

**Vergleich unterschiedlicher
Verfahren in der Diagnostik des Aszites
bei Leberzirrhose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lydia Thyssen
aus Viersen
2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Hörauf

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.07.2010

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Direktor Prof. Dr. med. T. Sauerbruch

Für meine Schwester Lara

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Leberzirrhose: Ätiologie, Pathogenese und ihre Komplikationen	9
1.2 Grundlagen der Aszitesbildung	12
1.3 Spontan bakterielle Peritonitis als Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites	14
1.3.1 Definition	14
1.3.2 Prävalenz und Pathomechanismus	14
1.3.3 Prognose	15
1.3.4 Historischer Überblick unterschiedlicher Definitionskriterien der SBP	16
1.3.5 Klinische Zeichen einer SBP	17
1.4 Diagnostische Untersuchung des Aszites	18
1.4.1 Parazentese und Zelldifferenzierung	18
1.4.2 Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszites zur Diagnose der SBP	18
1.4.3 Prädiktive Faktoren für das Auftreten einer Spontan bakteriellen Peritonitis	20
1.4.4 Faktoren, die mit einer Spontan bakteriellen Peritonitis assoziiert sind	21
1.5 Vergleich der verschiedenen SBP-Varianten	22
1.6 Neue Verfahren in der SBP-Diagnostik	23
1.6.1 Nachweis von Bakterien-DNA im Aszites und Blut	23
1.6.2 Frühzeitige Diagnose einer SBP durch Urineststreifen	26
1.7 Fragestellung	27
2 Patienten und Methoden	28
2.1 Patienten	28
2.2 Durchführung der Aszitespunktion	30
2.3 Untersuchung des Punktats	30
2.3.1 Bestimmung von Gesamtzellzahl und laborchemischen Parametern	30
2.3.2 Zytologische Untersuchung	30
2.3.3 Mikrobiologische Untersuchung	30
2.3.4 Urinstix-Analyse	31
Prinzip der Teststreifen	31
2.3.5 PCR	32
2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion-Methode	32
2.4.1 Probenvorbereitung	35
2.4.2 Amplifikation und Detektion mit Echtzeit-PCR	36
Wahl der Zielsequenz	36
Amplifikation mit dem LightCycler® 2.0 Anlagesystems	36
Echtzeit-Detektion von PCR-Produkten mit HybProbe-Sonden	38
2.4.3 Identifizierung von Spezies und Kontrollen	38
2.5 Verlaufskontrolle	40
2.6 Statistik	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Patientencharakteristika	42
3.2 Häufigkeiten des Auftretens einer Spontan bakteriellen Peritonitis und des Erregernachweises durch die Bakterienkulturmethode oder die PCR-Methode	44
3.3 Nachgewiesene Keime durch Bakterienkultur und PCR	44
3.4 Nachweis bakterieller DNA im Blut durch die PCR	48

3.5 SBP und antibiotische Therapie zum Zeitpunkt der Aszitespunktion	48
3.6 Vergleich klinischer und laborchemischer Parameter zwischen Patienten mit bzw. ohne SBP	51
3.7 Vergleich klinischer und laborchemischer Parameter zwischen Patienten mit positivem bzw. negativem bakteriellern DNA-Nachweis	53
3.8 Univariate und multivariate Analysen nach ANOVA	55
3.9 Zusammenhang zwischen der Granulozytenzahl im Blut und im Aszites	58
3.10 Überleben	59
3.10.1 Mortalität einer SBP-Episode bzw. 30-Tages-Mortalität nach dem Nachweis bakterieller DNA	59
3.10.2 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier	60
3.11 Urinteststreifen	63
4 Diskussion	66
4.1 Einleitung zum Diskussionsteil	66
4.2 Stellenwert des PCR-Verfahrens in der Aszitesuntersuchung	66
4.2.1 Vorteile und Grenzen des Nachweises bakterieller DNA durch die Real-time-PCR	66
4.2.2 Nachweis bakterieller DNA im Aszites	68
4.2.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Studien	69
4.2.4 Bedeutung des Nachweises bakterieller DNA für den aktuellen Verlauf und die Prognose	71
4.3 Nachweis bakterieller DNA im Blut	72
4.4 Einsatzgebiet der Bakterienkultur in der SBP-Diagnostik	73
4.5 Rolle klinischer Parameter und Laborparameter in der Diagnostik der SBP	73
4.6 Bestätigen die nach unserer Studie prädiktiven Parameter für eine SBP den Goldstandard als Diagnosekriterium für eine SBP?	74
4.7 Teststreifen in der Diagnostik der SBP	77
4.8 Beeinflussung der Ergebnisse durch eine antibiotische Therapie	78
4.9 Zusammenfassender Überblick über die diagnostische Wertigkeit der vorgestellten Verfahren	80
5 Zusammenfassung	82
6 Literaturverzeichnis	83
Danksagung	92

Abkürzungsverzeichnis

°C	°Celcius
ADH	Antidiuretisches Hormon
C. albicans	Candida albicans
CFU	Colony forming units/koloniebildende Einheiten
CNNA	Culture-negative neutrocytic ascites/ kulturnegativer neutrozytischer Aszites
CONS	Koagulasenegative Staphylokokken
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
g	2 Bedeutungen: 1. Gramm , 2. Erdschwerebeschleunigung
G	Giga
Gram (-)	gramnegativ
Gram(+)	grampositiv
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
IC	Interne Kontrolle
INR	International Normalized Ratio
ITS	Internal Transcribed Spacer
l	Liter
IQR	Interquartärer Abstand
K. oxyteca	Klebsiella oxyteca
LDH	Laktatdehydrogenase
ln	logarithmus naturalis
MELD	Model for End-stage Liver Disease

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Hydragyrum (Druck, den ein Millimeter einer Quecksilbersäule ausübt)
MRSA	multiresistenter Staphylokokkus aureus
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO	Nitric oxide/Stickstoffmonoxid
p	Statistische Wahrscheinlichkeit
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii/“Stärke“ des Wasserstoffs
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
spp.	Subspezies
Tm	Schmelzpunkt
TrisHCl	Tris Hydrochlorid
U	Units/Einheit
VIP	Vasoaktives intestinales Protein
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Leberzirrhose: Ätiologie, Pathogenese und ihre Komplikationen

Die Inzidenz der Leberzirrhose beträgt in Europa und den USA etwa 250/100.000/Jahr; weltweit ist sie die 11-häufigste Todesursache (Van Erpecum, 2006).

Ursächlich für die Leberzirrhose ist bei den meisten Patienten der Alkoholabusus (ca. 60% in Europa und den USA), gefolgt von den Virushepatitiden B und C. Andere seltenere Ursachen sind unter anderem die Autoimmunhepatitis, die primär biliäre Zirrhose, die primär sklerosierende Cholangitis, medikamenteninduzierte Leberschäden, das Budd-Chiari-Syndrom oder angeborene Stoffwechselerkrankungen. Die Zahl kryptogener Leberzirrhosen ist durch die verbesserten diagnostischen Methoden gesunken.

Das Primärereignis in der Pathogenese der Zirrhose ist der Zellschaden. Diese führt zur Aktivierung von Kupffer-Zellen und Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Diese und die Hepatozyten setzen Zytokine frei, die die Ito-Zellen aktivieren. Die Ito-Zellen wandeln sich daraufhin in fibroblastenähnliche Zellen um, die Bindegewebe synthetisieren. Als Folge bilden sich Septen zwischen benachbarten Portalfeldern und zwischen Portalfeldern und Zentralvene. Reaktiv bilden sich auch Regeneratknoten aus.

Zusammen mit dem Parenchymbau kommt es zu einer Veränderung der Gefäßarchitektur der Leber und zur portalen Hypertension.

Die Folge sind unter anderem eine verminderte Syntheseleistung der Leber und die Ausbildung von Kollateralen. Daraus resultierende Komplikationen sind die hepatische Enzephalopathie, Aszitesbildung mit der Komplikation einer Spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) oder die Varizenblutung.

Eine Einteilung in verschiedene Schweregrade der Zirrhose erfolgt anhand des Child-Pugh-Score oder des MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease). Der Child-Pugh-Score berechnet sich anhand folgender Parameter: Enzephalopathiegrad, Aszitesmenge, Quickwert, Bilirubin und Albumin im Serum. Kriterien für die Ermittlung des MELD-Scores sind Bilirubin im Serum, Kreatinin im Serum und der INR (International Normalized Ratio).

Portale Hypertension

Die Durchblutung der Leber beträgt etwa 25% des Herzzeitvolumens, wobei 2/3 der Durchblutung über die Pfortader und 1/3 über die Arteria hepatica erfolgen.

Der Druck in der Pfortader beträgt beim gesunden Menschen etwa 4mmHg, welcher im Falle einer Leberzirrhose steigt.

Man unterscheidet die prähepatische von der hepatischen und posthepatischen Hypertension. Die Leberzirrhose führt zu einer hepatischen Hypertension.

Wendet man das Ohmsche Gesetz auf die Gefäßphysiologie an, ergibt sich der Druck P in der Pfortader aus dem Produkt vom Blutfluss Q und dem Strömungswiderstand R ($P = Q \times R$). Somit kann die portale Hypertension sowohl Folge einer Zunahme des Blutflusses als auch einer Widerstandserhöhung im intrahepatischen Flussbett sein.

Zu der intrahepatischen Widerstandserhöhung trägt auf der einen Seite zum Beispiel die Einengung der Sinusoidalgefäße durch Kollagenablagerungen und Fibrosierungen im Rahmen der Zirrhose bei. Auf der anderen Seite besteht auch eine dynamische Komponente mit einer durch aktivierte Sternzellen vermittelten Vasokonstriktion.

Vor allem im fortgeschrittenen Stadium der Leberzirrhose kommt es durch die Zunahme des Blutflusses im Splanchnikusgebiet zu einem weiteren Anstieg des portalen Druckes.

Die portale Hypertension trägt zu Komplikationen wie der Ausbildung von Varizen und deren Blutungen und dem Auftreten von Aszites bei (Bosch und García-Pagán, 2000).

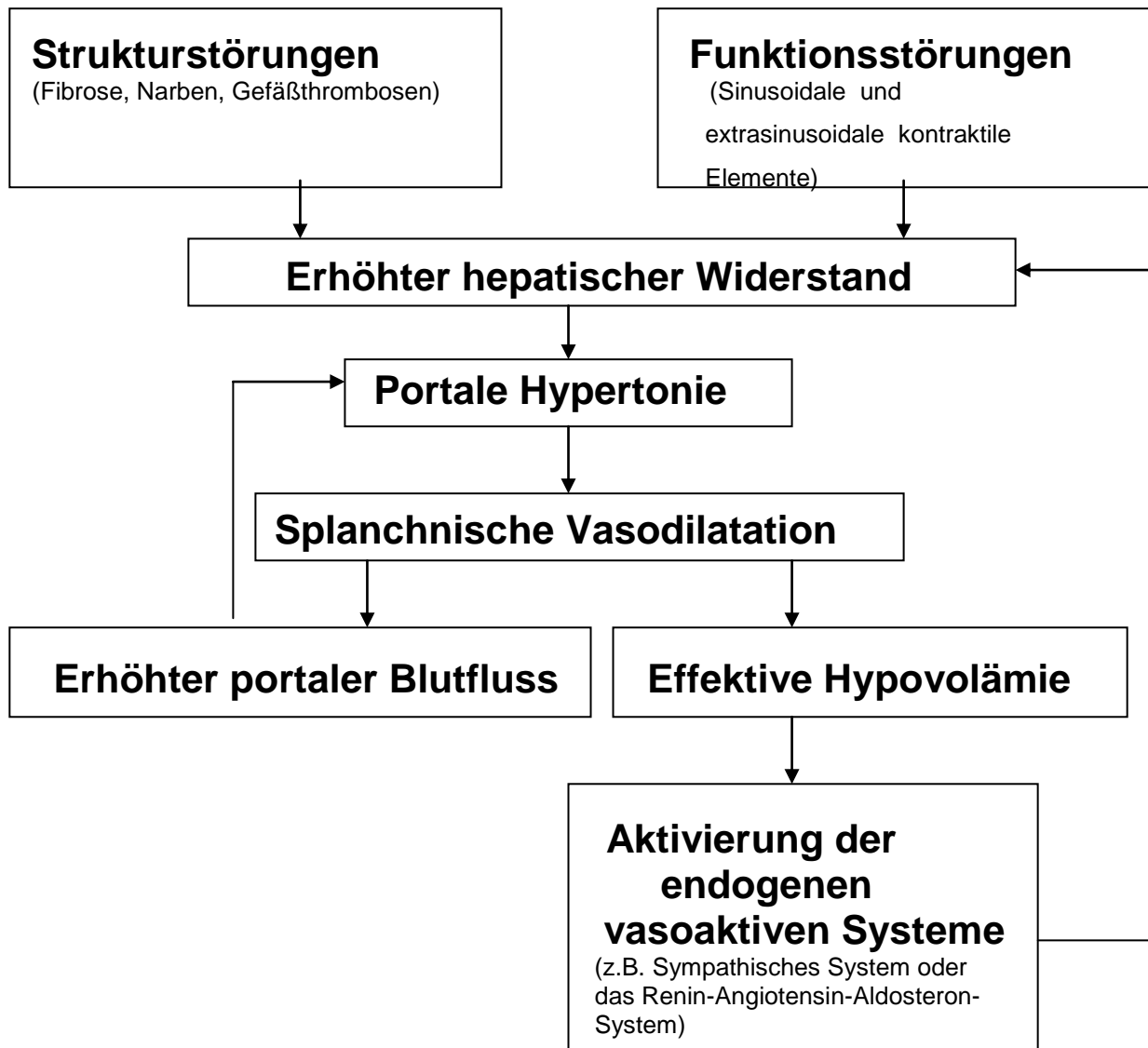


Abbildung 1: In die Pathogenese der portalen Hypertension involvierte Mechanismen (aus: Bosch und García-Pagán, 2000)

1.2 Grundlagen der Aszitesbildung

Die Ausbildung von Aszites ist die häufigste Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose. Sie ist ein ungünstiges prognostisches Zeichen und geht mit einer 2-Jahres-Mortalität von 50% einher (Van Erpecum, 2006).

Die Pathogenese der Aszitesbildung ist immer wieder diskutiert worden. Lange bestanden zwei Theorien: die „underfilling“- und die „overflow“-Theorie.

Nach der „underfilling“-Theorie führt die portale Hypertension zu einer Vasodilatation im Splanchnikusgebiet, wahrscheinlich bedingt durch eine gesteigerte Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen wie beispielsweise NO, Glucagon, Prostaglandinen und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) und einem gestörten Ansprechen der Splanchnikusgefäße auf Vasokonstriktoren. Das daraus resultierende Blutpooling im Splanchnikusgebiet mit einer Reduktion des zentralen intrathorakalen Blutvolumens wird von arteriellen Barorezeptoren registriert. Dies führt zu einer Stimulation des sympathischen Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und zu einer Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH). Als Folge kommt es zu einer renalen Retention von Natrium und Wasser sowie zu einer renalen Vasokonstriktion.

Die „overflow“-Theorie dagegen stellt die vermehrte Natriumretention der Niere, bedingt durch die portale Hypertension, an den Beginn der Kaskade. Die Natriumretention führt zu einer Vergrößerung des Plasmavolumens und trägt so zur Aszitesentstehung bei (Gentilini et al., 1999).

Aus diesen beiden Theorien ist in den letzten Jahren die sogenannte „forward“-Theorie entstanden. Diese Theorie geht davon aus, dass die Aszitesbildung eine Folge der arteriellen Vasodilatation im Splanchnikusgebiet ist, die zu zwei unterschiedlichen Ereignissen führt:

Das erste ist ein sekundärer Anstieg der splanchnischen Mikrozirkulation. Die verstärkte Mikrozirkulation führt zu einem Anstieg des kapillären Druckes, der kapillären Permeabilität und der Lymphbildung. Die vermehrte Lymphbildung entsteht auch durch Zirkulationsveränderungen in der Leber selbst.

Das zweite ist ein Abfall des arteriellen Druckes mit daraus resultierender Aktivierung des RAAS, des sympathischen Systems sowie des ADHs. Dieser Mechanismus wird auch arterielles „underfilling“ genannt und bewirkt eine verstärkte renale Natrium- und

Wasserretention. Das gleichzeitige Auftreten beider Ereignisse führt zu einer kontinuierlichen Aszitesbildung (Arroyo und Jiménez, 2000).

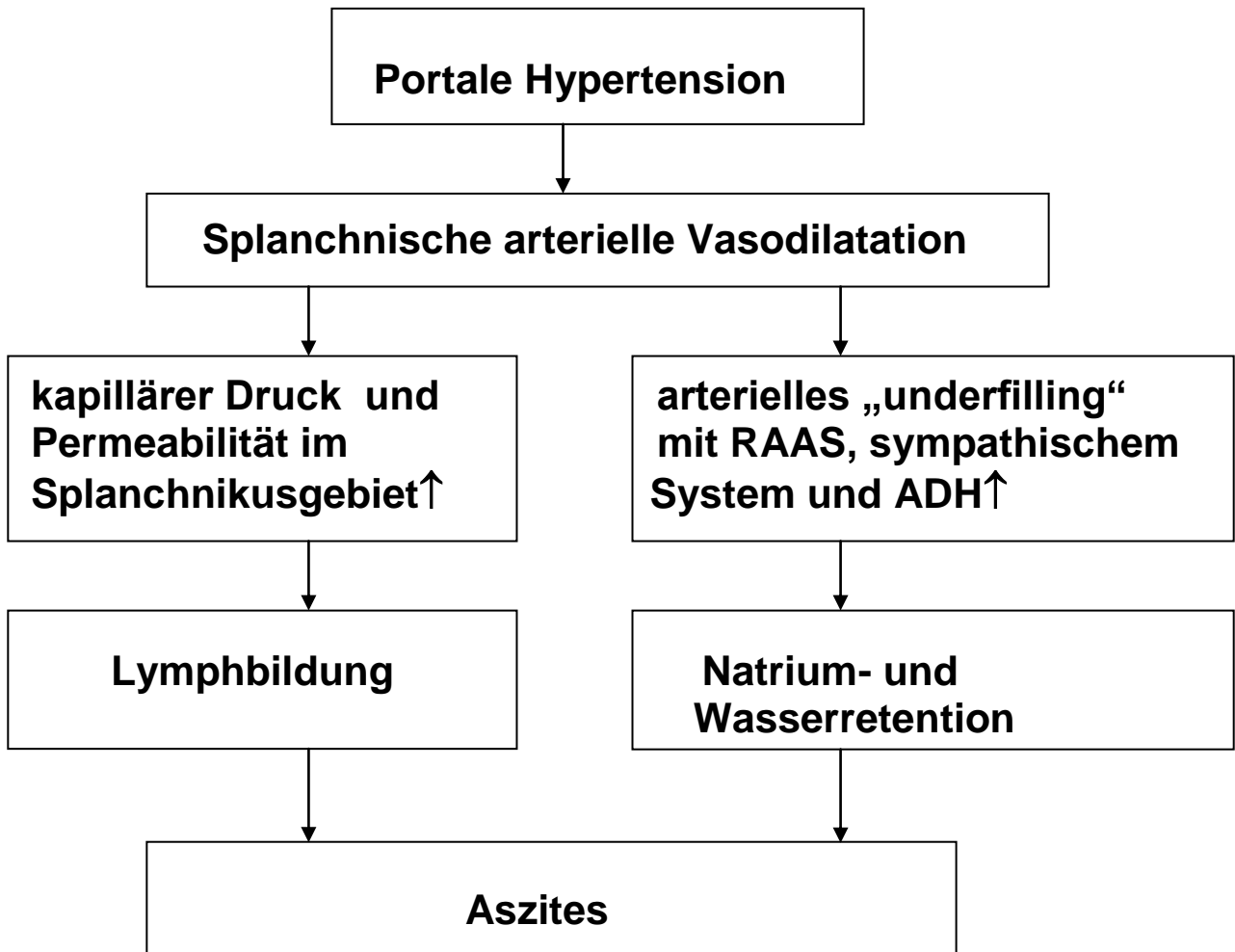


Abbildung 2: Die „forward“-Theorie der Aszitesbildung (aus: Arroyo und Jiménez, 2000)

1.3 Spontan bakterielle Peritonitis als Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites

1.3.1 Definition

Die Spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist definiert als Infektion des Aszites auf dem Boden einer Leberzirrhose ohne intestinale Läsion.

Nach dem „consensus document on spontaneous peritonitis“ ist die Erkrankung heute durch den Nachweis von Neutrophilen Graulozyten $\geq 250/\mu\text{l}$ mit oder ohne Keimnachweis im Aszites bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion definiert (Rimola et al., 2000).

