

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Institut für Klinische Chemie / Zentrallaboratorien

Direktor: Prof. Dr. Dr. T. Renné

**Arbeit unter der Institutsleitung von**

**Prof. Dr. Christoph Wagener**

Fragmentozyten und Lactat-Dehydrogenase in der  
Diagnostik des Hämolytisch-urämischen Syndroms bei  
Patienten mit *Escherichia coli* O104: H4 Infektion

---

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

**Maher Nassour**

aus Latakia

Hamburg 2015

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.08.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christoph Wagener

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde

Im Andenken an meinen Vater

Für meine liebe Mutter

Für meine Brüder

Maher, Hamburg den 16.03.2015

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Einleitung</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Patientenkollektiv</b>  | <b>15</b> |
| <b>Materialien und Methoden</b>                                      | <b>17</b> |
| <i>Mikrobiologischer Nachweis der Infektion</i>                      | 17        |
| <i>Labormedizinische Untersuchung</i>                                | 17        |
| Hämoglobin-Konzentration   | 17        |
| Thrombozyten-Zahl  | 18        |
| Kreatinin-Konzentration  | 19        |
| Haptoglobin-Konzentration  | 20        |
| Laktatdehydrogenase-Aktivität  | 20        |
| <i>Blutausstrich und Bestimmung der Fragmentozyten-Zahl</i>          | 20        |
| Färbungsprotokoll der manuellen Pappenheimmethode                    | 21        |
| <i>Übersicht Geräte und Reagenzien</i>                               | 22        |
| <i>Statistik</i>   | 23        |
| Definition der Zeitpunkte  | 25        |
| Boxplots   | 26        |
| TTest  | 26        |
| Sensitivität & Spezifität  | 27        |
| AUC und ROC Kurven   | 28        |
| Net Reclassification Improvement Analyse                             | 29        |
| Statistische Plattform R   | 31        |
| <i>Übersicht verwendete Software</i>                                 | 31        |
| <i>Ethik</i>   | 31        |
| <b>Ergebnisse</b>  | <b>32</b> |
| <i>Patientenkollektiv</i>  | 32        |
| <i>Blutausstriche und Qualitätskontrolle der Zählungen</i>           | 32        |
| <i>Unterschiede in Fragmentozytenzahl zum Zeitpunkt der Aufnahme</i> | 39        |
| <i>Zeitlicher Verlauf der Fragmentozytenzahl</i>                     | 40        |
| <i>Klassifikation von Patienten mittels Fragmentozytenzahl</i>       | 42        |
| <i>Kombination von LDH und Fragmentozyten für die Diagnostik</i>     | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Diskussion</b>   | <b>47</b> |
| <i>Bedeutung der untersuchten Patientenkohorte für die klinische Forschung</i>                        | <i>47</i> |
| <i>Eine Fragmentozytenzahl über 0.3% stellt einen guten Grenzwert für die STEC-HUS-Diagnostik dar</i> | <i>48</i> |
| <i>Bedeutung der Fragmentozytenzahl als Frühindikator für HUS</i>                                     | <i>50</i> |
| <i>Bedeutung der Fragmentozytenzahl als Verlaufsparemeter</i>   | <i>50</i> |
| <i>Kombinierte Diagnostik mit LDH Verlaufsdagnostik</i>   | <i>51</i> |
| <i>Messung im Alltag / Automatisierung</i>  | <i>52</i> |
| <i>Zusammenfassung und Einordnung in die Datenlage des ICSH</i>                                       | <i>53</i> |
| <b>Referenzen</b>   | <b>55</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>58</b> |
| <b>Einheiten</b>  | <b>58</b> |
| <b>Anhang</b>   | <b>59</b> |
| <b>Danksagung</b>   | <b>62</b> |
| <b>Eidesstattliche Versicherung</b>   | <b>64</b> |

## Zusammenfassung

Norddeutschland erlebte 2011 eine der größten Ausbrüche mit Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) und Ausbildung von Hämolytisch-urämischem Syndromen (HUS) weltweit. Einer der Parameter, die in der Labormedizin zur Diagnostik des HUS verwendet werden, ist die Anzahl der Fragmentozyten. Hier sollte untersucht werden, welche Fragmentozyten-Grenzwerte in einer großen Patientenkohorte beobachtet werden können und ob eine gleichzeitige Messung der Lactat-Dehydrogenase, die Diagnostik verbessern kann. Hierfür wurden drei Patientengruppen untersucht: Patienten mit STEC-Infektion bei gleichzeitiger Entwicklung eines HUS (STEC-HUS), STEC-Patienten ohne HUS (STEC) und Kontrollpatienten ohne STEC-Infektion, die unter ähnlichen Symptomen wie z.B. (blutigem) Durchfall litten.

Die Klassifizierung der STEC-Patienten erfolgte mittels mikrobiologischem Nachweis. Grundlage für die Diagnose eines HUS war das Auftreten der Trias einer Thrombozytopenie, Anämie und Nierenversagen. Die Fragmentozyten wurden im Blutausschrieb gezählt. Zudem wurden die Anzahl der Thrombozyten sowie die Konzentrationen von Hämoglobin und Kreatinin bestimmt.

In dieser Studie wurden 74 STEC-HUS Patienten, 75 STEC-Patienten und 69 Kontrollpatienten eingeschlossen. Es wurde eine deutliche Erhöhung der Fragmentozytenzahl (Median = 0,8%) bei STEC-HUS-Patienten im Vergleich zu STEC Patienten (Median = 0,1%) und Kontrollpatienten (Median = 0,1%) zum Zeitpunkt der Aufnahme beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein Grenzwert von 0,3% ausreicht, um HUS-Patienten zu klassifizieren. Die Anzahl an Fragmentozyten blieb im Durchschnitt auch zum Zeitpunkt der Normalisierung der Kreatininkonzentration und Thrombozytenzahl erhöht. Sie fiel erst zu einem späteren Zeitpunkt ab. Die LDH-Aktivität eignete sich mit vergleichbarer Leistung zur Klassifizierung von STEC-HUS und STEC bzw. Kontrollpatienten. Eine gleichzeitige Bestimmung beider Parameter, also der Fragmentozyten und der LDH, brachte keinen diagnostischen Vorteil.

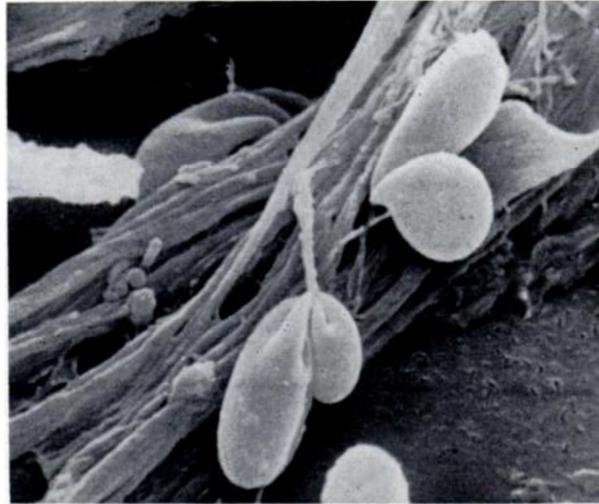
Hier handelt es sich um die bisher größte STEC Patientenkohorte zur Untersuchung von Fragmentozyten beim Hämolytisch-urämischem Syndrom. Dabei konnte das Potential der Fragmentozyten zur Diagnostik eines HUS bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie könnten bei der zukünftigen Wahl eines Cut-offs für die HUS-Diagnostik helfen.

## Einleitung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind Bakterien-Stämme, die in der Lage sind, Shiga-Toxin zu synthetisieren. Typische Begleiterscheinungen einer EHEC-Infektion sind u.a. Bauchschmerzen, blutiger Durchfall, Blut im Stuhl oder eine periphere Leukozytenzahl über 10.000/ $\mu$ l (O'Brien et al., 1983, Levine, 1987, Tarr et al., 2005, Slutsker et al., 1997, Talan et al., 2001). Die Inkubationszeit zwischen der Exposition mit enterohämorrhagischen *E. coli* und dem Auftreten der Symptome liegt in der Regel bei drei bis vier Tagen, wobei bisher ein genereller Zeitraum von ein bis neun Tagen beobachtet wurde (Slutsker et al., 1997).

Als schwere Komplikation einer EHEC-Infektion kann das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auftreten. HUS ist durch eine Trias von hämolytischer Anämie (Hämoglobin-Konzentrationsabfall), Thrombozytopenie (niedrige Thrombozytenzahl) und akutem Nierenversagen (Kreatinin-Konzentrationsanstieg) gekennzeichnet (Ruggenti et al., 2001). Meist folgt die HUS-Symptomatik einer Gastroenteritisphase, die oft gepaart mit blutigem Durchfall auftritt (Gerber et al., 2002). Das Syndrom kann von zusätzlichen Komplikationen begleitet werden, unter anderem durch neurologische Dysfunktionen oder einer Myokardschädigungen (Siegler, 1994). Einige Manifestationen einer Beteiligung des Zentralen Nervensystems umfassen Krampfanfälle, Koma, Schlaganfall, Hemiparese und kortikale Blindheit (Nathanson et al., 2010).

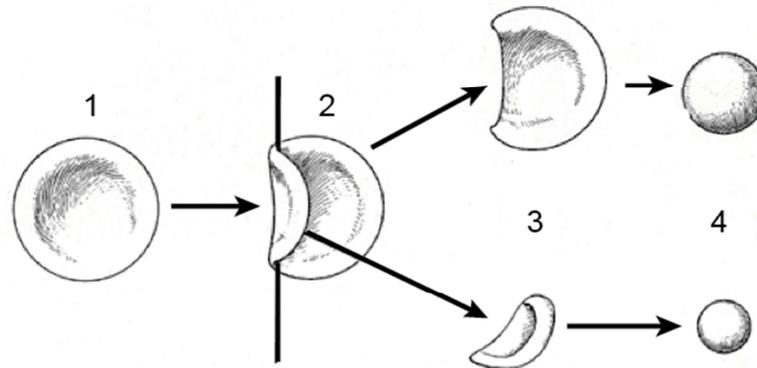
Das Shiga-Toxin-produzierende *Escherichia Coli* (STEC) assoziierte Hämolytisch-urämische Syndrom (STEC-HUS) ist ein wichtiger Auslöser für akute Nierenschädigung bei Patienten aller Altersgruppen, vor allem jedoch bei Kindern (Trachtman et al., 2012). Bei rund 40% der STEC-HUS Patienten ist eine Nierenersatztherapie notwendig – rund 20-25% der Patienten leiden unter neurologischen Dysfunktionen. Als zusätzliche Komplikation tritt HUS bei rund 6 bis 9 Prozent der EHEC-Infektionen insgesamt auf, bei Kindern unter 10 Jahren in etwa 15 Prozent der EHEC-Infektionsfälle (Bell et al., 1994, Boyce et al., 1995, Tarr et al., 2005).



**Abbildung 1: Rasterlektronenmikroskop-Aufnahme. Fibrinstränge auf der endothelialen Oberfläche können mechanische Schädigungen der Erythrozytenmembran hervorrufen und zur Fragmentozytenbildung führen. Entnommen aus Brian S. Bull and Irvin N. Kuhn (Bull and Kuhn, 1970), Copyright-Lizenznummer: 3557130409555.**

HUS ist ein Syndrom, das den Thrombotischen Mikroangiopathischen Anämien (TMA) zugeordnet wird. Die TMA umfassen hauptsächlich zwei Syndrome, das Hämolytisch-urämische Syndrom und die Thrombotische Thrombozytopenische Purpura (TTP). Thrombotische Mikroangiopathien sind mikrovaskuläre okklusive Erkrankungen, mit einer systemischen oder intrarenalen Aggregation von Thrombozyten sowie einer mechanischen Schädigung der Erythrozyten. Der genaue Mechanismus dieser mechanischen Beschädigungen ist noch nicht vollständig verstanden. Vermutet wird jedoch unter anderem, dass die Fragmentierung von Erythrozyten und Bildung der sogenannten Fragmentozyten (Erythrozytenfragmente) durch Turbulenzen in der Mikrozirkulation zustande kommt, in Bereichen bei denen die Gefäße teilweise von Blutplättchenaggregaten verstopft sind (Moake, 2002). Demgemäß führen die Thrombozytenaggregate zu einer niedrigen Thrombozytenzahl während die Turbulenzen die mikroangiopathische hämolytische Anämie verursachen. Zusätzlich zu den Turbulenzen kann eine mechanische Schädigung der Membran, die durch Fibrin-Stränge auf der endothelialen Oberfläche hervorgerufen wird, zur Fragmentozytenbildung führen (Bull and Kuhn, 1970).

Das Auftreten dieser Erythrozytenfragmente, der Fragmentozyten, ist gemäß der Empfehlungen des International Council for Standardization in Hematology (ICSH)

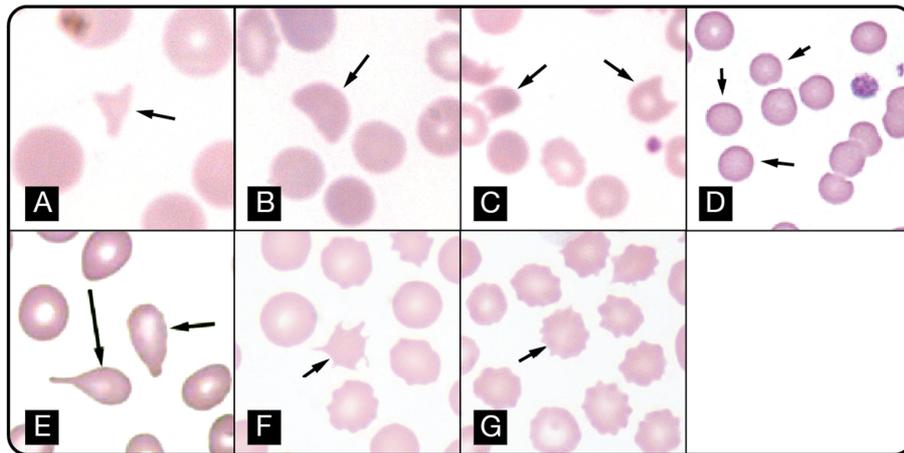


**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fragmentozytenentstehung durch mechanische Schädigung. Ein Diskozyt (1) wird an einem Fibrinstrang (2) zerteilt. Die dabei entstehenden Fragmentozyten werden zu Sphero-Fragmentozyten, die sehr einfach hämolysieren. Entnommen aus und modifiziert nach (Bessis, 1977)**

ein Indiz für das Vorliegen einer Thrombotischen Mikroangiopathischen Anämie (Zini et al., 2012), da fragmentierte Erythrozyten in der Regel nicht oder nur sehr selten in Blutausstrichen von gesunden Personen vorhanden sind. In der Diagnostik werden die Fragmentozyten als Prozentsatz nach dem Zählen von mindestens 1000 Zellen abgeschätzt. Gemäß Literatur zeigt ein Fragmentozyten-Anteil von über 1% eine Thrombotische Mikroangiopathische Anämie an (Zini et al., 2012).

Der Nachweis von Fragmentozyten erfolgt in der Regel durch eine mikroskopische Inspektion eines Pappenheim-gefärbten, peripheren Blutausstrichs. Gemäß den ICSH-Empfehlungen (Zini et al., 2012), sind Fragmentozyten stets kleiner als intakte rote Blutkörperchen (Erythrozyten) und werden als kleine Fragmente unterschiedlicher Form wie folgt definiert:

1. *Dreiecke und Microcrescents*: Kleine Fragmente von unterschiedlicher Form, die mitunter spitze Ecken oder stachelförmige Strukturen (Dreiecke) aufweisen. Sie weisen gerade Kanten, mitunter aber auch eine runde Begrenzung auf einer Seite auf (Microcrescent).
2. *Helm-Zellen*: Beschädigte Erythrozyten, mit einzelnen, selten zwei gekappten Zonen, die gerade Kanten und scharfe Grenzen aufweisen. Der fehlende Zellenabschnitt entspricht jenem Fragment, das als Ergebnis eines Bruchs an einem Fibrin-Strang abgerissen wurde.



**Abbildung 3: Übersicht zu den verschiedenen Formen der Zell- und Fragmenttypen, die bei der Fragmentozytenzählung berücksichtigt oder verworfen werden: (A) Dreiecke, (B) Helmzellen, (C) Keratozyten, (D) Sphärozyten, (E) Dakrozyten, (F) Akanthozyten und (G) Echinozyten.**

3. *Keratozyten*: Beschädigte Zellen, größer als die kleinen Fragmente, mit einem Paar aus hornförmigen Strukturen. Diese beiden hornförmigen Strukturen werden durch ein konkavförmiges Membransegment getrennt und können auch mehrfach (1 bis 3 Paare) auftreten. Die Keratozyten entstehen durch eine Ruptur einer oder mehrerer peripherer Pseudovakuolen mit anschließender Fusion der Zellmembran.

Gemäß diesen Empfehlungen sollten Sphärozyten, Dakrozyten, Akanthozyten, Echinozyten und irregulär kontrahierte Zellen in einer Fragmentozytenzählung nicht berücksichtigt werden. Mikrosphärozyten werden nur bei Anwesenheit der anderen Formen berücksichtigt. Eine grafische Übersicht zu den verschiedenen Fragmentozytentypen findet sich in Abbildung 3.

Das Auftauchen von Fragmentozyten im Blutbild bei der Thrombotischen Mikroangiopathischen Anämien kann mitunter verzögert oder stark reduziert auftreten (Akiyama et al., 1997, Daram et al., 2005, Fava and Galizia, 1995). Zur Unterstützung einer TMA-Diagnose, wie z.B. dem HUS, werden daher häufig weitere Parameter wie die Laktat-Dehydrogenase (LDH) oder Haptoglobin herangezogen. So wird z.B. für Transplantations-assoziierte TMA eine zusätzliche Betrachtung der Thrombozytopenie, LDH-Aktivität sowie der Hämoglobin- und Haptoglobinkonzentration empfohlen (Ruutu et al., 2007).

Insbesondere die LDH-Aktivität kann unterstützend herangezogen werden, um Hinweise auf eine Zellschädigung zu bekommen. Bei der Laktat-Dehydrogenase handelt es sich um ein Wasserstoff-übertragendes Enzym, das unter Einsatz von NAD<sup>+</sup> als Wasserstoffakzeptor die Oxidation von Laktat zu Pyruvat katalysiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die reversible Reaktion von Pyruvat zu Laktat stark begünstigt (Thomas, 2012). Das LDH-Enzym liegt in allen Körperzellen zytoplasmatisch gelöst vor und wird bei Zellschädigung freigesetzt. Da die Enzymaktivität dort im Mittel 500-fach höher ist als im Serum, können bereits kleine Gewebeschäden zur Erhöhung der LDH-Aktivität im Serum führen – wodurch sich die Messung einer erhöhten LDH-Aktivität im Serum oder Plasma gut zur Diagnose von Zellschädigungen eignet. Hierbei ist zu beachten, dass diverse Gewebe eine unterschiedliche Isoenzymausstattung haben. Im Herzmuskel und den Erythrozyten dominieren LDH-1 und LDH-2, in der Leber LDH-5. Die LDH-3 und LDH-4 kommen in Lunge, lymphatisches System, Milz, endokrinen Drüsen und den Thrombozyten vor (Thomas, 2012).

