

Point-of-Care Diagnostik von Harnwegsinfektionen urologischer Patienten: Eine experimentelle, prospektive Studie

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Des Fachbereichs Medizin

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von:

Marcel Oliver Grabitz

Aus Heidelberg

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner

Gutachter: Prof. Dr. med. Eugen Domann

Tag der Disputation: 31.08.2021

Inhalt

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Bakterien und ihre Behandlung – Ein Teufelskreis?.....	1
1.2	Harnwegsinfektionen (HWI).....	2
1.3	Point-of-Care Diagnostik	6
1.4	Loop-mediated isothermal amplification.....	6
	Abbildung 1 Schematische Darstellung der Entwicklung der Startstruktur für den Elongationszyklus der LAMP.....	7
	Abbildung 2 Schematische Darstellung des Elongations- und Amplifikationszyklus der LAMP	9
	Abbildung 3 Genie II von Amplex	10
1.5	Verbreitung der Resistenzgene	11
1.6	Urinteststreifen	13
1.7	Durchflusszytometrie	14
	Abbildung 4 Konzeptgrafik Durchflusszytometrie.....	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit	15
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Gerätschaften.....	17
2.2	Kulturmedien.....	17
2.3	Chemikalien.....	17
2.4	Primer.....	18
	Tabelle 1 Primersequenzen.....	18
2.5	Studienkollektiv.....	19
	Tabelle 2 Charlson Comorbidities Score Codierung.....	19
	Tabelle 3 Ausgewählte, urologische Diagnosen Codierung	21
2.6	Programme.....	22
2.7	Primererstellung.....	22
2.8	Primermischungsansatz.....	23

2.9 Die Positivkontrolle	25
2.10 Konzeption der Teststreifen	25
Abbildung 5 Exemplarische Darstellung eines Screeningpanels:	26
Abbildung 6 Exemplarische Darstellung eines Resistenzpanels:.....	26
2.11 Präanalytik der Proben.....	26
2.12 Genieverwendung und Programmparameter.....	27
2.13 Post-/Interanalytische Probenverwertung.....	28
2.14 Kulturelle Goldstandarddiagnostik.....	29
2.15 Datensammlung	30
2.16 Quantifizierung in vivo	30
2.17 Quantifizierung in vitro	31
2.18 Statistische Auswertung.....	31
<i>Vorgeschaltete Analyse: Durchflusszytometrie als Screening</i>	31
<i>Vorgeschaltete Analyse: Urinteststreifen als Screening</i>	33
Tabelle 4 Resistenzprädiktionskriterien	34
2.19 Probensammelungs- und Verwertungsalgorithmus	35
Abbildung 7 Probenverarbeitungsalgorithmus.....	35
3. Ergebnis	37
3.1 Patientenkollektiv.....	37
Abbildung 8 Drop-Out Darstellung.....	37
Tabelle 5 Patientenkollektiv: Das Patientenkollektiv ist nach durch den Goldstandard nachgewiesenen Harnwegsinfekten aufgetrennt.	38
Abbildung 9 Diagnosehäufigkeit im Patientenkollektiv, gruppiert	39
3.2 Resistenzvorkommen und Keimspektrum	39
Abbildung 10 Graphische Darstellung der Resistenzverteilung aller getesteten <i>E. coli</i>	40
Abbildung 11 Graphische Darstellung aller im Urin der Proben nachgewiesenen Bakterien	40
3.3 Vorgeschaltete Analyse: Urin-Durchflusszytometrie als Screening	41

Abbildung 12 ROC-Kurve Durchflusszytometrie	41
Abbildung 13 Vergleich Bakteriennachweis über Kultur in log ₁₀ (CFU/ml) (y-Achse) und Durchflusszytometrie in log ₁₀ (Anzahl/μl) (x-Achse). Aufgetrennt nach Abnahmemodalität	42
3.4 Vorgeschaltete Analyse: Urinteststreifen	43
Abbildung 15 Urinteststreifenuntersuchung Leukozytenesterase gegen kulturell positiv getestet	44
Abbildung 16 Urinteststreifenuntersuchung Nitrit	45
3.5 Quantifizierbarkeit der LAMP	46
Abbildung 17 Verdünnungsreihe.....	46
Abbildung 18 Kumulierter Kurvenverlauf, aufgeteilt nach Keimmenge im Goldstandard Urinkultur	47
Tabelle 6 Zusammenfassung der Quantifizierbarkeit und relevanter Cut-Offs für TTP durch die LAMP-Methode	48
3.6 gyrA-Screening Ergebnis.....	49
Tabelle 7 Gyrase Screening Testgütekriterien.....	49
3.7 Resistenzpanel Ergebnis.....	50
Tabelle 8 Resistenzpanel Testgütekriterien	50
Tabelle 9 Graphische Darstellung der Vorhersagerichtigkeit des Resistenzpanels	50
4. Diskussion.....	51
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.2 Durchführbarkeit des Point-of-Care Testsystems basierend auf der LAMP-Technik.....	51
4.3 Limitationen: Patientenkollektiv	52
4.4 Zusammenfassung der Testergebnisse der Urinteststreifen und der Durchflusszytometrie	53
Tabelle 10 Statistische Ausarbeitung zu Einflussfaktoren auf die prädiktive Stärke der Durchflusszytometrie mit dem Kriterium von 10 ⁵ CFU/ml bei einem Cutoff von 142/μl....	54
Abbildung 19 Graphische Darstellung der verschiedenen Diagnostikwerkzeuge im Vergleich.....	56

Tabelle 11 Auflistung der Gütekriterien von Durchflusszytometrie und Urinteststreifen, einzeln und als Kombinationsparameter	57
4.5 Vortestung mittels Durchflusszytometrie und Quantifizierung der LAMP	57
4.6 Falsch positive Screeningergebnisse	59
4.7 Limitationen: Resistenzpanel	61
4.8 Zusammenfassung moderner Harnwegsinfektionsdiagnostika	62
Tabelle 12 Vergleich der Parameter ausgewählter HWI-Diagnostika	64
4.9 Entscheidungsbaum unter Verwendung der LAMP-Technik	66
Abbildung 20 Entscheidungsbaum zum Einbinden der LAMP-Diagnostik in den klinischen Alltag (vgl. MiQ 2 05)	66
4.10 Ausblick	67
5. Zusammenfassung.....	68
6. Summary	70
7. Erklärung zur Dissertation	72
8. Danksagung	73
9. Literaturverzeichnis.....	75
9.1 Literaturquellen.....	75
9.2 Bilderquellen	84
10. Publikationen.....	85

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Bakterien und ihre Behandlung – Ein Teufelskreis?

Das verstärkte Auftreten multiresistenter Keime ist seit geraumer Zeit von weltweiter Bedeutung (Levy & Marshall, 2004).

Doch wie kommt es zu einer solchen Verbreitung von Antibiotikaresistenzen? Als ein einfaches Erklärungsmodell lässt sich die streng-darwinistische Vorstellung des Selektionsdruckes heranziehen:

Eine Bakterienpopulation ist genotypisch, und teilweise phänotypisch heterogen. Sollte diese Population unter Selektionsdruck geraten, beispielsweise weil sie einem Antibiotikum ausgesetzt wird, würden die wenigen Mitglieder einer resistenten Subpopulation diese Behandlung überleben¹. Der resistente Typus wäre somit selektioniert. Durch das Massensterben seiner Artgenossen verfügt der resistente Subtypus über große Mengen an Nahrung und Lebensraum um sich auszubreiten. Dadurch wird der Subtypus zum Haupttypus der Population und die neu entstehende Kolonie ist gegen das verwendete Antibiotikum bei der nächsten Verwendung resistent (Feng et al., 2016). Gleichzeitig ist das resistente Bakterium möglicherweise in der Lage seine Resistenz über Konjugation horizontal auf andere Bakterien, zum Teil sogar auf andere Bakteriengattungen, zu verteilen. So konnte auch in Metaanalysen ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Konsum von Antibiotika und der in der Bakterienpopulation beobachteten Resistenzlage gefunden werden (Bell, Schellevis, Stobberingh, Goossens, & Pringle, 2014).

Die Vorstellung, dass es durch Neumutation im antibiotika-gesättigtem Umfeld zu verteilungsreifen Resistenzgenen kommt, ist jedoch als sehr eindimensional zu bewerten. Zwar konnte gezeigt werden, dass solche Mutationen stattfinden, allerdings gehen sie oft mit einem Verlust an Fitness im Rahmen von Nährstoffnutzung und Wachstumsgeschwindigkeit einher. Darüber hinaus konnte Kreuz-Hypersensibilität beobachtet werden, was bedeutet, dass eine Subpopulation von Bakterien durch Mutation resistenter gegen Antibiotikum X aber anfälliger gegen Antibiotikum Y wird

¹ Eine eindruckliche Live-Darstellung der Selektion und Verbreitung resistenter Bakterien lässt sich in dem Experiment von (Baym et al., 2016) beobachten.

(Ben Zakour et al., 2016; Phan et al., 2015; Schembri et al., 2015; Zakour, Alsheikh-hussain, Ashcroft, Khanh, & Roberts, 2016). Vielmehr scheinen die relevantesten Resistenzmechanismen und -Gene bereits natürlich in geringer Menge vorzukommen, was sich z.B. bei Untersuchungen von antibiotikafernen Populationen von Menschen im Amazonasgebiet beweisen ließ (Clemente et al., 2015). Dies erscheint nachvollziehbar, denn viele Antibiotika sind Abkömmlinge von natürlich vorkommenden Pilzgiften. Die bedeutsamste Quelle an resistenten Erregern sind somit die Verbreitung über klonale Vermehrung und die Weitergabe ihrer Gene, zum Beispiel über Wasser (Finley et al., 2013).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass einzeln betrachtet sensible Bakterien sogenannte kommunale Resistenzmechanismen wie Biofilmbildung oder induzierte Heterogenität nutzen, um als Kolonie in einem Umfeld zu überleben, welches sich für das einzelne Bakterium als tödlich erweisen würde (Vega & Gore, 2014).

Um den immer resistenteren Erregern Herr zu werden, wird in der empirischen Therapie zu immer breiter wirksamen Antibiotika gegriffen, welche wiederum zu stärkerer Selektion und breiterer Resistenz führen. Sollte diese Strategie weiter verfolgt werden würde dies in einen Teufelskreis münden und schlussendlich jegliche antibiotische Therapie unwirksam machen.

Somit kann man zu dem Schluss kommen, dass die Verbreitung der Multiresistenz unter den Erregern Produkt von zwei Faktoren ist: Die Verbreitung der Resistenzgene unter den Mikroben und die Gabe von Antibiotika, die deren Entwicklung und Selektion befeuern.

1.2 Harnwegsinfektionen (HWI)

Im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten und Resistenzentwicklung lassen sich Harnwegsinfektionen (HWI) als geradezu modellhaft heranziehen: Harnwegsinfektionen gehören mit einer Lebenszeitprävalenz von 11-19% in der Allgemeinbevölkerung zu den häufigsten Krankenhausinfektionen (F. Wagenlehner et al., 2016). Insbesondere bei Frauen, die mit einer Lebenszeitprävalenz von 37% und einer Wiederholungsrate von 79% zu einer Risikogruppe gehören, werden

Harnwegsinfektionen aufgrund des Leidensdrucks häufig empirisch mit Antibiotika behandelt. (Butler, Hawking, Quigley, & McNulty, 2015) (Fünfstück, Helbig, Hofmann, & Hyome, 2017; Kranz, Schmidt, Lebert, Schmiemann, & Wagenlehner, 2017; F. M. Wagenlehner, Schmiemann, & DGU, 2017).

Harnwegsinfektionen treten zumeist durch Keimverschleppung von fakultativ-pathogenen Erregern aus ihrem natürlichen Habitat (Enddarm etc.) in die Harnwege und damit endogen auf. Als mögliche Risikofaktoren kommen dabei medizinische Eingriffe (z.B. transrektale Prostatastanzbiopsie), Katheterisierung und Sexualaktivität (sogenannte Honeymoon-Cystitis) in Betracht. Dabei wirken u.a. die kürzere Harnröhre und der relativ geringe Abstand zwischen Harnröhrenaussgang und Enddarm bei der Frau als begünstigende Faktoren für die Infektion.

Als klassische Symptome der Zystitis, die den größten Anteil der Harnwegsinfektionen ausmacht, stellen sich imperativer Harndrang, Dysurie, erschwerte oder als erschwert empfundene Miktion, Algurie, der Schmerz während der Miktion, und die Pollakisurie, die Miktion in kleinen Portionen, dar. Allgemeine vagale Symptomatik wie Übelkeit oder Unwohlsein, Fieber, sowie im akuten Verlauf krampfartige Schmerzen sind ebenfalls beschrieben und deuten dann auf eine ascendierende Infektion hin (Fritzenwanker, 2013).

Die am häufigsten auftretende Form der Zystitis, die unkomplizierte Zystitis der Frau, verläuft normalerweise sowohl meistens selbstlimitierend als auch komplikationslos (Kranz et al., 2017).

Folglich ist zusammenfassend festzuhalten, dass zumindest die ambulant erworbene, unkomplizierte Zystitis ein häufiges, in der Regel aber nicht lebensbedrohliches Leiden darstellt.

Die Diagnostik des Harnwegsinfekts an sich erfolgt normalerweise klinisch, ggfs. unterstützt durch einen klinisch validierten Fragebogen (Alidjanov et al., 2017). Sollte es zur Diagnose einer unkomplizierten Infektion des unteren Harntrakts kommen, so kann auch rein symptomatisch behandelt werden (Ibuprofen-symptomatische Therapie). Dies erzielt nach einer Woche immerhin eine Beschwerdefreiheit in bis zu bei 70% der Patienten, gegenüberstehend der 80% nach antibiotischer Behandlung. Allerdings sind aufsteigende Harnwegsinfekte mit der tatsächlich bedrohlichen

Pyelonephritis bei fehlender antibiotischer Behandlung häufiger (Kronenberg et al., 2017; F. M. Wagenlehner et al., 2017).

Sollten wie auch immer geartete verkomplizierende Faktoren vorliegen, so ist eine Erregerbestimmung für eine adäquate Therapie unerlässlich.

Das Standardwerk zur medizinischen Mikrobiologie Dörries (Auflage 2014) legt folgende Werte für die Verteilung der Erreger zugrunde:

- *E. coli* 50-70%
- Andere gramnegative Enterobacteriaceae 10-20%
- Enterokokken 10-20%
- *Pseudomonas aeruginosa* 5%
- *Staphylococcus aureus* 5%
- Pilze <5%

Diese Zahlen unterliegen allerdings einem systemischen Fehler, im Sinne dessen, dass manche Erreger anspruchsvoller zu kultivieren sind und deswegen unter Umständen kulturell nicht nachgewiesen werden können. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass mehr als 22% der Urinproben kulturell nicht erfasste Bakterien enthalten (z.B. *Lactobacillus*) (Fritzenwanker, Imirzalioglu, Chakraborty, & Wagenlehner, 2016; C. Imirzalioglu, Hain, Chakraborty, & Domann, 2008).

Folgendes lässt sich nun festhalten: Harnwegsinfekte sind optimal zum Erproben und Entwickeln einer Strategie zum Sparen von Antibiotika und Vermeiden von Resistenzen geeignet, da sie:

- Häufig sind
- Sowohl im ambulanten als auch im klinischen Setting auftreten
- Aufgrund ihres gut definierten Keimspektrums Nukleotidsequenz-gezielte Diagnostik ermöglichen (Chapelet et al., 2016)
- Im ambulanten Setting andere Resistenzen aufweisen und folglich nicht analog zu den klinischen Infektionen behandelt werden sollten (Schmiemann, Gágyor, Hummers-Pradier, & Bleidorn, 2012; Stapleton et al., 2017))
- Als asymptomatische Bakteriurie prophylaktisch vor chirurgischen Eingriffen behandelt werden müssen, um einer möglichen Keimverschleppung vorzubeugen. (F. M. Wagenlehner et al., 2017)

Besonders interessant hierbei ist das Beispiel der oben genannten transrektalen Prostatastanzbiopsie. Da hierbei das Rektum perforiert und in das Gewebe der Prostata eingedrungen wird, droht hierbei das Risiko einer Keimverschleppung und folgenden Gewebeinfektion. Um dies zu verhindern wird eine antibiotische Prophylaxe empfohlen. Die standardmäßig durchgeführte, empirische Therapie wurde mit einer 4,55% postbiopischen Infektionsrate beziffert, während die gezielte antibiotische Prophylaxe - basierend auf einer vorher durchgeführten Kulturabnahme und Resistogrammbestimmung aus dem Enddarm des Patienten - lediglich eine 0,72% postbiopische Infektionsrate nach sich zog (Cussans, Somani, Basarab, & Dudderidge, 2016; Davenport et al., 2017). Dies demonstriert sehr eindrücklich, dass die gezielte antibiotische Prophylaxe eine signifikante Reduktion infektiöser Komplikationen bewirkt.

Die Problematik der gezielten Therapie liegt momentan an der Zeit, die benötigt wird um adäquate, mikrobiologische Informationen zu einem Patienten zu generieren. Die häufig verwendeten Urin-Dipsticks (Teststreifen) sind sowohl einfach zu verwenden als auch schnell in ihrer Auswertung, was klassische Kriterien für ein Point-of-Care Verfahren sind, liefern allerdings weder die diagnostische Sicherheit, die man erwarten müsste, noch liefern sie treffgenaue Daten, die zur Identifizierung von Bakterien notwendig wären (Kunin, 1997). Vor allem bieten sie keinerlei Informationen zu Antibiotika-Resistenzen.

Der aktuelle Goldstandard der Diagnostik ist die Kultur, welche je nach Standort, inkl. phänotypischer Resistogrammbestimmung, zwischen zwei und drei Tage benötigt (Davenport et al., 2017). Diese Zeit ist in Szenarien einer Notfallsituation schlicht nicht abzuwarten und bei symptomatischen HWI möchte der Patient aufgrund der körperlichen Beschwerden sofort Behandlung erfahren.

Es ist also den Anforderungen eines gewissenhaften Umgangs mit den antibiotischen Reserven und der Erwartung an den Erfolg der Medizin durch den Patienten geschuldet, dass eine schnellere, präzisere und patientennähere Diagnostik gefunden wird.

1.3 Point-of-Care Diagnostik

Das Prinzip der Point-of-Care Diagnostik fußt auf der Überlegung, dass man bessere, schnellere, gezieltere Therapie am Patienten leisten kann, wenn man schnelleren Zugriff auf nötige Informationen hat. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Testung, bei der man die Proben in ein außerhalb der Behandlungsstelle liegendes Labor schickt, macht man sich bei der Point-of-Care Testung die Möglichkeit einer ortsnahen Diagnostik zunutze (Kost, 1995).

Das Verlassen der gut kontrollierbaren Laborumgebung und die Integration in den klinischen Alltag stellen besondere Herausforderungen an ein Point-of-Care Diagnostik Verfahren:

- Der Test muss einfach zu handhaben sein, damit er ohne spezifische, labormedizinische Ausbildung durchführbar ist.
- Der Test muss robust gegen Fehlerquellen sein um in der Klinik bestehen zu können.
- Der Test muss schnell durchführbar sein, damit ein Vorteil gegenüber der herkömmlichen Labordiagnostik besteht.

Um dies leisten zu können ist eine suffiziente Entwicklung des Tests und eine Vorbereitung von Seiten des Klinikums unerlässlich (Nichols, 2007).

Der Erfolg der Point-of-Care Tests ist jedoch unbestreitbar. Als ein allseits bekanntes Beispiel des Point-of-Care Testens lassen sich die Blutglukosemessung mittels kapillarem Blut oder die für die Herzinfarkt Diagnostik verwendeten Troponin-Schnelltests anführen. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere in der primärmedizinischen Versorgung ein Verlangen nach Point-of-Care Diagnostik besteht (Howick et al., 2014). Um diesem Bedarf an besseren medizinischen Werkzeugen nachzukommen entwickeln sich auch die Techniken der Point-of-Care Diagnostik in der Mikrobiologie weiter. Als besonders vielversprechender Ansatz hat sich die loop-mediated isothermal amplification (LAMP) erwiesen.

1.4 Loop-mediated isothermal amplification

Die LAMP-Methode basiert grob auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kary Mullis 1984), welche zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten genutzt werden kann. Dafür wird ein Mutter-DNA-Strang (sog. Template) von zwei bestimmten DNA-Oligonucleotiden (Primer) eingefasst, welche einem Enzym (thermostabile DNA-Polymerase) ermöglichen, einen Tochterstrang des Template zwischen den beiden Primern zu synthetisieren. Daraufhin wird das Template von dem Tochterstrang mittels einer Temperaturspitze getrennt und der Prozess kann sich zyklisch wiederholen.

Die LAMP-Methode wurde erstmals im Jahre 2000 entwickelt (Notomi et al., 2000) und verwendet im Gegensatz zu herkömmlichen Nucleotid-Amplifikationstechniken neben den „Vorwärts- und Rückwärtsprimern“ zusätzlich „Vorwärts-Innen-“ und „Rückwärts-Innen-Primer“. Spätere Optimierungen der Technik führten zusätzlich noch „Loopprimer“ ein (Nagamine, Hase, & Notomi, 2002).

Bei der Amplifikation kommt es zur Bildung eines girlandenförmigen DNA-Musters, welches sich selbst durch Anlagerung der zusätzlichen Primer prinzipiell endlos fortsetzen kann und nicht, wie bei der herkömmliche PCR, zyklisch über Erhitzen von dem Mutter-Strang getrennt werden muss (siehe Abbildung 1&2). Die Reaktion kann also durchgängig bei einer Temperatur durchgeführt werden (isothermal), was im Gegensatz zur klassischen trizyklischen PCR einen enormen Geschwindigkeitsvorteil ermöglicht und einen, relativ betrachtet, geringeren, apparativen Aufwand bedeutet. Gleichzeitig produziert es im Vergleich zu der PCR mehr Genprodukt in vergleichbarer Zeit mit entsprechenden Implikationen für die Detektionsmöglichkeiten.

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Entwicklung der Startstruktur für den Elongationszyklus der LAMP Grafik modifiziert nach [2]. Die farbigen Kästen stellen die Primersequenzen bzw. ihre Bindungstellen dar. F3 = Forward-Primer (Vorwärts-Primer); FIP = Forward-Inner-Primer (innerer Vorwärts-Primer); LF = Loop-Forward-Primer (Schlingen-Vorwärtsprimer); LB = Loop-Backward-Primer (Schlingen-Rückwärtsprimer); BIP = Backward-Inner-Primer (innerer Rückwärts-Primer); B3 = Backward-Primer (Rückwärts-Primer).

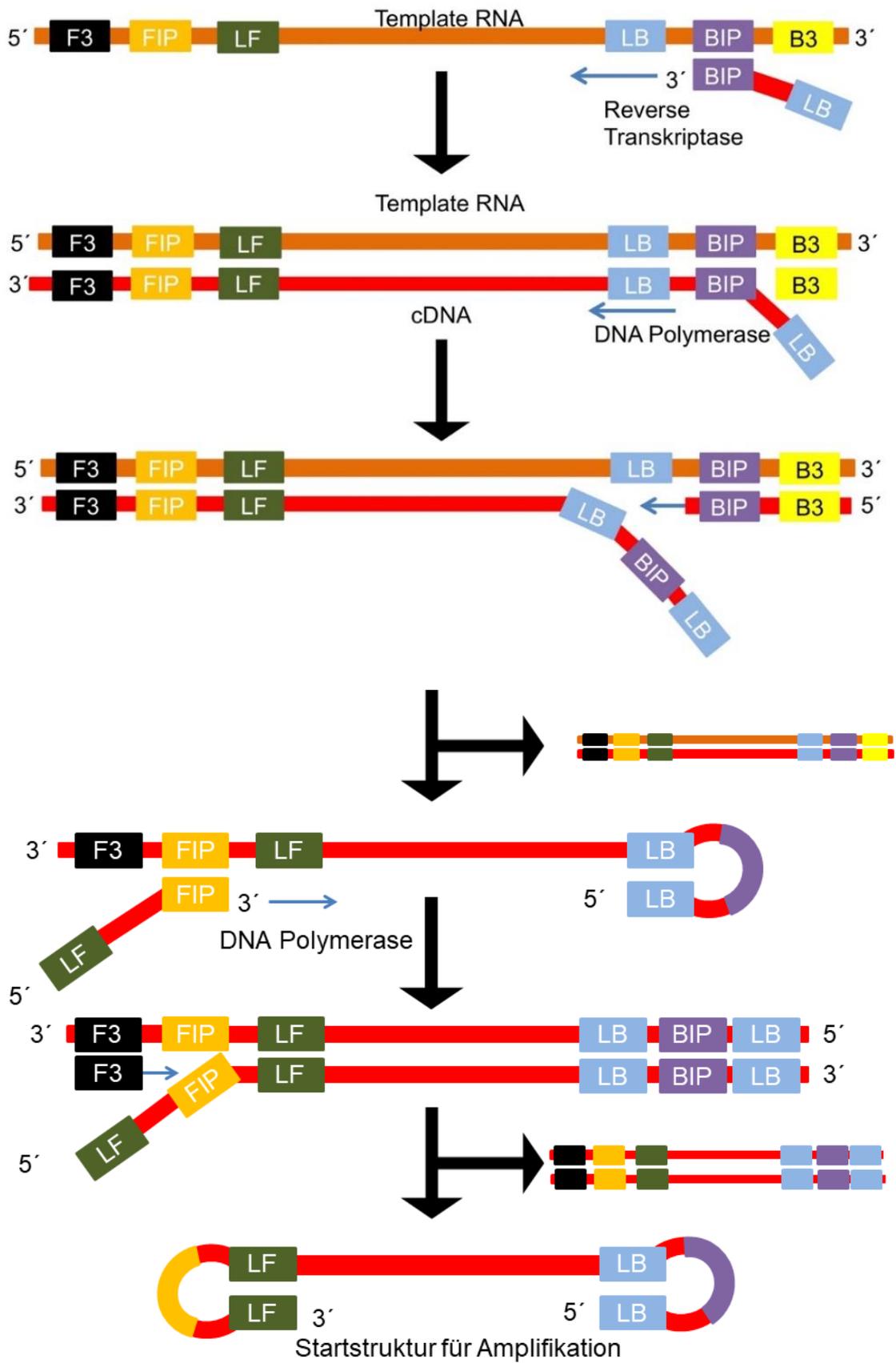
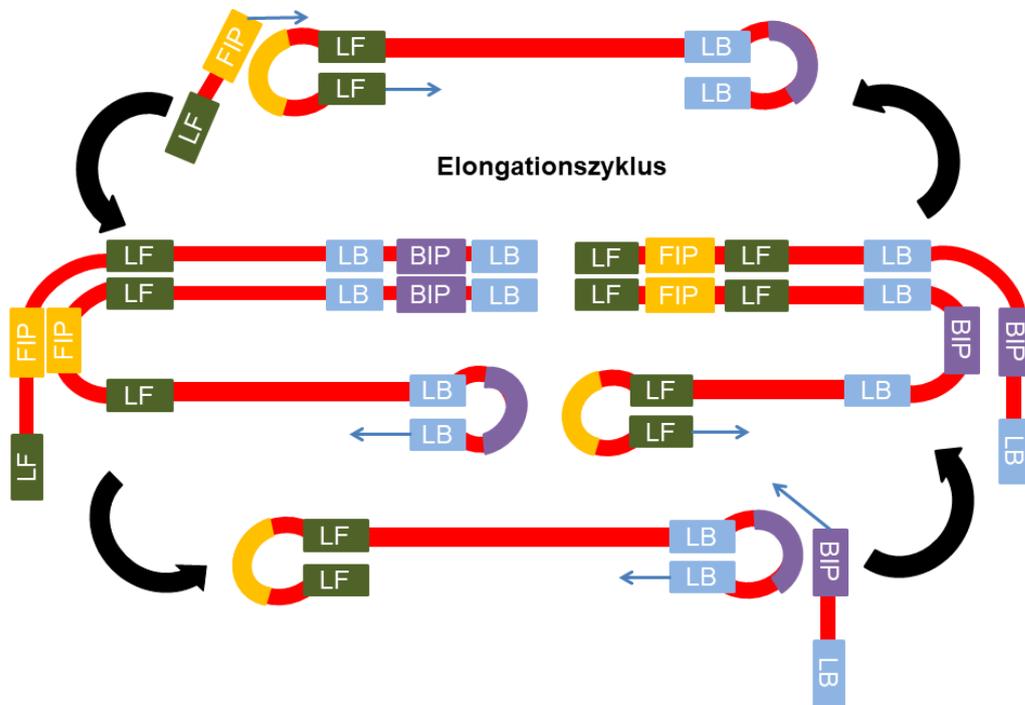


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Elongations- und Amplifikationszyklus der LAMP Grafik modifiziert nach [2], Benennung wie in Abbildung 1



Zur Detektion wird das Genprodukt fluoreszierend markiert, sodass bei großen Mengen mit dem bloßen Auge, ansonsten aber über maschinelle Erfassung die Amplifikation gemessen werden kann.

