

Aus der Klinik für Anästhesiologie
(Prof. Dr. med. K. Meissner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Nachweis bakterieller Translokation am
Beispiel *Enterococcus sp.* durch
real-time PCR aus Blut kritisch kranker
Patienten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sophie Michelle Neugebauer

aus

Buxtehude

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: PD Dr. med. J. Schäper

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. C. Lüder

Prüfungskommission

Referent/in PD Dr. med. J. Schäper

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Lüder

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 01.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Nachweis bakterieller Translokation am Beispiel *Enterococcus sp.* durch *real-time* PCR aus Blut kritisch kranker Patienten" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS).....	1
1.2 Patientenkollektive dieser Arbeit	4
1.3 Systemische Antworten auf ein Trauma.....	5
1.4 Bedeutung des Darms in der Sepsis	6
1.5 Die intestinale epitheliale Barriere	8
1.6 Gestörte intestinale epitheliale Barriere	8
1.7 Prädisponierende Faktoren für eine bakterielle Translokation	9
1.8 Bedeutung der bakteriellen Translokation bei kritisch kranken Patienten.....	10
1.9 Spezies <i>Enterococcus sp.</i>	13
1.10 Fragestellung und Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Angabe der Mengenverhältnisse	15
2.2 Geräte	15
2.3 <i>Enterococcus faecalis</i> -DNA	16
2.4 Kits.....	17
2.5 Primer	17
2.6 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.7 Ethikantrag	18
2.8 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie.....	18
2.9 Statistik	20
2.10 Materialgewinnung	20
2.11 DNA-Isolierung aus Patientenblut	21
2.12 DNA-Isolierung von <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.13 Quantifizierung genomischer DNA	22
2.14 Verdünnung genomischer DNA von <i>Enterococcus faecalis</i>	22
2.15 Gradienten-PCR zur Festlegung der Primer und der Annealing-Temperatur	23
2.16 16S-rDNA-PCR mit dem Primer-Paar RW01/DG74 zur Überprüfung der DNA-Qualität und PCR mit den Primer-Paaren EF1/EF2 und EF3/EF4.....	24
2.17 Durchgeführtes PCR-Protokoll	25

2.18	PCR der Patientenproben	26
2.19	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.20	Sequenzierung	26
2.21	Klinische Parameter	27
2.22	Entwicklung des Krankheitsverlaufs	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Etablierung der Methode	29
3.2	PCR-Analysen mit dem LightCycler 480®	31
3.3	Agarose-Gelelektrophorese mit ausgewählten Proben	38
3.4	<i>Crossing points</i>	39
3.5	Sequenzierung der PCR-Amplifikate ausgewählter Proben	39
3.6	Vergleich mit Markern der epithelialen Permeabilitätserhöhung und gesteigerter Monozytenaktivität.....	41
3.7	Vergleich mit Markern der systemischen Inflammation	43
3.8	Vergleich mit der Entwicklung des Krankheitsverlaufs	45
4	Diskussion.....	50
4.1	Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse.....	50
4.2	Diskussion der Methode	50
4.3	Zeitliches Auftreten der bakteriellen Translokationen.....	57
4.4	Indirekte Parameter für eine bakterielle Translokation.....	58
4.5	Ausblick.....	67
5	Zusammenfassung.....	68
6	Literaturverzeichnis	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit den Primer-Paaren RW01/DG74, EF1/2, EF3/4	30
Abbildung 2: Gradienten-PCR mit Primer-Paar F und R.....	30
Abbildung 3: Magnesium ²⁺ -Reihe mit Annealing-Temperatur von 54 °C.....	31
Abbildung 4: Magnesium ²⁺ -Reihe mit Annealing-Temperatur von 62 °C.....	31
Abbildung 5: Amplifikationskurve der Verdünnungsreihe vom 24.05.2016	32
Abbildung 6: Verteilung der Translokationen	36
Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate von Patient 010 und 013.....	38
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate von Patient 020, 021 und 023	38
Abbildung 9: Urinkonzentration des <i>intestinal fatty acid binding protein</i>	41
Abbildung 10: Urinkonzentration des Claudin 3.....	42
Abbildung 11: Blutkonzentration des sCD14.....	42
Abbildung 12: Plasmakonzentration des PCT.....	43
Abbildung 13: Blutkonzentration der Leukozyten.....	44
Abbildung 14: Plasmakonzentration des CRP.....	44
Abbildung 15: Score-Wert des SOFA-Scores.....	45
Abbildung 16: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „SIRS“ und „kein SIRS“	46
Abbildung 17: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Sepsis“ und „keine Sepsis“	46
Abbildung 18: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „schwere Sepsis“ und „keine schwere Sepsis“	47
Abbildung 19: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „septischer Schock“ und „kein septischer Schock“	47
Abbildung 20: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten auf Intensivstation verstorben“ und „Patienten nicht auf Intensivstation verstorben“	48
Abbildung 21: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 28 Tagen“ und „Patienten nicht verstorben nach 28 Tagen“.....	48
Abbildung 22: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 90 Tagen“	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	15
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 3: Ausschlusskriterien	19
Tabelle 4: Gradienten-PCR Pipettierschema.....	23
Tabelle 5: Gradienten-PCR Annealing-Temperaturen.....	23
Tabelle 6: Gradienten-PCR-Programm.....	24
Tabelle 7: PCR-Pipettierschema.....	25
Tabelle 8: <i>real-time</i> PCR-Programm.....	25
Tabelle 9: <i>crossing points</i> in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge von <i>E. faecalis</i>	33
Tabelle 10: positive Patientenproben	33
Tabelle 11: positive Ergebnisse in der Überprüfung	37
Tabelle 12: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter positiver und negativer Proben	39
Tabelle 13: SOFA-Score.....	64

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Arteria</i>
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BMI	Body-Mass-Index
Bp	Basenpaar(e)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CP	<i>crossing point</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	<i>(gut derived) danger-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>esp</i>	<i>enterococcal surface protein</i>
EF1	Primer EF1
EF2	Primer EF2
EF3	Primer EF3
EF4	Primer EF4
F	Forward-Primer
GCS	Glasgow Coma Scale
GIT	Gastrointestinaltrakt
HeLa	Henrietta Lacks
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
FABPs	<i>fatty acid-binding proteins</i>
iFABP	<i>intestinal fatty acid binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>polymerasechainreaction</i>
PCT	Procalcitonin
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
R	Reverse-Primer
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale RNA
sCD14	<i>soluble</i> (lösliches) CD14
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SYBR	Firmenname für Synergy Brands
TAE	TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA-Puffer

Taq	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelzpunkt
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
qSOFA	quickSOFA
V.	<i>Vena</i>

1 Einleitung

1.1 Sepsis und Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

1.1.1 Definition

Die erste Sepsis-Consensus-Konferenz von 1991 unterschied zwischen den Krankheitsbildern Sepsis, schwere Sepsis (Sepsis mit Organdysfunktion) und septischem Schock (Sepsis mit Organdysfunktion und der Notwendigkeit von Vasopressorgabe zur Behandlung einer bedrohlichen Hypotonie) (Bone et al. 1992). Für die Sepsisdefinition wurden die sogenannten Systemic Inflammatory Response Syndrome-Kriterien (SIRS-Kriterien) herangezogen, die Folgendes beinhalteten: Hypothermie ($< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$) oder Hyperthermie ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), Tachykardie ($\geq 90/\text{Min.}$), Tachypnoe ($\geq 20/\text{Min.}$) und Leukozytose ($\geq 120000/\mu\text{l}$) und $\text{P}_a\text{O}_2 < 32\text{ mmHg}$ oder Leukopenie $\leq 4000/\mu\text{l}$ und/oder Linksverschiebung $> 10\%$ (Bracht et al. 2019). Diese Kriterien wurden im Jahr 2001 um vier weitere Grenzwerte für Organdysfunktionen erweitert (Levy et al. 2003). Die hier genannte Sepsis-1/2-Definition klassifizierte die Sepsis als SIRS auf dem Boden einer Infektion.

2016 wurde die Sepsisdefinition überarbeitet (Singer et al. 2016). In der neuen Sepsisdefinition spielen die Begriffe SIRS und schwere Sepsis keine Rolle mehr. Lediglich der septische Schock als Untergruppe wird definiert. „Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine dysregulierte Immunantwort des Patienten auf eine Infektion verursacht wird.“ (Singer et al. 2016). Zur Diagnosestellung wird der Sequential Organ Failure Score (SOFA-Score) herangezogen. Eine Änderung von ≥ 2 Punkten im SOFA-Score definiert das Vorliegen einer Sepsis. Im SOFA-Score werden der Horowitz-Index ($\text{P}_a\text{O}_2/\text{F}_i\text{O}_2$), Thrombozytenzahl, Bilirubinmenge, arterieller Mitteldruck, Glasgow Coma Scale (GCS) und Plasmakreatinin bzw. Diurese beachtet. Im notfallmäßigen Setting kann der quickSOFA-Score (qSOFA) verwendet werden, um Patienten schnell klinisch einzuordnen. Hierbei werden $\text{GCS} < 15$, Tachypnoe $\geq 22/\text{Min.}$ und systolischer Blutdruck $\leq 100\text{ mmHg}$ als erhöhte Risikofaktoren für einen septischen Verlauf definiert (Bracht et al. 2019; Singer et al. 2016).

SIRS ist definiert als systemisch inflammatorische Reaktion des Körpers auf einen unspezifischen Auslöser. Die SIRS-Definition spielt in der Sepsis-3-Definition von 2016 keine Rolle. SIRS-Kriterien sind für die Diagnosestellung einer Sepsis nicht bindend. Jedoch ist Kenntnis

über die SIRS-Kriterien und SIRS-Trigger zur Einschätzung von Patienten im klinischen Alltag hilfreich. Wichtig ist, dass die SIRS-Kriterien auch ohne Infektion erfüllt werden können (Bracht et al. 2019). Außerdem können Patienten mit einer Infektion eine neue Organdysfunktion aufweisen ohne mindestens zwei SIRS-Kriterien, wie in der Sepsis-1/2-Definition gefordert, zu erfüllen (Bracht et al. 2019).

Als SIRS-Trigger gelten unter anderem (Poly)Traumata, schwere Operationen, Verbrennungen, schwere Erkrankungen wie Pankreatitis, Ischämie, Hypoxie oder Lungenarterienembolie (Balk 2014).

1.1.2 Epidemiologie

Sepsis ist weltweit eine häufige und schwere Erkrankung. Maßgeblich für eine Genesung sind die frühe Erkennung und Behandlung der Sepsis mittels Antibiotika, Fokussanierung und kreislaufstabilisierenden Maßnahmen.

Die Auswertung epidemiologischer Daten gestaltet sich unterschiedlich, je nachdem welcher Sepsisdefinition man folgt (Bracht et al. 2019). Der deutschlandweiten fallpauschalenbezogenen Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) zufolge lag die Anzahl der Sepsisfälle im Jahr 2013 bei etwa 280000. Die relative Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis liegt bei 25–35 %, bei Patienten mit septischem Schock sogar bei 40–60 % (Hagel und Brunkhorst 2011), höher als bei Myokardinfarkt oder Apoplex (Seymour et al. 2012). In Krankenhäusern war die Erkrankung die dritthäufigste Todesursache (Fleischmann et al. 2015).

Die Inzidenz der Erkrankung war bei sehr jungen und sehr alten Patienten am höchsten und es konnte ein linearer Anstieg der Sterblichkeit ab einem Alter von 40 Jahren beobachtet werden (Fleischmann et al. 2016).

Die Kosten für die intensivmedizinische Behandlung sind enorm. Für einen Sepsisfall werden die Kosten auf 25000 bis 36000 Euro geschätzt, was für das Gesundheitssystem etwa 3 % der Gesamtkosten ausmacht (Fleischmann et al. 2015).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

1.1.3.1 Sepsis

Die Sepsis entsteht auf dem Boden einer Infektion durch Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten mit einer überschießenden, generalisierten Entzündungsreaktion. Das septische Geschehen besteht aus drei wesentlichen pathophysiologischen Bestandteilen: erstens der Inflammation, zweitens der septischen Koagulopathie und drittens der Störung der Endothelfunktion.

Exogene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und endogene *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) können über die Bindung an *pattern recognition receptors* (PRRs), zu denen auch die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren und der *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like-Rezeptoren gehören, eine Immunantwort hervorrufen. PRRs erkennen Strukturen wie Lipopolysaccharide (LPS), andere Endotoxine, Reste von untergegangenen Zellen oder Teile bakterieller Desoxyribonukleinsäure/*deoxyribonucleic acid* (DNA) als fremd und führen zu einer Aktivierung des angeborenen, unspezifischen Immunsystems mit Phagozytose, Komplementaktivierung und Ausschüttung von Zytokinen, Entzündungsmediatoren und Akute-Phase-Proteinen. Das Epithel des Darms trägt einen großen Teil von PRRs, auch Toll-like-Rezeptoren, jedoch führt nicht jede Bindung an diese Rezeptoren zu einer generalisierten Entzündungsreaktion. Proinflammatorische Mechanismen und antiinflammatorische Funktionen halten sich im Optimalfall die Waage. Opsonierung und Phagozytose von Erregern ist ein positiver Effekt der verstärkten Inflammation, jedoch ergeben sich für das Ausmaß der Erkrankung negative Begleiterscheinungen, wie z. B. die Funktionsstörung des Endothels mit Kapillarleck, erhöhter Durchlässigkeit und verstärkter Aktivierung der Gerinnung. Hinzu kommt eine Verminderung bzw. Verhinderung der Fibrinolyse durch Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α). Die Endothelfunktion ist insofern im Rahmen der Sepsis gestört, dass Entzündungszellen durch Endotheldefekte verstärkt in das Gewebe einwandern können, Inflammation und Gerinnung somit voranschreiten und vermehrt Flüssigkeit in die Peripherie verloren gehen kann, was zu peripheren und pulmonalen Ödemen führt. Zusätzlich kommt es zu einer Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel. Die Leukozyten haften durch die massive Ausschüttung von Interleukinen vermehrt am Endothel und schädigen dieses durch Ausschüttung von Proteasen, Oxidantien und Prostaglandinen. Insgesamt sind im septischen Krankheitsbild die zentrale und periphere Blutzirkulation gestört, was zu erheblichen Funktionseinschränkungen der Organe bis hin zum Multiorganversagen führt (Ertmer und Rehberg 2016).

1.1.3.2 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Bei kritisch kranken Patienten kann es im Rahmen von Hypoxie oder Ischämie zur Zerstörung von Geweben kommen, was zur Freisetzung zellulärer Strukturen führt. Dies aktiviert die Ausschüttung proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine und eine Immunabwehr wird initiiert. Die Entzündungsreaktion setzt sich im ganzen Körper fort, ohne dass eine Infektion (im Gegensatz zur Sepsis) vorliegt (Bone et al. 1992). Alle Organsysteme können im Verlauf beeinträchtigt und geschädigt werden.

1.2 Patientenkollektive dieser Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit wurden polytraumatisierte Patienten mit und ohne Schädel-Hirn-Trauma (SHT), Patienten mit isoliertem SHT, Patienten mit aneurysmatischer Subarachnoidalblutung oder spontanen intracerebralen intraparenchymatösen Blutungen eingeschlossen (vgl. Kap. 2.8). In diesen Kollektiven kritisch kranker Patienten kommt es im Krankheitsverlauf häufig zur Entwicklung einer Sepsis.

Bei polytraumatisierten Patienten ist eine Sepsis eine gefürchtete Begleiterkrankung. Laut TraumaRegister DGU® (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie) entwickeln etwa 6 % der polytraumatisierten Patienten eine Sepsis, bei über 20 % der Fälle führt es zu einem Multiorganversagen (Huber-Lang 2018).

Bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma wurden viszerale Minderdurchblutung und gesteigerte intestinale Permeabilität beschrieben. Ob ein kausaler Zusammenhang besteht, ist jedoch unklar (Hernandez et al. 2007). In einem experimentellen Maus-Tiermodell für SHT konnten Störungen in der intestinalen Barriere nach Induktion des SHT gezeigt werden. Dies wurde als Datengrundlage für die sogenannte *brain-gut-axis* gewertet und als möglicher Einflussfaktor für ein schlechtes Outcome der Patienten nach SHT beschrieben (Ma et al. 2017). Auch bei Ratten wurde eine erhöhte intestinale Permeabilität nach standardisierter Kopfverletzung festgestellt (YB Wang et al. 2011). Wenn Verletzungen des Gehirns eine gestörte Darmbarriere zur Folge haben, könnte dies zur Translokation von Bakterien führen. Eine Übersichtsarbeit konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen Hirnverletzungen, Darmperfusionsstörung und Darmpermeabilitätssteigerung bei Patienten mit intrakranieller Blutung aufzeigen (Hernandez et al. 2007).

Eine weitere Theorie, die den Zusammenhang zwischen Trauma und Sepsis zu erläutern versucht, ist die Two-Hit-Hypothese (Butt und Shrestha 2008; Saadia und Schein 1999). Sie versucht die Geschehnisse auf Zellebene zu erklären. Das initiale Trauma als *first hit* setzt

eine überschießende Immunantwort (SIRS) in Gang. Weitere Ereignisse wie Operationen, Hypoxie oder Schock (*second hit*) verstärken diese Immunantwort. Das Immunsystem wird durch das initiale Trauma vorbereitet und die proinflammatorischen und anti-inflammatorischen Prozesse können aus dem Gleichgewicht geraten. Eine Dysbalance in der Immunantwort fördert das Risiko für Infektionen und den Übergang in ein frühes oder spätes Multiorganversagen (Neunaber et al. 2011; Saadia und Schein 1999).

1.3 Systemische Antworten auf ein Trauma

Die systemischen Antworten auf ein Traumaereignis sind komplex. Der Körper eines Traumapatienten reagiert auf das Traumageschehen mit drei Phänomenen. Direkt nach dem Traumaereignis erfolgt die Regulation des kardiovaskulären Systems. Darauf folgt innerhalb von Stunden bis Tage nach dem Ereignis eine immunologische oder inflammatorische Kaskade, die vermutlich durch die kardiovaskulären Gegebenheiten getriggert wird und zu einem Multiorganversagen führen kann. Schließlich folgt eine Änderung in den metabolischen Prozessen, die in der längerfristigen Behandlung beachtet werden müssen. Hämorrhagie, Gewebeschaden, Schmerz und Angst haben gemeinsam Einfluss auf die pathophysiologischen Vorgänge. Wenn eine hämorrhagische Hypotension im Rahmen eines Traumas bestehen bleibt, kann sich die Blutversorgung in anderen Gebieten, unter anderem im Darm, verschlechtern (Foëx 1999).

Experimente mit Ratten, bei denen Blutungen hervorgerufen wurden, bis sich ein mittlerer arterieller Druck von 40 mmHg einstellte, zeigten Verringerungen in der Blutzufuhr von Leber, Milz, Nieren, Dünndarm und Skelettmuskulatur (P Wang et al. 1990). Vor allem die Verringerung der Durchblutung des Dünndarms lässt vermuten, dass die Mukosa der Darmschleimhaut Schaden nimmt (Haglund et al. 1975). Diese Ischämie könnte in einem Verlust der Barrierefunktion und somit der Translokation von Bakterien oder Toxinen aus dem Darm in die lymphatischen Organe oder die systemische Zirkulation münden (Foëx 1999). Aus diesem Grund wurde dem Darm schon vor einigen Dekaden eine zentrale Rolle in der Entwicklung eines Multiorganversagens nach Trauma zugesprochen (Border et al. 1987).

1.4 Bedeutung des Darms in der Sepsis

1.4.1 Gut as a Motor of Sepsis-Hypothese

Die Aussage, dass der Darm in der Pathogenese der Sepsis eine große Bedeutung hat, wurde schon bereits in den 1980er Jahren in der medizinischen Forschung postuliert. Schwere Krankheitsbilder korrelieren mit fehlregulierter Apoptose und Proliferation sowie erhöhter Permeabilität des Darmepithels. Des Weiteren findet sich ein enormer Stellenwert des Mikrobioms im Darm für Gesundheit und Krankheit.

Die Theorie „*the gut as the motor of Multiple Organ Dysfunction Syndrome*“ (MODS) (Mittal und Coopersmith 2014) beschreibt die Dysbalance zwischen Darmepithel, Immunsystem und Mikrobiom des Darms als Ursache bzw. beeinflussenden Faktor für die Entwicklung von systemischen Entzündungs- und Krankheitsgeschehen.

Gesteigerte Apoptose des Darmepithels kann einen negativen Effekt auf das Outcome einer Sepsis haben. Tumorerkrankungen, chronischer Alkoholkonsum oder höheres Alter steigern die Apoptose der epithelialen Zellen im septischen Geschehen und mindern das Überleben. Die Behandlung eines septischen Patienten zusätzlich darauf auszurichten, die Unversehrtheit des Darms zu fördern, könnte eine hilfreiche Strategie darstellen.

Das Mikrobiom des Darms besteht beim Erwachsenen aus ca. 100 Billionen Keimen, hauptsächlich Bakterien, deren Zusammensetzung sich im Laufe des Lebens ändert. Die Aufgabe dieser Keime ist vielfältig und reicht von Nährstoffverdauung und Vitaminversorgung über Schleimhautproliferation bis hin zu einer Kommunikation zwischen Gehirn und Darm. Kommt es dazu, dass Art und Virulenz des intestinalen Mikrobioms sich in Richtung krankheitserregend ändern, also die eigentliche symbiotische Lebensweise von Keimen im Darm mit dem Menschen gestört ist, kann auch das Mikrobiom ein Faktor für systemische Inflammation sein.

Die Theorie „*gut as a motor of sepsis*“ ist eine Kombination aus Effekten, die zum septischen Krankheitsbild führen oder dies vorantreiben. Zerstörung der Mukosaschicht, als ersten Abwehrpunkt gegenüber Mikroorganismen, Veränderungen im Mikrobiom, gestörte Proliferation und Apoptose des Epithels und Translokation von Bakterien können als „Motor einer Sepsis“ fungieren (Mittal und Coopersmith 2014).

1.4.2 *Three hit model*

Anhand des “*three hit models*” (Deitch 2002) wird die Bedeutung des Darms im Sepsisgeschehen veranschaulicht. Als *first hit* gilt das Trauma, welches zu einer intestinalen Minderdurchblutung führt, wodurch proinflammatorische Stoffe aus dem Darm freigesetzt werden. Die Reperfusion als *second hit* führt zu einer Verletzung der Darmschleimhaut (Ischämie-Reperfusion-Verletzung), was die Barrierefunktion des Darms einschränkt. Bakterien oder Endotoxine können in die mesenterialen Lymphknoten übertreten und eine generalisierte Immunantwort folgt als *third hit*. Ein Übergang in ein SIRS oder MODS ist möglich (Deitch 2002).

1.4.3 Systemisch bakterielle Translokation und Gut-Lymph-Hypothese

Die bakterielle Translokation wurde bereits 1979 von Berg und Garlington beschrieben (Berg und Garlington 1979). Der Weg der Bakterien über das Epithel in die Lamina Propria und schließlich in die mesenterialen Lymphknoten oder andere Organe galt als wahrscheinlich.

Diese Theorie wurde erweitert, sodass nicht nur Bakterien, sondern auch deren pathogene Bestandteile (PAMPs) translozieren (Assimakopoulos et al. 2018; Lamprecht und Heininger 2012) und Folgen hervorrufen können.

Es gibt aktuell zwei Theorien, welchen Weg die Bakterien oder deren Bestandteile nehmen.

Erstens die systemische bakterielle Translokation. Ihr zufolge können Bakterien oder deren Bestandteile ursächlich auf dem Boden einer gestörten intestinalen Barriere in das portalvenöse System übertreten und so in den systemischen Kreislauf gelangen. Folge sind SIRS oder MODS. Diese Theorie kann durch klinische Daten nicht untermauert werden (Assimakopoulos et al. 2018).

