

Diplomarbeit

**Charakterisierung des Mikrobioms im Aszites bei
Patienten/innen mit Leberzirrhose**

eingereicht von

Lukas Mannert

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin,

Universitätsklinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Assoz. Profⁱⁿ. Priv.-Dozⁱⁿ. Drⁱⁿ. Ines Zollner-Schwetz

Dr.med.univ. Dr.scient.med. Jürgen Prattes

Graz, am 22.07.2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 22.07.2018

Lukas Mannert eh

Danksagungen

Allen voran möchte ich mich bei meinen Eltern Barbara und Thomas bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglichen und mich bei all meinen Projekten unterstützen. Weiters danke ich meiner Schwester Magdalena und meiner Freundin Anna die immer für mich da sind und die mich durch einen großen Teil des Studiums begleitet haben. Auch meinen Großeltern möchte ich an dieser Stelle danken.

Bezüglich dieser Arbeit möchte ich mich bei meiner Hauptbetreuerin Assoz. Profⁱⁿ. Priv.-Dozⁱⁿ. Drⁱⁿ. Ines Zollner-Schwetz sehr herzlich bedanken. Sie garantierte mir eine perfekte Betreuung, hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und fand selbst bei Rückschlägen positive und aufmunternde Worte. Weiters danke ich Dr.med.univ. Dr.scient.med. Jürgen Prattes und Drⁱⁿ rer.nat. Ingeborg Klymiuk ohne die ich wohl in so mancher Situation verzweifelt wäre.

Ich bin froh, dass ich in Graz so viele nette Menschen kennengelernt und einige sehr gute Freunde gewonnen habe. Auch wenn sich unsere Wege nun zum Teil trennen, bin ich mir sicher mit den meisten in Kontakt zu bleiben.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Die bakterielle Translokation von Darmbakterien in den Aszites spielt in der Pathogenese der Leberzirrhose und deren Komplikationen wie der spontan bakteriellen Peritonitis sehr wahrscheinlich eine wesentliche Rolle. Bisher wurden zur Untersuchung des Aszites-Mikrobioms hauptsächlich konventionelle, kulturelle Methoden verwendet. Diese Pilotstudie verwendete Next Generation Sequencing (NGS) zur Analyse der bakteriellen DNA im Aszites, dem Stuhl und der Haut. Ziele der Studie waren die Charakterisierung des Aszites-Mikrobioms sowie der Vergleich mit dem des Stuhls und der Haut, um Aussagen über mögliche Zusammenhänge treffen zu können.

Methoden:

Insgesamt wurden zwischen Juli 2016 und September 2017 12 Patienten und Patientinnen mit dekompensierter Leberzirrhose für unsere Pilotstudie rekrutiert. Die Parazentese wurden im Rahmen des stationären Aufenthalts routinemäßig durchgeführt. Zusätzlich wurden je eine Stuhlprobe und ein Hautabstrich der desinfizierten Punktionsstelle gewonnen. Die Untersuchung der Proben auf Bakterien-DNA mittels 16S rRNA Gen Sequenzierung erfolgte im Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz. Zur Datenanalyse wurde die Software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.9.1) verwendet.

Ergebnisse:

Nach Durchführung von Chao1 alpha diversity Berechnungen fanden wir signifikante Unterschiede ($p=0,015$) zwischen Stuhl- und Aszitesproben sowie zwischen Stuhlproben und Hautabstrichen. Zur Bestimmung der Beta-Diversität wurden ein Anosim (Analysis of Similarities) Test und eine Clustering Analyse durchgeführt. Sowohl der Ansoim Test ($p=0.001$) als auch die Clustering Analyse zeigten, dass Aszites-, Stuhlproben sowie Hautabstriche eine signifikant unterschiedliche Beta-Diversität aufweisen. Auf Ebene der Phyla wiesen alle drei Probenotypen eine unterschiedliche Verteilung auf. Während im Aszites Proteobacteria (85.6%) dominierten, wurden im Stuhl hauptsächlich Firmicutes (48.1%), Bacteroidetes (24%) und Proteobacteria (21%) gefunden. Häufigste

Bakterien im Aszites waren *Ralstonia* (63.8%), *Paenibacillus* (7.9%) und *Bradyrhizobium* (5.1%). Diese wurden nicht im Stuhl gefunden.

Diskussion:

Unsere Ergebnisse zeigten signifikant unterschiedliche bakterielle Zusammensetzungen der Stuhl- und Aszitesproben. Auch zwischen den Hautabstrichen und den Aszitesproben konnten wir signifikante Unterschiede nachweisen. Zusammenfassend können wir nicht bestätigen, dass das Mikrobiom im Aszites direkt aus dem Gastrointestinaltrakt transloziert. Kontamination durch Hautkeime während der Parazentese kann ausgeschlossen werden. Weitere Auswertung unserer Daten und Studien mit höherer Fallzahl werden nötig sein, um diese Aussagen zu verifizieren.

Abstract

Background:

Bacterial translocation from gut derived bacteria into the ascites is thought to play a major role in the pathogenesis of cirrhosis and its complications like spontaneous bacterial peritonitis. The majority of studies conducted so far, used conventional cultural methods to examine the composition of ascitic microbiota. This study used Next Generation Sequencing to investigate ascitic fluid, stool samples and skin swabs for the existence of bacterial DNA. Objectives of this study were to identify the microbiome of ascites and to compare it with the stool and skin microbiome of the same patients.

Methods:

12 patients with decompensated cirrhosis were part of this pilot study conducted between July 2016 and September 2017. A skin swab from the side of puncture, stool and ascites samples were taken from each patient. Skin swabs were taken after disinfection immediately prior to paracentesis. Stool samples were collected on the same or following day. The study was carried out monocentrically at the Medical University of Graz. The samples were examined for bacterial DNA using 16S rRNA gene sequencing on an Illumina MiSeq sequencer at the Core Facility Molecular Biology in the Center for Medical Research (ZMF) of the Medical University of Graz. Data were analyzed with Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.9.1) software.

Results:

Chao1 alpha diversity calculations revealed statistically significant differences in the comparisons between the microbiota of stool vs. ascites as well as stool vs. dermal swab samples ($p=0.015$). For analyzing the beta diversity, we conducted an Anosim (Analysis of Similarities) test and a Clustering Analysis. Anosim calculation revealed a significant difference between the three sample groups ($p=0.001$). Clustering analysis showed that stool microbiome clustered separately from skin and ascites microbiome. Members of the phyla Proteobacteria (85.6%) dominated the sequences obtained from ascitic fluid whereas we found mostly Firmicutes (48.1%), Bacteroidetes (24%) and Proteobacteria (21%) in the stool samples. Most abundant

genera in the ascites samples were *Ralstonia* (63.8%), *Paenibacillus* (7.9%) and *Bradyrhizobium* (5.1%). These were not detected in any of the stool samples.

Discussion:

Our data shows that significantly different bacterial patterns are present in stool samples compared to ascites samples of the same patients. Besides there is also a significant difference in the bacterial composition between ascitic fluid and dermal swabs. Concluding we cannot confirm that the ascitic microbiome is directly gut derived. There was no contamination during paracentesis. Further data analysis and filtering regarding control samples will be required and a larger sample cohort should be analyzed to verify these results.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Glossar und Abkürzungen	x
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	13
1.1 Leberzirrhose	13
1.1.1 Epidemiologie	13
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	13
1.1.3 Diagnose	16
1.1.4 Verlauf und Prognose	17
1.1.5 Komplikationen	18
1.1.6 Therapie der Leberzirrhose	28
1.2 Mikrobiom bei Leberzirrhose	29
1.2.1 Intestinales Mikrobiom bei Leberzirrhose	29
1.2.2 Mikrobiom im Aszites	31
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Studiendesign	33
2.2 Zielgrößen	33
2.3 Probengewinnung	34
2.3.1 Parazentese	34
2.3.2 Stuhlproben	36
2.4 Molekulargenetische Untersuchung	37
2.4.1 DNA Isolation, Erstellung der 16S rRNA Gen Bibliotheken und Next Generation Sequencing	37
2.4.2 Daten Analyse	38
2.5 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse – Resultate	39
3.1 Charakterisierung der Patienten und Patientinnen	39
3.2 Alpha-Diversität	41
3.3 Beta-Diversität	42
3.4 Bakterielle Zusammensetzung der Stuhlproben über die hierarchischen Ebenen	43
3.5 Bakterielle Zusammensetzung der Hautabstriche über die hierarchischen Ebenen	44

3.6	Bakterielle Zusammensetzung der Aszitesproben über die hierarchischen Ebenen	45
3.7	Patienten und Patientinnen mit Rifaximin Dauertherapie	47
3.8	Patienten und Patientinnen mit SBP	53
4	Diskussion	54
4.1	Charakterisierung des Mikrobioms im Aszites	54
4.2	Vergleich Aszitesproben-Stuhlproben	55
4.3	Vergleich Aszitesproben-Hautabstriche	56
4.4	Einfluss von Rifaximin-Dauertherapie auf das Mikrobiom im Stuhl und Aszites	56
4.5	Limitationen	56
4.6	Zusammenfassung	57
5	Literaturverzeichnis	58
	Anhang – NGS	63

Glossar und Abkürzungen

EZM	Extrazelluläre Matrix
NO	Stickstoffmonoxid
HE	Hepatische Enzephalopathie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
US	Ultraschall
LTX	Lebertransplantation
HVPG	Hepatic venous pressure gradient
Na ⁺	Natrium
GIT	Gastrointestinaltrakt
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
SAAG	Serum-Aszites-Albumin-Gradient
LVP	Large-Volume Paracentesis
PPCD	Post-paracentesis circulatory dysfunction
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
PMN	Polymorphonukleär
E.coli	Escherichia coli
CDR	Cirrhosis dysbiosis ratio
NGS	Next Generation Sequencing
ZMF	Center for Medical Research
Anosim	Analysis of Similarities
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCoA	Principal Coordinates Analysis

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: VERÄNDERUNG DER LEBERSTRUKTUR UND VASKULÄREN ARCHITEKTUR	15
ABBILDUNG 2: DESINFEKTION DER PUNKTIONSSTELLE MIT BETAISODONA®	35
ABBILDUNG 3: DURCHFÜHRUNG DES HAUTABSTRICHS AN DER PUNKTIONSSTELLE	35
ABBILDUNG 4: ABNAHME DER ASZITESPROBEN FÜR DAS ZENTRALLABOR	36
ABBILDUNG 5: INOKULATION DER BLUTKULTURFLASCHEN MIT ASZITESFLÜSSIGKEIT	36
ABBILDUNG 6: CHAO1 INDEX ZUR BESTIMMUNG DER ALPHA-DIVERSITÄT	41
ABBILDUNG 7: PCOA CLUSTERING ANALYSE	42
ABBILDUNG 8: BAKTERIELLE ZUSAMMENSETZUNG DER STUHLPROBEN AUF PHYLUM-EBENE (DARSTELLUNG PRO PATIENT BZW. PATIENTIN)	43
ABBILDUNG 9: BAKTERIELLE ZUSAMMENSETZUNG DER HAUTABSTRICHE AUF PHYLUM-EBENE (DARSTELLUNG PRO PATIENT	45
ABBILDUNG 10: BAKTERIELLE DNA IM ASZITES AUF PHYLUM-EBENE (DARSTELLUNG PRO PATIENT BZW. ... PATIENTIN)	46
ABBILDUNG 11: VERTEILUNG DER PHYLA IM STUHL IM VERGLEICH DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE.....	47
ABBILDUNG 12: VERTEILUNG DER GENERA IM STUHL IM VERGLEICH DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE.....	48
ABBILDUNG 13: CHAO1 INDEX DES STUHLS DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE IM VERGLEICH.....	49
ABBILDUNG 14: PCOA CLUSTERING ANALYSE DES STUHLS DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE IM VERGLEICH	49
ABBILDUNG 15: VERTEILUNG DER PHYLA IM ASZITES IM VERGLEICH DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE.....	50
ABBILDUNG 16: VERTEILUNG DER GENERA IM ASZITES IM VERGLEICH DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE	51
ABBILDUNG 17: CHAO1 INDEX DER ASZITESPROBEN DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE IM VERGLEICH.....	52
ABBILDUNG 18: PCOA CLUSTERING ANALYSE DER ASZITESPROBEN DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN MIT UND OHNE RIFAXIMIN-THERAPIE IM VERGLEICH	52

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZIRRHOSE ÄTIOLOGIE (MODIFIZIERT UND ERWEITERT NACH (7) (8))	14
TABELLE 2: CHILD-PUGH-KRITERIEN (6).....	18
TABELLE 3: ASZITES-ÄTIOLOGIE (MODIFIZIERT UND ERWEITERT NACH (8), (4), (24))	19
TABELLE 4: ASZITES-GRADE (25)	22
TABELLE 5: TYPEN DER ASZITES-INFektion (MODIFIZIERT NACH (40) (41))	24
TABELLE 6: DEMOGRAPHISCHE DATEN UND CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN	40
TABELLE 7: MEDIKAMENTÖSE ANTIBIOTISCHE, ANTIMYKOTISCHE UND IMMUNSUPPRESSIVE THERAPIE DER PATIENTEN UND PATIENTINNEN	40

1 Einleitung

1.1 Leberzirrhose

Leberzirrhose ist die Konsequenz vieler chronischer Lebererkrankungen und tritt als Folge dauerhafter Leberzellschädigung auf. Charakteristisch ist die Gewebsfibrosierung mit diffuser nodulärer Regeneration und Bildung von dichten bindegewebigen Septen (1) (2). Zusätzlich kommt es zum Zusammenbruch der Leberstruktur mit Veränderung in der hepatischen vaskulären Architektur (1) (2). Leberzirrhose ist ein dynamischer Prozess, bei dem die Entwicklung der Leberfibrose zur Zirrhose bei vielen Patienten 15-20 Jahre dauern kann (3).

Trotz Fortschritten beim Verständnis der Pathogenese und Verbesserungen in der Behandlung, bleiben chronische Lebererkrankungen und vor allem die Zirrhose ein bedeutendes weltweites Gesundheitsproblem.

1.1.1 Epidemiologie

In Industrieländern ist die Leberzirrhose in zunehmendem Maße für Morbidität und Mortalität verantwortlich. In Europa und den USA liegt die Inzidenz bei etwa 250/100 000, wobei Männer doppelt so oft betroffen sind wie Frauen (4). Durch die initial meist lange asymptomatisch verlaufenden, chronischen Lebererkrankungen bleibt die kompensierte Zirrhose oft für lange Zeit undiagnostiziert. Dadurch ist die genaue Prävalenz schwer zu bestimmen und wahrscheinlich höher als angenommen. 2010 stand die Leberzirrhose an 12. Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit (5).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Eingeteilt wird die Leberzirrhose nach ihrem histologischen Erscheinungsbild. Folglich wird zwischen mikronodulärer (Knoten bis 3mm), makronodulärer (Knoten 3mm-3cm) oder gemischtknotiger Leberzirrhose unterschieden (6).

Alkoholabusus, Hepatitis C und in zunehmendem Maße die nichtalkoholische Steatohepatitis stellen die drei häufigsten Ursachen für Leberzirrhose in den westlichen Ländern dar (1). In diesen Ländern sind Alkoholabusus und Virushepatitiden (B, C, D) zusammen für bis zu 95% der Fälle verantwortlich (6). In Asien und in Afrika wird Zirrhose dagegen am häufigsten durch Hepatitis B verursacht (1). Die Ätiologie zu wissen ist wichtig, um eine direkte Therapie zu ermöglichen und Komplikationen vorauszusagen bzw. vorzubeugen.

Ätiologie der Leberzirrhose:

Nichtalkoholische Steatohepatitis	Kardiovaskulär:
Toxisch:	- Chronische Rechtsherzinsuffizienz
- Alkohol	- Pericarditis constrictiva
- Methotrexat	- Budd-Chiari-Syndrom
- ...	Stoffwechselerkrankungen:
Infektiös:	- Hämochromatose
- chronische Hepatitis B (und D)	- Mb. Wilson
- chronische Hepatitis C	- α -1-Antitrypsin-Mangel
- Schistosomiasis	- Mukoviszidose
Biliär:	- Tyrosinämie
- Primär biliäre Zirrhose	- Glukogenose, Galaktosämie
- Autoimmuncholeangioopathie	Autoimmunhepatitis
- Primär sklerosierende Cholangitis	Kryptogene Zirrhose

Tabelle 1: Zirrhose Ätiologie (modifiziert und erweitert nach (7) (8))

Leberzirrhose resultiert als Folge chronischer Lebererkrankungen mit chronischer Entzündung, anhaltendem Wundheilungsprozess und kontinuierlicher Ablagerung von extrazellulären Proteinen (5) (9). Die Leberfibrose geht der Zirrhose voran. Der Beginn der Fibrose ist üblicherweise stumm und die Progression langsam. Folglich vergehen oft viele Jahre bis Symptome der Zirrhose auftreten. Bei verschiedenen Lebererkrankungen zeigt die Fibrosierung unterschiedlich schnelle Progression und Muster. Während es bei chronischen Hepatitiden zu früher Beteiligung der Zentralvene mit Ausbildung von portosystemischen Shunts kommt, zeigt die Fibrose in Folge anhaltender Cholestase eine späte Beteiligung der Zentralvene und eine ausgeprägte Erhöhung des präsinusoidalen Gefäßwiderstandes (10).

Durch den kontinuierlichen Leberschaden gehen Hepatozyten zu Grunde, wodurch es zur Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) und der Bildung von fibrotischen Septen sowie regenerativer Knoten kommt. Dies stellt die einfachste und schnellste Methode dar, um das geschädigte Gewebe abzukapseln oder auszutauschen und somit die Kontinuität des Leberparenchyms aufrecht zu erhalten (2) (10).

Eine Schlüsselrolle in der weiteren Pathogenese spielt die Aktivierung von hepatischen Sternzellen, die zu proliferativen Myofibroblasten differenzieren und maßgeblich an der Fibrogenese und Angiogenese beteiligt sind (5) (11) (12). In weiterer Folge kommt es zur Auffüllung des Disse-Raumes mit Narbengewebe, wodurch die endotheliale Fenestrierung verloren geht und sinusoidale Kapillaren entstehen (2). Die Angiogenese erfolgt durch zwei weitere Faktoren. Einerseits kommt es durch den chronischen Wundheilungsprozess zu einer Überproduktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen

und Metalloproteinasen mit proangiogenetischer Funktion und andererseits wird die Neoangiogenese durch die zunehmende Gewebshypoxie stimuliert (10). Histologisch findet man in diesem Stadium vaskularisierte fibrotische Septen, die portale Gefäße miteinander oder mit Zentralvenen verbinden und so zu „Hepatozyten-Inseln“ mit fehlender Zentralvene führen (2). Dadurch entstehen intrahepatische Shunts die irregulären Mustern folgen und in das Narbengewebe eingebettet sind (10). Zusätzlich besteht eine Dysfunktion des hepatischen Endothels, die durch die insuffiziente Ausschüttung von Vasodilatoren, v.a. von Stickstoffmonoxid (NO), entsteht (1) (12). Folgen der intra- und extrahepatischen portosystemischen Shuntbildung sind ein verminderter First-Pass-Effekt von oralen Medikamenten, die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie (HE) und verminderte Leberfunktion bis hin zum Leberversagen, ausgelöst durch Hypoperfusion und Untergang der Hepatozyten (1).

Mit Progression der Zirrhose nimmt der intrahepatische Gefäßwiderstand zu und trägt zusammen mit dem erhöhten portalvenösen Blutfluss durch Vasodilatation der Splanchnikusgefäße, zur Entwicklung eines portalen Hypertonus bei (1).