Anders als eine klassische PCR mit Geldetektion bietet die LAMP-Methodik, ähnlich wie die Realtime-PCR, die Möglichkeit, das Template zu quantifizieren. Bei der Detektion mit dem bloßen Auge ist das eher schwierig, aber mit geeignetem Equipment lässt sich der Verbrauch der Nukleotide bzw. die Produktion vom Amplifikat kontinuierlich messen, z.B. photometrisch. Über die zeitliche Dynamik dieser Messungen lassen sich Rückschlüsse über die Ausgangskonzentration des Template führen.

Da schon Mengen von bis zu 4 Kolonie-bildende-Bakterieneinheiten (KBE/ eng. *colony funding unit* = CFU) pro Milliliter im Test nachgewiesen werden können, spricht ein positives LAMP Ergebnis nicht zwingend für eine klinisch relevante Keimmenge in der Probe (Q. Yang et al., 2015).

Vorteilhaft an der LAMP ist zudem die gute Stabilität gegenüber Inhibitoren aus der Patientenprobe, welche bei der PCR ein großes Problem darstellen

können und eine extensive Präanalytik erfordern. Als Beispiel konnten in Endemie-Gebieten der Malaria in Thailand mit minimaler Vorbereitung der Patientenprobe gute, diagnostische Ergebnisse von Malaria erzielt werden (Sattabongkot, Tsuboi, Han, Bantuchai, & Buates, 2014).

Die Möglichkeit, ein kompaktes, ja sogar tragbares, Gerät (Abbildung 3), welches minimale Vorbereitung der Probe zur Analyse benötigt, das auf der LAMP-Technik basiert und resistent gegen Störfaktoren ist, zu konzipieren, prädestiniert diese Technik zur Anwendung im Point-of-Care Umfeld oder im Ressourcen reduzierten Umfeld des Feldeinsatzes in Entwicklungsländern.



Abbildung 3 Genie II von Amplex Schematische Darstellung des Teststreifens und der Beladung.

Dies wurde tatsächlich auch schon mit einigem Erfolg erreicht: So konnte gezeigt werden, dass man mittels der LAMP-Technik *Pseudomonas aeruginosa* und seine Toxingene im Point-of-Care Umfeld nachweisen konnte (Chen et al., 2016), dass das Gen der KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) sowohl im wissenschaftlichen als auch im wirtschaftlichen Umfeld detektiert werden kann (Nakano et al., 2014); eazyplex[®] SuperBug CRE von Amplex/ *mcr1*-Resistenzgenmessung (Can Imirzalioglu et al., 2017) und sogar Viren wie Influenza-Viren verlässlich und schnell detektiert werden können (Mahony et al., 2013).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bezüglich Salmonellen, Tuberkulose, oder Meningokokken erzielt werden (Geojith, Dhanasekaran, Chandran, &

Kenneth, 2011; Karrasch et al., 2018; Ponaka, Curioso, Patel, Elagin, & Slepnev, 2015; Q. Yang, Domesle, Wang, & Ge, 2016).

Darüber hinaus kann die LAMP ein sinnvolles Diagnostikwerkzeug in infektiologischen Notfallsituation wie einer Sepsis darstellen, um schnellstmöglich Keim und Resistogramm zu bestimmen (Rödel et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Antrieb, mittels der LAMP-Technik, einen Test zu entwickeln, der schnelle und verlässliche Diagnostik von dem Labor an den Patienten bringt und gleichzeitig Resistenzen nachweist, sehr zeitgemäß ist.

1.5 Verbreitung der Resistenzgene

Um eine Diagnostik der Empfindlichkeit von Bakterien über den Nachweis genetischer Marker zu ermöglichen, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen sollten aus praktischen Gründen innerhalb der untersuchten Bakterienpopulation einige wenige Gene hohe prädiktive Stärke für phänotypische Resistenz haben. Zum anderen sollten diese relevanten Gene bei einer großen Mehrheit der resistenten Bakterienpopulation vorliegen. Wird ein relevanter Anteil bakterieller Resistenz durch ein oder mehrere Resistenzgene verursacht, nach welchen nicht gesucht wird, werden diese systematisch übersehen – es sei denn, diese Resistenzgene wiederum liegen häufig genug zusammen mit dem gesuchten Resistenzgen vor. Dies erfordert vorab statistische Untersuchungen des Genoms.

Antibiotikaresistenzen werden bei Bakterien häufig auf Plasmiden kodiert, welche mittels Konjugation zwischen Bakterien übertragen werden können. Da Zugehörigkeit zu derselben Gattung hierfür nicht zwingend notwendig ist, werden über Bakterienstämme hinweg analoge Plasmide zur Resistenzentwicklung genutzt (Schumann, 2008; Smillie, Garcillan-Barcia, Francia, Rocha, & de la Cruz, 2010).

Als Beispiel lässt sich hierfür *Escherichia coli* ST131 heranzuführen, eine klonale Gruppe an *E. coli*, die mittlerweile weltweit nachgewiesen wurde und gleichzeitig der weltweit häufigste, extraintestinal-pathogene *E. coli* geworden ist. (Nicolas-Chanoine, Bertrand, & Madec, 2014)

Die Vorstellung, dass *Escherichia coli* ST131 durch seine umfassende Antibiotikaresistenz gegenüber sensibleren Artgenossen einen hohen Fitness-Verlust erfahren müsste, was einen Abfall der Pathogenität und Verdrängung unter optimalen Wachstumsbedingungen zur Folge hat, stellte sich bisher leider als unzutreffend heraus. Im Gegenteil: Untersuchungen zeigten, dass sich die klonale Linie des ST-131 *zunächst* durch bessere Kolonisationsfähigkeit an den Mensch adaptiert und vermehrt hat, und sich *später* durch Resistenzentwicklung an den wachsenden antibiotischen Druck in der medizinisch behandelten Menschenpopulation angepasst hat. Kurz nachdem Fluorchinolone weltweit massenhafte Anwendung in der Behandlung von Harnwegsinfektionen fanden, hatten Vertreter dieser Linie Resistenz gegen diese Wirkstoffgruppe erworben, und konnten sich dann, anders als andere Linien, weltweit behaupten und expandieren. Wiederum später wurde ein Plasmid mit dem Gen für CTX-M-15 aufgenommen, einer extended-Spectrum-Betalaktamase, welche Resistenz gegenüber den meisten Penicillinen und Cephalosporinen verleiht und so dem weiteren antibiotischen Druck entgegenwirkte (Ben Zakour et al., 2016). Diese Eskalationsspirale setzt sich auf medizinischer Seite mit der Anwendung von Carbapenemen fort – und folgerichtig wurden bereits auch einzelne Isolate der ST-131-Linie mit Carbapenemasen nachgewiesen.

Die Breitspektrum-Betalaktamase CTX-M-15, welche nach ihrer starken Hydrolyseaktivität gegen Cefotaxim (CTX), dem Ort ihrer ersten Entdeckung (München) und der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Gencluster 15) benannt wurde, ist nicht zuletzt aufgrund ihres Vorkommens in *Escherichia coli* ST131 eines der häufigsten Resistenzgene in Europa.

Ursprünglich entstammt der CTX-M-Cluster an Resistenzgenen der *Kluyvera* Spezies, einem peritrich begeißeltem Mitglied der Enterobacteriaceae, welche hauptsächlich in Wasser und Erde vorkommt und bei Immunkompetenten selten Infektionen hervorruft.

Hierin lässt sich ein Beispiel dafür finden, wie die Resistenzen fakultativ pathogener Erreger mittels Konjugation auf virulentere Bakterien übertragen werden, und dann in der klinischen Praxis Probleme verursachen.

Mittlerweile findet sich CTX-M-15 auch in anderen Spezies, beispielsweise *Salmonella* oder *Klebsiella* (Hudson, Bent, Meagher, & Williams, 2014).

Aufgrund der klonale Verbreitung dieser Erreger, kann man durch Nachweis von wenigen Resistenzgenen, welche wie CTX-M-15 keimfamilienübergreifend

übertragen werden, die phänotypische Resistenzlage dieser Keime voraussagen.

Durch sorgfältige Abwägung von Fragestellung, untersuchten Material und Patientenkollektiv, kann die Selektion der Zielgene noch weiter optimiert werden.

1.6 Urinteststreifen

Abgesehen von genotypischen Testmethoden und der klassischen Kultur gibt es noch andere Diagnostikwerkzeuge, die zu einer optimalen Versorgung des Patienten herangezogen werden können. Die sogenannten Urinteststreifen beispielsweise werden in der Praxis regelmäßig benutzt: Hierbei werden mittels eines chemischen Indikators per Farbumschlag beim Auftragen von frischem Urin bestimmte Inhaltsstoffe nachgewiesen. Besonders interessant sind dabei die Parameter Leukozyten, welche im handelsüblichen Format semiquantitativ in 4 Stufen angegeben werden, und Nitrit, welches rein qualitativ erfasst wird.

Menge und Vorhandensein von Leukozyten wird hierbei über das Vorhandensein der Leukozytenesterase (oder genauer Indoxylesterasen) bestimmt, welche bei der Lyse von Granulozyten in den Urin gelangt. Dies stellt eine wichtige Fähigkeit des Teststreifens dar, manifeste Infektionen der Harnwege, die normalerweise mit einer Entzündung im Sinne einer Leukozyturie einhergehen, zu detektieren.

Nitrit hingegen ist ein Metabolit von bestimmten Bakterienfamilien (auch nitritpositive Bakterien genannt), welches mittels der Nitratreduktase bei Vorhandensein einer bakteriellen Infektion der Blase aus Nitrat gebildet wird. Vorteilhaft an diesem Nachweis ist, dass Nitrit nicht von körpereigenen Zellen produziert wird, weswegen schon das Vorhandensein von Nitrit ohne jegliche Quantifikation für eine bakterielle Besiedelung spricht. Nachteilig ist, dass der Urin für ein nitritpositives Ergebnis einige Stunden in der Blase verweilen muss, damit die Nitratreduktion durch die Bakterien stattfinden konnte. Idealerweise sollte vor Abnahme des Testurins mindestens 2 Stunden vorher keine Miktion erfolgt sein – bei einer Harnwegsinfektion mit symptomatischer Pollakisurie oft nicht einfach umzusetzen. Zudem produzieren einige Erreger von Harnwegsinfektionen kein Nitrit (*Enterococcus species*, *Staphylococcus*

aureus, *Acetivobacter species*), weswegen sich eine Harnwegsinfektion und ein auf Nitrit negativ getesteter Urin nicht ausschließen. Auch gibt das Vorhandensein von Nitrit keinen Aufschluss über die Menge der bakteriellen Erreger.

Nichtsdestoweniger findet der Urinteststreifen aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und der Möglichkeit, sich einen „Überblick“ zu verschaffen, vielfach in der Klinik Verwendung, und manche Autoren bewerten ihn durchaus als exzellenten Schnelltest, wenn auch die Test-(Rahmen-) Bedingungen streng eingehalten werden müssen. (Devillé et al., 2004; Gieteling, van de Leur, Stegeman, & Groeneveld, 2014; Helling, 2002; Little et al., 2006)

1.7 Durchflusszytometrie

Ein weiteres Verfahren, was in der modernen Urindiagnostik genutzt wird, ist die Durchflusszytometrie. Die Methode der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie ist erstmals 1968 von Wolfgang Göhde entwickelt worden. Hierbei wird die Probe in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die Messküvette wird dabei so klein und eng gewählt, dass die korpuskulären Bestandteile der Probe lediglich einzeln durch den Lichtstrahl treten können. Das dabei entstehende Streulicht wird in Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht unterteilt. Das Vorwärtsstreulicht gibt Aufschluss über die Größe der Zelle, da es durch die Beugung um den Körper herum entsteht, wohingegen das Seitwärtsstreulicht Aufschluss über den Inhalt der Zelle gibt, da es durch Lichtbrechung an Zellorganellen entsteht (siehe Abbildung 4).

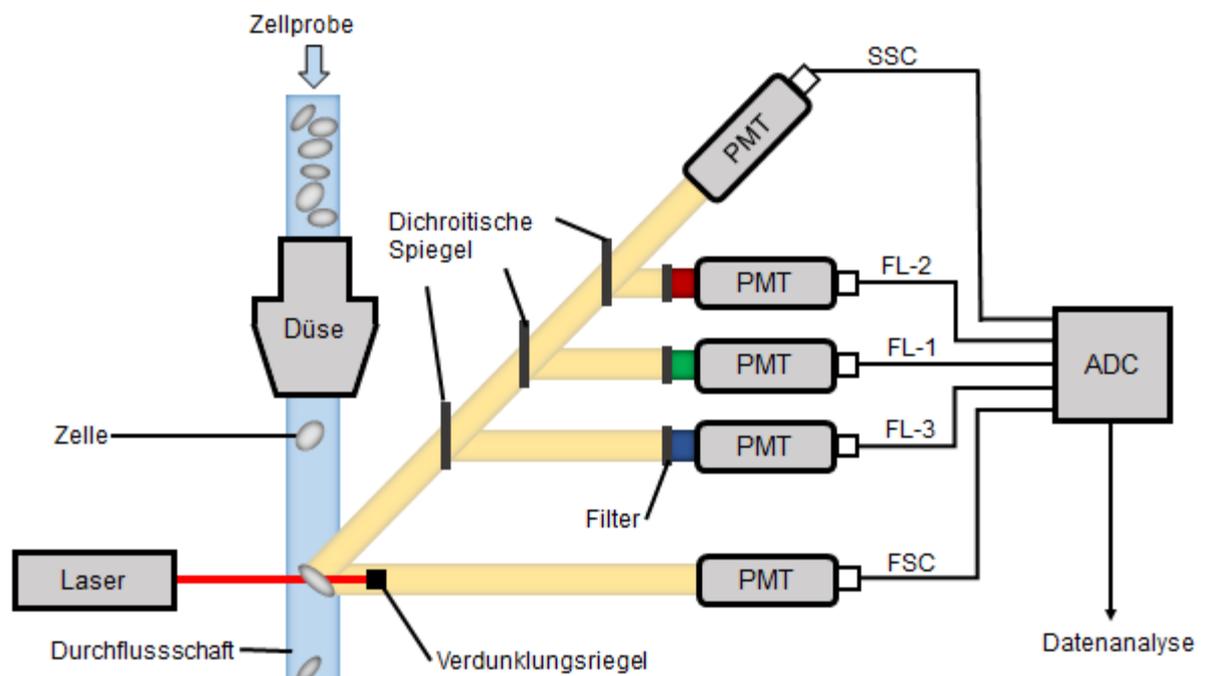
Die sich daraus ergebenden Daten ergeben ein recht genaues Bild um welche Zellart es sich beim Untersuchungsobjekt handelt. Leider beschreibt die Durchflusszytometrie lediglich Form und Größe der Zellen in der Probe und kann deswegen keine Aussage zu Vitalität, spezieller Spezies oder Resistenz der detektierten Bakterien machen.

Im Gegensatz zu der LAMP oder den Urinteststreifen benötigt man für die Durchflusszytometrie zurzeit auch noch eher größere, stationäre Laborgeräte. Allerdings ist die Durchflusszytometrie so dergestalt schnell in der Probenanalyse (circa eine Minute pro Probe), dass diese in einem Haus der Maximalversorgung mit angeschlossener, klinischer Chemie bei adäquatem Verarbeitungsalgorithmus in die kurzfristigen, diagnostischen Entscheidungen

der Proben miteinbezogen werden kann (Monsen & Ryden, 2017; Sun et al., 2018).

Im Besonderen ist die Durchflusszytometrie dafür bekannt, dass sie zuverlässig in der Lage ist, negative Proben (steril oder mit Keimzahlen in klinisch irrelevanter Konzentration) schnell auszusortieren und damit den längeren und umständlicheren Diagnostikwerkzeugen Arbeit zu ersparen. (Duong et al., 2016; Helling, 2002; Müller et al., 2018)

Abbildung 4 Konzeptgrafik Durchflusszytometrie PMT = photomultiplier tubes (lichtverstärkende Röhre); SSC = sidescatter (Seitwärtsstreulicht); FSC = forward scatter (Vorwärtsstreulicht); ADC = analog to digital converter (Analog zu Digital Übersetzer). Grafik modifiziert nach [1]



1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Vorfeld zur tatsächlichen Datenerhebung der Studie wurden über ein Jahr konsekutiv alle in der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus Liebig Universität Gießen angezüchteten Erreger von Harnwegsinfektionen aufgehoben und deren Genome komplett sequenziert, sowie die phänotypische Resistenz bestimmt. Die sich daraus ergebenden Daten wurden genutzt um einen Plan zur Validierung und Testung eines Primerpanels zur Testung auf *E. coli* und dessen Resistenzgene zu entwerfen.

Zielsetzung der Arbeit ist es einen Algorithmus zur Point-of care Diagnostik von Urinen urologischer Patienten zu entwickeln, mit Fokus auf dem Resistenznachweis von *E. coli*.

Die experimentell erfassten Daten wurden mit den routinemäßig erhobenen, klinisch etablierten Parametern (Durchflusszytometrie, Urinteststreifen, MALDI-TOF, kulturelle Testung) verglichen. In diesem Zuge wurde geprüft, in wie weit die Aufnahme von Durchflusszytometrie und anderer bereits etablierter, nicht kultureller Testverfahren der Urindiagnostik den Probenalgorithmus vervollständigen und zu einer zuverlässigeren und zielorientierten Diagnostik beitragen können.

Letztlich gilt es zu erforschen, ob, unserer Hypothese folgend, eine genetische Antibiotikaresistenzdiagnostik, basierend auf der LAMP-Technik, eine hinreichend gute Ergänzung/Alternative für die phänotypische, kulturelle Diagnostik darstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Gerätschaften

- Perfect Spin 24 Zentrifuge (Peqlab)
- 12 Slot Heizblock (Nippon Genetics)
- Mehrzweckheizblock (JLU-eigene Werkstatt)
- Genie II (Amplex)
- Combispin FVL-2400N (Peqlab)
- Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)
- Airclean600 PCR Wordstation (AirClean)
- Piko Thermalcycler (Finnzymes Instruments)
- Brutschrank (Heraeus)
- Elektrophoresekammer (JLU-eigene Werkstatt), Verwendung unter 150V
- KS 4000 i control (IKA)
- Ultrospec 10 Cell Density Meter (biochrom)
- Scan 500 (Interscience)
- eLine 120 µl 8-Kanal Pipette (Satorius)
- eLine 5ml Pipette (Satorius)
- 0,1-1ml Pipette (Biohit)
- 10-200 µl Pipette (Biohit)
- 2-20 µl Pipette (Biohit)
- 1-10 µl Pipette (Biohit)

2.2 Kulturmedien

- Brilliance UTI Agar (Thermo Fisher Scientific)
- MacConkey Agar No. 3 (Thermo Fisher Scientific)
- Chocolate Agar Medium (Thermo Fisher Scientific)
- LB Broth (Thermo Fisher Scientific)

2.3 Chemikalien

- Isothermale Master Mixe 400 Reaktionen (Amplex)
- Phusion Flash High-Fidelity PCR Mastermix (ThermoScientific)

- 1% Agarosegel in TrisBoratEDTA (TBE)-Puffer. Verwendung unter 150 Volt
- 25% Fioll-400 Auftragspuffer mit Bromphenol-Blau (ebenfalls 25%) (Pharmacia Biotech AB)
- Die Positivkontrolle des Tests wurde aus der Gyrase eines repräsentativen *E. coli* aus dem Stammarchiv der Mikrobiologie Gießen mittels PCR erstellt.

2.4 Primer

Die verwendeten Primer wurden durch eurofins Genomics (Anzingerstraße 7a D- 85560 Ebersberg) hergestellt. Zur Verwendung aus der lyophilisierten Form mit aqua dest. auf 100pmol/µl verdünnt.

Tabelle 1 Primersequenzen

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
gyrAS_F3_3	GTCGTTGGTGACGTAATCGG
gyrAS_B3_3	GCCATCAGTTCATGGGCAAT
gyrAS_FIP_3	CCAGCATGTAACGCAGCGAGAAGACTCGGCGGTTTATGACA
gyrAS_BIP_3	TAACCTCGGTTCCATCGACGGCTTTCGCCAGACGGATTTCC
gyrAS_LF_3	TGCGCCATACGGACGATC
gyrAS_LB_3	ACTCTGCGGCGGCAAT
tem1b_F3_1	CTTACGGATGGCATGACAGT
tem1b_B3_1	CATTGCTGCAGGCATCGT
tem1b_FIP_1	CGGTCTCCGATCGTTGTGTCAGAGCAGTGCTGCCATAACCA
tem1b_BIP_1	ATGGGGGATCATGTAACCTGCCGTCACGCTCGTCGTTTGG
tem1b_LF_1	TGGCAGCAGTGTTACTCA
tem1b_LB_1	TGATCGTTGGGAACCGGAGCT
ctxm15_F3_1	GGGAGACGAAACGTTCCG
ctxm15_B3_1	GGCAGTCCAGCCTGAATG
ctxm15_FIP_1	TGCCCGAGGTGAAGTGGTATCACCGAGCCGACGTTAAACAC
ctxm15_BIP_1	TGGGTAAAGCATTGGGCGACAACCGGTGGTATTGCCTTTC
ctxm15_LB_1	GGCGCAGCTGGTGACAT
ctxm14_F3_1	CGCGATCGGCGATGAGA
ctxm14_B3_1	CGCCGGTCGTATTGCCT
ctxm14_FIP_1	TGGTGTCTCTCGGGTCGCCGTCTGGATCGCACTGAACC
ctxm14_BIP_1	CGATGGCGCAGACGTTGCGTGAGCCACGTCACCAACTG
ctxm14_LB_1	CAGCTTACGCTGGGTCATG
sul2_F3_2	GCTGGCGACATCATGGAT
sul2_B3_2	AGAAGCACCGGCAAATCG

sul2_FIP_2	GCGTTTGATACCGGCACCCGCACATTGCGGGCATTCTTTG
sul2_BIP_2	TTGATCCCGGCATGGGGTTTTAGCCGCAATTCATCGAACC
sul2_LB_2	CTCCCGAAACCTCGCTCTC
dfrA17_B3_2	GAGCTTGAAATTCGGTCTT
dfrA17_FIP_2	CGCTTTAAAGAGTAGTTGCTCACCCGTAATCGGTAGTGGTCC
dfrA17_BIP_2	TCACATATAATCAATGGCTCCTTGCTCACTACTGCATATTTGCGAT
dfrA17_LB_2	TTTGACTCTATGGGTGTTCTTCCAA
sul1_F3_3	CGCACCGGAAACATCGC
sul1_B3_3	CGCTTCGCAGATCTCCAG
sul1_FIP_3	CGAGACCAATAGCGGAAGCCCCTGCACGTGCTGTGCGAACC
sul1_BIP_3	ACCGTTGGCCTTCTGTAAAGGGTAGTCAGCGCCATTGCC
sul1_LF_3	CGCCGACTTCAGCTTTTGAA
sul1_LB_3	GAGCCTTGCGGCGGAACCT
hlyA_F3_2	CTACATCTGCTGCTGCTG
hlyA_B3_2	GTTAACGATGCATCAATAGCT
hlyA_FIP_2	TCTTGGCACGTTTAACTTATCGGGTGACACTGGCAATTAGTCC
hlyA_BIP_2	AGAGGAGTATTCACAACGATTCAAACCTGTTTCTTTGTGGAAAGC
hlyA_LB_2	TTGGATACGATGGTGACAGTTTACT

2.5 Studienkollektiv

Alle Urinproben, die zur Erhebung der Daten genutzt wurden, wurden ohne Vorauswahl konsekutiv von Anfang März 2017 bis Anfang Oktober 2017 aus dem laufenden Patientenaufgebot der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus Liebig Universität Gießen entnommen.