Zweitens gibt es die Gut-Lymph-Hypothese. Diese Theorie gilt heute als wahrscheinlicher, da sie experimentell bewiesen werden konnte (Deitch et al. 2006). Demnach gelangen *gut-derived danger-associated molecular patterns* (DAMPs) wegen einer intestinalen Barrierefunktionsstörung in die mesenterialen Lymphknoten und über den *Ductus thoracicus* zur Lunge mit Ausbildung eines akuten Lungenversagens (Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)). Über die *Vena subclavia* (*V. subclavia*) können die DAMPs in den systemischen Kreislauf gelangen und zu SIRS oder MODS nach vorangegangenen Trauma oder Schock führen. Der Magen-Darm-Trakt funktioniert als proinflammatorisches Organ mit den oben beschriebenen Folgen (Assimakopoulos et al. 2018).

1.4.4 Bakterielle Translokation als normales Phänomen und *oral tolerance*

Die Annahme, dass Bakterien aus dem Darm in den systemischen Kreislauf übertreten können und so ein septisches Krankheitsgeschehen hervorrufen oder vorantreiben, sollte unter anderem wegen der Theorie, dass bakterielle Translokation auch ein normales Phänomen darstellt (Gatt et al. 2006), kritisch betrachtet werden. Als sogenannte „*oral tolerance*“ (Garside et al. 2004; Song und Whitacre 2001; Spahn und Kucharzik 2004) bekannt, kommt der Gastrointestinaltrakt (GIT) durch normal stattfindende bakterielle Translokationen mit unterschiedlichen Antigenen in Kontakt und es kann sich ein „passendes“ intestinales Immunsystem etablieren. Möglich ist, dass septische Komplikationen nur auftreten, wenn die Immunabwehr des Patienten überfordert oder fehlerhaft ist. Die bakterielle Translokation steht nicht unbedingt ursächlich im Vordergrund (Gatt et al. 2006).

1.5 Die intestinale epitheliale Barriere

Die intestinale epitheliale Barriere ist ein wesentlicher Bestandteil einer gesunden Abwehr gegenüber fremden Substanzen (Derikx et al. 2010). Sie besteht aus drei Hauptteilen (Assimakopoulos et al. 2007). Erstens dem Mikrobiom, welches eine metabolische, immunologische und schützende Funktion einnimmt. Zweitens der Immunbarriere, bestehend aus dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe, T-Zellen, antikörperproduzierenden Plasmazellen, Lymphoidzellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Drittens der mechanischen Barriere. Dazu gehören vor allem die *tight junctions*, die die Epithelzellen zusammenhalten, Interaktionen ermöglichen und nur bestimmte Stoffe passieren lassen (Assimakopoulos et al. 2018). *Tight junctions* bestehen aus vielen Proteinen, u. a. Occludin und Varianten des Claudin (Derikx et al. 2010).

1.6 Gestörte intestinale epitheliale Barriere

1.6.1 Nachweis von Claudin 3 und iFABP

Eine gestörte intestinale epitheliale Barriere lässt sich beispielsweise durch die Claudin 3-Konzentration oder die Intestinal Fatty Acid Binding Protein (iFABP)-Konzentration im Urin nachweisen. Claudin 3 ist ein Bestandteil der *tight junctions*. Eine erhöhte Konzentration von Claudin 3 im Blut oder im Urin gibt einen Hinweis auf eine erhöhte Durchlässigkeit zwischen den Epithelzellen durch defekte *tight junctions* (Derikx et al. 2008).

Die *fatty acid-binding proteins* (FABPs) gehören zu der Gruppe der zytoplasmatischen Proteine, die langkettige Fettsäuren binden können. FABPs liegen intrazellulär und gehören sehr spezifisch zu einem bestimmten Gewebe, in dessen Zellen sie den Transport und die Verdauung der Fettsäuren beeinflussen. Durch ihre geringe Größe treten sie bei einem Zellschaden schnell in das Blut über. Das spezifische intestinale FABP befindet sich nur in Epithelzellen des Jejunums und kann nach deren Schädigung im Urin gemessen werden.

1.6.2 Bakterielle Translokation als Hinweis für eine gestörte intestinale epitheliale Barriere und Besonderheiten des methodischen Nachweises

Der Nachweis bakterieller Translokation gilt als direktes Maß für die intestinale Barrierefunktion und ist somit Ausdruck gestörter gastrointestinaler Funktion (Gatt et al. 2006). Allerdings ist der Nachweis der bakteriellen Translokation problematisch. Die molekularen Nachweismethoden stellen eine Herausforderung dar und die Detektion von translozierten Darmkeimen mittels *polymerasechainreaction* (PCR) ist bislang keine klinische Routine (Gatt et al. 2006). Fragen bezüglich Verfügbarkeit, Methodik, Kosten und Anwendbarkeit sind bisher ungeklärt (Hagel und Brunkhorst 2011). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *real-time* PCR angewandt, um DNA der Spezies *Enterococcus sp.* im Blut kritisch kranker Patienten zu finden. Bereits im Tiermodell (Küçükaydin et al. 2000) und in entnommenen Lymphknoten chirurgischer Patienten (Mizuno et al. 2010) zeigte sich der Nachweis bakterieller DNA mittels PCR als sensitiver. Bei Patienten nach Ösophagektomie und hepatischer Lobektomie sowie bei septischen Patienten, deren Blutkulturen positiv waren, ließ sich bakterielle DNA mittels PCR nachweisen (Ono et al. 2005). Diskutiert wurde hier jedoch, inwieweit die geringen Mengen nachgewiesener bakterieller DNA Einfluss auf das Krankheitsbild des Patienten hatten. Die Durchführung einer PCR sei ein sehr sensitives Verfahren, um bakterielle Translokation nachzuweisen, jedoch sei diese Translokation nur mutmaßlich verantwortlich für den Ausbruch und Verlauf der Sepsis. Der Nachweis mittels PCR bei unklarem Infektfokus sei sinnvoll (Ono et al. 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode der *real-time* PCR aus Patientenblut stellt daher einen innovativen Ansatz zur Quantifizierung von bakterieller Translokation in ausgesuchten Patientenkollektiven kritisch Kranker dar.

1.7 Prädisponierende Faktoren für eine bakterielle Translokation

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die als prädisponierend für das Stattfinden einer bakteriellen Translokation aus dem Gastrointestinaltrakt in die Blutbahn gelten.

Eine Obstruktion des Darms kann die Wahrscheinlichkeit für eine bakterielle Translokation aus dem GIT erhöhen (Deitch 1989; Sedman et al. 1994). Bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten von Patienten mit intestinaler Obstruktion konnte zu größerer Anzahl nachgewiesen werden als bei Patienten ohne intestinale Obstruktion (Sagar et al. 1995). Sagar et al. (1995) äußern zudem die Vermutung, dass die bakterielle Translokation bei Patienten mit intestinaler Obstruktion mit einem verstärkten septischen Verlauf assoziiert sei. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich bei 59 % der Patienten mit intestinaler Obstruktion (10 von 17 Patienten) das Vorkommen von translozierten Bakterien, vor allem *E. coli*, in den mesenterialen Lymphknoten (Deitch 1989). Der im Tierversuch dargestellte Verschluss der Magen-Darm-Passage zeigte den Beginn der Zerstörung der Darmmukosa nach vier Stunden. Die aeroben Blutkulturen waren positiv mit dem Nachweis von *E. coli*, was auf eine gestörte epitheliale Barriere hinwies (Kabaroudis et al. 2003). Ist die Darm-passage durch einen Verschluss partiell oder ganz behindert, nimmt die Darmmukosa Schaden und intestinale Bakterien können translozieren. Auch eine chronisch entzündliche Darmerkrankung wirkt sich prädisponierend auf eine bakterielle Translokation aus (Ambrose et al. 1984; Sedman et al. 1994).

Des Weiteren haben In-vitro-Experimente und Tierversuche gezeigt, dass akute Pankreatitiden zu bakterieller Translokation aus dem Darm führen können (Deitch et al. 1990; Karsten et al. 1998). Gallenflüssigkeit und Gallensalze gelten als protektiv gegenüber bakterieller Translokation (Ogata et al. 2003). Totale parenterale Ernährung wirkt sich negativ auf die Darmbarriere aus, da der Magen-Darm-Trakt nicht ausreichend durch orale Nahrung zur Aktivität angehalten wird (Wildhaber et al. 2005). Notfallmäßige Operationen (Sistino und Acsell 1999) und intraoperative Minderperfusion des Splanchnikusgebietes (Holland et al. 2005) erhöhen das Risiko für eine intestinale Barrierestörung mit daraus resultierender bakterieller Translokation. Der im Tiermodell nachgestellte hypovolämische Schockzustand war mit einer erhöhten bakteriellen Translokation assoziiert (Schlag et al. 1994).

1.8 Bedeutung der bakteriellen Translokation bei kritisch kranken Patienten

Einen Teil dieser Arbeit stellt die mikrobiologische Diagnostik und Detektion von Darmkeimen, im vorliegenden Fall der Spezies *Enterococcus sp.* dar. Die Funktion des Darms beeinflusst entscheidend die Genesung kritisch kranker Patienten (Rombeau und Takala 1997). Im intensivmedizinischen Setting treten gastrointestinale Funktionsstörungen häufig und in unterschiedlichster Weise auf (Mutlu et al. 2001).

Die Analyse von Studien aus den Jahren 1966 bis 2006 von Gatt et al. (2006) zeigte unter anderem die methodischen Probleme des Nachweises bakterieller Translokation, prädisponierende Faktoren für bakterielle Translokation und Maßnahmen zur Verhinderung bzw. Verringerung bakterieller Translokation und ihrer Folgen.

Im Verlauf der letzten 40 Jahre gab es laut Gatt et al. (2006) vor allem klinische Studien, Tierversuche oder In-vitro-Modelle der Evidenzlevel zwei bis vier. Ergebnisse auf dem Evidenzlevel 1 aus randomisierten kontrollierten Studien fehlten. Dies zeigt, dass das Thema der bakteriellen Translokation und deren Folgen für die Patienten seit Jahrzehnten behandelt wird, aber Ergebnisse uneinheitlich sind und es weiterer Forschung bedarf.

Bakterielle Translokation ist auch als Phänomen bei Gesunden bekannt (Sedman et al. 1994). Erst wenn das Immunsystem nicht mehr intakt ist und die intestinale Barriere gestört ist, kann es zu einem Anstieg pathogener Keime und einer vermehrten bakteriellen Translokation aus dem Darm kommen (Berg et al. 1988). Der Darm als proinflammatorisches Organ führt womöglich zu einem Voranschreiten oder einer Aufrechterhaltung eines SIRS, einer Sepsis bis hin zum Multiorganversagen.

Im Rahmen dieser Arbeit und mit Rücksicht auf die Einschlusskriterien der Studie (vgl. Kap. 2.8) sind vor allem der Verlauf der Erkrankung und die möglichen Folgen durch bakterielle Translokation, wie prolongierter Krankheitsverlauf, Entwicklung einer Sepsis und eines Multiorganversagens von großer Bedeutung.

In vorangegangenen Studien konnte die bakterielle Translokation vor allem durch die Entnahme und Untersuchung von mesenterialen Lymphknoten bei chirurgischen Patienten nachgewiesen werden (Deitch 1989; MacFie et al. 2006; O'Boyle et al. 1998; Sedman et al. 1994). Kritisch kranke Patienten ohne Operation stellen eine andere Patientengruppe dar, bei der die Forschung bisweilen unvollständig ist.

Großes Interesse gilt dabei unter anderem der intestinalen Permeabilitätserhöhung. Bei kritisch kranken Patienten sind die Auswirkungen der intensivmedizinischen Versorgung, vor allem der Beatmungstherapie oder der Gabe kreislaufstabilisierender Medikamente auf die gastrointestinale Barrierefunktion unklar (Gatt et al. 2006).

Die Permeabilität des Darms ist bei Patienten auf der Intensivstation signifikant erhöht und steht in engem Zusammenhang mit dem Krankheitsbild SIRS, einer Sepsis oder einem Multiorganversagen (Doig et al. 1998; Herbert und Holzer 2008). Einen weiteren Hinweis darauf gibt das Ergebnis einer Studie von De-Souza und Greene (2005). Hier sank die Anzahl eines schlechten Outcomes in Form von SIRS, Sepsis und Multiorganversagen durch die

Therapie und Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion mittels Glutamingabe (De-Souza und Greene 2005). Ist der Darm bei kritisch kranken Patienten gestört, mündet dies in einem Verlust der intestinalen Barriere mit einem Einstieg in einen *Circulus vitiosus*. Mikrozirkulationsstörungen führen zu einer Minderdurchblutung des Darms, Ischämie und Reperfusion während der intensivmedizinischen Behandlung schädigen die Zellen, Nährstoffmangel und oxidativer Stress erhöhen die Apoptoserate der Enterozyten und zerstören die *tight junctions*. Enterobakterien und Endotoxine gelangen über eine gestörte intestinale Barriere mit dem intestinalen Immunsystem (GALT = darmassoziiertes lymphatisches Gewebe) in Kontakt. Die proinflammatorische Antwort verschlechtert die intestinale Barrierefunktion (erster *Circulus vitiosus*). Durch die zerstörte Mukosa können DAMPs in die mesenterialen Lymphknoten und über die Lunge in den systemischen Kreislauf gelangen und die überschießende Immunantwort (SIRS) aktivieren. Ein Übergang in ein MODS ist möglich. Die systemische Immunantwort steigert sich und hat wiederum negative Einflüsse auf die intestinale Barriere (zweiter *Circulus vitiosus*) (Assimakopoulos et al. 2018).

Es lässt sich vermuten, dass eine Verbesserung der intestinalen Barriere somit eine bakterielle Translokation und dessen mögliche Folgen verhindern kann.

Eine der größten retrospektiven Studien zum Thema bakterielle Translokation wurde über 13 Jahre mit 927 Patienten, die elektiven oder notfallmäßigen bauchchirurgischen Eingriffen unterzogen wurden, durchgeführt (MacFie et al. 2006). Im Rahmen der Studie wurde bei 130 von 927 Patienten (entspricht 14 %) eine bakterielle Translokation mittels der Entnahme von mesenterialen Lymphknoten und der kulturellen Anzüchtung der Bakterien nachgewiesen. Eine postoperative Sepsis war in der Patientengruppe mit bakterieller Translokation häufiger festzustellen als in der Gruppe ohne bakterielle Translokation. Als unabhängige Variablen, die eine bakterielle Translokation wahrscheinlicher machten, wurden Notfall-OP und totale parenterale Ernährung präoperativ definiert. Kritisch zu diskutieren ist hierbei allerdings, dass die Methode der mesenterialen Lymphknotenentnahme limitiert ist. Die Entnahme von Lymphknoten beim Menschen ist aus ethischen und technischen Gründen limitiert (MacFie et al. 2006). Bei Tierversuchen können deutlich mehr Lymphknoten entnommen werden. Dies wiederum kann zu einer Diskrepanz zwischen der Anzahl gefundener bakterieller Translokation aus einer Studie mit Menschen von etwa 10–15 % (MacFie et al. 2006; O'Boyle et al. 1998; Sedman et al. 1994) und den Ergebnissen aus Tiermodellen mit mehr als 90 % (Bai et al. 1996; Hua und Moochhala 2000; Reynolds et al. 1996) führen (Gatt et al. 2006).

Außerdem lässt sich nicht abschließend klären, inwieweit man das Tiermodell auf den Menschen übertragen kann. Eine andere Studie fand bei Patienten nach Leberresektion postoperativ bakteriell positive Lymphknoten und in Korrelation dazu einen häufiger auftretenden septischen postoperativen Verlauf (Mizuno et al. 2010). Der Nachweis bakterieller Translokation in mesenterialen Lymphknoten war bei chirurgischen Patienten mehrfach erfolgreich. Mittels Blutkulturen aus portalvenösem Blut jedoch konnten Bakterien oder Endotoxine bei chirurgischen Patienten nicht nachgewiesen werden (Moore et al. 1991).

Der Weg der bakteriellen Translokation über die mesenterialen Lymphknoten bei Traumapatienten konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Peitzman et al. 1991). Peitzmann et al. (1991) beschreiben, dass die Daten darauf schließen lassen, dass die bakterielle Translokation in die mesenterialen Lymphknoten keine Rolle bei akuten Traumata spielen. Insgesamt sind die Daten zur bakteriellen Translokation bei kritisch kranken Patienten nicht eindeutig und verlangen weitere wissenschaftliche Untersuchungen.

1.9 Spezies *Enterococcus* sp.

Die Gattung *Enterococcus* kennt mehr als 48 Spezies (Euzéby 1997), von denen vor allem *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) für den Menschen von medizinischer Bedeutung sind. Bei den Enterokokken handelt es sich um fakultativ anaerobe, Katalase-negative, grampositive Kokken (Fachausschuss_Antibiotika-Therapie 2014; Moellering 1992). Superinfektionen mit *E. faecalis* oder *E. faecium* bei Patienten unter Breitbandantibiotikatherapie gewinnen heutzutage immer mehr an Bedeutung. Seit den 1980er Jahren ist der Einsatz von Vancomycin als Antibiotikum zugelassen und etabliert. Neben des Einsatzes von Antibiotika in der Humanmedizin üben in der Tierzucht eingesetzte Antibiotika, wie seit den 1980er Jahren das Glykopeptid Avoparcin, einen Selektionsdruck zugunsten bestimmter Keime aus. Enterokokken sind Bestandteil der Flora im Dün- und Dickdarm und helfen durch Ansäuerung des Milieus unter Bildung von kurzkettigen Fettsäuren bei der Kohlenhydratverdauung (Beckmann und Ruffer 2000).

1.9.1 *E. faecalis* und *E. faecium*

Die beiden medizinisch relevanten Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* können im Verdauungstrakt nachgewiesen werden. *E. faecalis* ist dabei deutlich häufiger zu isolieren. Sowohl bei Menschen als auch bei anderen Tieren sind sie Teil der Darmflora (Vankerckhoven et al. 2004). *E. faecalis* und *E. faecium* können pathogen wirken, d.h. es ergibt sich entweder eine endogene oder nosokomiale Infektion. Der Keim kann sich zusätzlich opportunistisch auf

ein bereits geschwächtes und anderweitig infiziertes Individuum setzen. Bei immungeschwächten Patienten, die erleichterte Eintrittswege für *E. faecalis* bieten z. B. bei traumatischen Darmverletzungen, abdominell chirurgischen Eingriffen oder Dauerkathetern in der Harnröhre sind Infektionen wahrscheinlicher. Dramatische Erkrankungen, die sich aus solch einer Infektion ergeben, sind Peritonitiden, Endokarditiden oder generalisierte septische Geschehen (Bundesinstitut_für_Risikobewertung 2002). Es gibt einige Virulenzfaktoren, die für Enterokokken beschrieben sind. Zu ihnen gehören unter anderem Cytolysin, *aggregation substance* (Adhäsín), *enterococcal endocarditis antigen* (Adhäsín), *enterococcal surface protein* (Adhäsín), *adhesin to collagen* (Adhäsín), Gelatinase, Gelatinase-Regulatoren, Hyaluronidase und eine Kapsel (Vankerckhoven et al. 2004; Zentrale_Kommission_für_die_Biologische_Sicherheit 2004). Das *enterococcal surface protein*, kodiert durch *esp*, steht mit erhöhter Virulenz, Befall und Persistenz im Harntrakt sowie der Bildung von Biofilmen in Verbindung (Vankerckhoven et al. 2004). Multiples Vorkommen von Virulenzgenen tritt eher bei *E. faecalis* auf, wie es in einigen Studien beobachtet werden konnte (Dupré et al. 2003; Toledo-Arana et al. 2001).

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

Mittels spezifischer *real-time* PCR wurden Blutproben von Patienten auf das Vorliegen von bakterieller DNA, im hier vorliegenden Fall Enterococcus-DNA, untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Marker der epithelialen Permeabilitätserhöhung (iFABP und Claudin 3), den Marker der gesteigerten Monozytenaktivität *soluble* CD14 (sCD14), das Ausmaß der systemischen Inflammation (als Marker gelten Procalcitonin (PCT), Leukozyten und das C-reaktive Protein (CRP)) und die Schwere des Krankheitsverlaufs (betrachtet werden SOFA-Score, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Versterben auf der Intensivstation und 28-Tage- und 90-Tage-Letalität) in Korrelation mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation der Spezies *Enterococcus sp.* zu bringen. Die Hypothese, dass eine bakterielle Translokation ein höheres Ausmaß an systemischer Inflammation und einen schwereren Krankheitsverlauf hervorruft oder aufrechterhält als keine bakterielle Translokation in der Vergleichsgruppe, war zu überprüfen.

Ein Zusammenhang zwischen bakterieller Translokation und dem Schweregrad der Erkrankung der in die Studie eingeschlossenen (Trauma)Patienten würde eine weitere Option für Prävention und Therapie nahelegen.

2 Material und Methoden

2.1 Angabe der Mengenverhältnisse

Die Angabe der Mengenverhältnisse der Verdünnungsreihen der genomischen DNA von *E. faecalis* und daraus verwendeten Positivkontrollen für den Verlauf der Arbeit beziehen sich auf ein Volumen von 10 µl. Zur Erleichterung der Lesbarkeit wird im Folgenden auf die Konzentrationsangabe pro 10 µl verzichtet.

2.2 Geräte

Nachfolgend sind die verwendeten Geräte zur Veranschaulichung gelistet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
MagNA Pure LC 2.0	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
NanoDrop 2000c	Firma VWR, Darmstadt, Deutschland (früher Peqlab)
Gradienten-PCR Professional Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
LightCycler® 1.0	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler® 480	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
Gelelektrophorese (<i>electrophoresis power supply</i> EPS 500/400 und Elektrophorese System)	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden und VWR (früher Peqlab), Darmstadt, Deutschland
Bio-Rad Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kleinschüttler Vortex Genie 2™	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroliterpipetten (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Biosphere® <i>filter tips</i> (100–1000 µl, 2–100 µl, 0,1–20 µl)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
LightCycler® 480 <i>multiwell plate</i> 96, <i>white</i>	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler® 480 <i>sealing foil</i>	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
Laborfolie Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Verschlussröhrchen (1000 µl, 500 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Aufreinigungspipettenspitzen	Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland
Schraubverschlussröhrchen	Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland
Urin-Monovetten® á 8,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Aufziehkanüle BD Microlance™ 3 Sonderkanüle 18G	BD & Co, Heidelberg, Deutschland
S-Monovette® Lithium-Heparin-Gel á 4,7 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® K3 Ethylendiamintetraacetat (EDTA) á 2,7 ml und 7,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kühlzentrifuge Heraeus Labofuge 400R	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Aliquote, jeweils 2 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.3 Enterococcus faecalis-DNA

Genomische Bakterien-DNA von *E. faecalis* aus Anzucht auf einer Agar-Platte im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen.

2.4 Kits

DNA-Aufarbeitung: MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (darin enthalten: *wash buffer* I–III, *lysis/ binding buffer*, Proteinase K, *magnetic glass particles* (MGPs) *suspension* und *elution buffer*), Firma Roche, Mannheim, Deutschland.

Real-time PCR: SYBR Green Mix, Firma Roche, Mannheim, Deutschland.

2.5 Primer

Die Sequenzen für die PCR-Primer-Paare wurden aus der Literatur (Rinttilä et al. 2004) ausgewählt und bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bestellt. Vor Verwendung wurden sie mit destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst, daraufhin 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und zu je einer Menge von 100 μl aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren.