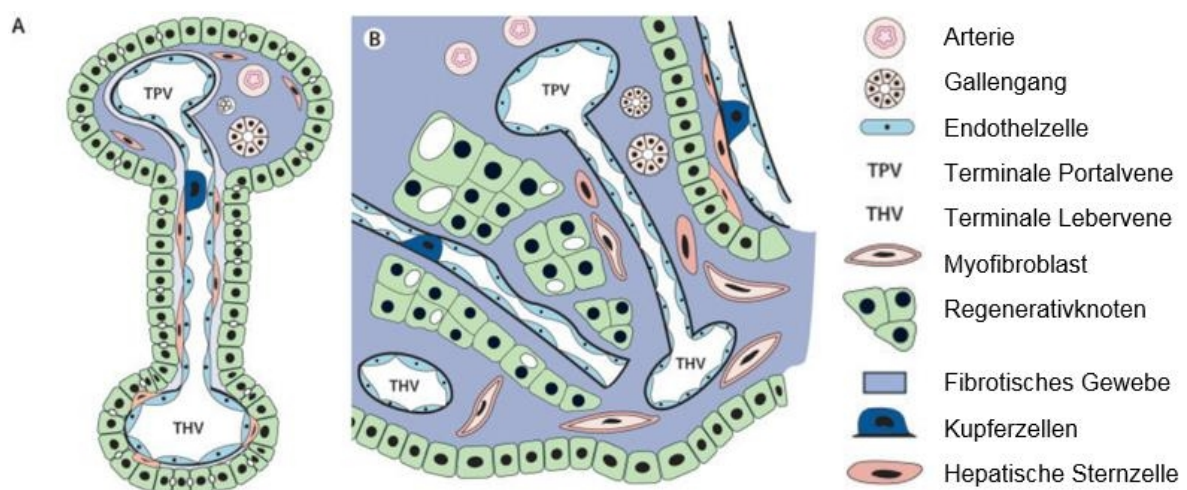


Abbildung 1: Veränderung der Leberstruktur und vaskulären Architektur

A, Physiologische Situation: Blut aus den terminalen Venolen der V. portae fließt in die Sinusoide. Von dort gelangt das Blut über das fenestrierte Endothel in den Disse-Raum wo der Stoffaustausch mit den Hepatozyten stattfindet. Anschließend gelangt das Blut in die Zentralvenen (terminale Lebervenen) welche sich in Sammelvenen vereinigen und schließlich in eine der drei Lebervenen münden.

B, Situation bei Leberzirrhose: aktivierte hepatische Sternzellen differenzieren zu proliferativen Myofibroblasten und produzieren extrazelluläre Matrix. Folglich kommt es durch den Verlust der endothelialen Fenestrierung zur Kapillarisation der Sinusoide sowie zur Auffüllung des Disse-Raums mit EZM. Zusätzlich werden fibrotischen Septen gebildet und Hepatozyten zu einzelnen „Hepatozyten-Inseln“ eingeschlossen und Regenerativknoten gebildet. Das Blut fließt nun direkt von den terminalen Ästen der V. portae und A. hepatica in die Zentralvenen, wodurch es zur Shuntbildung kommt.

Reproduziert von (2), mit Erlaubnis der Autoren Detlef Schuppan und Nezam H. Afdhal

1.1.3 Diagnose

Zirrhose-Prävention und frühe Intervention sind wichtig, um möglichst lange Symptombefreiheit zu erhalten und die Dekompensation zu verzögern. Die größte Herausforderung dabei liegt in der frühen Diagnose der chronischen Lebererkrankung, da diese meist lange Zeit still verläuft und sich erst spät mit Symptomen präsentiert. Wichtig ist eine genaue Anamnese durchzuführen, um mögliche Risikofaktoren wie Alkoholabusus oder Stoffwechselerkrankungen zu erheben. Typischerweise werden unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Mattigkeit, Gewichtsverlust oder abdominelle Beschwerden beschrieben und bei der körperlichen Untersuchung Aszites oder Leberhautzeichen gefunden (7). Zu den Leberhautzeichen zählen unter anderem Spider naevi, Palmar- und Plantarerythem, Weißnägel, Dupuytren-Kontrakturen und „Lacklippen“ bzw. „Lackzunge“ (6). Des Weiteren kann die Leber palpatorisch sowohl vergrößert als auch verkleinert imponieren und eventuell eine verhärtete oder höckrige Oberfläche sowie eine Splenomegalie getastet werden (6). Zusätzlich kann es durch erniedrigtes Testosteron und erhöhtes Östrogen zum Verlust der Sekundärbehaarung (Bauchglatze), Gynäkomastie, Potenzstörung sowie Hodenatrophie beim Mann und zu Menstruationsbeschwerden bei der Frau kommen (6).

Ultraschall, Magnetresonanztomographie sowie Computertomographie besitzen keine hohe Sensitivität bei der Detektion von Zirrhose, weisen aber eine hohe Spezifität bei bekannter Lebererkrankung und folgenden Befunden auf: Inhomogenität des Parenchyms bzw. der Oberfläche, erhöhte Echogenität, regenerative Knoten, verfeinerte Zentralvenen, hypertropher Lobus caudatus, atropher rechter Leberlappen, Splenomegalie sowie Kollateralvenen (2) (13). Von besonderem praktischen Nutzen ist die Durchführung einer Sonographie. Diese ist günstig, nahezu überall vorhanden, nicht-invasiv, strahlungsfrei und ermöglicht zusätzlich zur Aussage über die Beschaffenheit des Leberparenchyms eine Interpretation des Blutflusses, wodurch möglicherweise ein portaler Hypertonus erkannt werden kann (2).

Da insbesondere in frühen Stadien der Zirrhose konventionelle Bildgebung oft zu falsch negativen Ergebnissen führt, werden andere Verfahren benötigt (1). Ein solches nicht-invasives Bildgebungsverfahren ist die transiente Elastographie (Fibroscan®), bei der die Festigkeitseigenschaft des Leberparenchyms mittels Aussendung und Analyse eines Impulses ermittelt wird (2) (5). Diese vielversprechende Methode ist leider nicht überall vorhanden und wird durch Adipositas, Aszites und schmalen Intercostalraum limitiert (2) (5).

Goldstandard für die Diagnose der Leberzirrhose ist weiterhin die Leberbiopsie, die zusätzlich ein Grading der Entzündung und ein Staging der Fibrose ermöglicht (2). Da bei Leberzirrhose an unterschiedlichen Stellen der Leber verschiedene Stadien der Fibrose vorzufinden sind, kommt es leider je nach Biopsiestelle, zu Variabilität bei den Proben (2). Als Hauptkomplikation treten schwere Blutungen bei ca. einer von 10.000-12.000 Biopsien auf, wobei Leberzirrhose einen Risikofaktor darstellt (14).

Potential zur Diagnose der Leberzirrhose zeigen nicht-invasive Fibrosemarker aus dem Serum. Die große Heterogenität der verschiedenen Lebererkrankungen und die unterschiedlichen Krankheitsstadien innerhalb der Leber stellen aber auch hier ein Problem dar (2). Bis jetzt wurde noch kein Serummarker mit ausreichender Sensitivität und Spezifität entwickelt, die Kombination mit der transienten Elastographie zeigt aber bessere Ergebnisse als die jeweiligen Tests alleine (15). Beispiele für nicht-invasive Labortests zur Bestimmung einer Leberfibrose sind unter anderem: AST/Thrombozyten-Ratio Index (APRI), AST/ALT ratio, Lok-Index, Fibrosis-Index, Fibrosis-4 (FIB-4) Index, Fibrotest und der Forns Index (1) (2) (5).

1.1.4 Verlauf und Prognose

Der Verlauf der Leberzirrhose ist je nach Ätiologie und Therapie der Grunderkrankung verschieden. Bei chronischer Hepatitis C liegt die jährliche Dekompensationsrate bei ca. 4% und bei chronischer Hepatitis B bei etwa 10% (2). Mit fortschreitendem Leberschaden erhöht sich der portalvenöse Druck und die Leberfunktion nimmt ab, wodurch es zur Entstehung von Aszites, portal-hypertensiven gastrointestinalen Blutungen, HE und Ikterus kommt (16). Sobald eine dieser Komplikationen auftritt, spricht man von Dekompensation der Leberzirrhose (16). Eine Dekompensation wird häufig durch Ereignisse wie Infektionen, Operationen, Pfortaderthrombosen oder dem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) getriggert und geht mit einer erheblichen Reduktion der Überlebenswahrscheinlichkeit einher (1).

Bei fortgeschrittener Zirrhose können Scores, basierend auf klinischen und laborchemischen Parametern, eingesetzt werden, um das mittlere Überleben vorauszusagen und die Notwendigkeit einer Lebertransplantation (LTX) abzuschätzen. Für die Bestimmung der 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit eignen sich die Child-Pugh-Kriterien sehr gut.

	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Bilirubin i. S. (mg/dl)	< 2,0	2,0-3,0	> 3
Albumin i. S. (g/dl)	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
Quick (%)	> 70	40-70	< 40
Aszites	-	leicht	mittelgradig
Enzephalopathie	-	I - II	III - IV

	Child A	Child B	Child C
Punkte	5-6	7-9	10-15
1-Jahres-Überlebensraten	Annähernd 100%	85%	35%

Tabelle 2: Child-Pugh-Kriterien (6)

Zur Bestimmung des 3-Monats-Überlebens kommt häufig der MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease) zur Anwendung (2). Dieser lässt die subjektive Beurteilung des Aszites und der HE weg und berechnet sich aus einer Formel, basierend auf Kreatinin, Bilirubin und der International Normalized Ratio (17). Der MELD-Score gibt Patienten und Patientinnen Priorität, die auf der Warteliste für eine LTX stehen und ohne diese bald versterben würden (1) (2).

Wichtig zu beachten ist, dass beide Scores stark variieren können sobald ein Parameter, z.B. durch Albumin-Infusion, Diuretikatherapie oder Parazentese verändert wird (2).

1.1.5 Komplikationen

1.1.5.1 Portaler Hypertonus

Als portale Hypertension bezeichnet man eine Druckerhöhung in der Vena portae hepatis. Diese kann indirekt über den hepatic venous pressure gradient (HVPG) gemessen werden, wobei physiologische Werte zwischen 3-5 mmHg liegen (10). Übersteigt der Druck 5 mmHg spricht man von portaler Hypertension und erreicht dieser Werte von >10mmHg wird sie klinisch bedeutend (5). Aszites und Varizenblutungen treten üblicherweise nicht unter einem HVPG von 12 mmHg auf (10).

Nach dem Ohm'schen Gesetz ($\text{Druck} = \text{Widerstand} \times \text{Fluss}$) entsteht portaler Hypertonus bei Leberzirrhose durch erhöhten Widerstand im Pfortadersystem und vermehrten portal venösen Blutfluss aufgrund einer Vasodilatation der Splanchnikusarterien (18) (19) (20).

Der hepatische vaskuläre Widerstand wird sowohl von strukturellen Komponenten (Fibrose und Regeneratknoten) als auch von dynamischen Komponenten (aktivierte hepatische Sternzellen, Myofibroblasten und anderen kontraktilen Zellen) bestimmt

(21). Die Kollagenbildung im Disse-Raum engt die Sinusoide ein und reduziert deren Dehnbarkeit, wodurch es zu einer mechanischen Obstruktion des portalen Blutflusses, mit weiterer Erhöhung des Widerstandes kommt (22) (23). Zusätzlich kommt es zu einer Verminderung der endothelialen NO-Synthetase mit einer Abnahme der NO-Produktion und einer Zunahme der Vasokonstriktion innerhalb der Leber (20).

1.1.5.1.1 Aszites

Aszites ist definiert als eine Ansammlung seröser Flüssigkeit in der Peritonealhöhle (4). Er stellt die häufigste Komplikation bei Leberzirrhose dar und ist Leitsymptom vieler anderer, meistens die Leber betreffende, Erkrankungen.

Der Begriff Aszites leitet sich vom griechischen „askos“ ab und bedeutet Weinbeutel oder Weinsack (24). Diese Bezeichnung ist sowohl in Hinsicht auf die klinische Präsentation als auch auf die Hauptursache der Leberzirrhose sehr treffend.

1.1.5.1.2 Ätiologie

Generell kommen für die zugrundeliegende Ätiologie eines Aszites sehr viele Differentialdiagnosen in Frage. Im westlichen Europa und in den USA ist die Leberzirrhose mit 75-85% der führende Grund (25) (26).

Tabelle 3 gibt weitere mögliche Ursachen für die Entstehung von Aszites an.

Portaler Aszites	Kardialer Aszites	Maligner Aszites	Entzündlicher Aszites	Pankreatogener Aszites	Hypalbuminämischer Aszites
Leberzirrhose	Rechtsherzinsuffizienz	Peritonealkarzinose	Bakterielle Peritonitis	Pankreatitis	Nephrotisches Syndrom
Alkohol-Hepatitis	Pericarditis constrictiva	Intraabdominelle Tumoren	Peritoneale Tuberkulose	Pankreasfistel	Nierenversagen
Budd-Chiari-Syndrom		Hepatozelluläres Karzinom	Vaskulitis		
Pfortaderthrombose		Metastasenleber	Eosinophile Gastroenteritis		
		Lymphom			
		Mesotheliom			
		Pseudomyxom			

Tabelle 3: Aszites-Ätiologie (modifiziert und erweitert nach (8), (4), (24))

1.1.5.1.3 Pathogenese bei Leberzirrhose

Zirrhose Patienten und Patientinnen weisen Veränderungen der Hämodynamik im Systemkreislauf und im Splanchnikusgebiet auf (19). Diese können auf drei Hauptfaktoren zurückgeführt werden: portale Hypertension, arterielle Vasodilatation und neurohumorale Aktivierung mit renaler Natrium (Na⁺)- und Wasserretention. Die

portal-sinusoidale Hypertension ist dabei Voraussetzung für die Entstehung von Aszites bei Zirrhose (21).

Mögliche Erklärungen für die Vasodilatation der systemischen Gefäße mit Verminderung des Gefäßwiderstandes sind eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Vasokonstriktoren sowie die erhöhte Synthese von Vasodilatoren (21) (27) (28). NO wird in diesem Vorgang eine Schlüsselrolle zugeschrieben (18). Die Aktivierung der NO-Synthese erfolgt über mechanische Stimuli (Scherbelastung im Splanchnikusgebiet) und durch Vascular endothelial growth factors, Tumornekrosefaktor- α oder v.a. Bakterien-Endotoxine bzw. -DNA aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) (27). Am deutlichsten ist die Dilatation der Gefäße im Splanchnikusgebiet, infolge dessen ein Blutpooling entsteht (20). Die Entstehung bzw. Öffnung von portosystemischen Kollateralen trägt zusätzlich zur Senkung des Gefäßwiderstandes bei. Als Konsequenz ist das effektiv zur Verfügung stehende Blutvolumen reduziert, der mittlere arterielle Druck erniedrigt und der systemische vaskuläre Widerstand weiter gesenkt. Zur Kompensation dieser relativen Hypovolämie wird das kardiale Output erhöht und man spricht von einer hyperdynamischen Situation (28). Da das kardiale Output früher oder später nicht mehr genügend kompensieren kann, kommt es zur Aktivierung arterieller, kardiopulmonaler und zentraler Barorezeptoren mit Aktivierung neurohumoraler Mechanismen zur Na^+ - und Wasserretention, um das Blutvolumen wieder aufzufüllen (18) (27) (28). Zu diesen Mechanismen zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das sympathische Nervensystem sowie die Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (19) (28).

Der erhöhte intrahepatische Gefäßwiderstand führt durch Rückstau einerseits zu Rückleitung des erhöhten Druckes in die Splanchnikuskapillaren, wodurch es zur Erhöhung des hydrostatischen Drucks kommt und trägt andererseits zur Vasodilatation der Arterien im Splanchnikusgebiet bei (18) (19). In Folge des erhöhten hydrostatischen Drucks kommt es zum Austritt von Flüssigkeit aus den hepatischen Sinusoiden in die Cavitas peritonealis (18) (21).

Aszites entsteht letztendlich, wenn die Menge der austretenden Flüssigkeit, die abdominelle Flüssigkeitsreabsorption (bei optimalen Bedingungen ca. 850ml/d) übersteigt (24). Im späten Stadium der Leberzirrhose kommt es durch die vermehrte Ausschüttung vasokonstriktiver Stoffe zur zunehmenden Minderperfusion des renalen Kortex mit weiterer Na^+ - und Wasserretention und in Folge zur fortschreitenden Aszitesbildung mit möglicher Entwicklung eines Hepatorenalen Syndroms Typ-2 (19).

1.1.5.1.4 Pathogenese ohne Leberzirrhose

Weitere Auslöser von Aszites sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Grob können diese in prä- und posthepatische Ursachen unterteilt werden (24). Mit ca. 10% der Fälle ist ein malignes Geschehen am zweithäufigsten für die Entstehung von Aszites verantwortlich (24). In diesem Fall entsteht die freie Flüssigkeit meist durch eine Peritonealkarzinose (20). Zu den Tumoren, die häufig in das Peritoneum metastasieren, gehören das Mamma-, Ovarial-, Bronchial-, Pankreas, Colon- und Adenokarzinom des Magens (24).

Die Tumorzellen, die das Peritoneum auskleiden, produzieren eine proteinreiche Flüssigkeit und geben diese in den Bauchraum ab. Zusätzlich tritt Flüssigkeit aus dem Extrazellulärraum ins Peritoneum über und die Flüssigkeitsansammlung vergrößert sich weiter (20).

1.1.5.1.5 Diagnose

Die klinische Präsentation von Aszites ist sehr variabel. Im Liegen präsentiert er sich klassischerweise als vorgewölbtes Abdomen mit ausladenden Flanken (29). Aszites kann ebenso schmerzlos wie schmerzhaft, z. B. bei SPB, sein (24). Die Erstabklärung sollte Anamnese, körperliche Untersuchung, Sonographie des Abdomens und eine Analyse der Aszitesflüssigkeit umfassen.

Um Aszites bei der körperlichen Untersuchung zu erkennen, müssen ungefähr 1-1,5l Flüssigkeit vorhanden sein (29) (30). Zu achten ist auf das Vorhandensein von ausladenden Flanken, eines dumpfen Klangs bei der Perkussion oder einer Fluktuationswelle, gekennzeichnet durch das so genannte „puddle sign“ (26) (29). Da die oben erwähnten Untersuchungsmethoden jedoch weder eine hohe Spezifität noch Sensitivität aufweisen und bei Adipositas sehr schwer durchführbar sind, sollte auf jeden Fall eine Abdomen Sonographie erfolgen. Die Sonographie des Abdomens ist der Goldstandard in der Aszites Diagnostik und ermöglicht es bereits Flüssigkeitsmengen von 50-100ml nachzuweisen und zusätzlich auch die Leber selbst zu beurteilen (8) (29).

Um die genaue Ursache herauszufinden und Komplikationen auszuschließen, sollte als nächster Schritt eine diagnostische Parazentese erfolgen (31). Solange keine Hyperfibrinolyse oder disseminierte intravasale Koagulopathie vorliegt, stellt eine etwaige Koagulopathie keine Kontraindikation dar (29). Vorzugsweise wird die Punktion im linken unteren Quadranten des Abdomens durchgeführt (26). Makroskopisch imponiert das Punktat bei Leberzirrhose klar bis gelb, es kann jedoch

auch hämorrhagisch (maligne, traumatisch), trüb (entzündlicher Prozess) oder milchig (chylöser Aszites) erscheinen (29). Die Analyse der Aszitesflüssigkeit ermöglicht es meist die Ätiologie zu bestimmen und festzustellen, ob ein steriler, infektiöser oder maligner Aszites vorliegt (24). Im klinischen Einsatz hat sich der so genannte Serum-Aszites-Albumin-Gradient (SAAG) bewährt. Dieser berechnet sich aus der Subtraktion der Aszites-Albumin-Konzentration von der Serum-Albumin-Konzentration und hilft zwischen portalem Hypertonus und anderen Ursachen zu differenzieren (31). Liegt der SAAG bei Werten $\geq 1,1\text{g/dl}$, kann man zu 97% von portalem Hypertonus als Ursache ausgehen (30). Wird ein SAAG $\geq 1,1\text{g/dl}$ berechnet und liegt das Totalprotein bei $> 2,5\text{mg/dl}$, liegt vermutlich ein kardialer Aszites vor, insbesondere wenn zusätzlich das Brain Natriuretic Peptide erhöht und die Vena cava inferior erweitert ist (24) (32).