Beim Hämolytisch-urämisches Syndrom ist die LDH-Aktivität im Serum und Plasma aufgrund der mikroangiopatischen Lyse der Erythrozyten erhöht. Allerdings tragen auch andere bei der Erkrankung auftretende Gewebeschäden zu dem Anstieg bei. Im Verlauf einer HUS-Erkrankung wird die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität bisher zwar regulär zur Überwachung der Zellschädigung herangezogen, Bestandteil der offiziellen Leitlinien für die HUS-Diagnostik ist sie jedoch nicht.

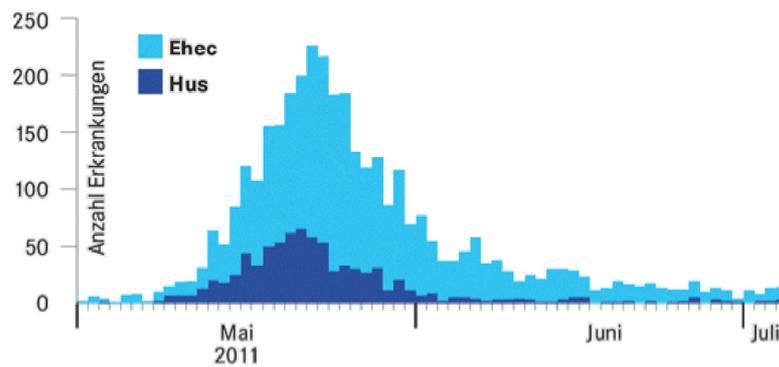
Folgt man der Literatur (Trachtman et al., 2012, Zini et al., 2012) so wird eine STEC-HUS-Komplikation durch drei klinische Befunde nach einer prodromalen Infektion durch einen Shiga-Toxin-produzierenden *Escherichia Coli* Stamm definiert: Der Thrombozytopenie, dem akuten Nierenversagen sowie der hämolytischen Anämie bei gleichzeitiger Beobachtung der Erythrozyten-Fragmentierung, wobei der Grenzwert in der Fragmentozytendiagnostik in den ICSH-Leitlinien bei 1% festgesetzt wird. Betrachtet man aber die Studien auf deren Basis diese Leitlinien ausgearbeitet wurden so stellt man fest, dass gerade einmal drei HUS-Fälle in die Statistik eingegangen sind, siehe Tabelle 1. Bei der Mehrheit der Fälle in den zugrundeliegenden Studien handelt es sich um TTP-Patienten oder um Patienten mit einer nicht weiter definierten chronischen Nierenerkrankung. Eine Studie zur

Fragmentozyten-Diagnostik in einer großen HUS-Patientenkohorte und einer möglichen Kombination mit der LDH-Diagnostik fehlte bisher. Eine zuverlässige Ermittlung eines robusten Grenzwertes für die Diagnostik lag somit bisher nicht vor.

| Studie               | Chronische Nierenerkran. | TTP | HUS | Gesunde Probanden |
|----------------------|--------------------------|-----|-----|-------------------|
| Klein et al., 1975   | -                        | -   | -   | 100               |
| Burns et al., 2004   | 28                       | 6   | -   | 40                |
| Lesesve et al., 2007 | -                        | 16  | 3   | 116               |

**Tabelle 1: Übersicht zu den Studien, die den Leitlinien des ICSH zugrunde liegen. Die Empfehlungen des ICSH beruhen auf drei Studien, die hauptsächlich Patienten untersucht haben, die unter chronischen Nierenerkrankungen oder Thrombotisch Thrombozytopenischer Purpura (TTP) litten. Lediglich drei der untersuchten Patienten wiesen ein Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) auf.**

Im Mai 2011 und Juni 2011 erlebten Norddeutschland und weitere Länder in Europa eine massive EHEC-Infektionswelle mit mehr als 3000 betroffenen Personen. Als Erreger des Ausbruchs wurde ein neuer, Shiga-Toxin-produzierender EHEC-Stamm mit der Bezeichnung O104:H4 identifiziert (Buchholz et al., 2011, Frank et al., 2011). O104:H4 wurde als enteroaggregativer *Escherichia Coli* Stamm eingestuft, der Gene erworben hatte, die eine Shiga-Toxin 2 und Antibiotikaresistenz kodieren (Rohde et al., 2011). Im Vergleich zu bisherigen Infektionswellen war der Ausbruch im Jahr 2011 durch ein besonders hohes Durchschnittsalter der Patienten sowie einen besonders hohen Anteil an Patienten gekennzeichnet, die zusätzlich unter einem Hämolytisch-urämisches Syndrom litten. Statistiken des Robert Koch Institutes (RKI) zufolge wiesen über 22% der Patienten eine HUS-Assoziation auf, 88% der infizierten Patienten waren 18 Jahre alt oder älter und mehr als 60% der Patienten waren weiblichen Geschlechts (Buchholz et al., 2011, Frank et al., 2011). Insgesamt entwickelten im Verlauf des Ausbruchs 852 Patienten HUS-Komplikationen, über 46 Patienten starben an den Folgen der HUS-Komplikation (Frank et al., 2011).



**Abbildung 4: Anzahl der Erkrankungen während des EHEC-Ausbruchs in Deutschland im Jahr 2011. Es ist zu erkennen, dass ein großer Anteil der Patienten ein HUS entwickelt haben. Modifiziert nach (Robert Koch-Institut, 2011).**

Das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf war eines der primären Behandlungszentren während der Infektionswelle in Deutschland. Mit dem Ausbruch ergab sich somit die einmalige Gelegenheit das Potential der Fragmentozytendiagnostik in einer großen Kohorte von STEC-HUS und STEC-Patienten zu untersuchen. Um eine zukünftige, mögliche Verbesserung der aktuellen Leitlinien zu unterstützen wurde daher in der vorliegenden Arbeit drei Fragestellungen nachgegangen:

- Dem Potential der Fragmentozyten zur Differenzierung zwischen STEC-infizierten Patienten und STEC-infizierten Patienten, die zusätzlich unter HUS-Komplikationen litten. Hierzu gehört auch die Frage nach dem optimalen Grenzwert, der Sensitivität und Spezifität maximiert.
- Dem zeitlichen Verlauf der Fragmentozytenzahl bei der STEC-HUS Infektion.
- Dem diagnostischen Potential der Fragmentozyten zur Klassifikation von STEC-HUS Patienten im Vergleich zur LDH-Aktivität und der Frage, ob eine gleichzeitige Betrachtung von Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität einen diagnostischen Mehrwert bietet.

Nach bestem Wissen und Gewissen des Autors handelt es sich hier um die Studie mit der größten STEC-HUS-Kohorte, die diesen Fragen nachgeht.

---

## Patientenkollektiv

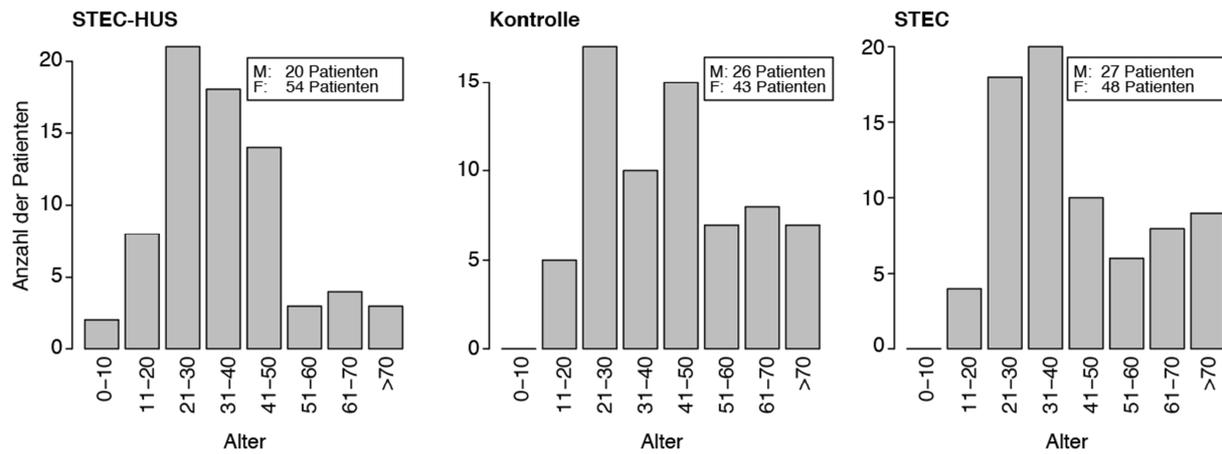
In dieser Arbeit wurden drei Patientengruppen untersucht:

- Patienten, die an einer STEC-Infektion erkrankt waren ("STEC").
- Patienten, die zusätzlich zu der STEC-Infektion ein Hämolytisch-urämisches Syndrom aufgrund der Infektion entwickelt haben ("STEC-HUS").
- Eine Kontrollgruppe an Patienten, bei denen keine STEC-Infektion vorlag, die aber unter vergleichbaren Symptomen wie z.B. blutigem Stuhlgang litten ("Kontrolle").

Initial in die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die mit Verdacht auf eine STEC-Infektion, aufgrund entsprechender Symptome wie blutigem Durchfall, vorstellig wurden. Bei Aufnahme der Patienten wurde von dem Institut für Mikrobiologie eine Stuhlanalyse durchgeführt, um auf eine STEC-Infektion zu testen. Patienten ohne Anzeichen für eine STEC-Infektion wurden als Kontrollgruppe eingestuft. Patienten, bei denen Shiga-Toxin-produzierende *Escherichia coli* O104:H4 in Stuhlproben nachgewiesen werden konnten, wurden je nach HUS-Symptomatik in die STEC-HUS oder STEC-Gruppe eingruppiert. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden in dem Zeitraum des EHEC Ausbruchs von Mitte Mai 2011 bis Ende Oktober 2011 untersucht.

Bei der Auswahl der Kontrollpatienten wurde insbesondere auf die Altersverteilung geachtet. Es wurde sichergestellt, dass die Kontrollgruppe eine vergleichbare Altersverteilung mit der STEC und STEC-HUS Gruppe aufwies. Dafür wurden die Patienten in acht Altersklassen mit einer Spanne von je 10 Jahren unterteilt (0-10 Jahre, 11-20 Jahre, 21-30 Jahre, 31-40 Jahre, 41-50 Jahre, 51-60 Jahre, 61-70 Jahre, älter als 70 Jahre). Zudem wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis zwischen Männern und Frauen in allen drei Gruppen vergleichbar ist.

Eine Übersicht über die Altersverteilung in den drei Gruppen befindet sich in Abbildung 5.



**Abbildung 5: Altersverteilung der in die Studie eingeschlossenen Patienten. Die Patienten wurden derart gewählt, dass die drei Gruppen (STEC-HUS, STEC, Kontrolle) möglichst vergleichbare Altersverteilungen aufweisen.**

## **Materialien und Methoden**

### **Mikrobiologischer Nachweis der Infektion**

Der Nachweis einer STEC-Infektion erfolgte mikrobiologisch im Institut für Mikrobiologie. Eine Stuhlprobe des Patienten wurde auf Sorbitol MacConkey-Agar (Oxoid) und ESBL-Agar (Biomerieux) ausgebreitet und bei 36°C für bis zu 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde den auf dem Agar gewachsenen Kolonien eine 10µl-Schleife an Bakterien entnommen und in 500µl TE-Puffer suspendiert. Die Suspension erfolgte bei 95°C für 10 Minuten. Die Probe wurde geklärt und mit dem Überstand eine STX-spezifische PCR-Reaktion durchgeführt (Rohde et al., 2011).

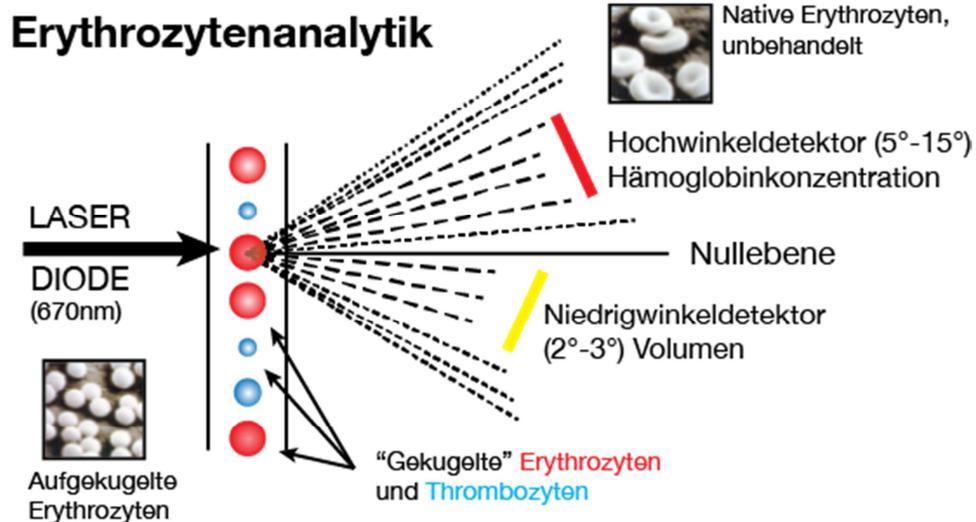
Parallel zu der STEC-Analytik wurden alle Stuhlproben mittels mikrobiologischer Kultivierungstechnik auf die Nachweisbarkeit von *Salmonella sp.* und *Campylobacter sp.* getestet.

### **Labormedizinische Untersuchung**

Jedem Patienten wurden im Verlauf der Erkrankung mehrere EDTA-Blut- und Lithium-Heparin-Plasma-Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die EDTA-Blut-Proben der Patienten wurden auf einem ADVIA® 2120i Zähler der Firma Siemens (Siemens AG, Eschborn) hämatologisch analysiert und dokumentiert. Die Plasma-Proben wurden zur Bestimmung der Kreatinin- und Haptoglobinkonzentration sowie der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH) verwendet und auf einem Dimension-Vista-Systems Gerät der Firma Siemens (Siemens AG, Eschborn) analysiert.

### ***Hämoglobin-Konzentration***

Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wurde eine spezifisch modifizierte Methode des International Council for Standardization in Hematology (ICSH) eingesetzt. Hierfür wurden die Erythrozyten zuerst vollständig lysiert. Anschließend wurden sämtliche Hämoglobinfraktionen mit Kalziumcyanid oxidiert und als Zyanmethämoglobin gemessen. Die Hämoglobinkonzentration wurde dann auf dem ADVIA® 2120i Zähler (Siemens AG, Eschborn) photometrisch im Messkanal gegen



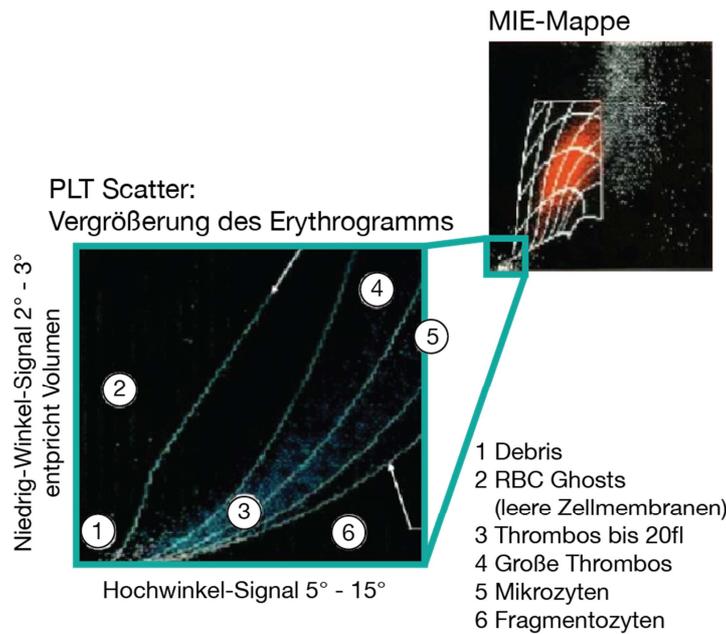
**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erythrozyten- und Thrombozytenzählung mittels Lichtstreuungsverfahren auf dem ADVIA® 2120i Zähler (Siemens, Eschborn). Erythrozyten und Thrombozyten werden anhand von Zellvolumen und Hämoglobinkonzentration in einem Erythrogramm und der MIE-Mappe (siehe Abbildung 7) unterschieden. Zellvolumen und Hämoglobinkonzentration werden mittels Niedrigwinkel- und Hochwinkeldetektor bestimmt.**

eine Referenzlösung (Sheat-Rinse) gemessen. Hierfür wurde eine Wellenlänge von 546nm bei Einsatz Cyanidhaltigem HB-Reagenz verwendet und eine Wellenlänge von 564nm bei Einsatz von Cyanidfreiem HB-Reagenz. Bei uns wurde das Cyanidfreie HB-Reagenz verwendet.

### *Thrombozyten-Zahl*

Die Thrombozytenzahl wurde im Lichtstreuungsverfahren auf dem ADVIA® 2120i Zähler (Siemens, Eschborn) optisch in einem LASER-Messkanal bei einer Wellenlänge von 670nm optisch gemessen („Scattered Light Optical Method“). Bei dem Verfahren werden die Thrombozyten mit speziellen Reagenzien isovolumetrisch aufgekugelt. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung, einem Verfahren bei dem die Zellen von einem Mantelstrom zylindrisch umhüllt werden, gewährleistet das Gerät, dass die Zellen die Messöffnung einzeln passieren und als singuläre Zellen gemessen werden können.

Die Vorwärtstreulichtsignale jeder Zelle werden in zwei unterschiedlichen Winkelbereichen (Niedrigwinkel 2-3°C und Hochwinkel 5-15°C) von Detektoren aufgefangen und in ein Erythrogramm projiziert. Mit Hilfe der MIE-Mappe ist es



**Abbildung 7: Erythrogramm und MIE-Mappe zur Unterscheidung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten. Thrombozyten weisen ein geringeres Volumen als Erythrozyten auf und beinhalten kein Hämoglobin.**

möglich, die Doppelwinkelsignale jeder Einzelzelle in das individuelle Zellvolumen und den Brechungsindex des Thrombozyten zu transformieren.

Die Einbeziehung des Brechungsindex bildet die Grundlage dafür, mit dieser Messtechnik einerseits Interferenz zu messen und zum anderen die Erfassung der Thrombozyten bis zu einer Größe von 60fl möglich zu machen.

### *Kreatinin-Konzentration*

Kreatinin reagiert mit Pikrat im Vorhandensein einer starken Base wie NaOH und bildet ein rotes Chromophor. Die zunehmende Extinktionsänderung bei 510nm durch die Bildung dieses Chromophors ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe und wird mit der bichromatischen Kinetik (bei 510nm und 600nm) gemessen. Bilirubin wird mit Kaliumferricyanid oxidiert, um eine Interferenz zu vermeiden.