Folgende Primer wurden für die *real-time* PCR verwendet:

Forward-Primer (F): 5'CCCTTATTTGTTAGTTGCCATCATT3'

Reverse-Primer (R): 5'ACTCGTTGTACTTCCCATTTGT3'

Die eingesetzten PCR-Primer amplifizieren einen definierten Bereich innerhalb des 16S rRNA-Gens (ribosomale Ribonukleinsäure/*ribonucleic acid* (rRNA)) von *E. faecalis*. Pro PCR-Ansatz wurde eine Primer-Menge von 12,5 pmol eingesetzt.

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien und Reagenzien zur Veranschaulichung gelistet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
HeLa-Zellen-DNA (Epithelzellen von Henrietta Lacks)	zur Verfügung gestellt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
Thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i> (Taq-Polymerase)	Firma Roche, Mannheim, Deutschland

Substanz	Bezugsquelle
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Firma Roche, Mannheim, Deutschland
TAE-Puffer bestehend aus (50fache <i>stock solution</i>):	zur Verfügung gestellt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland
245 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Base	Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
57,1 ml Essigsäure	Mikrobiologie Göttingen, Deutschland
100 ml einer 500 molaren EDTA-Lösung	Mikrobiologie Göttingen, Deutschland
ad 1 l mit H ₂ O dest.	Mikrobiologie Göttingen, Deutschland
Gel-Red®	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
Agarose	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
100bp DNA-Ladder	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Diffinity RapidTip System	Sigma Aldrich, Missouri, USA

2.7 Ethikantrag

Der Ethikantrag der Studie „Bakterielle Translokation beim kritisch kranken Patienten“ wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität Göttingen bewilligt (Antragsnummer 6/12/15).

2.8 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Zu den Einschlusskriterien der Studie gehören Polytrauma (Injury Severity Score > 16) ohne Schädel-Hirn-Trauma, Polytrauma mit Schädel-Hirn-Trauma, isoliertes Schädel-Hirn-Trauma, aneurysmatische Subarachnoidalblutung und spontane intracerebrale intraparenchymatöse Blutung. Mindestens eine der fünf genannten Diagnosen muss zutreffen. Die Patienten wurden somit in fünf Kohorten eingeteilt, die im Verlauf der Studie ausgewertet wurden.

Die Auswahl der Patienten wurde auf den anästhesiologischen Intensivstationen 0117 und 0118 der Universitätsmedizin Göttingen täglich durchgeführt, wenn mindestens eine der

oben genannten Einschlusskriterien zutraf und keine Ausschlusskriterien (Tabelle 3) erfüllt wurden.

Tabelle 3: Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien
Fehlende Einwilligung des Patienten oder des Betreuers zur Studienteilnahme
Alter unter 18 Jahren
Schwangerschaft und Stillzeit
Hospitalisierung über 72 Std.
Krankenhauswiederaufnahme im Zeitraum von ≤ 4 Wochen wegen desselben Krankheitsbildes
Chronische Darmerkrankung
Stattgehabte Darmoperation in den letzten zwei Monaten
Vorbestehende schwere Infektion, z. B. HIV, Hepatitis B oder C
Behandlung mit Immunsuppressiva und antiinflammatorischen Medikamenten (z. B. Glukokortikoiden)
Hämatologische Grunderkrankung
Hämoglobin-Wert unter 6 g/dl
Chemotherapie innerhalb der letzten sechs Monate
Bekannter Myokardinfarkt oder Verdacht auf Myokardinfarkt innerhalb der letzten sechs Wochen
Herzinsuffizienz mit New York Heart Association (NYHA)-Klassifikation III oder IV
Stattgehabte Eingriffe mit Herzlungenmaschine und anderen extrakorporalen Verfahren in den letzten sechs Monaten
Vorhandensein einer extrakorporalen Zirkulation (z. B. extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO), Dialyse)
Schwere floride endogene Psychose, auch bei bestehender Betreuung
Gleichzeitige Teilnahme an einer Arzneimittel-Studie (z. B. SCIENS) oder interventionellen Studie, die in die Inflamationsreaktion eingreift (z. B. Cytosorb-Studie)
Unmittelbar bevorstehendes Lebensende aufgrund einer unheilbaren Erkrankung

2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm Statistica (StatSoft) und SPSS (IBM) verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit kleiner 5 % angenommen ($p \leq 0,05$).

Es wurden Zwischengruppenvergleiche („bakterielle Translokation“ vs. „keine bakterielle Translokation“) mit wiederholten Messungen an den unterschiedlichen Visitentagen d0, d1, d2, d3, d5, d7, d10 und d14 für die Parameter iFABP (Abbildung 9), Claudin 3 (Abbildung 10), sCD14 (Abbildung 11), PCT (Abbildung 12), Leukozyten (Abbildung 13), CRP (Abbildung 14) und SOFA-Score (Abbildung 15) mittels des Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks Tests durchgeführt. Im Rahmen der Korrektur für multiple Vergleiche folgte die Anwendung des Tukey-Tests, wenn es Unterschiede zwischen den Medianen gab.

Die Ergebnisse für die Parameter SIRS (Abbildung 16), Sepsis (Abbildung 17), schwere Sepsis (Abbildung 18), septischer Schock (Abbildung 19), Versterben auf der Intensivstation (Abbildung 20), 28-Tage-Letalität (Abbildung 21) und 90-Tage-Letalität (Abbildung 22) in den Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ wurden mittels Z-Test statistisch getestet.

2.10 Materialgewinnung

Zur Probengewinnung wurden Gefäßzugänge genutzt, wenn möglich ein arterieller Zugang der *Arteria radialis* (*A. radialis*) und/oder der *A. femoralis*. Ansonsten wurde bei Unmöglichkeit der arteriellen Blutabnahme, venöses Blut aus einem zentralvenösen Katheter oder aus einem peripheren venösen Zugang abgenommen.

Die Urinproben in Urin-Monovetten® wurden mithilfe einer Aufziehkanüle aus der Abnahmemembran bereits liegender Blasenkatheter gewonnen. Um den Urin steril zu gewinnen, wurde der Urin nicht aus dem Urinbeutel entnommen.

Entnommen wurde das Blut zu acht verschiedenen Abnahmezeitpunkten: d0 = sofort bei Aufnahme des Patienten, variable Uhrzeit, d1 = 24 Std. nach Aufnahme, d2 = am zweiten Tag nach Aufnahme, d3 = am dritten Tag nach Aufnahme, d5 = am fünften Tag nach Aufnahme, d7 = am siebten Tag nach Aufnahme, d10 = am zehnten Tag nach Aufnahme, d14 = am 14. Tag nach Aufnahme, jeweils um acht Uhr morgens.

Es wurden eine S-Monovette® Lithium-Heparin-Gel á 4,7 ml und zwei S-Monovetten® K3 EDTA (á 2,7 ml und 7,5 ml) verwendet.

Die 2,7 ml EDTA S-Monovette® wurde sofort anonym mit einer Identifizierungsnummer bei - 20 °C eingefroren und anschließend im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen untersucht.

Die anderen Proben wurden im Kühlschrank gekühlt und für 15 Min. bei 4–8 °C bei 2500 g = 4500 U/Min. in einer Kühltzentrifuge zentrifugiert. Aus den zentrifugierten Lithium-Heparin-Gel und EDTA S-Monovetten® wurde jeweils Plasma für drei Aliquote (jeweils 2 ml) mit einer Transferpipette abpipettiert. Aus den beiden Urin-Monovetten® wurde jeweils zentrifugierter Urin für zwei Aliquote gewonnen. Die Aliquote wurden direkt bei - 20 °C zwischengelagert, um dann bei genügender Anzahl an Proben bei - 80 °C eingefroren zu werden. Diese Proben wurden in der Klinischen Chemie auf iFABP (Urin), Claudin 3 (Urin) und sCD14 (Blut) untersucht.

Wenn die Indikation für einen Gefäßzugang nicht mehr gegeben war oder der Patient innerhalb der 14 Tage entlassen wurde, entfielen weitere Probenabnahmen. Sollte eine Probenabnahme nicht funktioniert haben, wurde dies vermerkt und die Abfolge der Abnahme am nächsten Tag fortgeführt. Bereits gewonnene Proben wurden verworfen und von der Studie ausgeschlossen, wenn der Patient oder der Betreuer der Studienteilnahme nicht zustimmten.

2.11 DNA-Isolierung aus Patientenblut

Die DNA-Isolierungen aus den Blutproben erfolgte mit dem MagNA Pure LC 2.0. Hiermit konnten maximal 32 Proben parallel bearbeitet werden. Die Bedienung des Gerätes einschließlich der Beladung mit den zur DNA-Extraktion benötigten Lösungen erfolgte nach Vorgabe des Herstellers Firma Roche, Mannheim, Deutschland. Das eingesetzte Probenvolumen betrug je 200 µl, die Elution der isolierten DNA erfolgte in einem Volumen von jeweils 100 µl. Eine Aufarbeitungskontrolle in Form von destilliertem Wasser zur Detektion möglicher Kontaminationen wurde bei jeder Isolierung mitgeführt.

2.12 DNA-Isolierung von *Enterococcus faecalis*

Die Aufarbeitung von genomischer Bakterien-DNA von *E. faecalis* wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer und Materialien durchgeführt. Nach Anzucht des Bakterienstammes auf einer Agar-Platte für 24 Std. bei 37 °C wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer Impföse abgenommen und in einem mit 180 µl ATL-Suspensionspuffer gefüllten Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Dem Bakterien-Puffer-Gemisch wurden 20 µl Proteinase K zugegeben und das Gemisch wurde anschließend für 2 Std. bei 56 °C und

1100 U/Min. inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl AL-Lysispuffer und eine weitere Inkubation für 10 Min. bei 70 °C. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Bakterienlysat auf eine Affinitätssäule überführt und diese 1 Min. bei 8000 U/Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule zur Entfernung verbliebener löslicher Proteine zunächst mit 500 µl Waschpuffer AW1 und anschließend mit 500 µl Waschpuffer AW2 versetzt. Abschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 100 µl Elutionspuffer AE befüllt und 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der letzte Schritt der Aufarbeitung war die 1-minütige Zentrifugation bei 8000 U/Min. Schließlich wurde die aufgearbeitete Bakterien-DNA bei - 20 °C gelagert.

2.13 Quantifizierung genomischer DNA

Die Konzentration der isolierten Bakterien-DNA wurde im NanoDrop 2000c gemessen. Die Bedienung des Gerätes erfolgte nach Herstellerangaben (früher Firma Peqlab, Erlangen, Deutschland; heute Firma VWR, Darmstadt, Deutschland).

2.14 Verdünnung genomischer DNA von *Enterococcus faecalis*

Um die Sensitivität der PCR-Analysen belegen zu können, wurden definierte Mengen genomischer DNA von *E. faecalis* eingesetzt. Hierbei gilt, dass ein Genom des Erregers ein Gewicht von ca. 3,2 fg besitzt. Eine DNA-Stammlösung von 96,0 ng/µl wurde bis zu einer Konzentration von 32 fg/10µl verdünnt. Erster Schritt war die 1:3-Verdünnung (mit destilliertem Wasser) der Ausgangslösung zu einer Konzentration von 32 ng/µl. Es folgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe mit 10 µl DNA-Lösung und 90 µl HeLa-Zellen-DNA, sodass sich Konzentrationen von 32 ng, 3,2 ng, 320 pg, 32 pg, 3,2 pg, 320 fg und 32 fg ergaben. In den Verdünnungen befand sich je 20 ng/ml genomische DNA aus HeLa-Zellen, die als DNA-Stabilisator diente. Des Weiteren wurden zwei zusätzliche Verdünnungsstufen von 160 fg und 80 fg durch eine 1:2-Verdünnung aus 320 fg bzw. 160 fg generiert.

2.15 Gradienten-PCR zur Festlegung der Primer und der Annealing-Temperatur

Zur Festlegung der optimalen Primer und Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR mit folgenden Bedingungen durchgeführt: In Tabelle 4 wird das Pipettierschema der Gradienten-PCR veranschaulicht. Tabelle 5 zeigt die unterschiedlichen Annealing-Temperaturen. Das Programm der Gradienten-PCR wird in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 4: Gradienten-PCR Pipettierschema

Komponente	Volumen pro Ansatz
Taq-Polymerase	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
10xPuffer	5 µl
Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
DNA-Template	1 µl
H ₂ O dest.	41,1 µl

Tabelle 5: Gradienten-PCR Annealing-Temperaturen

1	68 °C
2	66,9 °C
3	65 °C
4	62,1 °C
5	58,7 °C
6	55,9 °C
7	54,1 °C
8	53,0 °C

Tabelle 6: Gradienten-PCR-Programm

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1 x	95 °C	3 Min.
Denaturierung	40 x	95 °C	30 Sek.
<i>annealing</i>		Werte aus Tabelle 5	30 Sek.
Elongation		72 °C	30 Sek.
Primer-Extension	1 x	72 °C	5 Min.

Als Primer wurden die Paare EF1/EF2, EF3/EF4 und F/R getestet:

- Forward-Primer EF1 5'AGATGGGGCTCCAATTTCAGA3' und Reverse-Primer EF2 5'ACGGTTGAACCTTCTTCTGGT3' konzipiert im Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen
- Forward-Primer EF3 5'TCGCTCCAAATGAAAAAGATGGG3' und Reverse-Primer EF4 5'ATCAACCGCTTTTGGTGAATTCC3' konzipiert im Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen
- Forward-Primer (F): 5'CCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT3' und Reverse-Primer (R) 5'ACTCGTTGTACTTCCCATGT3' (aus Rinttilä et al. 2004)

Mithilfe der Gradienten-PCR wurde die Annealing-Temperatur für die PCR auf 62 °C festgelegt.

2.16 16S-rDNA-PCR mit dem Primer-Paar RW01/DG74 zur Überprüfung der DNA-Qualität und PCR mit den Primer-Paaren EF1/EF2 und EF3/EF4

Um zu überprüfen, ob die isolierte genomische DNA von *E. faecalis* für PCR-Analysen geeignet war, wurde neben PCR-Ansätzen mit den Primer-Paaren EF1/EF2 und EF3/EF4, die das Esp-Gen amplifizieren, auch eine PCR-Analyse mit dem Primer-Paar RW01/DG74 durchgeführt. Dieses Primer-Paar ist in der Lage 16S-Sequenzen verschiedener Erreger, einschließlich *E. faecalis*, zu detektieren. Es wurden je 48 µl Mix und je 2 x 0,2 µl Primer eingesetzt. In Tabelle 7 ist das Pipettierschema der PCR aufgelistet.

Tabelle 7: PCR-Pipettierschema

Komponente	Volumen pro Ansatz
Taq-Polymerase	0,2 µl
dNTPs	0,4 µl
10xPuffer	5 µl
Magnesiumchlorid	3 µl
DNA-Template	10 µl
H ₂ O dest.	31 µl
Primer EF1 oder EF3 oder RW01	0,2 µl
Primer EF2 oder EF4 oder DG74	0,2 µl

2.17 Durchgeführtes PCR-Protokoll

Die *real-time* PCR-Analysen wurden mit dem LightCycler® 480 durchgeführt. In die Vertiefungen der PCR-Platte (max. 96 Proben) wurden jeweils 15 µl Mix und 5 µl Probe (Patient, Positivkontrolle, Negativkontrolle) gegeben. Der Mix pro Reaktion bestand aus 8,5 µl destilliertem Wasser, 4 µl SYBR Green Mix für LightCycler® 480, sowie je 1,25 µl (12,5 pmol) Forward- und Reverse-Primer (vgl. Kap. 2.5). Bei jeder PCR-Analyse wurde eine Kontaminationskontrolle in Form von destilliertem Wasser mitgeführt. Tabelle 8 veranschaulicht das PCR-Protokoll.

Tabelle 8: *real-time* PCR-Programm

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1 x	95 °C	10 Min.
Denaturierung	45 x	95 °C	15 Sek.
<i>annealing</i>		62 °C	15 Sek.
Elongation		72 °C	15 Sek.
Schmelzkurve	1 x	95 °C	20 Sek.
		68 °C	20 Sek.
		95 °C	kontinuierlich
Kühlung	1 x	40 °C	30 Sek.

Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 Min. erfolgten 45 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 15 Sek.), *annealing* (62 °C, 15 Sek.) und Elongation (72 °C, 15 Sek.). Abschließend wurde eine Schmelzkurve von 68 °C bis 95 °C erstellt.

Die Ergebnisse der PCR in Form von Schmelzpunkten (T_m -Wert, gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte einer doppelsträngigen DNA in Einzelstränge denaturiert wurde) und *crossing points* (CP) (Zyklus, in dem ein Produkt erstmals detektiert werden kann) wurden mit den mitlaufenden Positivkontrollen 320 fg, 160 fg, 80 fg und 32 fg verglichen. Als Nachweis von *Enterococcus*-DNA in den untersuchten Proben ergaben sich T_m -Werte von 83,93 °C bis 85,85 °C. Die positiven Proben wurden zu je 20 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde in ausgewählten Fällen eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.18 PCR der Patientenproben

Die Untersuchung auf *Enterococcus*-DNA im Patientenblut erstreckte sich über den gesamten Abnahmezeitraum von Tag 0 bis Tag 14.

2.19 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Gel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und nach Zugabe von GelRed® (1:10000) in den Gelschlitten gegossen. Je nach Probenmenge wurde ein 10er- oder 14er Kamm verwendet. Nach Erstarren der Lösung wurden je 5 µl Probevolumen mit je 1 µl Auftragspuffer aufgetragen. Negativkontrollen, Positivproben sowie ein 100 bp DNA-Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) wurden stets mitgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 30 Min. im elektrischen Feld bei 150 V.

2.20 Sequenzierung

Zur beispielhaften Bestätigung des Ergebnisses der PCR-Analysen wurden in einigen Fällen Sequenzierungen durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit dem Diffinity RapidTip System (Sigma Aldrich, Missouri, USA) nach Herstellerangaben umgepuffert. Je 7,5 µl der gereinigten Proben wurden mit je 2 µl Forward-Primer (20 pmol) und 5,5 µl destilliertem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktionen wurden von Microsynth (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.21 Klinische Parameter

Während der Teilnahme an der Studie wurden von den Patienten an den jeweiligen Blutentnahmetagen klinische Parameter des Krankheitsverlaufs erhoben. Die Daten wurden schriftlich in einem pseudonymisierten *case report* festgehalten. Ein Rückschluss auf die jeweiligen Patienten war nur durch einen Pseudonymisierungsschlüssel möglich.

Zu den klinischen Parametern gehörten International Normalized Ratio (INR), Thrombozyten ($10^3/\mu\text{l}$), Leukozyten (μl), Kreatinin (mg/dl), geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) (ml/Min.), Harnstoff (mg/dl), Bilirubin (mg/dl), Aspartat-Aminotransferase (AST) (U/l), Alanin-Aminotransferase (ALT) (U/l), Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) (U/l), CRP (mg/l), PCT ($\mu\text{l/l}$), therapeutische Antikoagulation, Durchschnittsverbrauch über 24 Std. von Dobutamin (mg), Adrenalin (mg) und Noradrenalin (mg), Temperaturminimum ($^{\circ}\text{C}$), Temperaturmaximum ($^{\circ}\text{C}$), Herzfrequenz pro Minute, mittlerer Blutdruck (mmHg), systolischer Blutdruck (mmHg), Beatmung (ja/nein), Beatmungsmitteldruck (mbar), *positive end-expiratory pressure* (PEEP) (mbar), Atemfrequenz pro Minute, P_aO_2 (mmHg), alveoloarterielle Sauerstoffdruckdifferenz (mmHg), F_iO_2 , Oxygenierungsindex ($\text{P}_a\text{O}_2/\text{F}_i\text{O}_2$) (mmHg), pH-Wert, HCO_3 (mmol/l), P_aCO_2 (mmHg), Hämatokrit (%), Hämoglobin (g/dl), Laktat (mmol/l), Natrium (mmol/l), Chlorid (mmol/l), Kalium (mmol/l), Insulinbedarf pro Tag, Magenrückfluss pro Tag (ml), Art der Ernährung, Nahrungsintoleranz (ja/nein), Blasendruck (mmHg), Gesamtbilanz pro Tag, intrakranieller Druck (ICP) (mmHg), Sedierung (ja/nein), GCS, Richmond Agitation Sedation Scale (RASS).

Außerdem wurden der operative Status der Patienten, das Alter, das Geschlecht, der Body-Mass-Index (BMI) und der tägliche Kalorienbedarf ermittelt. Der BMI wurde mithilfe der Formel Körpergewicht (KG) in kg/Größe in m^2 errechnet. Der tägliche Grundumsatz (kcal/d) wurde mit 25 kcal/kgKG geschätzt. Des Weiteren wurden wichtige Vorerkrankung und die Vormedikation vermerkt.

2.22 Entwicklung des Krankheitsverlaufs

Um eine Aussage über die Krankheitsentwicklung im Sinne von SIRS und/oder Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock machen zu können, wurden verschiedene Scores angewendet.

Am Aufnahmetag wurden der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score (APACHE-Score) und der Simplified Acute Physiology Score (SAPS-Score) ermittelt. Außerdem wurden an Tag 0 und an allen weiteren Blutabnahmetagen der SOFA-Score und der Gastrointestinal Failure Score (GIF-Score) benutzt.

Nach 28 und 90 Tagen wurden die Probanden bzw. deren Angehörige telefonisch über die weitere Entwicklung befragt und ermittelt, ob der Patient lebt oder verstorben ist.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode

3.1.1 Gradienten-PCR mit Primer-Paar EF1/EF2

Das Primer-Paar EF1 (5'AGATGGGGCTCCAATTTCAGA3') und EF2 (5'ACGGTTGAACCTTCTTCTGGT3'), welches an das Esp-Gen (Shankar et al. 1999; Willems et al. 2001) der Spezies *Enterococcus sp.* bindet, wurde zur Etablierung der Methode im Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen konzipiert und getestet. Mittels Gradienten-PCR sollten die optimalen Bedingungen für die *real-time* PCR ermittelt werden. Als *template* diente *E. faecalis*-DNA. Die Gradienten-PCR mit dem Primer-Paar EF1/EF2 ergab auch nach dreimaliger Durchführung kein Ergebnis und erwies sich somit als ungeeignet zum Nachweis der Spezies *Enterococcus sp.* in Patientenblut.

3.1.2 Gradienten-PCR mit Primer-Paar EF3/EF4

Daraufhin wurde das Primer-Paar EF3 (5'TCGCTCCAAATGAAAAAGATGGG3') und EF4 (5'ATCAACCGCTTTTGGTGATTCC3'), welches ebenfalls an das Esp-Gen (Shankar et al. 1999; Willems et al. 2001) der Spezies *Enterococcus sp.* bindet, zur Etablierung der Methode getestet. Mittels Gradienten-PCR sollte die optimale Annealing-Temperatur für die *real-time* PCR ermittelt werden. Als *template* diente *E. faecalis*-DNA. Die Gradienten-PCR mit dem Primer-Paar EF3/EF4 ergab nach dreimaliger Durchführung ebenfalls kein Ergebnis.

3.1.3 16S-rDNA-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität und Testung der Primer-Paare EF1/2 und EF3/4

Zur Überprüfung, ob die eingesetzte DNA (*E. faecalis* aus Anzucht auf Agar-Platte im Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen) zu PCR-Analysen geeignet ist, wurde eine PCR zum Nachweis eines ribosomalen RNA-Gens durchgeführt. Das hierbei eingesetzte Primer-Paar RW01/DG74 (Greisen et al. 1994) amplifizierte die entsprechende DNA-Sequenz und wies die eingesetzte Erreger-DNA als PCR-geeignet aus. Die Amplifikation des Esp-Gens hingegen mit den Primer-Paaren EF1/2 und EF3/4 gelang nicht (Abbildung 1).