1.1.5.1.6 Therapie

Das Auftreten von Aszites ist mit einer drastischen Verschlechterung der Prognose vergesellschaftet. Die Mortalität steigt auf 50% innerhalb von 3 Jahren (31).

Ist der Aszites weder infektiös noch maligne und liegen keine weiteren Komplikationen der Leberzirrhose wie refraktärer Aszites, Spontan bakterielle Peritonitis (SBP), HRS oder Hyponatriämie vor, wird er als unkompliziert bezeichnet. Die weitere Einteilung erfolgt in drei Grade (25).

Aszites Grad	Definition	Therapie
Grad 1	geringer Aszites, nur durch Ultraschall detektierbar	keine
Grad 2	moderater Aszites mit symmetrischer Dehnung des Abdomens	Natriumrestriktion und Diuretika
Grad 3	ausgedehnter Aszites mit deutlicher Dehnung des Abdomens	großvolumige Parazentese mit anschließender Natriumrestriktion und Diuretikatherapie

Tabelle 4: Aszites-Grade (25)

Bei bekannter Ursache steht am Beginn der Aszites Therapie die Behandlung der Grunderkrankung. Alkoholkarenz und effektive Therapie bei Autoimmunhepatitis bzw. Hepatitis B kann zu hochgradiger Verbesserung der allgemeinen Situation führen (26). Andere Lebererkrankungen zeigen weniger Potential zur Reversibilität (26). Tritt Aszites auf, dürfen Medikamente wie nichtsteroidale Antirheumatika (Risiko für Nierenversagen), Betablocker sowie Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker (niedriger Blutdruck ist mit erhöhter Mortalität

assoziiert) aber auch Aminoglykoside (Nephrotoxizität) nur mit strenger Indikation verschrieben werden oder müssen abgesetzt werden (25) (26) (33).

Die initiale Therapie bei mildem oder moderatem Aszites besteht aus einer mäßigen diätetischen Natriumrestriktion (80-120mmol/d) und der Gabe eines Diuretikums (25) (30). Aldosteron-Antagonisten sind Mittel der Wahl, da bei Patienten und Patientinnen mit Zirrhose und Aszites die vermehrte Natrium-Rückresorption im distalen Tubulus vor allem auf Hyperaldosteronismus zurückzuführen ist (25) (34). Begonnen wird mit Spironolacton (100mg/d) und sollte es zu rascher Reakkumulation des Aszites kommen, wird der Therapie ein Schleifendiuretikum, wahlweise Furosemid 40mg/d, hinzugefügt (25) (30). Die Dosis kann bis zu einer Maximaldosierung von 400mg/d für Spironolacton bzw. 160mg/d für Furosemid alle drei bis fünf Tage stufenweise erhöht werden, wobei es wichtig ist das Verhältnis 100mg/40mg beizubehalten (29) (35). Da im Rahmen der Diuretikatherapie schwere Komplikationen wie akutes Nierenversagen, Elektrolytentgleisungen, Muskelkrämpfe und Gynäkomastie möglich sind, ist eine genaue Beobachtung der Patienten und Patientinnen, sowie die Kontrolle der Laborwerte wichtig (30). Bei Hypokaliämie $<3\text{mmol/L}$ muss Furosemid und bei Hyperkaliämie $>6\text{mmol/L}$ müssen die Aldosteron-Antagonisten pausiert werden (25). Flüssigkeitsrestriktion ist erst ab schwerer Hyponatriämie ($<120\text{-}125\text{mmol/L Na}^+$) erforderlich (26).

Bei Aszites Grad 3 sind großvolumige Parazentesen (LVP) mit simultaner oder nachfolgender Albumin Infusion (8g pro entferntem Liter Flüssigkeit), ab Flüssigkeitsmengen von >5 Litern, notwendig (25). Die Verabreichung von Albumin soll das Auftreten der sogenannten „Post-paracentesis circulatory dysfunction“ (PPCD) verhindern. Die PPCD ist mit schneller Reakkumulation der Flüssigkeit, HRS, Wasserretention mit resultierender Verdünnungshyponatriämie sowie einer portalen Drucksteigerung und letztendlich mit einem verkürzten Überleben assoziiert (36) (25). Nach der Punktion sollten diätetische Natriumrestriktion und Diuretikatherapie weitergeführt werden, um ein Reakkumulieren des Aszites zu verhindern (26). Letztendlich muss bei geeigneten Patienten auch eine Lebertransplantation in Betracht gezogen werden, da nur sie eine deutliche Verlängerung der Lebenszeit bewirken kann (29).

Refraktärer Aszites wird definiert als Aszites, der nicht mobilisiert werden kann oder rasch zurückkehrt (z.B. nach LVP) (37). Großvolumige Parazentesen sind eine sichere und effektive Methode, um refraktären Aszites zu kontrollieren und können wenn nötig auch wiederholt durchgeführt werden (26). Eine weitere Alternative in der Behandlung

von refraktärem Aszites, stellt die Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts (TIPS) dar. Der TIPS wird von einem interventionellen Radiologen angelegt und verbindet einen intrahepatischen Pfortaderast (hoher Druck) mit einem Lebervenenast (niedriger Druck) und bewirkt somit eine Dekompression der portalen Zirkulation (29). Die Hauptkomplikation bei der Anlage eines TIPS ist die Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie in 20-30% der Patienten (38). Als Ultima-Ratio kann ein peritoneovenöser Shunt angelegt werden. Wegen schlechter Langzeit-Durchgängigkeit, schweren Komplikationen und keinem Überlebensvorteil im Vergleich zu medikamentöser Therapie, kommt dieser Shunt kaum mehr zur Anwendung (26) (39).

1.1.5.2 Spontan Bakterielle Peritonitis

Als spontan bakterielle Peritonitis bezeichnet man eine bakterielle Infektion des Aszites, in Abwesenheit einer fokalen infektiösen Quelle (40). Davon betroffen sind ca. 15% aller Patienten und Patientinnen mit portalem Aszites (4). SBP kommt selten ohne Vorliegen einer Leberzirrhose vor, kann aber auch bei anderen Ätiologien auftreten (41). Patienten und Patientinnen mit SBP können sich unter anderem mit Fieber, abdominellen Schmerzen und systemischen Entzündungszeichen präsentieren, sind aber auch in ca. 13% der Fälle asymptomatisch (4) (42).

Grundsätzlich werden fünf Typen der Aszites-Infektion unterschieden:

	PMN count cells/mm ³	culture
Spontaneous bacterial peritonitis	≥250	single organism
Culture-negative neutrocytic ascites	≥250	negative
Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites	<250	single organism
Secondary bacterial peritonitis	≥250	polymicrobial
Polymicrobial bacterascites	<250	polymicrobial

Tabelle 5: Typen der Aszites-Infektion (modifiziert nach (40) (41))

Die Diagnose basiert auf der Durchführung einer diagnostischen Parazentese mit Bestimmung der polymorphonukleären (PMN) Leukozytenzahl sowie Anlage einer aeroben und anaeroben bakteriellen Kultur (41). Übersteigt die Zahl der PMN 250 Zellen/mm³ und wird in der Kultur ein einziger Organismus nachgewiesen, spricht man von SBP (40). Eine negative Aszites-Kultur in Kombination mit erhöhter Anzahl an PMN wird in ca. 40% der Fälle gefunden und entspricht einer kultur-negativen SBP (43).

Im Rahmen der Leberzirrhose kommt es durch die verminderte intestinale Motilität zu übermäßigem bakteriellen Wachstum im Darm und durch die erhöhte Permeabilität der Darmwand zu bakterieller Translokation in die mesenterialen Lymphknoten (44). Diese Translokation ist erregerspezifisch, wobei gramnegative Bakterien besser translozieren als grampositive Bakterien und Anaerobier (45). Über die mesenterialen Lymphknoten treten die Erreger in die systemische Zirkulation über und besiedeln in Folge die Aszitesflüssigkeit (40). Durch Beeinträchtigung der Oponierung und Verminderung der Aktivität des endogenen Immunsystems, bietet proteinarmer Aszites ein günstiges Milieu für bakterielles Wachstum (40) (46). Zusammenfassend entsteht die SBP als Konsequenz der Unfähigkeit des Gastrointestinaltrakts Bakterien zurückzuhalten, mit gleichzeitigem Versagen des Immunsystems die Keime zu neutralisieren, sobald diese in den Aszites übergetreten sind (40) (47).

Waren früher gramnegative Bakterien noch für mehr als die Hälfte der Fälle von SBP verantwortlich, gewinnen grampositive Bakterien an Bedeutung (41) (48). In älteren Studien wurden überwiegend gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E.coli*) und Klebsiellen identifiziert (41) (48). Studien aus den letzten Jahren fanden meist ebenfalls am häufigsten *E. coli*, wobei die Anzahl der grampositiven Bakterien und auch der multiresistenten Stämme zunahm (49) (50). Im Vergleich zu Oliveira *et al.* (50) mit 58% gramnegativen Bakterien und 42% grampositiven Bakterien, fanden Friedrich *et al.* (49) mit 47.8% etwas mehr grampositive als gramnegative Bakterien (44.9%), sowie 7.2% Pilzinfektionen.

Eine empirische antibiotische Therapie mit einem Cephalosporin der dritten Generation, intravenös verabreicht für fünf Tage, sollte sofort nach der Diagnose SBP beginnen und nicht verzögert werden, etwa um das Ergebnis der Kultur abzuwarten (51) (52). Am häufigsten zum Einsatz kommt Cefotaxim 2g/8h für 5 Tage, wobei alternativ beispielsweise Ciprofloxacin oder Amoxicillin/Clavulansäure eingesetzt werden können (52). Patienten und Patientinnen mit einer oberen gastrointestinalen Blutung, einer überstandenen SPB-Episode oder Totalprotein von $\leq 1\text{g/dl}$ im Aszites, haben ein erhöhtes Risiko für eine weitere SBP-Episode und benötigen eine antibakterielle Prophylaxe (40). Norfloxacin ist hier Mittel der Wahl, aber auch Ciprofloxacin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol werden erfolgreich eingesetzt (52). Trotz Erfolgen in der Vergangenheit, bleibt die Mortalität der SPB mit ca. 58% im folgenden Jahr hoch (53).

1.1.5.3 Gastroösophageale Varizen

Die Bildung von gastroösophagealen Varizen entspricht bei vielen Patienten und Patientinnen der ersten klinischen Konsequenz der portalen Hypertension (1). Üblicherweise treten die Varizen ab HVPG-Werten von >10mmHg auf und präsentieren sich asymptomatisch (10). Kommt es jedoch zur Blutung handelt es sich um eine lebensbedrohliche Situation (1) (5). Das Risiko für die Bildung von Ösophagusvarizen beträgt 5-15% pro Jahr (7). Daher wird angenommen, dass die meisten Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose, im Laufe ihres Lebens Varizen im Ösophagus entwickeln (7).

Die Behandlung erfolgt durch endoskopische Bandligatur und/oder der Verabreichung von nicht-selektiven Betablockern (Carvedilol, Nadolol bzw. Propranolol) (1) (7). Für die akute Behandlung der Varizenblutung haben sich die Infusion vasoaktiver Stoffe (Terlipressin, Somatostatin bzw. Octreotid) sowie die endoskopische Intervention mittels Bandligatur, Obliteration oder Sengstaken-Blakemore-Sonde bewährt (5) (8) (54). Um die Infektionsrate und Mortalität zu senken, sollte zusätzlich eine antibakterielle Prophylaxe (z.B. mit einem Chinolon oder Cephalosporin der dritten Generation) eingeleitet werden (7). Falls die endoskopische Intervention nicht erfolgreich war bzw. es zu rezidivierenden Blutungen kommt, ist die Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts indiziert.

1.1.5.4 Infektionen

Infektionen bei Leberzirrhose sind häufig, insbesondere dann wenn eine Dekompensation vorliegt (2). Oft zu beobachten sind SPB, Harnwegsinfekte, Pneumonien und Entzündungen der Haut (1). Durch die herabgesetzte Darmmotilität, bakterielle intestinale Überwucherung und erhöhte intestinale Permeabilität steigt das Risiko der Translokation von Bakterien in die mesenterialen Lymphknoten bzw. systemische Zirkulation (1). Zusätzlich zeigen Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose intra- und extrahepatische Shuntbildungen, wodurch es zu verminderter hepatischer Clearance kommt (10). Durch defekte Kupferzellen, Defekte bei den neutrophilen Granulozyten sowie der bakteriostatischen und chemotaktischen Wirkung von zirkulierenden Immunzellen ist das Immunsystem geschwächt und der Organismus für Infektionen prädisponiert (1) (10).

1.1.5.5 Hepatische Enzephalopathie

Als hepatische Enzephalopathie bezeichnet man einen potentiell reversiblen Zustand mit neuropsychiatrischen Symptomen und neuromuskulärer Dysfunktion (55). Mit

Auftreten einer HE steigt die 1-Jahres-Mortalität auf 64% (56). Die Pathogenese ist noch nicht völlig verstanden. Es wird angenommen, dass Toxine wie Ammoniak aus dem Gastrointestinaltrakt durch die verminderte hepatische Clearance über die systemische Zirkulation das Gehirn erreichen (5). Das Auftreten einer HE ist meist mit einem auslösenden Ereignis oder Verhalten verbunden. Beispiele dafür sind gastrointestinale Blutungen, eiweißreiche Ernährung, Obstipation, Infektionen, Dehydration oder Sedativa-Gabe (1) (4). Das Hauptziel bei der Behandlung der HE besteht in der Ausschaltung des auslösenden Faktors, z.B. der Infektion (5). Zur weiteren Therapie wird die Verwendung von Laktulose, L-Ornithin-L-Aspartat und zur Prophylaxe Rifaximin empfohlen (1) (57).

1.1.5.6 Hepatozelluläres Karzinom

Leberzirrhose ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen, die in jedem Stadium und bei jeder Ätiologie der Zirrhose auftreten können (2). HCC ist der häufigste Primärtumor der Leber und stellt durch immer bessere Behandlung der Leberzirrhose-Komplikationen eine der häufigsten Todesursachen bei Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose dar (5) (10) (58). Durch den konstanten Stimulus zur hepatozellulären Regeneration, einer Umgebung charakterisiert durch chronische Entzündung sowie einer veränderten Zusammensetzung der EZM, bietet die Leberzirrhose den idealen Boden für die Entartung der Hepatozyten (10). Die Entwicklung von dysplastischen und neoplastischen Hepatozyten kann durch verschiedene Pathomechanismen verursacht werden. Einerseits können externe Stimuli zu genetischen Veränderungen und pathologischer hepatozellulärer Regeneration führen und andererseits bzw. zusätzlich kann ein HCC von aktivierten bzw. abnormal differenzierten hepatischen Progenitorzellen abstammen (10). Alternativ kann es durch vorerst normal differenzierte Hepatozyten, die später eine neoplastische Transformation vollziehen, zum HCC kommen (10) (59). Das Screening zur frühen Erkennung eines HCC ist eine der wichtigsten Aufgaben bei der Behandlung von Patienten und Patientinnen mit Zirrhose. Aktuelle Guidelines empfehlen eine sonographische Kontrolle in sechsmonatigen Intervallen (5). Die Bestimmung des Serum alpha-Fetoproteins wird wegen der schlechten Sensitivität und Spezifität nicht länger empfohlen (2). Kurativ kann eine chirurgische Resektion oder Lebertransplantation durchgeführt werden. Viele Zirrhose Patienten und Patientinnen sind für eine Operation dieser Größe nicht tauglich und so kommen andere (meist palliative) Methoden zur Anwendung. Zu

diesen zählen die Radiofrequenzablation sowie die transarterielle Chemoembolisation und die selektive interne Radiotherapie. Für eine systemische Chemotherapie wird heute im palliativen Setting vor allem Sorafenib, mit Wirkung als Multikinase-Inhibitor, eingesetzt (8). Um eine Lebertransplantation nur bei vernünftiger Indikation durchzuführen, wurden die Milan-Kriterien geschaffen. Sie besagen, dass die Mortalität und Rezidiv-Rate tolerabel sind, solange ein solitärer Tumor <5cm bzw. nicht mehr als 3 Tumoren (der größte <3cm) vorliegen (2).

1.1.6 Therapie der Leberzirrhose

Als erster Schritt in der Therapie der Leberzirrhose sollte der auslösende Faktor eliminiert und somit die Progression der Krankheit verlangsamt, sowie die HCC-Inzidenz reduziert werden (2). Den Patienten und Patientinnen wird eine Lifestyle-Änderung nahegelegt. Dazu zählen absolute Alkoholabstinenz, Nikotinentzug, Gewichtsreduktion bei nichtalkoholischer Steatohepatitis sowie die Meidung von hepatotoxischen Substanzen (1) (6). Da Alkohol bei Leberzirrhose unabhängig der Ätiologie zu erhöhtem HVP, portokollateralem Blutfluss sowie erhöhtem Risiko für Varizen-Blutung und HCC führt, sollten alle Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose auf Alkoholgenuss verzichten (1).

Zwei weitere wichtige Elemente in der Behandlung der Leberzirrhose sind die Prävention und Behandlung von Komplikationen sowie das Screening auf HCC (6). Bei Zirrhose in Folge chronischer Virushepatitis wird die Viruselimination angestrebt, bei Autoimmunhepatitis erfolgt Immunsuppression, bei Hämochromatose Eisenentfernung und Kupferentfernung bei Morbus Wilson (2) (6). Unterschiedliche Studien haben bei erfolgreicher Behandlung der Grunderkrankung Beweise für Regression der Fibrose und sogar der Zirrhose gefunden (10). Es scheint unwahrscheinlich, dass sich Leberzirrhose vollständig zurückbildet, wobei eine gewisse Kapazität zur Regeneration und Narbenabsorption gegeben ist (10). In Tierversuchen wurden bereits einige vielversprechende Wirkstoffe mit antifibrotischer Wirkung gefunden, wobei die tatsächliche Wirkung sowie die Langzeitsicherheit beim Menschen noch unbekannt sind (2). Ziele der antifibrotischen Therapie sind die Fibrose zu vermindern und gleichzeitig einen positiven Effekt auf die portale Hypertension und die HCC-Inzidenz zu erzielen (10).

Die einzige definitive Therapie bleibt weiterhin die Lebertransplantation, mit den Hauptproblemen der möglicherweise wiederkehrenden Grunderkrankung sowie den Langzeitnebenwirkungen der Immunsuppression (1) (2).

1.2 Mikrobiom bei Leberzirrhose

Die Zusammensetzung des Mikrobioms jedes Menschen ist einzigartig und wichtig für dessen Gesundheit. Das Mikrobiom im menschlichen Verdauungssystem besteht zum Großteil aus Bakterien und beherbergt grob geschätzt 10^{14} Bakterien (60). Diese bilden ein symbiotisches Ökosystem, welches das homöostatische Gleichgewicht im Körper aufrecht erhält und sehr anfällig für umweltbedingte oder pathophysiologische Störungen ist (61) (62). Unter anderem spielt die Darmflora eine wichtige Rolle bei der Zerlegung und Absorption von komplexen Polysacchariden und der Biosynthese von wichtigen Substanzen wie Vitaminen, Aminosäuren sowie von kurzkettigen Fettsäuren, die für die Epithelzellen im Darm wichtig sind (63) (64) (65). Zusätzlich schützen die autochthonen Bakterien den Körper vor pathogenen Krankheitserregern durch Konkurrenz bezüglich Haftungsstellen und Nährstoffen (66).

