Die Rolle von Laktat produzierenden Milchsäurebakterien bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom und D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Fabian Glowatzki

aus Calw

Gießen 2015

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Justus Liebig- Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Gutachter: Prof. Dr. B. Neubauer

Tag der Disputation: 21.04.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Das Kurzdarmsyndrom ... 1
1.2 D- + L- Laktat ... 2
1.2.1 D- + L- Laktat im menschlichen Körper ... 2
1.2.2 D-Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie ... 3
1.3 Physiologische Darmmikrobiota ... 5
1.4 Allgemeine Mikrobiologie der Milchsäurebakterien ... 6
1.5 Vorkommen von Milchsäurebakterien ... 7
1.6 Probiotika ... 7
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit ... 8
2 Material und Methoden ... 10
2.1 Patienten und Probanden ... 10
2.1.1 Literaturrecherche ... 10
2.1.2 Patienten mit Kurzdarmsyndrom und Kontrollgruppe in dieser Studie ... 10
2.2 Chemikalien und Geräte ... 11
2.2.1 Chemikalien und Materialien ... 11
2.2.2 Geräte ... 12
2.3 Kulturmedien ... 12
2.4 Datenverarbeitung, Hard- und Software ... 13
2.5 Methoden ... 13
2.5.1 Stuhlprobenverarbeitung ... 13
2.5.1.1 Vorbereitung für PCR/DHPLC- Analyse ... 13
2.5.1.2 Kulturelle Anzucht der Milchsäurebakterien ... 14
2.5.2 Identifikation der einzelnen Milchsäurebakterien ... 14
2.5.2.1 16S rDNA- Sequenzierung ... 14
2.5.2.1.1 Zelllyse ... 14
2.5.2.1.2 Polymerase- Ketten- Reaktion ... 14
2.5.2.1.3 Gelelektrophorese ... 15
2.5.2.1.4 DNA- Aufreinigung ... 16
2.5.2.1.5 Sequenzierung ... 16
2.5.2.1.6 Bioinformatische Analyse ... 17
2.5.2.2 Biochemische Identifizierung ... 17
2.5.2.3 Massenspektrometrische Identifizierung ... 18

2.5.3 Untersuchung auf dominante Keime 19
2.5.3.1 DNA- Extraktion mittels Maxwell® 19
2.5.3.2 PCR mittels Piko® Thermal Cycler 20
2.5.3.3 PCR/DHPLC- Analyse mittels WAVE® 20
2.5.4 D- + L- Laktatbestimmung 21
2.5.4.1 Versuchsaufbau 21
2.5.4.2 D- + L- Laktat Enzym- Assays 21
3 Ergebnisse 22
3.1 Literaturrecherche 22
3.2 Patienten und Probanden dieser Studie 24
3.3 Auswertung des Fragebogens 25
3.3.1 Grunderkrankung der Patienten mit KDS 27
3.3.2 Angaben zu neurologischen Auffälligkeiten 27
3.3.3 Angaben zu Probiotika- Einnahme bzw. zu weiterer Medikation 28
3.4 Vorkommen von Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen 28
3.4.1 Patienten mit KDS 28
3.4.2 Kontrollgruppen 29
3.5 Anzahl identifizierter Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen 30
3.5.1 Patienten mit KDS 30
3.5.2 Kontrollgruppen 30
3.6 Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen 31
3.6.1 Patienten mit KDS 31
3.6.2 Kontrollgruppen 32
3.7 Zuordnung der identifizierten Milchsäurebakterien zu den Patienten 36
3.8 Untersuchung auf dominante Keime 36
3.9 D- + L- Laktatproduktion der identifizierten Milchsäurebakterien 39
3.9.1 D- + L- Laktatwerte der einzelnen Milchsäurebakterien 39
3.9.2 Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Angaben der Patienten .. 49
3.10 Erstellung eines Risikoprofiles 50
4 Diskussion 52
5 Zusammenfassung 70
6 Abbildungsverzeichnis + Tabellenverzeichnis 72
7 Abkürzungsverzeichnis 75
8 Literaturverzeichnis 76
9 Anhang 85