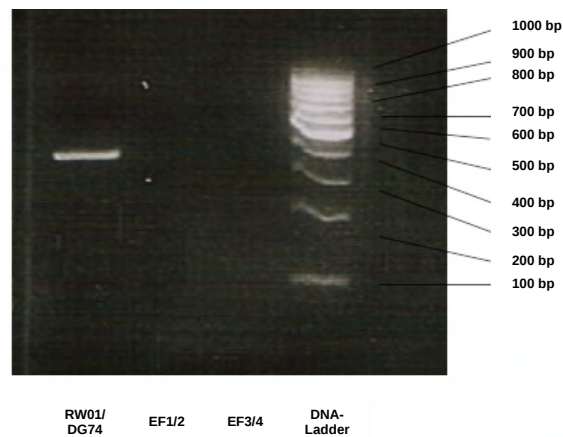


Abbildung 1: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit den Primer-Paaren RW01/DG74, EF1/2, EF3/4

Template: E. faecalis 100 ng. Das Primer-Paar RW01/DG74 amplifizierte das 16S-rDNA-Gen. Die Primer-Paare EF1/2 und EF3/4 (vgl. Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.2) dienen zur Amplifikation des Esp-Gens. Während die PCR mit dem Primer-Paar RW01/DG74 ein PCR-Produkt ergab, zeigte die PCR mit den Primer-Paaren EF1/2 und EF3/4 keine Amplifikation.

3.1.4 Gradienten-PCR mit Primer-Paar F und R

Die Primer F: 5'CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT3' und R: 5'ACTCGTTGTACTTCCCATTGT3' wurden aus der Literatur (Rinttilä et al. 2004) entnommen und zur Etablierung einer *real-time* PCR getestet. Mit diesen Primern gelang die Amplifikation eines definierten Bereiches innerhalb des 16S rRNA-Gens von *E. faecalis*. Somit wurden die Primer für den Nachweis von *E. faecalis* ausgewählt, wobei mithilfe einer Gradienten-PCR die Annealing-Temperatur auf 62 °C festgelegt wurde (Abbildung 2). Vgl. Kap. 2.15.

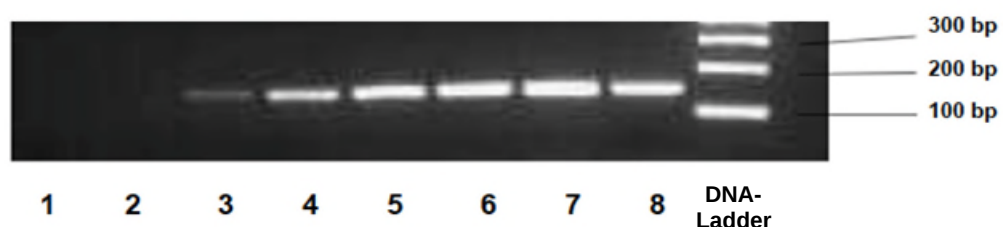


Abbildung 2: Gradienten-PCR mit Primer-Paar F und R

Template: E. faecalis 100 ng. 1–8 zeigen die verschiedenen Annealing-Temperaturen wie folgt: 1: 68 °C, 2: 66,9 °C, 3: 65 °C, 4: 62,1 °C, 5: 58,7 °C, 6: 55,9 °C, 7: 54,1 °C, 8: 53 °C.

3.1.5 Magnesiumionen-Konzentrationen und verschiedene Annealing-Temperaturen

Zur Optimierung der *Enterococcus* sp.-PCR mit den Primern F und R wurden verschiedene Magnesiumionen-Mengen bei Annealing-Temperaturen von 54 °C (Abbildung 3) und 62 °C (Abbildung 4) mit einer konventionellen PCR getestet. Folgende Mg^{2+} -Endkonzentrationen wurden dem Mix aus Taq-Polymerase, dNTPs, 10 x Reaktionspuffer, Forward-Primer, Reverse-Primer, H_2O dest. und DNA-Template hinzugefügt: 1,5, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 und 20,0 mM. Anhand einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese konnten starke und schwache PCR-Banden in Abhängigkeit von der Magnesiumionen-Menge sichtbar gemacht werden. Da die Magnesiumionenendkonzentration jedoch keinen Einfluss auf die Amplifikation des PCR-Produktes hatte, wurde auf die Zugabe von Magnesiumionen im Weiteren verzichtet.

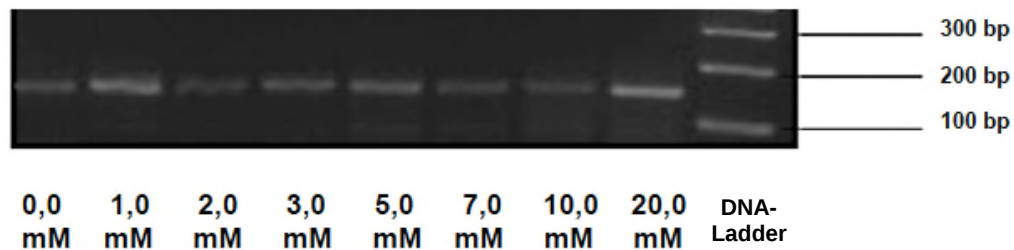


Abbildung 3: Magnesium²⁺-Reihe mit Annealing-Temperatur von 54 °C
Primer-Paar F und R, *template*: *E. faecalis* 100 ng.

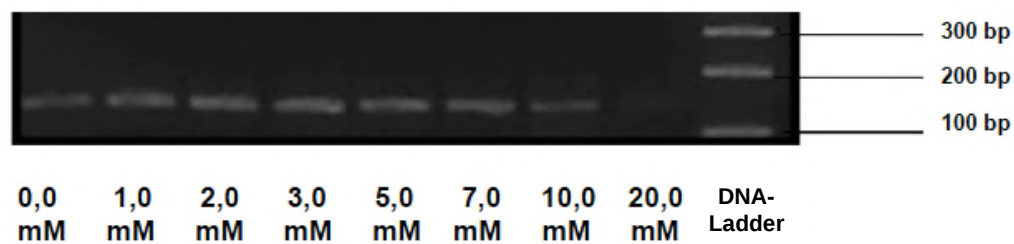


Abbildung 4: Magnesium²⁺-Reihe mit Annealing-Temperatur von 62 °C
Primer-Paar F und R, *template*: *E. faecalis* 100 ng.

3.2 PCR-Analysen mit dem LightCycler 480®

Zum Nachweis bakterieller Translokation am Beispiel von Bakterien der Gattung *Enterococcus* wurden *real-time* PCR-Analysen aus Patientenblut durchgeführt. Die Ziel-DNA wurde in 45 Zyklen amplifiziert, T_m -Werte von 83,93 °C bis 85,85 °C wurden als positiv gewertet.

3.2.1 Herstellung von Positivkontrollen aus einer Verdünnungsreihe mit Zusatz von DNA aus HeLa-Zellen

Um ein reproduzierbares Amplifikat der Positivkontrollen in der PCR gewährleisten zu können, wurde zur Stabilisierung der Bakterien-DNA der Verdünnungsreihe DNA aus HeLa-Zellen (Epithelzellen von Henrietta Lacks) zugesetzt (HeLa-Zellen-DNA 20 ng/ml). Die PCR-Analysen mit der Verdünnungsreihe ergaben spezifische Signale bis zu einer DNA-Menge von 32 fg, dies entspricht etwa 10 Bakteriengenomen (vgl. Kap. 2.14 und Tabelle 9). Die *crossing points* bei gleichen DNA-Mengen variierten allerdings. So lag der früheste *crossing point* bei einer eingesetzten DNA-Menge von 320 fg bei 34,68. Abbildung 5 veranschaulicht die *crossing points* der verschiedenen DNA-Mengen. Tabelle 9 zeigt den Zusammenhang zwischen DNA-Menge und dazugehöriger Anzahl der Bakteriengenome.

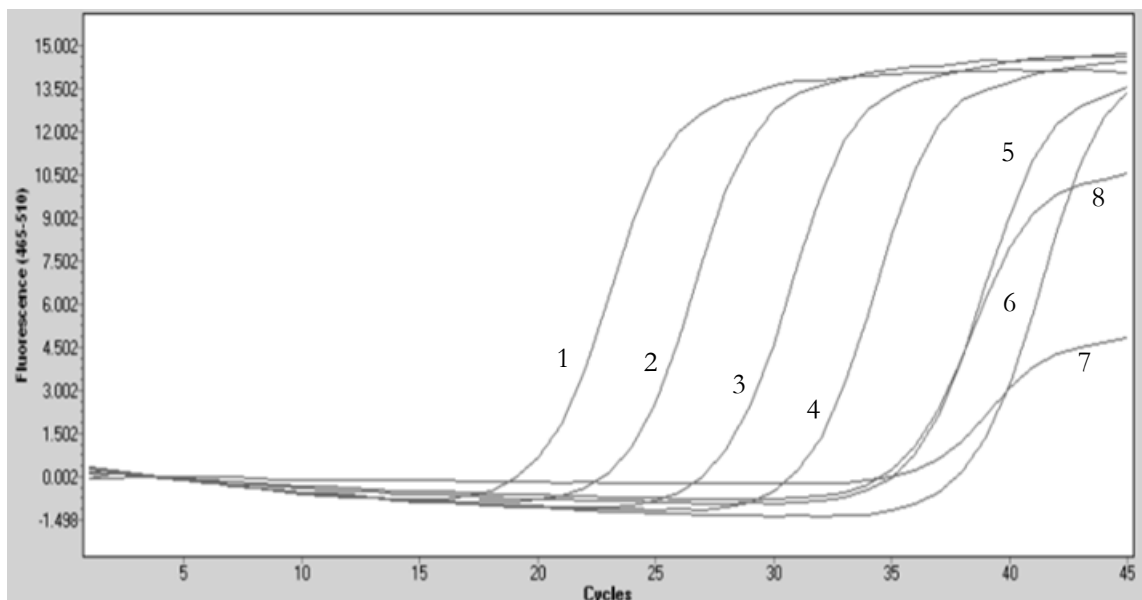


Abbildung 5: Amplifikationskurve der Verdünnungsreihe vom 24.05.2016

Template: *E. faecalis*, verschiedene Mengen: 1: 3,2 ng, 2: 320 pg, 3: 32 pg, 4: 3,2 pg, 5: 320 fg, 6: 160 fg, 7: 80 fg, 8: 32 fg. Ab einer DNA-Menge von 320 fg sind die Kurven nicht mehr um 3,3 CP-Werte verschoben (10fach Verdünnungen) und es ist ein Abbruch bzw. eine Verschiebung der Kurven zu erkennen.

Tabelle 9: *crossing points* in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge von *E. faecalis*

DNA-Menge	Anzahl der Bakteriengenome	<i>crossing point</i>
3,2 ng	~ 1000000	19,78
320 pg	~ 100000	23,45
32 pg	~ 10000	27,48
3,2 pg	~ 1000	31,02
320 fg	~ 100	35,12
160 fg	~ 50	35,67
80 fg	~ 25	35,92
32 fg	~ 10	37,90

3.2.2 Nachweis von *Enterococcus sp.* in Patientenproben

Mittels *real-time* PCR wurden 90 Patienten mit jeweils maximal acht Probenabnahmetagen getestet. In 70 aus 551 Blutproben wurde *Enterococcus*-DNA detektiert. Dies entspricht 46 positiv getesteten von insgesamt 90 Patienten (51,1 %). Bei 19 Patienten wurde bei mehr als einem Abnahmetag *Enterococcus*-DNA gefunden (Tabelle 10). Die allgemeine Kodierung ist wie folgt zu verstehen: PatientenID_Abnahmetag. Beispiel: Probe von Patient 1 am Abnahmetag 0 = 001_d0. Als *E. faecalis* spezifischer T_m -Werte ergab sich eine Spanne von 83,93° bis 85,85.

Tabelle 10: positive Patientenproben

Laufende Nummer der positiven Ergebnisse	Positive Patientenprobe	T_m -Wert	<i>crossing point</i>	Anzahl der Bakteriengenome
1	003_d2	84,80 °C	38,23	< 10
2	004_d5	85,26 °C	kein CP	keine Aussage möglich
3	007_d7	85,04 °C	34,86	25–100
4	013_d2	85,85 °C	34,85	25–100
5	020_d5	84,60 °C	40,00	< 10

Laufende Nummer der positiven Ergebnisse	Positive Patientenprobe	T_m-Wert	<i>crossing point</i>	Anzahl der Bakterien- genome
6	022_d7	85,30 °C	36,53	10–25
7	025_d0	85,21 °C	32,81	100–1000
7	025_d2	84,93 °C	34,76	25–100
8	026_d0	84,40 °C	35,70	25–50
8	026_d2	85,66 °C	kein CP	keine Aussage möglich
9	027_d1	84,54 °C	35,51	50–100
10	029_d0	84,05 °C	40,00	< 10
10	029_d1	85,32 °C	36,01	10–25
10	029_d2	84,89 °C	36,74	10–25
11	031_d3	85,33 °C	34,69	100–1000
11	031_d7	85,07 °C	35,20	50–100
12	032_d5	84,96 °C	35,76	25–100
13	033_d2	84,44 °C	37,59	10–25
13	033_d3	85,03 °C	35,50	50–100
14	034_d10	85,01 °C	36,42	10–25
15	046_d0	84,71 °C	34,05	100–1000
16	047_d2	84,98 °C	36,75	10–25
16	047_d10	85,26 °C	34,56	100–1000
17	050_d3	85,14 °C	35,98	10–25
17	050_d5	84,83 °C	36,04	10–25
17	050_d7	84,96 °C	37,90	10
17	050_d10	85,07 °C	36,77	10–25
18	051_d3	83,93 °C	38,76	< 10
19	052_d0	85,13 °C	35,59	50–100
19	052_d3	84,99 °C	35,64	10–100
19	052_d7	84,27 °C	37,07	10–25
20	053_d0	84,23 °C	40,00	< 10
21	054_d5	84,75 °C	37,03	10–25

Laufende Nummer der positiven Ergebnisse	Positive Patientenprobe	T_m-Wert	<i>crossing point</i>	Anzahl der Bakterien- genome
21	054_d10	85,07 °C	34,17	100–1000
22	055_d0	84,97 °C	35,49	50–100
23	058_d7	85,07 °C	36,05	10–25
24	061_d14	84,03 °C	40,00	< 10
25	062_d2	84,39 °C	40,00	< 10
26	064_d5	85,52 °C	40,00	< 10
27	066_d0	84,88 °C	40,00	< 10
28	067_d3	84,23 °C	36,68	10–25
29	068_d1	84,85 °C	38,77	< 10
30	069_d7	84,57 °C	40,00	< 10
30	069_d14	84,50 °C	40,00	< 10
31	071_d1	84,38 °C	39,41	< 10
31	071_d14	84,78 °C	40,00	< 10
32	074_d2	84,81 °C	36,58	10–25
32	074_d7	84,71 °C	38,86	< 10
32	074_d10	84,61 °C	36,02	10–25
33	075_d0	84,39 °C	37,12	10–25
34	076_d3	85,15 °C	40,00	< 10
35	077_d0	84,61 °C	40,00	< 10
36	080_d0	84,73 °C	40,00	< 10
36	080_d3	84,86 °C	36,43	10–25
37	081_d1	84,63 °C	kein CP	keine Aussage möglich
37	081_d14	84,25 °C	40,00	< 10
38	082_d0	84,85 °C	40,00	< 10
38	082_d10	85,45 °C	40,00	< 10
39	087_d1	84,69 °C	37,63	10–25
40	091_d14	84,05 °C	40,00	< 10
41	093_d0	84,08 °C	35,88	25–50

Laufende Nummer der positiven Ergebnisse	Positive Patientenprobe	T _m -Wert	<i>crossing point</i>	Anzahl der Bakterien-genome
41	093_d5	84,63 °C	40,00	< 10
42	094_d0	84,59 °C	40,00	< 10
42	094_d1	84,99 °C	40,00	< 10
43	095_d0	84,32 °C	36,09	10–25
44	096_d2	84,48 °C	34,96	100–1000
44	096_d5	84,58 °C	36,15	10–25
45	097_d7	84,99 °C	40,00	< 10
46	098_d2	84,34 °C	40,00	< 10
46	098_d7	84,07 °C	39,49	< 10

3.2.3 Verteilung der gefundenen Translokationen

Die Verteilung der gefundenen Translokationen (Tabelle 10) erstreckte sich über den gesamten Blutentnahmezeitraum. Abbildung 6 veranschaulicht die Anzahl der gefundenen Translokationen zu den verschiedenen Blutentnahmetagen 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14.

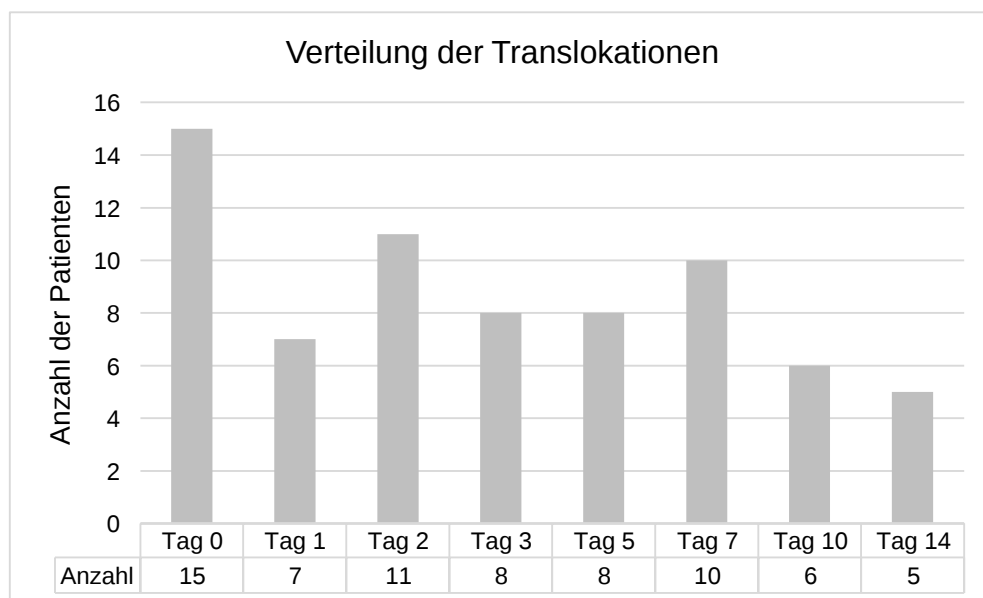


Abbildung 6: Verteilung der Translokationen

Anzahl der gefundenen Translokationen an den verschiedenen Blutentnahmetagen 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 und 14.

3.2.4 Überprüfung der Validität der PCR

Die im ersten Durchlauf der PCR positiv getesteten Patientenproben wurden in einer weiteren PCR nochmals getestet, um die Methode und die Ergebnisse zu validieren. Von den ursprünglich 70 positiven Blutproben (46 Patienten) konnten in der Überprüfung in 15 Blutproben (13 Patienten) erneut Bakterien der Gattung *Enterococcus* identifiziert werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: positive Ergebnisse in der Überprüfung

Positive Ergebnisse	<i>crossing point</i>	Anzahl der Bakteriengenome
007_d7	37,06	10–25
013_d2	32,73	100–1000
020_d5	35,13	50–100
022_d7	36,78	10–25
025_d0	35,56	50–100
033_d2	36,68	10–25
033_d3	40,00	< 10
034_d10	40,00	< 10
050_d7	40,00	< 10
053_d0	37,41	10–25
054_d5	36,97	10–25
074_d7	40,00	< 10
074_d10	34,77	100–1000
076_d3	30,73	1000–10000
082_d0	39,34	< 10

3.3 Agarose-Gelelektrophorese mit ausgewählten Proben

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurden zur Überprüfung der PCR-Ergebnisse Agarose-Gelelektrophoresen bei T_m -Wert positiven Patientenproben durchgeführt. Elektrophoretisch aufgetrennt wurden die PCR-Amplifikate der Patientenproben 001–007, 010–014 und 020–023 (Nachweis des ribosomalen RNA-Gens von *Enterococcus sp.* in Patientenproben). Exemplarisch wird im Folgenden das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese von Patient 010, 013 und 020, 021 und 022 abgebildet. Die Banden von Patient 013_d2 (Abbildung 7) und 020_d5 und 022_d7 (Abbildung 8) sind als positiv zu werten.

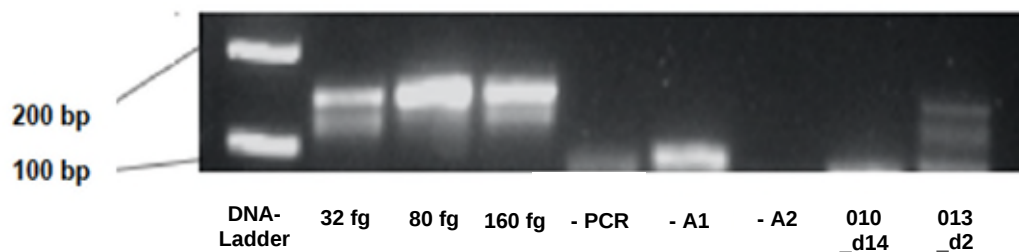


Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate von Patient 010 und 013

PCR vom 02.06.2016, Gel vom 02.06.2016. Als Positivkontrollen wurden in aufsteigender Reihenfolge 32 fg, 80 fg und 160 fg auf das Gel aufgetragen. Die Negativkontrolle - PCR gehört zur durchgeführten PCR der Patientenproben 010–014 und 020–023. Die Negativkontrolle - A1 gehört zu der Aufarbeitungsreihe von Patient 010 und die Negativkontrolle - A2 gehört zu der Aufarbeitungsreihe von Patient 020 (Abbildung 8). Die Aufarbeitung der Patientenproben erfolgte vor Durchführung der PCR mit dem MagNa Pure LC 2.0 (vgl. Kap. 2.11). Die Bande von 013_d2 ist als positiv zu werten.

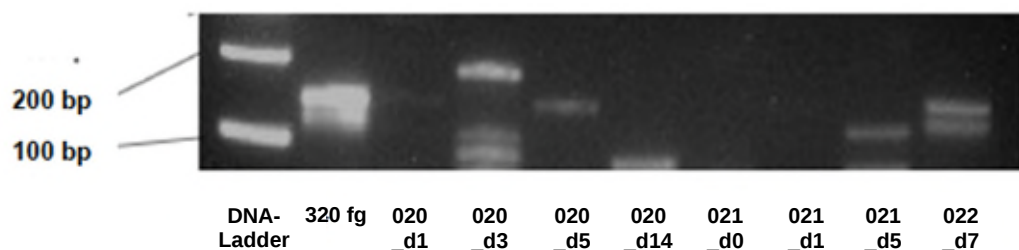


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate von Patient 020, 021 und 023

PCR vom 02.06.2016, Gel vom 02.06.2016. Als Positivkontrolle wurde 320 fg auf das Gel aufgetragen. Die Banden von 020_d5 und 022_d7 sind als positiv zu werten.

3.4 *Crossing points*

Es konnten in der initialen PCR (Tabelle 10) insgesamt eher späte *crossing points* mit Werten von $\geq 32,81$ bis maximal 40,00 identifiziert werden.