Das natürliche Darm-Mikrobiom eines gesunden Menschen besteht zum Großteil aus Bakterien der Stämme Bacteroides und Firmicutes mit kleineren Anteilen von Actinobacteria, Proteobacteria und anderen Stämmen (67). Am häufigsten zu finden sind *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium coccooides* und *leptum*, sowie *Enterobacter* spp. (68) (69) (70).

1.2.1 Intestinales Mikrobiom bei Leberzirrhose

Die Störung der Beziehung zwischen Darmmikroben und dem Menschen ist mit der Pathogenese einiger wichtiger Erkrankungen assoziiert (71). Chen *et al.* fanden in ihrer Analyse eine reduzierte mikrobielle Vielfalt im Stuhl von Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose (72). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei Adipositas (73) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn beschrieben (74). Im Rahmen der Leberzirrhose tragen die verminderte intestinale Motilität, reduzierte Magensäure- und pankreato-biliäre-Sekretion sowie portal-hypertensive Enteropathie zur Störung des normalen Milieus bei (75) (76). Zusätzlich tragen bakterielle Translokation, Immunschwäche und Verminderung von nützlichen Bakterien, wie den Lachnospiraceae, zur klinischen Ausprägung und zur Prognose der Zirrhose bei (71) (77).

Nicht nur quantitative Veränderungen, sondern auch qualitative Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm, sind bei Patienten und Patientinnen zu beobachten. Zahlreiche Studien fanden Veränderungen in der Häufigkeit der einzelnen Bakterienstämme und -arten (68) (72) (78) (79) (80). Die einzelnen Studien unterscheiden sich etwas in ihren Resultaten, was aber wahrscheinlich zum Großteil

auf die großen interindividuellen Unterschiede zurückzuführen ist. Im Allgemeinen zeigten die Studien, dass es bei Leberzirrhose zur Verminderung autochthoner Bakterien und gleichzeitiger Vermehrung fremder Keime kommt. In der Studie von Qin *et al.* waren die am häufigsten gefundenen Bakterienstämme Bacteroides und Firmicutes. Bacteroidetes und Firmicutes waren jedoch zahlenmäßig stark verringert und es waren deutlich mehr Proteobacteria und Fusobacteria als bei den gesunden Kontrollen zu beobachten (79). Zusätzlich waren potentiell pathogene Keime wie *Veillonella*, *Streptokokkus*, *Clostridium* und *Prevotella* vorherrschend (79). Auch Chen *et al.* fanden in Stuhlproben eine deutliche Verminderung von Bacteroidetes und eine signifikante Erhöhung von Proteobacteria und Fusobacteria (72). Zur relativen Vermehrung der Proteobacteria trugen hauptsächlich Enterobakterien bzw. Pasteurellaceae bei (72). Zusätzlich entdeckte man erhöhte Zahlen an Streptokokken, *Veillonella* und Enterobakterien (72). Neben den Bacteroidetes waren auch Bakterien der Lachnospiraceae bei der Zirrhose Gruppe deutlich seltener zu finden als bei den Gesunden (72). Lachnospiraceae sind physiologischer Weise an der Umwandlung von Kohlenhydraten in, für das Kolonepithel sehr wichtige, kurzkettige Fettsäuren beteiligt (81). Bajaj *et al.* stellte ebenso eine Dysbiose fest (78). Bei den Zirrhose Patienten und Patientinnen waren physiologische Keime wie Clostridiales Incertae Sedis XIV, Ruminococcaceae und Lachnospiraceae signifikant vermindert und potentiell pathogene Keime wie Enterococcaceae, Staphylokokken und Enterobakterien deutlich vermehrt (78). Tuomisto *et al.* und Liu *et al.* publizierten ähnliche Ergebnisse (68) (80). Interessanterweise beobachteten Qin *et al.* vermehrt Keime buccalen Ursprungs (79). Dies deutet auf eine distale Migration von pathologischen Bakterien aus dem Oropharynx in den Gastrointestinaltrakt, mit Beeinflussung des dortigen Mikrobioms, hin (77).

Fortschreitende Veränderungen im Mikrobiom des Darmes begleiten die Leberzirrhose und werden mit Fortschreiten der Erkrankung deutlicher (82). Um die Beeinträchtigung der Darmflora zu erfassen wurden die Cirrhosis dysbiosis ratio (CDR) und die Bifidobacterium/Enterobacteriaceae ratio erstellt (77). Die CDR entspricht dem Verhältnis autochthoner zu nicht-autochthoner Bakterien, also „guter“ zu „schlechter“ Bakterien (z.B. Lachnospiraceae oder Ruminococcaceae zu Enterobakterien) (78) (83). Sie ist am höchsten bei Gesunden und am niedrigsten bei dekompenzierter Zirrhose (83).

Das Wissen über die Zusammensetzung des Mikrobioms im Darm wurde durch den Einsatz von kultur-unabhängigen Methoden zur Analyse von Mikroorganismen in den

letzten Jahren extrem erweitert und so kann heute zusammen mit einer metagenomischen Analyse, der gesamte Genpool eines Mikrobioms erfasst werden (77). Die Limitation vieler Studien ist der alleinige Rückschluss von Stuhlproben auf den gesamten Darm, der aber viele verschiedene Lebensräume mit unterschiedlicher bakterieller Besiedelung beinhaltet (67).

1.2.2 Mikrobiom im Aszites

Schnelle und genaue Methoden zur Identifizierung von Krankheitserregern bei SBP sind wichtig, um eine gezielte Antibiotikatherapie einleiten zu können und die Prognose zu verbessern (84). Dasselbe gilt für Bacteraszites und kultur-negative SBP, die gleich wie eine SBP zu behandeln sind (85). Da bakterielle Kulturen trotz erhöhter PMN-Zellen oder klinisch manifester SBP in bis zu 40% negativ sind (43), bieten kultur-unabhängige Methoden neben der raschen Verfügbarkeit durch die höhere Sensitivität einen weiteren Vorteil. Bisher wurden nur einige wenige Studien, die molekulargenetische Untersuchungen des Aszites durchführten, mit teils unterschiedlichen Methoden und Ergebnissen, publiziert (84) (85) (86) (87) (88).

Mit jeweils über 50% wurde *E.coli* häufig als meist identifiziertes Bakterium im Aszites gefunden (84) (86) (87). Im Gegensatz zu Rogers *et al.*, auch hier machten Proteobacteria >50% aus, identifizierten Hardick *et al.* *Staphylococcus* spp. als häufigste Bakterien (85) (89). Am zweithäufigsten wurden in dieser Studie *Enterococcus* spp., gefolgt von *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. und *Serratia* spp., beschrieben (85).

Generell wurden bei den einzelnen Studien recht unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzungen im Aszites detektiert. Im Gegensatz zu Rogers *et al.* und Hardick *et al.*, unterschied sich das von Feng *et al.* analysierte Mikrobiom im Aszites deutlich von jenem im Darm (84) (85) (89). Somit lässt sich die Hypothese der bakteriellen Translokation aus dem GIT in den Aszites nur teilweise bestätigen bzw. sollte diese eventuell erweitert werden. Rogers *et al.* fanden neben typischen Keimen der Darmflora (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Rumiococcus*) auch aerobe Gattungen die üblicherweise mit opportunistischen Infektionen assoziiert sind (*Actinobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Staphylokokkus*) sowie Keime der gewöhnlichen Hautflora (*Propionibacterium*) (89). Folglich ist die bakterielle Translokation aus dem Darm ein wichtiger pathophysiologischer Vorgang, aber wahrscheinlich nicht der einzige (89). Außerdem entspricht die Zusammensetzung der Bakterien im Stuhl normalerweise

vorwiegend der des Kolons, weshalb manche der Bakterien im Aszites möglicherweise aus einem anderen Abschnitt des GIT kommen (84).

Bei kultur-negativen Aszites-Proben wurde deutlich weniger bakterielle DNA gefunden als bei Proben mit positiver bakterieller Kultur (84). Dies lässt vermuten, dass vor allem eine niedrige Anzahl von pathogenen Bakterien und nicht die Schwierigkeit von manchen Arten in Kulturen zu wachsen, für die niedrige Rate an positiven Kulturen bei SBP verantwortlich ist (84). Dadurch wird die Bestimmung der pathogenen Rolle einzelner Bakterienarten erschwert, insbesondere wenn sehr viel verschiedene bakterielle DNA in der Probe nachgewiesen wird. Dies hängt sehr stark von der Untersuchungsmethode und dem Patientenkollektiv ab. So fanden Rogers *et al.* DNA-Bestandteile von 236 verschiedenen Bakterien bei nur 25 Patienten (89). Im Gegensatz dazu waren 71% der Aszites-Proben bei Bruns *et al.* monobakteriell (86).

Mit dem Vorhandensein von bakterieller DNA im Blut und im Aszites kann auch auf die Mortalität der Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose geschlossen werden, wobei die Mortalität mit dem Nachweis von bakterieller DNA signifikant ansteigt (87).

Als häufigste Todesursache in Verbindung mit dem Nachweis von Bakterien DNA wurde Acute-on-chronic liver failure beschrieben (87). Generell ist die Interpretation von kultur-unabhängigen Verfahren bei schwerkranken Patienten und Patientinnen mit Vorsicht zu interpretieren, da auch bei Patienten und Patientinnen ohne manifeste Infektion in ca. 70% der Fälle peritoneale oder zirkulatorische bakterielle Bestandteile nachgewiesen wurden (87).

2 Material und Methoden

2.1 Zielgrößen

Hauptziel der Diplomarbeit war die Charakterisierung des Aszites-Mikrobioms bei Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose. Zusätzlich wollten wir analysieren, ob es Gemeinsamkeiten in der Zusammensetzung der Stuhl- und Aszitesproben gibt und ob eine Kontamination der Aszitesproben durch unzureichende Hautdesinfizierung vor der Parazentese ausgeschlossen werden kann.

Tritt eine SBP auf, ist es wichtig das verantwortliche Pathogen rasch zu identifizieren, um möglichst früh eine gezielte antimikrobielle Therapie einleiten zu können und die Prognose zu verbessern. Über die Zusammensetzung des Mikrobioms im Aszites gibt es bisher nur wenige Arbeiten. Der Großteil der bereits publizierten Studien zum Mikrobiom im Aszites untersuchte den Aszites mit konventionellen kulturellen Methoden. Mit diesen werden schwer-kultivierbare Mikroorganismen jedoch unter Umständen übersehen. Dies zeigt sich auch darin, dass bei vielen Patienten und Patientinnen mit einer SBP die Kulturergebnisse negativ bleiben und somit kein kausales Pathogen nachgewiesen werden kann. Mit der seit einigen Jahren auch in der Routine einsetzbaren Next Generation Sequencing (NGS) Methode, sollte es nun möglich sein, auch diese schwer- oder nicht-kultivierbaren Mikroorganismen in klinischen Materialien nachzuweisen.

2.2 Studiendesign

Diese Diplomarbeit basiert auf einer retrospektiven Pilotstudie mit dem Ziel das Mikrobiom bei Patienten und Patientinnen mit Leberzirrhose zu charakterisieren. Durchgeführt wurde die Studie monozentrisch an der Medizinischen Universität Graz. Gewonnen wurden jeweils Aszites- und Stuhlproben sowie ein Hautabstrich der Punktionsstelle. Insgesamt haben wir von 12 verschiedenen Patienten und Patientinnen alle Proben vollständig gesammelt. In unsere Studie eingeschlossen wurden die Patienten und Patientinnen im Zeitraum zwischen 06.07.2016 und 29.09.2017.

Sämtliche Teilnehmer und Teilnehmerinnen der Studie wurden während ihres stationären Aufenthalts auf der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie rekrutiert. Die Parazentesen erfolgten stets als Routineeingriff und wurden nicht extra für unsere Probensammlung durchgeführt. Vor Beginn der Studie wurde ein

Ethikantrag (25-326 ex 12/13) positiv abgeschlossen und vor jeder Punktion die Einwilligung der Patienten und Patientinnen eingeholt.

Als Einschlusskriterien wurden bestehende Leberzirrhose, Aszites und Volljährigkeit definiert. Minderjährige Patienten und Patientinnen sowie schwangere Patientinnen wurden nicht eingeschlossen. Immunsuppressive Therapie sowie laufende antibiotische, antimykotische bzw. virustatische Therapie wurden nicht als Ausschlusskriterium festgelegt. Auch mögliche aktuelle Infektionen waren für den Einschluss in die Studie nicht relevant. Die Ätiologie der Leberzirrhose spielte bei der Rekrutierung der Teilnehmer und Teilnehmerinnen keine Rolle.

2.3 Probengewinnung

Von den Patienten und Patientinnen, die in unsere Studie eingeschlossen wurden, sammelten wir je eine Aszitesprobe, einen Hautabstrich und eine Stuhlprobe. Zusätzlich wurden bei jeder Parazentese Blutkulturflaschen mit Aszitesflüssigkeit inokuliert und bebrütet. Die Aszitespunktionen im Rahmen unserer Studie wurden ausschließlich auf der Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Den Hautabstrich nahmen wir unmittelbar vor der Punktion auf der bereits desinfizierten Haut im Bereich der späteren Einstichstelle vor.

2.3.1 Parazentese

Für die Durchführung der Parazentese wurden die Patienten und Patientinnen unserer Studie in den Eingriffsraum der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie gebracht und über mögliche Risiken und Komplikationen aufgeklärt. Nach erfolgter Einwilligung wurde der Patient bzw. die Patientin im Liegen mittels Ultraschall untersucht und eine geeignete Punktionsstelle ausgewählt. Der gesamte weitere Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Arzt bzw. die Ärztin desinfizierte die Bauchdecke nun sorgfältig von innen nach außen mit einer Betaisodona® Lösung und achtete darauf, dass dieser Bereich nicht mehr mit möglichen Kontaminationsquellen in Berührung kam.



Abbildung 2: Desinfektion der Punktionsstelle mit Betaisodona®

Im Bereich der späteren Punktionsstelle führten wir nun einen Hautabstrich durch, der später getrennt von der Aszitesflüssigkeit tiefgefroren und gelagert wurde.



Abbildung 3: Durchführung des Hautabstrichs an der Punktionsstelle

Als Punktionsstelle wurde meist der linke oder rechte mittlere Unterbauch gewählt. Die gewählte Stelle infiltrierte der durchführende Arzt bzw. die Ärztin im nächsten Schritt mit Xylocain, um eine lokale Anästhesie zu bewirken. Nach entsprechender Einwirkdauer wurde eine kleine Inzision mit dem Skalpell durchgeführt. Anschließend wurde die Bauchdecke mit der Punktionskanüle punktiert, die Nadel herausgezogen und ein Abnahmeadapter angeschlossen. Im nächsten Schritt erfolgte die Abnahme von Aszitesproben für unsere Studie und das Routinelabor sowie die Inokulation von 6 bakteriellen Blutkulturflaschen, je drei für aerobe und drei für anaerobe Spezies, mit der Aszitesflüssigkeit.



Abbildung 4: Abnahme der Aszitesproben für das Zentrallabor



Abbildung 5: Inokulation der Blutkulturflaschen mit Aszitesflüssigkeit

Im letzten Schritt folgte die eigentliche Entfernung des Aszites mittels Drainage-Katheter sowie eine intravenöse Verabreichung von Albumin um einer Post-paracentesis circulatory dysfunction entgegen zu wirken.

2.3.2 Stuhlproben

Die Stuhlproben wurden von den Pflegekräften, innerhalb von 24 Stunden vor oder nach der Punktion, gesammelt und an das mikrobiologische Labor geschickt. Zusammen mit den Aszites-Proben und den Hautabstrichen erfolgte die Lagerung tiefgekühlt bei -70°C .

2.4 Molekulargenetische Untersuchung

2.4.1 DNA Isolation, Erstellung der 16S rRNA Gen Bibliotheken und Next Generation Sequencing

Zur DNA-Isolation wurden 24-40 ml Aszitesflüssigkeit in sterilen 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Pellets in 250 µl sterilen 0.9% NaCl (Sigma Aldrich, Germany) resuspendiert. Die Suspension jeder Probe wurde mit der gleichen Menge (250 µl) XS-Puffer¹ nach Moissl-Eichinger 2011 (90) vermischt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit kleinen Modifikationen nach Moissl-Eichinger 2011 (90). Die in NaCl gelösten Zellpellets wurden im Bioruptor (Diagenode S.A., Seraing, Belgium) für 15 Zyklen, jeweils 30 Sekunden „on“ und 30 Sekunden „off“, bearbeitet und anschließend in MagnaLyser Green Bead Tubes (Roche, Mannheim, Germany) überführt. Das weitere Homogenisieren und Aufbrechen der Zellwände erfolgte anschließend in einem Magna Lyser Instrument mit zwei Zyklen zu je 6500 rpm für 30 Sekunden (Roche Mannheim, Germany). Die DNA wurde in 20-50 µl ultrareinem Wasser (VWR Int.) resuspendiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Hautabstriche wurden in 250 µl „Bacterial Lysis Buffer“ (Roche, Mannheim, Germany) gevortext und der Puffer ohne Tupfer in MagnaLyser Green Bead Tubes (Roche, Mannheim, Germany) überführt. Zur Homogenisierung und zum Aufschluss mikrobieller Zellwände wurden die Proben wiederum in einem MagnaLyser Instrument für zwei Zyklen mit 6500 rpm zu je 30 Sekunden mechanisch lysiert. Die enzymatische Lyse erfolgte wie in Klymiuk et al. 2017 (91) beschrieben, mit 25 µl Lysozym (100 mg/ml) und Inkubation bei 37°C für 30 Minuten sowie anschließender Beigabe von 43.4 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Inkubation bei 65°C über Nacht. Die DNA wurde schließlich mithilfe des MagnaPure LC DNA III Isolation Kits (Bacteria, Fungi) (Roche, Mannheim, Germany) nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde die DNA in 50 µl Elution Buffer eluiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Stuhlproben wurden 175 mg Stuhl mit 500 µl sterilem PBS gemischt. 250 µl der Stuhl-Suspension wurden mit 250 µl „Bacterial Lysis Buffer“ (Roche, Mannheim, Germany) vermischt und zweimal bei 6500 rpm für 30 Sekunden mechanisch lysiert. Die enzymatische Lyse mit Proteinase K und Lysozym erfolgte wie für die Hautabstriche beschrieben. Die DNA wurde wieder mithilfe des MagnaPure LC DNA III Isolation Kits (Bacteria, Fungi) (Roche, Mannheim, Germany) nach Angaben des Herstellers in einer MagnaPure LC Workstation (Roche, Mannheim, Germany) isoliert.

Die aus den Stuhlproben isolierte gesamte DNA wurde in 100 µl Elution Buffer eluiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Die Amplifikation der 16S rRNA hypervariablen Region V4 erfolgte unter Verwendung der target spezifischen Primer 515F-5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' und 806r-5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'. Zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Amplifikation in 25 µl Reaktionen wurden von den aus Stuhlproben isolierte total DNAs 2 µl eingesetzt und 3 µl von den aus Aszitesflüssigkeit und Hautabstrichen isolierten DNAs. Für die PCR Amplifikation wurde der MolZym Nucleic Acid Free 16S Basic Mastermix (AI-Labortechnik, Amstetten, Austria) nach den Herstellerangaben mit 1 µl von jedem Primer (10 pmol/µl) und 30 (Haut, Stuhl) bis 35 (Aszites) Amplifikations-Zyklen, verwendet.