1 Einleitung

1.1 Das Kurzdarmsyndrom

Beim Kurzdarmsyndrom (KDS) handelt es sich um ein Malabsorptionssyndrom, welches meist aufgrund einer ausgedehnten Resektion großer Dünndarmteile auftritt. Das Ausmaß der Resektion bzw. die Länge des verbleibenden Dünndarms bestimmen den Grad der Malabsorption (Buchman et al., 2006). Beim Erwachsenen wird ab einer Dünndarmrestlänge von < 200 cm von einem Kurzdarmsyndrom gesprochen (Horbach 2006). Als Grenze der Überlebensfähigkeit gelten 40 cm verbliebene Dünndarmlänge ohne Erhaltung der Ileozoekalklappe und 15 cm mit bestehender Ileozoekalregion (Krause et al., 2013). Die Definition mit Längenangaben wird jedoch zunehmend verlassen und weicht der einer funktionellen Definition, in der die Unfähigkeit zur Aufrechterhaltung des Protein-, Energie-, Flüssigkeits-, Elektrolyt- oder Spurenelementshaushaltes bei normaler Ernährung im Vordergrund steht (Spencer et al., 2005; O'Keefe et al., 2006).

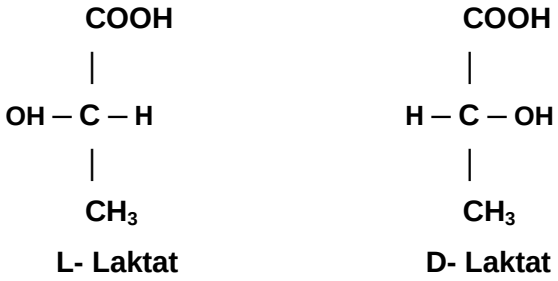
Die Inzidenz für ein neonatales Kurzdarmsyndrom liegt nach einer kanadischen Studie bei 24,5 von 100.000 Lebendgeborenen, mit viel höheren Inzidenzen bei Frühgeborenen verglichen mit Reifgeborenen (353,7/100.000 Lebendgeburten zu 3,5/100,000 Lebendgeburten) (Wales et al., 2004). Berichtete Überlebensraten variieren zwischen 73% und 89% (Duro et al., 2008). Als häufige angeborene Fehlbildungen des Gastrointestinaltraktes, die eine ausgedehnte Resektion großer Dünndarmteile nach sich ziehen können, sind die nekrotisierende Enterocolitis, Bauchwanddefekte (z.B. Gastroschisis), intestinale Atresien bzw. Dysplasien, der Volvulus und die Aganglionose beschrieben (Wales et. al., 2010). Neben diesen strukturellen Formen sind auch funktionelle Ausprägungen zu beachten. Dabei handelt es sich im Kindesalter meist um eine intestinale Pseudoobstruktion oder eine Mikrovillusinklusionserkrankung. Komplikationen die aufgrund der Malabsorptionsstörung auftreten sind u.a. Elektrolytentgleisungen, verringerte Vitamin- und Spurenelementresorption, Steatorrhoe, Wachstumsstörungen, Oxalatnephropathie, Choletitihiasis, Osteoporose, bakterielle Überwucherungen sowie das Auftreten einer D- Laktat Azidose. Daneben spielen jene Komplikationen eine Rolle, die aufgrund der oft jahrelang nötigen totalen parenteralen Ernährung auftreten: Infektionen der zentralen Gefäßzuggänge, das Auftreten einer Sepsis, von Thrombosen und Embolien sowie das Entstehen einer Hepatopathie (Horbach 2006). Dennoch steht die parenterale Ernährung in den ersten Jahren im Vordergrund des therapeutischen Konzeptes eines Kurzdarmsyndroms. Durch die immer besser

werdende postoperative Versorgung der kleinen Patienten mit Kurzdarmsyndrom und die damit einhergehende höhere Überlebensrate wird jedoch versucht, zur Vermeidung der oben genannten Komplikationen, neben der langzeitparentalen Ernährung eine möglichst frühzeitige enterale Ernährung einzuführen.

1.2 D- + L- Laktat

1.2.1 D- + L- Laktat im menschlichen Körper

Laktat wurde 1780 von dem schwedischen Chemiker Scheele entdeckt. Er isolierte das Molekül aus saurer Milch. Laktat existiert in Isomeren und wird anhand der OH-Gruppe am C2 Atom als D- oder L- Laktat definiert (Ewaschuk et al., 2005).