3.5 Sequenzierung der PCR-Amplifikate ausgewählter Proben

Die PCR-Amplifikate ausgewählter Proben wurden sequenziert. Bei der Auswahl der zu sequenzierenden Proben wurde auf variierende *crossing points* geachtet. Außerdem wurden ausgewählte Proben sequenziert, die laut T_m -Wert eindeutig negativ waren. Für die Sequenzierung wurde jeweils Primer F eingesetzt. Mittels der Sequenzierung konnte bei fast allen PCR-positiven Proben die Gattung *Enterococcus* bestätigt werden. Für die genauere Speziesidentifikation war die Länge des PCR-Produktes nicht ausreichend. Die Sequenzierung einiger weniger Proben (003_d2, 004_d5, 020_d5, und 053_d0) ergab kein Ergebnis. Tabelle 12 zeigt die Sequenzierungsergebnisse der ausgewählten Proben und die dazugehörigen T_m -Werte und *crossing points*.

Tabelle 12: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter positiver und negativer Proben

Probe	Ergebnis der Sequenzierung	T_m -Wert	<i>crossing point</i>
001_d0 negativ	/	82,70	40,00
003_d2	/	84,80	38,23
004_d5	/	85,26	/
007_d7	<i>Enterococcus sp.</i>	85,04	34,86
013_d2	<i>Enterococcus sp.</i>	85,85	34,85
020_d5	/	84,60	40,00
022_d7	<i>Enterococcus sp.</i>	85,30	36,53
025_d0	<i>Enterococcus sp.</i>	85,21	32,81
025_d2	<i>Enterococcus sp.</i>	84,93	34,76
027_d1	<i>Enterococcus sp.</i>	84,54	35,51
031_d3	<i>Enterococcus sp.</i>	85,33	34,69
032_d5	<i>Enterococcus sp.</i>	84,96	35,76

Probe	Ergebnis der Sequenzierung	T _m -Wert	<i>crossing point</i>
034_d7 negativ	<i>H. sapiens</i>	83,72	40,00
034_d10	<i>Enterococcus sp.</i>	85,01	36,42
036_d3 negativ	/	83,55	40,00
046_d0	<i>Enterococcus sp.</i>	84,71	34,05
047_d2	<i>Enterococcus sp.</i>	84,98	36,75
050_d3	<i>Enterococcus sp.</i>	85,14	35,98
051_d3	<i>Enterococcus sp.</i>	83,93	38,76
052_d0	<i>Enterococcus sp.</i>	85,13	35,59
053_d0	/	84,23	40,00
055_d0	<i>Enterococcus sp.</i>	84,97	35,49
074_d14 negativ	/	83,21	38,86
080_d3	<i>Enterococcus sp.</i>	84,86	36,43

3.6 Vergleich mit Markern der epithelialen Permeabilitätserhöhung und gesteigerter Monozytenaktivität

Im Folgenden werden die initial positiv getesteten Patientenproben (Tabelle 10) mit den unten aufgeführten Markern verglichen.

3.6.1 Intestinal Fatty Acid Binding Protein (iFABP)-Konzentration im Urin

Abbildung 9 zeigt die Urinkonzentration des iFABP an den verschiedenen Probeentnahmetagen. In der Abbildung ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ sichtbar.

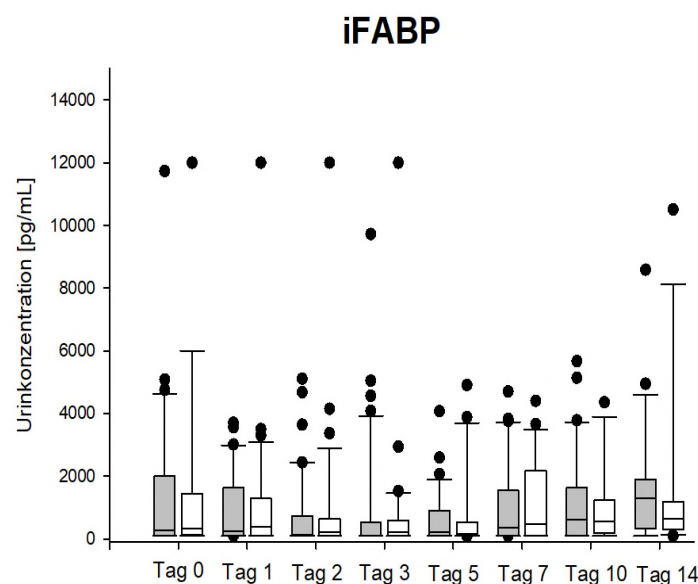


Abbildung 9: Urinkonzentration des *intestinal fatty acid binding protein*

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.6.2 Claudin 3-Konzentration im Urin

Abbildung 10 zeigt die Urinkonzentration des Claudin 3 an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Die Werte in Abbildung 10 weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ auf.

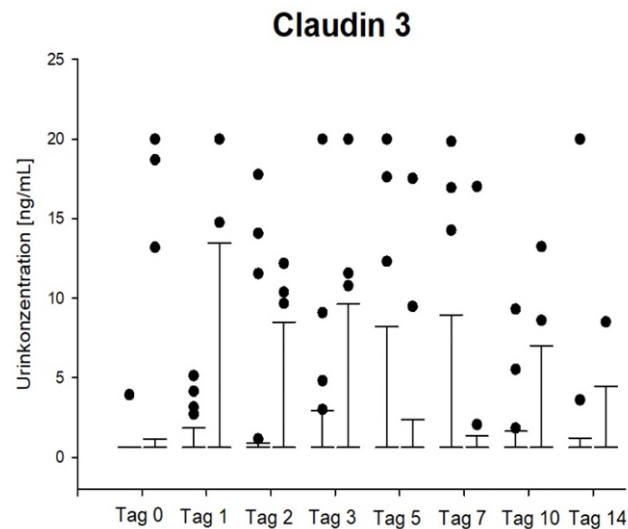


Abbildung 10: Urinkonzentration des Claudin 3

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“, jeweils linker Balken und „keine bakterielle Translokation“, jeweils rechter Balken. Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.6.3 sCD14

Abbildung 11 zeigt die Blutkonzentration des sCD14 an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ vorhanden.

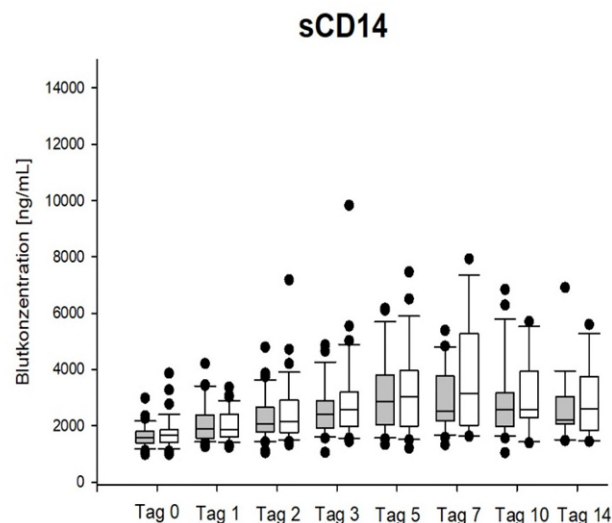


Abbildung 11: Blutkonzentration des sCD14

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.7 Vergleich mit Markern der systemischen Inflammation

Im Folgenden werden die initial positiv getesteten Patientenproben (Tabelle 10) mit den unten aufgeführten Markern verglichen.

3.7.1 Procalcitonin

Abbildung 12 zeigt die Plasmakonzentration des PCT an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“.

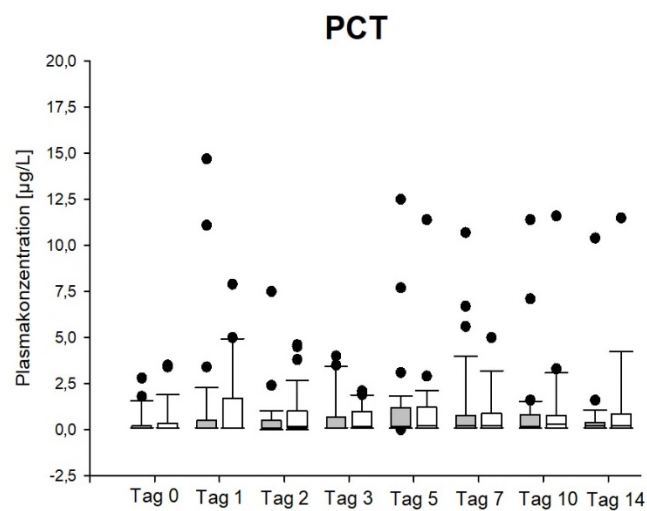


Abbildung 12: Plasmakonzentration des PCT

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.7.2 Leukozyten

Abbildung 13 zeigt die Blutkonzentration der Leukozyten an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Die Mehrheit der untersuchten Blutproben zeigt eine Leukozytose. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ vorhanden.

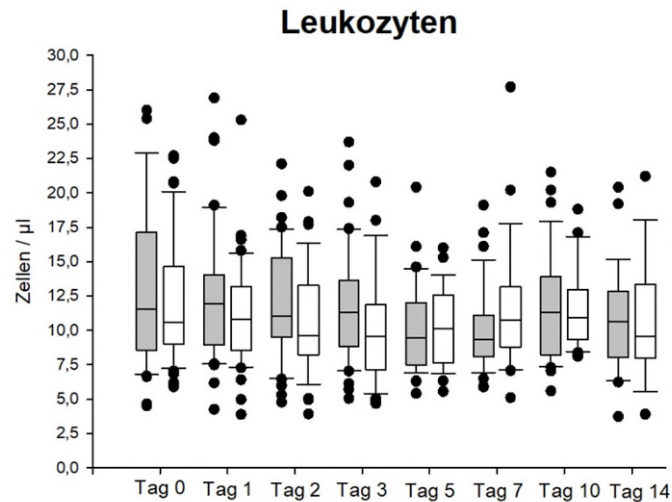


Abbildung 13: Blutkonzentration der Leukozyten

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.7.3 C-reaktives Protein

Abbildung 14 zeigt die Plasmakonzentration des CRP an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Die Mehrheit der Werte befindet sich oberhalb des Grenzwertes von 0,5 mg/l. Es ist allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ sichtbar.

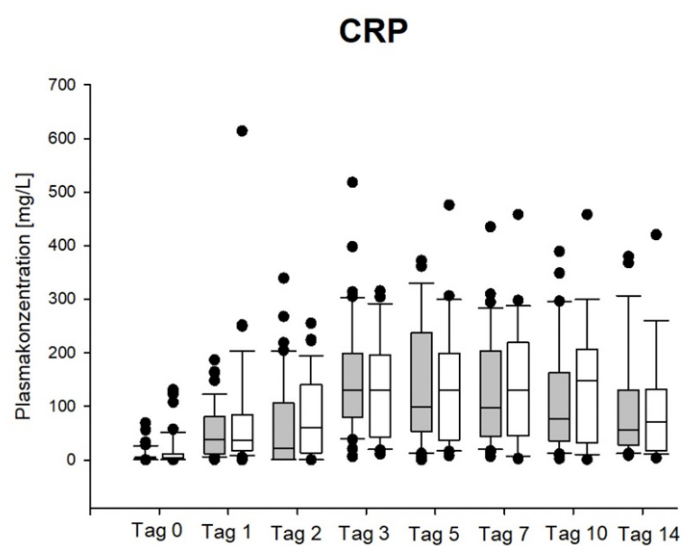


Abbildung 14: Plasmakonzentration des CRP

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.8 Vergleich mit der Entwicklung des Krankheitsverlaufs

Im Folgenden werden die initial positiv getesteten Patientenproben (Tabelle 10) mit den unten aufgeführten Parametern der Entwicklung des Krankheitsverlaufs verglichen.

3.8.1 SOFA-Score

Abbildung 15 zeigt die Werte des SOFA-Scores an den verschiedenen Probeentnahmetagen. Die Werte unterscheiden sich im Zwischengruppenvergleich statistisch nicht signifikant.

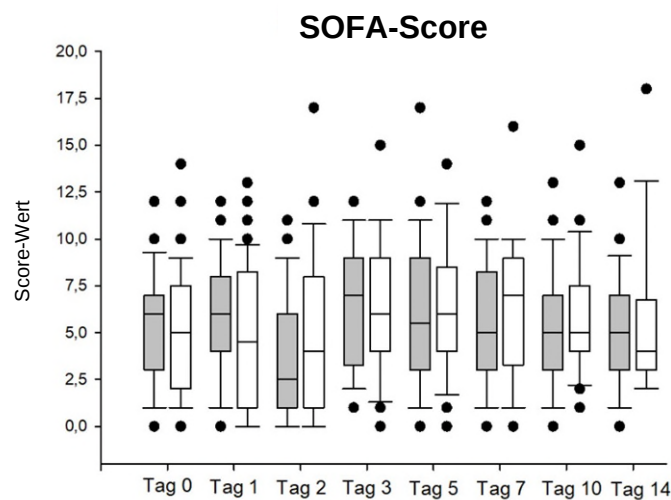


Abbildung 15: Score-Wert des SOFA-Scores

Probeentnahmetage 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. Vergleich der Gruppen „bakterielle Translokation“ (grau) und „keine bakterielle Translokation“ (weiß). Linie = Median, Box = Quartilen (25. und 75. Perzentile), Whisker = 10. und 90. Perzentile.

3.8.2 SIRS

Insgesamt wiesen 63 von 90 untersuchten Patienten (70 %) klinische Zeichen eines SIRS auf. Davon war bei 35 Patienten (56 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 27 der 90 untersuchten Patienten (30 %) wiesen keine klinischen Zeichen eines SIRS auf. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 41 % (11 Patienten) (Abbildung 16). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „SIRS“ und „kein SIRS“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

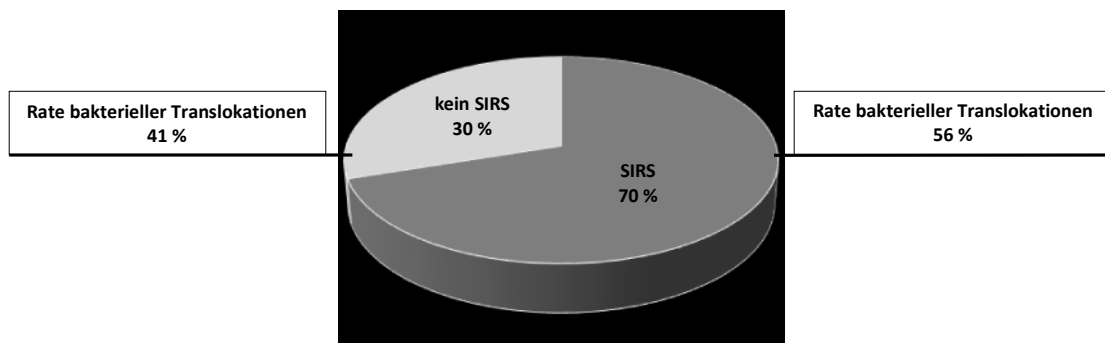


Abbildung 16: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „SIRS“ und „kein SIRS“.

3.8.3 Sepsis

Insgesamt wiesen 48 der 90 untersuchten Patienten (53 %) klinische Zeichen einer Sepsis auf. Davon war bei 27 Patienten (56 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. Bei 42 der 90 Patienten (47 %) fand sich keine Sepsis. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 45 % (19 Patienten) (Abbildung 17). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „Sepsis“ und „keine Sepsis“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

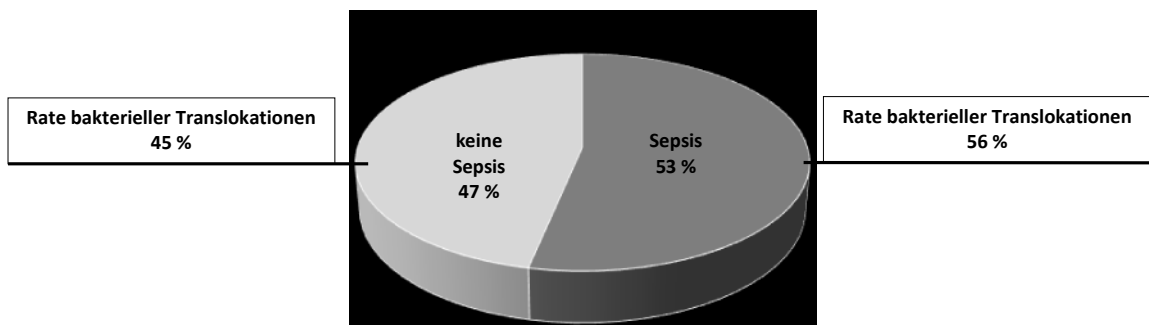


Abbildung 17: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Sepsis“ und „keine Sepsis“.

3.8.4 Schwere Sepsis

Bei 31 der 90 untersuchten Patienten (34 %) wurden klinische Zeichen einer schweren Sepsis festgestellt. Davon war bei 16 Patienten (52 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 59 der 90 untersuchten Patienten (66 %) hatten keine schwere Sepsis. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 51 % (30 Patienten) (Abbildung 18). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „schwere Sepsis“ und „keine schwere Sepsis“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

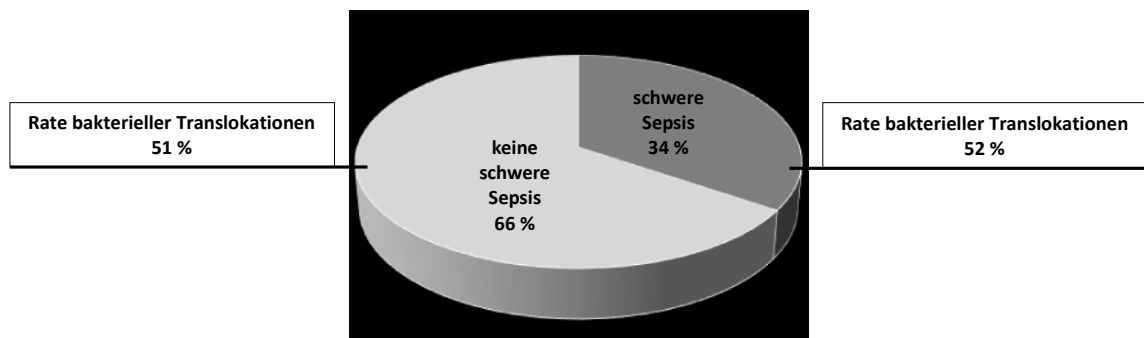


Abbildung 18: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „schwere Sepsis“ und „keine schwere Sepsis“.

3.8.5 Septischer Schock

Bei 31 der 90 untersuchten Patienten (34 %) wurden klinische Zeichen eines septischen Schocks festgestellt. Davon war bei 17 Patienten (55 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 59 der 90 untersuchten Patienten (66 %) hatten keinen septischen Schock. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 49 % (29 Patienten) (Abbildung 19). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „septischer Schock“ und „kein septischer Schock“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

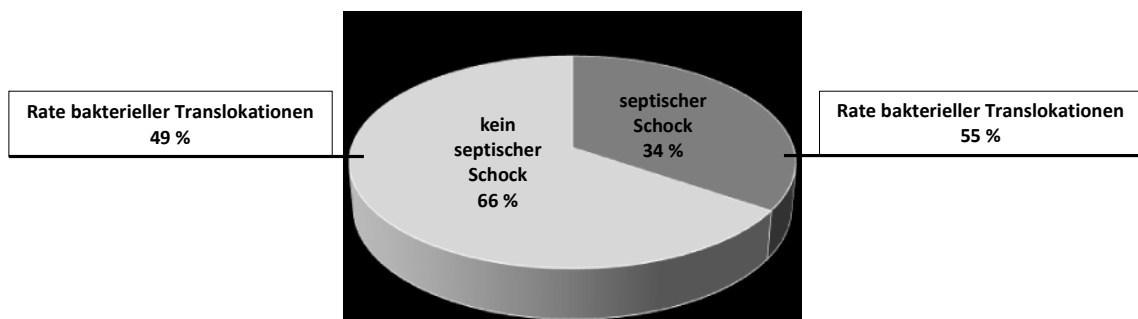


Abbildung 19: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „septischer Schock“ und „kein septischer Schock“.

3.8.6 Patienten auf der Intensivstation verstorben

Insgesamt starben 16 der 90 an der Studie teilnehmenden Patienten (18 %) auf der Intensivstation. Davon war bei 9 Patienten (56 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 74 der 90 untersuchten Patienten (82 %) verstarben nicht auf der Intensivstation. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 50 % (37 Patienten) (Abbildung 20). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „Patienten auf Intensivstation verstorben“ und „Patienten nicht auf Intensivstation verstorben“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

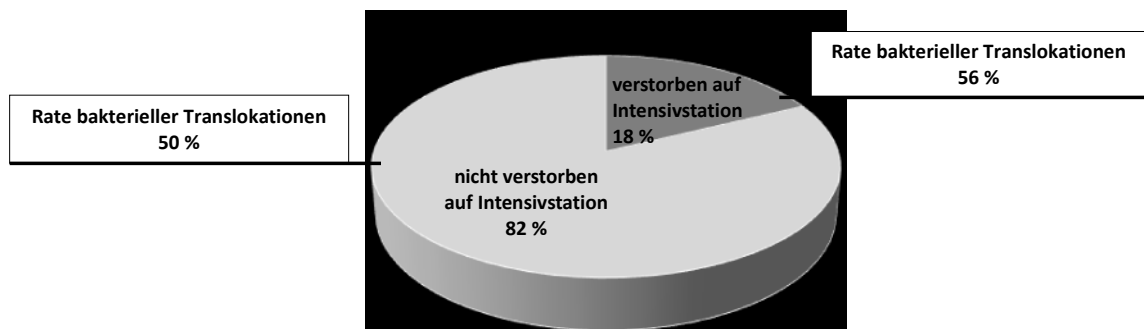


Abbildung 20: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten auf Intensivstation verstorben“ und „Patienten nicht auf Intensivstation verstorben“.

3.8.7 28-Tage-Letalität

Insgesamt starben 16 der 90 an der Studie teilnehmenden Patienten (18 %) nach 28 Tagen. Davon war bei 9 Patienten (56 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 74 der 90 untersuchten Patienten (82 %) verstarben nicht nach 28 Tagen. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 50 % (37 Patienten) (Abbildung 21). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 28 Tagen“ und „Patienten nicht verstorben nach 28 Tagen“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

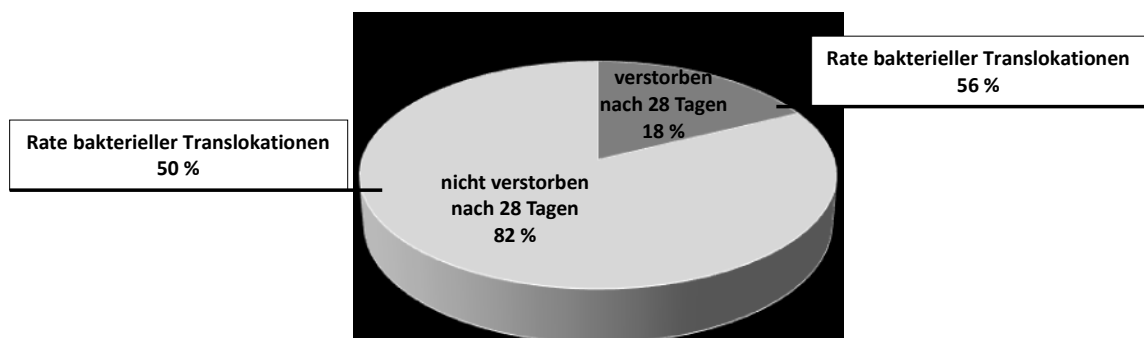


Abbildung 21: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 28 Tagen“ und „Patienten nicht verstorben nach 28 Tagen“.