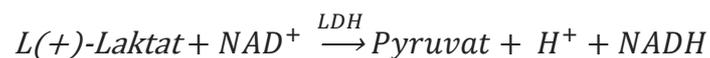
Die Kreatinin-Konzentration wurde auf dem Dimension-Vista-System (Siemens, Eschborn) analysiert.

### ***Haptoglobin-Konzentration***

Haptoglobin wurde mittels einer immunochemischen Methode analysiert. In dem verwendeten Verfahren bildet Haptoglobin mit einem spezifischen Antikörper Immunkomplexe, an denen eingestrahltes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichts ist proportional zur Konzentration des Haptoglobin-Proteins in der Probe. Die Auswertung erfolgt anschließend durch den Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration.

### ***Laktatdehydrogenase-Aktivität***

Die LDH-Aktivität wurde ebenfalls auf dem Dimension-Vista-System (Siemens AG, Eschborn) ermittelt. Beim verwendeten Messverfahren wird ein auf einen pH-Wert von 9.4 gepuffertes L-Laktat als Substrat eingesetzt. Laktatdehydrogenase oxidiert bei Vorhandensein von  $NAD^+$  zu Pyruvat und NADH (Absorption bei 340nm). Die LDH-Aktivität wird als Reaktionsgeschwindigkeit von 340/700nm erfasst, die proportional der Menge der in der Probe vorhandenen Laktatdehydrogenase entspricht.



LDH existiert in mehreren Isoformen, die gewebespezifisch sein können. Das hier verwendete Verfahren kann diese Isoformen jedoch nicht auseinanderhalten.

### **Blutausstrich und Bestimmung der Fragmentozyten-Zahl**

Für jeden Patienten wurde bei Aufnahme ein peripherer Blutausstrich und eine mikroskopische Analyse und Klassifikation durchgeführt. Die Blutausstriche wurden mit der panoptischen Methode von Pappenheim mit May-Grünwald und Giemsa-Lösungen gefärbt und im Mikroskop optisch bestimmt. Zum Teil wurde die Fragmentozytenzahl zusätzlich automatisch auf dem ADVIA® 2120i Zähler (Siemens AG, Eschborn) bestimmt.

Die Fragmentozyten wurden manuell durch drei Hämatologie-Spezialisten in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des ICSH zur Identifizierung und Quantifizierung von Fragmentozyten (Anzahl der fragmentierten Erythrozyten pro 1000 Erythrozyten) gezählt. Gemäß den Leitlinien des ICSH wurden dabei Sphärozyten, unregelmäßig kontrahierte Zellen, Dakrozyten, Akanthozyten und Echinozyten sowie Bite Cells nicht als Fragmentozyten gewertet (Zini et al., 2012).

Vor der statistischen Analytik wurde die Güte der Übereinstimmung zwischen den drei unabhängigen Zählungen als Korrelationskoeffizienten bestimmt und der Mittelwert ermittelt. Zur weiteren Analyse wurden anschließend die Fragmentozyten-Zahlen in eine Prozentskala umgewandelt.

#### ***Färbungsprotokoll der manuellen Pappenheimmethode***

Das Blut wird auf einem Objektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und anschließend fixiert. Zum Anfärben wird der fixierte Ausstrich sodann:

1. 4 Minuten mit May-Grünwald-Lösung behandelt.
2. Mit Aqua dest. gespült.
3. 10 Minuten mit Giemsa-Lösung behandelt.
4. Mit Leitungswasser gespült.

Im Anschluss wird der Ausstrich mit Heißluft getrocknet.

## Übersicht Geräte und Reagenzien

| Gerät                     | Hersteller           | Bestimmter Parameter                                  |
|---------------------------|----------------------|---|
| ADVIA ® 2120i Zähler      | Siemens AG, Eschborn | Thrombozyten, Hämoglobin, Erythrozyten/Fragmentozyten |
| Dimension Vista ® Systems | Siemens AG, Eschborn | Kreatinin, Haptoglobin, LDH                           |
| Mikroskop Axioskop 40     | Carl Zeiss, Jena     | Fragmentozyten  |

**Tabelle 2: Zur Fragmentozyten- und Parameterbestimmung verwendete Geräte.**

| Reagenz                                | Hersteller            |
|--|-----------------------|
| Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung  | Merck KGaA, Darmstadt |
| May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung | Merck KGaA, Darmstadt |
| Aqua B.Braun                           | B.Braun, Melsungen AQ |

**Tabelle 3: Reagenzien für die manuelle Fragmentozytenfärbung.**

| Reagenz   | Hersteller   | Bestimmter Parameter           |
|---|--|--------------------------------|
| May-Grünwald-Lösung   | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| Giemsa-Lösung   | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| May-Gründwald-Giemsa-Puffer                                 | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| Methanol  | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| ADVIA Autoslide-Spüllösung                                  | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| Objektträger  | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| Aqua dest.  | Siemens AG, Eschborn                                   | Fragmentozyten                 |
| Flex reagent cartridge<br>Reagenzien K1033,<br>K2054, K7042 | Siemens Healthcare<br>Diagnostics Inc., Newark,<br>USA | Kreatinin, LDH,<br>Haptoglobin |

**Tabelle 4: Reagenzien für die automatisierte Fragmentozytenfärbung. Die Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für den ADVIA ® 2120i werden gebrauchsfertig geliefert.**

| Analyse     | Reagenz                                    | Inhaltsstoff  | Konzentration                           |
|-------------|--|---|---|
| Kreatinin   | Flex reagent cartridge<br>Reagenz, K1033   | Lithiumpikrat,<br>NaOH,<br>K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]  | 25 mmol/l<br>100 mmol/l<br>0.13 mmol/l  |
| LDH         | Flex reagent cartridge<br>Reagenz 1, K2054 | N-Methyl-D-Glucamin,<br>L(+)-Laktat,<br>NaCL  | 1091 mmol/l<br>168 mmol/l<br>513 mmol/l |
| LDH         | Flex reagent cartridge<br>Reagenz 2, K2054 | $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-<br>Dinucleotid (NAD),<br>$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-<br>Dinucleotid-Lithiumsalz,<br>Konservierungsmittel,<br>Stabilisatoren | 16.5 mmol/l<br>36 mmol/l                |
| Haptoglobin | Flex reagent cartridge<br>Reagenz, K7042   | Reaktionspuffer,<br>Phosphatpuffer,<br>Polyethylenglykol,<br>Antiserum gegen human<br>Haptoglobin   | 56 g/l<br>984 g/l                       |

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Reagenzien für die Bestimmung der klinischen Parameter.**

## Statistik

Die nachfolgende statistische Analytik sollte hauptsächlich drei Fragen klären:

1. Wie gut kann die Anzahl der beobachteten Fragmentozyten zur Klassifikation von STEC-HUS-Patienten herangezogen werden und welcher Grenzwert maximiert Sensitivität und Spezifität?
2. Wie sieht der zeitliche Verlauf der Fragmentozytenzahl bei STEC-HUS-Patienten aus?
3. Wie hoch ist das diagnostische Potential der Fragmentozyten zur Klassifikation von STEC-HUS Patienten zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme im Vergleich zur LDH und kann die Klassifikation durch einen gleichzeitigen Einsatz von Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität signifikant verbessert werden?

Zu Beginn wurden die Zeitpunkte der Patientenprobensammlung in fünf Zeitfenster klassifiziert: Patientenaufnahme, Peak der Erkrankung, 1. Zeitpunkt der Remission, 2. Zeitpunkt der Remission und 3. Zeitpunkt der Remission. Die Zeitpunkte wurden anhand der gemessenen Laborparameterwerte LDH, Kreatinin, Hämoglobin und Thrombozyten bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Abschnitt *„Definition der Zeitpunkte“*.

Um zu ermitteln ob prinzipielle Unterschiede in der Anzahl der beobachteten Fragmentozytenzahl zwischen den drei Patientengruppen (STEC, STEC-HUS, Kontrollgruppe) zum Zeitpunkt der Aufnahme vorliegen wurden die jeweils ermittelten Werte verglichen. Hierfür wurde ein T-Test verwendet, der eine mögliche ungleiche Varianz berücksichtigt und die Signifikanz der potentiellen Unterschiede als p-Wert zurückgibt. Die Berechnung der p-Werte erfolgte in Microsoft Excel 2010. Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens findet sich in Abschnitt *„TTest“*.

Für eine grafische Aufarbeitung der gemessenen bzw. ermittelten Werte wurden die Werte-Verteilungen berechnet und als Box-Whisker-Plots dargestellt. Im nächsten Schritt wurden die zeitlichen Verläufe der Parameter visuell inspiziert und bewertet. Eine detaillierte Beschreibung dieser Darstellung findet sich in Abschnitt *„Boxplots“*.

Zusätzlich wurde die Fähigkeit der Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität zur Klassifikation von STEC-HUS-Patienten ermittelt. Dafür wurden Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven sowie die Fläche unter den Kurven (AUC) berechnet. Diese Kurven zeigen die Abhängigkeit und den Verlauf von Spezifität und Sensitivität auf. Anhand der AUC wurde der optimale Fragmentozyten-Grenzwert für die Klassifikation ermittelt. Mittels eines Hypothesentests wurde zudem analysiert ob Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität ein signifikant unterschiedliches Klassifikationspotential aufweisen. Eine detaillierte Beschreibung der ROC Kurven und des verwendeten Hypothesentests findet sich in Abschnitt *„AUC & ROC Kurven“*.

Zuletzt wurde ein Net Reclassification Improvement (NRI) Verfahren eingesetzt, um zu prüfen ob eine gleichzeitige Bestimmung von LDH und Fragmentozyten die HUS-Diagnostik verbessern könnte. Eine detaillierte Beschreibung des Net Reclassification Improvement Verfahrens findet sich in Abschnitt *„NRI Analyse“*.

**Definition der Zeitpunkte**

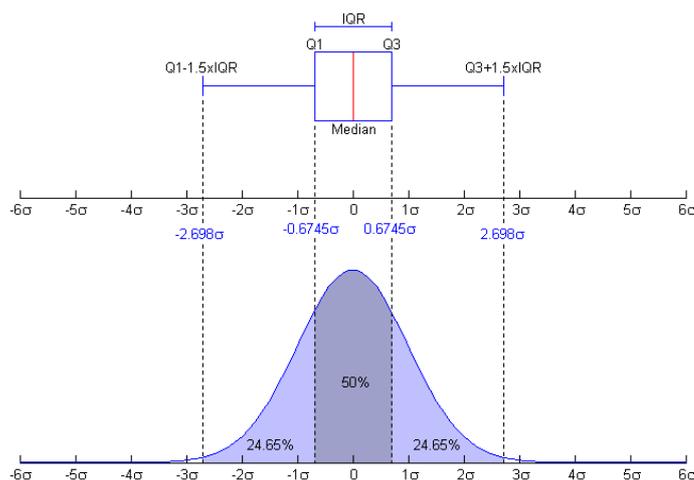
Für die Auswertung der Parameteränderungen über die Zeit wurden Zeitpunkte definiert, welche die Aufnahme des Patienten, Höhepunkt der Erkrankung sowie unterschiedliche Zeitpunkte der Remission reflektieren. Der erste Zeitpunkt stellt jene erste Probe dar, die direkt bei der Patientenaufnahme und mikrobiologischen Diagnose der STEC-Infektion gesammelt wurde. Der Höhepunkt der Erkrankung wurde als jene Probe definiert, die durch den LDH-Aktivitätspeak bestimmt ist. Der erste Zeitpunkt der Remission wurde für jene erste Probe im zeitlichen Verlauf definiert, die keine Trias mehr aufweist von erhöhtem Kreatinin, verminderten Blutplättchen und vermindertem Hämoglobin. Zum zweiten Zeitpunkt der Remission liegen bereits zwei der drei Trias-Parameter wieder innerhalb des Referenzbereiches. Der letzte Zeitpunkt schließlich definiert jene letzte Probe, die vor der Entlassung des Patienten gesammelt wurde. Hier sollten alle drei Parameter wieder innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche liegen.

Um einen Eindruck von der Dynamik der Fragmentozytennachweisbarkeit zu bekommen haben wir zudem noch die Fragmentozytenzahl in jenen Proben analysiert, die während der „Vorlaufzeit“ vor Manifestation des HUS gesammelt wurden.

Zur Definition der oben beschriebenen Zeitpunkte wurde die Trias aus Nierenversagen (Kreatinin-Anstieg), Thrombozytopenie (Thrombozyten-Abfall) und Anämie (Hämoglobin-Abfall) herangezogen. Die hierfür verwendeten Referenzwerte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

| Parameter             | Männer                                 | Frauen                                   | Kinder (<11 J.) |
|-----------------------|--|--|-----------------|
| Kreatinin [mg/dL]     | <18J: 1.27<br>18-49J: 1.2<br>>50J: 1.3 | <18J: 1.12<br>18-49J: 1.05<br>>50J: 1.12 | /               |
| Hämoglobin [mg/dL]    | 13.0                                   | 12.0                                     | 11.5            |
| Thrombozyten [10E9/L] | 150                                    | 150                                      | /               |

**Tabelle 6: Referenzwerte, die für die Definition von Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie herangezogen wurden.**



**Abbildung 8: Aufbau eines klassischen Box-Whisker-Plots (oben) im Vergleich zur Datenverteilung. Der Boxplot stellt die vier Quartile einer Datenmenge dar sowie den Datenmedian. Quelle der Grafik (Wikipedia contributors, 2014a)**

### *Boxplots*

Die Erstellung von Boxplot-Whisker-Plots, kurz Boxplots, zählt zu den Standardverfahren zur Darstellung von Werteverteilungen in einer Gesamtmenge. Um einen schnellen Überblick über die Daten zu vermitteln, werden fünf Parameter abgebildet: Der Daten-Median, das untere und das obere Quartil sowie die beiden Extremwerte Minimum und Maximum. Der „untere“ Whisker stellt die niedrigsten 25% der kardinalskalierten Werte dar, die „untere“ Box den Bereich 26%-50%, die „obere“ Box den Bereich 51%-75% und der „obere“ Whisker die 25% höchsten Werte (Bereich 76%-100%). Zusätzlich werden häufig vor der Quantil-Berechnung Ausreißer in der Datenmenge bestimmt und als separate Datenpunkte dargestellt. Boxplots sind in der Wissenschaft weit verbreitet, weil die Verteilung der Daten leicht zu erfassen ist. Allerdings sind Boxplots sensitiv gegenüber Werteänderungen in kleinen Datensätzen. In der vorliegenden Studie ist jedoch davon auszugehen, dass die Größe der Stichproben (ca 80 Proben pro Gruppe) eine robuste Darstellung sicherstellt.

### *TTest*

Der T-Test zählt zu den Standardverfahren unter den parametrischen Hypothesentests. Bei zwei definierten Stichproben prüft das Verfahren, ob die Mittelwerte der Stichproben signifikant voneinander abweichen. Hierfür werden

sowohl die Mittelwerte als auch die Varianzen der Stichproben ermittelt und eine T-Statistik berechnet. Anhand der T-Statistik und einer sogenannten T-Verteilung kann auf die Signifikanz geschlossen werden. Die Signifikanz wird mittlerweile meistens als p-Wert angegeben. Je nach Nullhypothese kann ein zweiseitiger oder einseitiger T-Test durchgeführt werden.

Die klassische Version des T-Tests geht von einer gleichen Varianz in beiden Gruppen aus. Es existiert aber auch ein Verfahren, das ungleiche Varianzen in beiden Gruppen berücksichtigen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein solches Verfahren verwendet. Die p-Werte für die Vergleiche in Microsoft Excel mit folgender Formel berechnet:

$$p - \text{Wert} = TTEST(\text{Matrix1}; \text{Matrix2}; 2; 3)$$

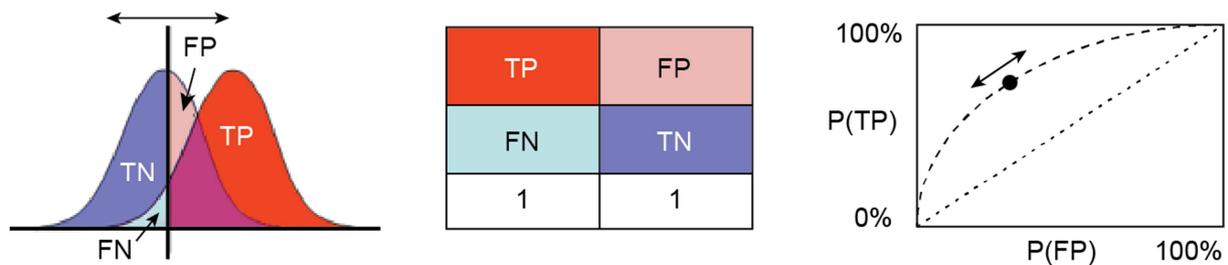
wobei die „2“ im dritten Parameter die Anzahl der Seiten und die „3“ im vierten Parameter die ungleiche Varianz angibt.

### ***Sensitivität & Spezifität***

Laborparameter werden häufig zur Klassifikation von Patienten in unterschiedliche Patientengruppen (positiver oder negativer Befund) verwendet, z.B. PCR- oder ELISA-Analysen zur Virusdetektion. Die Grenzwerte für die Laborparameter werden dabei so gewählt, dass entweder die Spezifität oder die Sensitivität des Parameters eine Mindest-Qualität erreicht.

Bei der Sensitivität handelt es sich um die „Empfindlichkeit“ des Parameters. Sie gibt die Rate (in Prozent) der Patienten wieder, die korrekt als positiv identifiziert wurden. Die Sensitivität wird normalerweise optimiert, wenn möglichst hohe Rate an Patienten als positiv identifiziert werden soll. Dabei nimmt man auch falsch-positive Befunde in Kauf.

Bei der Spezifität handelt es sich um die „Genauigkeit“ des Parameters. Sie gibt die Rate (in Prozent) der Patienten wieder, die korrekt als negativ eingestuft wurden. Üblicherweise wird die Spezifität zur Optimierung eines Parameters verwendet, wenn eine möglichst hohe Genauigkeit bei der Analyse erwünscht ist – d.h. falsch-positive Befunde möglichst ausgeschlossen werden sollen.



**Abbildung 9: Bestimmung von Sensitivität und Spezifität bei der Klassifikation von zwei Patientengruppen.** Die in den beiden Gruppen gemessenen Laborparameterwerte sind durch sich überschneidende Verteilungskurven dargestellt, der gewählte Grenzwert zur Klassifikation durch eine senkrechte Linie. Patienten links vom Grenzwert werden während der Klassifikation Gruppe 1 (negativer Befund) zugeordnet, Patienten rechts vom Grenzwert Gruppe 2 (positiver Befund). Dadurch ergeben sich vier Mengen: Korrekt-positiv, korrekt-negativ, falsch-positiv und falsch-negativ klassifizierte Patienten. Die rechts dargestellte Kurve veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Sensitivität und Spezifität bei verändertem Grenzwert. Grafik modifiziert nach (Wikipedia contributors, 2014b)

In der Regel sinkt die Spezifität, wenn ein Parametergrenzwert mit besonders hoher Sensitivität gewählt wird. Andersherum sinkt in der Regel die Sensitivität, wenn man sich bei der Grenzwert-Wahl auf eine besonders hohe Spezifität fokussiert. Der Zusammenhang zwischen Sensitivität und Spezifität kann in Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven dargestellt werden. Abbildung 9 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

Je höher die Sensitivitäts- und Spezifitätswerte sind, die mit einem Laborparameter erreicht werden können, umso besser ist der Parameter für die Klassifikation geeignet. Daher kann das Potential eines Laborparameters für die Klassifikation eines Phänotyps mit ROC-Kurven ermittelt werden.