Indexing, Pooling und die Aufreinigung der Library wurden wie von Klymiuk et al. 2017 (91) beschrieben, durchgeführt. So wurden 5 µl PCR Produkt von jeder Probe zur finalen Sequenzier-Library gepoolt und 30 µl der Library auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Library wurde danach aus dem Gel ausgeschnitten und entsprechend der Herstellerangaben mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aufgereinigt. Die fertige Library wurde auf einem MiSeq Instrument (Illumina) mit v3 600 Zyklen Chemie bzw. v2 500 Zyklen Chemie auf einer Nanoflowcell für die Aszitesproben, sequenziert. Die FastQ Rohdaten wurden für die Datenanalyse verwendet.

2.4.2 Daten Analyse

Die Analyse der Daten erfolgte nach Trimmen der Adaptoren, Entfernung der Chimären und QC-Filterung mit der Software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.9.1) gegen 97% clustered GreenGenes 16s rRNA Datenbank (v13.8) unter Verwendung des Galaxy-Servers des Zentrums für Medizinische Forschung (ZMF) (<https://galaxy.medunigraz.at/>).

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL). Eine explorative Datenanalyse mit Berechnung des Medians und des Interquartilbereichs wurde durchgeführt. Kontinuierliche Variablen wurden als Median mit Interquartilbereich angegeben. Kategoriale Variablen wurden als absolute Werte mit Prozentzahl angegeben.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Charakterisierung der Patienten und Patientinnen

Für unsere Studie wurden im Zuge routinemäßiger Aszitespunktionen 16 Aszitesproben gesammelt. 12 Patienten und Patientinnen mit dekompenzierter Leberzirrhose wurden in die Studie aufgenommen. 4 Patienten wurden wegen folgenden Gründen ausgeschlossen: 1.) fehlende Stuhlprobe 2.) Patient nicht einwilligungsfähig bei aktueller Episode einer hepatischen Enzephalopathie.

Demographische Daten und die Charakterisierung der Patienten und Patientinnen werden in Tabelle 6 gezeigt.

	Patientenkollektiv n=12
Geschlecht	
männlich	11 (91.7)
weiblich	1 (8.3)
Alter, Jahre	57 (53-64)
Ätiologie der Leberzirrhose	
Alkoholabusus	11 (91.7)
NAFLD	1 (8.3)
Child Pugh Score	
Child Pugh A	0 (0)
Child Pugh B	5 (41.7)
Child Pugh C	7 (58.3)
Meld Score, Punkte	15 (12-23)
SAAG	2.0 (1.9-2.3)
Leukozyten im Aszites, 10 ³ /μL	92.5 (52.5-226.3)
SBP	
ja	2 (16.7)
nein	10 (83.3)
Aszites Kultur	
Positiv	0 (0)
Negativ	12 (100)
Klinische Parameter zum Zeitpunkt der Punktion	
Fieber (>38.5°C)	0 (0)
C-reaktives Protein, mg/L	32.6 (8.2-45.1)
Leukozyten im Serum, 10 ³ /μL	9.3 (4.9-12.1)
Stationärer Aufenthalt bis zur Punktion, Tage	13 (2-32)

Daten angegeben in absoluten Werten und relativen Werten in Klammer (%) bzw. in Median und Interquartilbereich in Klammer

Spontan bakterielle Peritonitis bei mehr als $250 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ Leukozyten in der Aszitesflüssigkeit

Abkürzungen: NAFLD = Non-alcoholic fatty liver disease; SAAG = Serum-Aszites-Albumin-Gradient

Tabelle 6: Demographische Daten und Charakterisierung der Patienten und Patientinnen

Zum Zeitpunkt der Parazentese standen ein Teil der Patienten und Patientinnen unter antibiotischer, antimykotische bzw. immunsuppressiver Therapie.

Diese werden in Tabelle 7 angeführt.

	Patientenkollektiv n=12
Antibiotische Therapie	
β-Lactam-Antibiotika	
Piperacillin/Tazobactam	1
Ampicillin/Sulbactam	1
Meropenem	1
Fluorochinolone	
Moxifloxacin	1
Levofloxacin	1
Zyklische Lipopeptide	
Daptomycin	1
Antibakterielle HE-Prophylaxe	
Rifaximin	4
Antimykotische Therapie	
Caspofungin	1
Immunsuppressive Therapie	
Prednisolon	1

Prednisolon mit einer mittleren Dosis von 55,2 mg über einen Zeitraum von 26 Tagen

Tabelle 7: Medikamentöse antibiotische, antimykotische und immunsuppressive Therapie der Patienten und Patientinnen

3.2 Alpha-Diversität

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Diversität, also einem Maß für die bakterielle Vielfalt einer Probe, können unterschiedliche Berechnungsmöglichkeiten herangezogen werden (Chao1, observed species, PD whole tree, etc). Chao1 Berechnungen zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung im Vergleich zwischen Stuhlproben und Ascites sowie Stuhlproben und Hautabstrichen ($p=0,015$). Die Analyse ergab eine vielfach höhere mikrobielle Diversität in den Stuhlproben, die in den Hautabstrichen und Ascitesproben nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden konnte. Keine signifikanten Unterschiede konnten in der Diversität zwischen den Hautabstrichen und Ascitesproben gefunden werden (Abbildung 6). Durch zu geringen DNA-Gehalt in den Ascitesproben konnten nur 10 der 12 Proben für die Analyse verwendet werden.

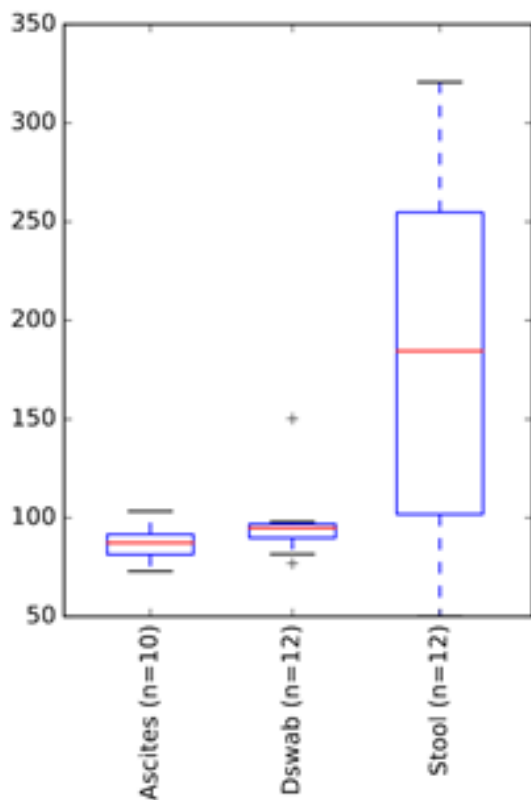


Abbildung 6: Chao1 Index zur Bestimmung der Alpha-Diversität

3.3 Beta-Diversität

Beta-Diversitäts-Analysen wurden durchgeführt, um die mikrobielle Zusammensetzung zwischen den einzelnen Proben bzw. den Probengruppen zu vergleichen. Die Prüfungen konnten keine Gemeinsamkeiten finden und zeigten, dass sich die Hautabstriche, Stuhlproben und Aszitesproben stark in ihrer bakteriellen Zusammensetzung unterscheiden. Demnach ergab die Durchführung eines Anosim (Analysis of Similarities) Tests, basierend auf weighted unifrac distance matrix, einen signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung aller drei Probengruppen ($p=0.001$).

Auch die Durchführung einer Principal Coordinates (PCoA) Clustering Analyse zur Prüfung der Beta-Diversität zeigte, dass Stuhlproben, Aszitesproben und Hautabstriche verschiedene Cluster bilden und somit Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Probenarten aufweisen (Abbildung 7).

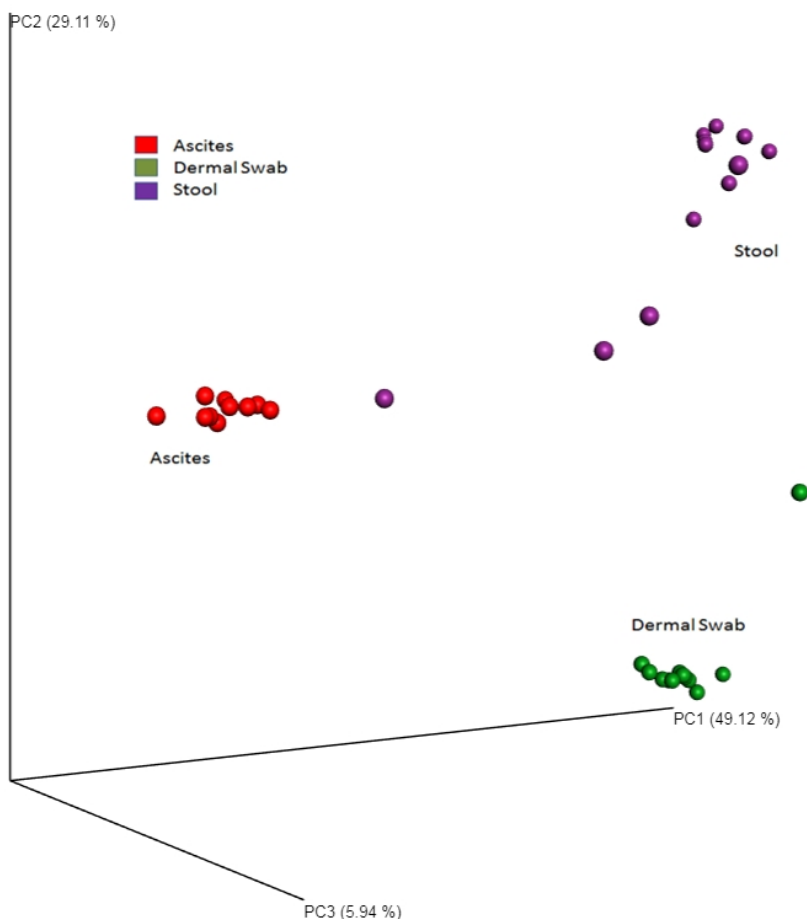


Abbildung 7: PCoA Clustering Analyse

3.4 Bakterielle Zusammensetzung der Stuhlproben über die hierarchischen Ebenen

Alle 12 Patienten und Patientinnen gaben im Laufe dieser Pilotstudie Stuhlproben ab, deren bakterielle Zusammensetzung mit Hilfe der Analyse von Abschnitten des 16S rRNA Gens untersucht wurde. Dabei wurden mit einer mittleren relativen Häufigkeit von 48,6% am häufigsten Bakterien des Phylum Firmicutes gefunden. Als zweithäufigstes Phylum wurden Bacteroidetes (23,2%) identifiziert. Auch die Bakterien der Proteobacteria machten mit 21,4% einen großen Teil der nachgewiesenen Phyla aus. Kleinere Anteile machten Verrucomicrobia (3,3%) und Actinobacteria (2,2%) aus. Auf Anteile unter 1%iger relativer Häufigkeit fielen die Phyla Euryarchaeota (0,5%), Fusobacteria (0,4%), Tenericutes (0,2%) Cyanobacteria (0,1%) und andere Stämme mit sehr geringem Anteil (Abbildung 8).

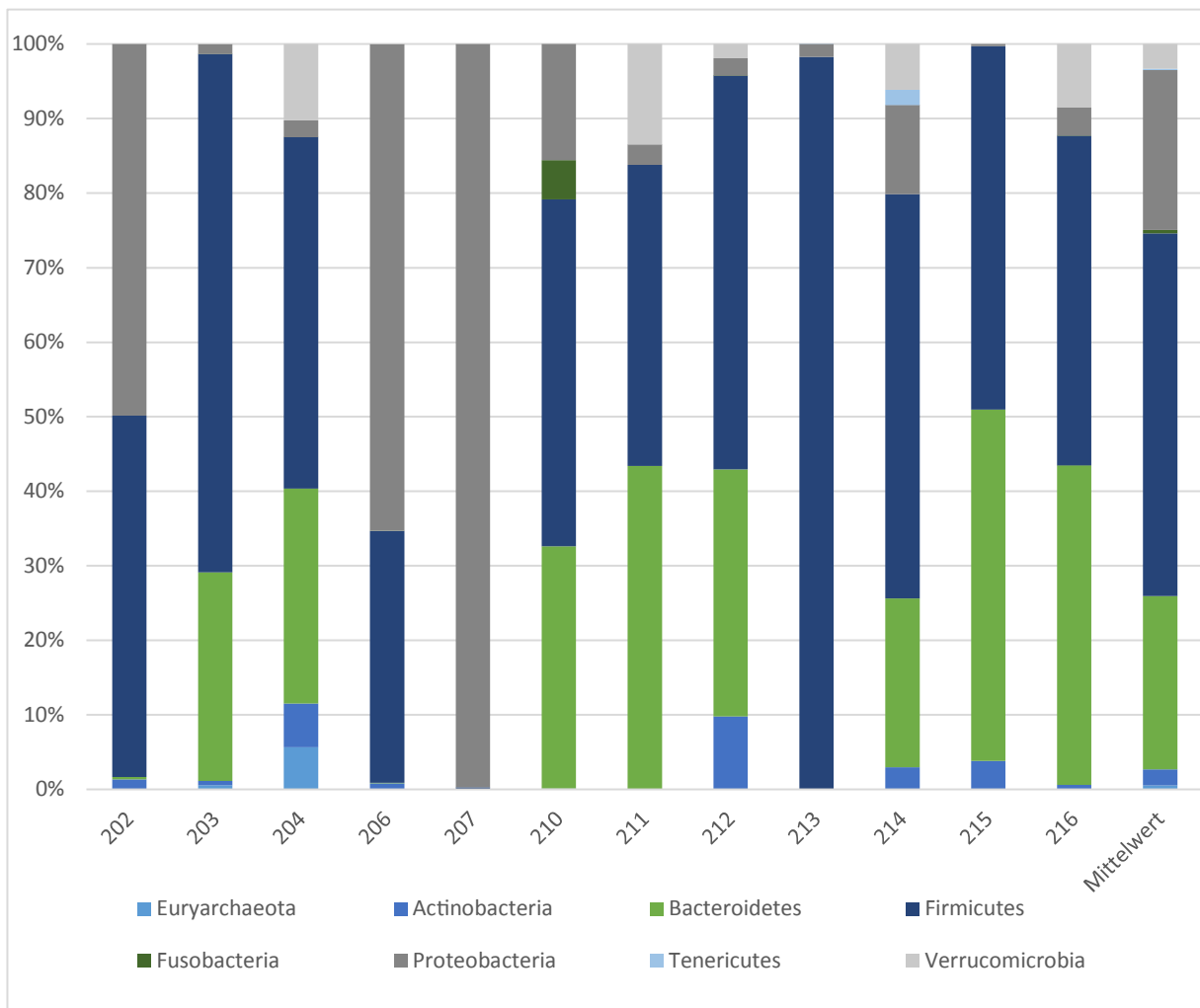


Abbildung 8: Bakterielle Zusammensetzung der Stuhlproben auf Phylum-Ebene (Darstellung pro Patient bzw. Patientin)

Bei Betrachtung der mikrobiellen Zusammensetzung auf Ebene der Bakterienfamilien, wurde am häufigsten DNA von Bakterien aus der Familie der Bacteroidaceae (18,2%) gefunden. Verbreitet wurden auch Keime der Enterobacteriaceae (16,8%) nachgewiesen. Weitere vielfach identifizierte Keime entstammten den Familien der Lachnospiraceae (13,5%), Enterococcaceae (11,2%), Ruminococcaceae (8,2%), Veillonellaceae (5,7%) sowie einige weitere Familien in geringerer Häufigkeit unter 1% relativer Häufigkeit.

Die drei häufigsten Genera, die in den Stuhlproben über alle Patienten gemittelt gefunden werden konnten, sind *Bacteroides* (18,2%), *Enterococcus* (11,2%) und *Klebsiella* (7,0%).

3.5 Bakterielle Zusammensetzung der Hautabstriche über die hierarchischen Ebenen

Nach Desinfektion der Haut im Bereich der späteren Punktionsstelle wurde ein Hautabstrich durchgeführt, um potentielle Verschleppungen von Keimen der Haut in den Aszites durch die Punktion nachzuweisen. Betrachtet man das Ergebnis der Hautabstriche zeigt sich, dass trotz Desinfektion nach wie vor bakterielle DNA nachgewiesen werden konnte.

Das am häufigsten nachgewiesene bakterielle Phylum der untersuchten Hautabstriche stellten die Proteobacteria mit 59,8% dar. Am zweithäufigsten wurde das Phylum Bacteroidetes mit einer mittleren relativen Häufigkeit von 31,4% nachgewiesen. Weitere nachgewiesene Phyla mit mittleren relativen Häufigkeiten von mehr als 1% entstammen den Firmicutes (5,6%) und Actinobacteria (2,7%) (Abbildung 9).

Auf hierarchischer Ebene der Familien wurde mit einer mittleren relativen Häufigkeit von 31,1% am häufigsten Flavobacteriaceae gefunden. Die zweithäufigste Familie stellten die Enterobacteriaceae (26,1%) dar. Weitere häufig gefundene Familien entsprachen den Pseudomonadaceae (13,0%), Xanthomonadaceae (9,8%), Moraxellaceae (4,1%), Comamonadaceae (2,6%) und Staphylococcaceae (2,5%).

Bei Betrachtung der drei häufigsten Genera die bei der Analyse der Hautproben nachgewiesen werden konnten, sind *Elizabethkingia* (30,6%), *Escherichia-Shigella* (22,3%) und *Pseudomonas* (13,0%) am häufigsten.