1.3.2 Prävalenz und Pathomechanismus

Die Prävalenz des Auftretens der Spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) bei stationären Patienten mit Leberzirrhose und Aszites schwankt zwischen 10% und 30%, wobei eine Korrelation zwischen Häufigkeit der SBP und dem Schweregrad der Leberzirrhose besteht (Caly und Strauss., 1993; Rimola et al., 2000).

Laut einer Untersuchung, die an 40 internistischen und gastroenterologischen Krankenhausabteilungen in Deutschland durchgeführt wurde, lag die Prävalenz im Jahr 1998 bei 14% (Fleig et al, 2004).

Bei ambulanten Patienten liegt die Prävalenz bei etwa 3,5% (Evans et al., 2003).

Als Pathomechanismus der SBP wird der Vorgang der bakteriellen Translokation von enteralen Keimen angesehen. Die bakterielle Translokation ist definiert als Passage von Darmbakterien aus dem Darmlumen in die extraluminale, mesenteriale Lymphknoten. Bei Patienten mit Leberzirrhose wird angenommen, dass ein vermehrtes intestinales Bakterienwachstum, eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen Schleimhaut, eine verringerte Darmmotilität und eine verminderte Immunabwehr für die vermehrte Passage der Darmbakterien nach extraluminal verantwortlich sind. Dabei begünstigt eine bestehende portale Hypertension die Translokation (Casafont et al., 1997; Guarner et al., 1997).

Guarner et al. (1997) zeigten, dass Ratten mit Leberzirrhose ein vermehrtes intestinales Bakterienwachstum aufweisen, welches zu bakterieller Translokation beiträgt. Pardo et al. (2000) untersuchten 30 zirrhotische Ratten und 164 zirrhotische Patienten vor und

nach der Behandlung mit Cisaprid bzw. einem Placebo. Cisaprid führt zu einer verstärkten Acetylcholinfreisetzung aus den postganglionären Nervenenden des Plexus myentericus und wirkt so prokinetisch. Unter Cisaprid kam es zu einer signifikanten Verringerung des intestinalen Bakterienwachstums. Man nimmt daher an, dass eine verringerte Darmmotilität bakterielles Wachstum begünstigt. Weiterhin zeigte sich, dass mit der Reduktion des intestinalen Bakterienwachstums eine verringerte bakterielle Translokation assoziiert ist.

Guarner et al. (1997), Runyon et al. (1994) und Llovet et al. (1998) zeigten in tierexperimentellen Studien, dass es durch eine wiederholte bakterielle Translokation aus dem intestinalen Lumen in das Peritoneum über mesenteriale Lymphknoten zu einer bakteriellen Besiedlung auch der Aszitesflüssigkeit kommt.

Llovet et al. (1998) und Ruyon et al. (1994) fanden außerdem bei 25% der Ratten mit bakterieller Translokation Bakterien im Blut, während keine der Ratten ohne bakterielle Translokation eine Bakteriämie aufwies.

Llovet et al. (1998) konnten außerdem zeigen, dass es sich bei der im intestinalen Lumen, im Peritoneum, im venösen Blut und den mesenterialen Lymphknoten nachweisbaren bakteriellen DNA um identische Sequenzen handelte.

Zusammenfassend hat die bakterielle Translokation eine Rolle in der Pathogenese der SBP. Casafont et al. (1997) unterstützen durch ihre tierexperimentelle Studie diese Aussage: Sie wiesen bei 100% der untersuchten Ratten mit SBP eine bakterielle Translokation nach. Bei den Tieren mit sterilem Aszites konnte dagegen nur bei 57% eine bakterielle Translokation nachgewiesen werden.

1.3.3 Prognose

Das Auftreten einer SBP verschlechtert die Prognose der Patienten mit Aszites. Die Mortalität einer Episode (30-Tage-Mortalität) liegt in verschiedenen Studien trotz adäquater Antibiotikatherapie zwischen 10% und 40% (Hoefs und Runyon, 1985; Pelletier et al., 1990; Cho et al., 2007). Das Ein-Jahres-Überleben beträgt 30-50% (Rimola et al., 2000).

1.3.4 Historischer Überblick unterschiedlicher Definitionskriterien der SBP

In der Literatur der vergangenen 25 Jahre finden sich unterschiedliche Diagnosekriterien für eine SBP.

Ursprünglich wurde der Bakteriennachweis im Aszites bei Fehlen einer abdominellen Infektionsquelle als obligat für die Diagnose einer SBP angesehen (Runyon et al., 1988). Aufgrund der geringen Sensitivität der Bakterienkultur und des großen Zeitintervalls bis zum Bakteriennachweis durch die Kultur wurde immer wieder nach anderen Faktoren gesucht, die eine schnellere Diagnose und damit eine schnellere Therapieeinleitung ermöglichen.

Conn und Fessel erkannten schon 1971, dass nicht nur bei positivem Bakteriennachweis durch die Kultur, sondern auch bei erhöhter Neutrophilenkonzentration im Aszites eine antibiotische Therapie indiziert ist.

Wo die obere Grenze einer noch normalen Neutrophilenkonzentration liegen sollte, war allerdings noch unklar.

Jones (1977) und Bar-Meir et al. (1979) setzten diese Grenze erstmalig bei 250 Neutrophilen/ μ l Aszites an. Diese Grenze wurde in den darauffolgenden Jahren durch mehrere Studien (Hoefs und Runyon, 1985; Runyon und Antillon, 1991) als sensitivster Parameter für die Diagnose einer SBP bestätigt.

Sie bildet heute den Goldstandard in der Diagnostik der SBP.

Bis zum Erscheinen des „consensus document on spontaneous peritonitis“ des International Ascites Clubs (Rimola et al.) im Jahr 2000 fanden sich jedoch immer wieder andere Definitionen.

Andreu et al. (1993) definierten in einer Studie zu Risikofaktoren einer Spontan bakteriellen Peritonitis eine SBP wie folgt: (1) ein Keimnachweis im Aszites oder im Blut und eine Neutrophilenkonzentration $\geq 250/\mu$ l im Aszites bei (2) fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektionsquelle und bei fehlendem Keimnachweis im Aszites oder (3) eine Neutrophilenkonzentration $\geq 500/\mu$ l im Aszites.

Daneben entstanden Diagnosekriterien für Varianten der SBP:

Im Jahr 1984 beschrieben Runyon und Hoefs den „Neutrozytischen Aszites“, auch „CNNA“ (culture-negative neutrocytic ascites) genannt, als eine Variante der Spontan bakteriellen Peritonitis. Dieser zeichnet sich durch eine Neutrophilenkonzentration $\geq 500/\mu$ l bei fehlendem Keimnachweis aus. Die Bezeichnung „CNNA“ wurde 1990 von

Pelletier et al. aufgegriffen. Im Unterschied zu Runyon und Hoefs definierten sie den Neutrozytischen Aszites als Aszites mit einer Neutrophilenkonzentration $\geq 250/\mu\text{l}$ bei fehlendem Keimnachweis. Dies entspricht der heutigen Definition.

Im selben Jahr beschrieb Runyon den sogenannten „Bakteraszites“, Aszites mit positivem Keimnachweis ohne erhöhte Neutrophilenzahl.

Die Definition des Bakteraszites gilt auch heute.

Zusammenfassend ist die SBP heute nach den Konsensusempfehlungen durch den Nachweis von Neutrophilen Granulozyten $\geq 250/\mu\text{l}$ mit oder ohne Keimnachweis bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion definiert (Rimola et al., 2000).

Der Bakteraszites, der den Aszites mit positivem Keimnachweis ohne erhöhte Neutrophilenzahl bezeichnet, gilt nach den aktuellen Konsensusbestimmungen nicht als SBP (Mowat und Stanley, 2001; Rimola et al., 2000).

Diese Definitionen werden auch in dieser Arbeit verwendet.

Zahlreiche Studien haben sich mit den Unterschieden zwischen den zwei Varianten der SBP und dem Bakteraszites beschäftigt, worauf Abschnitt 1.5 genauer eingeht.

1.3.5 Klinische Zeichen einer SBP

Begleitend zur SBP können Symptome und klinische Zeichen auftreten, die jedoch nicht als spezifisch angesehen werden können. Als typische klinische Befunde sind Fieber, abdominelle Schmerzen oder allgemeine Verschlechterung (Conte et al., 1993), aber auch die Verschlechterung der Nierenfunktion oder das Auftreten bzw. der progrediente Verlauf einer Hepatischen Enzephalopathie zu nennen.

Für eine Diagnosestellung sind diese Symptome jedoch zu unspezifisch.

1.4 Diagnostische Untersuchung des Aszites

1.4.1 Parazentese und Zelldifferenzierung

Der sichere Nachweis einer SBP gelingt nur durch eine Aszitesparazentese mit nachfolgender Untersuchung des Aszites. Der Aszites-Club empfiehlt eine diagnostische Parazentese zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme sowie bei lokalen Zeichen einer Peritonitis, systemischen Zeichen einer Infektion, einer hepatischen Enzephalopathie oder einer rapiden renalen Verschlechterung ohne offensichtliche Ursache (Rimola et al., 2000).

Die Parazentese ist einfach und sicher durchzuführen. Komplikationen wie zum Beispiel Bauchhauthämatome treten mit einer Häufigkeit von 1% nur sehr selten auf (Runyon, 2004).

Die Diagnose einer SBP gilt als gesichert, wenn der Goldstandard von 250 Neutrophilen Granulozyten/ μl im Aszites erfüllt ist.

Eine maschinelle Differenzierung und Quantifizierung ist technisch schwierig und verlangt spezielle Geräte.

1.4.2 Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszites zur Diagnose der SBP

Die Diagnostik des Aszites beinhaltet als grundlegende Untersuchung nicht nur die Zellzahlbestimmung, sondern auch die Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszitespunktat. Das positive Ergebnis der Bakterienkultur beweist zum einen die bakterielle Besiedlung des Aszites und gibt Hinweise auf die Art einer eventuell vorliegende Infektion, zum anderen kann nach angelegtem Antibiogramm gezielt antibiotisch therapiert werden. In prospektiv angelegten Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer höheren Sensitivität der Bakterienkultur kommt, wenn die Kulturflaschen direkt am Bett des Patienten beimpft werden (Runyon et al., 1988). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Beimpfung mit 10 ml Punktat die meisten positiven Ergebnisse ergibt (Castellote et al., 1990; Fernández et al., 2002).

Allerdings liegen unter Anwendung dieser Methoden trotzdem häufig negative Kulturergebnisse vor: Nur bei 30% bis 60% der Patienten mit einer SBP nach dem Goldstandard kann eine bakterielle Besiedlung durch die Bakterienkultur nachgewiesen werden (Canete et al., 2007; Fleig et al., 2004; Thévenot et al., 2004).

Ursächlich für die niedrige Zahl positiver Kulturergebnisse ist wahrscheinlich die geringe Konzentration von Bakterien in der Aszitesflüssigkeit, im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. im Urin (Bobadilla et al., 1989).

Auch die prophylaktische Gabe von Antibiotika kann die Nachweisrate verringern. Kuiper et al. (2007) wiesen bei 39,4% der Patienten mit SBP Bakterien durch die Kultur nach. Die Hälfte dieser Patienten mit SBP und positiver Bakterienkultur erhielt eine antibiotische Prophylaxe verglichen mit 74,5% der Patienten mit SBP ohne Bakteriennachweis.

Die häufigsten nachgewiesenen Erreger sind *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und Pneumokokken (Chu et al, 1995; Llovet et al., 1997; Mowat und Szanley, 2001). In den letzten Jahren wurde ein Anstieg des Anteils grampositiver Erreger bemerkt. In einer retrospektiven Studie von Almeida et al. waren zwischen 1997 und 1998 *E.coli* und *Klebsiella pneumoniae* zusammen für etwa 50% aller kulturpositiven SBPs verantwortlich, koagulasenegative Streptokokken und *Staphylokokkus aureus* dagegen für ca. 28%. Zwischen 2002 und 2003 hatte sich das Verhältnis in etwa umgekehrt (Almeida et al., 2007).

Tabelle 1 zeigt die nachgewiesenen Erreger mit ihren Häufigkeiten in einer Studie von Llovet et al. (1997).

<u>Gramnegative Bakterien:</u>	<u>n=86</u>	<u>Grampositive Bakterien:</u>	<u>n=26</u>
<i>E.coli</i>	41	<i>Streptokokkus pneumoniae</i>	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	<i>Enterokokkus spp.</i>	1
<i>Salmonella spp.</i>	3	Andere Streptokokken	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	<i>Staphylokokkus aureus</i>	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		
<i>Proteus mirabilis</i>	1		
<i>Morganella morganii</i>	1		
<i>Aeromona sobria</i>	1		
<i>Pasteurella</i>	1		

Tabelle 1: Verteilung der Bakterienspezies bei SBP (aus: Llovet et al., 1997)

1.4.3 Prädiktive Faktoren für das Auftreten einer Spontan bakteriellen Peritonitis

Mit dem Ziel, die Diagnose einer SBP schneller stellen zu können bzw. prädiktive Faktoren für das Auftreten einer SBP zu finden, wurden in mehreren Studien weitere Parameter untersucht.

Runyon (1986) zeigte, dass ein Eiweißgehalt ≤ 1 g/dl im Aszites einen Risikofaktor für das Auftreten einer SBP darstellt. Von 47 Patienten mit initial sterilem Aszites und einem Eiweißgehalt ≤ 1 g/dl entwickelten 15% im Verlauf eine SBP. Im Vergleich dazu entwickelten nur 1,5 % der 65 Patienten mit einem Eiweißgehalt im Aszites >1 g/dl eine SBP. Eine weitere Beobachtung war, dass der Eiweißgehalt im Aszites konstant bleibt, das heißt sich vor, während und im Anschluss an eine SBP nicht signifikant ändert (Runyon und Hoefs, 1985; Runyon, 1986).

Die Arbeitsgruppe zeigte darüber hinaus, dass ein niedriges Gesamteiweiß im Aszites mit einer geringeren Opsonierungsfähigkeit korreliert. Daraus folgte wiederum die höhere Inzidenz einer SBP bei Patienten mit niedrigem Gesamteiweiß im Aszites (Runyon, 1986).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Andreu et al. (1993). Neben einem Gesamteiweiß ≤ 1 g/dl korrelierte in ihrer Studie auch ein Bilirubinspiegel $>2,5$ mg/dl im Serum mit der Entwicklung einer SBP (n=110). SBP war in dieser Studie wie folgt definiert: (1) Neutrophilenkonzentration im Aszites $>250/\mu\text{L}$ und Keimnachweis im Aszites und/oder Blut oder (2) Neutrophilenkonzentration $>500/\mu\text{l}$.

Guarner et al. (1999) sahen einen Gesamteiweißspiegel im Aszites ≤ 1 g/dl, einen Bilirubingehalt im Serum $>3,2$ mg/dl und/oder eine Thrombozytenkonzentration $<98000/\mu\text{l}$ als Risikofaktoren für eine SBP nach Goldstandard an (n=109).

In einer neueren Longitudinalstudie von Canete et al. (2007) stellte eine Eiweißkonzentration <1 g/dl den einzigen unabhängigen prädiktiven Faktor für das Entstehen einer SBP dar (n=263).

1.4.4 Faktoren, die mit einer Spontan bakteriellen Peritonitis assoziiert sind

Runyon und Hoefs (1985) untersuchten 22 Patienten vor, während und nach dem Auftreten einer SBP (definiert durch die Kombination aus Keimnachweis und einer Konzentration Neutrophiler Granulozyten $\geq 250/\mu\text{l}$). Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall des Aszites/Serum Glukose Quotienten sowie ein signifikanter Anstieg des LDH-Spiegels im Aszites. Ihr Ergebnisse erklärten sie damit, dass Granulozyten Glukose verbrauchen, so dass die Glukosekonzentration bei erhöhter Granulozytenzahl abnehme.

LDH werde durch die Lyse von Granulozyten freigesetzt, so dass der LDH-Spiegel bei erhöhter Granulozytenzahl ansteige.

Albillos et al. (1990) zeigten, dass ein niedriger pH-Wert im Aszites und ein hoher Laktat-Wert im Aszites mit einem positiven Bakteriennachweis korrelieren.

In einer Studie, die Stassen et al. (1986) zur Diagnostik der SBP durchführten, ergab ein pH-Wert im Aszites $\leq 7,5$ oder ein Blut-Aszites-pH-Gradient von mindestens 0,10 in Kombination mit einer Gesamtzellzahl im Aszites ≥ 500 Zellen/ μl eine Sensitivität von 89% bei einer Spezifität von 100% (n=60).

Diese Studien beruhen jedoch nicht auf der heutigen Definition einer SBP und lassen sich daher nicht ohne weiteres auf die heutige Situation übertragen.

Eine neuere, multizentrische Studie von Nousbaum et al. (2007a), die an 1041 Patienten durchgeführt wurde, zeigte, dass der Bilirubin- und der Kreatiningehalt im Serum, eine Körpertemperatur $< 36,5^\circ\text{C}$ oder $> 38^\circ\text{C}$, abdominelle Schmerzen, Schüttelfrost, Enzephalopathie, akutes Nierenversagen und der Child-Pugh-Score Faktoren sind, die in der univariaten Analyse mit dem Auftreten einer SBP korrelieren. In der multivariaten Analyse ergaben sich drei unabhängige Faktoren, die mit einer SBP assoziiert waren: abdominelle Schmerzen, Hypo- oder Hyperthermie und eine Child-Pugh-Score Stadium C.

1.5 Vergleich der verschiedenen SBP-Varianten

1984 verglichen Runyon und Hoefs Patienten mit SBP, hier definiert durch eine Neutrophilenkonzentration $\geq 500/\mu\text{l}$ und Bakteriennachweis im Aszites, mit CNNA-Patienten, die eine Neutrophilenkonzentration $\geq 500/\mu\text{l}$ im Aszites aufwiesen ohne bakterielle Besiedlung des Aszites (n=50). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf klinische Zeichen und Symptome. Daraus schlossen sie, dass eventuell viele Patienten mit Neutrozytischem Aszites eine bakterielle Infektion hätten, die durch das Verfahren der Bakterienkultur nicht erkannt worden sei.

Die folgenden Studien definierten SBP und Neutrozytischem Aszites (CNNA) ähnlich den heutigen Kriterien:

- SBP: Neutrophile Granulozyten $\geq 250/\mu\text{l}$ und Nachweis einer bakteriellen Besiedlung des Aszites bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion
- Neutrozytischen Aszites: Neutrophile Granulozyten $\geq 250/\mu\text{l}$ ohne Nachweis einer bakteriellen Besiedlung des Aszites bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion.

Terg et al. (1992) und Chu et al. (1995) stützen durch ihre Ergebnisse die Aussage von Runyon und Hoefs, da auch sie keine signifikanten Unterschiede in demographischen Daten, der Krankenhausmortalität und den Laborparametern zwischen Patienten mit SBP und CNNA nachweisen konnten.

Zu gegenteiligen Ergebnissen kamen dagegen Al Amri et al. (1994), Cho et al. (2007) und Pelletier et al. (1990). In ihren Studien zeigten Patienten mit bakterienpositiver SBP eine höhere Mortalität als Patienten, die lediglich eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen Granulozyten im Aszites aufwiesen (37%-50% versus 12,7%-33%). Pelletier et al. stellten außerdem fest, dass Patienten mit SBP eine höhere Anzahl an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten im Aszites aufweisen als CNNA-Patienten. Sonst fanden die Arbeitsgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Zu Patienten mit Bakteraszites liegen bisher nur sehr wenige Daten vor:

Chu et al. (1995) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit asymptomatischen Bakteraszites und sterilem Aszites finden. Außerdem entwickelte keiner der unbehandelten Patienten mit asymptomatischem Bakteraszites im Verlauf eine SBP. Asymptomatischer Bakteraszites könnte daher für eine vorübergehende

Kolonisation sprechen. Symptomatischen Bakteraszites sah die Arbeitsgruppe dagegen als eine SBP-Variante an.

Diese Thesen wurden durch Pelletier et al. (1990) und Runyon (1990) gestützt. In der Studie von Runyon fanden sich unter 138 Punktionen mit Bakteriennachweis 44 vom Typ Bakteraszites, von denen wiederum 38,1% in eine SBP konvertierten. Auffällig war auch hier, dass keiner der Patienten mit asymptomatischem Bakteraszites eine SBP entwickelte.

1.6 Neue Verfahren in der SBP-Diagnostik

w1.6.1 Nachweis von Bakterien-DNA im Aszites und Blut

Wie in Abschnitt 1.4.1 dargestellt, sieht man als möglichen Pathomechanismus der SBP die bakterielle Translokation aus dem Interstitium über mesenteriale Lymphknoten in die Blutbahn an.