### *AUC und ROC Kurven*

Die Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven werden auch Grenzwertoptimierungskurven genannt. Die Methode stellt die Abhängigkeit von Spezifität und Sensitivität grafisch dar. Anhand der Kurven kann bestimmt werden, welcher Grenzwert die Sensitivität und Spezifität gleichzeitig optimiert.

Um mehrere ROC-Kurven oder diagnostische Parameter zu vergleichen kann die Fläche unter den Kurven (Area under the Curve, AUC) berechnet werden. Je höher die berechnete AUC eines Parameters ist, umso bessere Sensitivität-Werte können bei gleich hoher Spezifität erreicht werden – und umgekehrt. Je höher die AUC,

umso besser ist ein Parameter also für die Klassifikation geeignet. Mit einem Hypothesentest kann außerdem geprüft werden, ob zwei Parameter einen signifikanten Unterschied bei der Höhe der AUC aufweisen.

In der vorliegenden Studie wurden die ROC-Kurven und AUC-Werte mit dem pROC-Paket (Version 1.5.1) (Robin et al., 2011) für die R statistische Plattform (Version 2.15.2) berechnet. Danach wurden die Flächen unter den Kurven (AUC) mit einem Bootstrapping-basierten Hypothesentest verglichen. Die Null-Hypothese  $H_0$  bei diesem Ansatz geht davon aus, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Kurven existiert. Nicht signifikante p-Werte zeigen also an, dass kein signifikanter Unterschied nachweisbar ist.

Die ROC-Kurven wurden jeweils zum Vergleich der diversen Parameter bei STEC-HUS und STEC, STEC-HUS und Kontroll- sowie STEC und Kontrollpatienten berechnet. Die AUC-Werte wurden zum Vergleich der ROC-Kurven von Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität herangezogen.

### *Net Reclassification Improvement Analyse*

Eine der Fragestellungen, die beantwortet werden sollte war ob die Klassifikation von HUS-Patienten verbessert werden kann, wenn LDH-Aktivität und Fragmentozytenzahl gleichzeitig betrachtet werden. Hierfür wurde das ‚Net Reclassification Improvement‘ (NRI) Verfahren verwendet.

Tabelle 7 soll das Problem verdeutlichen. Verwendet man die Fragmentozytenzahl zur Klassifikation, könnte Patient 2 als HUS-Patient eingestuft werden. Patient 1 hingegen könnte als Nicht-HUS-Patient klassifiziert werden. Wird die LDH-Aktivität zur Klassifikation verwendet, kann evtl. Patient 2 nicht als HUS-Patient erkannt werden.

Ziel des NRI-Verfahrens ist es zu prüfen, ob ein Patient ein hohes Risiko für HUS-Komplikationen hat. Dafür wird geprüft ob die LDH-Aktivität und/oder die Fragmentozytenzahl erhöht sind. In einem ersten Schritt berechnet das Verfahren ein logistisches Regressionsmodell für die Patientendaten.

|           | LDH-Aktivität | Fragmentozyten-Anzahl |
|-----------|---------------|-----------------------|
| Patient 1 | Erhöht        | Niedrig               |
| Patient 2 | Niedrig       | Erhöht                |

**Tabelle 7: Beispieltabelle zur Veranschaulichung eines Grenzfall beim NRI-Verfahren. Verwendet man die Fragmentozytenzahl zur Klassifikation würde Patient 1 im Gegensatz zu Patient 2 nicht als HUS-Patient eingestuft werden. Beim Heranziehen der LDH-Aktivität hingegen würde Patient 1 nicht jedoch Patient 2 als HUS-Patient erkannt. Das NRI-Verfahren generiert ein Modell, bei dem beide Parameter gleichzeitig zur Beurteilung betrachtet werden.**

Die Berechnung wird zuerst univariat (Initiales Modell) für die Fragmentozytenzahl als diagnostischer Referenzmarker durchgeführt. Danach wird die Berechnung für die Kombination aus LDH-Aktivität und die Fragmentozytenzahl (aktualisiertes Modell) durchgeführt. In dem zweiten Schritt werden diese Regressionsmodelle verwendet, um das Patientenrisiko (0- niedriges Risiko, 1 – hohes Risiko) für HUS zu berechnen.

Weil das tatsächliche Outcome für jeden Patienten bekannt ist kann man die beiden Modelle im dritten Schritt vergleichen. Es wird eine Statistik berechnet, die illustriert ob das aktualisierte, bi-variate Modell besser in der Lage ist das Patientenrisiko korrekt abzuschätzen. Dafür müssen zu Beginn mehrere definierte Risikogrenzwerte, z.B. [0.0; 0.1; 0.3; 1.0] festgelegt werden. Mühlenbruch et al. (Muhlenbruch et al., 2013) haben gezeigt, dass die Performance der Methode von der Wahl der Anzahl und der Höhe dieser Grenzwerte abhängt. Des Weiteren haben Pencina et al. (Pencina et al., 2008) empfohlen bei der Evaluation von NRI-Analysen eine sinnvolle Wahl der Risikokategorien auf a-priori Wissen zu basieren. Für Behandlungs- und Präventionsstrategien bei kardiovaskulären Erkrankungen sind solche Risikogruppen bereits etabliert. Allerdings sind noch keine Risikokategorien für STEC oder HUS-Phänotypen publiziert. Um die Sensitivität der NRI-Analyse gegenüber den Grenzwerten und den derzeitigen Mangel an „klinisch sinnvollen“ Risikokategorien zu berücksichtigen, wurden hier weniger stringente Kategorien [< 10%, 10%-30%, >30%] gewählt. Diese wurden in Analogie zu den Werten gewählt, die für kardiovaskuläre Erkrankungen empfohlen werden (National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in, 2002, Grundy et al., 2004).

Die Analyse der ‚Net Reclassification Improvement‘ wurde mit dem PredictABEL Paket (Version 1.2-1) (Kundu et al., 2011) auf der statistischen Plattform R version 2.15.2 (R Core Team, 2012) durchgeführt.

### *Statistische Plattform R*

Bei der statistischen Plattform R handelt es sich um eine freie, open source Plattform für statistische Analysen und Visualisierungen. R ist modular aufgebaut und kann durch viele frei verfügbare Pakete erweitert werden. Solche Pakete können Algorithmen und Verfahren für diverse Anwendungen bereitstellen, wie z.B. die Berechnung von ROC-Kurven und den Flächen unter den Kurven. Insbesondere komplexere statistische Methoden, die in Excel nicht zur Verfügung stehen sind in den offiziellen R Bibliotheken häufig zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde R (Version 2.15.2) und das pROC Paket (Version 1.5.1) zur Berechnung der ROC-Kurven, der AUC und der Signifikanz für die Unterschiede zwischen mehreren ROC-Kurven eingesetzt. Außerdem wurde das R-Paket predictABEL (Version 1.2-1) für die Net Reclassification Improvement Analyse eingesetzt.

### Übersicht verwendete Software

| Software            | Version | Analyse                                   |
|---------------------|---------|---|
| Microsoft Excel     | 2010    | T-Test, Definition der Zeitpunkte         |
| R                   | 2.15.2  | Basis für pROC und predictABEL Pakete     |
| R-Paket pROC        | 1.5.1   | ROC-Kurven, AUC, Vergleich von ROC-Kurven |
| R-Paket predictABEL | 1.2-1   | Net Reclassification Improvement          |

**Tabelle 8: Übersicht zu der in der Arbeit verwendeten Software und deren Versionen.**

### Ethik

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg unter dem Votum PV4447 genehmigt. Bei allen in dieser Studie verwendeten Proben handelt es sich um Überschussmaterial von für die Diagnostik gesammelten Proben.

---

## Ergebnisse

### Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden insgesamt 203 Erwachsene sowie 15 minderjährige Patienten untersucht. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 69 erwachsenen Patienten (43 Frauen (f) und 26 Männer (m)) zusammen. Diese Patienten wurden aufgrund verdächtiger Symptome, wie z.B. blutigem Durchfall, mit Verdacht auf eine *Escherichia coli* O104:H4-Infektion untersucht wiesen jedoch ein negatives Ergebnis beim Stuhltest auf. Das Durchschnittsalter innerhalb dieser Gruppe betrug 52,5 Jahre (f: 50,5J; m: 55,5J). Die Gruppe der STEC-Patienten welche keine HUS-Komplikationen aufwiesen umfasste 71 (f: 46; m: 25) erwachsene Personen mit einem Durchschnittsalter von 39 Jahren (f: 39J; m: 40J) sowie 4 minderjährige Patienten. In die Gruppe der STEC-HUS Patienten, welche eine HUS-Komplikation entwickelten, wurden 63 erwachsene Personen (f: 47; m: 16) aufgenommen. Das mittlere Alter in der Gruppe betrug 35 Jahre (f: 35J; m: 35,5J). Darüber hinaus wurden 11 minderjährige STEC-HUS-Patienten in die Gruppe eingeschlossen.

Auffällig an dem EHEC-Ausbruch in 2011 waren der besonders hohe Anteil an Patienten, die zusätzlich unter HUS litten sowie der hohe Anteil an Frauen. Der Anteil der HUS-Patienten lag bei rund 49% der STEC-Infizierten. Der Anteil der Frauen in dem untersuchten Patientenkollektiv lag bei rund 67%.

Bei der Auswahl der Patienten wurde besonders darauf geachtet eine möglichst vergleichbare Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten, soweit möglich, in allen drei Gruppen sicherzustellen. Abbildung 5 in Abschnitt 2 stellt die Altersverteilung der Patienten in den drei Patientengruppen dar.

### Blutausstriche und Qualitätskontrolle der Zählungen

Insgesamt wurden 903 Blutausstriche angefertigt und ausgewertet. Abbildung 10 zeigt zwei repräsentative Blutausstriche eines Patienten der Kontrollgruppe und eines Patienten der STEC-HUS-Gruppe. Die Tabellen 9-11 zeigen einen repräsentativen Ausschnitt von den Ergebnissen der Fragmentozytenzählung.

| Patient | Geschlecht | Alter | Proben- | StudienFZ | StudienFZ | Studien.FZ | FZ         |
|---------|------------|-------|---------|-----------|-----------|------------|------------|
|         |            |       | Nr.     | #1        | #2        | #3         | Mittelwert |
| P24     | M          | 24.0  | 45      | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P38     | M          | 31.0  | 65      | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P42     | W          | 42.8  | 70      | 0.1       | 0.2       | 0.1        | 0.1        |
| P43     | W          | 26.3  | 71      | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P52     | M          | 30.9  | 82      | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P54     | W          | 59.9  | 86      | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P83     | W          | 47.4  | 118     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P85     | W          | 70.9  | 121     | 0.1       | 0.1       | 0.2        | 0.1        |
| P86     | M          | 62.2  | 125     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P103    | M          | 39.1  | 157     | 0.3       | 0.1       | 0.4        | 0.3        |
| P108    | W          | 30.8  | 165     | 0.1       | 0.1       | 0.3        | 0.2        |
| P110    | M          | 66.5  | 173     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P122    | M          | 43.6  | 186     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P123    | M          | 48.9  | 190     | 0.1       | 0.2       | 0.1        | 0.1        |
| P125    | M          | 32.1  | 194     | 0.1       | 0.4       | 0.1        | 0.2        |
| P141    | W          | 15.8  | 220     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P152    | W          | 49.0  | 235     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P167    | M          | 59.3  | 258     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P170    | W          | 46.0  | 265     | 0.3       | 0.1       | 0.1        | 0.2        |
| P175    | W          | 39.2  | 270     | 0.1       | 0.1       | 0.2        | 0.1        |
| P183    | W          | 47.5  | 280     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P188    | M          | 28.0  | 291     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P196    | M          | 40.4  | 301     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P207    | W          | NA    | 321     | 0.1       | 0.3       | 0.6        | 0.3        |
| P213    | M          | 25.8  | 329     | 0.1       | 0.1       | 0.2        | 0.1        |
| P215    | W          | 21.4  | 331     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P218    | W          | 86.2  | 344     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P223    | W          | 49.5  | 363     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P230    | W          | 39.1  | 376     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P231    | M          | 52.3  | 378     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P232    | W          | 74.5  | 380     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P239    | W          | 102.1 | 393     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P254    | W          | 24.9  | 409     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P255    | W          | 17.3  | 410     | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |

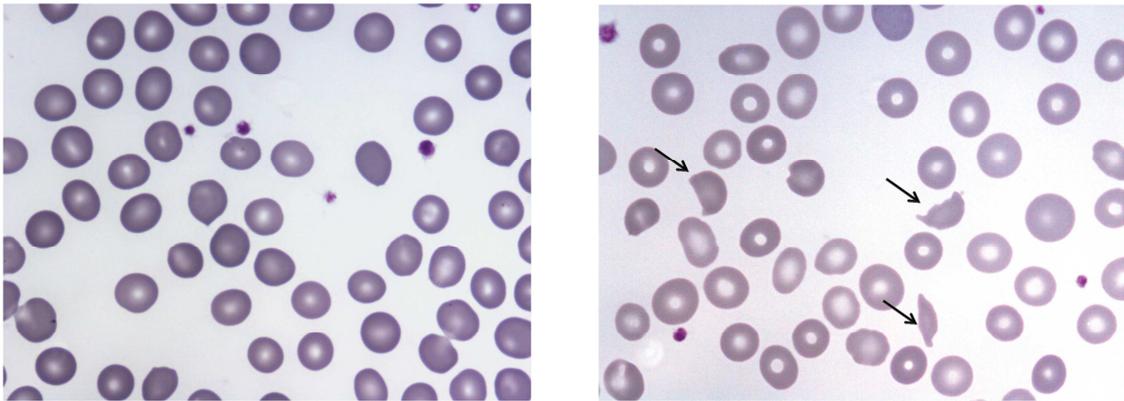
**Tabelle 9: Auszug aus den in Kontrollpatienten bestimmten Fragmentozytenwerten. Dargestellt sind pro Patient die drei in Dreifachbestimmung ermittelten Werte sowie der sich daraus ergebende Mittelwert. Einheit der Fragmentozyten in Prozent.**

| Patient | Geschlecht | Alter | Proben- | StudienFZ | StudienFZ | Studien.FZ | FZ         |
|---------|------------|-------|---------|-----------|-----------|------------|------------|
|         |            |       | Nr.     | #1        | #2        | #3         | Mittelwert |
| P578    | W          | 75.0  | 1158    | 0.1       | 0.1       | 0.2        | 0.1        |
| P580    | W          | 75.1  | 1161    | 0.2       | NA        | NA         | 0.2        |
| P580    | W          | 75.1  | 1162    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P580    | W          | 75.2  | 1163    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P588    | M          | 26.3  | 1175    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P593    | M          | 53.6  | 1185    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P599    | M          | 53.7  | 1192    | 0.2       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P599    | M          | 53.9  | 1193    | 0.1       | 0.3       | 0.1        | 0.2        |
| P600    | M          | 53.9  | 1194    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P612    | M          | 23.7  | 1207    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P616    | W          | 79.8  | 1215    | 0.1       | 0.2       | 0.1        | 0.1        |
| P625    | W          | 77.1  | 1244    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P625    | W          | 77.3  | 1246    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P635    | M          | 37.9  | 1257    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P635    | M          | 37.9  | 1258    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P636    | M          | 38.0  | 1259    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P635    | M          | 38.1  | 1261    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P639    | W          | 50.2  | 1266    | 0.1       | 0.2       | 0.2        | 0.2        |
| P653    | M          | 16.9  | 1288    | 0.1       | 0.2       | 0.1        | 0.1        |
| P662    | M          | 35.6  | 1303    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P663    | M          | 35.8  | 1305    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P664    | M          | 35.8  | 1306    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P670    | W          | 26.7  | 1322    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P671    | W          | 26.7  | 1323    | 0.1       | NA        | NA         | 0.1        |
| P682    | W          | 39.3  | 1341    | 0.1       | 0.2       | 0.1        | 0.1        |
| P712    | W          | 26.5  | 1431    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P736    | W          | 63.8  | 1456    | 0.2       | 0.4       | 0.2        | 0.3        |
| P736    | W          | 63.8  | 1457    | 0.2       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P736    | W          | 63.8  | 1458    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P736    | W          | 63.8  | 1460    | 0.4       | 0.3       | 0.2        | 0.3        |
| P736    | W          | 63.8  | 1461    | 0.5       | 0.1       | 0.2        | 0.3        |
| P736    | W          | 63.8  | 1462    | 0.1       | 0.1       | 0.4        | 0.2        |
| P740    | W          | 63.9  | 1485    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P740    | W          | 63.9  | 1486    | 0.1       | 0.3       | 0.1        | 0.2        |

**Tabelle 10: Auszug aus den in STEC-Patienten bestimmten Fragmentozytenwerten. Dargestellt sind pro Patient die drei in Dreifachbestimmung ermittelten Werte sowie der sich daraus ergebende Mittelwert. Einheit der Fragmentozyten in Prozent.**