Im menschlichen Gewebe wird Laktat hauptsächlich im Rahmen der anaeroben Glykolyse hergestellt. Laktat wird dabei mittels einer enzymatischen Reaktion aus Pyruvat synthetisiert. Die Reaktion wird durch die isomerspezifischen Enzyme L-Laktatdehydrogenase (L-LDH) bzw. D- Laktatdehydrogenase (D-LDH) katalysiert und kann in beide Richtungen ablaufen, sodass aus Laktat auch wieder Pyruvat produziert werden kann. In Säugetieren wird dabei die D-LDH nur in geringen Maßen exprimiert, sodass die Produktion und der Abbau von D- Laktat im menschlichen Gewebe normalerweise sehr gering sind. Die Umsetzung von D-Laktat zu Pyruvat kann im menschlichen Körper allerdings mit Hilfe des Enzyms D-2-Hydroxyacid Dehydrogenase (D-2-HDH) erfolgen (Petersen et al., 2005). In geringen Mengen wird D- Laktat zudem im Rahmen des Methylglyoxal- Stoffwechselweges hergestellt (Thornalley et al., 1990).

Im menschlichen Gastrointestinaltrakt entsteht Laktat durch die dort ansässige bakterielle Mikrobiota. Dabei spielen vor allen Dingen Milchsäurebakterien eine große Rolle. Diese produzieren zumeist zwei Isomere des Laktates. Außerdem sind einige dieser Bakterien mit Hilfe der DL- Racemase in der Lage, die Isomere ineinander zu überführen (Stetter et al., 1973).

Als weitere Quelle für Laktat im menschlichen Körper spielt die Ernährung eine große Rolle. Dabei sind fermentierte Lebensmittel wie Joghurt, Sauerkraut, Mixed- Pickles aber auch Salami und Käse zu nennen. Außerdem enthalten auch medizinische Infusionslösungen Laktat, wie zum Beispiel die häufig eingesetzte Ringer- Laktat Lösung.

1.2.2 D-Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie

Eine Erhöhung von Laktat im Blut führt zu einer Senkung des pH- Wertes, der im menschlichen Körper normalerweise zwischen 7,36 und 7,44 liegt. Sinkt der pH- Wert unterhalb des genannten Grenzwertes spricht man von einer Azidose. Der Normwert für Laktat im menschlichen Blut beträgt 5 – 20 mg/ dl.
L- Laktat Azidosen treten zum Beispiel im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen, Hypoxien oder bei Nierenversagen auf. Dabei ist allen Erkrankungen gemein, dass das vermehrt anfallende Laktat im Körper selbst produziert wird.
Eine Erhöhung des D- Laktates und eine damit verbundene D-Laktat Azidose hingegen entsteht durch exogene Faktoren, gepaart mit dem fehlenden bzw. sehr niedrigen Metabolismus der Säure im menschlichen Körper.
Bei den meisten in der Literatur beschrieben Fällen von D-Laktat Azidosen beim Menschen handelt es sich um Patienten mit Kurzdarmsyndrom. Als Voraussetzungen für die Entstehung einer D-Laktat Azidose bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom gilt dabei ein erhöhtes Angebot an unverdauten Kohlenhydraten im Darm und eine intestinale Mikrobiota, die zum größten Teil aus Laktat bildenden Bakterien besteht. (Uribarri et al., 1998). Bei gesunden Menschen werden Kohlenhydrate im bakterienarmen Duodenum bzw. Jejunum resorbiert. Der Übertritt unverdauter Kohlenhydrate in das bakterienreiche Colon ist damit nur in geringen Maßen möglich. Prädisponierend für ein erhöhtes Angebot an Kohlenhydraten im Colon sind dementsprechend Erkrankungen, bei denen der Dünndarm stark verkürzt ist, wie es bei einem Kurzdarmsyndrom oder auch beim jejunoilealen Bypass der Fall ist und die Ileozoekalklappe als natürliche Barriere zwischen Dickdarm und Dünndarm fehlt (Koletzko et al., 1994). Bei Patienten mit KDS kommt es regelhaft zum Übertritt von normalerweise im Colon ansässigen Bakterien in den verkürzten Dünndarmabschnitt. Im Rahmen dieser bakteriellen Überwucherung des Dünndarmes werden die dort anfallenden unverdauten Kohlenhydrate nicht komplett resorbiert, sondern zudem durch Bakterien zu organischen Säuren wie z.B. Laktat verstoffwechselt. Dies führt zu einer Senkung des pH- Wertes, wodurch azidophile Bakterien wie Milchsäurebakterien in ihrer Vermehrung bevorzugt werden. Milchsäurebakterien können ihren