Im Zuge der genauen Beschreibung unseres Studienkollektivs haben wir eine Auswertung der codierten Diagnosen durch die behandelnden Ärzte durchgeführt. Die Neben- und Hauptdiagnosen wurden basierend auf einem modifizierten Charlson Comorbidities Algorithmus zusammengefasst, der als guter Prädiktor für die Gesamtmorbidität von Patienten angesehen wird. (vgl. Quan et al. 2005).

Hierfür wurde folgende Diagnosecodes nach dem ICD10 System wie folgt zusammengefasst:

Tabelle 2 Charlson Comorbidities Score Codierung

Diagnosengruppe	Codes (* bedeutet jede weitere Unterdiagnose unter der gleichen Ziffer)
-----------------	--

Myokardiale Infarktleiden	I21.*; I22.*; I25.2
Kongestive Herzinsuffizienz	I09.9; I11.0; I13.0; I13.2; I25.5; I42.0; I42.5; I 42.7; I42.8; I42.9; I43.*; I50.*; P29.0
Periphere vaskuläre Erkrankungen	I70.*; I71.*; I73.1; I73.8; I73.9; I77.1; I79.0; I79.2; K55.2; K55.8; K55.9; Z95.8; Z95.9
Zerebrovaskuläre Erkrankungen	G45.*; G46.*; H34.0; I60.*; I61.*; I62.*; I63.*; I64.*; I65.*; I66.*; I68.*; I69.*
Demenz	F00.*; F01.*; F02.*; F03.*; F05.1; G30.*; G31.1
Chronische pulmonale Erkrankungen	I27.8; I27.9; J40.*; J41.*; J42.*; J43.*; J44.*; J45.*; J46.*; J47.*; J60.*; J61.*; J63.*; J64.*; J65.*; J66.*; J67.*; J68.4; J70.1; J70.3
Rheumatische Erkrankungen	M05.*; M06.*; M31.5; M32.*; M33.*; M34.* M35.1; M35.3; M36.0
Ulcererkrankungen	K25.*; K26.*; K27.*; K28.*;
Milde Erkrankungen der Leber	B18.*; K70.0; K70.2 K70.3; K70.9; K71.3; K71.4; K71.5; K73.*; K74.*; K76.0; K76.2; K76.3; K76.8; K76.9; Z94.4
Diabetes ohne chronische Komplikationen	E10.0 E10.1; E10.6; E10.8; E10.9; E11.0; E11.1; E11.6; E11.8; E11.9; E12.0; E12.1; E12.6; E12.8; E12.9; E.13.0; E13.1; E13.6; E13.8; E13.9; E14.0; E14.1; E14.8; E14.9
Diabetes mit chronischen Komplikationen	E10.2; E10.3; E10.4; E10.5; E10.7; E11.2; E11.3; E11.4; E11.5; E11.7; E12.2; E12.3; E12.4; E12.5; E12.7; E13.3; E13.4; E13.5; E14.2; E14.3; E14.4; E14.7
Hemi- oder Paraplegie	G04.1; G11.4; G80.1; G80.2; G81.*; G82.*; G83.0; G83.1; G83.2; G83.3; G83.4; G83.9
Renale Erkrankungen	I12.0; I13.1; N03.2; N03.3; N03.5; N03.6; N03.7; N05.2; N05.3; N05.4; N05.7; N05.7; N13.*; N19.*; N25.0; Z49.0; Z49.1; Z49.2; Z94.0; Z99.2
Jegliche maligne Neubildungen	C00.*; C01.*; C02.*; C03.*; C04.*; C05.*; C06.*; C07.*; C08.*; C09.*; C10.*; C11.*; C12.*; C13.*; C14.*; C15.*; C16.*; C17.*; C18.*; C19.*; C20.*; C21.*; C22.*; C23.*; C24.*; C25.*; C26.*; C30.*; C31.*; C32.*; C33.*; C34.*; C37.*; C41.*; C43.*; C45.*; C46.*; C47.*; C48.*; C49.*; C50.*; C51.*; C52.*; C53.*; C54.*; C55.*; C56.*; C57.*; C58.*; C60.*; C61.*; C62.*; C63.*; C64.*; C65.*; C66.*; C67.*; C68.*; C69.*; C70.*; C71.*; C72.*; C73.*; C74.*; C75.*; C76.*; C81.*; C82.*; C83.*; C84.*;

	C85.*; C88.*; C90.*; C91.*; C92.*; C93.*; C94.*; C95.*; C96.*; C97.*;
Moderate oder schwere Lebererkrankungen	I85.0; I85.9; I86.4; I98.2; K70.4; K71.1; K72.1; K72.9; K76.6; K76.6
Metastasierte solide Tumoren	C77.*; C78.*; C79.*; C80.*;
AIDS/HIV	B20.*; B21.*; B22.*; B24.*;

Der Charlson Comorbidity Index ist ein sehr gutes Werkzeug, um die Überlebensrate von Patienten abzuschätzen und somit bestens dafür geeignet, einen Einblick in die allgemeine Morbidität eines Patientenkollektives zu geben. Zugleich wurden auch klassische urologische Diagnosen, die auf komplizierende Faktoren für HWI hinweisen berücksichtigt. Um dem Rechnung zu tragen haben wir folgende ICD10 verschlüsselte Diagnosen wie folgt zusammengefasst. Besonderes Augenmerk wurde auf die Erkrankungen der Harnwege sowie die Neoplasien der Urogenitalorgane gelegt.

Tabelle 3 Ausgewählte, urologische Diagnosen Codierung

Diagnosengruppe	Codes (* bedeutet jede weitere Unterdiagnose unter der gleichen Ziffer)
Niereninsuffizienz	N18.*; N19.*
Nierentransplantation	Z94.*
Dialysepflichtigkeit	Z99.2;
Urolithiasis	N20.*; N21.*; N23.*
Entzündliche Erkrankungen der Urogenitalorgane	N30.*; N34.*; N41.*; N45.*; N49.*; N10.*; N11.*; N12.*;
Urothel malignome	C67.*; C65.*; C66.*; C68.*;
Prostatamalignome	C61.*
Malignome der männlichen Reproduktionsorgane	C62.*; C63.*;
Malignome der Niere	C64
Prostatahyperplasie	N40.*
Hämaturie	R31.*; N02.*
Tubulointerstitielle Nierenerkrankungen	N10.*; N11.*; N14.*; N15.*; N16.*
Obstruktive Uropathie und Refluxuropathie	N13.*
Nicht näher bezeichnete Symptome, die das Harnsystem betreffen (Inkontinenz, Algurie, Anurie/Polyurie, Ausfluss, etc.)	R30.*; R31.*; R32.*; R33.*; R34.*; R35.*; R36.*; R39.*; N39.*;
Iatrogen verursachte Schäden des Urogenitaltrakts (Strikturen nach Katheterisierung, Nierenversagen iatrogenen Art, etc.)	N99.*

2.6 Programme

- Microsoft Office 2013
- CLC Genetics Workbench 7.03 (Komparative genetische Analysen, Primerdesign)
- NCBI Complete Microbial genomes
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>)
- PrimerExplorer, Lamp Primer designing software
(https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html)
- STATA (Version 13, StataCorp, College Station, Texas)
- SWISSLAB Mikrobiologie (NEXUS SWISSLAB GmbH)
- SWISSLAB Zentrallabor (NEXUS SWISSLAB GmbH)
- Meona (Meona GmbH)
- Mendeley (Elsevier B.V.)

2.7 Primererstellung

Für die Erstellung der Primer wurde zuerst das passende Gesamtgenom des Bakteriums aus der Genomdatenbank von PubMed heruntergeladen.

Dieses wurde in der CLC Genetics Workbench 7.03 geöffnet.

Viele Bakterien, ins Besondere *E. coli*, verfügen über recht variable Genome. Um einen gut funktionsfähigen Speziesprimer zu konzipieren, musste ein Genlocus, der hochkonserviert ist, also in fast jedem *E. coli* vorhanden und möglichst gleich ist, gefunden werden. Durch vorherige Analyse der im Urin vornehmlich vorkommenden *E. coli*, stellte sich das Gen für die Gyrase, *gyrA*, als am besten geeignet heraus.

Als nächstes wurden die Sequenzen von Gyrasegenen verschiedener repräsentativer *E. coli* Stämme nach einem möglichst langen und variationsarmen Abschnitt abgesucht. Damit konnte gewährleistet werden, dass der neu zu konzipierende Primer möglichst alle Bakterien der designierten Gattung entdecken und markieren konnte.

Die gefundene Sequenz wurde in PrimerExplorer geöffnet um LAMP-Primer-Sets zu generieren. Diese wurden zur Kontrolle mit Ziel-Sequenzen

(hier die *gyrA* Gen-Allele) erneut verglichen (ob sie an allen Allelen binden) und dann von eurofins Genomics hergestellt.

Um divergente Validität der identifizierten Primersequenzen sicherzustellen, wurden diese zunächst in mehreren Labortestungen getestet. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf positive Proben, positive Kontrollen und Kreuzprobe gelegt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass spezifische Primersets nicht einander ähnliche Bakterien wie beispielsweise *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* fälschlicherweise beide erkennen.

Nachdem diese Tests zufriedenstellend verlaufen waren, konnten die Primer für die klinische Studienanwendung bestellt werden.

Zur Erstellung der Resistenzgenprimer haben wir im Vorfeld der Studie über 1,5 Jahre hinweg konsekutive Urinproben aus dem Patientenaufgebot der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie gesammelt (Ethikvotum: AZ 101/19). Diese wurden mittels Gensequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation-Sequencing; NGS) auf ihren genetischen Code untersucht. Hiernach wurde zwischen vorhandenen, phänotypischen Resistenzen und den genotypischen Codes eine korrelative Analyse angestellt.

Die Gene, die die höchste Korrelation mit den gesuchten Antibiotikaresistenzen aufwiesen, wurden als potentielle Zielgene ausgesucht.

Nun wurden LAMP-Primersets zur Detektion dieser Zielgene entworfen, analog dem Prinzip wie für die Spezies-Detektionsprimer (*gyrA*-Gen).

Diese Primer wurden strengen, laborinternen Kontrollen auf Sensitivität (Detektion möglichst vieler Vertreter der gesuchten Spezies sowie Detektion von Isolaten in klinisch relevanter Konzentration), Spezifität (keine Kreuzreaktion bei verwandten Spezies) überprüft, bevor sie im klinischen Setting angewandt wurden.

2.8 Primermischungsansatz

Die lyophilisierten Primer wurden entsprechend der Angaben des Herstellers in Aqua dest. aufgelöst, sodass eine 100pmol/µl-Lösung entstand.

Aus den Stammlösungen wurden Aliquots angesetzt. Diese und alle ihre Folgeprodukte werden bei -20°C gelagert und während ihrer Benutzung auf Eis gehalten. Primer-Stocklösungen wurden aus Reinheitsgründen immer unter einer DNA-freien Sterilbank geöffnet. Da die LAMP mit mehreren Unterprimern arbeitet, die girlandenförmige Amplifikationsstrukturen bilden, haben wir diese Unterprimer zu einem gesamten Primermischansatz zusammengefügt, der als fertiger Ansatz, zusammen mit dem entsprechenden Mastermix, das jeweilige Gen detektieren konnte. (z.B. die Unterprimer *gyrF3*; *gyrB3*; *gyrFIP3*; *gyrBIP3*; *gyrLF*; *gyrLB* zu Gesamtprimer *E. coli* Gyrase: *gyr3*). Analog zu Abbildung 1&2 (siehe Einleitung) stehen F3, FIP und LF für den Vorwärts-, den inneren Vorwärts- und den Schleifen-Vorwärtsprimer. Ebenso stehen B3, BIP und LB für den Rückwärts-, den inneren Rückwärts- und den Schleifen-Rückwärtsprimer. Folgendes Mischverhältnis wurde, basierend auf der einzelnen Konzentration der Komponenten von 100pmol/µl angewandt:

- Aqua dest: 72 µl
- F3-Primer: 2 µl
- B3-Primer: 2 µl
- FIP-Primer: 8 µl
- BIP-Primer: 8 µl
- LF-Primer: 4 µl
- LB-Primer 4 µl
- Entstehendes Gesamtvolumen: 100 µl Abschnittsprimergemisch.

Sollte ein Gemisch nicht über einen LF Primer in der Konzeption verfügen (beispielsweise der CTXM-15 Primer-Ansatz), so wurde stattdessen mehr Wasser hinzugegeben:

- Aqua dest: 76 µl
- F3-Primer: 2 µl
- B3-Primer: 2 µl
- FIP-Primer: 8 µl
- BIP-Primer: 8 µl
- LB-Primer 4 µl
- Entstehendes Gesamtvolumen: 100 µl Abschnittsprimergemisch.

Die daraus entstehenden Abschnittsprimer werden räumlich getrennt von den Stammlösungen verwahrt und niemals gemeinsam geöffnet.

2.9 Die Positivkontrolle

Um die Positivkontrolle herzustellen wurde der Abschnitt des Gyrasegens, welcher in *E. coli* nachgewiesen werden sollte, mittels einer Nukleinsäureamplifikationstechnik (PCR) aus gezüchtetem *E. coli* isoliert und vervielfältigt.

Hierzu wurden 12,5 µl des Phusion Mixes mit jeweils 1 µl der Gyrase Primer (F3 und B3) und 10,5 µl Wasser, in welchem vorher eine *E. coli* Kolonie verrührt und welches danach bei 99°C für 12 Minuten gekocht wurde, versetzt. Der fertige 25 µl Ansatz wurde in einem handelsüblichen Thermocycler (in dem Fall ein Piko Thermalcyclus der Marke Finnzymes) für 1,5 Stunden amplifiziert.

Zur Kontrolle der Reinheit wurde hiernach das fertige Produkt mit 1/5 Ficoll beschwert bzw. markiert und über eine Gelelektrophoresekammer bei 150V eine Stunde bei 250 mA getrennt. Das hierfür verwendete Gel bestand aus 1% Agarose in TBE-Puffer. Nachdem die Reinheit des Produktes sichergestellt war, wurde die Konzentration mittels eines Nanodrops bestimmt. In unserem Fall wurde eine Konzentration von 42,7 ng/ml gemessen.

Das fertige Produkt wurde mit Aqua dest. zu einer nutzbaren Menge verdünnt. Tests erwiesen, dass das Produkt noch in einer Verdünnung von 1:10¹⁶ problemfrei messbar war.

2.10 Konzeption der Teststreifen

Zur Vorbereitung der Teststreifen wurden blanke Genie© Tubes von Amplex verwendet. In diese wird je 15 µl des isothermalen Mastermixes (ebenfalls von Amplex) gegeben. Dieser Streifen kann nun mit je 5 µl des gewünschten Primers und weiteren 5 µl der vorbereiteten Probe bestückt werden.

Folgende Schemata wurden angewendet:

Abbildung 5 Exemplarische Darstellung eines Screeningpanels: Zum Screening der gesammelten Urinproben wurden diese nach ihrer Aufbereitung jeweils einzeln in mit Gyr3 beladene Wells eingebracht. Gyr3 = *E. coli*-Gyrase Primer; neg = Negativkontrolle (15 µl Enzym, 5 µl *E. coli*-Gyrase, 5 µl Aqua dest); pos = Positivkontrolle (15 µl Enzym, 5 µl *E. coli*-Gyrase, 5 µl *E. coli*-Gyrase Template)

Gyr 3	Neg	Pos					
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	------------	------------

Abbildung 6 Exemplarische Darstellung eines Resistenzpanels: Nach erfolgter Identifikation einer Gyr3 positiven Urinprobe durch das Screeningpanel, wurde diese auf ein Resistenzpanel eingebracht. Tem1b = blaTem1b (eine häufige Schmalspektrumbetalaktamase); CTX 14 = CTX-M 14 (für das Gen einer häufig vorkommenden extended spectrum betalaktamase (ESBL); CTX 15 = CTX-M 15 (ebenfalls für ein häufiges ESBL kodierendes Gen); Sul2.2 = Sul2.2 (Gen für eine Dihydropteroate-Synthase, welche im Sinne eines alternativen Stoffwechselwegs im Folsäure-Metabolismus eine Resistenz gegen „Folsäure-Antagonisten“ vermitteln kann) ; dfrA17 = dfrA17 (Gen für eine Dihydrofolate-Reductase, die ähnlich wie sul2 eine Resistenz gegen Folsäure-Antagonisten vermitteln kann); sul1.3 = sul1.3 (Inhibitionskontrolle; eine Primerpaarung, die sich in Abwesenheit jeglicher Template selbst amplifizieren kann. Ursprünglich als Alternative zur Folsäure-Resistenzgen-Testung konzipiert, stellte sich bald heraus, dass jenes Primersset auch ohne Template DNA zur Amplifikation in der LAMP-Reaktion führte); hylA = Hämolysin (bakterieller Pathogenitätsfaktor der eine statistische Antiproportionalität zu der Wahrscheinlichkeit, dass eine Resistenz gegen Flourchinolone vorliegt, besitzt.)

Gyr 3	Tem 1b	CTX 14	CTX 15	Sul 2.2	dfrA17	Sul1.3	Hyla
--------------	---------------	---------------	---------------	----------------	---------------	---------------	-------------

Alle Panels sollten zwar nach Möglichkeit frisch angesetzt und verbraucht werden, können aber auch mit gutem Ergebnis bei -20°C gelagert und später verwendet werden.

2.11 Präanalytik der Proben

Angelehnt an die Aufreinigungsverfahren des easyplex®CRE Swab Panels (Amplex, zur Detektion von Carbapenemasen aus Urin) wurde folgendes Protokoll entworfen:

Aus den originalen Urinproben, die die Patienten in der Urologie zur Standarddiagnostik abgeben, wurden jeweils 1,5ml entnommen und in 2ml Eppendorfgefäße überführt.

Diese wurden bei 13.300 Umdrehungen mittels einer peqlab Perfect Spin 24 Zentrifuge über 6 Minuten zentrifugiert.

Hiernach wurde die überstehende Flüssigkeit verworfen und das Eppendorfgefäß abgeklopft.

Von dem zurückbleibenden Pellet (oder von der zurückbleibenden Flüssigkeit, sollte sich kein Pellet gebildet haben) am Boden des Eppendorfgefäßes wurden 5 µl in ein neues 2ml Eppendorfgefäß, welches mit 120 µl Aqua dest. gefüllt war, überführt.

In der weiteren Optimierung des Verarbeitungsalgorithmus stellte es sich als sinnvoll heraus, die zurückbleibenden Eppendorfgefäße mit dem Rest der Pellets bis zum Ende des Testvorgangs aufzuheben, um bei positiven Ergebnissen aus dem Zentrifugat eine interne Kontrollkultur anlegen zu können.

Anschließend wurde die 120 µl Aqua dest. und 5 µl Pellet Mischung mittels eines Peqlab CombispinsFVL 2400N gevortext.

Dieses Eppendorfgefäß wurde mittels eines Heizblocks (JLU-eigen) bei 99°C für 12 Minuten erhitzt.

Nachdem der Heizvorgang abgeschlossen war, wurden in die ersten 6 Wells eines zuvor angesetzten Screeningpanels (8er-Streifen) jeweils 5 µl von je einer auf diese Weise verarbeiteten Patientenprobe pipettiert.

In das 7. Well wurden als Negativkontrolle 5µl Aqua dest. Gegeben.

In das 8. Well wurden 5 µl der 1:1000 verdünnten Positiv-Kontrolle (aus dem Genprodukt der *E. coli* Gyrase, Konzentration 42,7ng/µl) gegeben.

2.12 Genieverwendung und Programmparameter

Zur Anwendung der LAMP-Methode wurde ein Genie II der Marke Amplex genutzt.

Das für das Screening genutzte Programm läuft circa 35 Minuten, wobei die ersten 30 Minuten bei 63°C für die Amplifikation genutzt wurden. Hiernach wurde die Temperatur auf 98°C angehoben und langsam (um 0,05°C pro Sekunde) auf 80°C abgesenkt. Während dieses Zeitraumes konnte das Annealing, also der Zeitpunkt, ab dem die Primer wieder an das Genprodukt binden, bestimmt werden. Dies ermöglicht, insbesondere später beim Resistenzpanel, die tatsächlich richtige Amplifikation von der Verunreinigung durch z.B. die Positivkontrolle zu unterscheiden, da sowohl die Temperatur des Annealings als auch die Amplifikationskurvenform und Annealingskurvenform recht spezifisch sind.

Als positiv wurde ein Messergebnis nach Sichtung der einschlägigen Literatur über die Anwendung der LAMP-Methode definiert, wenn die Anzahl an detektierten, fluoreszierenden Einheiten 10.000 überstiegen und der Amplifikationskurvenverlauf die klassische, sigmoide Form besaß. Aus Informationen des Herstellers war ersichtlich, dass bei besonders lang gewählter Amplifikationszeit auch unspezifische Amplifikationen stattfinden können. Entsprechend haben wir in der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse besonderes Augenmerk auf die Proben gelegt, die erst sehr spät (>25 Minuten) den Cut-Off von 10.000 überschritten.

Analog zum Screeningpanel wurde das Resistenzpanel durchgeführt.

2.13 Post-/Interanalytische Probenverwertung

Sollte eine der Patientenproben positiv ausfallen, so wurde sie zur weiteren Testung selektiert.

Wie unter „Präanalytik der Proben“ bereits erwähnt hat es sich im späteren Verlauf der Testoptimierung als zielführend erwiesen, das übrig gebliebene Pellet der als positiv getesteten Proben für interne Kontrollen zu nutzen. Um auch in der Routinediagnostik ‚übersehene‘ Keime detektieren zu können, wurde das übrig gebliebene Pellet mit 350 µl Wasser aufgelöst, gevortext und schließlich vollständig auf eine UTI Brilliance Platte aufgetragen.

Bei einer Teilmenge der Proben wurde im Zuge der Prozessoptimierung direkt auf der genutzten Platte mit Antibiotika versetzte Kissen aufgestempelt, was nicht nur eine bessere Keimdifferenzierung bei

Mischkulturen ermöglicht, sondern auch eine ‚Blickdiagnose‘ am nächsten Tag auf die Korrektheit der vorhergesagten Resistenz durch das Resistenzpanel umsetzbar machte.

Zur weiteren Testung wurde aus dem ursprünglichen Eppendorfgefäß, in dem die Probe erhitzt wurde, jeweils 5 µl entnommen und auf die einzelnen Wells des Resistenzstreifens verteilt. Dieser wurde dann wie unter „Genieverwendung und Programmparameter“ erklärt mittels des Resistenzprogramms verwertet.

2.14 Kulturelle Goldstandarddiagnostik

Die kulturelle Goldstandarddiagnostik wurde nach den Parametern der MiQ (Qualitätsstandards in der mikrobiologische-infektiologischen Diagnostik) durchgeführt. (Gatermann et al., 2005)

Hierbei wurde der Nativurin auf Blutagar, MacConkey-Agar, CLED-Agar und Sabouraud-Agar aufgebracht. Durch Ausplattierung mittels einer 1µl-Öse auf dem CLED-Agar wurde die ungefähre Menge des Erregers (Anzahl der Kolonien x 1000 = CFU/ml; Zahlenschritte in der Dokumentation <1000; 1000-10.000; 10.000-50.000; 50.000-100.000; >100.000) im Nativurin bestimmt. Im weiteren Verlauf wurde mittels eines Antibiotikastempeldiffusionstests die Empfindlichkeit des Bakteriums bestimmt. Zur genauen Erreger- und Resistenzbestimmung wurden auch regelhaft der MALDI-TOF (**M**atrix-**A**ssistierte **L**aser-**D**esorption-**I**onisierung mit Flugzeitanalyse (engl. **T**ime **O**f **F**light)) und der VITEK 2 (ein automatisiertes System für die Inkubation und Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung) eingesetzt, welche beide von der Firma Biomérieux produziert wurden.

Für die Auswertung der Kulturergebnisse wurde, basierend auf den Richtlinien der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), das Ergebniss „I“ (intermediär suseptibel) bei den Antibiotika Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam und Cefuroxim als „S“ (suseptibel) gewertet. Bei den Antibiotika Cefotaxim, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Ciprofloxacin wurde „I“ als „R“ (resistent) gewertet.

2.15 Datensammlung

Nach abgeschlossener Testung wurden die im Rahmen der Studie erhobenen Messergebnisse in einer eigens für die Studie generierten Arbeitsliste im Swisslab System der Mikrobiologie Gießen eingespeist. Nach der Phase der Datenerhebung (März bis Oktober 2017) wurden die zu untersuchenden LAMP-Daten aus Swisslab in Microsoft Excel exportiert. Dies erlaubte eine Zusammenführung mit vorhandenen Informationen aus der Mikrobiologie (Kulturkontrolle als Goldstandard) und Daten aus der klinischen Chemie und Labordiagnostik (Durchflusszytometrie und Urinsticks). Durch Komplementierung mit allgemeinen Patientencharakteristika, wie demographischen Kenngrößen und klinischen Diagnosen, konnte ein allumfassendes Bild der Kohorte gewonnen werden.

Im Folgenden wurden Plausibilitätskontrollen durchgeführt um die Qualität des Datensatzes sicherzustellen. Zuletzt wurde die Patientennummer, die Rückschlüsse auf die Identität des Patienten zulässt, entfernt.

2.16 Quantifizierung in vivo

Zur Bestimmung der Quantifizierbarkeit des *gyrA*-Screeningtests wurden nach Erhebung aller klinischen Daten sämtliche photometrisch ermittelten Amplifikationskurven übereinander gelegt und nach der durch die Mikrobiologie bestimmten Keimmenge getrennt sortiert. Dabei trat ein Unterschied in der Zeit bis zum positiven Ergebnis des Tests (time to positivity, TTP) zutage, weswegen der dort angedeutete Effekt von uns nochmals *in vitro* untersucht wurde.