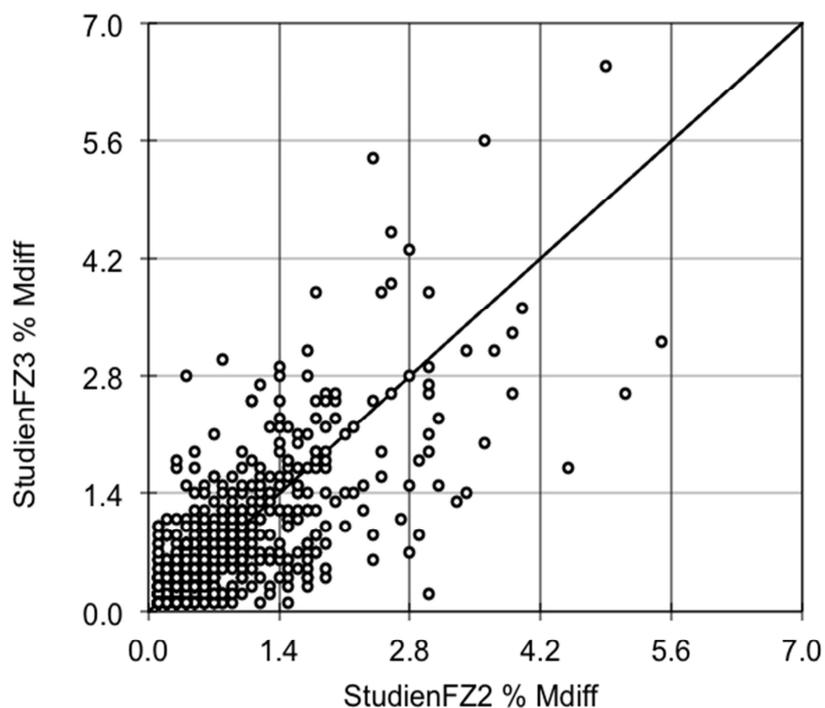
| Patient | Geschlecht | Alter | Proben- | StudienFZ | StudienFZ | Studien.FZ | FZ         |
|---------|------------|-------|---------|-----------|-----------|------------|------------|
|         |            |       | Nr.     | #1        | #2        | #3         | Mittelwert |
| P1819   | W          | 46.2  | 5481    | 0.3       | 0.1       | 0.2        | 0.2        |
| P1819   | W          | 46.4  | 5484    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P1821   | W          | 21.8  | 5496    | 0.3       | 1.7       | 1.2        | 1.1        |
| P1821   | W          | 21.8  | 5498    | 0.4       | 0.5       | 0.3        | 0.4        |
| P1821   | W          | 21.8  | 5499    | 0.1       | 1.9       | 1          | 1          |
| P1822   | W          | 21.9  | 5501    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P1828   | M          | 29.9  | 5521    | 2.6       | 1.5       | 1.8        | 2          |
| P1828   | M          | 29.9  | 5522    | 2.8       | 3         | 2.6        | 2.8        |
| P1828   | M          | 29.9  | 5523    | 0.9       | 3.1       | 2.3        | 2.1        |
| P1829   | M          | 30.1  | 5525    | 0.2       | 0.3       | 0.4        | 0.3        |
| P1829   | M          | 30.1  | 5526    | 0.1       | 0.3       | 0.1        | 0.2        |
| P1830   | M          | 30.3  | 5527    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5534    | 1.1       | 0.4       | 0.1        | 0.5        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5535    | 1.9       | 1.5       | 0.3        | 1.2        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5537    | 3.7       | 2.3       | 1.5        | 2.5        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5541    | 6         | 2         | 2.3        | 3.4        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5542    | 5.2       | 2.8       | 4.3        | 4.1        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5543    | 6.5       | 3.6       | 5.6        | 5.2        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5545    | 4.5       | 2.4       | 5.4        | 4.1        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5546    | 5.2       | 3.7       | 3.1        | 4          |
| P1832   | W          | 35.5  | 5548    | 2.1       | 3         | 2.7        | 2.6        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5549    | 3.4       | 2.7       | 1.1        | 2.4        |
| P1832   | W          | 35.5  | 5551    | 0.9       | 0.9       | 1.1        | 1          |
| P1832   | W          | 35.5  | 5553    | 1.5       | 1.7       | 3.1        | 2.1        |
| P1833   | W          | 35.5  | 5555    | 0.8       | 1.5       | 1.8        | 1.4        |
| P1833   | W          | 35.6  | 5557    | 1.9       | 1.9       | 0.5        | 1.4        |
| P1833   | W          | 35.6  | 5558    | 0.6       | 0.3       | NA         | 0.4        |
| P1833   | W          | 35.7  | 5562    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P1833   | W          | 35.8  | 5563    | 0.1       | 0.1       | 0.1        | 0.1        |
| P1494   | W          | 37.0  | 5578    | 2         | 3         | 2.1        | 2.4        |
| P1495   | W          | 37.0  | 5582    | 0.5       | 0.7       | 1.6        | 0.9        |
| P1496   | W          | 37.0  | 5584    | 1.1       | 1.2       | 1.7        | 1.3        |
| P1498   | W          | 37.0  | 5585    | 1         | 0.6       | 0.5        | 0.7        |

**Tabelle 11: Auszug aus den in STEC-HUS-Patienten bestimmten Fragmentozytenwerten. Dargestellt sind pro Patient die drei in Dreifachbestimmung ermittelten Werte sowie der sich daraus ergebende Mittelwert. Einheit der Fragmentozyten in Prozent.**



**Abbildung 10:** Darstellung von zwei unterschiedlichen Blutausstrichen. Der erste Blutausstrich (links) ist Fragmentozytenfrei. Im zweiten Blutausstrich (rechts) sind Fragmentozyten zu erkennen und mit schwarzen Pfeilen markiert.

Jeder Blutausstrich wurde von drei Hämatologieexperten (zwei Ärzten sowie eine medizinisch-technische Assistentin) unabhängig begutachtet und die Fragmentozyten dabei ausgezählt. Um die Konkordanz der unabhängigen Zählungen zu kontrollieren wurde jeweils paarweise eine Regression mittels Passing/Bablok-



**Abbildung 11:** Exemplarischer Korrelationsgraph zum Vergleich der unabhängig ermittelten Fragmentozytenzahl in den vermessenen Proben. Die entlang der Diagonalen angeordneten Datenpunkte zeigen die gute Vergleichbarkeit der beiden Einzelbestimmungen an.

Verfahren durchgeführt. Abbildung 11 stellt exemplarisch den Korrelationsgraphen für zwei der Zählungen dar.

Mit dem Passing/Bablok-Verfahren konnte gezeigt werden, dass keine signifikante Abweichung zwischen den einzelnen Zählungen der drei Experten vorlag. Die Korrelationswerte für die Vergleiche lagen zwischen  $r=0.71$  und  $r=0.78$ . Eine detaillierte Aufführung der Regressions-Ergebnisse findet sich in Tabelle 12. Eine exemplarische, vollständige Statistik des Passing/Bablok-Verfahrens ist in Abbildung 21 im Anhang dargestellt.

| Vergleich              | r     | tau   |
|------------------------|-------|-------|
| Experte 1 vs Experte 2 | 0.748 | 0.527 |
| Experte 1 vs Experte 3 | 0.714 | 0.492 |
| Experte 2 vs Experte 3 | 0.779 | 0.485 |

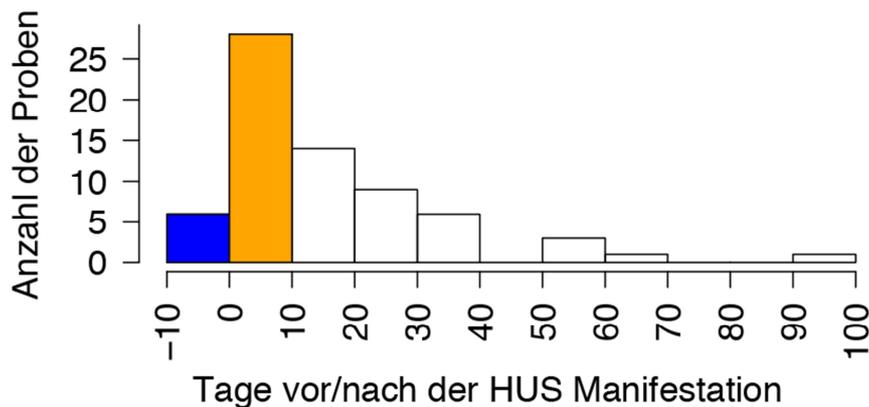
**Tabelle 12: Korrelationswerte für die Vergleiche zwischen den Einzelzählungen mittels Passing/Bablok-Verfahren. Die r-Werte liegen zwischen 0.714 und 0.779 und zeigen somit eine gute Vergleichbarkeit der Werte an.**

Für die untersuchten Patientengruppen (STEC-HUS, STEC, Kontrolle) wurden die Mittelwerte der Fragmentozytenzahl über alle Proben bei jedem Experten bestimmt und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung jeweils über diese drei Werte berechnet. Diese Werte lagen jeweils bei  $\mu=0.1$  und  $\sigma=0.01$  in der Kontrollgruppe, bei  $\mu=0.2$  und  $\sigma=0.02$  in der STEC Gruppe und bei  $\mu=0.7$  und  $\sigma=0.07$  in der STEC-HUS Gruppe. Eine detaillierte Übersicht der Werte findet sich in Tabelle 13.

| Patientengruppe | StudienFZ #1 | StudienFZ #2 | StudienFZ #3 | $\mu$ | $\sigma$ |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------|----------|
| CTRL            | 0.13         | 0.13         | 0.15         | 0.13  | 0.01     |
| STEC            | 0.18         | 0.22         | 0.21         | 0.20  | 0.02     |
| HUS             | 0.61         | 0.76         | 0.71         | 0.69  | 0.07     |

**Tabelle 13: Bestimmte Mittelwerte der Fragmentozytenzahl in den drei Patientengruppen für die drei unabhängigen Bestimmungen sowie die sich daraus ergebenden Gesamtmittelwerte ( $\mu$ ) und Standardabweichungen ( $\sigma$ ).**

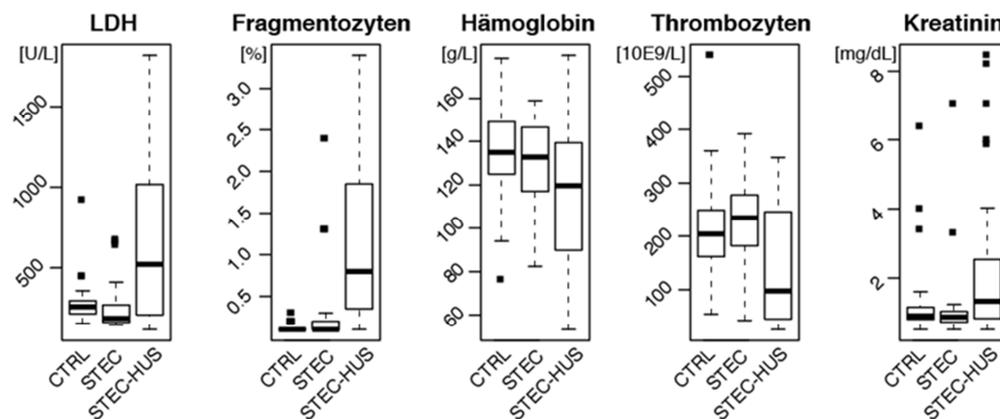
## Zeitpunkt der Fragmentozytenzählung



**Abbildung 12: Verteilung der Zeitpunkte (Tage vor/nach der ersten HUS-Manifestation) zu denen die erste Fragmentozyten pro Patient bestimmt wurden. Gut zu erkennen (in blau) ist, dass nur sehr wenige Fragmentozytenwerte bereits vor der HUS-Manifestation durchgeführt werden konnten. Die Mehrzahl der Erstbestimmungen erfolgte im Zeitraum von null bis zehn Tagen nach der Manifestation.**

Jeweils ein Aliquot der gleichen EDTA-Proben, die für das Anfertigen der Blutausrüche verwendet wurden, wurde zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration und der Thrombozytenzahl verwendet. In den parallel abgenommenen Lithium-Heparin-Proben wurden die Haptoglobinkonzentration, Kreatininkonzentration und die LDH-Aktivität bestimmt. EDTA- und Lithium-Heparin-Proben wurden über das Abnahmedatum und die Uhrzeit zugeordnet.

Die Manifestation des HUS bei den erkrankten Patienten setzte zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Daher wurde untersucht zu welchem Zeitpunkt, relativ zur HUS-Manifestation, die erste Fragmentozytenzählung für den Patienten erfolgte. Die ermittelte Statistik (siehe Abbildung 12) zeigte, dass die erste Zählung der Fragmentozyten bei der überwiegenden Mehrzahl der HUS-Patienten im Zeitraum von 0 bis 10 Tagen nach der Manifestation des HUS durchgeführt wurde. Für 4 Patienten lag eine erste Zählung der Fragmentozytenzahl bereits vor Einsetzen der HUS-Symptomatik vor.



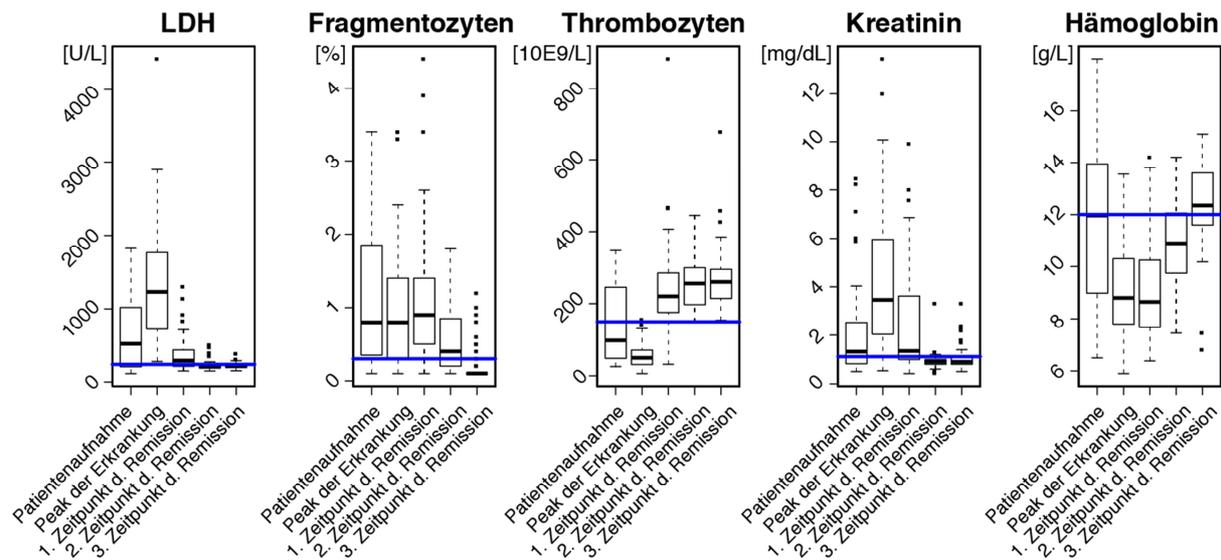
**Abbildung 13: Ermittelte Werte der Fragmentozytenzahlen sowie der weiteren Laborparameter zum Zeitpunkt der Aufnahme. Es ist deutlich zu erkennen, dass STEC-HUS-Patienten eine deutlich höhere Fragmentozytenzahl im Vergleich zu den STEC- und Kontrollpatienten aufweisen.**

### Unterschiede in Fragmentozytenzahl zum Zeitpunkt der Aufnahme

Im ersten Schritt wurde ermittelt, ob bereits zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme ein signifikanter Unterschied in der Fragmentozytenzahl zwischen STEC, STEC-HUS und den Kontrollpatienten zu beobachten ist. Eine Darstellung der Werte in Form von Boxplots und ein zweiseitiger T-Test zeigte, dass STEC-HUS Patienten signifikant ( $p\text{-Wert}_{\text{STEC-HUS\_vs\_STEC}} = 6.8\text{E-}11$ ,  $p\text{-Wert}_{\text{STEC-HUS\_vs\_Kontrolle}} = 3.0\text{E-}13$ ) höhere Fragmentozytenzahlen (Median = 0.8) aufwiesen im Vergleich zu den STEC-Patienten (Median = 0.1) und Kontrollpatienten (Median = 0.1).

Ähnlich wiesen die STEC-HUS-Patienten bei Aufnahme bereits deutlich höhere LDH-Aktivitäten auf ( $p\text{-Wert}_{\text{STEC-HUS\_vs\_STEC}} = 3.9\text{E-}15$ ,  $p\text{-Wert}_{\text{STEC-HUS\_vs\_Kontrolle}} = 3.8\text{E-}16$ ) als die STEC- und Kontroll-Patienten. Passend zu den medizinischen Symptomen konnte bereits bei einem Großteil der Patienten zu diesem Zeitpunkt ein Abfall der Hämoglobinkonzentration (Anämie) und Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) sowie ein Ansteigen der Kreatininkonzentration (Nierenversagen) beobachtet werden. Zudem wurde ein Abfall der Haptoglobinkonzentration beobachtet.

Die ermittelten Fragmentozytenzahlen und übrigen klinischen Parameter zum Zeitpunkt der Aufnahme sind in Abbildung 13 dargestellt.

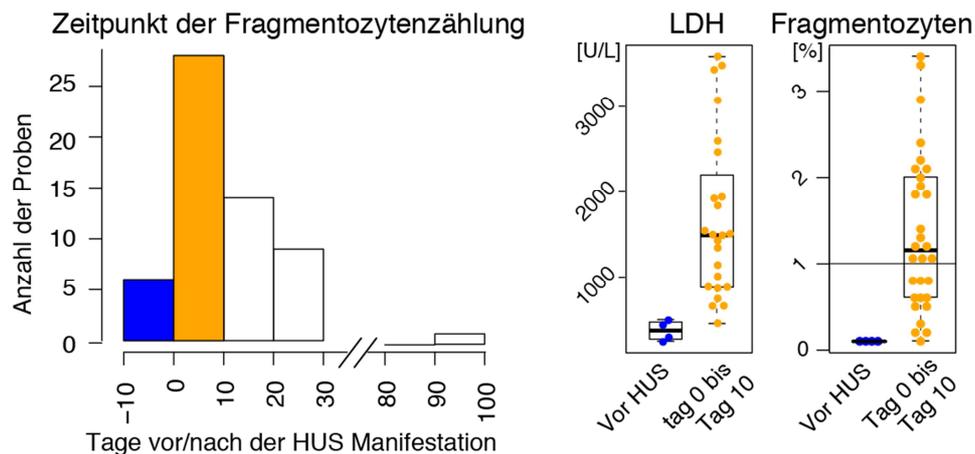


**Abbildung 14: Ermittelte Werte der Fragmentozytenzahlen sowie der weiteren Laborparameter zu den verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung. Es ist deutlich zu erkennen, dass STEC-HUS-Patienten bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme eine deutlich erhöhte Fragmentozytenzahl aufweisen. Diese normalisiert erst deutlich später als die LDH-Aktivität, Thrombozytenzahl und Kreatininkonzentration. Die Normwerte sind als blaue Linien dargestellt.**

### Zeitlicher Verlauf der Fragmentozytenzahl

Zur Kontrolle der definierten Verlaufs-Zeitpunkte wurde der zeitliche Verlauf der Hämoglobinkonzentration, Kreatininkonzentration und Thrombozytenzahl aufgetragen. Die Profile sind in Abbildung 14 dargestellt. Sie zeigen, dass bereits zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme eine vorwiegende Mehrheit der Patienten eine Trias aus Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen aufwies. Es konnte allerdings ein Anstieg im Schweregrad der Symptome (Stärke der Parameterabweichung von den Referenzwerten) zum definierten Zeitpunkt der Erkrankung (LDH-Peak) beobachtet werden. Auf die Spitze der Erkrankung folgend normalisierte sich erst die Anzahl der Thrombozyten, gefolgt von der Kreatininkonzentration. Eine Normalisierung der Hämoglobinkonzentration konnte erst zu einem späten Zeitpunkt kurz der Patientenentlassung beobachtet werden.