Energiehaushalt nur durch Fermentation decken, wobei als Endprodukt fast ausschließlich Laktat steht (Khalisanni Khalid, 2011). Ob dabei vermehrt D- oder L-Laktat entsteht hängt von der Bakterienspezies ab, in jedem Fall werden aber erhöhte Mengen Laktat im Darm produziert. Nach Resorption kann so auch im Blut vermehrt Laktat anfallen, wobei L- Laktat im Gegensatz zu D- Laktat im Rahmen der Homöostase des Körpers schnell wieder abgebaut wird. D- Laktat hingegen fällt im menschlichen Körper normalerweise kaum an und die Metabolisierung im menschlichen Körper ist sehr langsam. Der Normalwert für D- Laktat im Blut liegt beim Gesunden bei 11 - 70 nmol/L (Ewaschuk et al., 2005).

Vermehrt resorbiertes D- Laktat führt somit aufgrund des langsamen Abbaus zu einer metabolischen Azidose im Blut. Patienten mit einer D- Laktat Azidose können dabei Symptome einer Encephalopathie mit z.B. Verwirrtheit, Sprachstörungen, Ataxie, Gleichgewichtsstörungen, Orientierungslosigkeit, Aggressivität oder Konzentrationsschwäche zeigen. Insgesamt können die Patienten somit wie alkoholintoxikiert wirken. Die Symptome sind selbstlimitierend und treten meist nach dem Konsum kohlenhydratreicher Nahrung auf. Durch Nahrungskarenz kommt es meist innerhalb weniger Stunden oder Tagen zu einem Abklingen der Beschwerden.

Dieses Phänomen ist aus der Veterinärmedizin gut bekannt. Bekommen Wiederkäuer zu viel kohlenhydratreiches Futter verabreicht, kann sich das Krankheitsbild der „drunken cow“ entwickeln. Die Tiere zeigen dabei ebenfalls neurologische Auffälligkeiten in Form von Gleichgewichtsstörungen und Ataxie (Dunlop et al., 1965). Ob dabei nur D- Laktat oder auch andere toxische Metabolite für die Symptome verantwortlich sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Klar ist, dass D- Laktat die Blut- Hirn- Schranke durch einfache Diffusion überwinden kann. Entgegen früherer Vermutungen akkumuliert es dort jedoch nicht. Die Spiegel im Liquor und Blut zeigten sich in zwei publizierten Fällen gleichwertig (Karton et al., 1987; Scully et al., 1989). Die Azidose selbst scheint dabei nicht verantwortlich für das Auftreten der neurologischen Auffälligkeiten zu sein. Patienten mit Azidosen im Rahmen anderer Grundkrankheiten zeigen normalerweise nicht das Spektrum der beschriebenen neurologischen Symptome im Rahmen einer D- Laktat Azidose. Außerdem bewirkt der Ausgleich der Azidose allein keine Besserung der neurologischen Symptome (Uribarri et al., 1998). Zudem scheinen auch alleinig erhöhte D- Laktat Werte ohne Azidose zu neurologischen Symptomen zu führen (Godey et al., 2000). Dahingegen zeigten in einer Studie von Thurn et al, in der das Vorkommen einer D- Laktat Azidose bei Patienten mit jejunoilealem Bypass untersucht wurde, 16 von 33 Patienten neurologische Symptome, wobei nur neun der Patienten tatsächlich erhöhte D - Laktat Werte im Blut hatten. Anderseits zeigten einige Probanden mit erhöhten D-Laktat

Werten keinerlei Symptome (Thurn et al., 1985). In zwei weiteren Studien wurden gesunden Probanden D- Laktat infundiert, wobei Serum Werte von 3,5 mmol/l bzw. 6 mmol/l erreicht wurden. Dabei zeigten die Patienten interessanterweise keinerlei neurologische Symptome (Oh et al., 1985; Vrese et al., 1990).