Um die *in vivo* gefundenen Unterschiede zusätzlich statistisch zu validieren, haben wir die Korrelation zwischen verstrichener Zeit und gefundenen, fluoreszierenden Einheiten im Sinne einer Youden-Cut-Off-Analyse (siehe „Statistische Auswertung“) verwertet.

2.17 Quantifizierung in vitro

Zur Bestimmung der Quantifizierbarkeit der Patientenprobe mittels TTP-Auftrennung wurde ein Konzentrationsreihenexperiment durchgeführt. Hierzu wurde ein LB-Medium von 20ml mit K5 *E. coli* inokuliert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden von dieser Stammkultur 1ml in eine 10ml Tageskultur übertragen und unter photometrischer Kontrolle inkubiert. Aus vorherigen Versuchen des Labors war bekannt, dass bei einer optischen Dichte (OD) von circa 0,7 eine Keimmenge zwischen 10^8 und 10^7 CFU/ μ l zu erwarten ist.

Nachdem die Inkubation bei selbiger OD abgestoppt wurde, wurde eine Konzentrationsreihe von der originalen Konzentration in Zehnerschritten abwärts bis 10^{-9} des ursprünglichen Ansatzes verdünnt. Hierbei wurden immer 100 μ l des vorangegangenen Schrittes mit 900 μ l aqua dest. vermischt. Darauf folgend wurde jeder einzelne Schritt der Konzentrationsreihe nach dem Testschema des *gyrA*-Screenings getestet. Zur Mengenbestimmung wurde jeder Schritt der Konzentrationsreihe auf Agarplatten jeweils zweimal ausgestrichen. Nach einer Nacht Inkubation wurden die Kolonien mittels des Scan 500 ausgezählt und mit den Amplifikationskurven des Genie II verglichen. Für valide Ergebnisse wurde dieses Experiment viermal an getrennten Tagen durchgeführt.

2.18 Statistische Auswertung

Alle Analysen wurden in einem anonymisierten Datensatz durchgeführt. Bewachsene Proben mit nicht relevanter Bekeimung in der kulturellen Goldstandarddiagnostik (weniger als 10.000 KBE/ml, vgl. (F. M. Wagenlehner et al., 2017)), sowie Proben mit LAMP-Daten, bei denen eine Verunreinigung durch positive Negativkontrolle nachweisbar waren wurden ausgeschlossen.

Vorgeschaltete Analyse: Durchflusszytometrie als Screening

Um die Sichtung der Urinproben bei klinischer Anwendung des von uns entwickelten diagnostischen Werkzeugs effizienter gestalten zu können, haben wir vorgeschaltete Screeningmöglichkeiten evaluiert. Hierfür haben wir mittels Durchflusszytometrie bestimmte Zellzahlen von Bakterien,

Leukozyten und Erythrozyten als mögliche Marker getestet. Der Endpunkt von teilungsfähigen Bakterien in der Urinprobe wurde durch die Goldstandarddiagnostik mittels Bakterienkultur definiert.

Der prädiktive Wert von der hierfür untersuchten, stetig verteilten Zellzahlen für ein kulturpositives Ergebnis wurde jeweils durch univariable logistische Regressionen untersucht. Anschließend wurden die sich daraus ergebende Sensitivität und Spezifität in eine ROC-Kurve (Receiver-Operating-Characteristic-Kurve) eingetragen. Hierbei wird die Sensitivität, also der Quotient aus den richtig erkannten Kulturpositiven durch alle Kulturpositiven, gegen 1 minus der Spezifität, also der Quotient der richtig erkannten sterilen Proben durch alle sterile Proben, aufgetragen.

Die Fläche unter der ROC-Kurve ist ein Diskriminationsmarker der untersuchten Variable. Im Folgenden haben wir die Flächen unter den ROC Kurven von Bakterien-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen hinsichtlich ihrer diskriminativen Eigenschaften verglichen.

Der Punkt, der in der ROC-Kurve die maximale, tangentielle Steigung aufweist, ist gleichzeitig der Punkt, bei dem die Sensitivität und die Spezifität, die sich grob antiproportional zueinander verhalten, maximal werden. Eine Möglichkeit der Bestimmung eines Cut-off Wertes ist der Youden-Index, der sich mittels $\text{Sensitivität} - (1 - \text{Spezifität})$ berechnet. Damit wird der Youden-Index am Punkt der maximalen Sensitivität und Spezifität ebenfalls maximal. Der Punkt der maximalen tangentialen Steigung, beziehungsweise des maximalen Youden-Index beinhaltet den gesuchten Cut-off in Form seines initialen Messergebnisses.

Die Youden-Index Cutoff-Analyse erlaubt allerdings keine Gewichtung in Richtung eines Testparameters. Beispielsweise würden wir von einem Screeningtest deutlich niedrigere Spezifitätswerte akzeptieren, wenn dadurch die Sensitivität entsprechend beeindruckend wird. Um dies zu simulieren, haben wir bei der Bewertung des Durchflusszytometrie cutoffs, nachdem wir den Cutoff durch Maximierung des Youden-Index bestimmt hatten, um dem Cutoff herum die Werte nach in der Praxis anwendbaren Werten durchsucht und auf Basis von Literaturrecherche und klinischer Plausibilität eine Grenze festgelegt.

Ebenfalls analysierten wir die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie unter dem Gesichtspunkt der nach klinischem Interesse der Intervention gewichteten Wertigkeit als Diagnostikum. Hierfür nutzten wir die Entscheidungskurven-Analyse (Decision curve analysis; (Vickers & Elkin, 2006)). Die Entscheidungskurven-Analyse bedient sich des Konzepts des Nettonutzens, welcher sich aus der Wahrscheinlichkeit für eine unnötige Behandlung, gewichtet nach dem Risiko, eine notwendige Behandlung nicht durchzuführen, berechnet. Dieser Nettonutzen wird auf der Y-Achse der Entscheidungskurven-Analyse aufgetragen. Auf der X-Achse wird hingegen der Schwellenwert (Threshold Probability) für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Krankheit aufgetragen, ab dem laut Meinung des Patienten oder des Klinikers eine Intervention folgen sollte. Ebenfalls enthält die Entscheidungskurven-Analyse eine Gerade, die den Nettonutzen davon, niemanden zu behandeln darstellt, sowie eine Gerade, die den Nettonutzen alle zu behandeln darstellt. Damit erlaubt die Entscheidungskurven-Analyse eine risikoangepasste Beurteilung der Nützlichkeit verschiedener Diagnostika in der individuellen Situation des Patienten.

Vorgeschaltete Analyse: Urineststreifen als Screening

Um die Möglichkeiten einer vorgeschalteten Selektionsdiagnostik durch Urineststreifen auszuloten, haben wir die Ergebnisse der Urineststreifen unter dem Gesichtspunkt der Analyten „Leukozyten“ und „Nitrit“ deskriptiv mit dem Goldstandardergebnis verglichen. Zwar ist Testgüte dieses diagnostischen Werkzeugs in der Literatur bereits gut beschrieben aber im Zuge der gewissenhaften Datenauswertung mussten wir überprüfen, ob sich die Zahlen der Fachliteratur auch auf unsere Testpopulation übertragen lässt. Dabei haben wir die Prädiktionsstärke der einzelnen Analyten sowie die Prädiktionsstärke der zusammengefassten Analyten für die Vorhersage eines positiven Kulturergebnisses berechnet. Diese Betrachtung wurde sowohl für alle Bakterien insgesamt, ungeachtet der Spezies und Nitritproduktion, wie auch getrennt für Proben mit nitritpositiven Bakterienspezies durchgeführt. Als nitritpositiv wurden, die uropathogenen Bakterienspezies *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter koserii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*

und *Citrobacter freundii* angesehen. Andere, nitritpositive Keime kamen im Datensatz nicht vor.

Um die Wertigkeit unseres eigens entwickelten, diagnostischen Werkzeugs zu überprüfen, haben wir die klassischen Testgütekriterien bestimmt. Hierzu wurde die Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (der Quotient aus den positiv getesteten, tatsächlich kulturell bekeimten Proben und allen positiv getesteten Proben), negativer Vorhersagewert (der Quotient aus dem negativ getesteten, tatsächlich sterilen Proben und allen negativ getesteten Proben) und Genauigkeit (der Quotienten aus der Summe aller richtig positiv und richtig negativ getesteten und allen Proben) der LAMP-Ergebnisse (sowohl des Gyrase-Screening an sich als auch für jedes einzelne, untersuchte Antibiotikum) bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch eine Zusammenführung der Goldstandardwerte (Zentrifugatkultur, mikrobielle Testung aus Nativurin, Kultur aus vorbebrüteten Uricult). Hierbei wurde bei diskrepanten Befunden der Kulturen immer die als genauer bezeichnete Kultur verwertet, d.h. es wurde der in der Mikrobiologie nach Vorgaben des MiQ 2005 von ausgebildeten MTAs bearbeitete Nativurin als präziser angesehen (Gatermann et al., 2005).

Als Kriterium für die durch das LAMP-Panel vorhergesagten Resistenzen wurden folgende Bedingungen definiert:

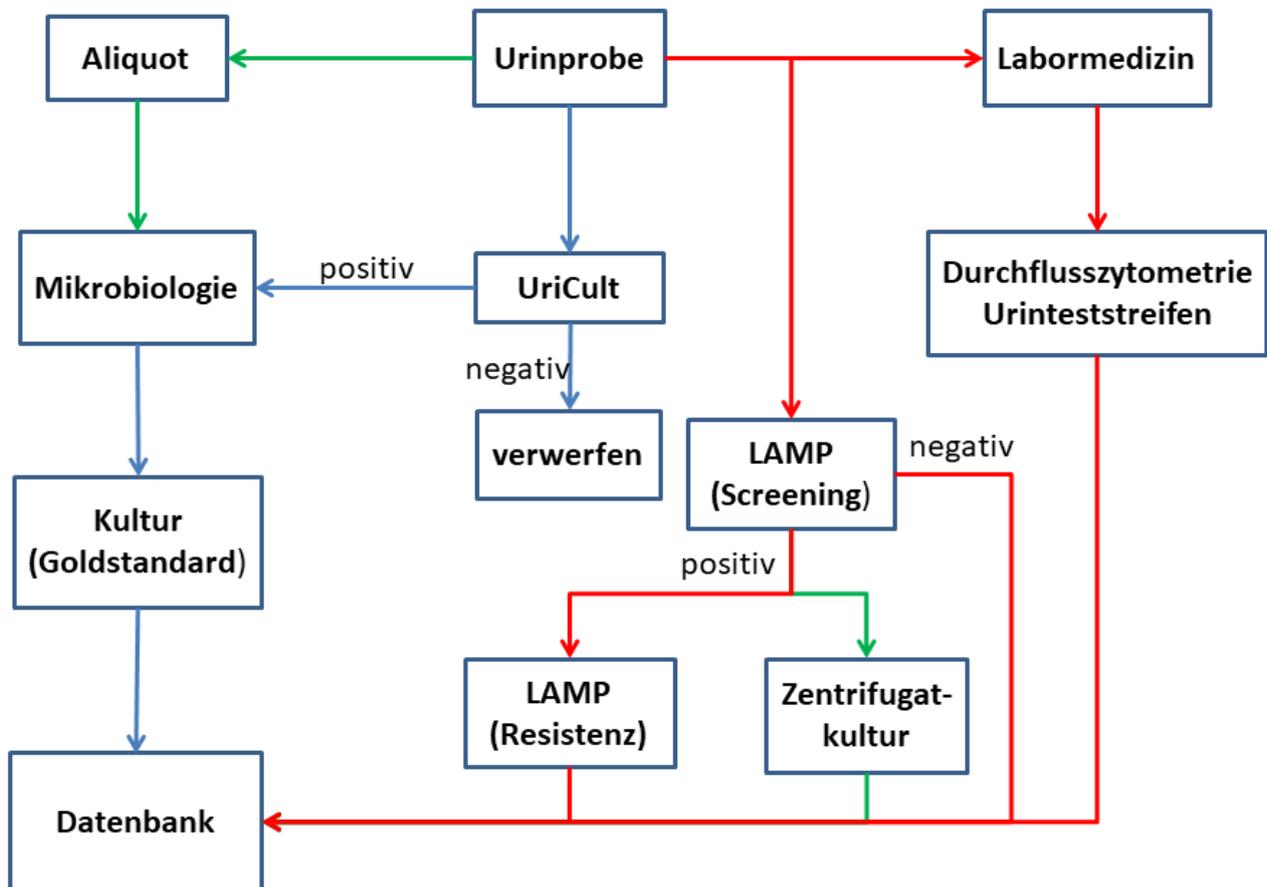
Tabelle 4 Resistenzprädiktionskriterien

Antibiotikum	Positive Genmarker <i>als „resistent“ wird bewertet, wenn mindestens eins der Gene detektiert wird</i>
Ampicillin	Tem1b+/CTXM14+/CTXM15+
Ampicillin/Sulbactam	Tem1b+/CTXM14+/CTXM15+
Cefuroxim	CTXM14+/CTXM15* (elektiv Tem1b+ oder Tem1b-)
Cefotaxim	CTXM14+/CTXM15+
Piperacillin/Tazobactam	CTXM14+/CTXM15+
Ceftazidim	CTXM14+/CTXM15+
Cotrimoxazol	Sul2.2+/dfrA17+
Antibiotikum	Genetischer, negativer Surrogat-Parameter <i>als „resistent“ wird bewertet, wenn der genannte Genmarker nicht detektiert wird</i>
Ciprofloxacin	hyla-

2.19 Probensammelungs- und Verwertungsalgorithmus

Im Folgenden ist eine Workflowgrafik aufgetragen, anhand derer der Probengewinnungs- und Verarbeitungsverlauf nachvollzogen werden kann. Hierbei werden die blauen Pfeile für die Wege der Standarddiagnostik verwendet. Die roten Pfeile geben die Wege der Studiendiagnostik an, während die grünen Pfeile die Optimierung der Probenverarbeitung während des Sammelprozesses anzeigen.

Abbildung 7 Probenverarbeitungsalgorithmus



Zwei Monate nach Beginn der Probensammlung haben wir eine erste Zwischenauswertung zum Zwecke der Ablafoptimierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass aufgrund der Vorselektion der UriCult-Nährmedien durch die Pflegekräfte der Urologie, eigentlich positive aber klinisch irrelevante Proben (1-2 Kolonien pro Agarplatte) verworfen wurden. Dies ermöglichte folglich keine adäquate Kontrolle der LAMP-Ergebnisse mittels

der Kultur, da die LAMP der Literatur folgend im Optimalfall sogar einzelne Bakterien detektieren kann (dies trat auch bei unseren Versuchen auf!). Es wurde deswegen eine Aliquotierung der initialen Urinprobe mit Weitergabe des Nativurins an die Mikrobiologie eingeführt, sodass keine klinische Vorselektion unseres Goldstandards stattfinden konnte. Die vermutlich falsch negativen Goldstandard-Ergebnisse wurden in der Auswertung als richtig negativ behandelt, um eine Verzerrung unserer Auswertung zugunsten unserer Methode auszuschließen.

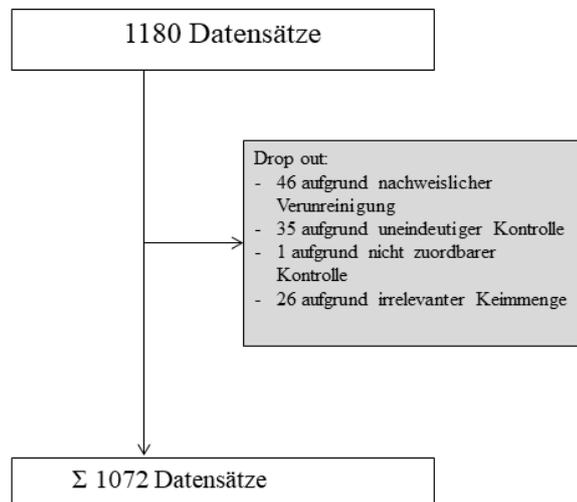
Im weiteren Verlauf fiel jedoch ebenfalls auf, dass in einigen mit LAMP positiv getesteten Proben in der routinemäßigen, mikrobiologischen Kulturdiagnostik keine *E. coli* nachgewiesen wurden. Wir hatten jedoch im späten Verlauf der Studie, eigentlich für den Zweck, die phänotypische Kontrolle für die genotypisch vorausgesagten Resistenzen zu verbessern, zusätzlich eine Zentrifugatkultur eingeführt: das Pellet, welches bei der Zentrifugation des Urins zurückbleibt, wurde im Falle eines positiven Screeningergebnisses mit 50 µl aqua dest eluiert und auf Selektivnährboden (Brilliance UTI Agar) ausplattiert (mit Antibiotika-Plättchen, um ggfs. resistente Subpopulationen zu entdecken). In diesen Anreicherungskulturen konnten wir niedrigere Keimkonzentrationen nachweisen als in der Routinediagnostik üblicherweise möglich ist. Zudem konnten wir gegebenenfalls resistente Subpopulationen von *E. coli* detektieren, welche an die Antibiotika-Plättchen heranwuchsen.

3. Ergebnis

3.1 Patientenkollektiv

Es konnten insgesamt 1180 Urinproben akquiriert werden. Jede davon stammt aus dem Patientenaufgebot der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der JLU Gießen.

Von diesen Proben waren 1072 verwertbar (siehe Abbildung 8). Entsprechend des vorher festgelegten



Algorithmus wurden 46 der [Abbildung 8 Drop-Out Darstellung](#)

Proben ausgeschlossen, da während der Testung dieser Proben ein Ansatz der Primer mit *Moraxella osloensis* verunreinigt wurde. Nachdem dies durch eine laborinterne Kontrolle nachgewiesen werden konnte, wurden sämtliche Proben, die mit diesem Primeransatz getestet wurden, von der Auswertung ausgeschlossen. Weitere 35 Proben mussten aus dem Datensatz ausgeschlossen werden, da die Mikrobiologie die zugeordneten Urine im Zuge der Routinediagnostik aufgrund von geringer Keimmenge (>1000/ml) nicht genauer als „Keime der Coli-Gruppe“ identifiziert hat. Da die Primer zwar *E. coli* nachweisen sollen, aber unter die „Coli-Gruppe“ z.B. auch *Klebsiella species* fallen würde, wurden die Proben aufgrund nicht ausreichender Differenzierungsmöglichkeit ausgeschlossen (geringe Keimengen werden nicht routinemäßig differenziert, wenn sie nicht als infektiologisch relevant gelten).

Eine weitere Probe musste aufgrund von nicht nachvollziehbarer Etikettierung während der Laboruntersuchung verworfen werden, da keine Zuordnung zwischen LAMP-Ergebnis und Kulturergebnis hergestellt werden konnte.

Weitere 26 Proben wurden, wie in den Methoden bereits dargelegt, aus der Auswertung ausgeschlossen, da sie das Mindestkriterium für einen Harnwegsinfekt kulturbedingt nicht erfüllen (F. M. Wagenlehner et al.,

2017). Diese Proben werden klinisch als bei der Abnahme verunreinigt eingestuft.

Von den übrig gebliebenen Urinproben wurden 793 (74,0%) von Männern und 279 (26,0%) von Frauen abgegeben.

Das durchschnittliche Alter des Patientenkollektivs lag bei 58 (SD 18) Jahren.

Von der genannten Patientengruppe befanden sich 288 (26,9%) in stationärer Behandlung, während die restlichen 784 (73,1%) der Patienten ambulant behandelt wurden.

Insgesamt verteilte sich die Abnahmemodalität auf 721 Mittelstrahlurine (67,29%), 252 Einmalkatheterurine (23,51%), 32 Dauerkatheterurine (2,99%) sowie 67 sonstige Urinproben (Erstrahlurin / Exprimaturin / Spontanurin / Punktaturin / nicht näher definierte Urinprobe). Der Charlson Komorbiditätsindex des Patientenkollektivs liegt im Median bei 2 Punkten mit einem Interquartilabstand von 0 bis 3 (Charlson, Pompei, Ales, & MacKenzie, 1987; Quan, Sundararajan, Halfon, & Fong, 2005).

Insgesamt wurden in der kulturellen mikrobiologischen Routinediagnostik 775 (72,29%) Proben als kulturnegativ und 297 (27,71%) Proben als kulturpositiv eingestuft.

Trennt man das Patientenkollektiv nach mikrobiologischem Befund in kulturell positive und negative (ungeachtet der bakteriellen Spezies), so treten die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen deutlich zu Tage (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Patientenkollektiv: Das Patientenkollektiv ist nach durch den Goldstandard nachgewiesenen Harnwegsinfekten aufgetrennt.

Faktor	Ausprägung	Kultur negativ	Kultur positiv
Anzahl an Studienteilnehmerproben	-	775	297
Alter (Jahre), Mittelwert ± Standardabweichung	-	56,24 ± 17,71	63,04 ± 18,70
Geschlecht	Männlich	586	207
	Weiblich	189	90
Behandlungsmodus	Ambulant	596	188
	Stationär	179	109
Abnahmeart der Urinprobe	Dauerkatheter	4	28
	Einmalkatheter	173	79
	Mittelstrahlurin	556	165
Charlson Komorbiditäts-Index, Median (Interquartilabstand)		2 (0; 3)	3 (1; 4)

Neben der Analyse des Patientenkollektivs nach dem Charlson Komorbiditätsindex wurde zusätzlich eine Analyse der urologischen Diagnosen, die bezüglich der getesteten Patienten während der Behandlung verschlüsselt wurden, durchgeführt. Dies ist insofern interessant, als dass Obstruktionen wie Urolithiasis und Prostatahyperplasie Risikofaktoren für Harnwegsinfekte darstellen, ebenso wie medizinische Eingriffe an den Harnwegen (siehe Abbildung 9).

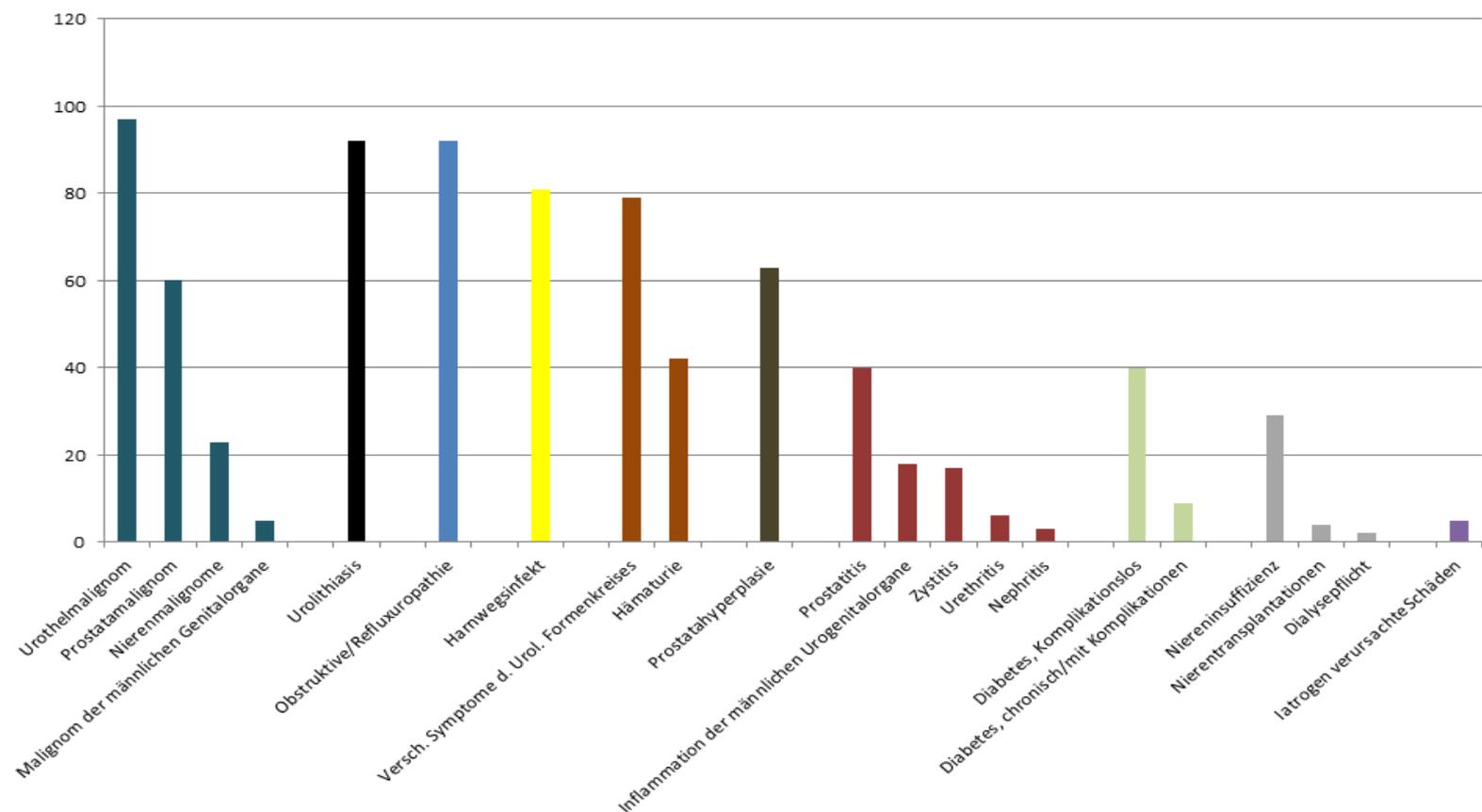


Abbildung 9 Diagnosehäufigkeit im Patientenkollektiv, gruppiert

3.2 Resistenzvorkommen und Keimspektrum

In 75 (7%) der gesammelten Proben konnte mikrobiologisch kulturell *E. coli* nachgewiesen werden. Die Verteilung der nachgewiesenen Resistenz der getesteten *E. coli*-Population wurde hier grafisch dargestellt. Jede Spalte entspricht einer Probe, die Farbe Blau entspricht sensiblen Isolaten, die Farbe Orange entspricht resistenten Isolaten und die Farbe Grau

signalisiert, dass dieses Antibiotikum bei dem jeweiligen Isolat nicht getestet wurde (Abbildung 10).