Bei der Kontrolle des zeitlichen Verlaufs der Fragmentozytenzahl konnte beobachtet werden, dass die Anzahl an Fragmentozyten zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits deutlich erhöht war und im weiteren Verlauf auf konstant hohem Niveau verblieb, siehe Abbildung 14. Selbst zum ersten und zweiten Zeitpunkt der Remission verblieb die Anzahl an beobachteten Fragmentozyten erhöht. Zum zweiten Zeitpunkt der

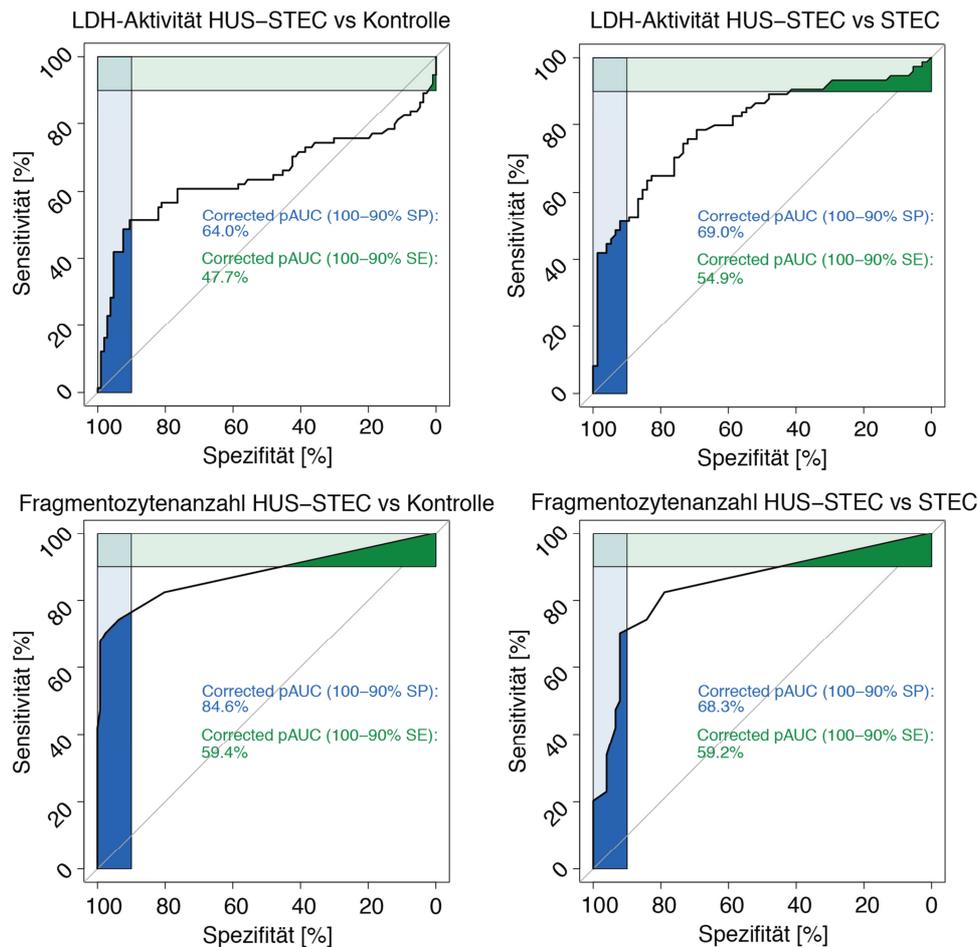


**Abbildung 15: Kontrolle der „Vorlaufzeit“ für LDH-Aktivität und Fragmentozytenzahl. Dargestellt sind die ermittelten LDH- und Fragmentozytenwerte vor (blau) sowie 0 bis 10 Tage (gelb) nach der Manifestation des HUS. Es ist zu erkennen, dass vor HUS-Manifestation weder erhöhte LDH-Aktivitäten noch Fragmentozytenzahlen zu beobachten sind.**

Remission sank die Fragmentozytenzahl zwar geringfügig, sie fiel aber erst zum letzten Zeitpunkt kurz vor Patientenentlassung auf das normale Niveau zurück.

Demgegenüber konnte bei der LDH-Aktivität ein klarer, schneller Anstieg bis zum Zeitpunkt der Erkrankung und ein deutlicher Abfall bereits zum ersten Zeitpunkt der Remission beobachtet werden, siehe Abbildung 14. Eine vollständige Normalisierung der LDH-Aktivität lag zum zweiten Zeitpunkt der Remission vor. Der Vergleich mit dem Fragmentozytenprofil zeigte somit, dass erstens die Fragmentozytenzahl bereits ihr Maximum zu einem frühen Zeitpunkt erreichte noch bevor die maximale LDH-Aktivität gemessen werden konnte. Zweitens blieb die Zahl der Fragmentozyten länger erhöht als die LDH-Aktivität. Die Normalisierung der Fragmentozytenzahl korrelierte dabei mit der Normalisierung der Hämoglobinkonzentration.

Daraus ergab sich die Frage, ob bei den STEC-HUS-Patienten hinsichtlich der Fragmentozytenzahl eine Vorlaufzeit beobachtet werden konnte. Ein Vergleich der Fragmentozytenzahl in den Proben, die zu einem Zeitpunkt vor der HUS-Manifestation gesammelt wurden, mit jenen aus dem Zeitraum Tag 0 bis Tag 10 der Manifestation machte deutlich, dass die Fragmentozytenzahl vor der HUS-Manifestation bei physiologischen Konzentrationen lag, nach der Manifestation aber schlagartig anstieg, siehe Abbildung 15.

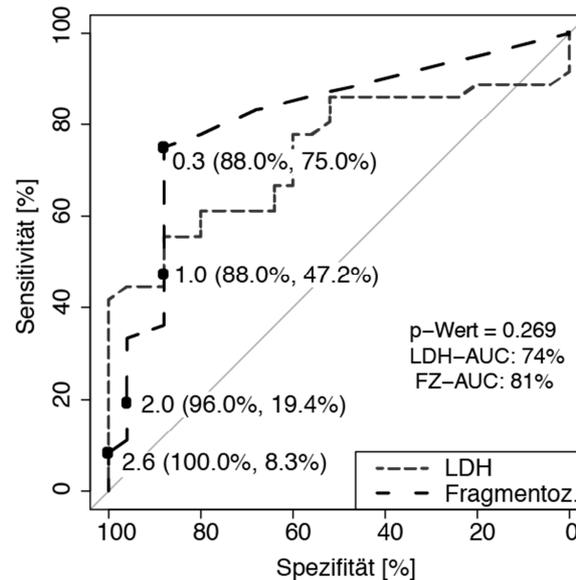


**Abbildung 16: Receiver Operating Characteristic Kurven für die Beurteilung der Klassifikation von STEC-HUS und STEAC bzw. STEC-HUS und Kontrollpatienten mittels Fragmentozytenzahl oder LDH-Aktivität im Vergleich. Angegeben sind für jeden Vergleich die Teilflächen „partial Area Under the Curve“ (pAUC) für eine Spezifität (SP) bzw. Sensitivität (SE) von jeweils 100%-90%. Diese werden häufig anstatt der Gesamtfläche (AUC) herangezogen, da in der klinischen Praxis die Grenzwerte normalerweise auf eine hohe Spezifität oder hohe Sensitivität ausgelegt werden.**

## Klassifikation von Patienten mittels Fragmentozytenzahl

Um das Potential der Fragmentozyten und der LDH-Aktivität zur Klassifikation von STEC und STEC-HUS Patienten zu ermitteln wurde eine Analyse mittels Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass die Fragmentozytenzahl zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme klar zur Unterscheidung zwischen STEC-HUS-Patienten und STEC-Patienten sowie zwischen STEC-HUS-Patienten und Kontrollpatienten herangezogen werden kann. Die Kurven zeigten, dass eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität erzielt werden kann. Die Flächen unter den Kurven (AUC) für die Fragmentozytenzahl betragen 81% bei der Klassifikation von STEC-HUS- und STEC- Patienten und 90% bei der Klassifikation von STEC-HUS- und Kontroll-Patienten. Für die LDH-Aktivität betragen die AUC-

Diskriminierung zwischen STEC und STEC-HUS

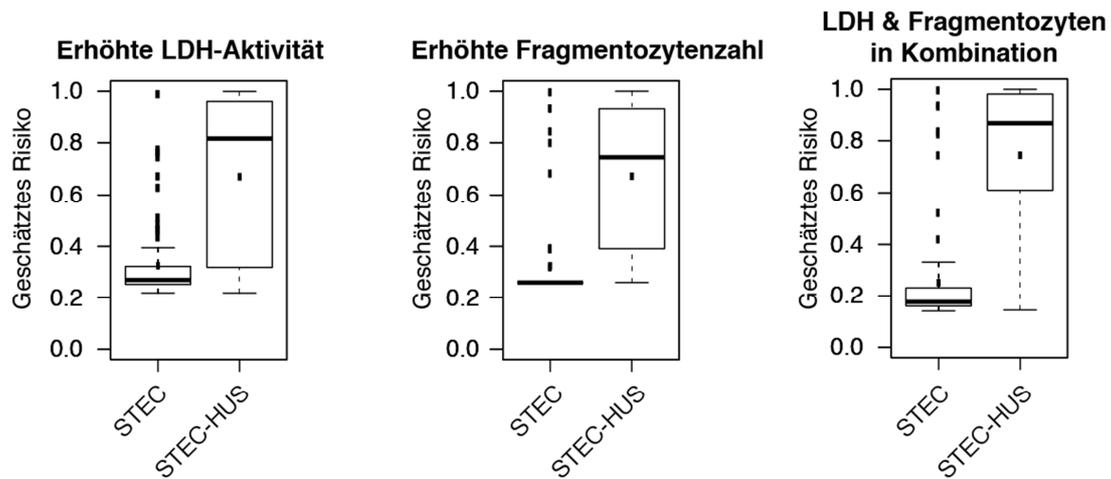


**Abbildung 17: Vergleich der ROC-Kurven von LDH und Fragmentozyten zur Diskriminierung zwischen STEC-HUS und STEC-Patienten. Angegeben sind jeweils die Grenzwerte in [%] und in Klammern die daraus resultierenden Spezifitäten und Sensitivitäten. Die beiden Kurven weisen keinen signifikanten Unterschied ( $p=0.269$ ) hinsichtlich der Klassifikationsgüte auf. Der optimale Fragmentozyten-Grenzwert für eine Klassifikation liegt bei 0.3%.**

Werte 74% bei der Klassifikation von STEC-HUS- und STEC- Patienten und 66% bei der Klassifikation von STEC-HUS- und Kontroll-Patienten.

Des Weiteren konnte aus den ROC-Kurven ermittelt werden, dass ein Wert von 0.3% für die Fragmentozytenzahl bereits den optimalen Grenzwert zur Unterscheidung zwischen STEC-HUS und STEC-Patienten darstellt, siehe Abbildung 17. Bei diesem Wert konnte eine Sensitivität von 75% und eine gleichzeitige Spezifität von 88% erreicht werden. Bei einem Grenzwert von 1.0% verblieb die Spezifität bei 88%, die Sensitivität sank allerdings auf einen Wert von 47%. Eine Spezifität von 96% konnte lediglich erreicht werden, wenn eine Sensitivität von 19.4% in Kauf genommen wurde.

Mittels Hypothesentest konnte zudem gezeigt werden, dass die Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität kein signifikant unterschiedliches Potential bei der Klassifikation zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme aufweisen. Während die AUC für die Fragmentozytenzahl bei der Klassifikation von STEC-HUS- und STEC-Patienten bei 81% lag, betrug der Wert für die LDH-Aktivität 74%. Der p-Wert des statistischen



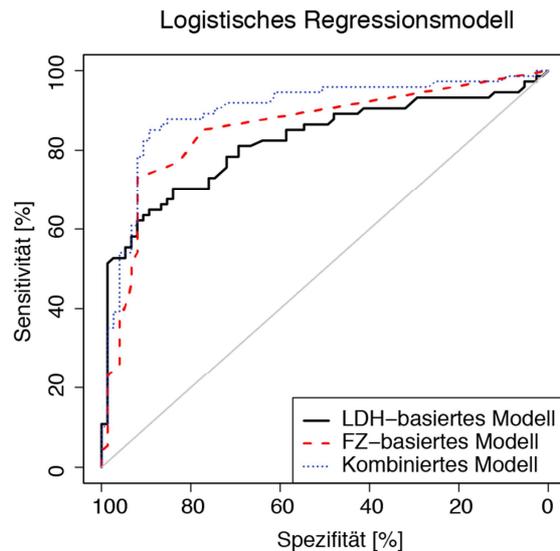
**Abbildung 18:** Im NRI-Verfahren vorhergesagte Risikowerte der Patienten ein HUS zu entwickeln basierend auf den beobachteten LDH-Aktivitäten, Fragmentozytenzahlen bzw. bei gleichzeitiger Beurteilung der LDH-Aktivitäten und Fragmentozytenwerte.

Tests betrug 0.269 und lag damit deutlich über einem Signifikanzniveau von 0.05, siehe Abbildung 17.

### Kombination von LDH und Fragmentozyten für die Diagnostik

Daraus ergab sich die Frage, ob eine gleichzeitig Betrachtung von LDH-Aktivität und Fragmentozyten eine Klassifikation von STEC-HUS- und STEC-Patienten und somit die HUS-Diagnose verbessern könnte. Mit dem hierfür durchgeführten Net Reclassification Improvement (NRI) Verfahren konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Betrachtung von LDH-Aktivität und Fragmentozytenzahl die Klassifikation geringfügig aber nicht signifikant verbessern könnte. Für das logistische Regressionsmodell wurden drei Risikogrenzwerte [ $< 10\%$ ,  $10\%-30\%$ ,  $>30\%$ ] in Analogie zu den Empfehlungen für Kardiovaskuläre Erkrankungen gewählt.

Mittels der darauf beruhenden Statistik konnte gezeigt werden, dass die Risikovorhersage für das Kombinierte Modell (Fragmentozyten + LDH) eine leicht verbesserte Diskriminierung zwischen STEC- und STEC-HUS-Patienten erlaubt, siehe Abbildung 18. Die Fläche unter der Kurve (AUC) für das kombinierte Modell lag allerdings mit 85% auf vergleichbarem Niveau mit der Fragmentozytenzahl, siehe Abbildung 19.



**Abbildung 19: ROC-Kurven zur Klassifikation von STEC-HUS und STEC-Patienten auf Basis der LDH-Aktivität und Fragmentozytenzahl im Vergleich zu der ROC-Kurve des kombinierten Modells. Es ist zu erkennen, dass eine Kombination aus LDH-Aktivität und Fragmentozytenzahl lediglich einen geringen Vorteil gegenüber dem Einsatz der Fragmentozytenzahl bringt.**

Eine detaillierte Reklassifizierungs-Analyse ergab, dass eine nicht signifikante Verbesserung der Risikoabschätzung für 7% der STEC-HUS und 12% der STEC-Patienten erreicht wird. Demgegenüber standen 4% der STEC-HUS und 4% der STEC-Patienten, für die in der kombinierten Analyse eine schlechtere Risikoabschätzung erzielt wurde. Die Signifikanz der Verbesserung lag bei  $p=0.0704$ , siehe Abbildung 20, und somit geringfügig über dem Signifikanzniveau von 0.05.

Konkret wurde bei ausschließlicher Betrachtung der Fragmentozytenzahl ein mittleres HUS-Risiko (10%-30%) für 58 der STEC-Patienten und ein erhöhtes HUS-Risiko (>30%) für 17 der STEC-Patienten ermittelt. Bei gleichzeitiger Betrachtung der LDH-Aktivität wurde ein mittleres Risiko für 64 der Patienten und ein erhöhtes Risiko für 11 der Patienten ermittelt. Unterm Strich wurde somit eine Verbesserung der Klassifikation für 8% STEC-Patienten (bessere Abschätzung für 12% Patienten, schlechtere Risikoabschätzung für 4% Patienten) beobachtet. Analog zu den STEC-Patienten wurde unterm Strich eine Verbesserung der Klassifikation für 3% der STEC-HUS-Patienten beobachtet. Eine detaillierte Übersicht zu den NRI-Ergebnissen findet sich in Abbildung 20.

| <b>Reklassifikationstabelle</b>  |                                      |             |             |                |
|--|--------------------------------------|-------------|-------------|----------------|
| <i>Outcome: Non-HUS</i>  |                                      |             |             |                |
|  | Updated Model [Fragmentozyten + LDH] |             |             |                |
| Initial Model  | [0.0 – 0.1]                          | [0.1 – 0.3] | [0.3 – 1.0] | % reclassified |
| [0.0 – 0.1]  | 0                                    | 0           | 0           | NaN            |
| [0.1 – 0.3]  | 0                                    | 55          | 3           | 5              |
| [0.3 – 1.0]  | 0                                    | 9           | 8           | 53             |
| <i>Outcome: HUS</i>  |                                      |             |             |                |
|  | Updated Model [Fragmentozyten + LDH] |             |             |                |
| Initial Model  | [0.0 – 0.1]                          | [0.1 – 0.3] | [0.3 – 1.0] | % reclassified |
| [0.0 – 0.1]  | 0                                    | 0           | 0           | NaN            |
| [0.1 – 0.3]  | 0                                    | 6           | 5           | 45             |
| [0.3 – 1.0]  | 0                                    | 3           | 60          | 5              |
| <i>Combined Data</i>   |                                      |             |             |                |
|  | Updated Model [Fragmentozyten + LDH] |             |             |                |
| Initial Model  | [0.0 – 0.1]                          | [0.1 – 0.3] | [0.3 – 1.0] | % reclassified |
| [0.0 – 0.1]  | 0                                    | 0           | 0           | NaN            |
| [0.1 – 0.3]  | 0                                    | 61          | 8           | 12             |
| [0.3 – 1.0]  | 0                                    | 12          | 68          | 15             |
| NRI(Categorical) [95% CI]: 0.107 [ -0.0089 - 0.223 ] ; p-value: 0.0704 |                                      |             |             |                |
| IDI [95% CI]: 0.1444 [ 0.0873 - 0.2016 ] ; p-value: 0                  |                                      |             |             |                |
| Call: glm(formula = fmla, family = binomial("logit"), data = p)        |                                      |             |             |                |
| Coefficients:  |                                      |             |             |                |
| (Intercept)  | LDH                                  | FZ          |             |                |
| -2.436543  | 0.003461                             | 2.257492    |             |                |
| Degrees of Freedom: 148 Total (i.e. Null); 146 Residual                |                                      |             |             |                |
| Null Deviance: 206.6   |                                      |             |             |                |
| Residual Deviance: 123      AIC: 129                                   |                                      |             |             |                |

**Abbildung 20: Vollständige Statistik des durchgeführten NRI-Verfahrens. Aufgeführt sind die Anzahl der als Niedrig-Risiko (0.0-0.1), Mittel-Risiko (0.1-0.3) und Hoch-Risiko-Patienten (0.3-1.0) eingestuft Patienten innerhalb der STEC und der STEC-HUS-Gruppe sowie die kombinierten Daten sowie die sich daraus ergebenden Signifikanzwerte.**

---

## Diskussion

### **Bedeutung der untersuchten Patientenkohorte für die klinische Forschung**

Das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ist eine schwere Komplikation, die bei Infektionen mit Shiga-Toxin-produzierenden *Escherichia Coli*-Stämmen auftreten kann. Es kann zu schwerwiegenden Symptomen führen wie akutem und chronischem Nierenversagen, Bluthochdruck, Krämpfen sowie weiteren neurologischen Erkrankungen oder Herzmuskelerkrankungen (Siegler, 1994). Etwa 40% der HUS-Patienten bedürfen einer Nierenersatztherapie und etwa 20-25% der Patienten leiden unter neurologischen Dysfunktionen (Trachtman et al., 2012). Um Langzeitfolgen zu vermeiden sollte die Diagnose des HUS daher so früh wie möglich gestellt werden. Hierfür ist eine zuverlässige Methodik zur Früherkennung notwendig.