Allerdings bleiben die Episoden der bakteriellen Translokation meist unentdeckt. Die meisten Aszites- und Blutkulturen bleiben negativ, wofür eventuelle Vorgänge der bakteriellen Oponisierung verantwortlich sein könnten. Auch im Falle der Oponisierung verbleiben aber möglicherweise Bakterienreste und damit bakterielle DNA im Aszites. Basierend auf dieser Überlegung entwickelte Such et al. (2002) eine PCR-Methode, mit der man bereits 10 pg bakterielle DNA im Blut und Aszites nachweisen kann. Bei der von ihnen angewandten Methode wird 16S ribosomale RNA amplifiziert. Durch die Sequenzierung der Nukleotide der PCR-Produkte konnten diese den entsprechenden Bakterien zugeordnet werden. Sie untersuchten 28 Patienten, die keine SBP nach dem Goldstandard aufwiesen, und fanden bei 9 dieser Patienten bakterielle DNA sowohl im Blut als auch im Aszites. Dabei fanden sich jeweils die gleichen Bakterienstämme in Blut und Aszites mit einer Sequenzübereinstimmung von mehr als 99,7%. Da die Proben jeweils von unterschiedlichen Personen entnommen wurden und in unterschiedlichen Probebehältern aufbewahrt wurden, schloss die Arbeitsgruppe eine Kontamination aus.

Unterschiede bezüglich Child-Pugh-Score und hämodynamischen, biochemischen und klinischen Parametern zwischen Patienten mit Nachweis von bakterieller DNA und ohne diesen Nachweis fand die Gruppe nicht. Über den weiteren Verlauf der bakteriellen

Besiedlung bei Patienten mit Nachweis von bakterieller DNA konnte die Gruppe keine Aussage treffen.

Dazu führten Francés et al. (2004a) aus derselben Gruppe eine weitere Studie durch, in der im Anschluss an die Parazentese über 2 Tage in 8-stündigem Abstand erneut Blut abgenommen wurde. Aszites und Serum wurden durch eine PCR-basierte Methode auf bakterielle DNA untersucht. Die DNA wurde durch Real-time PCR quantifiziert und durch automatische Nukleotidsequenzierung identifiziert. Bei 7 der 17 Patienten fanden sich zu Beginn bakterielle DNA in Aszites und Serum, wobei auch hier wiederum dieselben Bakterienstämme in beiden Körperflüssigkeiten gefunden wurden. Für mindestens 24 Stunden nach der Parazentese konnte noch bakterielle DNA im Serum nachgewiesen werden. Bei 3 Patienten gelang nach 24 Stunden kein Nachweis mehr. Die anderen 4 Patienten zeigten einen Wechsel zwischen unterschiedlichen Mengen an DNA, teils sogar Verschwinden und Wiederauftreten von bakterieller DNA.

Zwischen den DNA-Sequenzen der bei einem Patienten nachgewiesenen Bakterien zeigte sich nahezu 100%-ige Ähnlichkeit, was die Arbeitsgruppe als Hinweis dafür sah, dass es sich jeweils um das gleiche Bakterium handelte.

Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Nachweis bakterieller DNA fanden sich auch hier nicht.

Aus den Ergebnissen der Studie zogen Francés et al. den Schluss, dass es bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose zu wiederholten Episoden bakterieller Translokation kommt, wobei es sich jeweils nur um einen Bakterienstamm handelt. Bakterielle Translokation stelle also kein einmaliges Ereignis dar, sondern einen dynamischen Prozess.

Eine Untersuchung an Ratten stützt die Annahme, dass es sich beim Nachweis bakterieller DNA um das Ergebnis bakterieller Translokation handelt. In der Aszitesflüssigkeit als auch in mesenterialen Lymphknoten der Tiere wurde jeweils bakterielle DNA derselben Bakterienspezies gefunden. Die Lymphknoten zeigten dabei sowohl positive als auch negative Bakterienkulturergebnisse, eine inflammatorische Antwort war dabei an den Nachweis bakterieller DNA gekoppelt, nicht an den Kulturnachweis (Guarner et al., 2006).

Vieria et al. (2007) verglichen in einer Studie Kinder mit und ohne den Nachweis bakterieller DNA im Aszites. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich

Child-Pugh-Score, 3-Monats-Überlebensrate und laborchemischen Parametern feststellen.

Auch sie fanden bakterielle DNA im Aszites von Patienten, die die zytologischen Kriterien für eine SBP nicht erfüllten, was sie zu der Annahme bewegte, dass der Nachweis von bakterieller DNA durch die PCR keine Unterscheidung zwischen bakterieller Infektion und bakterieller Besiedlung zulässt.

Zusammenfassend kann aus diesen Studien der Schluss gezogen werden, dass etwa 40% der Patienten vorübergehend bakterielle DNA im Aszites und im Serum aufweisen. Welche Bedeutung die bakterielle Translokation im Langzeitverlauf hat, und ob sie eventuell das Auftreten einer späteren SBP begünstigt, ist jedoch nicht endgültig geklärt. Die jüngste Studie von Zapater et al. (2008) wirft die Hypothese auf, dass das Auftreten bakterieller DNA in Aszites und Serum die Überlebenszeit verschlechtert, während es die Entstehung einer SBP nicht begünstigt.

Sie zeigten, dass nach einem Jahr 38% der Patienten mit Nachweis bakterieller DNA verstorben waren, verglichen mit nur 15% der Patienten ohne DNA-Nachweis (n=156).

1.6.2 Frühzeitige Diagnose einer SBP durch Urinteststreifen

In mehreren Studie wurde in den letzten Jahren untersucht, ob durch den Einsatz von Teststreifen, die für die Urinschnelltestung entwickelt wurden, die Diagnose einer SBP schnell und zuverlässig gestellt werden kann. Es wurden der Multistix Test der Firma Bayer, der Combur Test LN der Firma Roche oder der Nephur Test getestet.

Butani et al. (2004), Castellote et al. (2003), Sapey et al. (2005), Thévenot et al. (2004) und Vanbiervliet et al. (2002) zeigten, dass diese neue diagnostische Methode eine Sensitivität von 64,7 bis 100% und eine Spezifität von 99 bis 100% besitzt.

Da die Testung direkt im Anschluss an die Parazentese, eventuell sogar noch am Patientenbett erfolgen kann, könnte so die Diagnose direkt gestellt werden, falls erforderlich, eine antibiotische Therapie direkt eingeleitet werden und so vermutlich die Überlebensrate einer SBP-Episode erhöht werden.

In einer neueren, multizentrischen Studie von Nousbaum et al. (2007b) wurde bei 1041 stationären und ambulanten Patienten mit Leberzirrhose und Aszites der Einsatz des Multistix Tests zur Diagnostik der SBP mit der Frage nach Sensitivität und Spezifität dieses Testverfahrens untersucht. Es ergab sich eine deutlich geringere Sensitivität von nur 45,3% bei einer Spezifität von 99,2%. Die Autoren vertreten daher im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit deutlich kleineren Fallzahlen die Ansicht, dass die Teststreifen zwar ergänzend zur standardmäßigen Aszitesuntersuchung verwendet werden könnten, diese aber keinesfalls ersetzen dürften.

1.7 Fragestellung

1. Welchen diagnostischen Stellenwert hat der Nachweis bakterieller DNA im Vergleich zum Goldstandard (>250 Granulozyten/ μ l im Aszites)?
2. Gibt es eine Assoziation zwischen dem Nachweis bakterieller DNA und Entzündungszeichen und Leberfunktionsparametern im Vergleich zum Goldstandard?
3. Wie ist der prognostische Wert des bakteriellen DNA-Nachweises in Bezug auf das Überleben im Vergleich zum Goldstandard?
4. Stellt die Verwendung von Teststreifen eine sinnvolle Ergänzung in der Aszitesuntersuchung dar und/oder kann sie die bisherige Standardanalyse des Aszites sogar ersetzen?

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Zwischen März 2006 und November 2007 wurden 151 stationäre Patienten, darunter 46 Frauen und 119 Männer mit Leberzirrhose und Aszites untersucht.

Ein- und Ausschlusskriterien:

- eine Leberzirrhose
- Alter > 18 Jahre
- Nachweis von punktionswürdigem Aszites
- vorliegende Einverständniserklärung

- Alter <18 Jahre
- fehlende Einverständniserklärung
- Kontraindikation zur Aszitespunktion: unzureichender Gerinnungsstatus

Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt.

Im Anschluss an das Feststellen der Einschlusskriterien und bei Vorliegen der Einverständniserklärung erfolgte die genauere Anamnese und klinische Untersuchung des Patienten. Dabei wurden folgende Parameter erfasst:

- Ursache der Leberzirrhose
- Antibiotische Therapie zum aktuellen Zeitpunkt oder um weniger als 1 Woche zurückliegend
- Körpertemperatur
- Blutdruck und Herzfrequenz
- Abdomineller Druck
- Schmerzen
- Dyspnoe
- Übelkeit
- Enzephalopathie-Grad nach den Westhaven-Kriterien

Die Festlegung der klinischen Beschwerden erfolgte durch den Patienten selber, indem er den Schweregrad seines abdominellen Druckes, seiner Luftnot und seiner Übelkeit auf einer Punkteskala von 0-3 (0: gering, 3: sehr stark), seiner Schmerzen auf einer Skala von 1-10 (1: gering, 10: sehr stark) festlegte.

Der Enzephalopathie-Grad (nach den Westhaven Kriterien) wurde anhand des Zahlenverbindungstests (Number Connection Test), der zur Schweregradeinteilung der Hepatischen Enzephalopathie herangezogen wird, sowie nach dem klinischen Bild erfasst.

Laborchemische Parameter des Blutes:

Nach der Punktion einer peripheren Vene zur Blutentnahme unter Verwendung einer EDTA-, einer Serum- und einer Citrat-Monovette (Sarstedt, Numbrecht) erfolgte die Bestimmung der Parameter Albumin, Bilirubin, Kreatinin, Leukozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Quick-Wert bzw. INR im Institut für Klinische Biochemie der Universitätsklinik Bonn.

Anhand der laborchemischen Parameter wurde der Leberdekompressionsgrad des jeweiligen Patienten ermittelt. Zum einen erfolgte anhand folgender Formel die Bestimmung des MELD (Model for End-Stage Liver Disease):

$$10 \times [0,975 \ln(\text{Serumkreatinin in mg/dl}) + 0,378 \ln(\text{Serumbilirubin in mg/dl}) + 1,12 \ln(\text{INR}) + 0,643]$$

Außerdem wurde aus den Parametern Albumin, Quick-Wert bzw. INR, Bilirubin, Hepatischen Enzephalopathiegrad und der Aszitesmenge der Child-Pugh-Score berechnet.

2.2 Durchführung der Aszitespunktion

Zunächst wurde sonographisch die Punktionsstelle an einem typischen Ort aufgesucht und markiert. Anschließend erfolgte die dreimalige Desinfektion mit Povidon-Iod-Lösung (Betasisodona®) getränkten sterilen Tupfern. Nach einer ausreichenden Wartezeit, in der das Desinfektionsmittel trocknen konnte, erfolgte die Durchführung eines Hautabstriches zum mikrobiellen Nachweis von Hautkeimen.

Anschließend erfolgte die Abnahme des Aszites nach den üblichen hygienischen Richtlinien und sterilen Bedingungen.

Zur laborchemischen Bestimmung wurden zwei EDTA-, eine Serum- und eine Glucose-Monovette (Sarstedt, Numbrecht) mit Aszitespunktat gefüllt.

2.3 Untersuchung des Punktats

2.3.1 Bestimmung von Gesamtzellzahl und laborchemischen Parametern

Die maschinelle Gesamtzellzahlbestimmung und die Bestimmung der Parameter Albumin, Bilirubin, Gesamteiweiß, Glucose und LDH erfolgte im Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn.

2.3.2 Zytologische Untersuchung

Die manuelle mikroskopische Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung wurde im Hämatologischen Labor durchgeführt.

2.3.3 Mikrobiologische Untersuchung

Die Beimpfung von drei Bakterienkulturflaschen (Bactec Plus+ Aerobic, Bactec Plus+ Anaerobic und Bactec Plus+ Mycosis, Becton, Dickinson and Company, Sparks, Ireland) mit jeweils 10 ml Aszites erfolgte am Bett.

Im unmittelbaren Anschluss an die Beimpfung erfolgte der Transport in das Institut für Mikrobiologie der Universitätsklinik Bonn. Dort wurden die Auswertung und das Erstellen eines Antibiogramms bei positivem Ergebnis durchgeführt.

2.3.4 Urinstix-Analyse

Das Auftragen der Aszitesflüssigkeit auf die Teststreifen der Firmen Bayer (Multistix[®] 10SG) und Roche (Combur[®]) erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Aszitespunktion. Die Leukozytenanzahl wurde 2 min nach dem Auftragen abgelesen.

Prinzip der Teststreifen

Das Prinzip des Leukozytennachweises durch die Teststreifen beruht auf der Esteraseaktivität der Leukozyten. Das Testfeld enthält einen Indoxylester, der in Anwesenheit von Leukozyten hydrolysiert wird und anschließend mit einem Diazoniumsalz zu einem violetten Farbstoff reagiert. Die Farbreaktion fällt umso stärker aus, je mehr Leukozyten sich in der zu untersuchenden Flüssigkeit befinden. Anhand einer Farbskala wird die Intensität der Verfärbung quantifiziert und ein Zellzahlbereich ermittelt.

Die Teststreifen der Firma Roche besitzen vier Farbfelder für die Bestimmung der Leukozytenanzahl:

- Negativ
- 1+ : entspricht 20-25 Leukozyten/ μ l
- 2+ : entspricht 75 Leukozyten/ μ l
- 3+ : entspricht 500 Leukozyten/ μ l.

Die Teststreifen der Firma Bayer unterscheiden fünf Farbtintensitäten:

Negativ

- Spur: entspricht 15 Leukozyten/ μ l
- 1+: entspricht 70 Leukozyten/ μ l
- 2+: entspricht 125 Leukozyten/ μ l
- 3+: entspricht ca. 500 Leukozyten/ μ l



Abbildung 3: Foto der Multistix[®]- und der Combur[®]-Teststreifen

2.3.5 PCR

Für die PCR-Methodik wurden jeweils 50 ml Aszitespunktat in Cellstar PP Test-tubes (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) und 10 ml Blut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Numbrecht) asserviert und bis zur Weiterverarbeitung maximal drei Tage bei 4°C gelagert.

Die weitere Präparation und die Durchführung der PCR erfolgte im Labor der Klinik für Anästhesie und Spezielle Intensivmedizin der Universität Bonn.

2.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion-Methode

Bei dem LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) handelt es sich um einen in vitro-Nukleinsäure-Amplifikationstest für den Nachweis und die Identifizierung bakterieller und fungaler DNA von Mikroorganismen. Dabei können die in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Die Mindestsensitivität beträgt für alle Spezies 30 CFU/ml, mit Ausnahme von *Staphylokokkus epidermidis*, *Staphylokokkus haemolyticus*, *Streptokokkus agalactiae*, *Streptokokkus pyogenes*, *Streptokokkus pneumoniae*, *Streptokokkus mitis* und *Candida glabrata* (100 CFU/ml).

Der LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade basiert im Wesentlichen auf drei Verfahrensschritten:

- Probenvorbereitung anhand von mechanischer Lyse und DNA-Aufreinigung
- Amplifikation der Ziel-DNA in drei parallelen Reaktionen (grampositive und gramnegative Bakterien und Pilze) und Detektion durch spezielle Hybridisierungssonden mit Echtzeit-PCR
- Automatische Identifizierung von Spezies und Kontrollen

Die Probenvorbereitung und der Aufbau der PCR-Reaktions-Station wurden auf einer Sterilbank durchgeführt. Außerdem wurden sterile puderfreie Handschuhe getragen. Alle verwendeten Instrumente wurden vor der Vorbereitung durch UV-Bestrahlung oder Dekontaminations-Reagenz von bakterieller DNA befreit.

Gram (-)	Gram (+)	Pilze
Escherichia coli	Staphylokokkus aureus	Candida albicans
Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)	CoNS*	Candida tropicalis
Serratia marescens	Streptokokkus pneumoniae	Candida parapsilosis
Enterobacter (cloacae/aerogenes)	Streptokokkus spp.**	Candida glabrata
Proteus mirabilis	Enterokokkus faecium	Candida krusei
Pseudomonas aeruginosa	Enterokokkus faecalis	Aspergillus fumigatus
Acinetobacter baumanii***		
Stenotrophomonas maltophilia		

Tabelle 2: Bakterienspezies, die mit dem LightCycler® SeptiFast Test Mgrade nachgewiesen werden können

* koagulasenegative Staphylokokken: siehe Tabelle 3B

** Streptokokkus Spezies: siehe Tabelle 3A

A	B
Streptokokkus spp. Streptokokkus agalactiae Streptokokkus anginosus Streptokokkus bovis Streptokokkus constellatus Streptokokkus cristatus Streptokokkus gordonii Streptokokkus intermedius Streptokokkus milleri Streptokokkus mitis Streptokokkus mutans Streptokokkus oralis Streptokokkus parasanguinis Streptokokkus pneumoniae Streptokokkus pyogenes Streptokokkus salivarius Streptokokkus sanguinis Streptokokkus thermophilus Streptokokkus vestibularis Streptokokkus viridans	Koagulasenegative Staphylokokken (CoNS) Staphylokokkus hominis spp. Novobiosepticus Staphylokokkus pasteurii Staphylokokkus warneri Staphylokokkus cohnii spp. Urealyticum Staphylokokkus hominis spp. Hominis Staphylokokkus lugdunensis Staphylokokkus cohnii spp. Cohnii Staphylokokkus capitis spp. Capitis Staphylokokkus caprae Staphylokokkus saprophyticus Staphylokokkus saprophyticus spp. saprophyticus Staphylokokkus xylosus Staphylokokkus epidermidis Staphylokokkus haemolyticus

Tabelle 3: Spezies der

A) Gruppen der Streptokokkus spp.

B) koagulasenegative Staphylokokken (CoNS), die anhand des LightCycler® SeptiFast Tests Mgrade positiv getestet werden

2.4.1 Probenvorbereitung

Zunächst erfolgte die Zentrifugation von 50 ml Aszitesflüssigkeit bei 4500 rpm für 15 min. Anschließend wurden 45 ml Überstand abgesaugt und die restlichen 5 ml gemischt. Von diesen 5 ml wurden 1,5 ml in Lysis Tubes gefüllt und im MagNA Lyser® System (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) 30 Sekunden bei 6500 rpm einer mechanischen Lyse unterzogen. 1,5 ml des venösen Blutes wurden ohne vorherige Zentrifugation direkt in Lysis Tubes gefüllt. Die weiteren Schritte waren dieselben wie bei der Aufbereitung der Aszitesflüssigkeit.

Im Anschluss an die Lyse wurde die bakterielle DNA unter Verwendung des SeptiFast Prep Kits Mgrade (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend der Empfehlungen des Herstellers präpariert.

1 ml der lysierten Proben wurden bei 56°C für 15 min unter geringem Schütteln mit einer Protease und einem chaotropischen Lysepuffer (bestehend aus 50% Guanidin-Thiocyanat, 20% Triton X-100, 2% Proteinkinase A) inkubiert. Durch diesen Puffer wird die Nukleinsäure freigesetzt und vor DNAsen im Aszites bzw. Blut geschützt.

Zusammen mit dem Lyseagens wurden in jede Probe 10 µl interne Kontrolle (IC) gegeben, die aus synthetischen doppelsträngigen DNA-Molekülen besteht. Die DNA-Moleküle weisen die gleichen Primer-Bindungsstellen auf wie die Zielsequenzen. Da die IC einmalige HybProbe-Sonden-Bindungsregionen enthält, kann die amplifizierte IC vom zielspezifischen Amplifikat unterschieden werden.

Es folgte die Zugabe eines Bindungspuffers (1000 µl). Anschließend wurde das Gemisch in eine Filtersäule mit einem Glasfaser-Filtereinsatz gegeben (1900 g; 3 min). Die Ziel-DNA band an die Oberfläche der Glasfaser. Ungebundene Substanzen (Salze, Proteine und andere Zellfragmente) wurden in zwei Waschvorgängen, zunächst (4200 g; 2 min) mit 1800 µl Inhibitor Removal-Puffer (enthält 50% Guanidin-Thiocyanat, 40% Ethanol, Tris-HCl-Puffer) und anschließend (4200 g; 10 min) mit 1600 µl Waschpuffer (enthält 0,2% NaCl, 80% Ethanol, Tris-HCl-Puffer) entfernt. Die absorbierten Nukleinsäuren wurden nach 5-minütiger Inkubation mit 100 µl 70°C-heißem Elutionspuffer eluiert, bei 4200 g für 2 min zentrifugiert und die Eluate einer PCR-Analyse unterzogen.