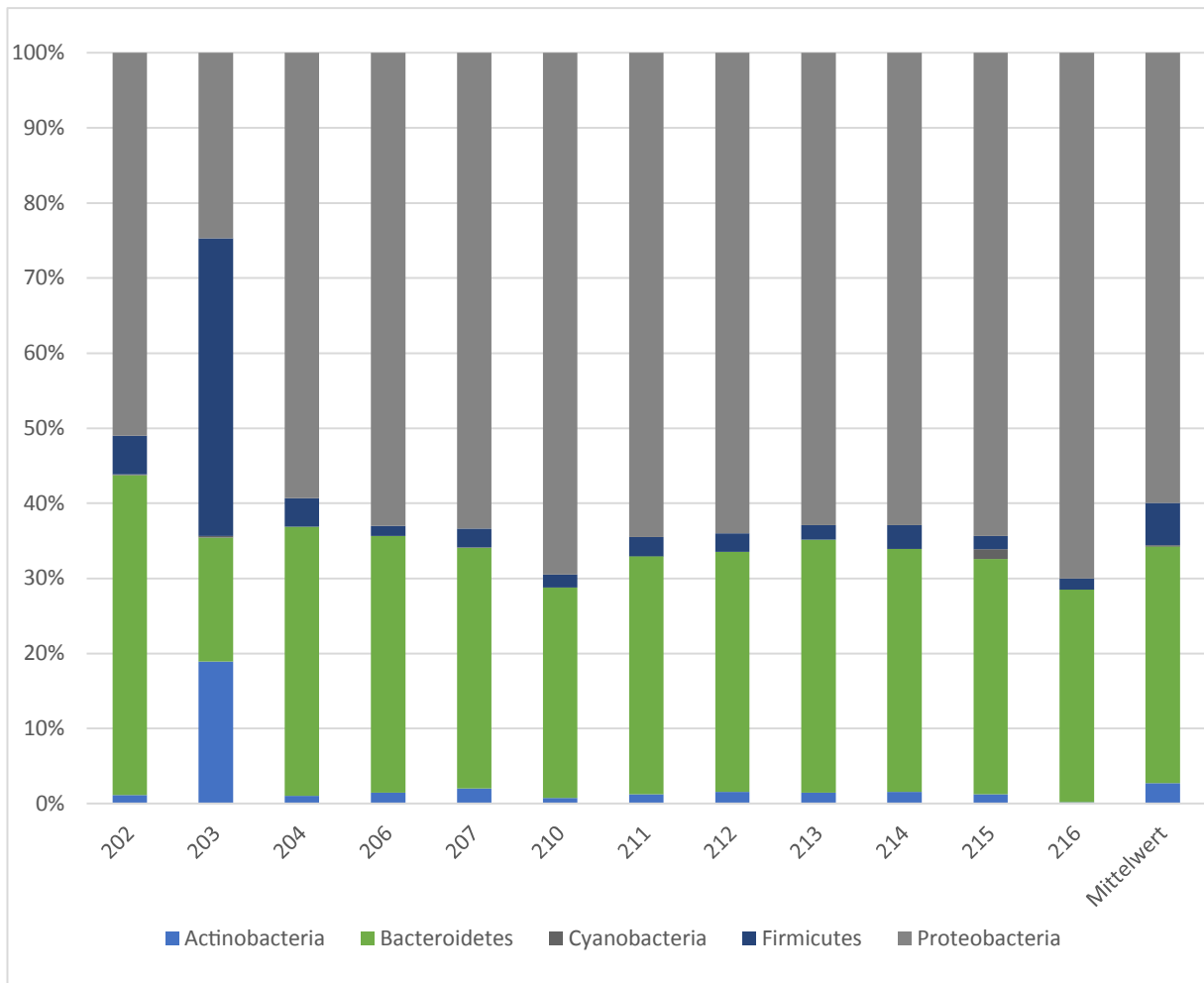


Abbildung 9: Bakterielle Zusammensetzung der Hautabstriche auf Phylum-Ebene (Darstellung pro Patient bzw. Patientin)

3.6 Bakterielle Zusammensetzung der Aszitesproben über die hierarchischen Ebenen

Die Isolation der DNA aus dem Aszites stellte sich aufgrund der geringen bakteriellen Masse als schwierig heraus und konnte erst nach Adaptierung des DNA-Isolationsprozesses erfolgreich durchgeführt werden (siehe Material und Methoden). Nach Durchführung einer Rarefaction auf 1000 Reads, konnten die Daten der beiden Patienten 204 (86 Reads) und 213 (132 Reads) nicht in die Auswertung der Mikrobiomdaten inkludiert werden.

Auf Phylum-Ebene machten die Proteobacteria mit einer mittleren relativen Häufigkeit von 83,8% den Großteil der im Aszites nachgewiesenen Phyla aus. Weiters wurden Firmicutes (11,5%), Bacteroidetes (1,9%), Actinobacteria (1,7%) sowie wenige andere Phyla mit weniger als 1% mittlerer relativer Häufigkeit gefunden (Abbildung 10).

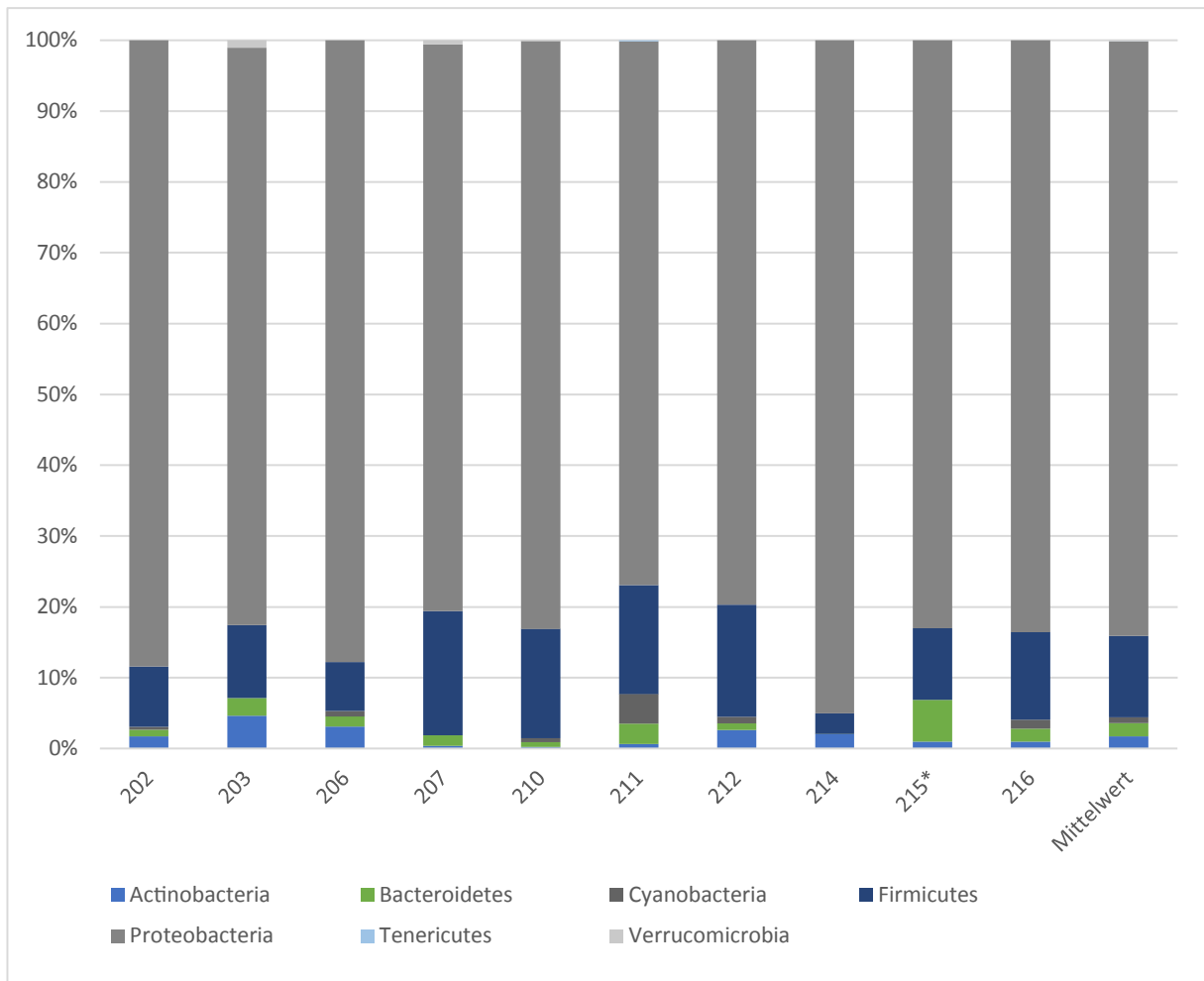


Abbildung 10: Bakterielle DNA im Aszites auf Phylum-Ebene (Darstellung pro Patient bzw. Patientin)

***Patient mit SBP**

Die am relativ häufigsten gefundene Bakterienfamilie stellte die Familie der Burkholderiaceae (63,8%) dar. Weiters wurden Bakterien der Familie der Paenibacillaceae (7,9%), Comamonadaceae (5,7%) Bradyrhizobiaceae (5,1%) und Bacteroidaceae (1%) gefunden. Auch von einigen anderen Familien wurde bakterielle DNA nachgewiesen, die jedoch mit mittleren relativen Häufigkeiten unter 1% blieben.

Auf hierarchischer Ebene der Genera wurden bei der Analyse der Aszitesproben am häufigsten *Ralstonia* (63,8%), *Paenibacillus* (7,9%) und *Bradyrhizobium* (5,1%) gefunden.

3.7 Patienten und Patientinnen mit Rifaximin Dauertherapie

Von den 12 Patienten und Patientinnen die in die Studie eingeschlossen wurden, befanden sich vier Patienten (207, 211, 212, 213) zum Zeitpunkt der Parazentese unter Rifaximin Dauertherapie zur HE-Prophylaxe. Diese Patienten wurden den anderen gegenübergestellt, um das Mikrobiom auf Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu analysieren und die Einflüsse der Langzeit Antibiotikatherapie mit Rifaximin zu untersuchen.

In den Stuhlproben konnten auf hierarchischer Ebene der Phyla nur geringe Unterschiede in der Verteilung der fünf häufigsten Bakterien Phyla in den beiden Gruppen beobachtet werden. In der Gruppe mit Rifaximin-Therapie wurden am häufigsten Firmicutes mit einer mittleren relativen Häufigkeit von 47,9%, gefolgt von Proteobacteria (26,5%) und Bacteroidetes (19,1%) gefunden. In der Gruppe ohne Rifaximin-Therapie wurden am häufigsten Firmicutes (49,0%), Bacteroidetes (25,3%) und Proteobacteria (18,8%) gefunden (Abbildung 11).

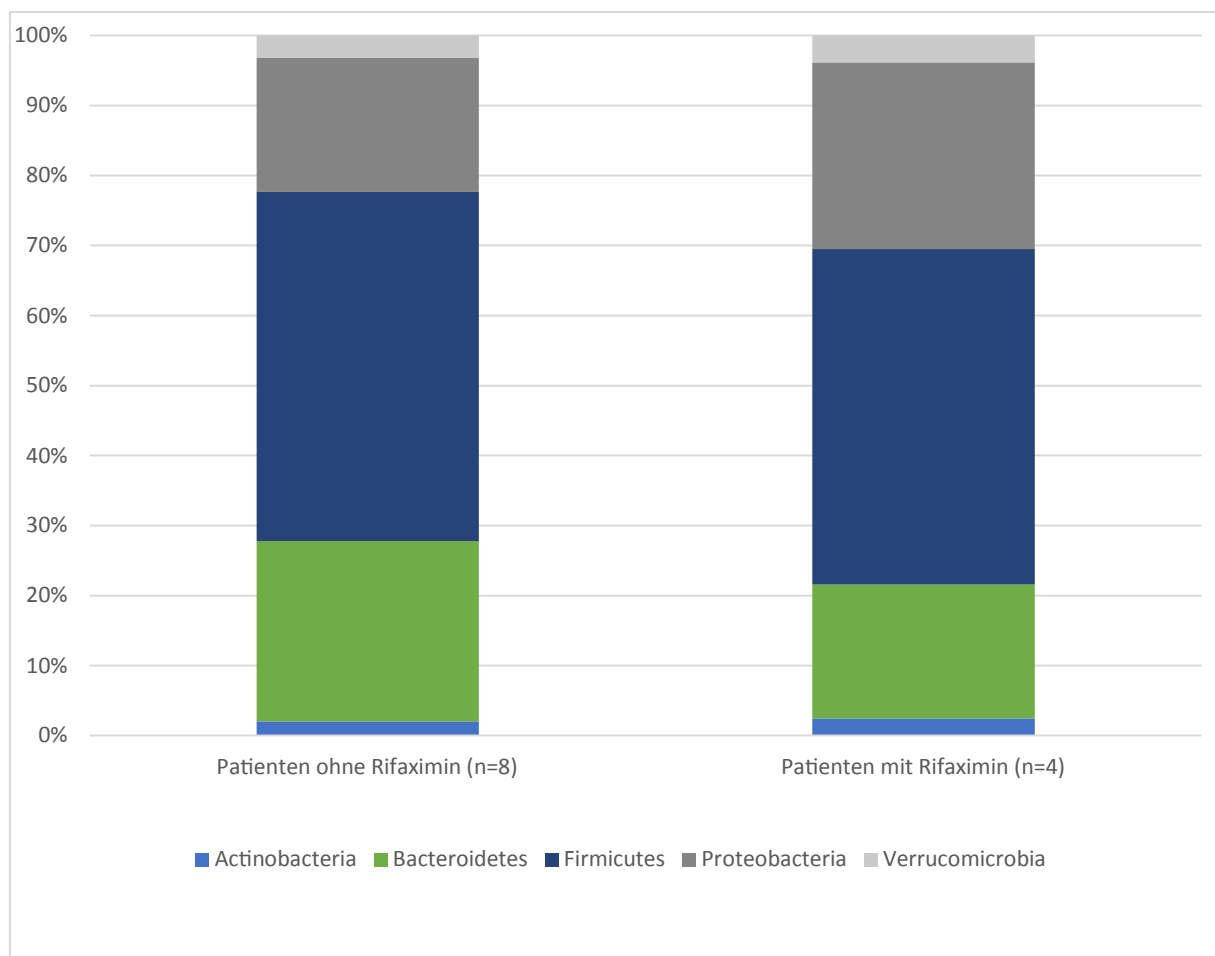


Abbildung 11: Verteilung der Phyla im Stuhl im Vergleich der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie

Auf Genus-Ebene ist auf den ersten Blick eine etwas geringere Diversität in der Rifaximin-Gruppe im Vergleich zu den übrigen Patienten und Patientinnen zu beobachten (Abbildung 12). Die drei häufigsten Genera in der Rifaximin-Gruppe stellen *Bacteroides* (20,7%), *Raoultella* (18,6%) und *Sutterella* (15,3%) dar. Betrachtet man die Verteilung der anderen Gruppe fanden sich dort am häufigsten *Bacteroides* (17,4%), *Enterococcus* (13,7%) und *Klebsiella* (8,3%) (Abbildung 12).

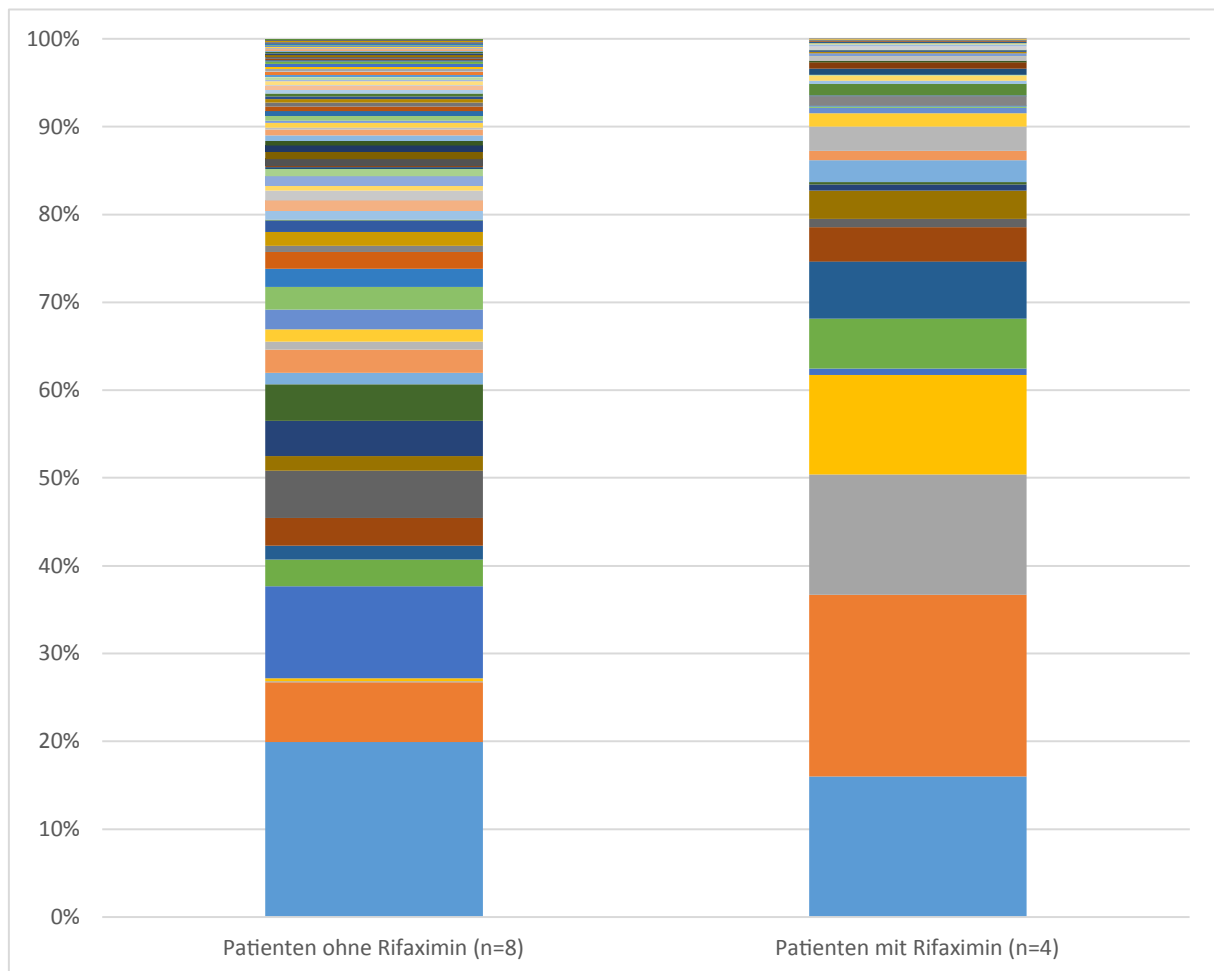


Abbildung 12: Verteilung der Genera im Stuhl im Vergleich der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie

Der in Abbildung 12 beobachtete Unterschied in der Diversität auf Genus-Ebene ist nicht signifikant. Chao1 Berechnungen zur Bestimmung der Alpha-Diversität zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung im Vergleich zwischen den Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Dauertherapie (Abbildung 13).

Auch die Durchführung einer PCoA Clustering Analyse des Stuhls zur Bestimmung der Beta-Diversität konnte keine signifikanten Unterschiede zeigen ($p=1$) (Abbildung 14).