Derzeit erfolgt die Diagnostik über die Bestimmung von Laborparametern, die Hinweise auf eine Trias aus hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen liefern. Eine wichtige Rolle spielen dabei fragmentierte Erythrozyten, die sogenannten Fragmentozyten. Da die Zahl der STEC-Patienten, die zusätzlich unter HUS-Komplikationen leiden in der Regel sehr begrenzt ist, fehlen bisher zuverlässige Informationen über den wahren diagnostischen Wert der Fragmentozyten. Zudem fehlt bisher auch eine solide Basis für die Ermittlung eines optimalen Grenzwertes zur HUS-Diagnostik.

Die Leitlinien des International Council for Standardization in Hematology (ICSH) schlagen zwar einen Grenzwert von 1% (Zini et al., 2012) zur Diagnostik von Thrombotischen Mikroangiopathien vor. Die Berechnung beruht allerdings auf einigen wenigen Studien (Klein, 1975, Lesesve et al., 2007, Burns et al., 2004), deren Datenlage zur spezifischen Diagnostik von HUS als nicht optimal einzuschätzen ist. Insgesamt beruhen diese drei Studien auf 256 gesunden Probanden demgegenüber aber auf lediglich 53 Patienten, von denen 28 Patienten unter chronischen Nierenerkrankungen litten und 22 Patienten eine Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura aufwiesen. Lediglich 3 der in die Studien aufgenommenen Patienten litten tatsächlich unter einem HUS. Es ist zudem bisher

nicht untersucht worden, inwiefern eine Berücksichtigung der LDH-Aktivität einen Mehrwert für die HUS-Diagnostik darstellt.

Unter diesen Gesichtspunkten stellt der schwere STEC-Infektionsausbruch in Nord-Deutschland im Jahr 2011, mit insgesamt 852 berichteten HUS-Patienten in Europa, eine große Chance für die medizinische Forschung dar. Rund 10% dieses Patientenpools, 74 Patienten, wurden in die vorliegende Studie eingeschlossen. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden die Daten von insgesamt 218 Patienten ausgewertet – 74 STEC-HUS Patienten, 75 STEC Patienten ohne HUS-Komplikation und 69 Kontrollpatienten ohne STEC-Infektion jedoch mit vergleichbaren Symptomen, wie z.B. blutigem Durchfall. Insgesamt wurden hierfür 903 Blutausstriche angefertigt und ausgewertet.

### **Eine Fragmentozytenzahl über 0.3% stellt einen guten Grenzwert für die STEC-HUS-Diagnostik dar**

Die Patientenproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung erhoben und im Kontext mit den klassischen Laborparametern Kreatinin, Hämoglobin, Haptoglobin, der Thrombozytenzahl und der LDH-Aktivität untersucht. In der Analyse konnte gezeigt werden, dass bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme deutlich erhöhte Fragmentozytenzahlen bei den STEC-HUS zu beobachten waren (Abbildung 14). Der beobachtete Median lag hier bei 0.8%. Bei STEC-Patienten ohne HUS-Komplikationen und bei den Kontrollpatienten war die Fragmentozytenzahl deutlich niedriger. Der beobachtete Medianwert lag hier vergleichbar mit den Werten gesunder Probanden in den bisherigen Studien von (Klein, 1975) und (Lesesve et al., 2007) bei ca. 0.2% Prozent. Eine Unterscheidung zwischen diesen STEC-Patienten und den Kontrollpatienten war anhand der Fragmentozyten nicht möglich. Es ist im Vergleich mit den publizierten Arbeiten auch zu vermuten, dass die Fragmentozytenzahl sich in diesen beiden Patientengruppen nicht signifikant von den Werten bei gesunden Probanden unterscheiden.

Das Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Fragmentozyten in der Diagnostik des HUS. Gleichzeitig war es möglich, aufgrund der besonderen Größe des Patientenkollektivs, einen genaueren Grenzwert für die HUS-Diagnostik zu ermitteln.

Eine Analytik auf Basis von Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven und deren Flächen unter der Kurve (AUC) ergab einen optimalen Grenzwert von 0.3%. Die Wahl dieses Grenzwertes würde bei Unterscheidung zwischen STEC und STEC-HUS Patienten eine hinreichend hohe Spezifität von 88% bei gleichzeitig hoher Sensitivität von 75% erlauben. Bei einer Differenzierung zwischen STEC-HUS und Kontrollpatienten läge die Spezifität sogar bei 100%, bei gleichbleibender Sensitivität.

Es ist allerdings zu beachten, dass die Wahl dieses Grenzwertes über eine mathematische Maximierung der AUC erfolgt ist. In dieser Form spiegelt er die Qualität des diagnostischen Verfahrens wieder. Eine Berücksichtigung der spezifischen Erfordernisse der Diagnostik ist hier jedoch noch nicht mit einbezogen. So wird bei der praktischen Wahl eines Grenzwertes in der Diagnostik normalerweise der Fokus an erster Stelle entweder auf die Spezifität oder auf die Sensitivität gelegt. Ist der diagnostische Test zum Ausschließen von möglichen falsch-positiven Befunden gedacht, optimiert man die Spezifität. Soll hingegen die Gefahr von falsch-negativen Befunden reduziert werden, wird der Fokus auf eine möglichst hohe Sensitivität gelegt. Beispiele hierfür aus der Labormedizin sind der Einsatz der ASAT/ALAT-Messung bei Patienten mit Verdacht auf eine Lebererkrankung (Sensitivität: hoch, Spezifität: niedrig) oder die Glukose-Bestimmung im Urin (Sensitivität: niedrig, Spezifität: hoch). Vergleicht man die mit den Fragmentozyten erzielten Werte (Sensitivität: 75%, Spezifität: 88%), kann davon ausgegangen werden, dass ein Grenzwert von 0.3% eine sehr gute Treffsicherheit bietet.

Im Vergleich dazu würde der derzeit vom ICSH vorgeschlagene Grenzwert von 1% zur Diagnose von Thrombotischen Mikroangiopathien (Zini et al., 2012) zu einer deutlich geringeren Treffsicherheit (Spezifität von 88%, Sensitivität von 47.2%) führen, siehe Abbildungen 22-23 im Anhang. Bereits ein Grenzwert von 0.6% würde die Sensitivität auf 66.7% reduzieren. Bei einem Grenzwert von 0.2% läge die Sensitivität zwar bei 77.8% (+2.8%), die Spezifität allerdings fiel auf 80% (-8%).

### **Bedeutung der Fragmentozytenzahl als Frühindikator für HUS**

Betrachtet man die gemessenen Laborwerte des Kreatinins, Hämoglobins und der Thrombozyten (Abbildung 14) ist festzustellen, dass viele der STEC-HUS Patienten bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme HUS Symptome aufwiesen. So sind die Medianwerte dieser Trias-Parameter bereits zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht (Kreatinin) bzw. erniedrigt (Hämoglobin, Thrombozyten). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass viele der STEC-HUS Patienten im Jahr 2011 unter einen rapiden Krankheitsverlauf litten. Erschwerend kommt hinzu, dass die Aufnahme eines Patienten in die Studie, aufgrund des Patientenansturms während des Ausbruchs im Jahr 2011, oft erst nach Vorliegen eines positiven mikrobiologischen EHEC-Befundes erfolgte. Von Beginn der Infektion bis zur Durchführung der ersten Fragmentozytenzählung vergingen somit in der Regel einige Tage: Die Dauer bis zur Manifestation der ersten Infektionssymptome, die Dauer bis zur Vorstellung des Patienten im Krankenhaus und die Dauer bis zum Vorliegen des mikrobiologischen Befundes.

Dadurch lässt sich schwer abschätzen, inwiefern die Fragmentozytenzahl als Frühindikator für die Entwicklung eines HUS geeignet sind. Lediglich für 6 der STEC-HUS-Patienten lagen Proben von einem Zeitpunkt vor der HUS-Manifestation vor. Bei keiner dieser Proben konnten erhöhte Fragmentozytenzahlen beobachtet werden. Proben, die im Zeitraum zwischen 0 bis 10 Tage nach der ersten HUS-Manifestation gesammelt wurden, zeigten bereits einen sehr deutlichen Anstieg (Median größer 1%) der Fragmentozytenzahlen. Aufgrund dieser Werte kann zwar vermutet werden, dass eine Vorlaufzeit (Anstieg der Fragmentozytenzahl vor HUS-Manifestation) nicht existiert. Die statistische Datenlage in dieser Arbeit ist jedoch gering, um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

### **Bedeutung der Fragmentozytenzahl als Verlaufsparemeter**

Im weiteren Verlauf der Erkrankung scheint die erhöhte Fragmentozytenzahl mit der erniedrigten Hämoglobinkonzentration zu korrelieren (Abb. 14). Anhand des zeitlichen Verlaufs der Laborparameter konnte gezeigt werden, dass zuerst eine Normalisierung der Thrombozytenzahl erfolgt, gefolgt von einer Normalisierung der Kreatininkonzentration. Erst im Anschluss sind eine Regeneration der

Hämoglobinkonzentration und eine Reduktion der Fragmentozytenzahl unter die 0.3%-Grenze zu beobachten. Für diese anhaltende Erhöhung der Fragmentozytenzahl sind mehrere Erklärungen denkbar. Einerseits könnte die Clearance-Geschwindigkeit der Fragmentozyten langsamer sein als bei den anderen Parametern. Dem Wissen des Autors nach existieren bisher keine publizierten Erkenntnisse zu der Clearance-Geschwindigkeit der Fragmentozyten. Der Effekt von Medikation oder Transfusionen auf die Clearance ist bisher unbekannt.

Andererseits könnte trotz einsetzender Remission eine noch bestehende Mikroangiopathie zur Neubildung von Fragmentozyten führen. In diesem Fall wäre die weiterhin erhöhte Anzahl an Fragmentozyten ein Indikator für die anhaltende Mikroangiopathie. Tatsächlich wird die Quantifizierung der fragmentierten roten Blutkörperchen nicht nur zur Diagnose (Ruutu et al., 2007) sondern auch für die zeitliche Überwachung von Zelltransplantations-abhängigen Mikroangiopathien vorgeschlagen (Buttarelo and Plebani, 2008). Eine fortlaufende Bestimmung der Fragmentozyten während des gesamten Verlaufs der HUS-Erkrankung erscheint auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse daher empfehlenswert.

### **Kombinierte Diagnostik mit LDH Verlaufsdiagnostik**

Zur Diagnose von Transplantations-abhängigen Mikroangiopathien wird die gemeinsame Betrachtung der Fragmentozyten mit weiteren Parametern wie z.B. der Laktatdehydrogenase (LDH) im Kontext empfohlen (Ruutu et al., 2007). In Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, inwiefern eine solche Kombination aus Fragmentozytenzahl und LDH-Aktivität die Klassifikation von STEC-HUS und STEC-Patienten verbessern könnte. Mittels dem hier verwendeten NRI-Verfahren (siehe Abbildung 20) konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Betrachtung beider Parameter die Klassifikation zwar geringfügig aber nicht signifikant ( $p = 0.0704$ ) verbessern würde. Eine Verbesserung der Risikoabschätzung HUS zu entwickeln wurde durch die gleichzeitige Betrachtung für 7% der STEC-HUS Patienten beobachtet, eine schlechtere Abschätzung für 4% der STEC-HUS Patienten.

Das Potential einer solchen Kombination von LDH und Fragmentozyten für die Klassifikation von Patienten mit erhöhtem HUS Risiko könnte auch stark von der Wahl des jeweils gewählten Zeitpunktes der Probenentnahme abhängen. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der LDH-Aktivität und der Fragmentozyten (siehe Abbildung 14) bei den STEC-HUS-Patienten im Vergleich, wird ersichtlich, dass die Verläufe sich deutlich unterscheiden. Die Fragmentozytenzahl erreichte im Durchschnitt bei den hier untersuchten Patienten bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme ihren Maximalwert und blieb bis zur Normalisierung der Hämoglobinkonzentration erhöht. Die LDH-Aktivität stieg jedoch erst im Verlauf der Erkrankung weiter an und fiel dafür bereits zu einem frühen Zeitpunkt wieder ab. Der Spitzenwert der LDH-Aktivität schien zeitlich mit den Spitzenwerten der Trias-Parameter (Kreatininkonzentration, Hämoglobinkonzentration, Thrombozytenzahl) zusammenzufallen.

Aufgrund dieser Daten erscheint es durchaus empfehlenswert sowohl die LDH-Aktivität als auch die Fragmentozytenzahl gleichzeitig zu betrachten – hauptsächlich zur Kontrolle und Beobachtung des Erkrankungsverlaufes. Hierbei muss die niedrige Spezifität der LDH im Vergleich zur hohen Spezifität der Fragmentozyten bedacht werden, da die verschiedenen LDH-Isoenzyme in diversen weiteren Geweben (Lunge, lymphatische Systeme, Milz) vertreten sind (Thomas, 2012). Während die LDH zur verbesserten Erkennung der Erkrankungsspitze genutzt werden könnte, wäre eine Analyse der Fragmentozytenzahl zur Bewertung der Remissionsphase denkbar.

### **Messung im Alltag/ Automatisierung**

Die Praktikabilität eines vermehrten Einsatzes der Fragmentozytenzahl in der medizinischen Laboranalytik, zu früheren Zeitpunkten, für einen längeren Zeitraum zur Verlaufskontrolle oder bei einer größeren Anzahl an Patienten, hängt stark von der Automatisierung der Analytik ab. Nach derzeitigem Stand könnte der mit der Quantifizierung verbundene manuelle Aufwand und die Qualität automatisierter Systeme einen vermehrten Einsatz der Fragmentozytenzahl praktisch einschränken. Automatisierte Systeme zur Quantifizierung von Fragmentozyten, wie der Siemens ADVIA 2120, haben eine niedrige Spezifität (20% bis 52,2%) bei der Diagnose von

Mikroangiopathien (Buttarelo and Plebani, 2008). Diese Systeme ermitteln Fragmentozyten nur auf der Grundlage ihrer Größe und des Hämoglobingehalts – unabhängig von ihrer Form. Als Konsequenz könnten andere Teilchen wie kleine rote Blutzellen oder Membranfragmente das Ergebnis verfälschen (Lecompte et al., 2004). Diese Ungenauigkeit würde derzeit eine arbeitsintensive mikroskopische Untersuchung für die Bestätigung der Fragmentozytenbefunde erforderlich machen (Buttarelo and Plebani, 2008).

### **Zusammenfassung und Einordnung in die Datenlage des ICSH**

Im praktischen Alltag ist die Bestimmung der Fragmentozytenzahl derzeit noch mit hohem Arbeitsaufwand verbunden. Unter diesem Gesichtspunkt und in Anbetracht der vergleichbaren Leistung zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme wäre die alternative Bestimmung der LDH-Konzentration denkbar. Sieht man von dem notwendigen Arbeitsaufwand ab, geht der Autor davon aus, dass die Bestimmung der Fragmentozytenzahl eine wichtige Analytik zur HUS-Diagnose darstellt. Auf Grundlage der hier beschriebenen Daten erscheint es empfehlenswert, die Fragmentozyten nicht nur zur Bestätigung eines HUS-Risiko bei Verdachtspatienten zu bestimmen, sondern auch zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes. Für die Diagnostik scheint dabei ein Grenzwert von 0.3% die beste Treffsicherheit (Spezifität: 88%, Sensitivität: 75%) zu bieten. Konzentriert sich die Diagnostik auf eine hohe Spezifität erscheint der vom ICSH vorgeschlagene Grenzwert von 1% (Zini et al., 2012) sinnvoll. Für eine erhöhte Sensitivität zur möglichen Früherkennung jedoch würde sich eine Senkung des Grenzwertes auf 0.3% empfehlen. Dieser Wert dürfte mit den in der Literatur für gesunde Probanden beschriebenen Fragmentozytenwerte von 0.1%-0.2% (Klein, 1975, Buvens and Pierard, 2012, Burns et al., 2004, Lesesve et al., 2007) im Einklang stehen.