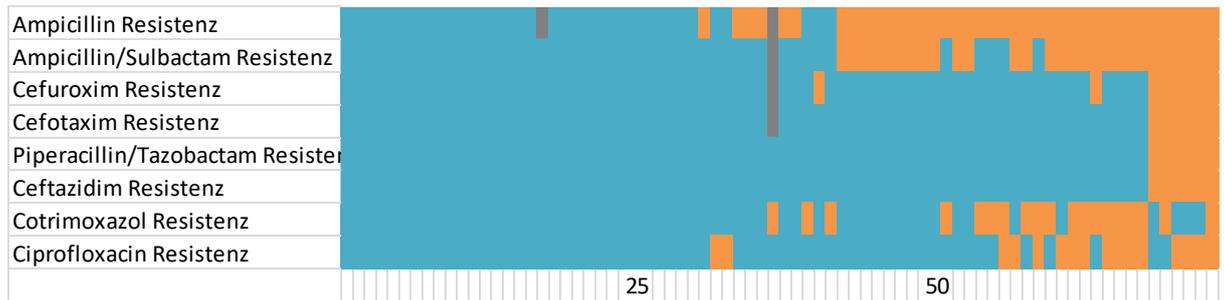


Abbildung 10 Graphische Darstellung der Resistenzverteilung aller getesteten *E. coli*

Als weitere Nebenauswertung wurde die Verteilung des gesamten Erregerspektrums betrachtet (Abbildung 11).

Interessant ist hierbei, dass *E. coli* nicht in der Mehrheit der untersuchten Isolate nachgewiesen wurde. Selbst bei den hospitalisierten Patienten, bei denen man von einem grampositiveren Spektrum ausgeht, wird der Anteil der von *E. coli*-positiven Proben normalerweise auf 50% geschätzt. (Dörries, 2014)

Wir gehen davon aus, dass einer der Gründe für die große Menge an Enterokokken-positiven Isolaten in der Art der Testung zu

finden ist: Da sowohl bei denen durch die Urologie genutzten Uricult-Eintauchmedien als auch in der Mikrobiologie ein Selektivagar für Enterokokken bzw. Gram-positive Bakterien verwendet wurde (in der Routinediagnostik eine mit Colistin gesättigte modifizierte Blutplatte, Columbia CNA Agar, PB5049A, Oxoid,), konnten enterokokkenhaltige Proben korrekt identifiziert werden, wohingegen sie auf nicht-selektiven Vollmedien (z.B. Columbia Blut Agar ohne Antibiotika-Zusatz) von anderen, schneller wachsenden Bakterien, v.a. mit großen, schleimigen

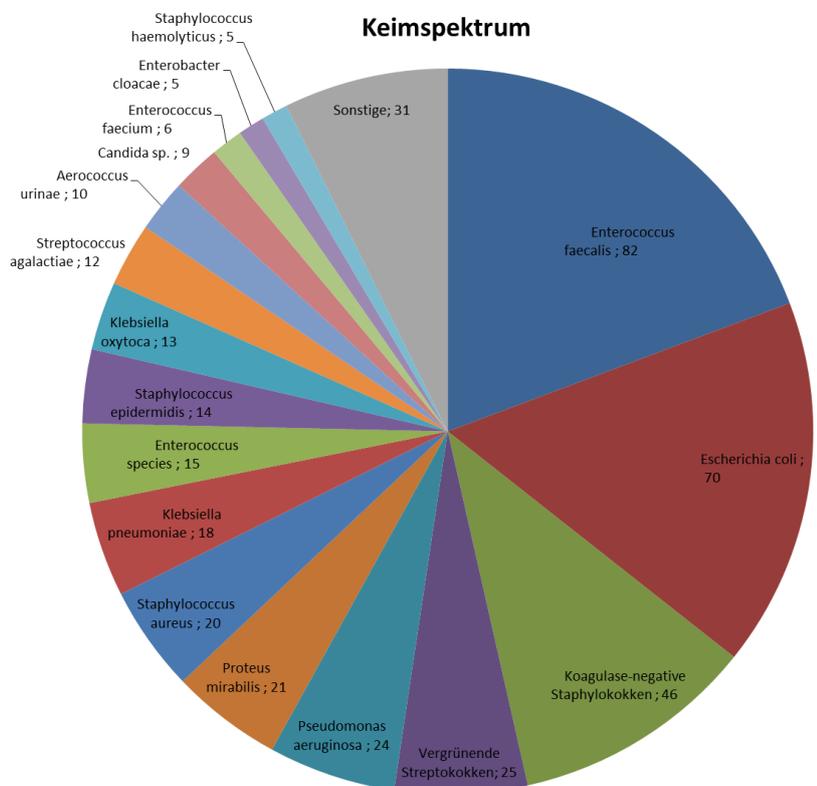


Abbildung 11 Graphische Darstellung aller im Urin der Proben nachgewiesenen Bakterien

Kolonieformen, überwuchert werden können und damit potentiell unterdiagnostiziert sein können (Dörries, 2014). Ein weiterer, rein statistischer Grund für die Verschiebung der erwarteten Verhältnisse ist, dass in der Keimspektrumanalyse auch die Keime, die üblicherweise als nicht oder nur fakultativ pathogen bedeutsame Verunreinigung verstanden werden, dezidiert aufgeführt sind (*Staphylococcus epidermidis* und andere Koagulase-negative Staphylokokken; vergrünende Streptokokken).

3.3 Vorgeschaltete Analyse: Urin-Durchflusszytometrie als Screening

Um die semiquantitative Testung der LAMP zu vervollständigen, damit vormerklich relevant positive Mengen an Bakterien gemessen werden, wurde die Durchflusszytometrie als eine Möglichkeit der vorgeschalteten Testung erwogen. Folgend der S3-Leitlinie Harnwegsinfektionen

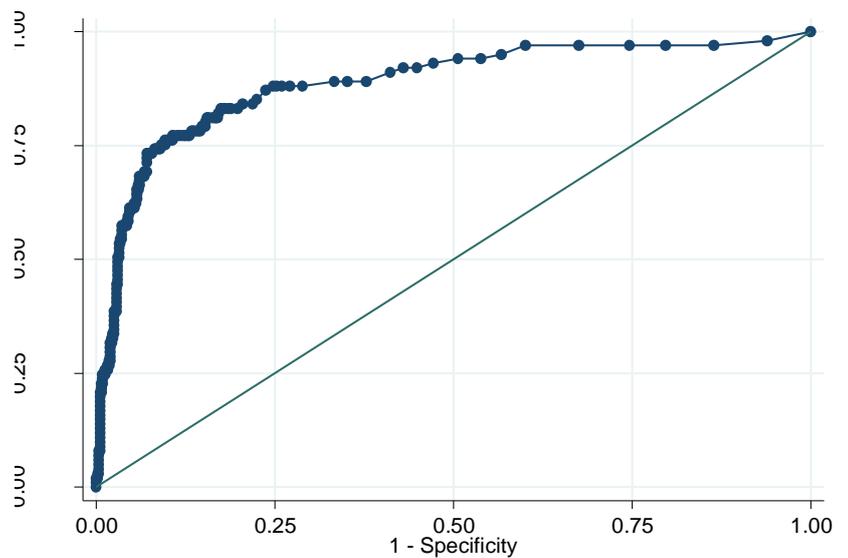


Abbildung 12 ROC-Kurve Durchflusszytometrie

aus 2017 wurde der Schwellenwert für die notwendige Keimmenge, ab der eine Kultur als „positiv“ im Sinne der Kriteriumsvariable gezählt wurde bei 10.000 CFU/ml angesetzt. Darauf basierend konnte durch die Youden-Cutoff Analyse gezeigt werden, dass ein Schwellenwert von 70 Bakterien/µl in der Zytometrie die besten Ergebnisse (Sensitivität:76,24%; Spezifität: 90,37%; positiver prädiktiver Wert: 58,78%; negativer prädiktiver Wert: 95,48%; Genauigkeit: 88,21%) als Prädiktor für eine kulturpositive Probe (≥ 10.000 CFU/ml) ergibt (vgl. Abbildung 12).

Als Validierung für die Fähigkeit der Durchflusszytometrie, die Bakterienzahl nachvollziehbar und verlässlich zu bestimmen, wurde eine Gegenüberstellung zwischen der durch die Mikrobiologie mittels Koloniezählung bestimmte Bakterienzahl und der durch die

Durchflusszytometrie bestimmte Bakterienzahl durchgeführt (Abbildung 13).

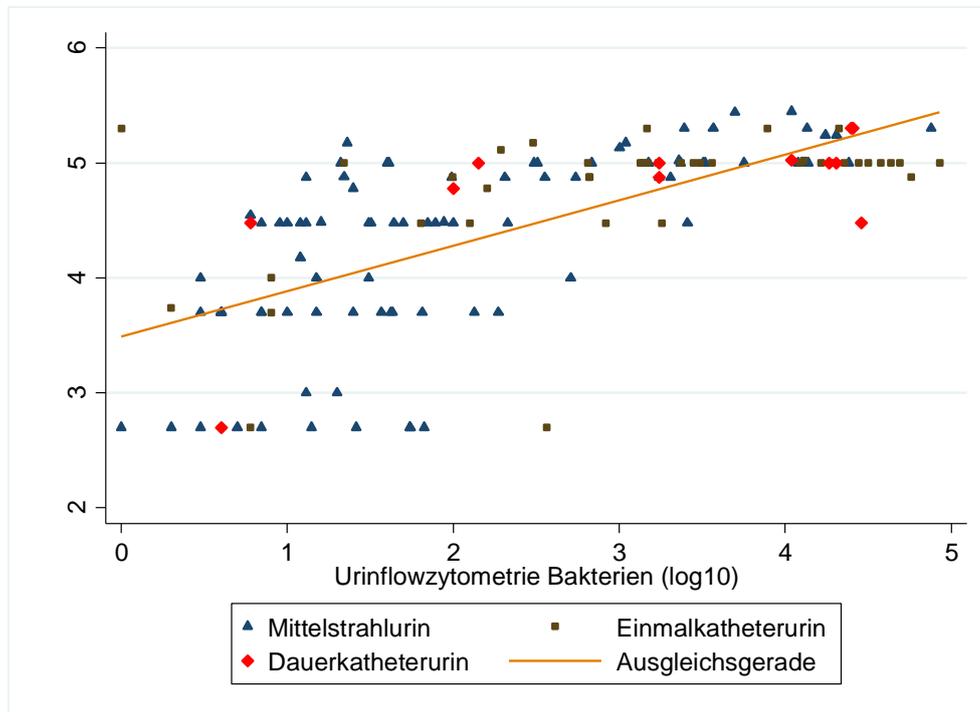


Abbildung 13 Vergleich Bakteriennachweis über Kultur in $\log_{10}(\text{CFU/ml})$ (y-Achse) und Durchflusszytometrie in $\log_{10}(\text{Anzahl}/\mu\text{l})$ (x-Achse). Aufgetrennt nach Abnahmemodalität

Es besteht ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,65 mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ zwischen den beiden gemessenen Werten.

Somit legt der Korrelationskoeffizient in Zusammensicht mit dem negativ prädiktiven Wert eine signifikante Aussagekraft eines negativen Durchflusszytometrienergebnisses zur Vorhersage von negativen Kulturergebnissen nahe.

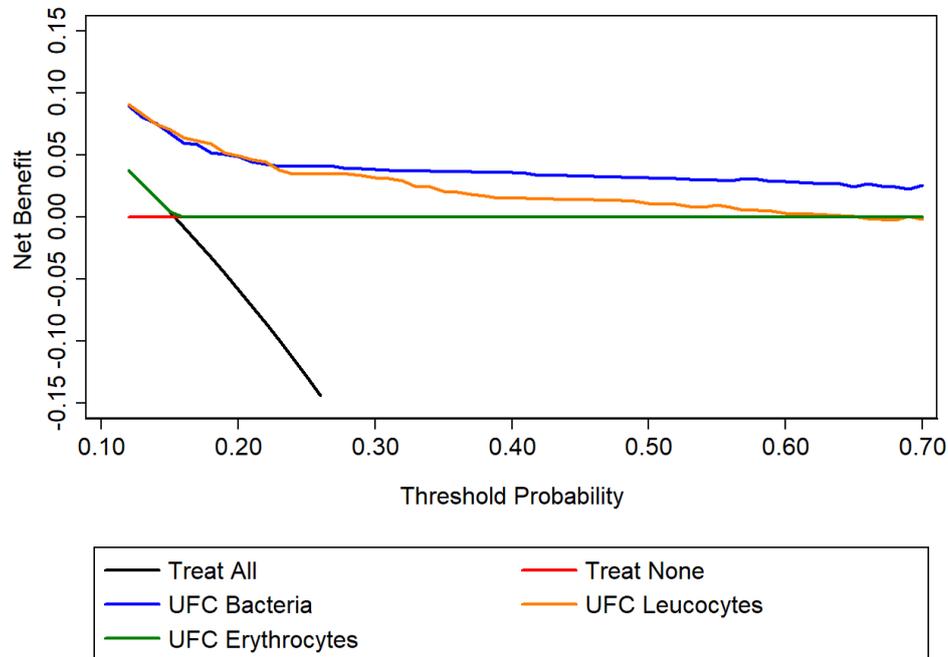


Abbildung 14 Entscheidungskurven-Analyse X-Achse: Schwellenwahrscheinlichkeit eines Harnwegsinfekts, ab dem weitere therapeutische oder diagnostische Konsequenzen folgen würden. Y-Achse: Nettonutzen des Diagnostikums. Anteil der richtig positiven Ergebnisse minus des Anteils der falsch negativen Ergebnisse, gewichtet nach der Schwellenwahrscheinlichkeit.

In der obenstehenden Grafik (Abbildung 14) zeigt die Durchflusszytometrie einen durchgehenden Nutzen als Diagnostikum. Bis zu einem Schwellenwert von $\leq 0,23$ besteht ähnlicher Nutzen des Nachweises von Leukozyten und Bakterien, ab 0,24 ist der Nachweis von Bakterien in der Durchflusszytometrie dem Nachweis von Leukozyten in der Durchflusszytometrie durchgehend überlegen.

3.4 Vorgeschaltete Analyse: Urinteststreifen

Als weitere Möglichkeit, bereits etablierte Testverfahren in unseren Diagnostikalgorithmus einzupflegen, haben wir die Urinteststreifen mit den Parametern der Leukozyten (Leukozytenesterasenachweis, ordinalskaliert in 4 Stufen) und des Nitrits (nominalskaliert) überprüft. Hierbei wurde vor Allem exploriert, inwieweit die Ergebnisse der Urinteststreifen dazu

geeignet sind, getrennt oder zusammen, ein positives Kulturergebnis vorherzusagen oder auszuschließen. In der untenstehenden Grafik (Abbildung 15) sind, rein deskriptiv, als Stapelgraph die Verteilung von Proben (N=795, keine Auswahl der Bakterienspezies) mit positivem Leukozytenesterasenachweis und ihrer zugeordneten, kulturellen Testung aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass ein erhöhter, quantitativer Nachweis von Leukozytenesterase mit einer höheren Rate an positiven Urinkulturen einhergeht. Allerdings ist der Anteil von positiven Kulturen bei negativem Leukozytenesterase-Test 10,28%.

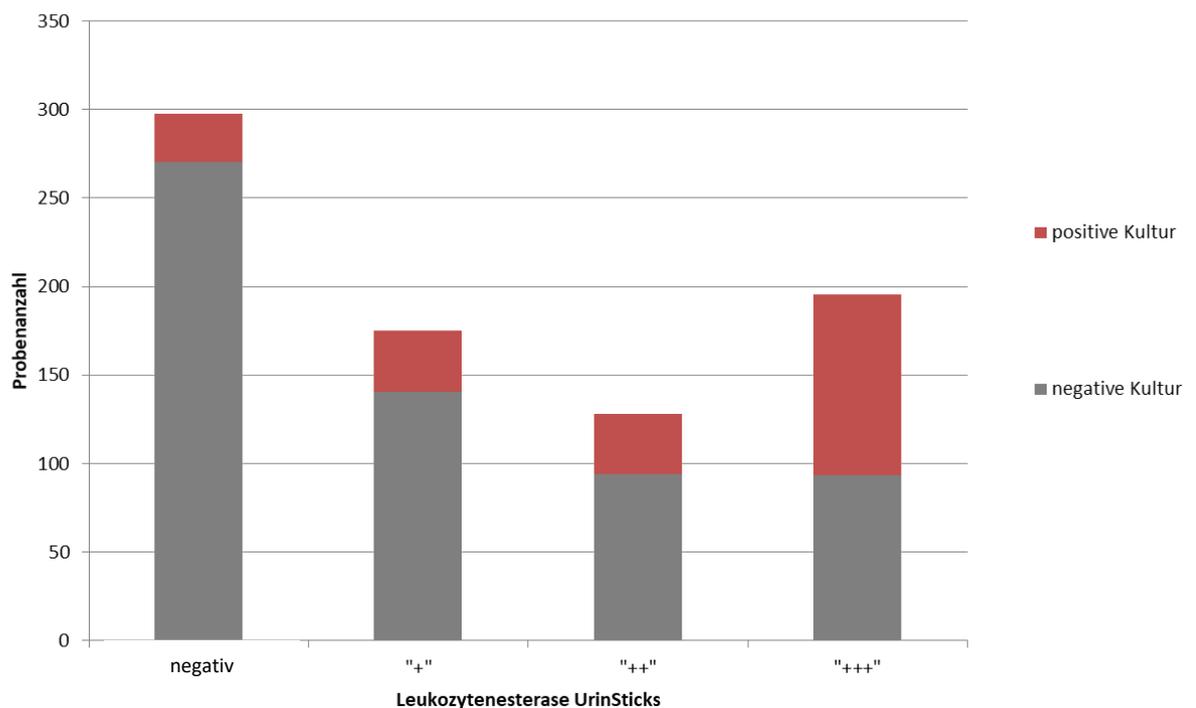


Abbildung 15 Urinteststreifenuntersuchung Leukozytenesterase gegen kulturell positiv getestet

Im nächsten Schritt haben wir einen ähnlichen Vergleich für den Nachweis von Nitrit im Urin (N= 795) durch die Urinteststreifen angestrebt. Auch hier ist wieder das Ergebnis der Testung deskriptiv mit dem zugeordneten Kulturergebnis aufgetragen. Hierbei wurden als „kultur-positiv“ jedoch nur solche Urinproben gewertet, welche in der Kultur Nitrit-produzierende

Bakterien enthielten. (Abbildung 16; vgl. Methoden).

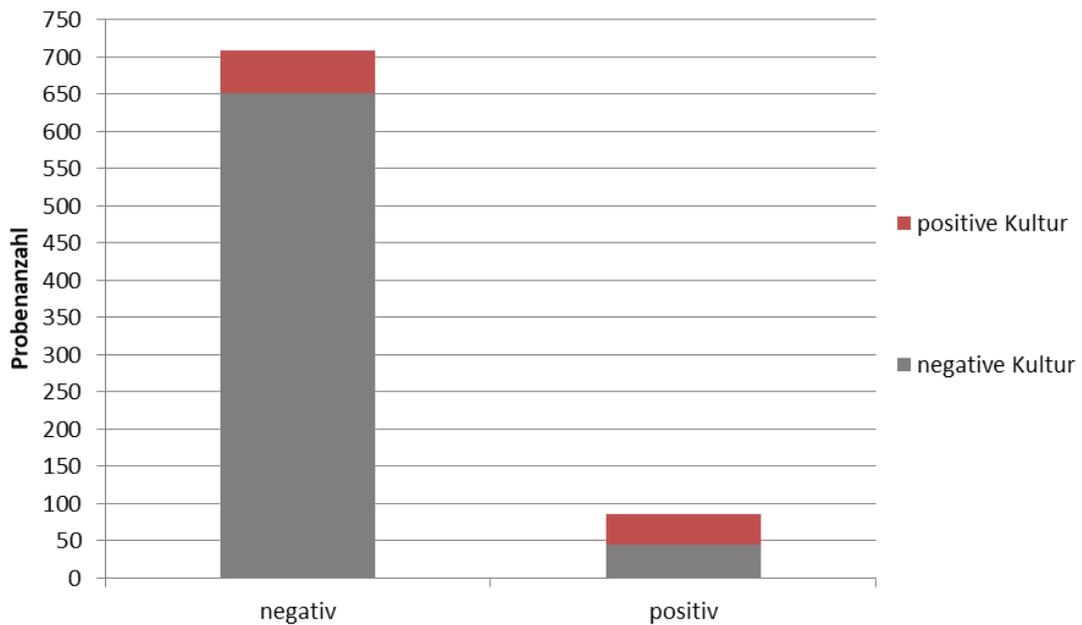


Abbildung 16 Urinteststreifenuntersuchung Nitrit

Auch hier ist erneut ersichtlich, dass die Rate an kulturpositiven Ergebnissen bei Nachweis von Nitrit erhöht ist. Der Anteil der kulturpositiven Proben an den Nitrit-negativen beträgt 8,91%.

Um die Möglichkeit, die Urinteststreifen in den Screeningalgorithmus einzubinden, auszuloten, haben wir die Prädiktionsstärke der Kombination von Nitrit und Leukozytenesterase (als kombinierter Parameter, sowohl Nitrit als auch Leukozyten mussten positiv getestet sein) für ein positives Kulturergebnis berechnet: Die Sensitivität dieser Untersuchung für Nitrit produzierende Keime liegt bei 80,39%, die Spezifität bei 86,45%, der positive, prädiktive Wert bei 47,67% und der negative, prädiktive Wert bei 96,63%.

3.5 Quantifizierbarkeit der LAMP

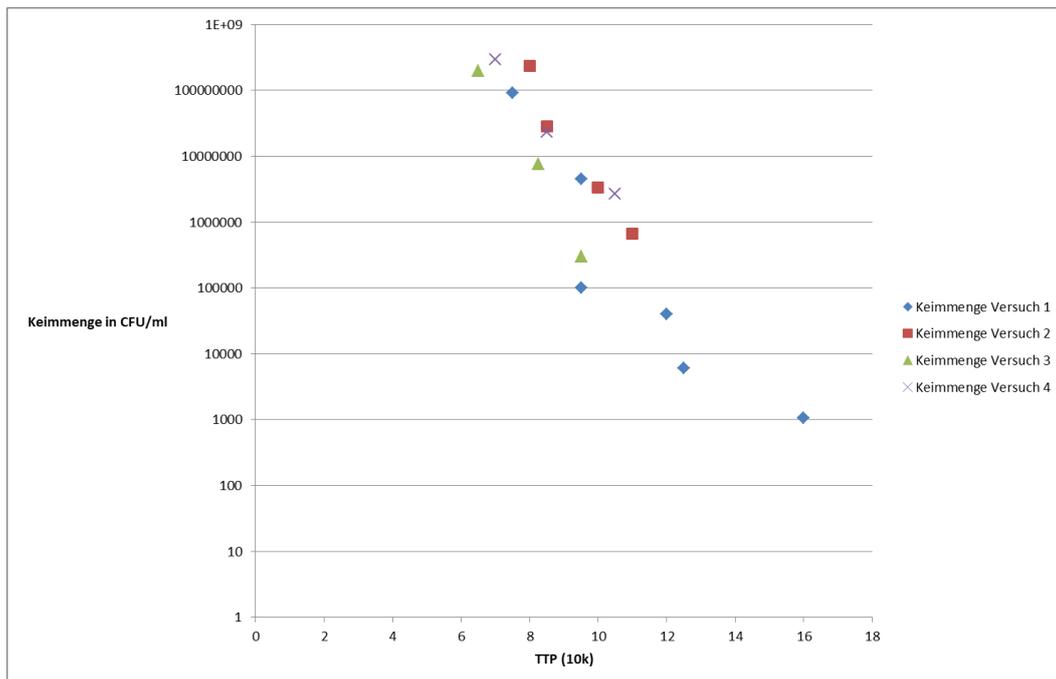


Abbildung 17 Verdünnungsreihe TTP = Time to positivity; 10k bezieht sich auf das Kriterium von 10.000 fluoreszierenden Einheiten, die als Grenze für die positive Testung durch den Genie gemessen werden

Die in vitro bestimmte Nachweisgrenze der LAMP mittels des gyrA Screeningpanels lag bei 1.050 Bakterien/ml (Abbildung 17).

Den Cutoff zur Detektion positiver Proben haben wir im Genie 2 so definiert, dass ab 10.000 FU (fluoreszierende Einheiten) positiv gewertet wird. Die Zeit, bis dieser Cutoff erreicht oder überschritten wurde, wurde als „time to positivity“ (TTP) definiert.

Die Verdünnungsreihen zeigen, dass die TTP mit abnehmender Keimmenge der Probe ansteigt.

Bei den Verdünnungsreihen in vitro lag der Unterschied zwischen 10.000 CFU/ml (als relevante Keimmenge in der Probe) und <1.000 CFU/ml (als klinische irrelevante Keimmenge) bzw. Verunreinigung bei einer TTP von circa 15 Minuten.