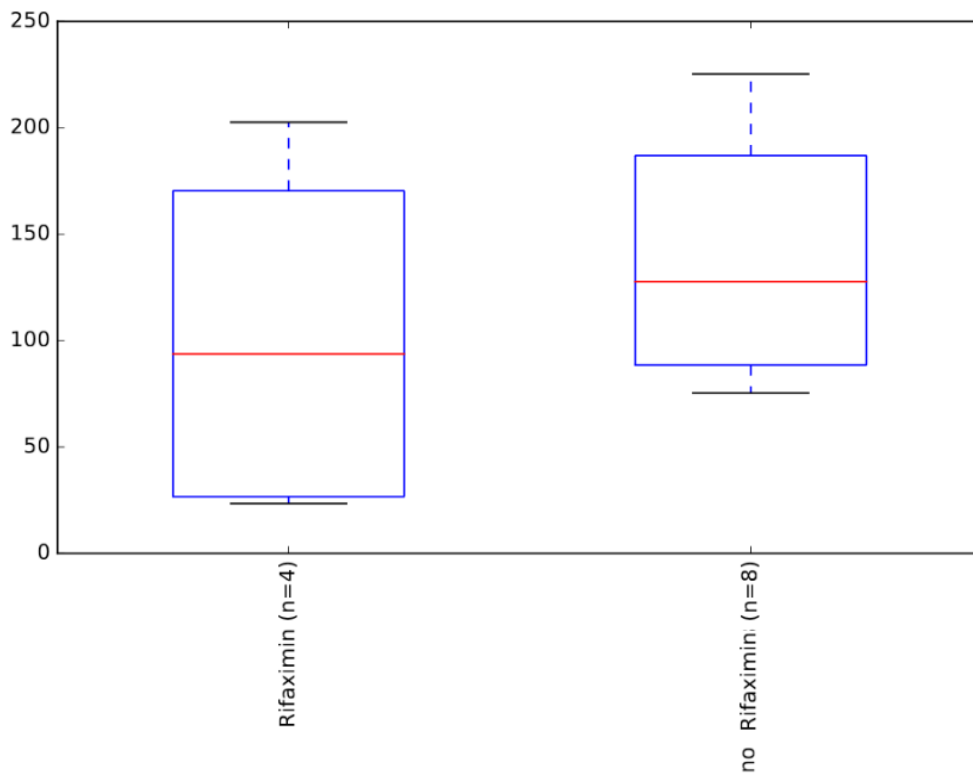


Abbildung 13: Chao1 Index des Stuhls der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie im Vergleich

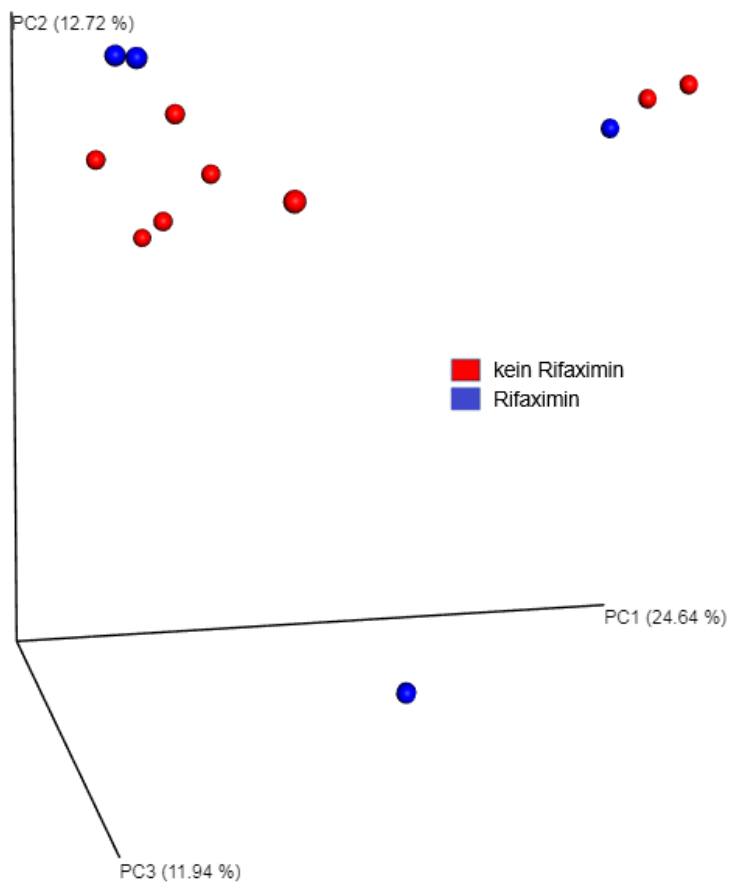


Abbildung 14: PCoA Clustering Analyse des Stuhls der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie im Vergleich

Durch die Rarefaction auf 1000 Reads, konnten die Daten von je einem der Patienten aus den beiden Gruppen nicht zur Analyse der bakteriellen Zusammensetzung im Aszites verwendet werden. Beim Vergleich der beiden Gruppen in den Aszitesproben zeigten sich sehr ähnliche Verteilungen. Auf Phylum-Ebene wurden jeweils überwiegend Proteobacteria nachgewiesen. Zweithäufigstes Phylum war in beiden Gruppen Firmicutes. (Abbildung 15).

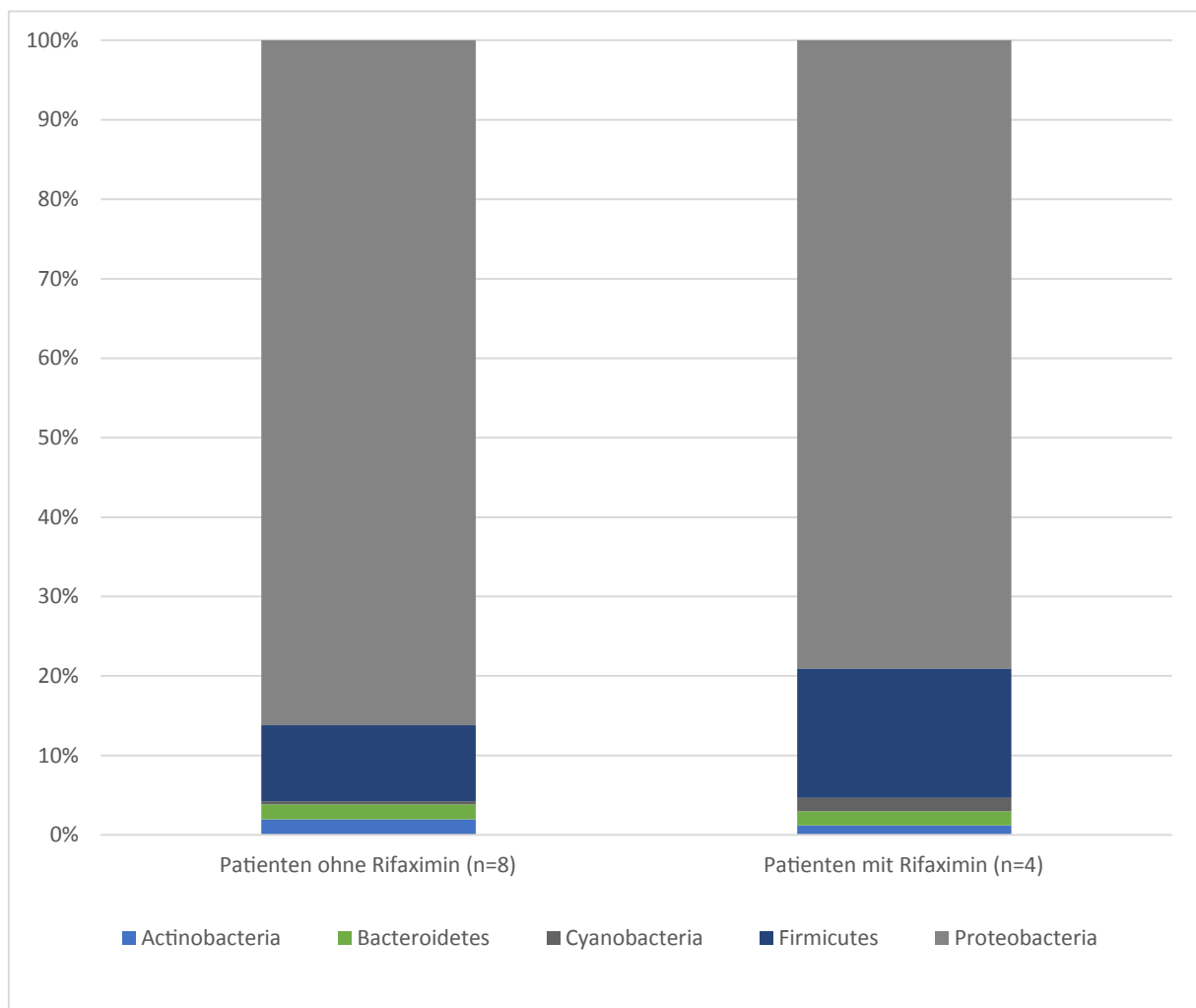


Abbildung 15: Verteilung der Phyla im Aszites im Vergleich der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie

Betrachtet man die Verteilung der Bakterien in den beiden Gruppen im Aszites auf Genus-Ebene, fanden sich in beiden Gruppen mehr als 50% *Ralstonia*. Zweithäufigster nachgewiesener Keim war in beiden Gruppen *Paenibacillus*. In der Gruppe mit der Rifaximin-Therapie stellte *Sphingomonas* (7,6%) den dritthäufigsten Keim dar und in der Gruppe der Patienten und Patientinnen ohne Rifaximin-Therapie wurde *Bradyrhizobium* (5,3%) am dritthäufigsten gefunden (Abbildung16).

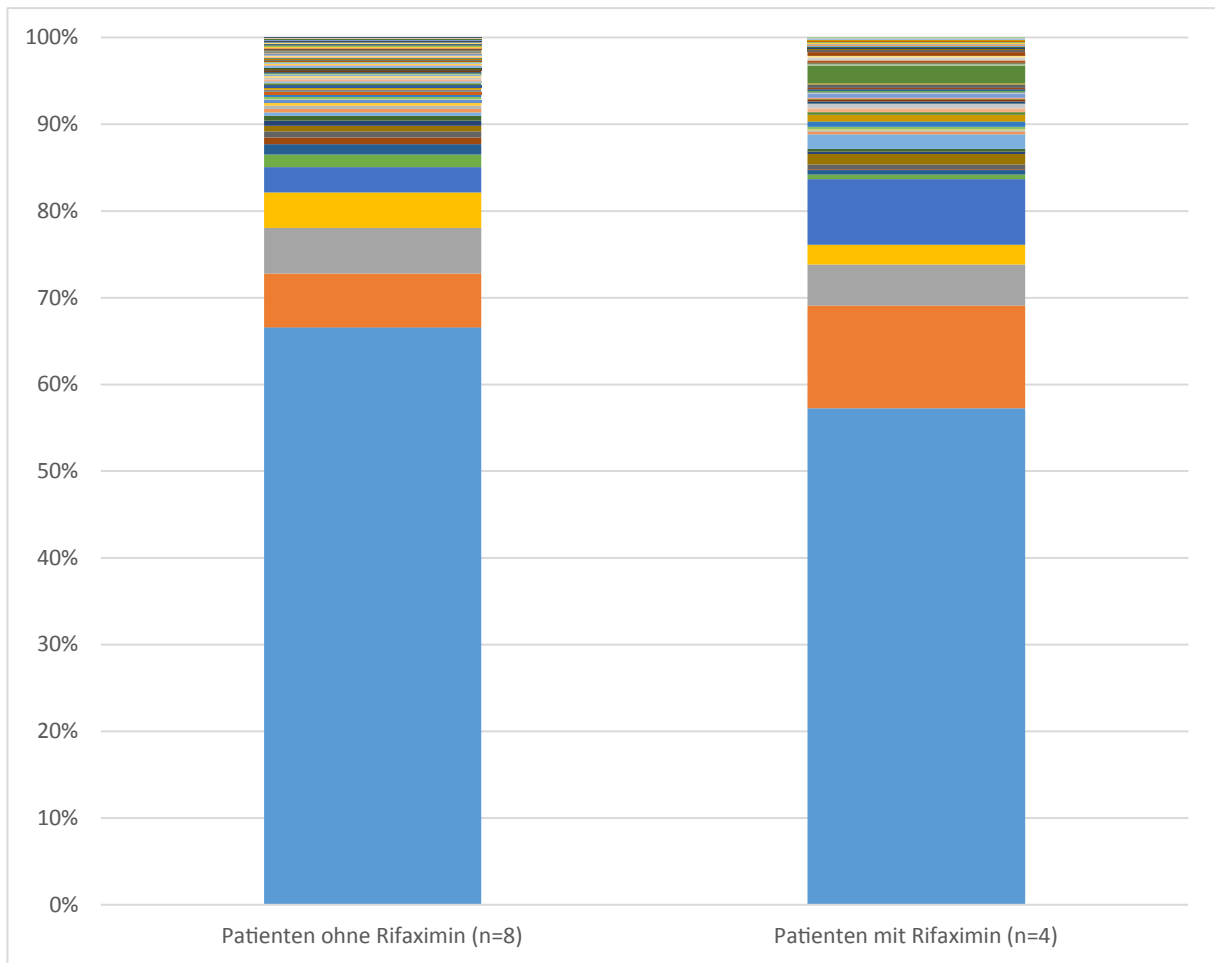


Abbildung 16: Verteilung der Genera im Aszites im Vergleich der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie

Um die Alpha- und Beta-Diversitäten des Aszites-Mikrobioms zu vergleichen wurden auch für die Aszitesproben der beiden Gruppen eine PCoA Clustering Analyse durchgeführt und der Chao1 Index bestimmt. Die Ergebnisse zeigten wie bereits nach Analyse der Stuhlproben keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Alpha- (Abbildung 17) und Beta-Diversität ($p=0,243$) (Abbildung 18) zwischen den Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin Dauertherapie.

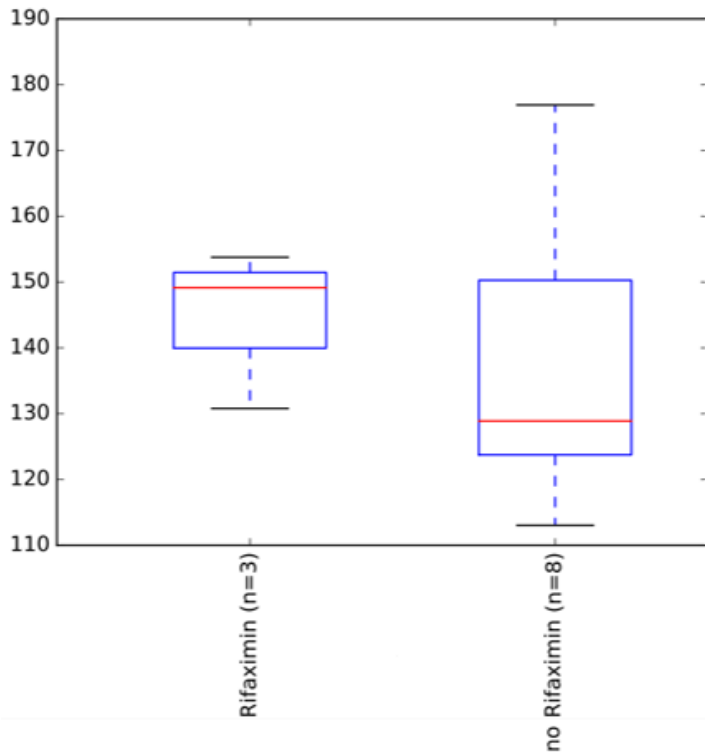


Abbildung 17: Chao1 Index der Aszitesproben der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie im Vergleich

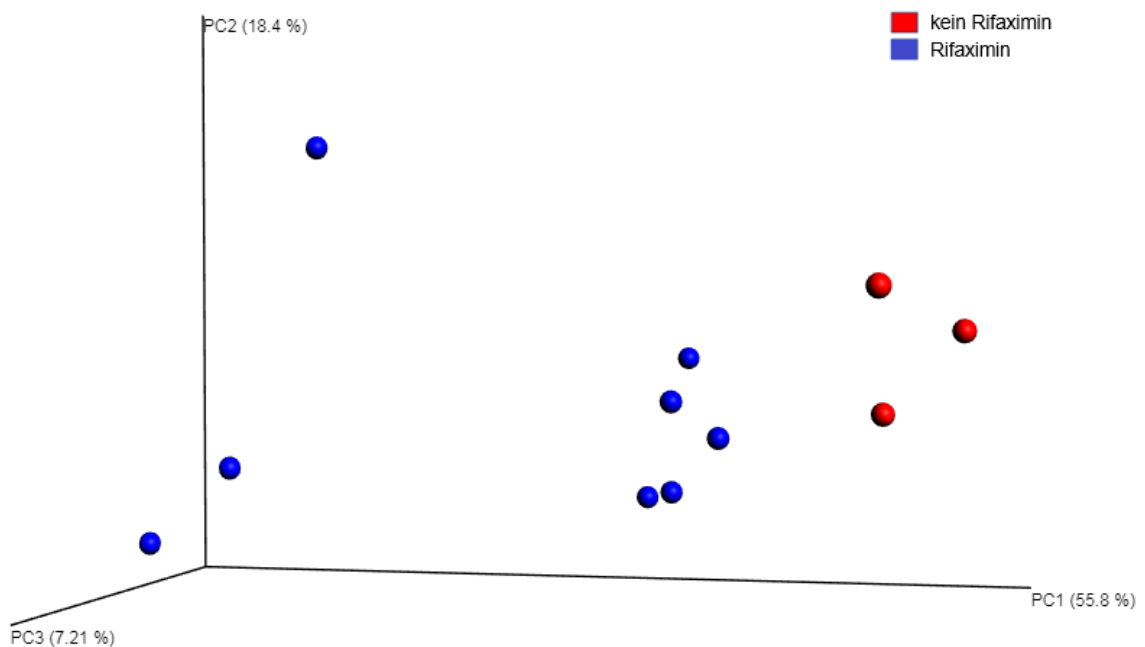


Abbildung 18: PCoA Clustering Analyse der Aszitesproben der Patienten und Patientinnen mit und ohne Rifaximin-Therapie im Vergleich

3.8 Patienten und Patientinnen mit SBP

Bei zwei der zwölf Patienten und Patientinnen diagnostizierten wir eine spontan bakterielle Peritonitis. Die beiden Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studie im Child Pugh Stadium C und präsentierten sich mit Aszites Grad 3. Auslöser der Leberzirrhose waren Alkoholabusus bei Patient 204 und NAFLD bei Patient 215. Die Diagnose SBP wurde in beiden Fälle durch hohe Leukozytenzahl im Aszites gestellt (2970 und $1474 \times 10^3/\mu\text{L}$). Patient 204 erhielt zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses Moxifloxacin 400mg/d . Patient 215 stand sowohl unter antibakterieller- (Levofloxacin 500mg/d), antifungaler- (Caspofungin 70mg/d) und immunsuppressiver-Therapie (Prednisolon mit mittlere Dosis von $55,2$ mg über einen Zeitraum von 26 Tagen). Durch den zu geringen Anteil bakterieller DNA in der Aszitesprobe von Patient 204 war eine Gegenüberstellung der Patienten und Patientinnen mit und ohne SBP nicht sinnvoll. Betrachtet man die mikrobielle Zusammensetzung im Aszites bei Patient 215 kann man keinen großen Unterschied zu den anderen Patienten und Patientinnen der Studie erkennen (Abbildung 10).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung des Mikrobioms im Aszites

Bis dato haben noch nicht viele Studien versucht das Mikrobiom des Aszites mittels Next Generation Sequencing auf das Vorhandensein von bakterieller DNA zu analysieren. Standardmäßige Inokulation der Blutkulturflaschen mit Aszitesflüssigkeit führte in keiner unserer Flaschen zu bakteriellen Wachstum. Nach PCR Amplifikation der hypervariablen Region V4 des 16s rRNA Gens konnten wir im Aszites hauptsächlich Proteobacteria und kleinere Anteile von Firmicutes, Bacteroidetes und Actinobacteria sowie auf Genus Ebene hauptsächlich *Ralstonia*, *Paenibacillus* und *Bradyrhizobium* finden. Dies stimmt auf Phylum-Level in etwa mit den Ergebnissen von Rogers *et al.* überein (89), nicht jedoch auf Genus-Ebene. Andere Studien die mit vergleichbaren NGS-Methoden arbeiteten, fanden Großteils unterschiedliche Phyla und Genera. Im Gegensatz zu Santiago *et al.* fanden wir im Aszites vor allem Proteobacteria und nicht Firmicutes und Bacteroidetes wie in deren Arbeit beschrieben (88). *E. coli*, der bei Feng *et al.*, Bruns *et al.* und Zapater *et al.* jeweils mehr als 50% der nachgewiesenen Genera ausmachte, konnten wir nicht in diesem Ausmaß nachweisen (84) (86) (87).

Nach Durchführung einer Rarefaction auf 1000 Reads konnten wir die Daten von 83,3% (10/12) der Patienten zur Datenauswertung heranziehen. Weitere Studien die NGS verwendeten, wiesen sehr unterschiedliche Ergebnisse bei der Anzahl an positiven PCR-Amplifikationen auf. Bruns *et al.* konnten in 46,7% (102/218) der Aszitesproben bakterielle DNA nachweisen, Hardick *et al.* bei 19,8% (21/106) Rogers *et al.* bei 84,0% (21/25) und Santiago *et al.* bei 72,7% (8/11) (85) (86) (89) (88).