3.8.8 90-Tage-Letalität

Bei 88 Patienten wurde der Parameter „90-Tage-Letalität“ bestimmt. Nach 90 Tagen waren 24 Patienten (27 %) verstorben. Davon war bei 13 Patienten (54 %) eine bakterielle Translokation nachzuweisen. 64 der 88 untersuchten Patienten (73 %) lebten noch nach 90 Tagen. Bei ihnen fand sich eine Rate an bakteriellen Translokationen von 52 % (33 Patienten) (Abbildung 22). Die Rate an bakteriellen Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 90 Tagen“ und „Patienten nicht verstorben nach 90 Tagen“ zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

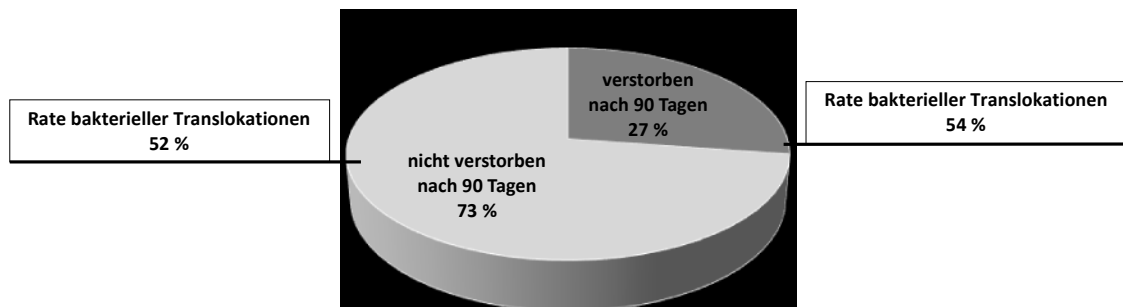


Abbildung 22: Rate bakterieller Translokationen in den Gruppen „Patienten verstorben nach 90 Tagen“.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte mit der Methode der *real-time* PCR das Vorliegen von *Enterococcus*-DNA im Blut von 46 kritisch kranken Patienten nachgewiesen werden. Die Marker der epithelialen Permeabilitätserhöhung (iFABP und Claudin 3), der Marker der gesteigerten Monozytenaktivität (sCD14), das Ausmaß der systemischen Inflammation (als Marker galten PCT, Leukozyten und CRP) und die Schwere des Krankheitsverlaufs (betrachtet wurden SOFA-Score, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Versterben auf der Intensivstation und 28-Tage- und 90-Tage-Letalität) waren nicht in positive Korrelation mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation der Spezies *Enterococcus sp.* zu bringen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Alte und neue Ansätze in der Diagnostik bakterieller Translokation

Bereits in früheren Studien wurde die bakterielle Translokation darmansässiger Bakterien in Lymphknoten des Mesenteriums bzw. in das Blutkreislaufsystem diskutiert.

Sowohl bei gesunden Menschen mit 5–10 % (Sedman et al. 1994), als auch bei speziellen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel Obstruktion des Darms durch einen *Illus* (Deitch 1989; Sedman et al. 1994) oder im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Ambrose et al. 1984; Deitch 1989) wurden translozierte Darmbakterien nachgewiesen. In allen drei oben genannten Studien wurden jeweils Proben der Serosa oder mesenteriale Lymphknoten entnommen und translozierte Bakterien mittels Bakterienkultur nachgewiesen. Dies stellt einen wichtigen Unterschied zur Methodik der hier vorliegenden Arbeit dar. Die Entnahme von Gewebe oder mesenterialen Lymphknoten ist eine Form der invasiven Diagnostik und ist nur mittels Operation bei chirurgischen Patienten möglich.

Im Setting dieser Arbeit stellt diese invasive Methodik keine Option dar. Wichtig ist außerdem zu erwähnen, dass sowohl chronisch entzündliche Darmerkrankungen als auch operative abdominelle Eingriffe Ausschlusskriterien dieser Studie sind. Ist der Darm durch Entzündung oder Operation angegriffen, ist eine Translokation von Darmkeimen als wahrscheinlicher anzusehen als bei darmgesunden Patienten, was die Daten verfälschen könnte.

Allerdings ist es vorstellbar, dass es im Rahmen von Traumata zu einer Darmkontusion mit daraus resultierender erhöhter Permeabilität der Darmschleimhaut kommen kann. Derartige Szenarien sind in den Einschlusskriterien dieser Studie nicht auszuschließen.

Der molekularbiologische Nachweis bakterieller DNA aus peripheren Blutproben oder anderen Körperflüssigkeiten ist eine neue Herausforderung, Schwierigkeit und Möglichkeit zugleich (Gatt et al. 2006).

Der molekularbiologische Nachweis bakterieller DNA gilt im Vergleich zur Bakterienkultur als schneller und sensitiver, um eine Translokation festzustellen (Küçükaydin et al. 2000; Ono et al. 2005).

Die PCR-Technik fand bei Küçükaydin et al. (2000) Anwendung. Im Tierversuch mit Ratten wurde bakterielle Translokation im Ischämie-Reperfusionen-Modell mittels PCR nachgewiesen. Die Ratten wurden in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bestand aus 20 Ratten, die *E. coli* erhielten, gefolgt von 10 Min. Ischämie und 30 Min. Reperfusion der *A. mesenterica superior*. Gruppe 2 war die Kontrollgruppe bestehend aus 20 Ratten, denen bakterielle künstliche Ernährung verabreicht wurde. Gruppe 3 bestand aus 20 Kontrollratten ohne Intervention. 3 ml portalvenöses Blut und mesenteriale Lymphknoten wurden bei allen Ratten entnommen und *E. coli*-DNA mittels PCR gefunden. Die Ergebnisse zeigten *E. coli*-DNA in 30 % der Lymphknoten-Proben und 10 % der Blutproben aus Gruppe 1. Die PCR war in Gruppe 2 und 3 negativ. Die Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen ist hierbei durchaus plausibel, da das Bakteriengenom in den Tieren mit dem im Menschen vergleichbar ist.

Kane et al. (1998) setzten sich zum Ziel, bei Patienten eine sensitivere Methode zum Nachweis von systemischen Infektionen auf dem Boden einer bakteriellen Translokation aus dem Darmtrakt zu finden. Getestet wurde das Blut von 40 chirurgischen Patienten und 20 gesunden Kontrollpersonen. Es zeigte sich auch hier, dass die PCR sensitiver war als die Blutkulturen. Bei 64 % der kritisch kranken Patienten fanden sich bakterielle DNA-Bestandteile. Die Blutkulturen waren nur bei 14 % der Patienten positiv (Kane et al. 1998).

Eine Untersuchung von Wen et al. (2000) verglich die Anwendung von Blutkulturen und PCR aus dem Blut zum Nachweis von bakterieller DNA bei 23 Patienten nach Laparotomie. Beide Methoden wurden gleichzeitig angewandt und zeigten, dass die PCR sensitiver war, um eine Bakteriämie nachzuweisen. 3 Blutkulturen von 23 waren positiv (13 %) und die PCR zeigte sich bei 10 von 23 Proben positiv (43,5 %) (Wen et al. 2000).

Eine neuere Studie mit Patienten nach Hepatektomie bei Malignitäten der Gallenwege hat die moderne Methode der *ribosomal RNA-targeted reverse-transcriptase polymerasechainreaction*

(rRNA-targeted RT-qPCR) angewandt, um das Auftreten von postoperativen septischen Komplikationen vorauszusagen. Während der OP entnommene Lymphknoten wurden nicht bakteriell kultiviert, sondern das Material wurde mithilfe einer PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit positivem Bakteriennachweis häufiger postoperative septische Komplikationen hatten. Von den 65 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden letztendlich die Ergebnisse von 51 Patienten ausgewertet. Die mesenterialen Lymphknoten wurden zweimal entnommen. Erstens bei der Laparotomie und zweitens nach der Tumorentfernung. In den Lymphknoten der Gruppe 1 zeigten sich Bakterien bei 29,4 % und in den Gruppe 2 Lymphknoten bei 37,3 %. Die Detektion von Bakterien in den Gruppe 1 Lymphknoten war signifikant mit einer präoperativen Cholangitis verknüpft ($P = 0,04$). Die gefundenen Bakterien bei den Gruppe 2 Lymphknoten zeigten eine Korrelation mit postoperativen Infektionen ($P = 0,002$) (Mizuno et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich mit Bezug auf die oben genannten Studien festhalten, dass die PCR aus Blut, anderen Körperflüssigkeiten oder Körpermaterialien eine sensitivere und schnellere Methode zum Nachweis bakterieller DNA im Gegensatz zu der Anwendung von Blutkulturen oder kulturellem Anzüchten von Bakterien aus entnommenen Lymphknoten, portalvenösem Blut oder anderem Körpermaterial darstellen kann. Die Entnahme von Lymphknoten und portalvenösem Blut ist nur mit invasiver Technik möglich und spielt im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle. Hinzu kommt, dass die kulturelle Anzucht von Bakterien nicht bei allen Spezies möglich ist oder eine Anzucht nach bereits begonnener Antibiotikatherapie im Rahmen von Operationen eingeschränkt ist (Lamprecht und Heininger 2012).

4.2.2 Diskussion der Primer

Die Primer RW01 und DG74 sind Universalprimer, die eine 370 bp Region im 16S rRNA-Gen von Bakterien amplifizieren (Greisen et al. 1994). Sie wurden in einer Gradienten-PCR verwendet, um die eingesetzte DNA von *E. faecalis*, angezüchtet auf einer Agar-Platte im Institut für Medizinische Mikrobiologie Göttingen, als PCR-geeignet zu testen. Das 16S rRNA-Gen ist bei allen Bakterien hoch konserviert, weswegen die Primer RW01 und DG74 die DNA verschiedenster bakterieller Spezies amplifizieren. Für eine weitere Identifikation des Genus oder der Spezies benötigt man entsprechend spezifischere Primer.

Die Primer EF1/2 und EF3/4 konnten keine DNA amplifizieren (Abbildung 1). Eigentlich amplifizieren sie das *Esp*-Gen (Shankar et al. 1999) bei *E. faecalis* und *E. faecium*. *Esp* gilt als

Virulenzfaktor (Vankerckhoven et al. 2004), vor allem bei Vancomycin-resistenten *E. faecium* (Willems et al. 2001).

Im weiteren Verlauf wurden die Primer F und R mittels Gradienten-PCR getestet. Sie wurden aus der Literatur entnommen (Rinttilä et al. 2004). Bei Rinttilä et al. (2004) wurden 16S rDNA amplifizierende Primer für verschiedene Bakteriengruppen, unter anderem *Enterococcus sp.*, konzipiert und ein Protokoll einer SYBR-Green I basierten *real-time* PCR erstellt.

Die Primer aus Rinttilä et al. (2004) wurden in dieser Arbeit verwendet. Im Unterschied zu Rinttilä et al. (2004) kamen sie allerdings in einer PCR mit DNA aus humanen Blutproben zum Einsatz. Sowohl Blut als auch humane DNA haben unterschiedliche Einflüsse auf eine PCR. Blut wirkt inhibierend auf die PCR, was den Vorgang der DNA-Amplifikation erschwert (Hemschemeier et al. o.J.). Primer können unter Umständen unspezifisch an DNA binden und es entstehen z. B. Amplifikate von Human-DNA, was die Spezifität und Sensitivität herabsetzt (Navarro et al. 2002). Es kann sowohl zu fehlenden Amplifikationen, also falsch-negativen Ergebnissen, als auch zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, wenn humane DNA anstelle von bakterieller DNA amplifiziert wird (Disqué 2007). Des Weiteren können sich die im Ansatz der PCR eingesetzten Primer (vgl. Kap. 3.1.4) selbst aneinanderlagern und es können Primer-Dimere entstehen (Neusser 2001). Die Amplifikationsprodukte in Form von Primer-Dimeren ließen sich in der hier vorliegenden Arbeit gut von positiven Patientenproben unterscheiden, da anhand der Schmelzkurve andere T_m -Werte sichtbar wurden. Die spezifischen T_m -Werte für Amplifikate von *Enterococcus sp.* waren eindeutig zu erkennen (vgl. Kap. 3.2.2). In der hier vorliegenden Arbeit konnte bei 46 von 90 Patienten bakterielle DNA nachgewiesen werden. In der Überprüfung der im ersten Durchlauf positiv getesteten Patienten konnte nur bei 13 Patienten zweimalig Enterococcus-DNA gefunden werden. Zu erklären ist dies damit, dass sich die hier angewendete Methode an der unteren Nachweisgrenze befand. Dies zeigte sich an den späten *crossing points* (vgl. Kap. 3.2.1 und Tabelle 9). Weitere Diskussion und Inhalte finden sich dazu in Kap. 4.2.7. Die Sequenzierung einiger stichprobenartig ausgewählter Proben zeigte den Nachweis von *Enterococcus sp.*, was das PCR-Protokoll und die Auswahl der Primer als gattungsspezifisch identifizierte.

4.2.3 Bedeutung der Annealing-Temperatur

Annealing ist ein Begriff für das Anlagern der Primer an die komplementäre DNA des Zielgens (Hemschemeier et al. o.J.), hier: Enterococcus-DNA, die es zu amplifizieren galt. Sobald die Template-DNA zu Einzelsträngen denaturiert wurde, wurde bis zu einer

definierten Temperatur (Annealing-Temperatur) heruntergekühlt und die Primer konnten sich spezifisch an die DNA-Einzelstränge binden und die denaturierte DNA zu Doppelstrang-DNA vervollständigen (Hemschemeier et al. o.J.). Die Wahl der passenden Annealing-Temperatur ist maßgeblich für die Spezifität der Bindung zwischen Primer und Einzelstrang DNA des *templates*. Zu niedrige Temperaturen lassen unspezifische Bindungen zu, woraus sich möglicherweise die Amplifikation eines anderen Produktes ergibt. Zu hohe Temperaturen erlauben es den Primern nicht, sich an das *template* anzulagern und es wird kein Produkt amplifiziert (Hemschemeier et al. o.J.). Optimal ist ein *annealing* von ca. 2 °C unterhalb des T_m -Wertes des verwendeten Primers (Hemschemeier et al. o.J.). Der Primer F hat einen T_m -Wert von 60,3 °C und der Primer R hat einen T_m -Wert von 57,5 °C. Angegeben sind in der Literatur Annealing-Temperaturen von 50–70 °C je nach verwendetem Primer (Rinttilä et al. 2004). Im Falle der ausgewählten spezifischen Primer für die Gattung *Enterococcus* ist in der Literatur eine Annealing-Temperatur von 61 °C vorgegeben (Rinttilä et al. 2004). In der vorliegenden Laborarbeit wurde unter Berücksichtigung der Studie von Rinttilä et al. (2004) eine Gradienten-PCR zur Detektion der optimalen Annealing-Temperatur durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine optimale Primer-Anlagerung bei 62 °C, was etwas von den oben genannten Empfehlungen aus Hemschemeier et al. (o.J.) zum *annealing* unter optimalen Bedingungen abweicht (Abbildung 4). Höhere Temperaturen zeigten kein Ergebnis. Niedrigere Temperaturen konnten unspezifische Bindungen nicht ausschließen.

4.2.4 Nachweisgrenze der PCR-Tests

Ein Bakteriengenom des *E. faecalis* bestehend aus etwa 3000000 Basenpaaren wiegt ca. 3 fg (vgl. Kap. 2.14).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die PCR der Verdünnungsreihe minimal etwa zehn Bakteriengenome der *Enterococcus sp.* nachweisen. Dies entsprach einer Menge von 32 fg. Die nachgewiesenen Bakterienmengen waren insgesamt mit späten *crossing points* verknüpft (vgl. Kap. 3.2.1, Tabelle 9 sowie Kap. 3.4). Die in den Patientenproben mitgeführten Positivkontrollen beliefen sich in derselben Größenordnung.

In einer Studie von Santos et al. (2019) zum Nachweis von *E. faecalis* in Luftfiltern lag die niedrigste Nachweisgrenze mittels PCR bei 15 Genomen pro 10 µl (Santos et al. 2019), was ähnlich zur Nachweisgrenze der hier vorliegenden Arbeit ist.

Neben dem Nachweis von Bakterien-DNA besteht die Möglichkeit eine bakterielle Translokation durch den Nachweis von PAMPs zu detektieren. Die Theorie der bakteriellen Translokation wurde um die Theorie der Translokation von bakteriellen Bestandteilen, den

sogenannten PAMPs, erweitert (Tsujiimoto et al. 2009). Diese Bestandteile wie bakterielle Flagellen, Murein der Zellwand, Nukleinsäuren und Endotoxine wie Lipopolysaccharide können nach deren Erkennung von PRRs (vor allem Toll-like-Rezeptoren), eine Immunantwort in Gang setzen.

Genetische Variationen der Toll-like-Rezeptoren wiederum sind mit unterschiedlich ausgeprägten Krankheitsbildern assoziiert (Corr und O'Neill 2009). Aussagen darüber, ab welchen genauen Bakterienmengen ein Einfluss auf die Entwicklung einer Sepsis oder eines SIRS zu erwarten wäre, lassen sich nicht machen. Da in der hier vorliegenden Arbeit keine positive Korrelation zwischen dem Auftreten einer bakteriellen Translokation und der Inflammation sowie Schwere des Krankheitsverlaufs (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22) gefunden werden konnte, kann diese Fragestellung mithilfe der erhobenen Daten nicht beantwortet werden. Die hier gefundenen geringen Mengen von *Enterococcus* sp.-DNA in Patientenproben haben zumindest nicht alleinig oder ausschlaggebend zur Ausprägung oder Aufrechterhaltung des septischen Krankheitsbildes beigetragen.

4.2.5 Bedeutung der *crossing points*

Die *crossing points* (oder auch *threshold cycle* = Ct-Wert) können bei einer *real-time* PCR als Quantifizierungsmethode herangezogen werden (Simon Med. Diss. Bonn 2008). Sie geben den PCR-Zyklus an, in dem ein Produkt erstmals detektiert werden kann. Möglich ist dies mittels Fluoreszenzsignal in Echtzeit. Fluoreszenz und DNA-Menge nehmen proportional zu und so können Rückschlüsse auf die Startmenge gezogen werden (Pfaffl 2004). Niedrige *crossing points* zeigen, dass eine größere DNA-Menge in der untersuchten Probe vorhanden ist (Scheck Med. Diss. Jena 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit lagen die *crossing points* der Positivkontrollen einer DNA-Konzentration von ≤ 320 fg bei $\geq 34,68$ (vgl. Kap. 3.2.1). Dies sind späte *crossing points*, was darauf schließen lässt, dass nur geringe DNA-Mengen in den Proben vorhanden waren. Die frühesten *crossing points* bei der ersten Testung der Patientenproben beliefen sich in einem Bereich von ungefähr 33,00 (Tabelle 10). Dies lässt auch hier die Aussage zu, dass sich in den Patientenproben wenig *Enterococcus* sp.-DNA befand.

4.2.6 Bedeutung der Positivkontrollen

Im Verlauf der Testung verschiedener Patientenproben mittels *real-time* PCR wurden Positivkontrollen der *E. faecalis*-DNA in verschiedenen Mengen mitgeführt (320 fg, 160 fg, 80 fg und 32 fg). In der *real-time* PCR konnte nicht immer die *E. faecalis*-DNA bis 32 fg detektiert werden. Ursächlich dafür können verschiedene Gegebenheiten wie z. B. mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der *E. faecalis*-DNA Positivkontrollen oder minimale Pipettierabweichungen beim Herstellen der Verdünnungsreihen sein. Wichtig ist, dass die Ergebnisse der PCR trotz dieser Umstände valide sind, nur die Nachweisgrenze zu größeren DNA-Mengen verschoben war.

4.2.7 Validität der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den PCR Analysen, in denen *Enterococcus sp.* in Patientenproben entdeckt wurde, sind insofern valide, da sie kontaminationsfrei waren. Kontaminationsfreiheit ist ein wesentlicher Aspekt von Validität. Hinzu kommt die Reproduzierbarkeit. Die Ergebnisse der Überprüfung (Tabelle 11) weichen von den initial positiv getesteten Proben (Tabelle 10) ab, was sich durch die Arbeitsschritte im Labor erklären lässt. Der Umgang mit DNA erfordert bestimmte Voraussetzungen und Verhaltensrichtlinien. Minimale Abweichungen können die Proben beeinflussen und im Verlauf der Experimente die Ergebnisse verändern. Beispielsweise sollten häufiges Auftauen und Einfrieren der DNA-Proben vermieden werden (Jansohn und Rothhämel 2012). Außerdem sind DNA-Bestandteile empfindlich gegenüber starken mechanischen Kräften, die beispielsweise beim maschinellen Schütteln (Vortex®) auf sie einwirken (Jansohn und Rothhämel 2012). Vorgänge wie häufiges Auftauen und Einfrieren und die Verwendung des Vortex® haben unvermeidlich im Verlauf der Laborarbeit regelmäßig an allen Proben stattgefunden und können deren Qualität beeinflusst haben. Außerdem befand sich die Sensitivität der verwendeten Methode an der unteren Nachweisgrenze, was an den späten *crossing points* (vgl. Kap. 3.2.1, Tabelle 9 sowie Kap. 3.4) sichtbar wurde. In der Auswertung der Proben wurde von der ersten PCR als stichhaltigem Ergebnis ausgegangen und diese Proben als tatsächlich positiv gewertet (Tabelle 10).

4.2.7.1 Validität der Ergebnisse durch Wiederholung der Analysen

In den ersten PCR-Analysen mit Patientenproben wurde bei 46 Patienten *Enterococcus*-DNA im Blut detektiert (Tabelle 10). Es ist auf den ersten Blick erstaunlich, dass nur bei 13 Patienten in der zweiten Überprüfung erneut *Enterococcus*-DNA gefunden werden konnte (Tabelle 11). Wie oben beschrieben, können mehrere labortechnische Umstände die DNA-Qualität beeinflussen. Außerdem wurden nur geringe Mengen an Bakterien-DNA

nachgewiesen. Diese geringen Mengen konnten nicht erneut mittels PCR amplifiziert werden, da sich die PCR-Methode generell an der unteren Nachweisgrenze befand. Die initial positiv getesteten Patienten wurden für den Verlauf der Arbeit als Proben mit bakterieller Translokation gewertet.

4.2.7.2 Validität der Ergebnisse durch Agarose-Gelelektrophoresen

Eine weitere Methode, um die Ergebnisse der experimentellen Arbeit zu überprüfen und somit zu bestätigen, war die Agarose-Gelelektrophorese mit ausgewählten Proben (Abbildung 7 und Abbildung 8). Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnte anhand von Positivkontrollen, Negativkontrollen und ausgewählten Patientenproben das Ergebnis der PCR in Form einer Bande auf dem Gel visualisiert werden.

Wie in der Studie von Rinttilä et. al (2004) beschrieben, wird für den Nachweis ein Amplikon von 144 bp Produktlänge erwartet. In den durchgeführten Gelelektrophoresen konnte dies bestätigt werden (Abbildung 7 und Abbildung 8).

4.2.7.3 Validität der Ergebnisse durch Sequenzierung ausgewählter Proben

Mittels Sequenzierung war nur eine Aussage auf Gattungsebene (*Enterococcus*) möglich. Des Weiteren gab es bei einigen wenigen Proben kein Ergebnis (Tabelle 12). Die Differenzierung zwischen Gattung und Spezies hängt von der Spezifität der amplifizierten DNA ab. Wenn sich die Spezies sehr ähnlich sind, wie es für alle Spezies der Gattung *Enterococcus* der Fall ist, binden die Primer an alle passenden DNA-Stränge und es ist nur eine Differenzierung auf Gattungsebene möglich. In zwei *Enterococcus*-negativen Patientenproben wurde humane DNA sequenziert (Tabelle 12). Die Primer F und R, die zwar spezifisch für die Gattung *Enterococcus* waren, konnten auch Bindungen mit humaner DNA eingehen. Da es sich um eindeutig negative Patientenproben, ermittelt anhand des T_m -Wertes, handelte, war die Spezifität der Ergebnisse dadurch nicht negativ beeinflusst.