2.4.2 Amplifikation und Detektion mit Echtzeit-PCR

Wahl der Zielsequenz

Bei der Echtzeit-PCR werden sogenannte ITS-Regionen (Internal Transcribed Spacer) als Zielregionen für die Bindung von Primern und HybProben-Sonden gewählt. Da sich in bakteriellen und fungalen Genomen mehrere Operone befinden, verfügt diese Region über eine höhere analytische Sensitivität als single-copy-Gene. Darüber hinaus ist sie speziesspezifischer als ribosomale RNAs.

Bei Bakterien befindet sie sich zwischen den 16S- und 23S-Sequenzen der ribosomalen DNA, bei Pilzen zwischen den 18S- und 5,8S-Sequenzen.

Amplifikation mit dem LightCycler® 2.0 Anlagesystems

Das Eluat wurde drei verschiedenen PCR Reaktionen unter Verwendung des Light Cycler® SeptiFast Kits Mgrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) unter Einhaltung der Empfehlungen des Herstellers unterzogen.

50 µl Probeneluat wurden zu 50 µl des sogenannten Master Mix, einem Amplifikationsgemisch mit „FastStart“-Taq-Polymerase in den LightCycler® Kapillaren (100 µl) gegeben, in denen die PCR-Amplifikation stattfand.

Der Master-Mix enthält die FastStart Taq-Polymerase, das Enzym Uracil-N-Glykosylase, dNTPs (Desoxyneukleotid-triphosphate) und den Detektionsmix für grampositive oder gramnegative Bakterien oder Pilze. Das Enzym Uracil-N-Glykosylase erkennt deoxyuridinhaltige DNA und katalysiert deren Zerstörung. Desoxythimidinhaltige DNA wird dagegen nicht erkannt. Da bei jeder Amplifikation Desoxyuridintriphosphate anstelle von Desoxythimidintriphosphaten eingebaut wird, verringert es so das Risiko einer potenziellen Verunreinigung des Amplifikats.

Tabelle 4 zeigt das nun ablaufende Amplifikationsprogramm.

Programm	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklenanzahl
Inkubation	40	300	1
Denaturierung	95	600	1
Amplifikation I	95	15	15
	58	50	
	72	40	
Amplifikation II	95	15	30
	50	50	
	72	40	
Schmelzkurve	95	60	1
	40	60	
	80	0	
Abkühlung	40	30	1

Tabelle 4: Amplifikations- und Schmelzkurvenprofil des LightCycler® 2.0 Anlagesystems

Parallel wurde ein Gemisch von Zielsequenzen in den Reagenzkontrollen für grampositive und gramnegative Bakterien und Pilze, sowie Negativkontrollen amplifiziert.

Echtzeit-Detektion von PCR-Produkten mit HybProbe-Sonden

Ein spezifisches Paar HybProbe-Sonden diente dem Nachweis des Amplifikats mittels Fluoreszenz. Während der Bindungsphase des Amplifikationszyklus hybridisierten diese fluoreszenzmarkierten HybProbe-Sonden an eine interne Sequenz des amplifizierten Fragments. Die emittierte Fluoreszenz wurde in einem von vier verschiedenen Detektionskanälen des Light Cycler[®] 2.0 Analysesystems gemessen.

Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelztemperatur T_m war von der Länge, der Sequenz und dem Homologiegrad zwischen Sonde und Ziel-DNA abhängig.

Die Detektion der Fluoreszenz in einem der vier Kanäle diente dem Nachweis der Spezies. Anhand der Schmelztemperatur T_m erfolgte die weitere Differenzierung.

2.4.3 Identifizierung von Spezies und Kontrollen

Die Schmelztemperaturen T_m der Proben werden mit einer speziellen Identifizierungssoftware (SIS; *SeptiFast* Identification Software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) analysiert.

Nach der Vollendung jedes Durchlaufs des LightCycler[®] 2.0 Anlagesystems wurden alle Schmelzkurven manuell mit vertikalen Strichen markiert. Sobald ein Strich gesetzt war, berechnete die Software automatisch den Schmelzpunkt (T_m) und die Höhe des entsprechenden Peaks. Im Vorfeld waren spezifische T_m -Grenzen für jedes Schmelzpunktmaximum gesetzt worden.

Dieser Ablauf wurde für alle vier Detektionskanäle und mit allen drei Essays (Gram+, Gram-, Funghi) durchgeführt (siehe Abbildung 4).

Abbildung 5 zeigt die Schmelzkurven dreier Spezies.

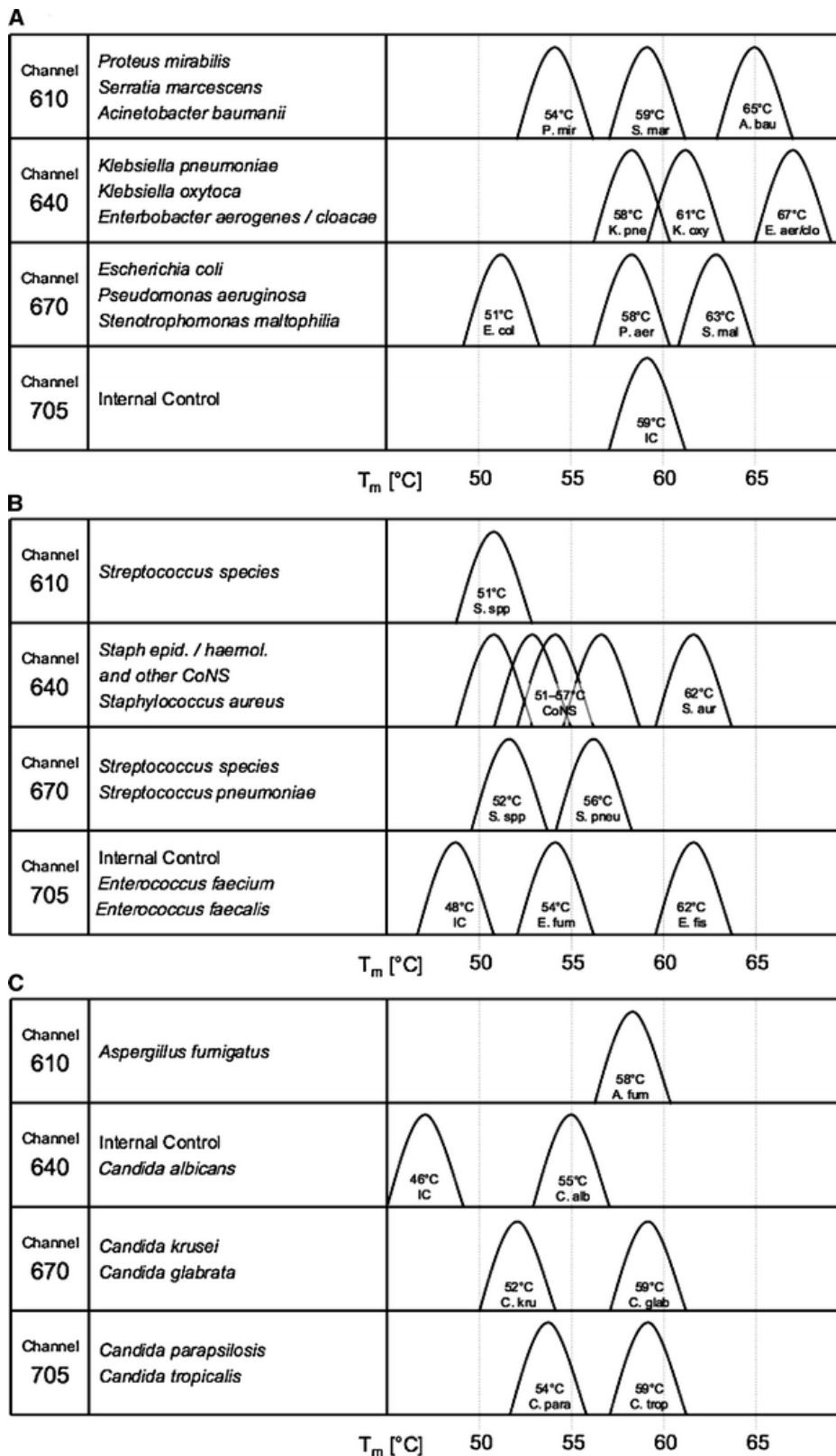


Abbildung 4: Detektionskanäle, des LightCycler® 2.0 Anlagesystems und Schmelzpunkte aller mit dem LightCycler nachweisbaren Mikroorganismen
A gramnegative Bakterien, B grampositive Bakterien, C Pilze
(aus: Lehmann et al., 2008)

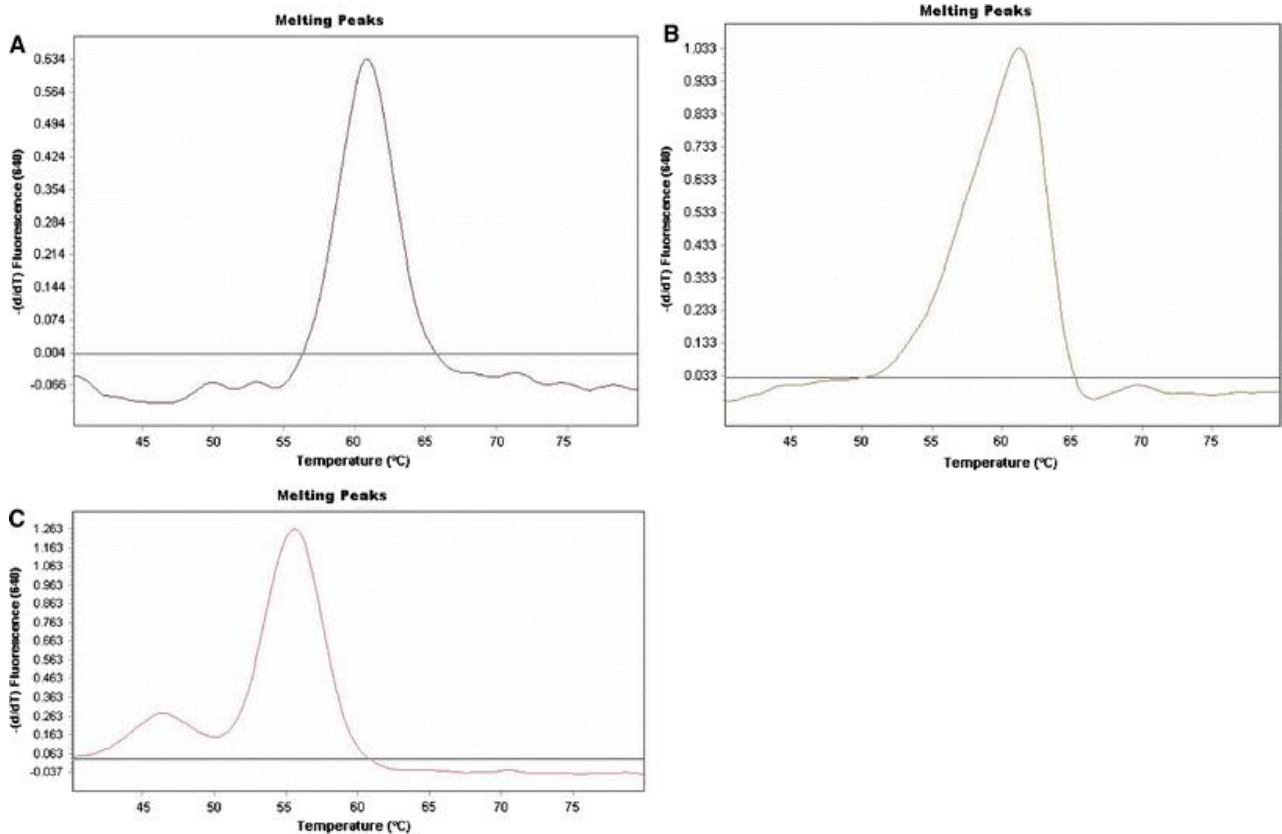


Abbildung 5: Beispiele spezies-charakteristischer Schmelzkurven, die die Identifizierungssoftware des LightCycler® SeptiFast Test Mgrade erstellt
 A *K.oxyteca* ($T_m=61^{\circ}\text{C}$),
 B *S.aureus* ($T_m=62^{\circ}\text{C}$),
 C *C.albicans* ($T_m=55^{\circ}\text{C}$) und interne Kontrolle ($T_m=46^{\circ}\text{C}$)
 (aus: Lehmann et al., 2008)

2.5 Verlaufskontrolle

Drei Monate nach der Rekrutierung des letzten Patienten wurden die Überlebenszeiten und die eventuellen Todesursachen aller Patienten erfasst. Hierzu wurden zunächst die Datenbanken der Univeritätsklinik im Hinblick auf Informationen über den Krankheitsverlauf des Patienten ausgewertet. Ergab sich daraus kein Hinweis auf die Überlebensdauer des Patienten, wurden die Patienten selbst oder deren Hausärzte oder Angehörige kontaktiert.

2.6 Statistik

Alle Analysen wurden mit der SPSS Version 14.0 für Windows® (Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Anhand einer Vierfeldertafel wurden Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert des Nachweises bakterieller DNA durch die PCR für die Diagnose einer SBP, definiert durch den Goldstandard (>250 Granulozyten/ μ l Aszites) berechnet.

Es wurden jeweils Gruppen gebildet aus Patienten mit und ohne SBP nach dem Goldstandard bzw. mit und ohne Nachweis bakterieller DNA durch die PCR und diese miteinander verglichen. Dazu wurden Mittelwert und Standardabweichung bei numerischen Merkmalen und Median und Interquartärer Abstand (IQR) bei ordinalen Merkmalen bestimmt. Außerdem wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben bei gleichen Varianzen durchgeführt.

Im ANOVA-Modell wurde uni- und multivariat der prädiktive Wert von im Blut und Aszites bestimmten Parametern für den Nachweis einer SBP nach dem Goldstandard bzw. bakterieller DNA im Aszites getestet.

Das Überleben wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse und Logrank-Test berechnet.

Für die Teststreifen wurden mithilfe von Vierfeldertafeln Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert ermittelt.

Die Tabellen und Abbildungen entstammen dem Programm SPSS 14.0 (Chicago, Illinois) und Microsoft Excel, Version 2003.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

151 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites, die sich zwischen April 2006 und November 2007 stationär in der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Bonn vorstellten, wurden prospektiv erfasst. Unter den Patienten befanden sich 110 Männer (73%) und 41 Frauen (27%). Das durchschnittliche Alter betrug 57 Jahre.

Bei 40% der Patienten (74 Patienten) lag zum Untersuchungszeitpunkt ein Leberzirrhosegrad Child-Pugh-Score C vor, bei 44% (68 Patienten) ein Score B. Die restlichen 6% (9 Patienten) hatten einen Child-Pugh-Score A.

Die häufigste Ursache der Leberzirrhose war Alkoholabusus (90 Patienten bzw. 60%). Andere Ursachen waren Hepatitis B (10 Patienten/7%), Hepatitis C (7 Patienten/5%), Autoimmunhepatitis (2 Patienten/1%), PBC und PSC (zusammen 5 Patienten/3%) neben selteneren Ursachen bei 37 Patienten (24%).

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten.

		Mittelwert (SD)	Anzahl n	prozentualer Anteil
Alter		57 (\pm 12)		
m/w	männlich		110	
	weiblich		41	
Child-Pugh-Score	A		9	6,0%
	B		68	45,0%
	C		74	49,0%
MELD-Score		17 (\pm 7)		
Erkrankungsursache	Alkohol		90	59,6%
	Kryptogen		28	19,3%
	HBV		10	6,6%
	HCV		7	4,6%
	PSC		4	2,6%
	Hämochromatose		3	2,0%
	Autoimmunhepatitis		2	1,3%
	Kardial		2	1,3%
	Budd-Chiari-Syndrom		2	1,3%
	PBC		1	0,7%
	Alpha1-Antitrypsin-Mangel		1	0,7%

Tabelle 5: Patientencharakteristika
 (HBV: Hepatitis-B-Virus, HCV: Hepatitis-C-Virus,
 PSC: Primär sklerosierende Cholangitis, PBC: Primär biliäre Zirrhose)

3.2 Häufigkeiten des Auftretens einer Spontan bakteriellen Peritonitis und des Erregernachweises durch die Bakterienkulturmethode oder die PCR-Methode

Eine Spontan bakterielle Peritonitis nach Goldstandard (Granulozyten im Aszites >250/ μ l) fand sich bei 18 Patienten (12%).

5 Patienten (28%) mit SBP nach Goldstandard hatten zusätzlich einen positiven Nachweis von Bakterien in der Bakterienkultur. Zwei Patienten wiesen einen Bakteraszites (Nachweis von Bakterien im Aszites ohne Erhöhung der Neutrophilenzahl im Aszites) auf. Bei 18 Patienten (12%) konnte bakterielle DNA im Aszites durch die PCR nachgewiesen werden. Darunter waren 5 Patienten (28%) mit SBP. Die Sensitivität des PCR-Verfahrens zum Nachweis einer SBP beträgt damit 28% bei einer Spezifität von 90%, einem positiv prädiktiven Wert von 28% und einem negativ prädiktivem Wert von 90%. Die Sensitivität der Bakterienkultur beträgt 28% bei einer Spezifität von 99%, einem positiv prädiktiven Wert von 71% und einem negativ prädiktiven Wert von 91%. Die Asziteskultur und die PCR stimmten bei drei Patienten in dem Nachweis der Bakterienspezies bzw. bakterieller DNA überein (siehe Abbildung 6 und Tabellen 6-8).

3.3 Nachgewiesene Keime durch Bakterienkultur und PCR

Staphylokokkus aureus war der am häufigsten nachgewiesene Erreger durch die PCR (33,3%), gefolgt von Enterobacter cloacae (19%) und E.coli (11%). Weiterhin wurden Candida albicans, Enterokokkus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Pneumokokken, Pseudomonas aeruginosa und Stenotrophomonas maltophilia nachgewiesen (jeweils 5,6%) (siehe Tabelle 9).

Die Asziteskultur wies bei 7 Patienten 8 verschiedene Erreger nach: Candida albicans, Candida glabrata, Enterokokkus gallinarum, Pneumokokken, Salmonellen, Staphylokokkus aureus, koagulasenegative Staphylokokken und vergrünende Streptokokken.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die nachgewiesenen Erreger durch die Asziteskultur und die PCR und die jeweilige Zellzahl im Aszites.