Nach bestem Wissen des Autors handelt es sich hierbei um die erste Studie, die den diagnostischen Wert der Fragmentozyten in einer derart großen Kohorte an STEC-, STEC-HUS und Kontrollpatienten untersucht. Eine Einordnung der vorliegenden Arbeit in die Literaturlage, die den ICSH-Leitlinien zugrunde liegt findet sich in Tabelle 14.

| <b>Studie</b>             | <b>Chronische Nierenerkrank.</b> | <b>TTP</b> | <b>STEC-HUS</b> | <b>STEC ohne HUS</b> | <b>Kontroll-Patienten</b> |
|---------------------------|----------------------------------|------------|-----------------|----------------------|---------------------------|
| Klein et al., 1975        | -                                | -          | -               | -                    | 100                       |
| Burns et al., 2004        | 28                               | 6          | -               | -                    | 40                        |
| Lesesve et al., 2007      | -                                | 16         | 3               | -                    | 116                       |
| <b>Vorliegende Studie</b> | -                                | -          | <b>74</b>       | <b>75</b>            | <b>69</b>                 |

**Tabelle 14: Aktualisierte Tabelle 1 mit Ergänzung der in dieser Arbeit herangezogenen Patienten. Es ist erkennbar, dass es sich hierbei um die erste Studie handelt, die den diagnostischen Wert der Fragmentozyten in einer derart großen Kohorte an STEC-, STEC-HUS untersucht. Der Autor geht daher davon aus, dass die vorliegende Arbeit dabei helfen kann das Verständnis der Fragmentozytenzahlen bei HUS-Patienten zu verbessern.**

---

## Referenzen

- AKIYAMA, H., YOSHINAGA, H., ENDOU, M., TANIKAWA, S., SAKAMAKI, H., TANOUE, K. & ONOZAWA, Y. 1997. Microangiopathy without hemolysis in a patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 20, 261-3.
- BELL, B. P., GOLDOFT, M., GRIFFIN, P. M., DAVIS, M. A., GORDON, D. C., TARR, P. I., BARTLESON, C. A., LEWIS, J. H., BARRETT, T. J., WELLS, J. G. & ET AL. 1994. A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*, 272, 1349-53.
- BESSIS, M. 1977. *Blood Smears Reinterpreted*, New York, Springer Verlag.
- BOYCE, T. G., SWERDLOW, D. L. & GRIFFIN, P. M. 1995. Escherichia coli O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 333, 364-8.
- BUCHHOLZ, U., BERNARD, H., WERBER, D., BOHMER, M. M., REMSCHMIDT, C., WILKING, H., DELERE, Y., AN DER HEIDEN, M., ADLHOCH, C., DREESMAN, J., EHLERS, J., ETHELBERG, S., FABER, M., FRANK, C., FRICKE, G., GREINER, M., HOHLE, M., IVARSSON, S., JARK, U., KIRCHNER, M., KOCH, J., KRAUSE, G., LUBER, P., ROSNER, B., STARK, K. & KUHNE, M. 2011. German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*, 365, 1763-70.
- BULL, B. S. & KUHN, I. N. 1970. The production of schistocytes by fibrin strands (a scanning electron microscope study). *Blood*, 35, 104-11.
- BURNS, E. R., LOU, Y. & PATHAK, A. 2004. Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 75, 18-21.
- BUTTARELLO, M. & PLEBANI, M. 2008. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*, 130, 104-16.
- BUVENS, G. & PIERARD, D. 2012. Infections with verotoxin-producing escherichia coli O157:H7 and other serotypes, including the outbreak strain O104:H4. *Acta Clin Belg*, 67, 7-12.
- DARAM, S. R., PHILIPNERI, M., PURI, N. & BASTANI, B. 2005. Thrombotic thrombocytopenic purpura without schistocytes on the peripheral blood smear. *South Med J*, 98, 392-5.
- FAVA, S. & GALIZIA, A. C. 1995. Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndrome in the absence of schistocytes. *Br J Haematol*, 89, 643-4.
- FRANK, C., WERBER, D., CRAMER, J. P., ASKAR, M., FABER, M., AN DER HEIDEN, M., BERNARD, H., FRUTH, A., PRAGER, R., SPODE, A., WADL, M., ZOUFALY, A., JORDAN, S., KEMPER, M. J., FOLLIN, P., MULLER, L., KING, L. A., ROSNER, B., BUCHHOLZ, U., STARK, K., KRAUSE, G. & TEAM, H. U. S. I. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*, 365, 1771-80.
- GERBER, A., KARCH, H., ALLERBERGER, F., VERWEYEN, H. M. & ZIMMERHACKL, L. B. 2002. Clinical course and the role of shiga toxin-producing Escherichia coli infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis*, 186, 493-500.
- GRUNDY, S. M., CLEEMAN, J. I., MERZ, C. N., BREWER, H. B., JR., CLARK, L. T., HUNNINGHAKE, D. B., PASTERNAK, R. C., SMITH, S. C., JR., STONE, N. J., NATIONAL HEART, L., BLOOD, I., AMERICAN COLLEGE OF

- CARDIOLOGY, F. & AMERICAN HEART, A. 2004. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, 110, 227-39.
- KLEIN, P. J. P., H.; DE LACROIX, W.F.; PAHNKE, V.; IMIG, H.; FISCHER, R. 1975. Quantitative determination of fragment erythrocytes (schistocytes) in healthy subjects and patients after surgery. *Klinische Wochenschrift*, 53, 847-51.
- KUNDU, S., AULCHENKO, Y. S., VAN DUIJN, C. M. & JANSSENS, A. C. 2011. PredictABEL: an R package for the assessment of risk prediction models. *Eur J Epidemiol*, 26, 261-4.
- LECOMPTE, T., BORDIGONI, P., BENBIH, M., DEFENTE, M., ALLA, F., SALIGNAC, S. & LESESVE, J.-F. 2004. Comparative Evaluation of Schistocyte Counting by an Automated Method and by Microscopic Determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 121, 739-745.
- LESESVE, J. F., SALIGNAC, S. & LECOMPTE, T. 2007. Laboratory measurement of schistocytes. *Int J Lab Hematol*, 29, 149-51.
- LEVINE, M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*, 155, 377-89.
- MOAKE, J. L. 2002. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 347, 589-600.
- MUHLENBRUCH, K., HERACLIDES, A., STEYERBERG, E. W., JOOST, H. G., BOEING, H. & SCHULZE, M. B. 2013. Assessing improvement in disease prediction using net reclassification improvement: impact of risk cut-offs and number of risk categories. *Eur J Epidemiol*, 28, 25-33.
- NATHANSON, S., KWON, T., ELMALEH, M., CHARBIT, M., LAUNAY, E. A., HARAMBAT, J., BRUN, M., RANCHIN, B., BANDIN, F., CLOAREC, S., BOURDAT-MICHEL, G., PIETREMENT, C., CHAMPION, G., ULINSKI, T. & DESCHENES, G. 2010. Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5, 1218-28.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM EXPERT PANEL ON DETECTION, E. & TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN, A. 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106, 3143-421.
- O'BRIEN, A. O., LIVELY, T. A., CHEN, M. E., ROTHMAN, S. W. & FORMAL, S. B. 1983. Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet*, 1, 702.
- PENCINA, M. J., D'AGOSTINO, R. B., SR., D'AGOSTINO, R. B., JR. & VASAN, R. S. 2008. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*, 27, 157-72; discussion 207-12.
- R CORE TEAM 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- ROBERT KOCH-INSTITUT 2011. Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin: Robert Koch-Institut.
- ROBIN, X., TURCK, N., HAINARD, A., TIBERTI, N., LISACEK, F., SANCHEZ, J. C. & MULLER, M. 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, 77.

- ROHDE, H., QIN, J., CUI, Y., LI, D., LOMAN, N. J., HENTSCHKE, M., CHEN, W., PU, F., PENG, Y., LI, J., XI, F., LI, S., LI, Y., ZHANG, Z., YANG, X., ZHAO, M., WANG, P., GUAN, Y., CEN, Z., ZHAO, X., CHRISTNER, M., KOBBE, R., LOOS, S., OH, J., YANG, L., DANCHIN, A., GAO, G. F., SONG, Y., LI, Y., YANG, H., WANG, J., XU, J., PALLEN, M. J., WANG, J., AEPFELBACHER, M., YANG, R. & CONSORTIUM, E. C. O. H. G. A. C.-S. 2011. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med*, 365, 718-24.
- RUGGENENTI, P., NORIS, M. & REMUZZI, G. 2001. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int*, 60, 831-46.
- RUUTU, T., BAROSI, G., BENJAMIN, R. J., CLARK, R. E., GEORGE, J. N., GRATWOHL, A., HOLLER, E., IACOBELLI, M., KENTOUCHE, K., LAMMLE, B., MOAKE, J. L., RICHARDSON, P., SOCIE, G., ZEIGLER, Z., NIEDERWIESER, D., BARBUI, T., EUROPEAN GROUP FOR, B., MARROW, T. & EUROPEAN, L. 2007. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica*, 92, 95-100.
- SIEGLER, R. L. 1994. Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*, 125, 511-8.
- SLUTSKER, L., RIES, A. A., GREENE, K. D., WELLS, J. G., HUTWAGNER, L. & GRIFFIN, P. M. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med*, 126, 505-13.
- TALAN, D., MORAN, G. J., NEWDOW, M., ONG, S., MOWER, W. R., NAKASE, J. Y., PINNER, R. W., SLUTSKER, L. & GROUP, E. M. I. N. S. 2001. Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to United States emergency departments: prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enteropathogens. *Clin Infect Dis*, 32, 573-80.
- TARR, P. I., GORDON, C. A. & CHANDLER, W. L. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365, 1073-86.
- THOMAS, L. 2012. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik; 2 Bde.*, TH-Books-Verlag-Ges.
- TRACHTMAN, H., AUSTIN, C., LEWINSKI, M. & STAHL, R. A. 2012. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nat Rev Nephrol*.
- WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. 2014a. *Boxplot* [Online]. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Available: [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Box\\_plot&oldid=617605869](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Box_plot&oldid=617605869) [Accessed 23 July 2014].
- WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. 2014b. *Receiver Operating Characteristic* [Online]. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Available: [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Receiver\\_Operating\\_Characteristic&oldid=129352830](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Receiver_Operating_Characteristic&oldid=129352830) [Accessed 23 July 2014].
- ZINI, G., D'ONOFRIO, G., BRIGGS, C., ERBER, W., JOU, J. M., LEE, S. H., MCFADDEN, S., VIVES-CORRONS, J. L., YUTAKA, N., LESEVE, J. F. & INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN, H. 2012. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol*, 34, 107-16.

## Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| <b>AUC</b>   | Area Under the Curve, Fläche unter der Kurve                   |
| <b>Abb.</b>  | Abbildung  |
| <b>EDTA</b>  | Ethylendiamintetraacetat                                       |
| <b>EHEC</b>  | Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>                   |
| <b>ELISA</b> | Enzyme-linked immunosorbent Assay                              |
| <b>HUS</b>   | Hämolytisch-Urämisches Syndrom                                 |
| <b>ICSH</b>  | International Council for Standardization in Hematology        |
| <b>LDH</b>   | Laktat-Dehydrogenase   |
| <b>NRI</b>   | Net Reclassification Improvement                               |
| <b>p</b>     | p-Wert   |
| <b>pAUC</b>  | partial Area Under the Curve, partielle Fläche unter der Kurve |
| <b>PCR</b>   | Polymerase Chain Reaction                                      |
| <b>RKI</b>   | Robert Koch Institut   |
| <b>ROC</b>   | Receiver Operating Characteristic                              |
| <b>STEC</b>  | Shiga-Toxin-produzierende <i>Escherichia Coli</i>              |
| <b>TMA</b>   | Thrombotische Mikroangiopathie(n)                              |
| <b>TTP</b>   | Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura                       |

## Einheiten

|           |                  |
|-----------|------------------|
| <b>dL</b> | Deziliter        |
| <b>g</b>  | Gramm            |
| <b>L</b>  | Liter            |
| <b>mg</b> | Milligramm       |
| <b>U</b>  | Units, Einheiten |

# Anhang

|                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| Method X: StudienFZ2 % | Instrument: Mdiff |
| Method Y: StudienFZ3 % | Instrument: Mdiff |
| Sample Size: 904       |                   |

| Descriptive Statistics |       |       |        |               |  |
|------------------------|-------|-------|--------|---------------|--|
|                        | X     | Y     | Y-X    | (Y - X)% of X |  |
| Median                 | 0.300 | 0.200 | 0.000  | 0.0           |  |
| Mean                   | 0.623 | 0.584 | -0.039 | 16.9          |  |
| Minimum                | 0.100 | 0.100 | -2.800 | -93.3         |  |
| Maximum                | 5.500 | 6.500 | 3.000  | 900.0         |  |
| 68% Median Distance    | 0.400 | 0.400 | 0.300  | 50.0          |  |
| Standard Deviation     | 0.766 | 0.769 | 0.511  | 106.8         |  |

| Differences |         |
|-------------|---------|
| Medians     | -33.333 |
| Means       | -6.201  |

| Regression and Correlation Analysis |          |           |             |             |             |
|-------------------------------------|----------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| Coefficients of Correlation:        |          | r = 0.779 | tau = 0.485 |             |             |
| Structural Relationship Model:      |          | slope b   | intercept a | lower limit | upper limit |
| Passing/Bablok (P/B)                |          | 1.000     | 0.000       |             |             |
| 95% Confidence Region for b (P/B)   |          |           |             | 0.885       | 1.000       |
| 95% Confidence Region for a (P/B)   |          |           |             | 0.000       | 0.012       |
| Std. Principal Component (SPC)      |          | 1.005     | -0.042      |             |             |
| Linear Model:                       |          |           |             |             |             |
| Least Squares Regression            |          | 0.782     | 0.097       |             |             |
| Theil Regression                    |          | 0.714     | 0.029       |             |             |
| Dispersion of Residuals:            |          |           |             |             |             |
| Passing/Bablok Regression           | md(68) = | 0.212     | md(95) =    | 0.778       |             |
| Std. Principal Component            |          |           | SE =        | 0.361       |             |

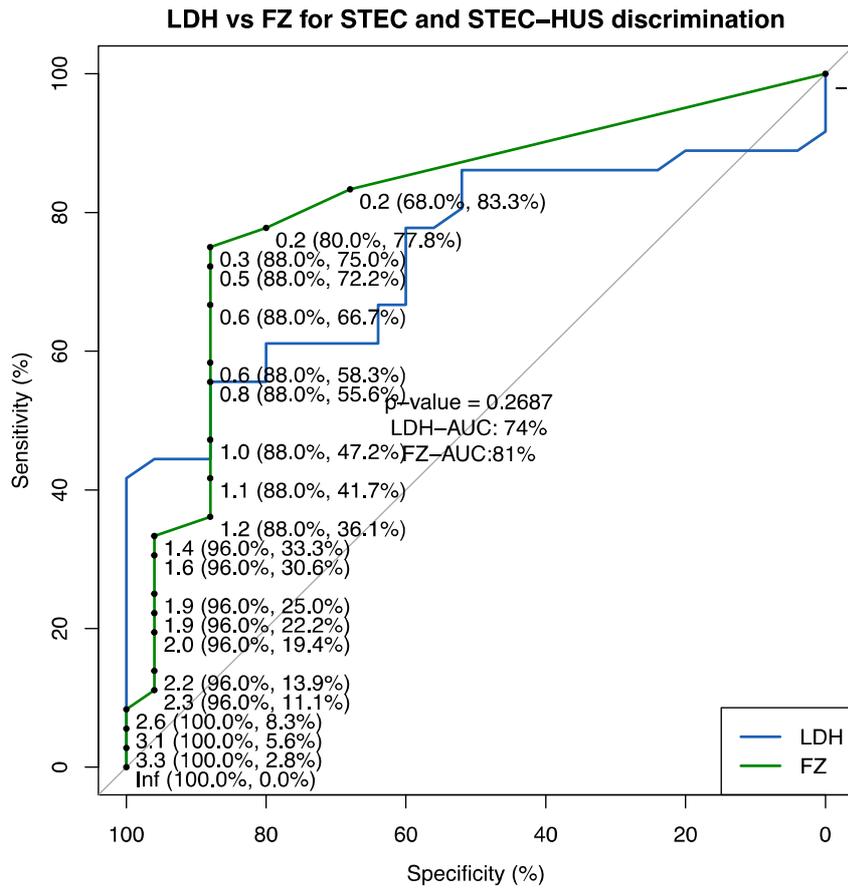
  

**Data Assessment**

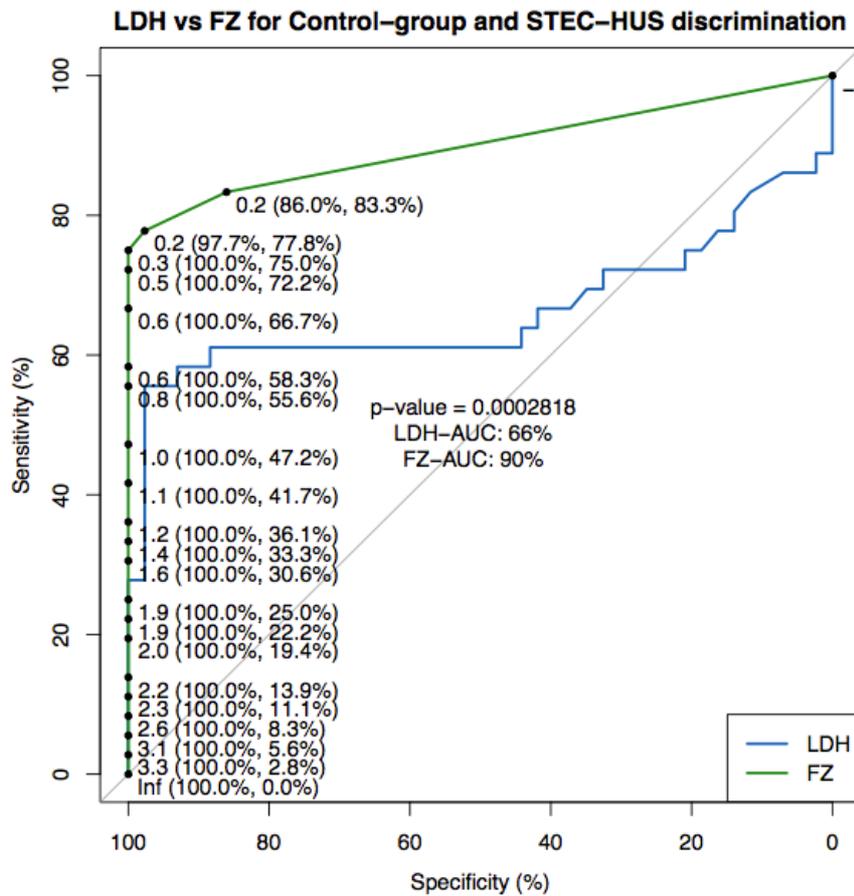
Cusum test for linearity shows no significant deviation from linearity.

Variable X: The variable does not appear to be continuous.  
 The data does not conform to the model assumptions; be careful with the interpretation of the results.

**Abbildung 21: Exemplarisches Passing/Bablok Statistikergebnis für den Vergleich von in Doppelbestimmung ermittelten Fragmentozytenwerten. Das Verfahren ermittelt die deskriptiven Statistikmaße für die Daten sowie Korrelationswerte anhand einer linearen Regression. Je höher der Korrelationswert, umso vergleichbarer sind die beiden Bestimmungen.**



**Abbildung 22: Vollständige Übersicht der grenzwertabhängigen Spezifitäten und Sensitivitäten für die Fragmentozyten beim Vergleich von STEC und STEC-HUS Patienten.**



**Abbildung 23: Vollständige Übersicht der grenzwertabhängigen Spezifitäten und Sensitivitäten für die Fragmentozyten beim Vergleich von Kontroll- und STEC-HUS Patienten.**

## **Tabellarischer Lebenslauf**

Entfällt aus Datenschutzrechtlichen Gründen.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich in dieser spannenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Professor Christoph Wagener verpflichtet. Als Doktorvater hat mich Herr Professor Wagener stets mit seinem wertvollen akademischen Rat unterstützt. Ich danke ihm zudem für die vielen spannenden und anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Ebenso geht mein Dank an meinen Betreuer Herrn PD. Dr. Thomas Streichert, der bei Planung, Durchführung & Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich wertvolle Unterstützung gewährte und auch jenseits der Doktorarbeit ein hervorragender Mentor war. Nicht zuletzt möchte ich ihm für die sehr warmherzige und außerordentlich professionelle Betreuung danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Kollegin und Mitdotorandin Frau Julia Doulgere für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, sowohl in der Klinik als auch in der Wissenschaft, bei der Probensammlung und bei der Vorbereitung unserer Seminare.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. rer. nat. Benjamin Otto, der mir eine große Hilfe bei der Auswertung und der Statistik war. Weiterhin möchte ich mich sehr bei Herrn Dr. Gerhard Nordholt bedanken, der mir mit den Patientendaten und der EDV geholfen hat.

Mein Dank geht ebenso an Herrn Dr. Roman Jung, der bei der Planung mitgeholfen und mich stets motiviert hat.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei Frau Anette Johst dafür bedanken, dass sie die Blutausstriche mitbeurteilt hat und somit eine unabhängige Kontrolle der Fragmentozytenzahl ermöglichte.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Maher Nassour