4.3 Zeitliches Auftreten der bakteriellen Translokationen

Es ist eine Hypothese, dass eine bakterielle Translokation in zeitlicher Nähe zum Ereignis stattfindet und somit bakterielle Translokationen zu Beginn der Blutentnahmen zu finden sind. Im Tiermodell mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein ischämischer Schlaganfall eine bakterielle Translokation nach 72 Std. induziert (Crapser et al. 2016). In der hier vorliegenden Arbeit haben sich die gefundenen bakteriellen Translokationen über den gesamten Blutentnahmezeitraum relativ homogen erstreckt (Abbildung 6). Die Blutentnahmetage

wurden eng gewählt, vor allem zu Beginn wurde das Blut engmaschiger untersucht. Somit ist sehr unwahrscheinlich, dass eine bakterielle Translokation zeitlich verpasst wurde.

4.4 Indirekte Parameter für eine bakterielle Translokation

Im Folgenden sollen die epitheliale Permeabilitätserrhöhung (als Marker galten iFABP und Claudin 3), die gesteigerte Monozytenaktivität (als Marker galt sCD14), das Ausmaß der systemischen Inflammation (als Marker galten PCT, Leukozyten und CRP) und die Schwere des Krankheitsverlaufs (betrachtet wurden der SOFA-Score, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Versterben auf der Intensivstation und 28-Tage- und 90-Tage-Letalität) mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation verglichen werden.

4.4.1 Vergleich der epithelialen Permeabilitätserrhöhung (iFABP und Claudin 3) mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation

Der direkte Nachweis einer bakteriellen Translokation birgt, wie bereits zuvor beschrieben, einige methodische Schwierigkeiten und ist bisher noch keine klinische Routine (Lamprecht und Heininger 2012). Eine weitere Methode, um eine bakterielle Translokation indirekt nachzuweisen, ist die Darstellung der intestinalen Permeabilität mittels Biomarkern aus dem Blut oder Urin (Assimakopoulos et al. 2018). Sind diese Marker erhöht, ist eine gesteigerte Permeabilität naheliegend. Dies kann Hinweise auf das Vorliegen einer bakteriellen Translokation bedingt durch die gesteigerte Durchlässigkeit des Darms geben. Eine Ischämie der Mukosa der Darmschleimhaut, als Reaktion auf posttraumatischen Blutverlust und kardiovaskuläre Regulationsmechanismen, mündet möglicherweise in einer Funktionseinschränkung der intestinalen Barriere und so könnten Bakterien translozieren (Foëx 1999).

Die Ergebnisse aus bisherigen Studien sind nicht eindeutig. Beispielsweise wurde in einer Untersuchung Patienten Lactulose bei Aufnahme auf die Intensivstation oral verabreicht und die Permeabilität dieser Lactulose korrelierte positiv mit der Schwere des Krankheitsverlaufs (Doig et al. 1998). Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien ein schweres Trauma nicht mit einer postoperativen Sepsis in Korrelation gebracht werden. Hier zeigten sich das Auftreten von Infektion und epithelialer Permeabilität als unabhängige Gegebenheiten (Roumen et al. 1993). Getestet wurde des Weiteren die Zucker-Absorption zur Quantifizierung der intestinalen Permeabilität, was sich allerdings bei kritisch kranken Patienten als abhängig von der Nierenfunktion erwies (Oudemans-van Straaten et al. 2002). Bei Patienten mit schwerer Pankreatitis konnte durch Polyethylenglykol die epitheliale Permeabilität mit

einem Schaden der Enterozyten und der Krankheitsschwere in Verbindung gebracht werden (Besselink et al. 2009).

Eine Erhöhung der parazellulären epithelialen Permeabilität konnte bisher in einigen Studien gezeigt werden, allerdings ohne den direkten Nachweis von Bakterien. Bei Patienten nach Endotoxin-Gabe (Hietbrink et al. 2009), bei Patienten mit intrakranieller Blutung (Hernandez et al. 2007) und bei Patienten unter psychischem (Demaude et al. 2006) oder physischem Stress (Marchbank et al. 2011) konnte eine erhöhte parazelluläre epitheliale Permeabilität festgestellt werden.

4.4.1.1 iFABP

Es handelt sich um eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, die langkettige Fettsäuren binden. Sie befinden sich intrazellulär, sind klein und treten bei Zellschaden schnell ins Blut über (Derikx et al. 2008). Das spezifische intestinale FABP befindet sich nur in den Epithelzellen des Jejunums. Es konnte gezeigt werden, dass intestinale Biomarker helfen können, das Risiko für eine bakterielle Translokation bei kritisch kranken Patienten zu ermitteln (Piton und Capellier 2016). Allerdings seien die Biomarker, darunter auch iFABP, mit Vorsicht zu interpretieren und im Gesamtkontext des klinischen Bildes der Patienten zu betrachten (Piton und Capellier 2016).

Abbildung 9 zeigt die Urinkonzentration des iFABP in der Patientengruppe mit bakterieller Translokation und in der Patientengruppe ohne bakterielle Translokation. Einzelne Werte waren in obere Urinkonzentrationsmengen verstreut, aber der Großteil der gemessenen Werte für iFABP im Urin lag unterhalb von 2000 pg/ml (bei einer Nachweisgrenze von 94 pg/ml). Zwar scheint die Konzentration von iFABP im Vergleich zu gesunden Individuen in einer Kontrollgruppe (20 pg/ml) aus einer Studie mit HIV-infizierten Patienten (Sandler et al. 2011) erhöht zu sein, jedoch gab es entgegen der oben genannten Hypothese keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“. Somit bestand keine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von iFABP im Urin und einer bakteriellen Translokation.

4.4.1.2 Claudin 3

Claudin 3 ist ein Bestandteil der *tight junctions*. Eine erhöhte Konzentration im Blut oder im Urin gibt einen Hinweis auf eine erhöhte Durchlässigkeit zwischen den Epithelzellen durch defekte *tight junctions* (Derikx et al. 2008). *Tight junctions* fungieren als Diffusionsbarriere, die den parazellulären Übergang von gelösten Stoffen mittels Diffusion reguliert (Anderson und Van Itallie 1995).

Abbildung 10 zeigt die Urinkonzentration von Claudin 3 (bei einer Nachweisgrenze 0,625 ng/ml) bei der Patientengruppe mit bakterieller Translokation und in der Patientengruppe ohne bakterielle Translokation. Bei einem Defekt der *tight junctions*, welcher zu einer verstärkten Durchlässigkeit des Epithels führt, findet sich Claudin 3 im Urin oder Blut. Zu vermuten wäre dann eine verstärkte Möglichkeit der bakteriellen Translokation zwischen den Epithelzellen (parazellulär).

In Abbildung 10 zeigt sich kein einheitliches Bild für ein vermehrtes Auftreten von Claudin 3 in der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation. Im Median lagen die Werte sogar im Bereich der Nachweisgrenze bzw. knapp unterhalb der Nachweisgrenze von 0,625 mg/ml. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Medianen der beiden verglichenen Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“. Somit ließ sich auch für Claudin 3 aus dem Urin der Patienten keine positive Korrelation mit bakterieller Translokation feststellen.

4.4.2 Vergleich der gesteigerten Monozytenaktivität (sCD14) mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation

Soluble CD14 ist die lösliche Form des membranständigen Rezeptors CD14 von Monozyten und Makrophagen. Es kann im Plasma oder Urin nachgewiesen werden (Krüger et al. 1991). Freisetzung von sCD14 ist ein indirekter Marker für eine Endotoxinämie (Shive et al. 2015). CD14 kann Bindungen mit Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien (Kitchens und Thompson 2005) und Zellwandbestandteilen grampositiver Bakterien eingehen (Pugin et al. 1994). Es ist ein unspezifischer Marker für eine gesteigerte Monozytenaktivität (Shive et al. 2015). Bakterielle Infektionen, z. B. Infektionen mit *Enterobacter* (Soler-Rodriguez et al. 2000) oder *E. coli* (Cauwels et al. 1999) verursachen höhere Konzentrationen an sCD14 im Blut. Eine Bindung an den CD14-Rezeptor setzt eine Kaskade zur Aktivierung der Immunantwort mit gesteigerter Tumornekrosefaktorproduktion in Gang. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an sCD14 bei Verbrennungsoptionen mit septischem Krankheitsverlauf und bei Traumapatienten signifikant erhöht ist (Krüger et al. 1991). Auch Landmann et al. (1996) zeigten die höchsten Serumkonzentrationen an sCD14 bei septischen Patienten. Das sCD14 hat neben den proinflammatorischen Eigenschaften allerdings auch antiinflammatorische Funktionen. Beispielsweise kann sCD14 das Wachstum von Bakterien verringern (Ohnishi et al. 2010) oder die Ausschüttung bestimmter Interleukine unterdrücken (Arias et al. 2000). Bis heute sind die genauen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt.

Abbildung 11 veranschaulicht die Blutkonzentration von sCD14. Ist die Darmbarriere gestört, wäre ein gemeinsames Übertreten von grampositiven Enterokokken im Rahmen der bakteriellen Translokation mit gramnegativen bakteriellen Lipopolysacchariden aus dem Darm denkbar. Die Zellwandbestandteile der grampositiven Enterokokken oder die gramnegativen bakteriellen Lipopolysaccharide wiederum könnten an den CD14-Rezeptor binden und eine Immunkaskade aktivieren, sodass sich die Inflammation im Körper ausbreitet. In Abbildung 11 lässt sich erkennen, dass die Konzentration an sCD14 in beiden Gruppen, „bakterielle Translokation“ und „nicht bakterielle Translokation“, annähernd gleich war. An den Blutentnahmetagen 7, 10 und 14 war die Konzentration von sCD14 sogar in der Gruppe ohne bakterielle Translokation deutlich höher. In der Kontrollgruppe aus einer Studie mit HIV-infizierten Patienten und einhergehender erhöhter intestinaler Permeabilität und schlechterem klinischen Outcome konnten ähnliche Konzentrationen (Median $2,33 \times 10^6$ pg/ml = 2330000 pg/ml) (Sandler et al. 2011) an sCD14 gemessen werden wie in den hier gezeigten Gruppen „bakterielle Translokation“ und „nicht bakterielle Translokation“ (Median 2000 ng/ml = 2000000 pg/ml). Somit konnte eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten einer bakteriellen Translokation und einer progredienten systemischen Inflammation durch eine gesteigerte Monozytenaktivität nicht dargestellt werden.

4.4.3 Vergleich Ausmaß der systemischen Inflammation (PCT, Leukozyten und CRP) mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation

Es ist im Folgenden zu erörtern, inwieweit die Marker der systemischen Inflammation in Korrelation mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation zu bringen sind. Vergleiche dazu Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14.

4.4.3.1 Procalcitonin

Das Protein Procalcitonin gilt als bester klinischer Marker für ein septisches Geschehen. PCT hat gegenüber anderen Biomarkern viele Vorteile in der Diagnostik von entzündlichen Zuständen (Maruna et al. 2000). Eine Erhöhung gibt vor allem Hinweis auf eine bakterielle Infektion. PCT hat eine hohe Spezifität und Sensitivität für das Krankheitsbild der Sepsis (Hagel und Brunkhorst 2011). Die Plasmakonzentration von PCT korreliert positiv mit dem Verlauf und der Schwere einer entzündlichen Reaktion (Gramm et al. 1995). Ab Konzentrationen von $> 2 \mu\text{g/l}$ (= 2 ng/ml) kann man von einem hohen Risiko für das Bestehen einer schweren bakteriellen Infektion bzw. Sepsis ausgehen. Nachteilig ist bei diesem Biomarker allerdings, dass er bei schwerem SIRS aufgrund von Polytrauma, großer Operation,

Schockzuständen, schweren Verbrennungen oder immunsuppressiver Therapie ebenfalls erhöht sein kann (Hagel und Brunkhorst 2011).

In Abbildung 12 wird die Plasmakonzentration von PCT dargestellt. Sowohl in der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation als auch in der Gruppe der Patienten ohne bakterielle Translokation waren erhöhte Konzentrationen an PCT messbar (Referenzwert: $< 0,5 \mu\text{g/l}$), die zu einer mäßigen ($0,5\text{--}2 \mu\text{g/l}$) systemischen Entzündungsreaktion passen. Alle in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten waren kritisch krank (vgl. Kap. 2.8) und wurden zu einem großen Teil auf der Intensivstation beatmet. Dieser kritisch kranke Zustand mit inflammatorischen Prozessen kann die Erhöhung der Entzündungswerte erklären. Im hier vorliegenden Fall waren die PCT-Konzentrationen in der Gruppe ohne bakterielle Translokation teilweise sogar höher als in der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation. Eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten einer bakteriellen Translokation und einer systemischen Entzündungsreaktion konnte hier nicht gezeigt werden.

4.4.3.2 Leukozyten

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kann es sowohl zum Anstieg als auch zum Abfall der Leukozytenzahl kommen. Im Labor zeigt sich eine Leukozytose oder eine Leukopenie, die im Zusammenspiel mit weiteren Laborparametern Hinweise auf den Zustand des Patienten geben können. Als Sepsismarker haben Leukozyten jedoch eine geringe Spezifität (Hagel und Brunkhorst 2011). Die Two-Hit-Hypothese (vgl. Kap. 1.2) erklärt, inwieweit das Trauma selbst als *first hit* einen komplexen Ablauf der humoralen und zellulären Immunantwort nach sich zieht und in ein SIRS und später in ein Multiorganversagen übergehen kann (Wutzler et al. 2013). Entsprechend der Krankheitsbilder der in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten ist es nachvollziehbar, dass sich erhöhte Leukozytenwerte messen ließen. Die Leukozytenanzahl ist in Abbildung 13 dargestellt. Sowohl bei Patienten mit bakterieller Translokation als auch bei Patienten ohne bakterielle Translokation waren meist erhöhte Leukozytenwerte festzustellen (Referenzwert: $4000\text{--}10000/\mu\text{l}$). Eine Leukozytose im Rahmen eines Traumas, welches zur systemischen Inflammation führt, ist plausibel. Jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ zu finden.

4.4.3.3 C-reaktives Protein

Ähnlich wie beim PCT und den Leukozyten verhielt es sich beim Akute-Phase-Protein CRP (Abbildung 14). Die in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben wiesen zum größten Teil ein erhöhtes CRP auf (Referenzwert $< 5 \text{ mg/l}$). Das CRP steigt etwa nach 6–12 Std. nach

einer Entzündungsreaktion im Körper an und hat eine Halbwertszeit von etwa 24 Std. Die Bestimmung des CRP ist weniger spezifisch und weniger sensitiv (Hagel und Brunkhorst 2011) in Bezug auf eine bakterielle Infektion, wird aber im Rahmen der Basisdiagnostik bestimmt und gibt Hinweise auf ein infektiöses Geschehen unterschiedlicher Genese. Bei bakteriellen Infektionen ist meist ein höherer Anstieg zu erwarten, dies ist jedoch nicht in jedem Fall so. Das CRP hat keine Organ- oder Krankheitsspezifität (Hagel und Brunkhorst 2011). Die Erhöhung des CRP ist, wie auch in den Abschnitten zu PCT und Leukozyten beschrieben, durch das Traumaereignis, eine Pneumonie oder ein ARDS (vgl. Kap. 2.8) zu erklären. Normwertige CRP-Konzentrationen wären im Falle dieser Patientengruppen unwahrscheinlich. In Abbildung 14 lässt sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ im Anstieg des CRP erkennen. Insgesamt ist festzustellen, dass sowohl die Werte für PCT, Leukozyten als auch CRP in den beiden untersuchten Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ erhöht waren. Die Hypothese, dass eine bakterielle Translokation ein höheres Ausmaß einer systemischen Inflammation hervorruft, konnte nicht bestätigt werden.

4.4.4 Vergleich der Schwere des Krankheitsverlaufs mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation

Um die Schwere des Krankheitsverlaufs darzustellen, wurden verschiedene Parameter ausgesucht, die Auskunft über die klinische Symptomatik im Krankheitsgeschehen geben. Zu diskutieren ist, ob eine bakterielle Translokation zu einer Zunahme der Schwere des Krankheitsbildes führt oder nicht. Dazu werden im Folgenden die einzelnen Parameter in Bezug zur gefundenen bakteriellen Translokation gesetzt und das Ergebnis kritisch diskutiert.

4.4.4.1 SOFA-Score

Der SOFA-Score (Vincent et al. 1996) wird alle 24 Std. bestimmt und gibt Auskunft über das Mortalitätsrisiko des Patienten. Ein Anstieg des Scores im Vergleich zum vorherigen Punktwert deutet auf eine Organdysfunktion, zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, hin. In die Punktevergabe fließen Lungenfunktion, Nierenfunktion, Leberfunktion, Kreislauffunktion, Blutbild und der GCS (Tabelle 13) ein.

Tabelle 13: SOFA-Score

modifiziert nach Vincent et al. (1996), MAD (mittlerer arterieller Druck), ZNS (Zentrales Nervensystem), GCS (Glasgow Coma Scale).

SOFA-Score					
Parameter	0	1	2	3	4
Lungenfunktion: P_aO₂/F_iO₂	> 400 mmHg	< 400 mmHg	< 300 mmHg	< 200 mmHg (mit Beatmung)	< 100 mmHg (mit Beatmung)
Nierenfunktion: Kreatinin (mg/dl)	< 1,2	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 oder Oligurie	≥ 5 oder Anurie
Leberfunktion: Bilirubin (mg/dl)	< 1,2	1,2–1,9	2,0–5,9	6–11,9	≥ 12
Kreislauffunktion: MAD mit/ohne Katecholamine	keine Hypotension	< 70	Katechola- mindosis niedrig	Katechola- mindosis mittel	Katechola- mindosis hoch
Blutbild: Thrombozytenabfall	> 150 /nl	< 150/nl	< 100/nl	< 50/nl	< 20/nl
ZNS: GCS	15	13–14	10–12	6–9	< 6

Abbildung 15 zeigt den Wert der Patienten im SOFA-Score an den verschiedenen Blutentnahmetagen. Verglichen wurden in der Grafik die Patientengruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“. Auffallend ist, dass die Werte der beiden Gruppen ähnlich hoch waren. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass eine bakterielle Translokation nicht entscheidend zu einer Zunahme der Organdysfunktion, ausgedrückt durch den SOFA-Score-Punktwert, führt. Eine bakterielle Translokation kann nicht maßgeblich für eine Zunahme des SOFA-Scores verantwortlich sein.

4.4.4.2 Auftreten eines SIRS in Bezug zu bakterieller Translokation

Obwohl die SIRS-Definition in der Sepsis-3-Definition von 2016 nicht mehr relevant ist, sind Kenntnisse über die SIRS-Kriterien und SIRS-Trigger hilfreich. SIRS als systemisch inflammatorische Reaktion des Körpers auf einen unspezifischen Auslöser ohne das notwendige Vorliegen einer Infektion (Bracht et al. 2019) spielt unter anderem bei polytraumatisierten Patienten, Verbrennungsoptern oder nach schweren Operationen eine Rolle (Balk 2014; Deitch et al. 2006).

Mit der Hypothese, dass eine bakterielle Translokation die Schwere des Krankheitsverlaufs negativ beeinflussen kann, wäre eine höhere Anzahl von SIRS-Fällen in der Gruppe der Patienten mit positiver bakterieller Translokation anzunehmen. In der Entwicklung eines SIRS nach Trauma, Verbrennung oder Schock gilt der Darm schon lange als einer der entscheidenden Trigger, wobei die genaue Pathogenese noch nicht abschließend geklärt ist (Deitch et al. 2006). Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen den beiden Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ in Bezug auf das Auftreten eines SIRS. Im Vergleich dieser beiden Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Somit konnte die Hypothese der Aufrechterhaltung oder Auslösung eines SIRS durch bakterielle Translokation nicht bestätigt werden. Bedenkt man die Theorie, dass bakterielle Translokation als normales Phänomen (Berg und Garlington 1979) (vgl. Kap. 1.4.4) auftreten kann, führt eine Translokation nicht notwendigerweise zu einem Krankheitswert, im hier vorliegenden Fall zum Auftreten eines SIRS.

4.4.4.3 Auftreten einer Sepsis in Bezug zu bakterieller Translokation

Die Rolle der bakteriellen Translokation in der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Sepsis wird schon lange diskutiert. Es stellt sich die Frage nach dem genauen Einfluss einer bakteriellen Translokation auf Sepsis und Multiorganversagen. Die „Gut as a Motor of Sepsis“-Hypothese (Mittal und Coopersmith 2014) ist schon lange Gegenstand medizinischer Forschung (vgl. Kap. 1.4.1). Es bleibt jedoch uneindeutig, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen bakterieller Translokation und dem Auftreten einer Sepsis bis hin zu Multiorganversagen besteht (Lemaire et al. 1997). Zwar konnte beispielsweise das Krankheitsbild der schweren Pankreatitis in Zusammenhang mit gestörter intestinaler Barriere, Organversagen und erhöhter Mortalität in Verbindung gebracht werden (Besselink et al. 2009), jedoch lässt sich dies nicht ohne Weiteres auf die hier untersuchten Patienten übertragen. Auch der PCR-basierte Nachweis von Bakterienbestandteilen im Blut von HIV-Patienten stand in Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität in diesem Patientenkollektiv (Kramski et al. 2011).

In Abbildung 17 wird deutlich, dass zwar etwas mehr Patienten mit bakterieller Translokation eine Sepsis aufwiesen, dies aber keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe ohne bakterielle Translokation darstellte. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen bakterieller Translokation und der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Sepsis gefunden werden.

4.4.4.4 Auftreten einer schweren Sepsis in Bezug zu bakterieller Translokation

Ähnlich wie in 4.4.4.3 beschrieben, verhielt es sich beim Vergleich der beiden Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ in Bezug auf die Entwicklung einer schweren Sepsis. In Abbildung 18 ist gezeigt, dass eine schwere Sepsis bei der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation leicht vermehrt, aber nicht signifikant vermehrt, auftrat. Da kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen erkennbar war, kann kein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer schweren Sepsis und dem Vorhandensein einer bakteriellen Translokation gefunden werden. Zur Entwicklung einer schweren Sepsis müssen in der hier vorliegenden Arbeit andere Faktoren beigetragen haben.

4.4.4.5 Auftreten eines septischen Schocks in Bezug zu bakterieller Translokation

In Abbildung 19 ist das Vorkommen eines septischen Schocks bei Patienten mit und ohne bakterielle Translokation gezeigt. Genau wie in Kap. 4.4.4.3 und Kap. 4.4.4.4 war kein signifikanter Unterschied der Gruppen „bakterielle Translokation“ und „keine bakterielle Translokation“ in Bezug auf die Entwicklung eines septischen Schocks zu finden. Zur Entwicklung und Aufrechterhaltung des septischen Schocks müssen weitere Ursachen in einem multikausalen Zusammenhang vermutet werden.

4.4.4.6 Versterben auf der Intensivstation in Bezug zu bakterieller Translokation

Das Outcome der Patienten wurde mittels des Parameters „Versterben auf Intensivstation“ ermittelt. Hätte sich die Hypothese, dass eine bakterielle Translokation ursächlich für das Entstehen und die Aufrechterhaltung einer Sepsis ist, bestätigt, wäre zu vermuten gewesen, dass Patienten aus der Gruppe mit bakterieller Translokation eher versterben. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass die Akutletalität in der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation nicht signifikant erhöht war. Dies zeigt erneut, dass die Theorie der bakteriellen Translokation als kausaler Faktor für die Zunahme der Schwere des Krankheitsbildes nicht bestätigt werden konnte.