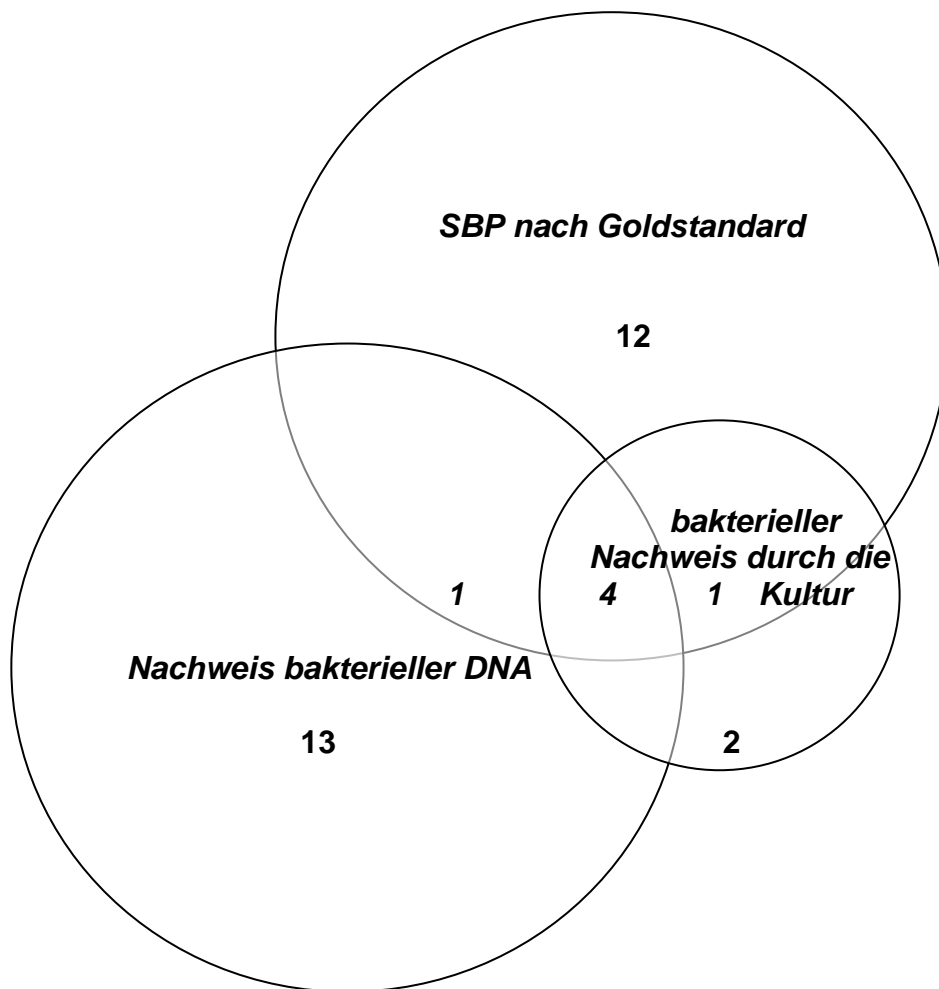


Abbildung 6: Übereinstimmungen zwischen Patienten mit SBP nach Goldstandard, Nachweis bakterieller DNA und bakterieller Nachweis in der Kultur (die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl Patienten in den unterschiedlichen Gruppen)

PCR	keine SBP	SBP	Gesamt
negativ	120	13	133
positiv	13	5	18
Gesamt	133	18	151

Tabelle 6: Anzahl der Patienten mit/ohne SBP nach Goldstandard mit/ohne Nachweis bakterieller DNA durch die PCR

Asziteskultur	keine SBP	SBP	Gesamt
negativ	131	13	144
positiv	2	5	7
Gesamt	133	18	151

Tabelle 7: Anzahl der Patienten mit/ohne SBP nach Goldstandard mit/ohne bakteriellem Nachweis in der Kultur

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv prädiktiver Wert (%)	negativ prädiktiver Wert (%)
Bakterienkultur	27,8	98,5	71,4	91,0
PCR	27,8	90,2	27,8	90,2

Tabelle 8: Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert der Bakterienkulturmethode und der PCR-Untersuchung zum Nachweis einer SBP nach Goldstandard

Patientennr.	Bakterielle DNA	Bakterienkultur	Neutrophile/ µl im Aszites	Gesamtzellzahl/ µl im Aszites
2	Staphylokokkus aureus	Negativ	10	350
14	MRSA	Negativ	400	900
18	Stenotrophomonas maltophilia	Negativ	30	300
34	Candida albicans	Candida albicans+glabrata	2800	3970
61	Enterokokkus faecalis	Negativ	10	210
64	Enterobacter cloacae	Negativ	10	160
76	Staphylokokkus aureus	Negativ	10	160
77	Staphylokokkus aureus	Negativ	0	200
80	Staphylokokkus aureus	Negativ	184	460
81	Pseudomonas aeruginosa	Negativ	0	150
85	E.coli	Negativ	0	60
86	Negativ	Negativ	5	170
89	Pneumokokken	Pneumckokken	385	1720
97	Staphylokokkus aureus	Staphylokokkus aureus	300	560
99	Enterobacter cloacae	Negativ	2	110
115	Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae	Negativ	30	190
117	Staphylokokkus aureus	Negativ	0	100
121	Pseudomonas aeruginosa	Negativ	93	930
139	E.coli	vergrünende Streptokokken	300	600
13	Negativ	Enterococcus gallinarum	1856	2320
118	Negativ	koagulaseneg.Staphylokokken	175	620
164	Negativ	Salmonellen	0	170

Tabelle 9: Vergleich zwischen den Ergebnissen der PCR, der Bakterienkultur und der Neutrophilenanzahl im Aszites

3.4 Nachweis bakterieller DNA im Blut durch die PCR

Bakterielle DNA im venösen Blut fand sich bei zwei Patienten. Dabei handelte es sich einmal um einen multiresistenten Staphylokokkus aureus, der zudem im Aszites durch die PCR nachgewiesen wurde, und einmal um Staphylokokkus aureus, der im Aszites nicht nachgewiesen werden konnte. Der Patient mit Nachweis des multiresistenten Staphylokokkus aureus hatte gleichzeitig eine Spontan bakterielle Peritonitis nach Goldstandard.

3.5 SBP und antibiotische Therapie zum Zeitpunkt der Aszitespunktion

48 Patienten (32%) wurden zum Zeitpunkt der Punktion oder bis zu drei Tage vorher antibiotisch therapiert. Die dabei verabreichten Antibiotika sind in Tabelle 10 aufgelistet. Tabelle 11 zeigt die verwendeten Antibiotika bei Patienten mit positiver Bakterienkultur. 3 Patienten (60%) mit SBP nach Goldstandard und positiver Bakterienkultur erhielten eine antibiotische Therapie, darunter zweimal die Kombination Ampicillin+Sulbactam und einmal die Kombination Ampicillin+Sulbactam+Metronidazol.

Im Gegensatz dazu wurden nur 5 Patienten (38,5%) mit SBP nach Goldstandard, aber negativer Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Punktion oder bis zu drei Tage vorher antibiotisch therapiert. Hier fanden sich als Therapeutika Ampicillin, Ciprofloxacin, Flucloxacillin, Levofloxacin oder Moxifloxacin. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests weist keinen Zusammenhang zwischen antibiotischer Therapie und Bakterienkulturnachweis nach (siehe Tabelle 12).

Auch zwischen dem Nachweis bakterieller DNA und der Gabe von Antibiotika lässt sich kein Zusammenhang feststellen. 8 von 18 Patienten (44,4%) mit Nachweis bakterieller DNA im Aszites und 40 von 133 Patienten mit negativer PCR (30,1%) wurden antibiotisch therapiert (siehe Tabelle 13).

Tabelle 14 zeigt das Auftreten einer SBP nach Goldstandard ohne und mit antibiotischer Therapie. 8 Patienten mit einer Therapie (16,7%), 10 Patienten ohne Therapie hatten eine SBP auf (9,7%). Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests weist auch hier keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer SBP und einer antibiotischen Therapie nach (siehe Tabelle 14).

Antibiotika	Anzahl	Anteil in Prozent
Keine antibiotische Therapie	103	68,2%
antibiotische Therapie	48	31,8%
Levofloxacin	17	
Ciprofloxacin	8	
Ampicillin+Sulbactam	8	
Metronidazol	3	
Ceftriaxon	2	
Moxifloxacin	1	
Levofloxacin, Vancomycin	1	
Levofloxacin, Metronidazol	1	
Flucloxacillin	1	
Ciprofloxacin, Meronem	1	
Ceftriaxon, Levofloxacin	1	
Ampicillin+Sulbactam, Metronidazol	1	
Ampicillin+Sulbactam, Levofloxacin	1	
Ampicillin	1	

Tabelle 10: Anzahl der unterschiedlichen verabreichten Antibiotika

Asziteskultur	Neutrophile/ μ l im Aszites	antibiotische Therapie
Enterokokkus gallinarum	1856	Ampicillin, Sulbactam
Candida glabrata, Candida albicans	2800	Ampicillin, Sulbactam
Staphylokokkus aureus	300	Ampicillin, Sulbactam, Metronidazol
Pneumokokken	385	-
Vergrünende Streptokokken	300	-
Koagulasenegative Staphylokokken	187	Ceftriaxon
Salmonellen	0	-

Tabelle 11: Keimspektrum, Anzahl Neutrophiler Granulozyten und antibiotische Therapie der kulturpositiven Aszitespunktate

	antibiotische Therapie	keine antibiotische Therapie	Chi-Quadrat nach Pearson
SBP+, Bactec+	3	2	0,678
SBP+, Bactec-	5	8	

Tabelle 12: Anzahl Patienten mit/ohne antibiotischer Therapie mit SBP und positiver (SBP+, Bactec+) bzw. negativer (SBP+, Bactec-) Bakterienkultur und Chi-Quadrat-Test

	antibiotische Therapie	keine antibiotische Therapie	Chi-Quadrat nach Pearson
PCR+	8	10	1,51
PCR-	40	93	

Tabelle 13: Anzahl Patienten mit/ohne antibiotischer Therapie mit (PCR+) bzw. ohne (PCR-) Nachweis bakterieller DNA durch die PCR und Chi-Quadrat-Test

	SBP	Keine SBP	Chi-Quadrat nach Pearson
antibiotische Therapie	8	40	1,51
keine antibiotische Therapie	10	93	

Tabelle 14: Anzahl des Auftretens einer SBP nach Goldstandard bei Patienten mit bzw. ohne antibiotische Therapie

3.6 Vergleich klinischer und laborchemischer Parameter zwischen Patienten mit bzw. ohne SBP

Hinsichtlich des Leberfunktionsgrades sowie klinischer Parameter wie Schmerzen, Luftnot, Übelkeit, abdomineller Druck und Körpertemperatur unterscheiden sich Patienten mit SBP nicht von Patienten ohne SBP.

Vergleicht man die laborchemischen Parameter Albumin, Kreatinin, CRP, Bilirubin, INR, Thrombozyten und Leukozyten im Blut, so fällt auf, dass Patienten mit SBP einen signifikant niedrigeren Albuminwert und einen signifikant höheren CRP- und Leukozytenwert (Signifikanzniveau $p < 0,05$) aufweisen.

Hinsichtlich der Aszitesparameter unterscheiden sich Patienten mit bzw. ohne SBP in der Höhe des LDH-Wertes.

Die Tabellen 15-18 zeigen Median (IQR) bzw. Mittelwert (Standardabweichung) der Leberfunktionsgrade (Child-Pugh-Punkte und MELD-Score) und der klinischen und laborchemischen Parameter von Patienten mit bzw. ohne SBP.

	SBP	Keine SBP	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
Child-Pugh-Punkte	11 (\pm 10,8)	10 (\pm 1,8)	>0,05
MELD-Score	17,3 (\pm 6,6)	16,8 (\pm 7,4)	>0,05

Tabelle 15: Childpunkte und MELD-Score der Gruppen SBP nach Goldstandard bzw. keine SBP nach Goldstandard (SD: Standardabweichung)

Klinische Parameter	SBP	Keine SBP	
	Median (IQR)	Median (IQR)	Signifikanz p
Schmerzen	1 (1,4)	1 (1,3)	>0,05
Luftnot	3 (0,6)	0 (0,6)	>0,05
Übelkeit	0 (0,0)	0 (0,0)	>0,05
abdomineller Druck	4,5 (3,6)	3 (0,6)	>0,05
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	
Körpertemperatur (°C)	36,5 (0,8)	36,0 (3,6)	> 0,05

Tabelle 16: Klinische Parameter der Gruppen SBP nach Goldstandard bzw. keine SBP nach Goldstandard (IQR: Interquartärer Abstand; SD: Standardabweichung)

Laborparameter im Blut	SBP	keine SBP	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
Albumin (g/l)	22,8 (± 4,9)	27,6 (± 6,7)	0,004
Kreatinin (mg/dl)	1,6 (± 0,7)	2,7 (± 11,4)	>0,05
CRP (mg/l)	74,2 (± 54,3)	22,9 (± 20,0)	0,000
Bilirubin (mg/dl)	6,2 (± 9,8)	4,3 (± 6,8)	>0,05
INR	1,3 (± 0,2)	1,41 (± 0,6)	>0,05
Thrombozyten (G/l)	166,3 (± 142,7)	144,5 (± 82)	>0,05
Leukozyten (G/l)	10,8 (± 7,0)	7,3 (± 3,9)	0,002

Tabelle 17: Laborparameter des Blutes der Gruppen SBP nach Goldstandard bzw. keine SBP nach Goldstandard (SD: Standardabweichung)

Aszitesparameter	SBP	keine SBP	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
LDH (U/l)	105,9 (± 64,6)	64,8 (± 35,9)	0,00
Albumin (g/l)	7,0 (± 4,9)	7,6 (± 7,8)	>0,05
Gesamteiweiß (g/l)	16 (± 10)	19 (± 13)	>0,05
Glukose (mg/dl)	117,4 (± 30,6)	134,9 (± 61,0)	>0,05
Granulozyten/ μ l	816,1 (± 830,5)	22,1 (± 39,0)	
Gesamtzellzahl/ μ l	1386,7 (± 1149,6)	267,7 (± 204,5)	
Serum-Aszites-Albumingradient (g/l)	16,69 (± 5,43)	20,09 (± 8,06)	>0,05

Tabelle 18: Laborparameter des Aszites der Gruppen SBP nach Goldstandard bzw. keine SBP nach Goldstandard (SD: Standardabweichung)

Auf die Berechnung der Signifikanz p für die Granulozytenanzahl und die Gesamtzellzahl im Aszites wurde bewusst verzichtet, da die Granulozytenanzahl als Goldstandard für die SBP-Diagnostik dient.

3.7 Vergleich klinischer und laborchemischer Parameter zwischen Patienten mit positivem bzw. negativem bakteriellem DNA-Nachweis

Entsprechend des Vergleiches zwischen Patienten mit und ohne SBP wurden Patienten mit bzw. ohne bakteriellen DNA-Nachweis im Aszites hinsichtlich klinischer und laborchemischer Parameter verglichen. Die Tabellen 19-22 zeigen jeweils Median und IQR bzw. Mittelwert und Standardabweichung.

Anhand des t-Testes konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

	PCR-positiv	PCR-negativ	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
Child-Pugh-Punkte	10 (\pm 1,3)	10 (\pm 1,9)	>0,05
MELD-Score	16,9 (\pm 6,2)	16,9 (\pm 7,5)	>0,05

Tabelle 19: Childpunkte und MELD-Score der Gruppen PCR-positiv bzw. -negativ (SD: Standardabweichung)

Klinische Parameter	PCR-positiv	PCR-negativ	
	Median (IQR)	Median (IQR)	Signifikanz p
Schmerzen	1 (1,4)	1 (1,3)	>0,05
Luftnot	3 (0,6)	0 (0,6)	>0,05
Übelkeit	0 (0,0)	0 (0,0)	>0,05
abdomineller Druck	4,5 (3,6)	3 (0,6)	>0,05
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	
Temperatur (°C)	36,2 (0,6)	36,1 (3,6)	>0,05

Tabelle 20: Klinische Parameter der Gruppen PCR-positiv bzw. PCR-negativ (IQR: Interquartärer Abstand; SD: Standardabweichung)

Laborparameter im Blut	PCR-positiv	PCR-negativ	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
Albumin (g/l)	24,9 (\pm 6,7)	27,3 (\pm 6,8)	>0,05
Kreatinin (mg/dl)	1,7 (\pm 0,8)	2,7 (\pm 11,4)	>0,05
CRP (mg/l)	39,1 (\pm 41,9)	27,8 (\pm 29,5)	>0,05
Bilirubin (mg/dl)	3,1 (\pm 2,9)	4,7 (\pm 7,6)	>0,05
INR	1,3 (\pm 0,3)	1,4 (\pm 0,6)	>0,05
Thrombozyten (G/l)	134,6 (\pm 67,1)	148,8 (\pm 93,8)	>0,05
Leukozyten (G/l)	8,2 (\pm 5,5)	7,7 (\pm 4,4)	>0,05

Tabelle 21: Laborparameter des Blutes der Gruppen PCR-positiv bzw. PCR-negativ (SD: Standardabweichung)

Aszitesparameter	PCR-positiv	PCR-negativ	
	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz p
LDH (U/l)	78,7 (\pm 56,9)	68,6 (\pm 40,0)	>0,05
Albumin (g/l)	6,6 (\pm 3,9)	7,7 (\pm 7,8)	>0,05
Gesamteiweiß (g/l)	23 (\pm 18)	18 (\pm 12)	>0,05
Glukose (mg/dl)	145,9 (\pm 97,6)	130,9 (\pm 50,8)	>0,05
Granulozyten/ μ l	253,6 (\pm 651,5)	98,2 (\pm 329,5)	>0,05
Gesamtzellzahl/ μ l	614,1 (\pm 921,9)	378,2 (\pm 508,5)	>0,05
Serum-Aszites-Albumin-Gradient (g/l)	18,2 (\pm 8,5)	19,9 (\pm 7,8)	>0,05

Tabelle 22: Laborparameter des Aszites der Gruppen PCR-positiv bzw. PCR-negativ (SD: Standardabweichung)

3.8 Univariate und multivariate Analysen nach ANOVA

Der prädiktive Wert der folgenden Parameter für den Nachweis einer SBP nach Goldstandard bzw. bakterieller DNA im Aszites wurde getestet:

Im Blut bzw. Serum: Albumin, Bilirubin, CRP, INR, Leukozyten, Kreatinin, Thrombozyten

Im Aszites: Albumin, Glukose und LDH.

Nach der univariaten Analyse (Signifikanzniveau $p < 0,1$) sind Albumin und CRP im Serum, Leukozyten im Blut und LDH im Aszites als prädiktive Parameter für eine SBP zu werten. Diese Parameter wurden in einem multivariaten Cox-Modell zur Testung auf Unabhängigkeit geprüft ($p < 0,05$).

In der multivariaten Analyse (Signifikanzniveau $p < 0,05$) waren Albumin und CRP im Serum, Leukozyten im Blut und LDH im Aszites signifikant (siehe Tabelle 23 A-B).

Mit dem Nachweis bakterieller DNA war bereits in der univariaten Analyse kein Parameter assoziiert (siehe Tabelle 24).

A Univariate Analyse – SBP

Laborparameter	F	Signifikanz p
Albumin im Serum	8,47	0,00
Bilirubin im Serum	1,17	0,28
CRP im Serum	59,53	0
INR im Serum	0,654	0,42
Kreatinin im Serum	0,171	0,68
Leukozyten im Blut	9,65	0,00
Thrombozyten im Blut	0,91	0,34
Albumin im Aszites	0,10	0,75
LDH im Aszites	16,49	0
Gesamteiweiß im Aszites	0,92	0,36
Glukose im Aszites	1,43	0,23

B Multivariate Analyse - SBP

Abhängige Variable	F	Signifikanz p
Albumin im Serum	8,25	0,01
CRP im Serum	57,55	0,00
Leukozyten im Blut	9,04	0,00
LDH im Aszites	15,15	0,00

Tabelle 23:

Univariate (A) und multivariate (B) Analyse von Parametern für das Auftreten einer SBP

Univariate Analyse – PCR

Laborparameter	F	Signifikanz p
Albumin im Serum	2,11	0,15
Bilirubin im Serum	0,82	0,37
CRP im Serum	2,07	0,15
INR im Serum	0,51	0,48
Kreatinin im Serum	0,13	0,72
Leukozyten im Blut	0,19	0,66
Thrombozyten im Blut	0,38	0,56
Albumin im Aszites	0,33	0,57
LDH im Aszites	0,91	0,34
Gesamteiweiß im Aszites	0,19	0,60
Glukose im Aszites	1,04	0,31

Tabelle 24:

Univariate Analyse der Laborparameter zur Bestimmung von Parametern für das Auftreten bakterieller DNA im Aszites

3.9 Zusammenhang zwischen der Granulozytenzahl im Blut und im Aszites

Betrachtet man Abbildung 7, so fällt auf, dass zwischen der Granulozytenanzahl im Blut und der Anzahl im Aszites kein linearer Zusammenhang besteht.