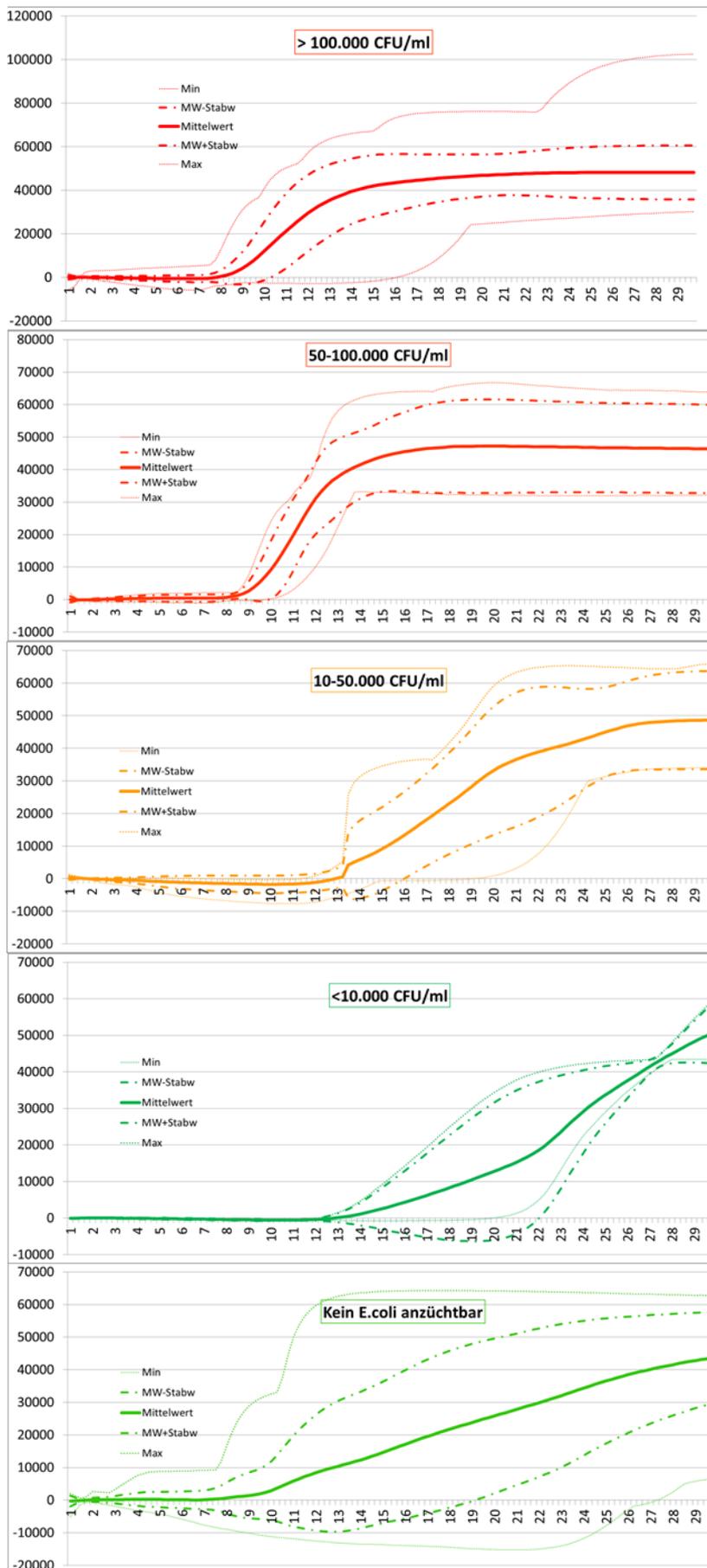


Abbildung 18 Kumulierter Kurvenverlauf, aufgeteilt nach Keimmenge im Goldstandard Urinkultur. Die gestrichelte Linie gibt eine Standardabweichung um den Mittelwert, die dünnen Linien den Minimal/maximal-Wert an. Die x-Achse zeigt die Zeitdauer in Minuten an.

Als Möglichkeit dies in vivo zu überprüfen wurde hier die von der Mikrobiologie gemessene Keimmenge farblich den durch den Genie II gemessenen Proben gegenübergestellt (Abbildung 18). Erkennbar ist, dass der überwältigende Anteil aller nach 15 Minuten positiv werdenden Proben, also die Marke von 10.000 fluoreszierenden Einheiten überschreitend, von geringer Keimmenge ist. Ebenfalls konnten wir eine Auflösung der klassischen sigmoidalen Amplifikationskurvenform und eine breitere Streuung bei geringerer Keimmenge beobachten.

Um diese rein explorative Betrachtung mit statistischer Genauigkeit zu unterfüttern, haben wir für jeden einzelnen Zeitpunkt, an dem eine beliebig Probe des in vivo Datensatzes 10.000 fluoreszierende Einheiten überschreitet die Korrelation mit einem positiven Kulturergebnis und einer Keimmenge von mindestens 100.000 Bakterien (respektive 74.000 Bakterien, entsprechend dem oberen Grenzbereich der kulturellen Testung; und 10.000 Bakterien) berechnet. Dabei zeigte sich, dass mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 74% ein Erreichen von 10.000 fluoreszierenden Einheiten mit einer TTP von 780 Sekunden (= 13 Minuten) eine signifikante Bakteriurie vorhersagt. Für das Kriterium von mindestens 74.000 Bakterien in der Goldstandarddiagnostik erreicht der Cut-Off von 780 Sekunden sogar eine noch bessere Sensitivität von 90% mit einer Spezifität von 85%. Sollte eine scharfe Unterscheidung zwischen geringeren Keimmengen, wie zum Beispiel 10.000 Bakterien in der kulturellen Testung notwendig sein, so empfiehlt sich unserer Statistik nach ein Cut-Off bei einer TTP von 825 Sekunden (13 Minuten und 45 Sekunden) mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 78% (Tabelle 6).

Tabelle 6 Zusammenfassung der Quantifizierbarkeit und relevanter Cut-Offs für TTP durch die LAMP-Methode

Kulturelle Bakterienanzahl (/ml)	Time to positivity (sek)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
>100.000	780	89,13	74,47
>74.000	780	90,38	85,37
>10.000	825	80,33	78,13

3.6 gyrA-Screening Ergebnis

Der Nachweis von *E. coli* im Urin durch die Amplifikation des gyrA-Genabschnitts mittels der LAMP-Methode zeigte eine Sensitivität von 96%, eine Spezifität von 96,19%, einen positiven prädiktiven Wert von 65,45% und einen negativen prädiktiven Wert von 99,69% bei einer gesamten Stichprobengröße von 1.072 Proben. Diese Statistik entstand, ebenso wie die oben genannte Messung der Durchflusszytometrie unter der Bedingung einer relevant positiven Keimmenge von mindestens 10.000 CFU/ml.

Als weitere Auswertung, um mögliche Störfaktoren oder Untergruppen des Patientenguts zu betrachten, wurde die gyrA-Screeninganalyse unter Verwendung eines vorgeschalteten Kriteriums neu untersucht (Tabelle 7). Die Testgenauigkeiten lagen bei den unterschiedlichen klinischen Parametern zwischen 92,16 und 100. So konnte zum Beispiel demonstriert werden, dass eine klinisch manifeste Hämaturie keinen negativen Einfluss auf die Vorhersagekraft des Tests hat.

Tabelle 7 Gyrase Screening Testgütekriterien Verschiedene Einflussfaktoren und Diagnosen

Kriterium	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW	Genauigkeit	N
Alle	96,00	96,19	65,45	99,69	96,17	1.072
Weiblich	94,74	95,02	75	99,13	94,98	279
Männlich	97,30	96,56	58,06	99,86	96,59	793
Dauerkatheter	100	92,31	75	100	93,75	32
Malignom	100	96,59	75	100	96,91	97
Urolithiasis	80	94,44	44,44	98,84	93,68	95
Obstruktive Uropathie & Refluxuropathie	87,50	96,43	70	98,78	95,65	92
Hämaturie	100	100	100	100	100	42
Prostatahyperplasie	100	91,67	42,86	100	92,16	51

3.7 Resistenzpanel Ergebnis

Mit den insgesamt im klassischen Sinne als richtig positiv getesteten 72 *E. coli* Urinen wurde konsekutiv eine Resistenzgenbestimmung durchgeführt (Tabelle 8).

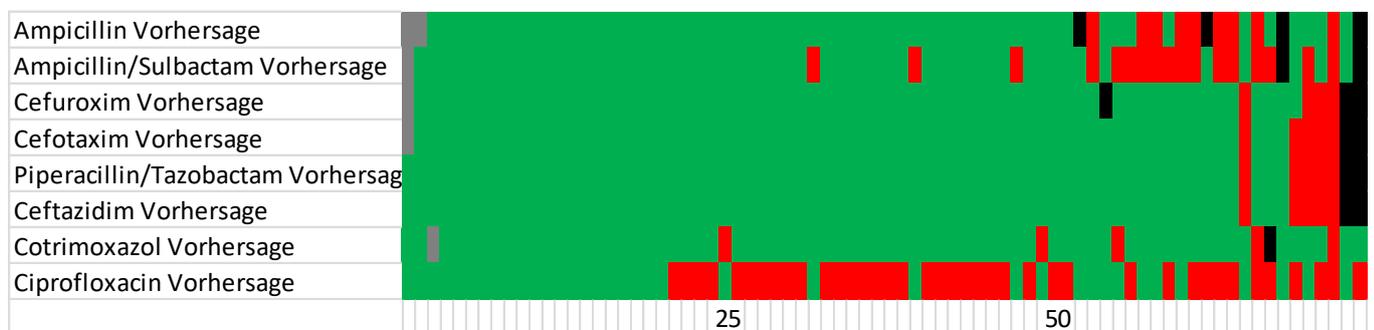
Tabelle 8 Resistenzpanel Testgütekriterien Aufgeteilt nach Antibiotika

Antibiotikum	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW	Genauigkeit	N
Ampicillin	89,74	73,33	81,40	84,62	82,61	69
Ampicillin/Sulbactam	93,10	60,98	62,79	92,59	74,29	70
Cefuroxim	66,67	93,44	60	95	90	70
Cefotaxim	71,43	92,06	50	96,67	90	70
Piperacillin /Tazobactam	71,43	92,19	50	96,72	90,14	71
Ceftazidim	71,43	92,19	50	96,72	90,14	71
Cotrimoxazol	94,74	90,20	78,26	97,87	91,43	70
Ciprofloxacin	100	33,33	32,08	100	49,30	71

Dies deckt sich mit unserer Zielsetzung insoweit, als dass eine optimale, negative Vorhersagerichtigkeit erzielt werden konnte, bei der der Durchschnitt über 95% liegt.

Als alternative Darstellung, angelehnt an die Darstellung der Resistenzverteilung wurde hier erneut jedes Isolat als Spalte aufgetragen. Grün steht für eine zutreffende Vorhersage, Rot für eine zu resistente Vorhersage und schwarz für eine zu sensible Vorhersage. Grau steht für fehlende Daten (Tabelle 9).

Tabelle 9 Graphische Darstellung der Vorhersagerichtigkeit des Resistenzpanels



4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In einer prospektiven, klinischen Studie haben wir an insgesamt 1.072 Proben die Anwendbarkeit von Point-of-Care Testverfahren aus Urinproben exploriert, mit dem Ziel, eine möglichst schnelle, antibiogrammgerechte Therapie zu finden.

Folgende Ansätze wurden gegenüber dem Standard, mikrobiologische Urinkultur, evaluiert:

- ✓ Leukozytenesterase- und Nitrit-Test mittels Teststreifen, als generelles Screening für Bakteriurie
- ✓ Urin-Durchflusszytometrie, ebenfalls als Screening für Bakteriurie
- ✓ Nachweis des *gyrA*-Gens von *E. coli* mittels LAMP, als Screening für *E. coli*

Genotypisches Resistenzgen-Panel mittels LAMP, zur Ermittlung von Antibiotika-Resistenzen bei *E. coli*-positiven Proben (Schmalspektrum-Betalaktamase, Breitspektrum-Betalaktamase, Folsäurestoffwechselblocker-Resistenz und, über einen Surrogatparameter, Flouorchinolonresistenz).

Ebenfalls wurde, unter Berücksichtigung der Durchflusszytometrieergebnisse ein Algorithmus entwickelt, die semiquantitative LAMP-Testung hinreichend quantifizierbar auszuwerten.

4.2 Durchführbarkeit des Point-of-Care Testsystems basierend auf der LAMP-Technik

Zusammenfassend kann man sagen, dass es uns gelungen ist, die Genauigkeit und Durchführbarkeit unseres Testwerkzeugs in der klinischen Anwendung darzustellen.

Trotz der erhöhten Anforderungen, die ein Patientenkollektiv, welches hauptsächlich aus Patienten mit komplizierten Harnwegsinfekten besteht, an eine Testmaschinerie stellt, zeigt unser Test sowohl eine einfache Handhabung als auch zielführende, diagnostische Ergebnisse.

Auch wenn der Test eine bis eineinhalb Stunden von der Probengewinnung bis zum Ergebnis benötigt, ist ein Großteil dieser Zeit autonome Verarbeitung der Probe durch die Maschinen. Die reine Arbeitszeit (hands-on time) für die Methode liegt nur knapp über 5 Minuten. Dies, in Verbindung mit den nach Labormaßstäben extrem einfachen Verarbeitungsschritten, ermöglicht es nach kurzer Einarbeitung selbst Personal ohne tiefergehende labortechnische Vorbildung die Verwendung unseres Tests in den täglichen Ablauf zu integrieren. Anwendungsmöglichkeiten für unseren Test finden sich damit neben der Klinik auch in der Niederlassung.

Folglich eröffnet der Point-of-Care Test dem behandelnden Arzt nicht nur schneller an die gewünschten Informationen zu kommen und damit eine bessere, informiertere Entscheidung zu treffen, sondern kommt auch künftigen Generationen zugute, in dem durch adäquate, gezielte Therapie der Einsatz von Breitspektrum Antibiotika vermindert werden kann, und damit eine Resistenzentwicklung vermindert werden kann.

4.3 Limitationen: Patientenkollektiv

Auch wenn die Stichprobe der Patienten ohne spezifische Auswahl durch den Untersucher stattfanden (keine Ausschlusskriterien), gibt es jedoch einige Einschränkungen zu beachten: Die Proben stammen alle aus dem Patientengut der Urologie, was bedeutet, dass im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung mehr komplizierte als unkomplizierte Harnwegsinfekte zu erwarten sind. Erfahrungsgemäß werden unkomplizierte Zystitis-Fälle meistens bereits in der Primärmedizin behandelt. Des Weiteren wurden die Proben zur Hauptgeschäftszeit der Poliklinik erhoben (8Uhr bis 16Uhr). Da stationär aufgenommenen Patienten auch später am Tag durch die Urinsammelstelle bearbeitet werden, muss davon ausgegangen werden, dass die Anzahl an erhobenen, stationsstämmigen Proben die tatsächliche Anzahl untertrifft.

Abschließend lässt sich zur Beschreibung des Kollektivs durch den Charlson Comorbidities Index sagen, dass dieser vermutlich die Patienten in Ihrer Komorbidität unterschätzt. Dies ist darin begründet, dass die kodierten ICD-Diagnosen nicht nur Dokumentation sondern zugleich auch

Abrechnungsliste der Klinik sind und folglich nur Diagnosen, die mit pflegerischem oder medizinischem „Mehraufwand“ einhergingen, verschlüsselt wurden. Demzufolge ist zu erwarten, dass beispielsweise ein Diabetiker, der unabhängig von seinem Diabetes aufgrund einer benignen Prostatahyperplasie in Behandlung ist, nicht mit dem ICD-Code für „Diabetes“ verschlüsselt werden würde und folglich vom Charlson Comorbidities Index nicht vollständig erfasst ist.

4.4 Zusammenfassung der Testergebnisse der Urinteststreifen und der Durchflusszytometrie

Eine der prominentesten Bedenken in der Anwendung von neuen, diagnostischen Techniken, wie die Durchflusszytometrie eine darstellt, ist, dass Einflussfaktoren und Charakteristika, welche das spezifische Patientenkollektiv im Vergleich zu Grundgesamtheit mit sich bringt, die Testergebnisse verfälschen könnten (Íñigo et al., 2016). Um dieser Befürchtung zu begegnen, haben wir eine statistische Auswertung nach den potentiell relevanten Störvariablen für eine gute Vorhersage durch die Durchflusszytometrie (Kriterium 10^5 CFU/ml, Cutoff: 142/ μ l) erstellt (Tabelle 10).

Kriterium	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver prädiktiver Wert[%]	Negativer prädiktiver Wert [%]	Genauigkeit [%]	n
Alle	93,10	91,89	52,43	99,28	91,99	662
Weiblich	92,86	79,41	48,15	98,18	81,71	164
Männlich	93,33	95,51	57,14	99,55	95,38	498
Dauerkatheter	100	75	77,78	100	86,67	15
Urogenitales Malginom	100	93,94	45,45	100	94,23	104
Urolithiasis	60	86,54	30	95,74	84,21	57
Obstuktive Uropathie/ Refluxuropathie	80	85,19	50	95,83	84,37	32
Hämaturie	100	83,33	40	100	85	20

Prostatahyperplasie	100	100	100	100	100	29
---------------------	-----	-----	-----	-----	-----	----

Tabelle 10 Statistische Ausarbeitung zu Einflussfaktoren auf die prädiktive Stärke der Durchflusszytometrie mit dem Kriterium von 10^5 CFU/ml bei einem Cutoff von 142/ μ l

Außerdem enthält das bakterielle Spektrum unseres Patientenkollektives einen hohen Anteil an *Enterococcus spezies*-haltigen Proben, was der Vorstellung entspricht, dass man bei komplizierten Harnwegsinfekten häufiger *Enterococcus* findet und diese folglich insgesamt in der Urologie häufiger auftreten können. Dies ist insofern relevant, als dass in der Literatur der Verdacht geäußert wird, dass die Durchflusszytometrie weniger verlässlich in der Detektion von gram positiven Erregern sei (F Manoni et al., 2002; Fabio Manoni et al., 2009; C. C. Yang et al., 2017).

Ein in der Tabelle nicht aufgeführter Vergleich wurde zwischen den Altersgruppen „jünger als 60 Jahre“ und „mindestens 60 Jahre“ durchgeführt, orientierend am Altersmedian unserer Stichprobe. Dabei konnte kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen festgestellt werden, weswegen sie hier nicht aufgeführt wurden. Aufgrund unserer Stichprobenpopulation haben wir leider wenig Daten zu Kindern im Hinblick auf die Durchflusszytometrie gesammelt oder ausgewertet, aber andere Autoren haben beschrieben, dass die Durchflusszytometrie ein nutzbares Werkzeug zur Verarbeitung von Urinproben von Kindern darstellt (Conkar & Mir, 2018).

Besondere Bedeutung kommt auch der Probenabnahmeart zu. Männer haben überwiegend einen Mittelstrahlurin abgegeben, während die Frauen nach dem Protokoll der urologischen Ambulanz von den Schwestern fachkundig und steril einmalkatheterisiert wurden.

Bei Frauen sind die positiven prädiktiven Werte etwas schlechter als bei Männern. Dies findet sich bei der Analyse um einen Cutoff von 10^5 CFU/ml, daher erscheint es unwahrscheinlich, dass dies durch Kontaminationen bei der Abnahme durch einzelne Staphylokokken von der Haut verursacht ist. Diese Beobachtung deckt sich aber auch mit der dazu veröffentlichten Literatur (Geerts, Boonen, Boer, & Scharnhorst, 2016; Sun et al., 2018), daher liegt es nahe einen systematischen Effekt zu vermuten.

Verantwortlich für diese Unterschiede könnten anspruchsvoll zu kultivierende Bakterien (*Lactobacillus spp.*) sein, die normalerweise im weiblichen Genitaltrakt zu finden sind, von der Routinediagnostik

möglicherweise nicht angezüchtet werden, aber von einem optischen Messverfahren wie der Durchflusszytometrie erfasst werden könnten.

Eine künftige Möglichkeit, dieses Phänomen zu untersuchen, wäre die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie zu nutzen, Gram positive von Gram negativen Bakterien zu unterscheiden. Dies stand zum Zeitpunkt der Studie für das verwendete Gerät noch nicht zur Verfügung.

Im Vergleich zu den Urineststreifen ist die Urin-Durchflusszytometrie sehr gut geeignet, Bakterien im Urin nachzuweisen oder auszuschließen. Dies ist nicht verwunderlich, da auf den Teststreifen auch nicht direkt nach allen Bakterien gesucht wird: die Leukozytenesterase ist letztlich ein Surrogat-Parameter für Inflammation (und damit nur indirekt für Bakterien), und Nitrit wird nicht von allen bakteriellen Spezies produziert.

Es stellte sich die Frage, welcher Parameter Bakteriurie am exaktesten messen kann:

- Leukozyten-Esterase (Teststreifen)
- Nitrit (Teststreifen)
- Bakterienzählung mittels Durchflusszytometrie
- Leukozytenzählung mittels Durchflusszytometrie.

Hierzu haben wir diese vier Parameter mittels ROC-Kurven gegenüber der Referenz „Kulturell bestimmte signifikante Bakteriurie von mindestens 10^5 CFU/ml“ verglichen, wobei sich folgendes feststellen lässt:

1. Die Bakterienzählung mittels Durchfluss-Zytometrie stellt eine Bakteriurie besser dar als die drei anderen Parameter. Dies ist plausibel, da sie von den genannten auch die direkteste Methode ist.

2. Am zweitbesten schneiden die Leukozytenzählung mittels Durchflusszytometrie und der Leukozyten-Nachweis mittels Teststreifen ab. Beide sind vergleichbar gut, aber etwas schlechter als die Bakterienzählung in der Zytometrie.

3. Am schlechtesten eignet sich der Nitrit-Nachweis. Dies ist möglicherweise auf den insgesamt hohen Anteil an Enterokokken in den Urinproben zurückzuführen.

(Abbildung 19):

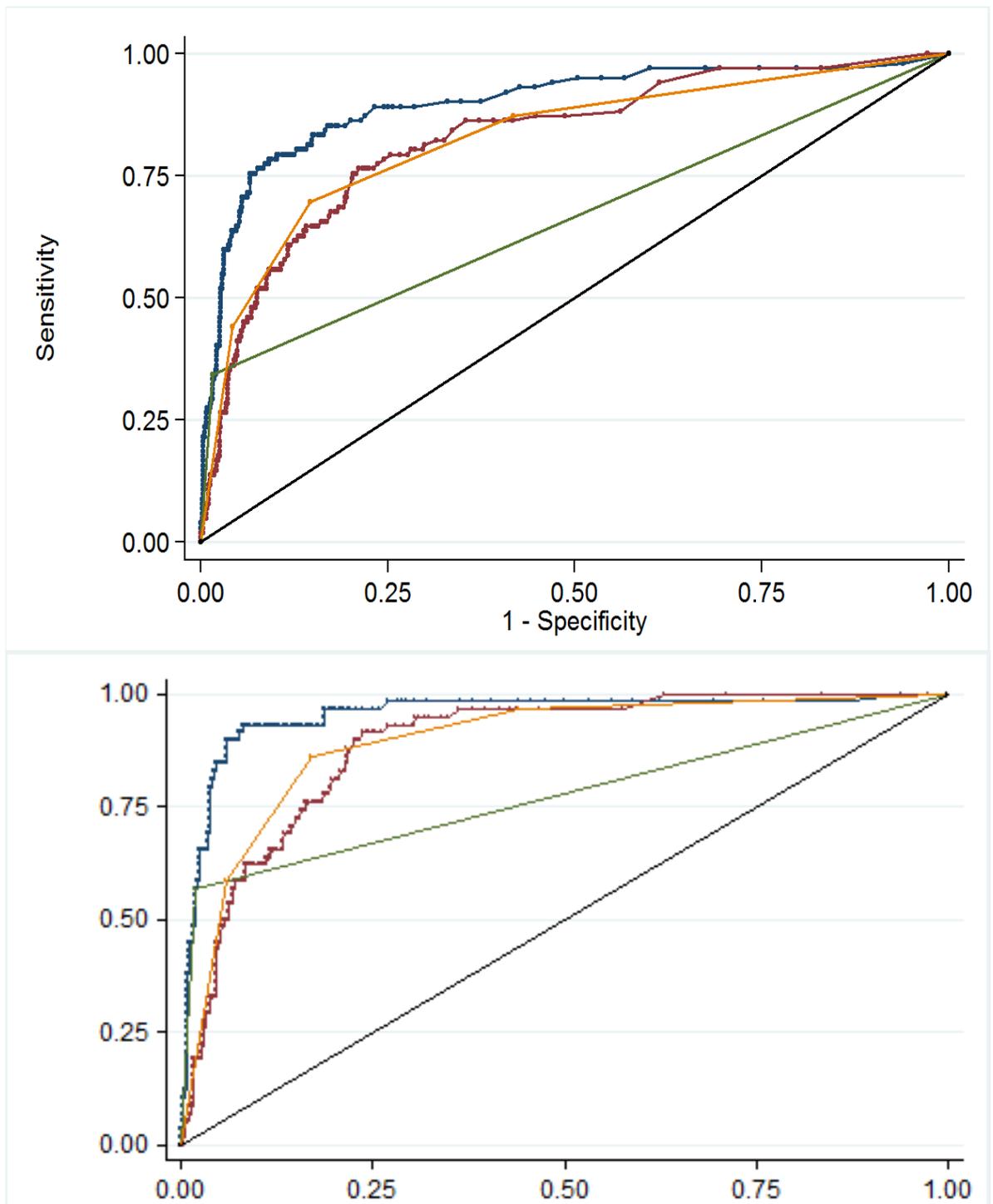


Abbildung 19 Graphische Darstellung der verschiedenen Diagnostikwerkzeuge im Vergleich. Oben mit dem Kriterium ein kulturelles Wachstum von $\geq 10^4$ CFU/ml nachzuweisen, unten mit dem Kriterium ein kulturelles Wachstum von $\geq 10^5$ CFU/ml nachzuweisen. Legende: Blau = Bacterienanzahl (Durchflusszytometrie); Rot = Leukozytenanzahl (Durchflusszytometrie); Gelb = Leukozytenanzahl (Urinteststreifen); Grün = Nitrit (Urinteststreifen).