4.4.4.7 28-Tage- und 90-Tage-Letalität im Bezug zu bakterieller Translokation

Ähnlich wie bei 4.4.4.6 wurde das Outcome der Patienten nach 28 und 90 Tagen bewertet. Auch hier zeigte sich keine signifikant erhöhte Letalität in der Gruppe der Patienten mit bakterieller Translokation (Abbildung 21 und Abbildung 22).

4.5 Ausblick

Diese prospektive Kohortenstudie konnte keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer bakteriellen Translokation und einer gesteigerten systemischen Inflammation und Schwere des Krankheitsverlaufs aufzeigen. Ursache und Wirkung der bakteriellen Translokation sind nicht zu differenzieren.

Für die Erregerdiagnostik mittels PCR stehen noch viele Fragen zu Sensitivität und Spezifität, Kosten und Verfügbarkeit der Methode offen (Hagel und Brunkhorst 2011). Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich die Limitation der Methode (vgl. Kap. 4.2.4). Kritisch zu betrachten ist außerdem die Frage, über welchen Weg die Bakterien translozieren können (vgl. Kap. 1.4.3). Die Theorie der systemischen bakteriellen Translokation konnte bisher durch klinische Daten noch nicht belegt werden (Assimakopoulos et al. 2018). Lediglich die Theorie, dass bakterielle Bestandteile über die mesenterialen Lymphknoten in den systemischen Kreislauf gelangen können, wurde experimentell bewiesen (Deitch et al. 2006). Welchen Weg die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien der Spezies *Enterococcus sp.* genommen haben könnten, bleibt unklar. Eine gestörte intestinale Barrierefunktion spielt in beiden oben genannten Theorien eine entscheidende Rolle. Diese Barrierefunktionsstörung konnte mithilfe von ausgewählten Biomarkern (vgl. Kap. 3.6.1 und Kap. 3.6.2) in dieser Arbeit nicht in Korrelation mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation gebracht werden. Die hier gefundenen Bakterien der Gattung *Enterococcus* passen zu dem Erregerspektrum einer Sepsis und es ist verständlich, dass Theorien über die Translokation von Bakterien aus dem Darm entwickelt wurden.

Allerdings bleiben sie umstritten, vor allem der kausale Zusammenhang in Bezug auf das Outcome der Patienten ist unklar. Möglicherweise können PAMPs mitverantwortlich für die Entwicklung einer Sepsis sein, wenn bakterielle Translokation stattfindet (Tsujimoto et al. 2009). Dass bakterielle Translokation beim Menschen stattfindet, konnte auch in dieser Untersuchung gezeigt werden. Bisher fehlen jedoch eindeutige Daten zur Korrelation der bakteriellen Translokation mit ihrer klinischen Bedeutsamkeit (Tsujimoto et al. 2009). In dieser Arbeit konnte die krankheitsverursachende Rolle der Bakterien der Spezies *Enterococcus sp.* bei kritisch kranken Patienten nicht dargestellt werden. Ein alleiniger kausaler Zusammenhang konnte durch die vorgestellten Daten sogar ausgeschlossen werden. Einer Rolle der bakteriellen Translokation innerhalb eines multifaktoriellen Geschehens widersprechen die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer generalisierten Entzündungsreaktion spielt bei den in dieser Studie untersuchten Patientenkollektiven eine wichtige Rolle. So haben Veränderungen im kardiovaskulären System und in immunologischen bzw. inflammatorischen Prozessen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf. Eine verringerte Durchblutung des Darms kann Einflüsse auf die Permeabilität der Darmschleimhaut haben und zu einem Verlust der Barrierefunktion mit bakterieller Translokation führen.

Die bakterielle Translokation wurde bereits 1979 von Berg und Garlington beschrieben und ist seither Gegenstand der medizinischen Forschung. Es gibt aktuell zwei Theorien, welchen Weg die Bakterien oder deren Bestandteile aus dem Darm nehmen können.

Durch die systemische bakterielle Translokation können Bakterien oder deren pathogene Bestandteile ursächlich auf dem Boden einer gestörten intestinalen Barriere in das portal-venöse System übertreten und so in den systemischen Kreislauf gelangen. Diese Theorie konnte bislang nicht durch klinische Daten untermauert werden.

Die Gut-Lymph-Hypothese besagt, dass DAMPs aufgrund einer intestinalen Barrierefunktionsstörung in die mesenterialen Lymphknoten und über den *Ductus thoracicus* zur Lunge gelangen und dort ein akutes Lungenversagen auslösen können. Über die V. *subclavia* können die DAMPs in den systemischen Kreislauf gelangen und zu SIRS oder MODS nach vorangegangenem Trauma oder Schock führen. Diese Theorie gilt heute als wahrscheinlicher, da sie experimentell bewiesen werden konnte.

Die Theorie „*gut as a motor of sepsis*“ ist eine Kombination aus Effekten, die zum septischen Krankheitsbild führen oder es vorantreiben. Zerstörung der Mukosaschicht, Veränderungen im Mikrobiom, gestörte Proliferation und Apoptose des Epithels und Translokation von Bakterien können als „Motor einer Sepsis“ fungieren.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde die Methode der *real-time* PCR zum Nachweis von Enterococcus-DNA angewandt. Blutproben der in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden aufgearbeitet und deren DNA mittels MagNA Pure LC 2.0 isoliert. Nach Aufbereitung der Patientenproben und Herstellen von Positivkontrollen für *E. faecalis* wurden die *real-time* PCR-Analysen mit dem LightCycler® 480 durchgeführt. Bei einigen ausgewählten Ergebnissen wurden Agarose-Gelelektrophoresen zur Bestätigung angefertigt. Zur beispielhaften Bestätigung der Ergebnisse der PCR-Analysen wurden in einigen Fällen Sequenzierungen durchgeführt.

Mithilfe der *real-time* PCR konnte das Vorliegen von *Enterococcus*-DNA im Blut von 46 kritisch kranken Patienten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse waren insofern valide, da sie kontaminationsfrei waren. Zwar war die Reproduzierbarkeit durch die Beeinflussung der DNA-Qualität im Rahmen der Laborarbeit eingeschränkt, allerdings befand sich die Methode auch an der unteren Nachweisgrenze, was an den späten *crossing points* deutlich wurde. In der Auswertung der Proben wurde von der ersten PCR als stichhaltigem Ergebnis ausgegangen und diese Proben als positiv gewertet.

Mittels Sequenzierung einiger ausgewählter Proben war nur eine Aussage auf Gattungsebene (*Enterococcus*) möglich. Zu erklären ist dies durch die Spezifität der amplifizierten DNA. Alle Spezies der Gattung *Enterococcus* sind sich sehr ähnlich und die Primer binden an alle passenden DNA-Stränge.

Es bestand keine statistisch signifikante Korrelation zwischen epithelialer Permeabilitäts-erhöhung, gesteigerter Monozytenaktivität, dem Ausmaß der systemischen Inflammation oder der Schwere des Krankheitsverlaufs mit dem Auftreten einer bakteriellen Translokation der Spezies *Enterococcus sp.*

Die Hypothese, es könne ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer bakteriellen Translokation und einem septischen Krankheitsbild bestehen, konnte mittels dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Hypothese, dass eine bakterielle Translokation als einer von vielen Bestandteilen der systemischen Reaktion auf ein Trauma stattfindet, ist wahrscheinlich und wird von den Ergebnissen dieser Untersuchung getragen. Ein unifaktorieller oder direkt kausaler Zusammenhang der bakteriellen Translokation auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines SIRS, einer Sepsis, einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks kann durch die Ergebnisse der Studie ausgeschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ambrose NS, Johnson M, Burdon DW, Keighley MR (1984): Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during crohn's disease surgery. *Br J Surg* 71, 623-625
- Anderson JM, Van Itallie CM (1995): Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269, G467-G475
- Arias MA, Rey Norez JE, Vita N, Stelter F, Borysiewicz LK, Ferrara P, Labeta MO (2000): Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production. *J Immunol* 164, 3480-3486
- Assimakopoulos SF, Scopa CD, Vagianos CE (2007): Pathophysiology of increased intestinal permeability in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 13, 6458-6464
- Assimakopoulos SF, Triantos C, Thomopoulos K, Fligou F, Maroulis I, Marangos M, Gogos CA (2018): Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment. *Infection* 46, 751-760
- Bai M, Jiang Z, Liu Y (1996): Glutamine dipeptide attenuate mucosal atrophic changes and preservation of gut barrier function following 5-FU intervention. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi (Chinese Journal of Surgery)* 34, 370-373
- Balk RA (2014): Systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Virulence* 5, 20-26
- Beckmann G, Rüffer A: *Mikroökologie des Darmes: Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Schlütersche Verlag, Hannover 2000
- Berg RD, Garlington AW (1979): Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 23, 403-411
- Berg RD, Wommack E, Deitch EA (1988): Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg* 123, 1359-1364
- Besselink MG, van Santvoort HC, Renooij W, de Smet MB, Boermeester MA, Fischer K, Timmerman HM, Ahmed Ali U, Cirkel GA, Bollen TL, et al. (2009): Intestinal barrier dysfunction in a randomized trial of a specific probiotic composition in acute pancreatitis. *Ann Surg* 250, 712-719
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655
- Border JR, Hassett J, LaDuca J, Seibel R, Steinberg S, Mills B, Losi P, Border D (1987): The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS = 40) in the ICU. *Ann Surg* 206, 427-448
- Bracht H, Hafner S, Weiß M (2019): Sepsis-Update: Definition und Epidemiologie. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 54, 10-20
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2020): *Enterokokken* – Mikroorganismen mit positiven und negativen Eigenschaften. https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2002/B/enterokokken_mikroorganismen_mit_positiven_und_negativen_eigenschaften-1456.html; abgerufen am 15.07.2019
- Butt I, Shrestha BM (2008): Two-hit hypothesis and multiple organ dysfunction syndrome. *JNMA J Nepal Med Assoc* 47, 82-85

- Cauwels A, Frei K, Sansano S, Fearn C, Ulevitch R, Zimmerli W, Landmann R (1999): The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis. *J Immunol* 162, 4762-4772
- Corr SC, O'Neill LAJ (2009): Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases. *J Innate Immun* 1, 350-357
- Crapser J, Ritzel R, Verma R, Venna VR, Liu F, Chauhan A, Koellhoffer E, Patel A, Ricker A, Maas K, et al. (2016): Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice. *Aging (Albany NY)* 8, 1049-1063
- De-Souza DA, Greene LJ (2005): Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 33, 1125-1135
- Deitch EA (1989): Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 124, 699-701
- Deitch EA (2002): Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery* 131, 241-244
- Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD (1990): Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 159, 79-84
- Deitch EA, Xu D, Kaise VL (2006): Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 11, 520-528
- Demaude J, Salvador-Cartier CF, J. Ferrier, L., Bueno L (2006): Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655-661
- Derikx JPM, Luyer M, Heineman E, Buurman W (2010): Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J Gastroenterol* 16, 5272-5279
- Derikx JPM, van Waardenburg DA, Thuijls G, Willigers HM, Koenraads M, van Bijnen AA, Heineman E, Poeze M, Ambergen T, van Ooij A, et al. (2008): New insight in loss of gut barrier during major non-abdominal surgery. *PLoS One* 3, e3954
- Disqué C (2007): Einfluss der DNA-Extraktion auf die PCR-Detektion von Sepsiserregern. *BIOspektrum* 6, 627-629
- Doig CJ, Sutherland LR, Dean Sandham J, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB (1998): Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 444-451
- Dupré I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA (2003): Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 52, 491-498
- Ertmer C, Rehberg S (2016): Pathophysiologie der Sepsis. *Dtsch Med Wochenschr* 141, 1067-1073
- Euzéby JP (1997): List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Evol Microbiol* 47, 590-592
- Fachausschuss Antibiotika-Therapie (2014): VRE – *Enterococcus faecium/faecalis*. http://www.mre-netzwerk-mittelhessen.de/images/downloads/Dokumente_20150107/Empfehlungen_VRE_14-05-05.pdf; abgerufen am 15.07.2019

- Fleischmann C, Hartmann M, Hartog C, Welte T, Heublein S, Thomas-Rueddel D, Dennler U, Reinhart K (2015): Epidemiology of sepsis in germany: incidence, mortality and associated costs of care 2007–2013. *Intensive Care Med Exp* **3**, A50
- Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K (2016): Hospital incidence and mortality rates of sepsis. *Dtsch Arztebl Int* **113**, 159-166
- Foëx BA (1999): Systemic responses to trauma. *Br Med Bull* **55**, 726-743
- Garside P, Millington O, Smith KM (2004): The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 9-15
- Gatt M, Reddy BS, Macfie J (2006): Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther* **25**, 741-757
- Gramm H-J, Dollinger P, Beier W (1995): Procalcitonin – ein neuer Marker der inflammatorischen Wirtsantwort. Longitudinalstudien bei Patienten mit Sepsis und Peritonitis. *Chir Gastroenterol* **11**, 51–54
- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994): PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **32**, 335-351
- Hagel S, Brunkhorst F (2011): Sepsis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* **48**, 57-73
- Haglund U, Hulten L, Ahren C, Lundgren O (1975): Mucosal lesions in the human small intestine in shock. *Gut* **16**, 979-984
- Hemschemeier SK, Kriese J, Meyer-Rogge K (o.J.): Einführung in die PCR. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/annealing.vscml.html; abgerufen am 18.06.2019
- Herbert MK, Holzer P (2008): Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients – current status and future options. *Clin Nutr* **27**, 25-41
- Hernandez G, Hasbun P, Velasco N, Wainstein C, Buggedo G, Bruhn A, Klaassen J, Castillo L (2007): Splanchnic ischemia and gut permeability after acute brain injury secondary to intracranial hemorrhage. *Neurocrit Care* **7**, 40-44
- Hietbrink F, Besselink MG, Renooij W, de Smet MB, Draisma A, van der Hoeven H, Pickkers P (2009): Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock* **32**, 374-378
- Holland J, Carey M, Hughes N, Sweeney K, Byrne PJ, Healy M, Ravi N, Reynolds JV (2005): Intraoperative splanchnic hypoperfusion, increased intestinal permeability, down-regulation of monocyte class II major histocompatibility complex expression, exaggerated acute phase response, and sepsis. *Am J Surg* **190**, 393-400
- Hua TC, Mochhala SM (2000): Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation. *J Surg Res* **93**, 247-256
- Huber-Lang M (2018): Sepsis nach Polytrauma. *Trauma Berufskrankh* **20**, 73-76
- Jansohn M, Rothhämel S (Hrsg.): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2012

- Kabaroudis A, Papaziogas B, Koutelidakis I, Kyparissi-Kanellaki M, Kouzi-Koliakou K, Papaziogas T (2003): Disruption of the small-intestine mucosal barrier after intestinal occlusion: a study with light and electron microscopy. *J Invest Surg* 16, 23-28
- Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA (1998): The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 227, 1-9
- Karsten TM, van Gulik TM, Spanjaard L, Bosma A, van der Bergh Weerman MA, Dingemans KP, Dankert J, Gouma DJ (1998): Bacterial translocation from the biliary tract to blood and lymph in rats with obstructive jaundice. *J Surg Res* 74, 125-130
- Kitchens RL, Thompson PA (2005): Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 11, 225-229
- Kramski M, Gaeguta AJ, Lichtfuss GF, Rajasuriar R, Crowe SM, French MA, Lewin SR, Center RJ, Purcell DFJ (2011): Novel sensitive real-time PCR for quantification of bacterial 16S rRNA genes in plasma of HIV-infected patients as a marker for microbial translocation. *J Clin Microbiol* 49, 3691-3693
- Krüger C, Schütt C, Obertacke U, Joka T, Müller FE, Knöller J, Köller M, König W, Schönfeld W (1991): Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol* 85, 297-301
- Küçükaydin M, Kocaoğlu C, Köksal F, Kontaş O (2000): Detection of intestinal bacterial translocation in subclinical ischemia-reperfusion using the polymerase chain reaction technique. *J Pediatr Surg* 35, 41-43
- Lamprecht G, Heininger A (2012): Current aspects of sepsis caused by bacterial translocation. *Zentralbl Chir* 137, 274-278
- Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W (1996): Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis* 173, 661-668
- Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ (1997): Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg* 84, 1340-1350
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31, 1250-1256
- Ma EL, Smith AD, Desai N, Cheung L, Hanscom M, Stoica BA, Loane DJ, Shea-Donohue T, Faden AI (2017): Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun* 66, 56-69
- MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ (2006): Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg* 93, 87-93
- Marchbank T, Davison G, Oakes JR, Ghatei MA, Patterson M, Moyer MP, Playford RJ (2011): The nutraceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G477-484
- Maruna P, Nedelníková K, Gürlich R (2000): Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiol Res* 49 Suppl 1, S57-61
- Mittal R, Coopersmith CM (2014): Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med* 20, 214-223

- Mizuno T, Yokoyama Y, Nishio H, Ebata T, Sugawara G, Asahara T, Nomoto K, Nagino M (2010): Intraoperative bacterial translocation detected by bacterium-specific ribosomal RNA-targeted reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the mesenteric lymph node strongly predicts postoperative infectious complications after major hepatectomy for biliary malignancies. *Ann Surg* 252, 1013-1019
- Moellering RC, Jr. (1992): Emergence of Enterococcus as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 14, 1173-1178
- Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, Parsons PE (1991): Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma* 31, 629-638
- Mutlu GM, Mutlu EA, Factor P (2001): GI complications in patients receiving mechanical ventilation. *Chest* 119, 1222-1241
- Navarro E, Escribano J, Fernández JA, Solera J (2002): Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 147-151
- Neunaber C, Zeckey C, Andruszkow H, Frink M, Mommsen P, Krettek C, Hildebrand F (2011): Immunomodulation in polytrauma and polymicrobial sepsis – where do we stand? *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 5, 17-25
- Neusser M (2001): Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit „Real-Time“-PCR. *BIOspektrum* 6, 539-541
- O'Boyle CJ, Macfie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC (1998): Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 42, 29-35
- Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S (2003): Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res* 115, 18-23
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K-I (2010): Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth. *Microbiol Immunol* 54, 74-80
- Ono S, Tsujimoto H, Yamauchi A, Hiraki S, Takayama E, Mochizuki H (2005): Detection of microbial DNA in the blood of surgical patients for diagnosing bacterial translocation. *World J Surg* 29, 535-539
- Oudemans-van Straaten HM, van der Voort PJ, Hoek FJ, Bosman RJ, van der Spoel JI, Zandstra DF (2002): Pitfalls in gastrointestinal permeability measurement in ICU patients with multiple organ failure using differential sugar absorption. *Intensive Care Med* 28, 130-138
- Peitzman AB, Udekwu AO, Ochoa J, Smith S (1991): Bacterial translocation in trauma patients. *J Trauma* 31, 1083-1087
- Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92-95
- Piton G, Capellier G (2016): Biomarkers of gut barrier failure in the ICU. *Curr Opin Crit Care* 22, 152-160
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ (1994): CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1, 509-516
- Reynolds JV, Murchan P, Leonard N, Clarke P, Keane FB, Tanner WA (1996): Gut barrier failure in experimental obstructive jaundice. *J Surg Res* 62, 11-16

- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A (2004): Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Appl Microbiol* 97, 1166-1177
- Rombeau JL, Takala J (1997): Summary of round table conference: gut dysfunction in critical illness. *Intensive Care Med* 23, 476-479
- Roumen RM, Hendriks T, Wevers RA, Goris JA (1993): Intestinal permeability after severe trauma and hemorrhagic shock is increased without relation to septic complications. *Arch Surg* 128, 453-457
- Saadia R, Schein M (1999): Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model? *J Accid Emerg Med* 16, 163-167
- Sagar PM, MacFie J, Sedman P, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D (1995): Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum* 38, 640-644
- Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, et al. (2011): Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 203, 780-790
- Santos RA, Sau N, Certucha MT, Almendáriz FJ, Monge AO, Zepeda IJ, Hernández LJ (2019): Rapid detection of bacteria, *Enterococcus faecalis*, in airborne particles of Hermosillo, Sonora, México. *J Environ Biol* 40, 619-625
- Scheck O: Anwendung der LightCycler-Technologie zur quantitativen Bestimmung viraler DNA bei immunsupprimierten Patienten. Med. Diss. Jena 2006
- Schlag G, Redl H, Bahrami S (1994): SIRS (systemic inflammatory response syndrome) following trauma and during sepsis. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 29, 37-41
- Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D (1994): The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 107, 643-649
- Seymour CW, Rea TD, Kahn JM, Walkey AJ, Yealy DM, Angus DC (2012): Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 186, 1264-1271
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS (1999): Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 67, 193-200
- Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM (2015): Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS* 29, 1263-1265
- Simon CL: Untersuchung der relativen Expressionsänderung von Tyrosinkinasen bei der Ausreifung Dendritischer Zellen. Med. Diss. Bonn 2008
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, et al. (2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801-810
- Sistino JJ, Acsell JR (1999): Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) following emergency cardiopulmonary bypass: a case report and literature review. *J Extra Corpor Technol* 31, 37-43
- Soler-Rodriguez AM, Zhang H, Lichenstein HS, Qureshi N, Niesel DW, Crowe SE, Peterson JW, Klimpel GR (2000): Neutrophil activation by bacterial lipoprotein versus lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* 164, 2674-2683

- Song F, Whitacre CC (2001): The role of the gut lymphoid tissue in induction of oral tolerance. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1382-1386
- Spahn TW, Kucharzik T (2004): Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53, 456-465
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I (2001): The Enterococcal surface protein, ESP, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67, 4538-4545
- Tsujimoto H, Ono S, Mochizuki H (2009): Role of translocation of pathogen-associated molecular patterns in sepsis. *Dig Surg* 26, 100-109
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H (2004): Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *gylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42, 4473-4479
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996): The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the european society of intensive care medicine. *Intensive Care Med* 22, 707-710
- Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH (1990): Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. *Circ Shock* 32, 307-318
- Wang YB, Liu J, Yang ZX (2011): Effects of intestinal mucosal blood flow and motility on intestinal mucosa. *World J Gastroenterol* 17, 657-661
- Wen L, Tang W, Jiang Z, Wang S, Liang C, Zhang Y (2000): Detection of bacterial DNA in blood with three pairs of primers. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 22, 592-594
- Wildhaber BE, Yang H, Spencer AU, Drongowski RA, Teitelbaum DH (2005): Lack of enteral nutrition – effects on the intestinal immune system. *J Surg Res* 123, 8-16
- Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuve M, Tribe D, Manziros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CM, Mascini EM, van Kregten E, et al. (2001): Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 357, 853-855
- Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I (2013): Pathophysiologie des Polytraumas. *Chirurg* 84, 753-758
- Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2004). In Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.): Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Enterococcus faecalis* Stämme S1/01/00 bis S1/10/00. https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/02_Bakterien/Enterococcus_faecalis.pdf?__blob=publicationFile&v=4; abgerufen am 13.06.2020

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen durch deren Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertationsschrift erst möglich gewesen ist, bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meinem Doktorvater PD Dr. med. Jörn Schäper. Ich möchte mich bei ihm für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die kontinuierliche Zusammenarbeit mit ihm war jederzeit freundlich, zugewandt und sehr hilfreich. Sowohl telefonisch als auch per E-Mail oder im persönlichen Gespräch konnten alle Fragen geklärt werden und die Dissertation ihre Form annehmen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. rer. nat. Carsten Lüder, meinem Zweitbetreuer, der sich im Rahmen der beiden Fortschrittsstreffen und später zum Korrekturlesen und konstruktiver Rückmeldung Zeit genommen hat.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. phil. nat. Raimond Lugert. Durch seine Unterstützung während der experimentellen Phase im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen konnte ich die Ergebnisse meiner Dissertationsarbeit erzielen.

Ein Dank geht darüber hinaus abschließend an das gesamte Team des Labors im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Durch die Hilfestellung bei praktischen Fragen war die Arbeit im Labor für mich eine lehrreiche und erfolgreiche Zeit.