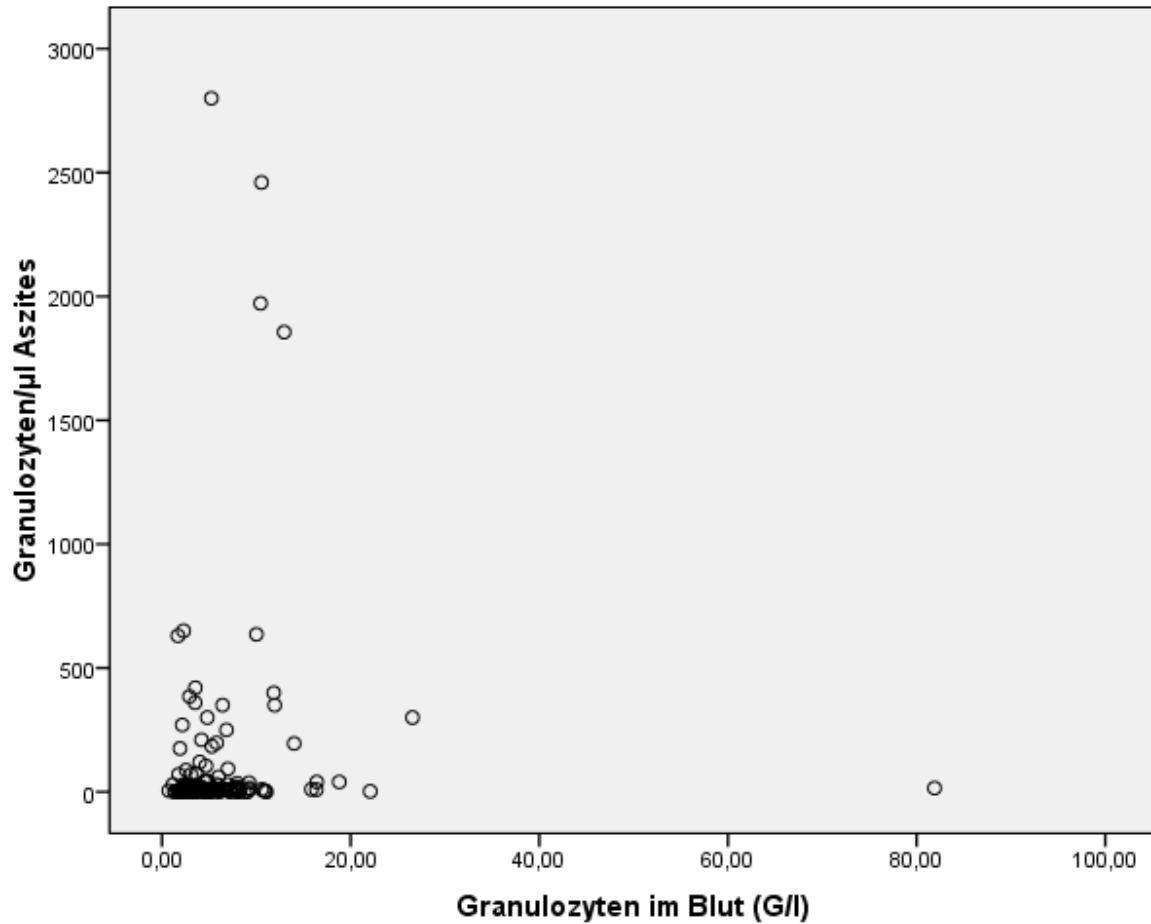


Abbildung 7: Punktwolkendiagramm mit der Granulozytenanzahl im Blut und im Aszites

3.10 Überleben

3.10.1 Mortalität einer SBP-Episode bzw. 30-Tages-Mortalität nach dem Nachweis bakterieller DNA

Die 30-Tages-Mortalität bei Patienten mit SBP betrug 18% (3 Patienten). Im Vergleich dazu betrug die 30-Tages-Mortalität bei Patienten ohne SBP 10% (13 Patienten) (siehe Tabelle 25).

Die 30-Tages-Mortalität bei Patienten mit dem Nachweis bakterieller DNA betrug 6% (1 Patient) und 11% (15 Patienten) bei Patienten mit negativem PCR-Ergebnis (siehe Tabelle 26).

SBP nach Goldstandard	30-Tages-Mortalität	Anzahl verstorbener Patienten
SBP	18%	3
keine SBP	10%	13

Tabelle 25: 30-Tages-Mortalität nach SBP bzw. ohne SBP und Anzahl verstorbener Patienten

PCR	30-Tages-Mortalität	Anzahl verstorbener Patienten
positiv	6%	1
negativ	11%	15

Tabelle 26: 30-Tages-Mortalität von Patienten mit positiver/negativer PCR und Anzahl verstorbener Patienten

3.10.2 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

Es zeigte sich in der Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 8), dass Patienten mit SBP nach Goldstandard eine ungünstigere Überlebensprognose haben, auch wenn der Unterschied zwischen beiden Gruppen im Log Rank Test keine Signifikanz erreicht ($p=0,112$). Das mittlere Überleben lag in der Gruppe mit SBP bei 264 (± 134) Tagen, in der Gruppe ohne SBP bei 543 (± 92) Tagen.

Vergleicht man die Überlebenszeiten zwischen Patienten mit positiver PCR und negativer PCR, so zeigt die Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 9) ein längeres Überleben von Patienten mit positiver PCR. Nach dem Log Rank Test gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,169$). Patienten mit positiver PCR leben im Durchschnitt noch 589 (± 89) Tage, Patienten mit negativer PCR 365 (± 57) Tage nach der Parazentese.

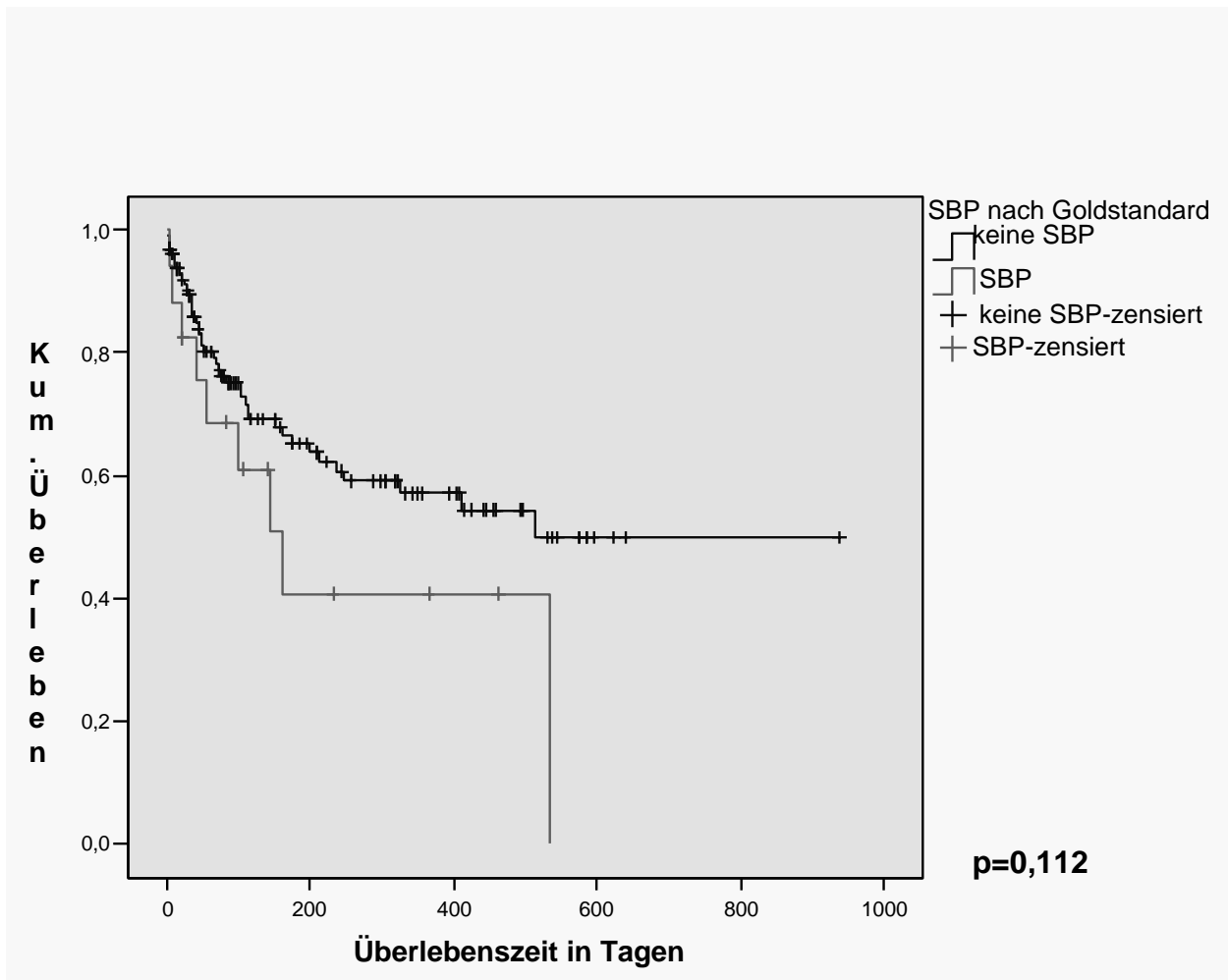


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit/ohne SBP (p nach logrank)

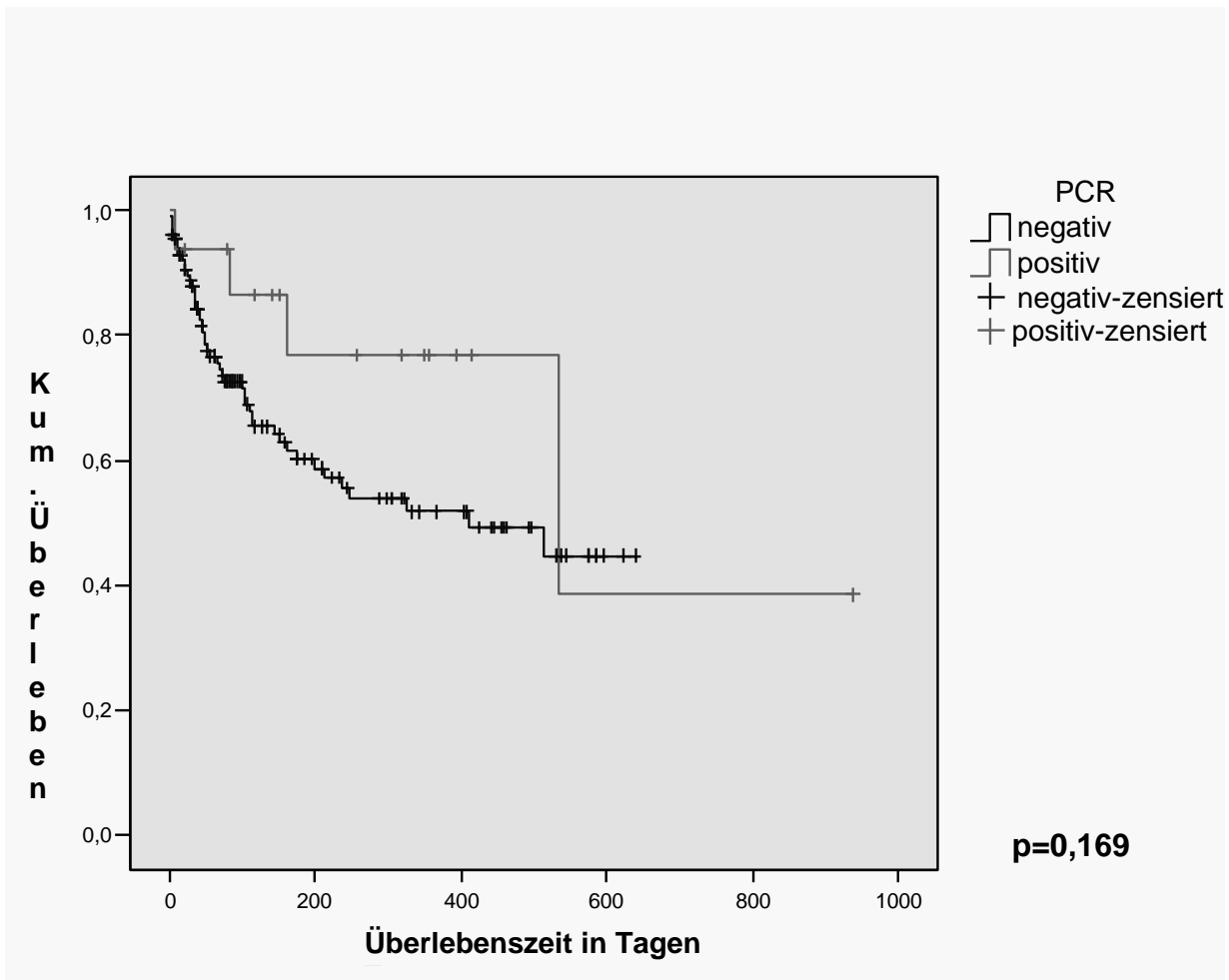


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit positivem/negativem DNA-Nachweis durch die PCR (p nach logrank)

3.11 Urinteststreifen

Eine Auswertung der beiden verwendeten Teststreifen Combur[®] und Multistix[®] erfolgte durch unterschiedliche Wichtung der Farbfelder. Nicht ablesbare Teststreifen wurden für die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktivem Wert als negativ gewertet.

Wertet man eine Verfärbung der Teststreifen entsprechend der Felder 1+-positiv, 2+-positiv oder 3+-positiv als positives Testergebnis, so ergibt sich für die Combur[®]-Streifen eine Sensitivität von 66,%, eine Spezifität von 52,6%, ein positiv prädiktiver Wert von 16% und ein negativ prädiktiver Wert von 92,1%. Für die Multistix[®]-Teststreifen ergibt sich eine Sensitivität von 27,8%, eine Spezifität von 91,7%, ein positiv prädiktiver Wert von 83,3% und ein negativ prädiktiver Wert von 91,0%.

Nimmt man die Verfärbung entsprechend des 2+-Feldes oder 3+-Feldes für Combur[®] bzw. entsprechend des 1+-, 2+- oder 3+-Feldes für Multistix[®] als positives Ergebnis an, so beträgt die Sensitivität 38,9% bzw. 5,6% für Combur[®] bzw. Multistix[®], die Spezifität 97,0% bzw. 100%, der positiv prädiktive Wert 63,6% bzw. 100% und der negativ prädiktive Wert 92,1% bzw. 88,0%.

Diese Werte sowie die absoluten Ergebnisse sind den Tabellen 27-32 zu entnehmen.

Tabelle 33 zeigt die Bilirubinmittelwerte im Aszites eindeutig ablesbarer und nicht eindeutig ablesbarer Teststreifen. Sowohl beim Combur[®]-Test, als auch beim Multistix[®]-Test unterscheiden diese sich signifikant zwischen beiden Gruppen.

Multistix®	SBP	keine SBP	Gesamt
positiv (ab 1+)	5	1	6
negativ	8	120	128
nicht ablesbar	5	12	17
Gesamt	18	133	151

Tabelle 27: Ergebnisse der Multistix® 10SG-Teststreifen, wenn man eine Verfärbung von mindestens der Stärke des 1+-Feldes zugrunde legt

Multistix®	SBP	keine SBP	Gesamt
positiv (ab 2+)	1	0	1
negativ	12	121	133
nicht ablesbar	5	12	17
Gesamt	18	133	151

Tabelle 28: Ergebnisse der Multistix® 10SG-Teststreifen, wenn man eine Verfärbung von mindestens der Stärke des 2+-Feldes zugrunde legt

Combur®	SBP	keine SBP	Gesamt
positiv (ab 1+)	12	63	75
negativ	1	57	58
nicht ablesbar	5	13	18
Gesamt	18	133	151

Tabelle 29: Ergebnisse der Combur®-Teststreifen, wenn man eine Verfärbung von mindestens der Stärke des 1+-Feldes zugrunde legt

Combur®	SBP	keine SBP	Gesamt
positiv (ab 2+)	7	4	11
negativ	6	116	122
nicht ablesbar	5	13	18
Gesamt	18	133	151

Tabelle 30: Ergebnisse der Combur®-Teststreifen, wenn man eine Verfärbung von mindestens der Stärke des 2+-Feldes zugrunde legt

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv prädiktiver Wert (%)	negativ prädiktiver Wert (%)
Combur [®]	66,7	52,6	16	92,1
Multistix [®]	27,8	91,7	83,3	91,0

Tabelle 31 : Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert der Teststreifen, wenn man eine Verfärbung mindestens der Stärke des 1+-Feldes zugrunde legt

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv prädiktiver Wert (%)	negativ prädiktiver Wert (%)
Combur [®]	38,9	97,0	63,6	92,1
Multistix [®]	5,6	100	100	88,0

Tabelle 32: Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert der Teststreifen, wenn man eine Verfärbung mindestens der Stärke des 2+-Feldes zugrunde legt

	ablesbare Teststreifen	nicht ablesbare Teststreifen	
Bilirubingehalt im Aszites (mg/dl)	Mittelwert (SD)	Mittelwert (SD)	Signifikanz
Combur [®]	0,5 (± 0,5)	3,69 (± 2,83)	0,000
Multistix [®]	0,51 (± 0,51)	3,85 (± 2,88)	0,000

Tabelle 33: Bilirubingehalt im Aszites der Gruppen ablesbare bzw. nicht ablesbare Teststreifen des Combur[®]- und des Multistix[®]-Tests (SD: Standardabweichung)

4 Diskussion

4.1 Einleitung zum Diskussionsteil

In jüngster Vergangenheit sind neue Verfahrensweisen in der Diagnostik des Aszites und der SBP vorgestellt worden. Diese haben wir prospektiv an einem Kollektiv von Patienten, die sich stationär in der Universitätsklinik Bonn zwischen März 2006 und November 2007 vorgestellt haben, mit den bekannten, etablierten Verfahren verglichen. Neuere Verfahren sind der Nachweis bakterieller DNA im Aszites mittels PCR und die Verwendung von Urinteststreifen.

Es soll diskutiert werden, welche Verfahren und welche Kombination von Verfahren sinnvoll in der Diagnostik der SBP sind.

4.2 Stellenwert des PCR-Verfahrens in der Aszitesuntersuchung

4.2.1 Vorteile und Grenzen des Nachweises bakterieller DNA durch die Real-time-PCR

Der LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde ursprünglich dazu entwickelt, in Verbindung mit dem klinischen Bild, bewährten mikrobiologischen Tests und/oder anderen Labormarkern als zusätzliches Diagnostikum bei Sepsis zu dienen (Lehmann et al., 2008).

Man geht davon aus, dass etwa 25 Mikroorganismen für mehr als 90% aller Infektionen im Blutkreislauf verantwortlich sind (Biedenbach et al., 2004; Wisplinghoff et al., 2004).

Mit dem LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade können alle diese Mikroorganismen nachgewiesen werden (Lehmann et al., 2008).

Vorteile des Verfahrens

Während die Detektion bakterieller und fungaler Pathogene mittels Blutkulturen meist mindestens 48 Stunden in Anspruch nimmt, stehen die Ergebnisse mittels Realtime-PCR bereits nach weniger als 6 Stunden zur Verfügung. Damit liefert sie frühzeitig die notwendigen Informationen, um rasch eine Breitspektrumtherapie einzuleiten, was in der Sepsis-Therapie einen entscheidenden therapeutischen Gewinn darstellt.

Darüber hinaus können mit mikrobiologischen Testmethoden nur lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Mit der PCR-Methode gelingt dagegen der Nachweis sowohl lebender als auch toter Mikroorganismen sowie freier mikrobieller DNA. Dies könnte sich als Vorteil bei einer bereits begonnenen antibiotischen/antimykotischen Therapie erweisen.

Nachteile des Verfahrens

Der LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade erlaubt zur Zeit noch nicht die Detektion von Resistenzgenen und kann daher die konventionelle Bakterienkultur mit Antibiotogrammherstellung auch nicht vollständig ersetzen. Darüber hinaus ist eine Beurteilung hinsichtlich Pathogenität der nachgewiesenen bakteriellen DNA nicht möglich.

Die analytische Sensitivität des verwendeten PCR-Verfahrens wurde durch eine Trefferquotenanalyse jedes Analyten einer Verdünnungsserie mit 100, 30 und 3 CFU/ml in EDTA-Blut gesunder Sepsender analysiert. Sie liegt mit 3-30 CFU/ml Blut unter der des konventionellen Kulturverfahrens mit einer theoretischen Sensitivität von 1 CFU/Kulturflasche, die mit 10 ml Blut gefüllt wurde (Lehmann et al., 2008).

Der LightCycler[®] SeptiFast Test Mgrade ist für die Verwendung mit Humanblut aus dem Antikoagulans K-EDTA validiert. Ob sich die Ergebnisse auf die Untersuchung von Aszites übertragen lassen, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Vorteile	Nachteile
Ergebnisse in weniger als 6 Stunden	Keine Antibiotogrammherstellung
Nachweis lebender und toter Mikroorganismen	geringere Sensitivität als die Bakterienkultur
	nicht für die Verwendung mit Aszites validiert

Tabelle 34: Überblick über Vor- und Nachteile des LightCycler[®] SeptiFast Tests Mgrade im Vergleich zur Bakterienkultur

4.2.2 Nachweis bakterieller DNA im Aszites

In dieser Studie gelang der bakterielle/fungale DNA-Nachweis durch die PCR im Aszites bei 18 von 151 (12%) Patienten, darunter hatten 5 Patienten (44,4%) gleichzeitig eine SBP nach Goldstandard.

Staphylokokkus aureus war der am häufigste nachgewiesene Erreger, gefolgt von *Enterobacter cloacae*.