In Tabellenform stellen sich die Parameter wie folgt dar (Tabelle 11):

	Parameter	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)	Genauigkeit (%)
Vergleich der Genauigkeit der Durchflusszytometrie und Urinstix um kulturelles Wachstum von $\geq 10^5$ CFU/ml nachzuweisen	Bakterienzahl (UFC)	93,10	91,89	52,43	99,28	91,99
	Leukozytenzahl (UFC)	91,38	76,16	26,90	98,92	77,49
	Leukozytenesterase (Stix)	96,55	55,79	17,34	99,41	59,37
	Nitrit (Stix)	56,90	98,18	75	95,95	94,56
	Leukozytenesterase ¹ + Nitrit (Stix)	98,28	55,79	17,59	99,70	59,52
	Kombinationstestung ²	98,28	54,47	17,17	99,70	58,31
Vergleich der Genauigkeit der Durchflusszytometrie und Urinstix um kulturelles Wachstum von $\geq 10^4$ CFU/ml nachzuweisen	Bakterienzahl (UFC)	78,43	90,89	61,07	95,86	88,97
	Leukozytenzahl (UFC)	76,71	78,89	39,59	94,84	78,40
	Leukozytenesterase (Stix)	87,25	58,21	27,55	96,17	62,69
	Nitrit (Stix)	34,31	98,39	79,55	89,16	88,52
	Leukozytenesterase + ¹ Nitrit (Stix)	88,24	58,21	27,78	96,45	62,84
	Kombinationstestung ²	90,20	56,07	27,22	96,91	61,33
	¹ Die Probe wurde als "positiv" bezeichnet, wenn Leukozytenesterase oder Nitrit positiv getestet wurden					
	² Die Probe wurde als "positiv" bezeichnet, wenn Leukozytenesterase, Nitrit, Bakterienzahl (UFC) oder Leukozytenzahl (UFC) positiv waren.					

Tabelle 11 Auflistung der Gütekriterien von Durchflusszytometrie und Urinreststreifen, einzeln und als Kombinationsparameter

4.5 Vortestung mittels Durchflusszytometrie und Quantifizierung der LAMP

Da die LAMP schon sehr geringe Mengen an Keimen nachweisen kann, war es von Anfang an sehr wichtig eine Möglichkeit zu finden, mit der wir eine leicht verunreinigte Urinprobe von einer klinisch relevant bekeimten Urinprobe unterscheiden können.

Als erste Möglichkeit wurde eine vorgeschaltete Analyse in Form der Durchflusszytometrie erwogen, da die Literaturlage (Duong et al., 2016; Moshaver et al., 2016; Müller et al., 2018) nahelegt, dass gerade die

Durchflusszytometrie über herausragende, negativ prädiktive Möglichkeiten verfügt. Dies trifft in unserer Analyse insgesamt auch für den Cutoff von 10^5 CFU/ml zu. Für die Urologie sind jedoch potentiell auch niedrigere Keimzahlen relevant: Sollte man den von der AWMF S3 Leitlinie vorgeschlagenen kulturellen Cutoff von 10^4 CFU/ml anwenden, so ergeben sich von allen bewertbaren Proben 24 falsch negativ und 54 falsch positiv durch die durch Zytometrie getesteten Proben. Damit stellt die Durchflusszytometrie in der Simulation des Behandlungsalgorithmus die größte Fehlerquelle dar. Gänzlich auf sie zu verzichten erscheint jedoch impraktikabel, da die Zytometrie eine wirtschaftlich gangbare Möglichkeit darstellt, das große Aufgebot an negativen Proben zu sichten.

Um die Möglichkeiten, von Durchflusszytometrie und LAMP-Panel ihre jeweiligen Limitationen gegenseitig auszugleichen zu eruieren, haben wir eine konsekutive Testung der Proben durch beide Screeningtests in silicio modelliert. Bei insgesamt 675 Proben, die durch die Zytometrie getestet wurden, wurden 133 als positiv bezeichnet. Nach dem Goldstandard gemessen wären hiervon 54 falsch positiv und 79 richtig positiv getestet. Von den 133 Zytometrie-positiven Proben wurden vom Gyrase-Screeningpanel 36 als positiv bewertet. Nach dem Goldstandard gemessen sind hiervon 28 richtig positiv und 8 falsch positiv. In aufbauender Testung ergibt sich folglich eine geringe Rate 1,19% falsch positiv gemessene Proben. Somit zeigt sich, dass eine Übertherapie durch sequenzielles Screening effektiv verhindert werden könnte.

Um hier die diagnostischen Optionen zu erweitern haben wir den Zusammenhang zwischen Keimmenge in der Originalprobe und time to positivity (TTP) des LAMP-Verfahrens hergestellt. Wir konnten feststellen, dass richtig positive Proben in aller Regel spätestens nach 15 Minuten in der LAMP positiv wurden (Ausnahme 3 Proben mit mittlerer Keimmenge). In unserer dazu angestellten in vitro Analyse ließ sich ein evidenter Zusammenhang zwischen Keimmenge und Amplifikationsgeschwindigkeit nachweisen. Somit können Proben geringer Keimmenge im zweiten Schritt nach der Durchflusszytometrie auch über die TTP-Analyse gefunden und ausgesondert werden.

Im Rahmen der genannten Einschränkungen ist die LAMP-Methode damit nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ nutzbar.

Bezüglich der in dem vorgeschlagenen, durch die Durchflusszytometrie falsch negativ getesteten Proben (n=24), würde eine

Testalgorithmusoptimierung die tatsächlich unwillkommenen Auswirkungen einer Fehldiagnostik abschwächen: Wie bereits erwähnt (Einleitung, Kapitel 1.2) wird die Diagnose des Harnwegsinfekts durch den behandelnden Arzt in Anamnese und körperlicher Untersuchung, gegebenenfalls unterstützt mittels eines Fragebogens gestellt. Sollten also Patienten mit Symptomen aber einem negativen, potentiell falsch negativen, Durchflusszytometrieergebnis untersucht werden, so würde dennoch die Diagnose eines Harnwegsinfekts gestellt werden und die Patienten würden der adäquaten Therapie bzw. weiterführenden Diagnostik zugeführt werden. Die Patientengruppe, die am ehesten Schaden von einem falsch negativen Durchflusszytometrieergebnis nehmen könnte, wären folglich Patienten ohne Symptome des Harnwegsinfektes, deren Bakteriurie dennoch behandlungsbedürftig ist. Diese Patientengruppen sind hauptsächlich Schwangere, Immunsupprimierte und Patienten vor einem schleimhautinvasiven operativen Eingriff am Urogenitaltrakt. Bei diesen Patientengruppen ist denkbar, dass unabhängig von einem negativen Durchflusszytometrieergebnis dennoch eine LAMP-Diagnostik in Kombination mit der bereits etablierten Dipslide-Kultur durchgeführt wird. Durch diese Anpassungen des Testprozesses auf die individuellen Patientenbegebenheiten lässt sich die Vortestqualität deutlich erhöhen und das Risiko einer versäumten Therapie minimieren.

4.6 Falsch positive Screeningergebnisse

Wir gehen davon aus, dass der von uns erhobene positive prädiktive Wert zu niedrig ist.

In erster Linie gab es in den ersten 3 Monaten, bevor die Weitergabe von Nativurin an die Mikrobiologie implementiert war, Probleme, Proben mit geringer Keimmenge adäquat zu erkennen. Zu der Zeit ist, als Teil der Routinediagnostik, zu jedem Patientenurin ein Uricult Eintauchnährboden angelegt und vor Ort in der Urologie bis zum nächsten Morgen bebrütet worden. Nach stehender Dienstanweisung wurden nur die Uricults, welche mehr als 2-3 Kolonien hatten zur weiteren Diagnostik an die Mikrobiologie weitergereicht. Die Proben mit weniger Kolonien wurden als „steril“ vermerkt, da ihr Bewuchs nicht von klinischer Relevanz sei. Da nun aber das *gyrA*-Screening in der Lage scheint, selbst kleinste Mengen an

genetischem Material in der Patientenprobe zu detektieren, erhielten wir ein „falsch positives“ Ergebnis, welches möglicherweise aber einfach sehr kleine Erregermengen anzeigte. Um diesem Effekt der Vorselektion entgegenzuwirken haben wir, als wir die Fehlerquelle gefunden haben, zusätzlich die Einsendung von Nativurin zu Studienzwecken implementiert. Leider war es im Nachhinein nicht mehr möglich, genau zu bestimmen in welchen Fällen es sich um die „wahren“ falsch positiven Fälle und wann es sich um die kontrollbedingten falsch positiven Fälle handelt. Aus diesem Grund haben wir für alle Fälle denselben Goldstandard verwendet, auch wenn zu befürchten steht, dass wir damit ein schlechteres Ergebnis für den Test erhalten als eigentlich zutreffend wäre.

Gegen Ende der Studie haben wir diesen Sachverhalt durch eine weitere Untersuchung versucht zu hinterfragen: 15 Urinproben, welche in der LAMP-Reaktion positiv waren und in der Standard-Kultur negativ, wurden Aliquots von dem zentrifugierten Urin, der für die LAMP-Reaktion benutzt wurde, direkt auf Agar-Platten (Chromagar) ausgestrichen und zusätzlich wurden auf diese Platte Antibiotika-Plättchen gestempelt. Die Intention hierbei war, in dem Material, welches für die LAMP-Reaktion benutzt wird, möglichst direkt auch kleine Mengen an *E. coli* zu finden. Durch die Antibiotika-Plättchen sollte ermöglicht werden, auch ggfs. resistente von sensiblen Sub-Populationen differenzieren zu können. Von 15 Urinproben fanden sich hierbei in 9 *E. coli*.

Damit bleibt weiterhin eine Rate an falsch positiven LAMP-Reaktionen, jedoch ist anzunehmen, dass ein Teil davon eigentlich tatsächlich *E. coli* nachweist. Denkbar ist natürlich auch ein Probengewinnungsfehler: Im Urinbecher ist deutlich mehr Urin als man für LAMP und kulturelle Diagnostik benötigt. Um den Routine-Ablauf nicht zu gefährden, wurden die Aliquots für die LAMP-Pilotstudie jedoch jeweils erst später aus den Urinbechern entnommen, wenn die Routinediagnostik definitiv schon genug Material bekommen hatte.

Es bleibt festzuhalten, dass der Vergleich einer genotypischen mit einer kulturellen Methode komplex ist.

4.7 Limitationen: Resistenzpanel

Die zentralen Limitationen jedes genotypisch orientierten Testes sind zweierlei: Auf der einen Seite ist man in seinem Erkenntnisgewinn an die Auswahl seiner Primer gebunden. Sollte also ein Patient infiziert sein mit einem *E. coli* mit einem ungewöhnlichen, deswegen auch nicht von unserem Panel erfassten, Resistenzgen, und würde mit dem Panel getestet werden, so würde unser Test ein falsch sensibles Ergebnis für den *E. coli* dieses Patienten liefern. Auch wenn unsere Primer sorgfältig nach häufigen Resistenzgenen und Mechanismen in unserer Patientenpopulation ausgewählt wurden, so bleibt die Möglichkeit, dass zum Beispiel unser Surrogatparameter (*hylA* als statistischer Marker für Flourchinolonsensibilität) in einer anderen Population, mit anderen Verteilungsmustern und Genassoziationen keine verlässliche Vorhersage liefern kann. Auf der anderen Seite bedeutet das Vorhandensein von Resistenzgenen weder deren Ausprägung noch deren Verbreitung innerhalb der Bakterienpopulation. Dadurch kann es passieren, dass ein Patient breiter therapiert wird, als es eigentlich notwendig wäre.

Demgegenüber steht jedoch ein Potential der genetischen Nachweise: Durch Detektion einer potentiell resistenteren Subpopulation an Tag 1 kann, durch eine direkt adäquate Antibiose deren Verbreitung möglicherweise besser unterbunden werden:

Beispielsweise haben wir in 13 Proben mittels LAMP *E. coli* mit Resistenz gegen Ampicillin/Sulbactam vorhergesagt, die sich in zunächst in der Routinekultur nicht bestätigte, und damit per Protokoll als „falsch resistent“ zu werten war. In der Nachbetrachtung zur Point-of-Care-Studie sind jedoch einige Patienten weiterhin urologisch betreut worden und haben mikrobiologische Urinkultur-Proben abgegeben. Deren Ergebnisse haben wir durchsucht, und haben bei 5 der 13 Fälle feststellen können, dass diese Patienten in später abgegebenen Urinproben tatsächlich *E. coli* Isolate hatten, die dem von uns per LAMP bestimmten Resistenzmuster entsprachen (Zeitraum 4 Tage bis 3 Monate).

Kliniker berichten von der Beobachtung, dass Bakterien bei ihren Patienten während eines Aufenthaltes oder zwischen Aufenthalten resistenter werden. Unsere Ergebnisse bieten hierzu eine potentielle Erklärung: die resistenteren Erreger sind in einigen Fällen möglicherweise schon am

ersten Tag des Krankenhausaufenthalts vorhanden, werden aber von der Routinediagnostik nicht erfasst.

In der von der Mikrobiologie durchgeführten Goldstandard-Diagnostik werden zur Resistenztestung jeweils einige wenige Kolonien von einer (mitunter voll) bewachsenen Platte entnommen und dann mittels automatisierter Resistenztestung (VITEK 2, Biomerieux) getestet. Dies geschieht in der Annahme, dass die entnommenen Kolonien repräsentativ für die gesamte Population seien. Sollten allerdings die Bakterien in Wirklichkeit heterogen in ihrem Resistenzmuster verteilt vorliegen, so erscheint es durchaus denkbar, dass die ausgewählten Kolonien eben nicht das gesamte phänotypische Spektrum der Resistenzen repräsentieren. Hierbei läuft man Gefahr eine Subpopulation an resistenten Bakterien zu übersehen, die, nach Änderung der Selektionsbedingungen durch Antibiotikagabe nach Antibiogramm (welches in Wahrheit aber nur einen Teil der Gesamtpopulation adäquat charakterisiert), sich ungehindert vermehren kann.

Unser LAMP-Panel bietet hierbei den Vorteil, dass große Mengen der Bakterien über die Zentrifugation und DNA-Extraktion untersucht werden (was die Diagnostik repräsentativer macht als wenn einzelne Kolonien repräsentativ untersucht werden) und innerhalb dieser Probe selbst kleine Mengen der Resistenzgene nachgewiesen werden können. Damit ermöglicht der Test möglicherweise früher eine adäquate Behandlung von resistenten Subpopulationen, die normalerweise von der herkömmlichen Diagnostik übersehen werden könnten.

4.8 Zusammenfassung moderner Harnwegsinfektionsdiagnostika

Neben dem Goldstandard der kulturellen Züchtung zum Nachweis einer Bakteriurie und unseren angewandten Methoden (LAMP, Durchflusszytometrie, Dipstick-Testung) stehen eine Vielzahl weiterer diagnostischer Werkzeuge zur Verfügung, welche zum Teil noch in der Entwicklung begriffen sind. Im Sinne eines komparativen Überblickes haben wir eine Tabelle dieser Diagnostika und ihrer Charakteristika zusammengestellt (Fritzenwanker et al., 2016)(Tabelle 12).

Hierbei ist zu erwähnen, dass neben unserem LAMP-Testpanel andere vielversprechende Diagnostika existieren. Zum Beispiel wären das NGS im Datengewinn und die automatisierte Mikroskopie in Geschwindigkeit der LAMP überlegen. Die benutzerfreundliche Anwendbarkeit, die Resistenz gegenüber Störfaktoren, die Verwendungsmöglichkeiten als Point-of-Care Test und die Resistenzvorhersage sind jedoch Vorteile, die die LAMP-Methodik recht attraktiv erscheinen lassen.

Tabelle 12 Vergleich der Parameter ausgewählter HWI-Diagnostika modifiziert nach (Fritzenwanker et al., 2016); mit freundlicher Genehmigung

Technik	Bearbeitungszeit	Bakterielle Quantifikation	Spezies-identifikation	Resistenzdaten	Stärken	Limitationen	Literatur
Dipsticks	Minuten	Nein	Nein	Nein	Weit verbreitet. Detektiert Leukozyten, Erythrozyten, Proteine, Glucose, pH uvm. PoC-geeignet.	Reliabilität wird von einigen Studien in Zweifel gezogen. Detektiert keine Nitrit-negativen Bakterien.	(Devillé et al., 2004; Gieteling et al., 2014; Little et al., 2006) Uvm.
Papierbasierte ELISA für <i>E. coli</i>	Stunden	Nein	Nur <i>E. coli</i>	Nein	Beworben als PoC-geeignet	Bisher nur experimentelle Daten. Findet nur <i>E. coli</i>	(Shih et al., 2015)
Papierbasierte Mikrofluid-Detektion für <i>E. coli</i>	Stunden	Nein	Nur <i>E. coli</i>	Nein	Beworben als PoC-geeignet. Detektiert auch <i>N. gonorrhoeae</i>	Bisher nur experimentelle Daten. Findet nur <i>E. coli/N.gonorrhoeae</i>	(Cho, Park, Nahapetian, & Yoon, 2015)
Elektronische Nase	<1 Stunde	Nein	Ja	Nein	Beworben als PoC-geeignet.	Bisher nur experimetelle Daten	(Roine et al., 2014)
Automatisierte Mikroskopie	Minuten	Ja	Nein	Nein	Detektiert ebenfalls Leukozyten, Erythrozyten und Pilze. Automatisiert, billig, mit hohem Durchsatz	Nicht Point-of-Care geeignet	(Falbo et al., 2012; Huysal et al., 2012; Rosanne Sterry-Blunt, Randall, Doughton, Aliyu, & Enoch, 2015)
Durchfluss-Zytometrie	Minuten	Ja	Gramdifferenzierung. Hinweise auf Spezies.	Nein	Detektiert ebenfalls Leukozyten, Erythrozyten. Automatisiert, billig mit hohem Durchsatz	Daten benötigen Interpretation. Cutoffs müssen je nach Testpopulation gewählt werden.	(Geerts et al., 2016; Picot, Guerin, Le Van Kim, & Boulanger, 2012; Sun et al., 2018; C. C. Yang et al., 2017) Uvm.
Massenspektrometrie	<1 Stunde	Nein	Ja	Hinweise	Mikrobiologische, etablierte Routine.	Limitierte Daten bei unkultivierten Bakterien	(Oviaño & Bou, 2019; Rosselló, Rodríguez, De

							Lejarazu Leonardo, Domingo, & Pérez, 2015; Zboromyrska et al., 2016)
Quantitative PCR LAMP	Stunden (qPCR) Minuten (LAMP)	Ja	Ja	Ja	Anpassbar an Testpopulation. Robust gegenüber Mischkulturen. Beworben als PoC-geeignet.	Benötigt präzise Genmarker. Nicht zur Blinddiagnostik geeignet.	Siehe Einleitung.
Komplette Genomsequenzierung (NGS)	Circa 1 Tag	Ja	Ja	Ja	Allumfassende Information zu Spezies, Pathogenitätsfaktoren und Verbreitungsabstammung. Ermöglicht Analyse des Mikrobioms.	Sehr teuer in Anschaffung und Unterhalt. Interpretation benötigt umfassende Bioinformatik.	(Hasman et al., 2014; Zankari et al., 2012)
Microarray	Stunden	Ja	Ja	Ja	Anpassbar an Testpopulation. Automatisierte Testung mit hohem Durchsatz	Benötigt präzise Genmarker. Bisher lediglich limitierte, experimentelle Daten verfügbar.	(Bentaleb et al., 2016; Yu et al., 2007)
Isothermale Mikrokolorimetrie	Stunden	Ja	Ja	Hinweise	Differenziert zwischen vitalen und toten Bakterien	Bisher nur experimentelle Daten	(Braissant et al., 2014)
Impedanzmessung	Stunden	Ja	Nur <i>E. coli</i>	Nein	Quantitative Messung vitaler Bakterien	Bisher nur experimentelle Daten. Detektiert nur <i>E. coli</i>	(Settu, Chen, Liu, Chen, & Tsai, 2015)
Biosensor-Chips	Stunden	Ja	Ja	Ja	Anpassbar an Testpopulation. Robust gegenüber Mischkulturen	Benötigt präzise Marker. Limitierte Daten bezüglich klinischer Implementation	(Mohan et al., 2011)

4.9 Entscheidungsbaum unter Verwendung der LAMP-Technik

Basierend auf den Mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards (Gatermann et al., 2005) haben wir einen möglichen Entscheidungsbaum entworfen, der beispielhaft demonstriert, inwieweit ein Screening und Empfindlichkeitstestsystem basierend auf der LAMP-Technik die diagnostischen und therapeutischen Handlungsspielräume erweitert (Abbildung 20).

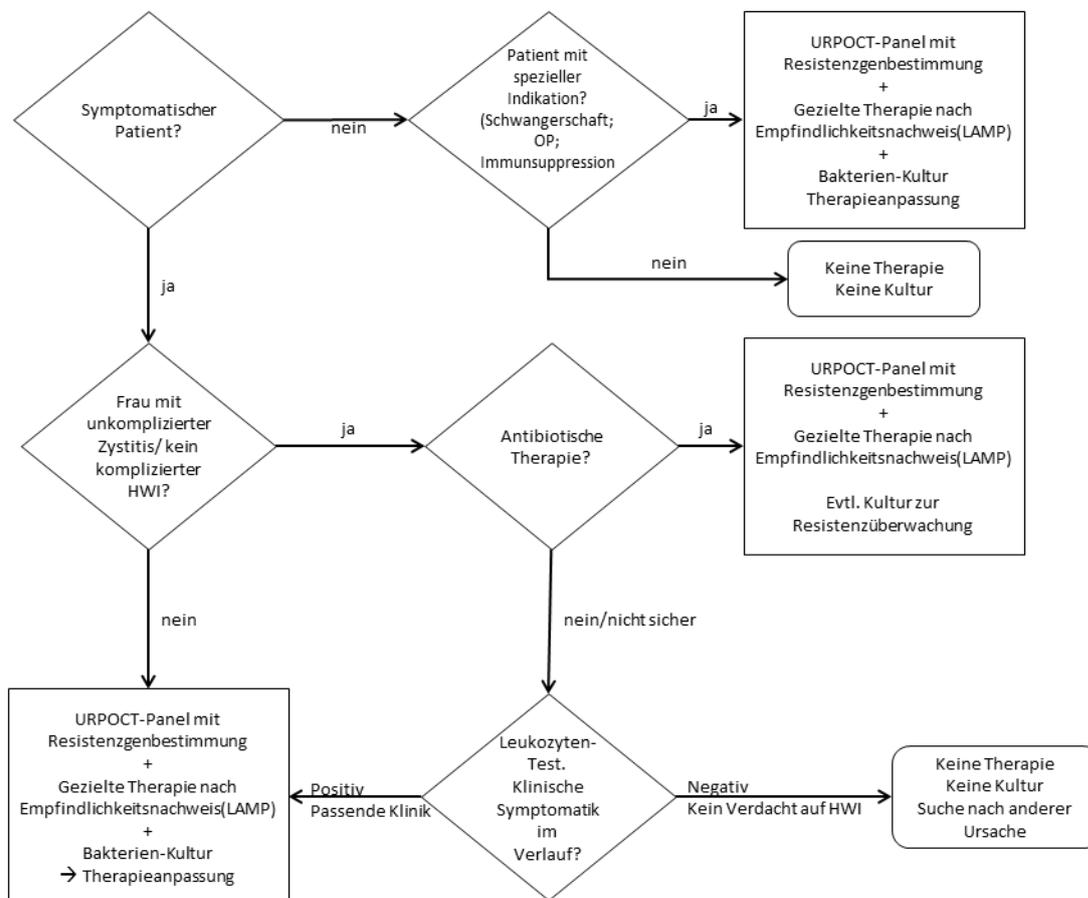


Abbildung 20 Entscheidungsbaum zum Einbinden der LAMP-Diagnostik in den klinischen Alltag (vgl. MiQ 2 05)

Dieser Algorithmus kann jederzeit mit anderen Testsystemen erweitert werden, z.B. um die Durchflusszytometrie.

4.10 Ausblick

Nachdem sowohl Durchführbarkeit als auch Anwendbarkeit und klinischer Nutzen des LAMP basierten Testpanels exploriert wurden, bleibt als nächster Schritt die Testmöglichkeiten um weitere Harnwegserreger zu erweitern. In erster Linie werden wir uns der Entwicklung und Testung von Screeningprimern für *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*, sowie *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* annehmen.

Ebenfalls in der Entwicklung ist die Implementierung von genotypischer Resistenztestung analog zu *E. coli* für die Spezies *Enterococcus faecium/faecalis* und *Klebsiella oxytoca/pneumoniae*.

Im Anschluss daran steht die Möglichkeit, die LAMP-Testmethode multizentrisch zu erproben und gegebenenfalls auf andere Resistenzvorkommen anzupassen und somit gerade die Surrogat-Parameter weiter zu validieren.

Schlussendlich hoffen wir, dass am Ende der tatsächliche, klinische Einsatz unserer Testmethode am Patientenbett steht.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und deren Verbreitung ist zu einer globalen Herausforderung geworden. Wichtige Faktoren hierfür sind, dass zu viele Antibiotika verschrieben werden, selbst wenn sie nicht indiziert wären, und die häufige Verwendung von Breitband-Antibiotika in Fällen, bei denen schmalere Optionen ausreichen würden. Diese Behandlungen finden insgesamt hauptsächlich im Rahmen empirisch kalkulierter Therapie, bevor ein Antibiogramm vorliegt, statt.

Um also die Entwicklung flächendeckender Antibiotikaresistenzen zu verlangsamen, ist eine Testmethode, welche ambulant oder am Patientenbett angewendet werden kann und schnell Antibiotikaempfindlichkeitsvorhersagen treffen kann, nötig. Als ein robustes und schnelles Testsystem hat sich die LAMP-Nukleinsäure-Amplifikationstechnik bewährt, weswegen wir auf dieser Technologie basierend einen Schnelltest für Resistenzen von Harnwegsinfektionserregern, der zweithäufigsten akuten Infektionskrankheit, entwickelt haben.

In dieser Studie wollten wir die Testgütekriterien und die Anwendbarkeit eines Point-of-Care Tests zur Schnelldiagnostik von *E. coli* im Urin mittels einer LAMP-PCR ausloten. Als sekundäre Analyse betrachteten wir die Wertigkeit klassischer Schnelltestverfahren wie die Urindipstickanalyse und die Durchflusszytometrie und in wieweit wir mit Ihnen unseren Point-of-Care Test supplementieren können.

Zur Durchführung unserer Analysen sammelten wir im prospektiven Studiendesign von März 2017 bis August 2017 insgesamt 1.180 Urinproben von Patienten der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Gießen. Diese wurden sowohl im Routinelabor nach Goldstandard kulturell auf Erreger getestet, als auch unserem Testpanel aus LAMP und Durchflusszytometrie unterzogen. Diese Daten wurden zusammen mit der routinemäßig erhobenen Dipstick-Testung zusammengefasst. Basierend auf diesem Datensatz konnte die Testgüte unseres Resistenzpanels bestimmt werden. Zusätzlich betrachten wir explorativ, inwieweit wir Dipsticks und Durchflusszytometrie zum Probenscreening vorschalten können.