Klinisch wurde bei zwei Patienten (204, 215) eine spontan bakterielle Peritonitis diagnostiziert. Da die Aszitesprobe von Patient 204 nach Abschluss der PCR leider einen zu geringen Gehalt an bakterieller DNA aufwies und aus der Datenauswertung des Aszites ausgeschlossen werden musste, verzichteten wir auf einen Vergleich des Mikrobioms der Gruppen mit SBP und ohne SBP. Der niedrige Gehalt an bakterieller DNA im Aszites bei Patient 204 könnte die Hypothese von Feng *et al.* allerdings bestätigen, dass bereits eine kleine Anzahl an Bakterien SBP auslösen kann, deren Zahl aber nicht ausreicht um etwa in einer Blutkultur zu wachsen. Auch die Hypothese von Rogers *et al.*, die keine strenge Korrelation zwischen dem strikten Vorhandensein bakterieller DNA und dem Auftreten von SBP sieht, scheint möglich zu sein. Begründet

wird die Annahme durch freischwimmende DNA bereits abgestorbener Bakterien im Aszites, die eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien erschwert (89).

4.2 Vergleich Aszitesproben-Stuhlproben

Die wahre Herkunft des Mikrobioms im Aszites ist noch unbekannt. Eine mögliche Erklärung bietet die Hypothese der bakteriellen Translokation. Diese geht davon aus, dass es im Rahmen der Leberzirrhose durch verminderte intestinale Motilität mit resultierendem übermäßigem bakteriellen Wachstum sowie einer erhöhten Permeabilität der Darmwand zu bakterieller Translokation in die mesenterialen Lymphknoten kommt (44). Über diese treten die Erreger in die systemische Zirkulation über und könnten in Folge die Aszitesflüssigkeit besiedeln (40).

Um mögliche Zusammenhänge herauszufinden, haben wir das Mikrobiom des Aszites und des Stuhls charakterisiert und die Alpha- und Beta-Diversität der Proben analysiert. Unsere Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede sowohl in der Alpha- als auch in der Beta-Diversität zwischen Stuhl- und Aszitesproben. Zudem konnten wir keinen der drei häufigsten Keime, die wir im Aszites fanden (*Ralstonia*, *Paenibacillus* und *Bradyrhizobium*), im Stuhl nachweisen. Somit lässt sich kein unmittelbarer Zusammenhang feststellen und wir können nicht bestätigen, dass die Bakterien im Aszites direkt aus dem Gastrointestinaltrakt stammen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Studien von Santiago *et al.* und Feng *et al.* überein. Santiago *et al.* fanden ebenfalls große Unterschiede in der Beta-Diversität der Aszites- und Stuhlproben (88). Auch Feng *et al.* beschrieben in ihrer Arbeit einen signifikanten Unterschied zwischen Stuhl- und Aszitesproben (84). Betrachtet man die relativen Häufigkeiten der im Stuhl gefundenen Phyla, stimmen unsere Ergebnisse in etwa mit den typischen Stuhlkeimen aus anderen veröffentlichten Studien überein (72) (79) (80) (88).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die bakterielle Translokation aus dem Darm nicht der einzige Weg ist, der zum Mikrobiom des Aszites beiträgt. Nun stellt sich die Frage welche alternativen Wege es zur Entstehung des Mikrobioms im Aszites gibt. Möglicherweise entstammen die Bakterien nicht aus dem Colon sondern aus anderen Abschnitten des GIT wie dem Dünndarm oder aber auch aus extraintestinalen Lokalisationen wie z.B. dem Respirationstrakt oder der Vagina bei der Frau (84) (88). Möglich ist auch, dass die Bakterien, die im Aszites vorgefunden werden, im Stuhl eine zu geringe Häufigkeit aufweisen und erst im Aszites detektierbar werden, wenn sie

eine für sich günstigere Umgebung zum Wachstum vorfinden (88). Hinzu kommt, dass die bakterielle Translokation wahrscheinlich erregerspezifisch ist und die Abdominalhöhle für manche Bakterien bessere Lebensbedingungen bietet als für andere.

4.3 Vergleich Aszitesproben-Hautabstriche

Beim Vergleich zwischen den Aszitesproben und den Hautabstrichen mittels einer Principal Coordinates Clustering Analyse zur Untersuchung der Beta-Diversität, konnten wir ebenfalls signifikante Unterschiede im Clusterverhalten zeigen. Auch bei Betrachtung der bakteriellen Zusammensetzung auf Phylum- und Genus-Level konnten keine Zusammenhänge sichtbar gemacht werden. Generell war der Gehalt an bakterieller DNA in den Hautabstrichen gering. Somit können wir von adäquater Desinfektion bei der Parazentese ausgehen und Kontamination im Aszites durch Hautkeime bei der Aszitespunktion für unsere Studie ausschließen.

4.4 Einfluss von Rifaximin-Dauertherapie auf das Mikrobiom im Stuhl und Aszites

Zur langfristigen Prophylaxe von Episoden hepatischer Enzephalopathie wurde den Patienten 207, 211, 212 und 213 Rifaximin mit einer Tagesdosis von 1200 mg verabreicht. Von den Ergebnissen erwarteten wir uns eine Abnahme der bakteriellen Vielfalt in der Gruppe mit Rifaximin-Therapie. Sowohl im Stuhl als auch im Aszites konnten wir auf Phylum-Ebene nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennen. Auch auf Genus-Ebene wurde ersichtlich, dass die Diversität bei den Patienten unter Rifaximin-Therapie nicht statistisch signifikant abnimmt. Wir konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen, möglicherweise auf Grund der geringen Anzahl an Patienten in jeder Gruppe.

4.5 Limitationen

Diese Pilotstudie weist einige Limitationen auf. Dazu zählen die kleine Fallzahl (n=12) und DNA-Kontaminationen im Rahmen der PCR, die eventuell auch nach Abzug der Negativkontrollen bestehen bleiben. Weiters standen einige der Patienten zum Zeitpunkt der Parazentese unter antibiotischer Therapie. Dies beeinflusste wahrscheinlich sowohl die bakterielle Zusammensetzung als auch die negativen Ergebnisse der Kulturen. Hinzu kommt, dass die Proben nur zu einem Zeitpunkt gesammelt wurden. Durch die Analyse zu einem einzigen Zeitpunkt können deshalb

keine Aussagen über die Kumulation bestimmter Bakterien über die Zeit getroffen werden.

Als Konsequenz sollten zukünftige Studien größere Kohorten einschließen, strengere Ausschlusskriterien bezüglich antimikrobieller Therapie formulieren oder prospektiv Proben über einen längeren Zeitraum sammeln. Ein weiteres Problem stellt die Varianz der Ergebnisse durch andere NGS-Methoden dar, womit sich ein Vergleich mit anderen Studien manchmal schwierig gestaltet. Dennoch ist der Stellenwert, den NGS-Methoden heute eingenommen haben, zu unterstreichen. Während all unsere Kulturen nach Inokulation mit der Aszitesflüssigkeit ohne Wachstum blieben, konnten wir mithilfe der 16S PCR von 83,3% (10/12) der Aszitesproben genügend bakterielle DNA zur Interpretation des Mikrobioms gewinnen.

Schwierigkeiten ergeben sich letztendlich auch in der Diagnostik der spontan bakteriellen Peritonitis sowie in der Identifizierung der auslösenden Bakterien. In dieser Studie konnten von nur 50% (1/2) der Patienten und Patientinnen, die einen culture-negative neutrocytic bacterascites aufwiesen, genügend bakterielle DNA zur Auswertung gewonnen werden. Vor allem wenn es sich um polymikrobielle Infektionen handelt, wird es schwierig sein, herauszufinden welche Bakterien wirklich an der Infektion beteiligt sind. Trotzdem könnte es von Vorteil sein die Zusammensetzung des Mikrobioms sowie den Anteil der grampositiven und gramnegativen Bakterien im Aszites bei Patienten und Patientinnen mit kulturnegativer SBP zu kennen, um die empirische antibiotische Therapie daran anzupassen (85).

4.6 Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse zeigten signifikant unterschiedliche bakterielle Zusammensetzungen der Stuhl- und Aszitesproben. Auch zwischen den fHautabstrichen und den Aszitesproben konnten wir signifikante Unterschiede nachweisen. Zusammenfassend können wir nicht bestätigen, dass das Mikrobiom im Aszites direkt aus dem Gastrointestinaltrakt transloziert. In dieser Studie konnte keine direkte Kontamination von Hautkeimen durch die Parazentese in den Aszites nachgewiesen werden. Weitere Auswertung unserer Daten und Studien mit höherer Fallzahl werden nötig sein, um diese Aussagen zu verifizieren.

5 Literaturverzeichnis

1. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2014;383(9930):1749-1761.
2. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2008;371(9615):838-851.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(2):209-218.
4. Herold G. Innere Medizin. In Ausgabe 2016. p. 555-561.
5. Muir AJ. Understanding the Complexities of Cirrhosis. *Clinical Therapeutics*. 2015;37(8):1822-1836.
6. Herold G. Innere Medizin. In Ausgabe 2016. p. 553-555.
7. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrisons Innere Medizin*. In Band 3. 18. Auflage.; 2012. p. 2805 - 2817.
8. Arasteh K, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT. *Duale Reihe Innere Medizin*. In.; 2009. p. 573 - 576.
9. Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 2003;38:38-53.
10. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011;25(2):281-290.
11. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(23):7312–7324.
12. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology*. 2009;50(3):604-620.
13. Martínez-Noguera A, Montserrat E, Torrubia S, Villalba J. Doppler in hepatic cirrhosis and chronic hepatitis. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2002;23:19-36.
14. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver Biopsy. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(7):495-500.
15. Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédinghen V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;128(2):343-350.
16. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*. 2006;44(1):217-231.
17. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124(1):91-96.
18. De Franchis R, Salerno F. Pathogenesis of ascites and predictors of resistance to therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2002;17(s3):242-247.
19. Salerno F, Guevara M, Bernardi M, Moreau R, Wong F, Angeli P, Garcia-Tsao G, Lee SS. Refractory ascites: pathogenesis, definition and therapy of a severe complication in patients with cirrhosis. *Liver international*. 2010;30(7):937-947.
20. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrisons Innere Medizin*. In Band 1. 19. Auflage.; 2015. p. 346 - 348.
21. Møller S, Henrikse JH, Bendtsen F. Pathogenetic background for treatment of ascites and hepatorenal syndrome. *Hepatology International*. 2008;2(4):416-428.

22. Heneghan MA, Harrison PM. Pathogenesis of ascites in cirrhosis and portal hypertension. *Medical Science Monitor*. 2000;6(4):807-816.
23. Orrego H, Medline A, Blendis LM, Rankin JG, Kreaden DA. Collagenisation of the Disse space in alcoholic liver disease. *Gut*. 1979;20(8):673-679.
24. Moore CM, Van Thiel DH. Cirrhotic ascites review: Pathophysiology, diagnosis and management. *World Journal of Hepatology*. 2013;5(5):251-263.
25. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2010;53(3):397-417.
26. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: update 2012. *AASLD Practice Guideline*. 2012.
27. Savio J, Thuluvath PJ. Hyponatremia in cirrhosis: Pathophysiology and management. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2015;21(11):3197-3206.
28. Groszmann RJ. Hyperdynamic Circulation of Liver Disease 40 Years later: Pathophysiology and Clinical Consequences. *Hepatology*. 1994;20(5):1359-1363.
29. Wiest R, Schölmerich J. Diagnostik und Therapie des Aszites. *Deutsches Ärzteblatt*. 2006;103(28-29):1972-1981.
30. Tsochatzis EA, Gerbes AL. Diagnosis and treatment of ascites. *Journal of Hepatology*. 2017;67(1):184-185.
31. Pedersen JS, Bendtsen F, Møller S. Management of cirrhotic ascites. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2015;6(3):124-137.
32. Runyon BA. Cardiac ascites: a characterization. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1988;10(4):410-412.
33. Cabrera J, Arroyo V, Ballesta AM, Rimola A, Gual J, Elena M, Rodes J. Aminoglycoside nephrotoxicity in cirrhosis: value of urinary β_2 -microglobulin to discriminate functional renal failure from acute tubular damage. *Gastroenterology*. 1982;82(1):97-105.
34. Bernardi M, Servadei D, Trevisani F, Rusticali AG, Gasbarrini G. Importance of Plasma Aldosterone Concentration on the Natriuretic Effect of Spironolactone in Patients with Liver Cirrhosis and Ascites. *Digestion*. 1985;31(4):189-193.
35. Runyon BA. Care of patients with ascites. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(5):337-342.
36. Gines A, Fernandez-Esparrach G, Monescillo A, Vila C, Domenech E, Abecasis R, et al. Randomized trial comparing albumin, dextran 70, and polygeline in cirrhotic patients with ascites treated by paracentesis. *Gastroenterology*. 1996;111(4):1002-1010.
37. Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laf G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Schölmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology*. 1996;23(1):164-176.
38. Boyer TD, Haskal ZJ. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the management of portal hypertension. *Hepatology*. 2005;41(2):386-400.
39. Stanley MM, Ochi S, Lee KK, Nemchausky BA, Greenlee HB, Allen JI, et al. Peritoneovenous shunting as compared with medical treatment in patients with alcoholic cirrhosis and massive ascites. *New England Journal of Medicine*. 1989;321(24):1632-1638.
40. Sheer TA, Runyon BA. Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Digestive Diseases*. 2005;23(1):39-46.

41. Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis—bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2015;41(11):1116-1131.
42. Runyon BA. Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: A variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 1990;12(4):710-715.
43. Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology*. 1988;95(5):1351-1355.
44. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Journal of Hepatology*. 1997;26(6):1372-1378.
45. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of Translocation Rates of Various Indigenous Bacteria from the Gastrointestinal Tract to the Mesenteric Lymph Node. *Journal of Infectious Diseases*. 1988;157(5):1032-1038.
46. Runyon BA, Morrissey RL, Hoefs JC, Wyle FA. Opsonic Activity of Human Ascitic Fluid: A Potentially Important Protective Mechanism Against Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Hepatology*. 1985;5(4):634-637.
47. Runyon BA. Early events in spontaneous bacterial peritonitis. *Gut*. 2004;53(6):782-784.
48. Koulaouzidis A, Bhat S, Saeed AA. Spontaneous bacterial peritonitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2009;15(9):1042-1049.
49. Friedrich K, Nüsse S, Rehlen T, Stremmel W, Mischnik A, Eisenbach C. Microbiology and resistance in first episodes of spontaneous bacterial peritonitis: implications for management and prognosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016;31(6):1191-1195.
50. Oliveira AM, Branco JC, Barosa R, Rodrigues JA, Ramos L, Martins A, Karvellas CJ, Cardoso FS. Clinical and microbiological characteristics associated with mortality in spontaneous bacterial peritonitis: a multicenter cohort study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2016;28(10):1216-1222.
51. Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *Journal of Hepatology*. 32(1):2000:142-153.
52. Wong F, Bernardi M, Balk R, et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut*. 2005;54(5):718-725.
53. Khan J, Pikkarainen P, Karvonen AL, Mäkelä T, Peräaho M, Pehkonen E, Collin P. Ascites: aetiology, mortality and the prevalence of spontaneous bacterial peritonitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009;44(8):970-974.
54. Hsu YC, Chung CS, Wang HP. Application of Endoscopy in Improving Survival of Cirrhotic Patients with Acute Variceal Hemorrhage. *International Journal of Hepatology*. 2011;2011:893973.
55. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin Treatment in Hepatic Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(12):1071-1081.
56. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sørensen HT, Vilstrup H. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: A Danish population-based cohort study. *Hepatology*. 2010;51(5):1675-1682.
57. Bai M, Yang Z, Qi X, Fan D, Han G. L-ornithine-L-aspartate for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: A meta-analysis of randomized

- controlled trials. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28(5):783-792.
58. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(8):448-458.
 59. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Seminars in liver disease*. 2010;30(1):35-51.
 60. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Reviews in Microbiology*. 1977;31(1):107-133.
 61. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-1920.
 62. Guarner F, Malagelada JR. Bacterial flora of the digestive tract. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2003;26:1-5.
 63. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
 64. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(4):7493-7519.
 65. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;28 Suppl 4:9-17.
 66. Gómez-Hurtado I, Such J, Francés R. Microbiome and bacterial translocation in cirrhosis. *Gastroenterología y Hepatología*. 2016;39(10):687-696.
 67. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(24):2369-2379.
 68. Tuomisto S, Pessi T, Collin P, Vuento R, Aittoniemi J, Karhunen PJ. Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC Gastroenterology*. 2014;14(1):40.
 69. Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Doré J, Rigottier-Gois L. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environmental Microbiology*. 2005;7(7):933-946.
 70. Orrhage K, Nord CE. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*. 2000;26(3):95-111.
 71. Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*. 2016;65(12):2035-2044.
 72. Chen Y, Yang F, Lu H, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*. 2011;54(2):562-572.
 73. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-484.
 74. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55(2):205-211..
 75. Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2008;11(5):613-619.
 76. Zeuzem S. Gut-liver axis. *International Journal of Colorectal Disease*. 2000;15(2):59-82.

77. Macnaughtan J, Jalan R. Clinical and Pathophysiological Consequences of Alterations in the Microbiome in Cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015;110(10):1399-1410.
78. Bajaj JS, Hylemon PB, Heuman DM, Sonyol AJ, Gillevet PM. The Cirrhosis Dysbiosis Ratio defines Changes in the Gut. *Journal of Hepatology*. 2014;60(5):940–947.
79. Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014;513(7516):59-77.
80. Liu J, Wu D, Ahmed A, et al. Comparison of the Gut Microbe Profiles and Numbers between Patients with Liver Cirrhosis and Healthy Individuals. *Current Microbiology*. 2012;65(1):7-13.
81. Wong, JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006;40(3):235-243.
82. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of Hepatology*. 2014;60(5):940-947.
83. Tilg H, Grander C, Moschen AR. How does the microbiome affect liver disease? *Clinical Liver Disease*. 2016;8(5):123-126.
84. Feng Y, Chen CL, Chen TH, Liang YH, Chen HL, Lin CY, Chiu CH. Application of next-generation sequencing to study ascitic microbiome in cirrhotic patients with or without spontaneous bacterial peritonitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2015;48(5):504-509.
85. Hardick J, Won H, Jeng K, Hsieh YH, Gaydos CA, Rothman RE, Yang S. Identification of bacterial pathogens in ascitic fluids from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis by use of broad-range PCR (16S PCR) coupled with high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7):2428-2432.
86. Bruns T, Reuken PA, Stengel S, et al. The prognostic significance of bacterial DNA in patients with decompensated cirrhosis and suspected infection. *Liver International*. 2016;36(8):1133-1142.
87. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2008;48(6):1924-1931.
88. Santiago A, Pozuelo M, Poca M, Gely C, Nieto JC, Torras X, et al. Alteration of the serum microbiome composition in cirrhotic patients with ascites. *Scientific Reports*. 2016;6:25001.
89. Rogers GB, van der Gast CJ, Bruce KD, Marsh P, Collins JE, Sutton J, Wright M. Ascitic microbiota composition is correlated with clinical severity in cirrhosis with portal hypertension. *PLoS One*. 2013;8(9):e74884.
90. Moissl-Eichinger C. Archaea in artificial environments: Their presence in global spacecraft clean rooms and impact on planetary protection. *The ISME journal*. 2011;5(2):209-219.
91. Klymiuk I, Bilgiler C, Stadlmann A, Thannesberger J, Kastner MT, Hogenauer C, Puspok A, Biowski-Frotz S, Schrutka-Kolbl C, Thallinger GG, Steininger C.. The Human Gastric Microbiome Is Predicated upon Infection with *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2508.

Anhang – NGS

XS Puffer nach Moissl-Eichinger 2011 (90):

XS buffer (2x) was freshly prepared as follows:

(20ml stock solution): 1M Tris/HCl (pH 7.4) (4ml); 7M ammonium acetate (4.56 ml); 250mM ethylene diamine tetraacetic acid (3.2ml); 10% sodium dodecyl sulfate (w/v) (4ml); potassium ethyl xanthogenate (0.4 g); PCR-grade water (4.99 ml). For completely dissolving the xanthogenate, the buffer was incubated at 65 °C for 15 min.