Nur bei zwei Patienten lag die Leukozytenzahl im Aszites innerhalb eines für Vollblut üblichen Bereichs. Humane DNA in Leukozyten wird als Träger für die bakterielle DNA benötigt und verbessert so die Präparationseffizienz. Man könnte daher vermuten, dass für den Nachweis bakterieller DNA eine Mindestleukozytenzahl im Medium notwendig ist. Der Nachweis bakterieller DNA gelang jedoch auch bei 16 Patienten mit einer Leukozytenzahl $<1000/\mu\text{l}$ (mittlere Leukozytenanzahl aller Patienten: 406 ± 573 , mittlere Leukozytenzahl bei Patienten mit positiver PCR: 614 ± 922). Somit ist nach unseren Untersuchungen davon auszugehen, dass das PCR-Verfahren auch bei Medien mit kleinerer Leukozytenzahl als im Vollblut anzuwenden ist.

Positive Nachweise in der Asziteskultur fanden sich bei 5 Patienten mit SBP nach Goldstandard (38,5%). Bei 2 Patienten lag ein Bakteraszites vor.

Der gleichzeitige Nachweis einer Bakterienspezies durch die PCR und die Asziteskultur gelang bei 2 Patienten. In einem weiteren Fall, in dem in der Asziteskultur *Candida albicans* und *Candida glabrata* wuchsen, wies die PCR nur *Candida albicans* nach. Die Sonde ist für *Candida glabrata* weniger sensitiv, die Mindestsensitivität wird erst bei einer Konzentration von 100 CFU/ml erreicht. Eine mögliche Ursache für die geringere analytische Sensitivität sehen Lehmann et al. (2008) in der Größe der Ziel-DNA-Region, die durch die Primer begrenzt wird, die für die IST-Region dieses Keimes hergestellt wurden. Eine zu geringe Candidakonzentration mag daher in diesem Fall ursächlich für das negative Ergebnis der PCR gewesen sein.

Die durch die Asziteskultur nachgewiesenen Bakterien *Salmonella enterica*, *Enterokokkus gallinarum*, koagulasenegative Staphylokokken und vergrünende Streptokokken wurden durch die PCR nicht erkannt. *Salmonella enterica* und *Enterokokkus gallinarum* sind nicht in der *SeptiFast* Master List aufgeführt, werden durch den LightCycler® *SeptiFast* Test Mgrade also bislang nicht erkannt. Die koagulasenegativen Staphylokokken und vergrünenden Streptokokken werden durch

die Identifikationssoftware unterdrückt, was das (falsch-) negative Ergebnis in der PCR erklären könnte.

4.2.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Studien

Im Vergleich zu den bereits zitierten Studien von Francés et al. (2004a), Such et al. (2002), Viera et al. (2007) und Zapater et al. (2008) fällt zunächst einmal eine geringere Nachweisrate an bakterieller DNA durch die PCR auf.

Such et al. (2002) wiesen bei 9 von 28 Patienten, Francés et al. (2004a) bei 7 von 17 (41,2%) , Zapater et al. (2008) bei 48 von 156 Patienten (30,8%) bakterielle DNA im Aszites und im Blut nach. Sie untersuchten nur Patienten mit sterilem Aszites, also ohne Erregernachweis durch die Kultur oder einer SBP nach dem Goldstandard.

Viera et al. (2007) fanden bakterielle DNA bei 7 von 8 Patienten mit SBP, bei 3 von 4 Patienten mit Bakteraszites und bei 8 von 28 Patienten mit sterilem Aszites, das heißt ohne SBP nach Goldstandard und ohne bakteriellen Nachweis durch die Kultur.

Auffällig ist auch der hohe Anteil des Nachweises an E.coli in diesen Studien. Unter den 9 nachgewiesenen Bakterienstämmen in der Studie von Such et al. fanden sich 7-mal E.coli und 2-mal Staphylokokkus aureus.

Außerdem fanden sich bei Such et al. und Francés et al. jeweils dieselben Bakterienspezies im Blut und im Aszites, während in unserer Studie der bakterielle DNA-Nachweis im Blut nur bei zwei Patienten gelang. Der hohe Anteil an E.coli positiven Proben könnte jedoch auch für eine Verunreinigung sprechen. Die fehlende Darstellung von Negativkontrollen in der Arbeit der Arbeitsgruppe und die geringe Anzahl an Amplifikationszyklen von nur 35 Zyklen könnten dafür sprechen. Verwendet man eine Negativkontrolle und amplifiziert man diese 40-45 Zyklen, wie dies in unserer Studie durchgeführt wurde, so kann man bei negativem Ergebnis eine Kontamination mit großer Sicherheit ausschließen.

Nach Meier et al. (1993) sind PCR-Reagenzien, insbesondere die Taq-Polymerase häufig mit bakterieller DNA kontaminiert.

Wir haben daher dekontaminierte PCR-Reagenzien, die frei von bakterieller oder fungaler DNA sind, entsprechend den Empfehlungen von Corless et al. (2000) und Klaschik et al. (2002), verwendet.

Staphylokokkus aureus hat laut Literatur (Such et al., 2002) einen Anteil von 4% an den durch die Kultur nachgewiesenen Keimen.

Eine Erklärungsmöglichkeit für den hohen Anteil von nachgewiesenen Staphylokokkus aureus (33,3%) in dieser Studie liefern Such et al. (2002):

Sie wiesen Staphylokokkus aureus in zwei Fällen nach und bemerkten, dass dieser Keim eventuell für die Infektion bei Patienten mit CNNA und daher für weitaus mehr als nur 4% der SBPs verantwortlich sein könnte.

	Such et al. (2002)	Francés et al. (2004a)	Vieria et al. (2007)	Zapater et al. (2008)	Unsere Studie
positive PCR-Ergebnisse/ Patienten mit sterilem Aszites*	9/28	7/17	8/28	48/156	13/131
positive PCR-Ergebnisse/ Patienten mit Bakteraszites	nicht untersucht	nicht untersucht	3/4	nicht untersucht	0/2
positive PCR-Ergebnisse/ Patienten mit SBP	nicht untersucht	nicht untersucht	7/8	nicht untersucht	5/18

Tabelle 35: Ergebnisse der Aszitesuntersuchungen (unter anderem mit der PCR-Methode) verschiedener Arbeitsgruppen

* ohne SBP und ohne bakteriellen Nachweis durch die Kultur

4.2.4 Bedeutung des Nachweises bakterieller DNA für den aktuellen Verlauf und die Prognose

Bisherige Ergebnisse anderer Studien

Such et al. (2002) sowie Francés et al. (2004a) fanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich klinischen und laborchemischen Serum- und Aszitesparametern zwischen Patienten mit positiver und negativer PCR.

Francés et al. (2004a) stellten außerdem fest, dass Patienten mit dem Nachweis bakterieller DNA zumindest während ihres Krankenhausaufenthaltes keine SBP-Episode entwickeln.

In der Studie von Zapater et al. (2008) lag die Rate an SBP-Episoden im Verlauf bei Patienten mit Nachweis bakterieller DNA nicht höher als bei Patienten ohne Nachweis bakterieller DNA (4,8% versus 4,9%). Zapater et al. lieferten dazu zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1. Die Entstehung einer SBP ist an das Vorhandensein eines lebenden Bakteriums gebunden. Die PCR weist nur Fragmente von Bakterien nach.

2. Das Vorhandensein bakterieller DNA könnte das Immunsystem anregen und daher Schutz vor virulenten Bakterien bieten.

In experimentellen (Klinman et al., 1999) und klinischen Studien (Francés et al., 2004b; Francés et al 2007; Klinman et al., 1996) wurde sogar gezeigt, dass das Vorliegen bakterieller DNA zu einer Verbesserung der Immunantwort gegen virulente Bakterien beitragen kann und damit einen gewissen Schutz vor der Entstehung einer SBP bietet.

Vieria et al. (2007) verglichen Patienten mit und ohne bakteriellen Nachweis durch die PCR bezüglich INR, Aszites, Bilirubin und Kreatinin im Serum, Albumin, Gesamteiweiß und Gesamtzellzahl im Aszites, bezüglich des Aszites-Serum-Albumingradienten, des MELD-Scores und bezüglich der 3-Monats-Sterblichkeit. Sie fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Die Arbeitsgruppe schloss aus ihren und aus den Ergebnissen von Such et al. (2002), dass das Vorhandensein bakterieller DNA bei Patienten, die die zytologischen Kriterien einer SBP nicht erfüllen, keinen Effekt auf die kurzzeitige Prognose hat. Sie ziehen allerdings auch in Betracht, dass diese Patienten in Abhängigkeit von der bakteriziden Kapazität der Aszitesflüssigkeit durchaus eine SBP-Episode entwickeln können (Vieria et al., 2007).

Die jüngste Studie von Zapater et al. (2008) weist jedoch daraufhin, dass Patienten mit dem Nachweis bakterieller DNA eine höhere Mortalität in den folgenden 12 Monaten haben als Patienten ohne diesen Nachweis (38% versus 15%).

Such et al. (2002), Francés et al. (2004a) und Zapater et al. (2008) untersuchten nur Patienten ohne SBP nach Goldstandard, Vieria et al. (2007) nur Patienten mit SBP nach Goldstandard. Eine direkte Aussage darüber, ob der Nachweis bakterieller DNA mit einer SBP assoziiert ist, konnten sie daher nicht treffen.

Ergebnisse unserer Studie

In unserer Studie konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Entzündungszeichen und Leberfunktionsparametern sowie der Überlebenszeit zwischen Patienten mit positivem und negativem PCR-Nachweis festgestellt werden.

Der Nachweis bakterieller DNA stimmt darüber hinaus in unserer Studie nicht mit dem Goldstandard der SBP überein.

Daraus lässt sich folgern, dass der Nachweis bakterieller DNA mit der von uns verwendeten Methode weder eine Aussage über das Vorliegen einer SBP nach Goldstandard noch über die Überlebensprognose des Patienten zulässt.

4.3 Nachweis bakterieller DNA im Blut

Da der Nachweis bakterieller DNA im Blut nur bei zwei Patienten gelang, messen wir der Untersuchung von Blut auf bakterieller DNA keine zusätzliche diagnostische und prognostische Bedeutung bei.

4.4 Einsatzgebiet der Bakterienkultur in der SBP-Diagnostik

Bei nur 27,8% der Patienten mit SBP nach Goldstandard gelang in unserer Studie der bakterielle Nachweis durch die Kultur.

Auch in anderen Studien ist nur bei 36% bis 59% der Patienten mit SBP die Bakterienkultur positiv (Canete et al., 2007; Fleig et al., 2004; Thévenot et al., 2004).

Die geringere Konzentration von Bakterien in der Aszitesflüssigkeit, im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten, ist vermutlich ursächlich für die niedrige Zahl positiver Kulturergebnisse.

Ein Vorteil des Verfahrens ist sicherlich, dass bei positivem Keimnachweis die Erstellung eines AntibioGRAMMS und damit die gezielte antibiotische Therapie möglich wird.

Nachteilig ist die lange Wartezeit von mindestens 48 Stunden bis zum Vorliegen eines Ergebnisses.

4.5 Rolle klinischer Parameter und Laborparameter in der Diagnostik der SBP

Klinische Parameter wie Schmerzen, abdomineller Druck, Dyspnoe, Übelkeit und Temperatur lassen laut unserer Studie keine Aussage über das Vorliegen einer SBP nach Goldstandard zu. Patienten mit SBP weisen zwar einen schlechteren Leberfunktionsgrad nach Child-Pugh-Score und MELD-Score, auf, der Unterschied erreicht aber keine Signifikanz. Auch in anderen Studien wurden klinische Parameter nicht als geeignet für ein alleiniges Diagnosekriterium einer SBP gesehen (Caly und Strauss, 1993; Conte et al., 1993; Mowat und Stanley, 2001).

In unserer Gruppe sind prädiktive Faktoren für eine SBP erhöhte Entzündungsparameter, ein erhöhter LDH-Wert im Aszites und ein erniedrigter Serumalbuminspiegel, der als Hinweis auf eine beginnende Dekompensation der Leberzirrhose gesehen werden kann.

Einen signifikant erhöhten Bilirubinwert im Serum und eine erniedrigte Thrombozytenzahl im Blut bei Patienten mit SBP, die Andreu et al. (1993) beschrieben, konnten wir in unserer Studie nicht finden.

Wir stimmen dagegen mit Runyon und Hoefs (1985) überein, die einen erhöhten LDH-Wert im Aszites bei Patienten mit SBP feststellten. Die Arbeitsgruppe beschrieb darüber

hinaus eine Veränderung des Glukosegehaltes im Aszites bei Patienten mit SBP. Einen signifikanten Unterschied im Glukosegehalt des Aszites zwischen Patienten mit und ohne SBP konnten wir nicht feststellen.

Nousbaum et al. (2007a) sahen im Gegensatz zu unserer Studie klinische Parameter wie abdominelle Schmerzen, Hypo- und Hyperthermie und einen Child-Pugh-Score C als prädiktive Parameter an.

Es fällt auf, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Gruppen unterschiedliche Definitionskriterien für eine SBP festgelegt haben. Caly und Strauss (1993) haben eine Neutrophilenzahl $>500/\mu\text{l}$ unabhängig vom Ergebnis der Bakterienkultur, Conte et al. (1993) eine Neutrophilenzahl $>500/\mu\text{l}$ in Verbindung mit einem bakteriellen Nachweis, Runyon und Hoefs (1985) eine Neutrophilenzahl $>250/\mu\text{l}$ in Verbindung mit einem bakteriellen Nachweis, Andreu et al. eine Neutrophilenzahl $>500/\mu\text{l}$ in Verbindung mit einem bakteriellen Nachweis oder eine Neutrophilenzahl $>500/\mu\text{l}$ als Definitionskriterium für eine SBP angenommen. Nousbaum et al. (2007a) und Mowat und Stanley (2001) haben die SBP nach dem heutigen Goldstandard definiert. Die Studien sind daher untereinander nicht direkt vergleichbar.

Eine Assoziation mit Entzündungsparametern, CRP im Serum und Leukozyten im Blut, wurde bisher in keiner anderen Studie untersucht.

4.6 Bestätigen die nach unserer Studie prädiktiven Parameter für eine SBP den Goldstandard als Diagnosekriterium für eine SBP?

Wir konnten in unserer Studie folgende prädiktive Parameter für das Vorhandensein einer SBP nach Goldstandard bestimmen: eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut, ein erniedrigter Albuminspiegel im Serum, ein erhöhtes C-reaktives Protein im Serum und ein erhöhter LDH-Wert im Aszites (siehe Tabelle 23).

Die erhöhte Leukozytenzahl, der erhöhte CRP-Wert sowie der erhöhte LDH-Wert weisen dabei auf eine bestehende Entzündung hin, was im Folgenden erläutert werden soll.

Nach Eindringen eines Erregers in den Körper wird zunächst das unspezifische Immunsystem aktiviert. Phagozyten, dazu gehören ortständige Makrophagen,

dendritische Zellen, mobile neutrophile Granulozyten und Monozyten haben die Aufgabe, Antigene zu eliminieren. Monozyten und Makrophagen sind außerdem zur Antigenpräsentation und zur Abgabe ko-stimulierender Signale befähigt und können dadurch das spezifische Immunsystem aktivieren. Darüber hinaus setzen Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen Zytokine frei, die wiederum mobile Phagozyten an den Ort des Infektionsgeschehens dirigieren. Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Funktionsproteinen, die die Aktivität anderer Immunzellen beeinflussen können. Sie werden durch eine Vielzahl von Zellen nach Aktivierung oder Verletzung gebildet, wie z.B. von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen oder Epithelzellen, und beeinflussen sowohl die spezifische als auch die unspezifische Immunantwort. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Spontan bakterielle Peritonitis mit einer Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere Interleukin-6 und TNF-alpha, in Serum und Aszites einhergeht (Rodríguez-Ramos et al., 2001; Zeni et al., 1993).

Neutrophile Granulozyten

Von antigenpräsentierenden Zellen ausgeschüttete Zytokine (v.a. Interleukin-1, Interleukin-8) veranlassen eine zielgerichtete Wanderung der Granulozyten in das Infektionsgebiet, wo sie durch Bindung des Antigens an unspezifische Oberflächenrezeptoren aktiviert werden.

Eine Erhöhung der Granulozytenanzahl im Aszites weist daher auf eine Entzündung in diesem Medium hin.

Leukozyten

Meist, und v.a. bei bakteriellen Infektionen, ist eine Leukozytenerhöhung durch eine absolute Granulozytenerhöhung bedingt. Wie oben beschrieben führen einzelne Zytokine zu einer Aktivierung und Proliferation von Leukozyten.

Eine Erhöhung der Leukozytenzahl im Blut kann daher einen Hinweis auf das Vorliegen einer bakteriellen Infektion geben.

C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein gehört zu den Akut-Phase-Proteinen und wird durch Interleukin-6 induziert. Es kann sich als Opsonin an Bakterienhüllen binden und die Komponentenkaskade aktivieren. Es steigt frühzeitig, innerhalb von 6-8 h nach Infektionsausbruch, an. Sehr hohe CRP-Werte lassen den Verdacht auf eine bakterielle Infektion, wie z.B. einer SBP, zu.

LDH

Nach Runyon und Hoefs (1985) wird LDH durch die Lyse von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Eine erhöhte Anzahl Neutrophiler Granulozyten im Aszites müsste folglich mit einem erhöhten LDH-Wert einhergehen. Dies konnten wir in unserer Studie bestätigen.

Die nach der multivariaten Analyse prädiktiven Parameter bestätigen das Vorliegen einer Entzündung bei Patienten, die >250 Granulozyten/ μ l Aszites aufweisen. Die erhöhte Leukozytenzahl im Blut und der erhöhte CRP-Wert im Serum weisen auf eine bestehende Entzündung hin. Der erhöhte LDH-Wert und die erhöhte Granulozytenzahl im Aszites, die als Goldstandard in der SBP-Diagnostik dient, erlauben die Lokalisation dieser Entzündung in die Bauchhöhle.

Man könnte vermuten, dass nicht die Bauchhöhle, sondern ein extraperitonealer Fokus primär für das Entzündungsgeschehen verantwortlich ist. Allerdings würde man dann einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Granulozyten im Blut und der Anzahl im Aszites erwarten unter der Annahme, dass die Granulozyten sekundär aus dem Blutkreislauf in die Bauchhöhle gewandert sind. Dies ist aber nicht der Fall (siehe Abbildung 7).

Die gleichzeitige Erhöhung der Entzündungsparameter bei Erfüllung des Goldstandards, zeigt, dass bei diesen Patienten die Diagnose einer Spontan bakteriellen Peritonitis und als Folge die Einleitung einer antibiotischen Therapie gerechtfertigt ist, auch wenn sich bei den meisten Patienten kein Erreger nachweisen lässt und die Patienten keine klinischen Symptome wie Fieber, Schmerzen oder Übelkeit aufweisen. Der in der Regel zu beobachtende Abfall der Leukozytenkonzentration im Aszites nach Einleitung einer antibiotischen Therapie zeigt, dass diese Therapie erfolgreich ist.

Darüber hinaus haben Patienten mit SBP nach Goldstandard eine schlechtere Langzeitprognose gemessen am Überleben, was die Relevanz der Diagnose und die Dringlichkeit einer Therapie bei diesen Patienten noch unterstützt.

Eine Erhöhung der Leukozytenzahl im Blut und ein erhöhter CRP-Wert im Serum sollten daher Anlass zu einer diagnostischen Aszitespunktion geben. Bei zusätzlichem Vorliegen eines erhöhten LDH-Wertes im Aszites, sollte eventuell schon mit der Einleitung einer antibiotischen Therapie begonnen werden.

4.7 Teststreifen in der Diagnostik der SBP

Die Sensitivität der Teststreifen ist in unserer Studie niedriger als in früheren Studien, die die Teststreifen als zuverlässig für die Schnelldiagnostik einer SBP beschrieben (Vanbiervliet et al., 2002; Thévenot et al., 2004).

Nousbaum et al. (2007b) kamen in der bislang größten Studie zur Verwendung von Teststreifen für die Diagnose einer SBP zu schlechteren Ergebnissen. Sie sahen eine Verfärbung entsprechend des 2+-Feldes der Multistix-Teststreifen als positiv an.

In ihrer Studie, in der sie 2123 Punktate untersuchten, ergab sich nur eine Sensitivität von 45,3% bei einer Spezifität von 99,2%, einem positiv prädiktiven Wert von 77,9% und einem negativ prädiktiven Wert von 96,9%.

Verwenden wir diese Kriterien, so erreicht der Multistix[®]-Test in unserer Studie eine noch niedrigere Sensitivität von nur 5,6% bei einer Spezifität von 100%. Die Ergebnisse des Combur[®]-Tests ähneln mit einer Sensitivität von 38,9% bei einer Spezifität von 97,0% eher den Ergebnissen, die Nousbaum et al. für den Multistix[®]-Test ermittelt haben.