Es zeigte sich, dass unser Screeningpanel mit einer Genauigkeit von 96,17% *E. coli* erkennt. Besonders hervorzuheben ist dabei der NPW von 99,69%.

In der klassischen Rapid-Sequenzdiagnostik erreichte die Durchflusszytometrie mit 88,97% Genauigkeit für den Nachweis einer Bakteriurie das beste Ergebnis.

Unser Resistenzpanel sagt mit mindestens 92% (Ausnahme Ampicillin) erfolgreich Antibiotikaempfindlichkeit voraus.

Unsere leistungsstarke Empfindlichkeitsvorhersage gilt zum jetzigen Zeitpunkt methodenbedingt nur für *E. coli*. Trotz sehr hoher Verlässlichkeit der Empfindlichkeitsvorhersage, bewertet das Resistenzpanel zum Teil phänotypisch sensibel getestete Bakterien als resistent. Eine Möglichkeit damit umzugehen, wäre prinzipiell nur zu testen, wenn die klinische Diagnose des Harnwegsinfekts gestellt wurde. Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint das Testen jeder einzelnen Urinprobe mittels der LAMP bei der hohen Rate an Negativergebnissen aus Kostengründen unattraktiv. Als Alternative stellt sich bei Indikationen, die einer schnellen Diagnostik bedürfen, oder auch bei asymptomatischer Bakteriurie behandelt werden würden (Schwangerschaft, OP, Immunsuppression, etc.) die Durchflusszytometrie dar. Mit der Durchflusszytometrie könnte ein Großteil der negativen Proben vorab selektiert werden. Wir konnten in dieser proof of concept Studie die Anwendbarkeit und Verlässlichkeit unseres Resistenzpanels eindrücklich darstellen. Als nächstes bleibt die Implementierung weiterer Speziesdiagnostik um einen umfassenden Keimnachweis des gesamten bakteriellen Spektrums mit Empfindlichkeitsbestimmung zu ermöglichen.

6. Summary

Urinary tract infections (UTIs) are most commonly caused by bacteria and lead to a large volume of empiric calculated antibiotic prescriptions. Over- and misuse of antibiotics leads to antibiotic resistance with dwindling therapeutic options. To enable rational antibiotic selection at therapy initiation, a rapid, sensitive, point-of-care susceptibility testing is needed.

The primary aim of this study was to evaluate the accuracy and feasibility of a novel point of care testing panel in detecting *E. coli* and their resistance genes using loop mediated isothermal amplification (LAMP).

As a secondary analysis, we evaluated other point-of-care or rapid-sequence diagnostic tools to supplement the potential usage of the LAMP.

All urine samples were prospectively collected from urologic patients admitted to the university clinic Giessen between March 2017 and August 2017. Following sample acquisition, the urine samples were screened for presence of *E. coli* specific *gyrA* gene using the LAMP method. Conditional on the presence of *E. coli*, a subsequent antibiotic resistance gene panel testing was performed.

The results of this novel approach were compared to the current clinical gold standard provided by the routine diagnostics of the microbiological, urological and laboratory medicine department.

For the secondary analysis the accuracy of urine dipsticks and urine flow cytometry (UFC) was compared against gold standard with subsequent evaluation of a possible algorithm for sample screening.

A total of 1.073 urine samples were included in the primary analysis. The accuracy of the experimental screening panel to detect *E. coli* was 96.17% with an excellent negative predictive value (99.69%).

Out of the classic rapid-sequence-diagnostics, UFC performed best with an accuracy of 88.97%.

Our resistance panel performed equally well with every susceptibility prediction (under exclusion of Ampicillin) being correct in 92% of cases.

LAMP-panel based testing is a reliable approach to detect the presence of *E. coli* and its antibiotic resistance genes.

Its shortcomings in financial feasibility may be alleviated by performing pretesting. It outperforms classic rapid-sequence-diagnostics and may improve patient care by providing fast access to rational antibiotic therapy for UTIs.

7. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

(Marcel Grabitz)

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Florian Wagenlehner danken, der mir nicht nur dieses Thema zur Verfügung stellte, sondern auch jederzeit bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich ebenfalls bei Prof. Chakraborty für seine Anregungen in Bezug auf Darstellungsmöglichkeiten unserer Untersuchungsergebnisse und seine umfassenden Ratschläge zur Genetik der *E. coli* bedanken.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinem direkten Ansprechpartner in der Mikrobiologie, Dr. Moritz Fritzenwanker, bedanken, der es geschafft hat, alle Erwartungen, die ich an ihn hatte mit Bravour zu überbieten. Ohne ihn würde diese Schrift, sollte es sie geben, gewiss weniger umfassend vorliegen.

Auch möchte ich mich bei Dr. Borros Arneth bedanken, der uns die Daten der Durchflusszytometrie zur Verfügung gestellt hat und während des gesamten Datenerhebungsprozesses aktiv an der Prozessoptimierung arbeitete.

Für sehr viele interessante sowie relevante Informationen und erfahrenen Rat beim Projektdesign danke ich Dr. Can Imirzalioglu.

Für das besondere Laborcoaching, einige Ficoll-Ansätze und Erklärungen jeglicher Geräte, die ich nicht vollständig überblicken konnte, möchte ich mich herzlichst bei Silke Zechel-Gran bedanken.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Claudia Neumann für den entscheidenden Hinweis, wie wir unsere Primer-Verunreinigung in den Griff bekommen konnten.

Ich danke ebenfalls Dr. Azita Lengler für ihre Einführung in die Ausplattierungstechniken von Bakterien in den ersten Wochen meiner Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei Dr. Adrian Pilatz für seine Unterstützung bei der Implementierung des Arbeitsablaufes in der Urologie danken.

Ich spreche ebenso Dr. Jakhongir Alidjanov meinen Dank aus, dass er mir nicht nur guten Rat bezüglich Harnwegsinfektdiagnostik geben konnte, sondern auch sonst mir dabei geholfen hat mich in der Urologie einzufinden.

Für ihre Hilfe mit aller technischen Unwegsamkeit in der Urologie und dafür, dass sie immer eine ausgezeichnete Zimmergenossin war, danke ich Katharina Endres. Nicht nur weil sie mir jede Frage zu STATA und Datenauswertung im Allgemeinen, die ich hätte haben können, beantwortet hat, sondern auch weil sie die beste Schwester ist, die ich mir wünschen könnte, bedanke ich mich bei Stephanie Grabitz.

Zuletzt in Reihenfolge jedoch nicht in Bedeutung bedanke ich mich bei meinen Eltern für Ihre Fähigkeit duldsam auszuhalten, wenn ich über Bakterien sprechen musste und dafür, dass sie mir bei der Korrekturlesung der Arbeit halfen.

Ich danke Agnes für mehr Dinge als ich Seiten habe, sie aufzulisten.

9. Literaturverzeichnis

9.1 Literaturquellen

- Alidjanov, J. F., Pilatz, A., Abdufattaev, U. A., Wiltink, J., Weidner, W., Naber, K. G., & Wagenlehner, F. (2017, March 1). Neuer Fragebogen zur deutschen Validierung des „Acute Cystitis Symptom Score“. *Urologe*. Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s00120-017-0327-2>
- Baym, M., Lieberman, T. D., Kelsic, E. D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., & Kishony, R. (2016). Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*, 353(6304), 1147–1151. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>
- Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., & Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-13>
- Ben Zakour, N. L., Alsheikh-Hussain, A. S., Ashcroft, M. M., Khanh Nhu, N. T., Roberts, L. W., Stanton-Cook, M., ... Beatson, S. A. (2016). Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio*, 7(2), e00347-16.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00347-16>
- Bentaleb, E. M., Abid, M., El Messaoudi, M. D., Lakssir, B., Ressami, E. M., Amzazi, S., ... Ait Benhassou, H. (2016). Development and evaluation of an in-house single step loop-mediated isothermal amplification (SS-LAMP) assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum samples from Moroccan patients. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1864-9>
- Braissant, O., Müller, G., Egli, A., Widmer, A., Frei, R., Halla, A., ... Bonkat, G. (2014). Seven hours to adequate antimicrobial therapy in urosepsis using isothermal microcalorimetry. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2), 624–626.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02374-13>
- Butler, C. C., Hawking, M. K. D., Quigley, A., & McNulty, C. A. M. (2015). Incidence, severity, help seeking, and management of uncomplicated urinary tract infection: a population-based survey. *British Journal of General Practice*, 65(639), e702–e707.

<https://doi.org/10.3399/bjgp15X686965>

- Chapelet, G., Corvec, S., Montassier, E., Herbreteau, G., Berrut, G., Batard, E., & De Decker, L. (2016). Rapid detection of amoxicillin-susceptible *Escherichia coli* in fresh uncultured urine: A new tool to limit the use of broad-spectrum empirical therapy of community-acquired pyelonephritis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *47*(6), 486–489.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.012>
- Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of Chronic Diseases*, *40*(5), 373–383.
[https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
- Chen, Y., Cheng, N., Xu, Y., Huang, K., Luo, Y., & Xu, W. (2016). Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *81*, 317–323.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.006>
- Cho, S., Park, T. S., Nahapetian, T. G., & Yoon, J. Y. (2015). Smartphone-based, sensitive μ PAD detection of urinary tract infection and gonorrhea. *Biosensors and Bioelectronics*, *74*, 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.014>
- Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., ... Dominguez-Bello, M. G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances*, *1*(3), e1500183–e1500183.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
- Conkar, S., & Mir, S. (2018). Urine Flow Cytometry in the Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Indian Journal of Pediatrics*, *85*(11), 995–999.
<https://doi.org/10.1007/s12098-018-2689-x>
- Cussans, A., Somani, B. K., Basarab, A., & Dudderidge, T. J. (2016, May). The role of targeted prophylactic antimicrobial therapy before transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy in reducing infection rates: A systematic review. *BJU International*. <https://doi.org/10.1111/bju.13402>
- Davenport, M., Mach, K. E., Shortliffe, L. M. D., Banaei, N., Wang, T.-H., & Liao, J. C. (2017). New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nature Rev Urology*, *14*(5), 296–310. <https://doi.org/10.1002/aur.1474>. Replication
- Devillé, W. L., Yzermans, J. C., Van Duijn, N. P., Bezemer, P. D., Van Der Windt, D. A. W. M., & Bouter, L. M. (2004, December 2). The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. *BMC Urology*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2490-4-4>
- Duong, H. P., Wissing, K. M., Tram, N., Mascart, G., Lepage, P., & Ismaili, K. (2016).

- Accuracy of automated flow cytometry-based leukocyte counts to rule out urinary tract infection in febrile children: A prospective cross-sectional study. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), 2975–2981. <https://doi.org/10.1128/JCM.01382-16>
- Falbo, R., Sala, M. R., Signorelli, S., Venturi, N., Signorini, S., & Brambilla, P. (2012). Bacteriuria screening by automated whole-field-image-based microscopy reduces the number of necessary urine cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1427–1429. <https://doi.org/10.1128/JCM.06003-11>
- Feng, Y., Hodiament, C. J., Van Hest, R. M., Brul, S., Schultsz, C., & Ter Kuile, B. H. (2016). Development of antibiotic resistance during simulated treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in chemostats. *PLoS ONE*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149310>
- Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., ... Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 704–710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Fritzenwanker. (2013). Genomsequenz des probiotischen *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 (DSM 16431) und vergleichende Genomanalyse mit den Stämmen *E. faecalis* V583, *E. faecalis* OG1RF und *E. faecalis* 62. Retrieved from www.doktorverlag.de
- Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., & Wagenlehner, F. M. (2016). Modern diagnostic methods for urinary tract infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(11), 1047–1063. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1236685>
- Fünfstück, R., Helbig, S., Hofmann, W., & Hyome, U. (2017). Interdisziplinäre S3 Leitlinie Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. <https://doi.org/10.1007/s00120-017-0389-1>
- Gatermann, S., Fünfstück, R., Handrick, W., Leitritz, L., Naber, K., Podschun, R., ... Wittke, J.-W. (2005). *MIQ 02: Harnwegsinfektionen* (2nd ed.). Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. Retrieved from <https://shop.elsevier.de/miq-02-harnwegsinfektionen-9783437226069.html>
- Geerts, N., Boonen, K. J. M., Boer, A. K., & Scharnhorst, V. (2016). Cut-off values to rule out urinary tract infection should be gender-specific. *Clinica Chimica Acta*, 452, 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.11.022>
- Geojith, G., Dhanasekaran, S., Chandran, S. P., & Kenneth, J. (2011). Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a resource limited setting. *Journal of*

- Microbiological Methods*, 84(1), 71–73.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.015>
- Gieteling, E., van de Leur, J. J. C. M., Stegeman, C. A., & Groeneveld, P. H. P. (2014). Accurate and fast diagnostic algorithm for febrile urinary tract infections in humans. *Netherlands Journal of Medicine*, 72(7), 356–362. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25178769>
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Moller, N., & Aarestrup, F. M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 139–146.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02452-13>
- Helling, J. (2002). *Automatisierte Bakterienzahl-Bestimmung im Urin mittels Durchflusszytometrie Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule Hannover Vorgelegt von*. Retrieved from <https://dnb.info/969518714/34>
- Howick, J., Cals, J. W. L., Jones, C., Price, C. P., Piddemann, A., Heneghan, C., ... Thompson, M. (2014). Current and future use of point-of-care tests in primary care: An international survey in Australia, Belgium, The Netherlands, the UK and the USA. *BMJ Open*, 4(8), e005611. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005611>
- Hudson, C. M., Bent, Z. W., Meagher, R. J., & Williams, K. P. (2014). Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS ONE*, 9(6), e99209.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099209>
- Huysal, K., Budak, Y. U., Ulusoy Karaca, A., Aydos, M., Kahvecioğlu, S., Bulut, M., & Polat, M. (2012). Diagnostic accuracy of urised automated urine microscopic sediment analyzer and dipstick parameters in predicting urine culture test results. *Biochemia Medica*, 23(2), 211–217. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.025>
- Imirzalioglu, C., Hain, T., Chakraborty, T., & Domann, E. (2008). Hidden pathogens uncovered: Metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia*, 40(2), 66–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00830.x>
- Imirzalioglu, Can, Falgenhauer, L., Schmiedel, J., Waezsada, S. E., Gwozdziński, K., Roschanski, N., ... Chakraborty, T. (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification-based assay for the rapid detection of plasmid-encoded colistin resistance gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM).
<https://doi.org/10.1128/AAC.02326-16>

- Íñigo, M., Coello, A., Fernández-Rivas, G., Carrasco, M., Marcó, C., Fernández, A., ... Ausina, V. (2016). Evaluation of the SediMax automated microscopy sediment analyzer and the Sysmex UF-1000i flow cytometer as screening tools to rule out negative urinary tract infections. *Clinica Chimica Acta*, *456*, 31–35. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2016.02.016>
- Karrasch, M., Eisenach, S., Vogel, U., Zinke, J., Witte, O. W., Günther, A., ... Rödel, J. (2018). Value of the eazyplex® csf direct assay in rapid diagnosis of invasive meningococcal disease -Case report. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *65*(3), 309–315. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.021>
- Kost, G. J. (1995, October). Guidelines for point-of-care testing: Improving patient outcomes. *American Journal of Clinical Pathology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7484942>
- Kranz, J., Schmidt, S., Lebert, C., Schmiemann, G., & Wagenlehner, F. M. E. (2017). Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten: Aktualisierung 2017 der interdisziplinären AWMF S3-Leitlinie. *Gynakologe*, *50*(8), 630–641. <https://doi.org/10.1007/s00129-017-4110-7>
- Kronenberg, A., Bütikofer, L., Odutayo, A., Mühlemann, K., da Costa, B. R., Battaglia, M., ... Jüni, P. (2017). Symptomatic treatment of uncomplicated lower urinary tract infections in the ambulatory setting: randomised, double blind trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *359*, j4784. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4784>
- Kunin, C. M. (1997). Urinary tract infections. Detection, prevention, and management. *Urinary Tract Infections. Detection, Prevention, and Management.*, (Ed. 5). Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19982006756>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, *10*(12s), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Little, P., Turner, S., Rumsby, K., Warner, G., Moore, M., Lowes, J. A., ... Mullee, M. (2006). Developing clinical rules to predict urinary tract infection in primary care settings: Sensitivity and specificity of near patient tests (dipsticks) and clinical scores. *British Journal of General Practice*, *56*(529), 606–612. <https://doi.org/10.3399/bjgp10x514747>
- Mahony, J., Chong, S., Bulir, D., Ruyter, A., Mwawasi, K., & Waltho, D. (2013). Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40min with single genome copy sensitivity. *Journal of Clinical*

- Virology*, 58(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.006>
- Manoni, F., Valverde, S., Antico, F., Salvadego, M. M., Giacomini, A., & Gessoni, G. (2002). Field evaluation of a second-generation cytometer UF-100 in diagnosis of acute urinary tract infections in adult patients. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(10), 662–668. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2002.00452.X>
- Manoni, Fabio, Fornasiero, L., Ercolin, M., Tinello, A., Ferrian, M., Hoffer, P., ... Gessoni, G. (2009). Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(2), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.06.003>
- Mohan, R., Mach, K. E., Bercovici, M., Pan, Y., Dhulipala, L., Wong, P. K., & Liao, J. C. (2011). Clinical validation of integrated nucleic acid and protein detection on an electrochemical biosensor array for urinary tract infection diagnosis. *PLoS ONE*, 6(10), e26846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026846>
- Monsen, T., & Ryden, P. (2017). A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(9), 1691–1703. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2964-1>
- Moshaver, B., de Boer, F., van Egmond-Kreileman, H., Kramer, E., Stegeman, C., & Groeneveld, P. (2016). Fast and accurate prediction of positive and negative urine cultures by flow cytometry. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1557-4>
- Müller, M., Seidenberg, R., Schuh, S. K., Exadaktylos, A. K., Schechter, C. B., Leichtle, A. B., & Hautz, W. E. (2018). The development and validation of different decision-making tools to predict urine culture growth out of urine flow cytometry parameter. *PLoS ONE*, 13(2), e0193255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193255>
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Nakano, R., Nakano, A., Ishii, Y., Ubagai, T., Kikuchi-Ueda, T., Kikuchi, H., ... Ono, Y. (2014). Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21(3), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.11.010>
- Nichols, J. H. (2007, December 1). Point of Care Testing. *Clinics in Laboratory Medicine*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.07.003>

- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* st131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Oviaño, M., & Bou, G. (2019, January 1). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-18>
- Phan, M. D., Forde, B. M., Peters, K. M., Sarkar, S., Hancock, S., Stanton-Cook, M., ... Schembri, M. A. (2015). Molecular characterization of a multidrug resistance IncF plasmid from the globally disseminated *Escherichia coli* ST131 clone. *PLoS ONE*, 10(4), e0122369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122369>
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012, March). Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- Ponaka, R. V., Curioso, C., Patel, D., Elagin, S., & Slepnev, V. (2015). Molecular detection of *Plasmodium* with Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and sensitivity comparison to PET-PCR assay. Retrieved from http://www.ilmar.org.il/diasorin/MBI_MalariaPoster2015-ASTMH_JT_rev3.pdf
- Quan, H., Sundararajan, V., Halfon, P., & Fong, A. (2005). Coding algorithms for defining comorbidities in. *Medical Care*, 43(11), 1130–1139.
- Rödel, J., Bohnert, J. A., Stoll, S., Wassill, L., Edel, B., Karrasch, M., ... Pfister, W. (2017). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid identification of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(6), 1033–1040. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2888-1>
- Roine, A., Saviuk, T., Kumpulainen, P., Karjalainen, M., Tuokko, A., Aittoniemi, J., ... Oksala, N. K. J. (2014). Rapid and accurate detection of urinary pathogens by mobile IMS-based electronic nose: A proof-of-principle study. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114279>
- Rosanne Sterry-Blunt, E., Randall, K. S., Doughton, M. J., Aliyu, S. H., & Enoch, D. A. (2015). Screening urine samples for the absence of urinary tract infection using the sediMAX automated microscopy analyser. *Journal of Medical Microbiology*, 64(6), 605–609. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000064>
- Rosselló, G. A. M., Rodríguez, M. P. G., De Lejarazu Leonardo, R. O., Domingo, A. O.,

- & Pérez, M. Á. B. (2015). New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Monografías*, 33(2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.022>
- Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Han, E.-T., Bantuchai, S., & Buates, S. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Diagnosis of Malaria Infections in an Area of Endemicity in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1471–1477. <https://doi.org/10.1128/JCM.03313-13>
- Schembri, M., Zakour, N., Phan, M.-D., Forde, B., Stanton-Cook, M., & Beatson, S. (2015). Molecular Characterization of the Multidrug Resistant Escherichia coli ST131 Clone. *Pathogens*, 4(3), 422–430. <https://doi.org/10.3390/pathogens4030422>
- Schmiemann, G., Gágyor, I., Hummers-Pradier, E., & Bleidorn, J. (2012). Resistance profiles of urinary tract infections in general practice - An observational study. *BMC Urology*, 12, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-12-33>
- Schumann, W. (2008). *Plasmids: Current Research and Future Trends*.
- Settu, K., Chen, C. J., Liu, J. T., Chen, C. L., & Tsai, J. Z. (2015). Impedimetric method for measuring ultra-low E. coli concentrations in human urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.027>
- Shih, C. M., Chang, C. L., Hsu, M. Y., Lin, J. Y., Kuan, C. M., Wang, H. K., ... Cheng, C. M. (2015). Paper-based ELISA to rapidly detect Escherichia coli. *Talanta*, 145, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.051>
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/mmb.00020-10>
- Stapleton, P. J., Lundon, D. J., McWade, R., Scanlon, N., Hannan, M. M., O’Kelly, F., & Lynch, M. (2017). Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli urinary isolates and comparison with antibiotic consumption data over 10 years, 2005–2014. *Irish Journal of Medical Science*, 186(3), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s11845-016-1538-z>
- Sun, S. J., Zuo, L. L., Liu, P. P., Wang, X. M., He, M. L., & Wu, S. Y. (2018). The diagnostic performance of urine flow cytometer UF1000i for urinary tract infections. *Clinical Laboratory*, 64(9), 1395–1401. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180210>
- Vega, N. M., & Gore, J. (2014, October). Collective antibiotic resistance: Mechanisms and implications. *Current Opinion in Microbiology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.003>

- Vickers, A. J., & Elkin, E. B. (2006). Decision curve analysis: A novel method for evaluating prediction models. *Medical Decision Making*, 26(6), 565–574.
<https://doi.org/10.1177/0272989X06295361>
- Wagenlehner, F. M., Schmiemann, G., & DGU. (2017). *Leitlinienprogramm DGU: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017 AWMF Registern*. Retrieved from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-044I_S3_Harnwegsinfektionen_2017-05.pdf
- Wagenlehner, F., Tandogdu, Z., Bartoletti, R., Cai, T., Cek, M., Kulchavenya, E., ... Johansen, T. E. B. (2016). The Global Prevalence of Infections in Urology Study: A Long-Term, Worldwide Surveillance Study on Urological Infections. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens5010010>
- Yang, C. C., Yang, S. S. D., Hung, H. C., Chiang, I. N., Peng, C. H., & Chang, S. J. (2017). Rapid differentiation of cocci/mixed bacteria from rods in voided urine culture of women with uncomplicated urinary tract infections. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(5), e22071. <https://doi.org/10.1002/jcla.22071>
- Yang, Q., Domesle, K. J., Wang, F., & Ge, B. (2016). Rapid detection of Salmonella in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. *BMC Microbiology*, 16(1), 112.
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0730-7>
- Yang, Q., Wang, F., Jones, K. L., Meng, J., Prinyawiwatkul, W., & Ge, B. (2015). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of Salmonella in produce. *Food Microbiology*, 46, 485–493.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.011>
- Yu, X., Susa, M., Weile, J., Knabbe, C., Schmid, R. D., & Bachmann, T. T. (2007). Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli from urine samples using a genotyping DNA microarray. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(6), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.018>
- Zakour, N. L. Ben, Alsheikh-hussain, A. S., Ashcroft, M. M., Khanh, T., & Roberts, L. W. (2016). Erratum for Ben Zakour et al ., Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of Escherichia coli ST131. *MBio*, 7(3), e00958-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00958-16>.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., ... Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks261>

Zboromyrska, Y., Rubio, E., Alejo, I., Vergara, A., Mons, A., Campo, I., ... Vila, J. (2016). Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(6), 561.e1-561.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.025>

9.2 Bilderquellen

- [1] Grafik modifiziert nach <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytometer.svg> unter Creative Commons Lizenz. Originalauthor: Kierano Zugriff : 07.10.19
- [2] Grafik modifiziert nach https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_Transcription_Loop-mediated_Isothermal_Amplification & https://en.wikipedia.org/wiki/File:Cycling_amplification_and_elongation_steps_of_RT-LAMP_method.png unter Creative Commons Lizenz. Originalauthor: Lmstanfield Zugriff: 07.10.19

10. Publikationen

Posterpräsentationen

M. Fritzenwanker*, **M. Grabitz***, O. Schwengers, P. Hrouska, B. Arneth, C. Imirzalioglu, F. Wagenlehner, T. Chakraborty, „*Fast Point of Care Testing for Common Uropathogens and Antibiotic Resistances in Urological Urine Samples to Aid Antibiotic Stewardship*“; DZIF Jahrestagung 28 – 30 September 2017

M. Fritzenwanker, V. Negwer, **M. Grabitz**, C. Imirzalioglu, O. Schwengers, T. Chakraborty, F. Wagenlehner:
„*URPOCT – Rapid Point of Care Detection, Quantification and Sensitivity Testing of Uropathogenic Bacteria*“; DZIF Jahrestagung 21 – 23 November 2019

Publikation

M. Fritzenwanker*, **M. Grabitz***, B. Arneth*, H. Renz, C. Imirzalioglu, T. Chakraborty, F. Wagenlehner: „*Comparison of Urine Flow Cytometry on the UF-1000i system and Urine Culture of Urine Samples from Urological Patients*“; Eingereicht in *Urologia Internationalis* am 09.08.2021