Ein Grund für die niedrige Sensitivität und Spezifität in unserer Studie könnte die Anzahl an nicht eindeutig ablesbaren Teststreifen sein. Diese wurden als Negativergebnis gewertet und beeinflussen daher die Sensitivität ungünstig. Insgesamt konnten 17 Teststreifen des Multistix[®]-Testes, darunter 5 SBP, und 18 Teststreifen des Combur[®]-Tests, darunter ebenfalls 5 SBP, nicht eindeutig einem Farbfeld zugeordnet werden. Die Felder waren gelblich verfärbt, wobei wir als Ursache den signifikant höheren Bilirubingehalt in diesen Aszitesproben im Vergleich zu den anderen Proben annehmen

(siehe Tabelle 33). Der unlesbare Teststreifen wurde bisher von keiner Studie beschrieben. Wir sehen hier jedoch eine Schwachstelle dieses Verfahrens.

Stellenwert der Teststreifen in der Aszitesdiagnostik

Aufgrund der differierenden Ergebnisse der verschiedenen Studien und vor dem Hintergrund der niedrigen Sensitivität in dieser Studie, kann man die Teststreifen sicherlich allenfalls als Ergänzung zur Zellzahlbestimmung im Aszites sehen. Keinenfalls jedoch dürfen die Teststreifen die bisherige Diagnostik ersetzen.

Außerdem sollten Teststreifen verschiedener Firmen verglichen werden. Diese Studie zeigt wie auch schon einige früher durchgeführte Studien, dass die Combur[®]-Teststreifen, die eine modifizierte Version des Nephur-Tests darstellen, eine höhere Sensitivität aufweisen als die Multistix[®]-Streifen (Campillo et al., 2006; Sapey et al., 2005).

Nach unserer Studie erlaubt das positive Ergebnis im Teststreifen die Diagnose einer SBP, ein negativer Test schließt die SBP aber keinesfalls aus.

4.8 Beeinflussung der Ergebnisse durch eine antibiotische Therapie

In unsere Studie wurden Patienten mit und ohne antibiotische Therapie eingeschlossen. Dabei erhielt weniger als ein Drittel der Patienten eine antibiotische Therapie zur Zeit der Aszitespunktion.

Patienten mit SBP nach dem Goldstandard und positiver Asziteskultur wurden zum Zeitpunkt der Punktion deutlich häufiger antibiotisch therapiert als Patienten mit SBP und negativer Kultur. Auch Patienten mit SBP nach dem Goldstandard wurden häufiger antibiotisch therapiert als Patienten ohne SBP (siehe Tabelle 12, 14).

Zwischen dem Nachweis bakterieller DNA und einer bestehenden antibiotischen Therapie konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die gewählten Antibiotika bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites keinen Einfluss auf die diagnostische Wertigkeit der durchgeführten Untersuchungen hat.

Außerdem hätte man bei Ausschluss der Patienten mit antibiotischer Therapie nur ein eingeschränktes Patientenkollektiv betrachtet, das gerade die Patienten, die sich in einem kritischeren Zustand befanden, nicht erfasst hätte.

Zu bemerken ist weiterhin, dass der Nachweis bakterieller DNA auch noch nach dem Einleiten der Therapie gelingt, nämlich so lange sich bakterielle Bestandteile in der Aszitesflüssigkeit bzw. im Blut befinden und wird daher vermutlich kaum von einer antibiotischen Therapie beeinflusst.

Bislang ist allerdings noch unklar, wie lange sich die bakterielle DNA nachweisen lässt.

Tsumita und Iwanaga (1963) injizierten radioaktiv markierte DNA in die Blutbahn von Mäusen. Sie stellten dabei fest, dass schon nach 30 Minuten 99% der radioaktiv markierten DNA aus dem Blutkreislauf verschwunden waren. Francés et al. (2004a) konnten bakterielle DNA im Blut zwischen 24 und 72h nachweisen (bei einem Beobachtungszeitraum von 72h und 8-stündigen Kontrollen). Allerdings ist unklar, ob es sich bei dieser DNA um permanent im Blut befindliche DNA handelte, oder ob bei diesen Patienten eine repetitive oder permanente bakterielle Translokation aus dem Darm stattfand.

Zu der Frage nach der Dauer der Persistenz der DNA im Aszites gibt es bisher keine Hinweise.

4.9 Zusammenfassender Überblick über die diagnostische Wertigkeit der vorgestellten Verfahren

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SBP nach Goldstandard erhöhte Entzündungsparameter aufweisen und eine ungünstigere Überlebensprognose haben. Die Diagnose einer SBP sollte daher schnell gestellt werden und zügig mit der Einleitung einer antibiotischen Therapie begonnen werden.

Eine Erhöhung der Entzündungsparameter wie CRP im Serum und Leukozyten im Blut kann dabei erste Hinweise auf das Vorliegen einer SBP liefern und sollte zumindest eine diagnostische Aszitespunktion mit Bestimmung der Granulozytenzahl im Aszites zur Folge haben. Bei Erfüllen des Goldstandards sollte sofort mit einer antibiotischen Therapie begonnen werden.

Eine sinnvolle Ergänzung zur Schnelluntersuchung des Aszites stellt sicherlich die Verwendung von Teststreifen dar. Diese Diagnostik ist relativ einfach und kostengünstig durchzuführen, so dass es sich anbietet, diese Art der Diagnostik zusätzlich zu der bisher üblichen Diagnostik durchzuführen. Bei einer hohen Spezifität sollte überlegt werden, mit einer antibiotischen Therapie zu beginnen.

Die Bakterienkultur-Methode sollte trotz niedriger Sensitivität angewandt werden. Immerhin bietet sie bei ca. 30% der Patienten mit SBP nach Goldstandard einen Erregernachweis mit Antibigramm, so dass bei diesen Patienten die begonnene antibiotische Therapie auf eine gezielt wirksame umgestellt werden kann.

Zur Zeit stellt nach unseren Untersuchungen der Nachweis bakterieller DNA mittels PCR kein prognostisch relevantes diagnostisches Verfahren zur Diagnose einer SBP dar.

Der bakterielle Nachweis durch die PCR gelingt zwar häufiger als durch die Asziteskultur. Allerdings lassen sich nicht alle durch die Kultur nachgewiesenen Erreger auch durch das verwendete PCR-Verfahren nachweisen. Hier sind sicherlich noch Verbesserungen des noch recht jungen PCR-Verfahren möglich.

Weiterhin stimmt der Nachweis bakterieller DNA in unserer Studie nicht mit dem Goldstandard der SBP überein, was sich damit erklären lässt, dass die PCR Bakterienfragmente nachweist, die nicht unbedingt eine bakterielle Virulenz bedeuten.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Patienten mit Nachweis bakterieller DNA sich bezüglich klinischer und laborchemische Parameter, als auch bezüglich der

Überlebensprognose nicht von Patienten ohne bakteriellen DNA-Nachweis unterscheiden. Welche Rolle der Nachweis bakterieller DNA im Aszites spielt, ist nach wie vor nicht geklärt.

Es könnte sich um eine vorübergehende, zum Punktionszeitpunkt stattfindende oder abgelaufene bakterielle Besiedlung des Aszites handeln. Das Auftreten bakterieller DNA könnte durch Stimulation einer Immunantwort auch einen Schutz vor der Entstehung einer SBP bieten.

5 Zusammenfassung

Wir haben Daten von 151 stationären Patienten mit Leberzirrhose und Aszites prospektiv erfasst mit dem Ziel, den Nachweis bakterieller DNA mittels PCR hinsichtlich seiner Relevanz für die Diagnose einer SBP, die Assoziation mit Entzündungszeichen und Leberfunktionsparametern und das Überleben zu untersuchen. Außerdem sollte die diagnostische Aussagekraft zweier Urinteststreifen für eine SBP ermittelt werden.

18 Patienten (12%) hatten eine SBP nach Goldstandard (>250 Granulozyten/ μl), 18 (12%) Patienten hatten einen positiven DNA-Nachweis im Aszites, darunter 5 Patienten (28%) mit SBP. 7 Patienten (5%) wiesen eine positive Asziteskultur auf, darunter waren 2 Patienten DNA-positiv mit identischen Keimen.

In der SBP-Gruppe waren – verglichen mit jenen ohne SBP – in der univariaten Analyse das C-reaktive Protein (CRP) ($p=0,000$), die Blutleukozyten ($p=0,000$), das Serumalbumin ($p=0,004$) und LDH im Aszites ($p=0,000$) signifikant unterschiedlich. In der multivariaten Analyse waren die Parameter Serum-CRP ($p=0,000$), Serum-Albumin ($p=0,005$), Leukozyten im Blut ($p=0,003$) und LDH im Aszites ($p=0,000$) signifikant unterschiedlich. In der DNA-Gruppe war kein Parameter prädiktiv.

Die SBP-Gruppe hatte ein kürzeres mittleres Überleben im Vergleich zu Patienten ohne SBP (264 \pm 134 versus 544 \pm 93 Tage), während der DNA-Nachweis prognostisch nicht relevant war.

Die Ergebnisse der Teststreifen waren nicht befriedigend bei geringer Sensitivität und höherer Spezifität.

Der Nachweis eines Erregers durch die Bakterienkultur gelang bei 27,8% der Patienten mit SBP. Die Bakterienkultur kann Hinweise für die Therapie geben und eignet sich daher als zusätzliches Diagnostikum.

Die Bestimmung von bakterieller/fungaler DNA im Aszites eignet sich laut unserer Untersuchung zum aktuellen Zeitpunkt nicht zum Nachweis einer SBP. Auch der Bestimmung von bakterieller/fungaler DNA im Blut messen wir zur Zeit keine diagnostische und prognostische Bedeutung bei.

6 Literaturverzeichnis

Albillos A, Cuervas-Mons V, Millán I, Cantón T, Montes J, Barrios C, Garrido A, Escartín P. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 1990; 98: 134-140

Almeida PR, Camargo NS, Arenz M, Tovo CV, Galperim B, Behar P. Spontaneous bacterial peritonitis: impact of microbiological changes. *Arq Gastroenterol*. 2007; 44: 68-72

al Amri SM, Allam AR, al Mofleh IA. Spontaneous bacterial peritonitis and culture negative neutrocytic ascites in patients with non-alcoholic liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1994; 9: 433-436

Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alía C, Gallen M, Vila MC, Coll S, Oliver MI. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology*. 1993; 104: 1133-1138

Arroyo V, Jiménez W. Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol*. 2000; 32: 157-170

Bar-Meir S, Lerner E, Conn HO. Analysis of ascitic fluid in cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 1979; 24: 136-144

Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50: 59-69

Bobadilla M, Sifuentes J, Garcia-Tsao G. Improved method for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 2145-2147

Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension.

J Hepatol. 2000; 32: 141-156.

Butani RC, Shaffer RT, Szykowski RD, Weeks BE, Speights LG, Kadakia SC. Rapid diagnosis of infected ascitic fluid using leukocyte esterase dipstick testing. Am J Gastroenterol. 2004; 99: 532-537

Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. J Hepatol. 1993; 18: 353-358

Campillo B, Richardet JP, Dupeyron C. Diagnostic value of two reagent strips (Multistix 8 SG and Combur 2 LN) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and symptomatic bacterascites. Gastroenterol Clin Biol. 2006; 30: 446-452

Canete N, Erice E, Bargallo A, Cirera I, Masnou H, Miquel M, Coll S, Gimenez MD, Galeras JA, Morilla RM, Planas R, Sola R. Natural history of spontaneous bacterial peritonitis: A longitudinal study in 263 cirrhotic patients after the first ascites decompensation. J Hepatol. 2007; 46: 90-91

Casafont F, Sánchez E, Martín L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. Hepatology. 1997; 25: 1334-1337

Castellote J, López C, Gornals J, Tremosa G, Fariña ER, Baliellas C, Domingo A, Xiol X. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. Hepatology. 2003; 37: 893-896

Castellote J, Xiol X, Verdaguer R, Ribes J, Guardiola J, Gimenez A, Casais L. Comparison of two ascitic fluid culture methods in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. Am J Gastroenterol. 1990; 85: 1605-1608

Cho JH, Park KH, Kim SH, Bang JH, Park Wb, Kim HB, Kim NJ, Oh MD, Lee HS, Choe KW. Bacteremia is a prognostic factor for poor outcome in spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39: 697-702

Chu CM, Chang KY, Liaw YF. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. *Dig Dis Sci.* 1995; 40: 561-565

Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine* 1971; 50: 161-197

Conte D, Bolzoni P, Bodini P, Mandelli C, Ranzi ML, Cesarini L, Fraquelli M, Panagini R, Bianchi PA. Frequency of spontaneous bacterial peritonitis in 265 cirrhotics with ascites. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1993; 5: 41-45

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1747–1752

van Erpecum KJ. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2006: 79-84

Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology.* 2003; 37: 897-901

Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology.* 2002; 35: 140-148

Fleig WE, Grothe W, Lotterer E, Behl S. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP). Retrospective and prospective data from a multicenter study on prevalence, diagnosis and therapy in Germany. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004; 129: 1792-1797

Francés R, Benlloch S, Zapater P, González JM, Lozano B, Muñoz C, Pascual S, Casellas JA, Uceda F, Palazón JM, Carnicer F, Pérez-Mateo M, Such J. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology*. 2004; 39: 484-491

Francés R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascón I, Pascual S, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut*. 2004; 53: 860-864

Francés R, Gonzallez-Navajas JM, Zapater P, Munos C, Cano R, Pascual S, Marquez D, Santana F, Perez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA induces the complement system activation in serum and ascitic fluid from patients with advanced cirrhosis. *J Clin Immunol*. 2007; 27: 438-444

Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Romanelli RG, Blendis LM. Ascites and hepatorenal syndrome during cirrhosis: two entities or the continuation of the same complication? *J Hepatol*. 1999; 31: 1088-1097

Guarner C, Gonzalez-Navajas JM, Sanchez E, Soriando G, Frances R, Chiva M, Zapater P, Benlloch S, Munoz C, Pascual S, Balanzo J, Perez-Mateo M, Such J. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006; 44: 633-639

Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol*. 1997; 26: 1372-1378

Guarner C, Solà R, Soriano G, Andreu M, Novella MT, Vila MC, Sàbat M, Coll S, Ortiz J, Gómez C, Balanzó J. Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels. *Gastroenterology*. 1999; 117: 414-419

Hoefs JC, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dis Mon.* 1985; 31: 1-48

Jones SR. The absolute granulocyte count in ascites fluid: an aid to the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *West J Med.* 1977; 126: 344-346

Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F. Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by real-time-PCR. *Mol Biotechnol.* 2002; 22: 231–242

Klinman DM, Conover J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun.* 1999; 67: 5658-5663.

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 2879-2883.

Kuiper JJ, Buuren HR, de Man RA. Limited role for routine ascitic culture as a diagnostic tool for spontaneous bacterial peritonitis in the era of prophylactic antibiotics. *J Hepatol.* 2007; 46: 96.

Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* 2008; 197: 313-324

Llovet JM, Bartolí R, March F, Planas R, Viñado B, Cabré E, Arnal J, Coll P, Ausina V, Gassull MA. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol.* 1998; 28: 307-313

Llovet JM, Rodríguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, Pardo A, Castells A, Cabré E, Arroyo V, Gassull MA, Rodés J. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol.* 1997; 26: 88-95

Meier A, Persing DH, Finken M, Bottger EC. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 646–652

Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--diagnosis, treatment and prevention. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15: 1851-1859

Nousbaum JB, Cadranet JF, Bessaguet C, Nahon P, Nguyen-Khac E, Moreau R, Thevenot T, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Pauwels A, Sapey T, Grange JD, Tzran A. Predictive factors of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. Results of a prospective multicenter study. *J Hepatol.* 2007; 46: 98

Nousbaum JB, Cadranet JF, Nahon P, Khac, EN, Moreau R, Thevenot T, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Vanbiervliet G, Oberti F, Davion T, Jouannaud V, Roche B, Bernard PH, Beaulieu S, Danne O, Thabut D, Chagneau-Derrode C, de Lédinghe V, Mathurin P, Pauwels A, Bronowicki JP, Habersetzer F, Abergel A, Audigier JC, Sapey T, Grangé JD, Tran A. Diagnostic accuracy of Multistix SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 2007; 45: 1275-1281

Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, Riba J, Cabré E, Santos J, Luque T, Ausina V, Gassull MA. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology.* 2000; 31: 858-863

Pelletier G, Salmon D, Ink O, Hannoun S, Attali P, Buffet C, Etienne JP. Culture-negative neutrocytic ascites: a less severe variant of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 1990; 10: 327-331

Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomie JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol.* 2000; 32: 142-153

Rodríguez-Ramos C, Galan F, Díaz F, Elvira J, Martín-Herrera L, Girón-González JA. Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 1668-1677

Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology.* 1986; 91: 1343-1346

Runyon BA. Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1990; 12: 710-715

Runyon BA; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology.* 2004; 39: 841-856

Runyon BA, Antillon MR. Ascitic fluid pH and lactate: Insensitive and nonspecific tests in detecting ascitic fluid infection. *Heptology.* 1991; 13: 929-935

Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology.* 1988; 95: 1351-1355

Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1984; 4: 1209-1211

Runyon BA, Hoefs JC. Ascitic fluid chemical analysis before, during and after spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1985; 5: 257-159

Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 1994; 21: 792-796

Sapey T, Kabissa D, Fort E, Laurin C, Mendler MH. Instant diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis using leukocyte esterase reagent strips: Nephur-Test vs. MultistixSG. *Liver Int.* 2005; 25: 343-348

Stassen WN, McCullough AJ, Bacon BR, Gutnik SH, Wadiwala IM, McLaren C, Kalhan SC, Tavill AS. Immediate diagnostic criteria for bacterial infection of ascitic fluid. Evaluation of ascitic fluid polymorphonuclear leukocyte count, pH, and lactate concentration, alone and in combination. *Gastroenterology.* 1986; 90: 1247-1254

Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazón JM, Pérez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology.* 2002; 36: 135-141

Terg R, Levi D, Lopez P, Rafaelli C, Rojter S, Abecasis R, Villamil F, Aziz H, Podesta A. Analysis of clinical course and prognosis of culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and neutrocytic ascites. Evidence of the same disease. *Dig Dis Sci.* 1992; 37: 1499-1504

Thévenot T, Cadranel JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16: 579-583

Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature.* 1963; 198: 1088-1089

Vanbiervliet G, Rakotoarisoa C, Filippi J, Guérin O, Calle G, Hastier P, Mariné-Barjoan E, Schneider S, Piche T, Broussard JF, Dor JF, Benzaken S, Hébuterne X, Rampal P, Tran A. Diagnostic accuracy of a rapid urine-screening test (Multistix8SG) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14: 1257-1260

Vieira SM, da Silveira TR, Matte U, Kieling CO, Ferreira CT, Taniguchi A, Oliveira Fdos S, Barth. Amplification of bacterial DNA does not distinguish patients with ascitic fluid infection from those colonized by bacteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44: 603-607

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 309–317

Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, Montoliu S, Vila C, Escudero A, Torras X, Cirera I, Llanos L, Guarner-Argente C, Palazón JM, Carnicer F, Bellot P, Guarner C, Planas R, Solá R, Serra MA, Muñoz C, Pérez-Mateo M, Such J. Serum and ascites fluid bacterial DNA: A new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2008; 48: 1924-1931

Zeni F, Tardy B, Vindimian M, Comtet C, Page Y, Cusey I, Bertrand JC. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the ascitic fluid of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 218-223

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sauerbruch, der mir mit stets offenkundigem Interesse an der Arbeit, mit anregenden Diskussionen, Ermutigungen und der Ermöglichung der Teilnahme an Kongressen und den Sitzungen der Arbeitsgruppe Portale Hämodynamik sehr beim Zustandekommen der vorliegenden Arbeit geholfen hat.

Ganz besonders und herzlich danke ich Frau Dr. Beate Appenrodt für ihre kontinuierliche Unterstützung, ihre fachkompetente Anleitung, ihren Rat vor und während meiner ganzen Arbeit sowie für ihre Geduld.

Herrn Dr. Lutz Lehmann und den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin danke ich für die Durchführung der Arbeiten im Labor, die gute Einführung und Erläuterung der PCR-Methode und die stets gute Auskunftsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Ärzten und PJlern, die zwischen März 2006 und November 2007 auf den Stationen Hufeland, Nasse, von Müller und Wunderlich tätig waren und die eine große Hilfe bei der Patientenrekrutierung waren.

Martin danke ich für die gute Zusammenarbeit, Barbara für ihre freundschaftliche Unterstützung während des ganzen Studiums.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat und mich, obwohl sie in schwierigen Phasen sicherlich oft mitleiden musste, kontinuierlich unterstützt hat.