Ein erhöhter D- Laktat- Spiegel im Blut scheint also nicht obligatorisch bei allen Menschen zu einer Encephalopathie zu führen. Möglicherweise spielen der Abnahmezeitpunkt und die Dauer der D- Laktaterhöhung eine Rolle in der Entstehung der Encephalopathie.

Auch toxische Metabolite, die während der D- Laktat Produktion durch intestinale Bakterien entstehen und anschließend resorbiert werden könnten, werden als möglicher Auslöser einer Encephalopathie diskutiert. Dazu zählen Mercaptane, Aldehyde und Amine, die möglicherwiese als falsche Neurotransmitter fungieren könnten (Halperin et al.,1996). Auch Ethanol kann als Nebenprodukt bei der Fermentation von Kohlenhydraten entstehen, wobei bisher in keinerlei publizierten Fällen erhöhte Ethanolwerte im Blut betroffener Patienten nachgewiesen wurden. Möglicherweise spielen auch begleitende Nährstoffdefizite bzw. Stoffwechseldefekte wie z.B. Störungen des Pyruvat- oder Thiaminstoffwechsels eine Rolle bei der Entstehung neurologischer Symptome im Rahmen einer D- Laktat Azidose (Hudson et al., 1990; Uribarri et al., 1998).

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer D-Laktat Azidose spielt jedoch sicherlich die Fähigkeit des menschlichen Körpers das anfallende D- Laktat wieder abzubauen. Für den schnellerer Abbau der Säure beim Erwachsenen im Vergleich zum Kind wird dabei eine erhöhte Aktivität der dafür verantwortlichen D-2-Hydroxyacid Dehydrogenase diskutiert (Bongaerts et al., 2005; Yasuda et al., 1993).

1.3 Physiologische Darmmikrobiota

Der menschliche Gastrointestinaltrakt beinhaltet eine enorme Menge und Vielfalt an aeroben und anaeroben Bakterien, welche in einem komplexen Ökosystem interagieren und die physiologische Darmmikrobiota bilden (Simon et al., 1986). Im menschlichen Körper befinden sich ca. zehnmal mehr Mikroorganismen als eukaryotische Zellen. Man geht von bis zu 1000 verschiedenen Spezies aus (Guarner et al., 2003; Ceapa et al. 2013; Blottière et al. 2013; Rajilić-Stojanović et al., 2014).

Die Besiedelung des Gastrointestinaltraktes mit Bakterien findet unmittelbar während bzw. nach der Geburt durch die Passage des Geburtskanals bzw. durch das Zuführen der ersten Nahrung statt. Im Laufe des Lebens beeinflussen dann verschiedene Faktoren die Komposition der Darmmikrobiota. Dabei spielen die Ernährung und das

Alter, aber auch der sozioökonomische Status und die geographische Herkunft, sowie der Konsum von Antibiotika und Probiotika eine Rolle (Lagier et al., 2012).
Im Magen und Duodenum findet sich im gesunden Menschen nur eine geringe Anzahl an Bakterien, typischerweise weniger als 10^3 cfu/ml. Dabei verhindern die Magensäure, die Galle, das Pankreassekret und die propulsiven Bewegungen in diesem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes eine vermehrte Besiedelung. Die Mikrobiota des Magens und des Duodenums besteht vornehmlich aus Gram- positiven aeroben Bakterien wie *Streptokokken, Staphylokokken, Lactobacillen* und einigen Pilzen. Im Jejunum und Ileum nimmt die Anzahl an Bakterien stetig zu, von 10^4 cfu/ml im Jejunum auf 10^7 cfu/ml im distalen Ileum. Dort finden sich nun vornehmlich Gram- negative aerobe und anaerobe Bakterien wie *Bacteriodes, Bifidobakterien, Fusobakterien* oder *Clostridien*. Distal der Ileozoekalklappe nimmt die Bakterienkonzentration rapide zu. Im Colon wird die Anzahl an Bakterien auf 10^{11} – 10^{12} cfu/ml geschätzt. Anaerobe Bakterien wie *Bacteriodes* oder *Bifidobakterien* kommen dabei 1000- Mal häufiger vor als ihre aeroben Vertreter. Weitere häufige Spezies im Colon sind anaerobe Gram-positive Kokken, *Clostridien*, *Enterokokken* und verschiedene Arten von *Enterobakterien* (Simon et al., 1986; Guarner et al., 2006).

1.4 Allgemeine Mikrobiologie der Milchsäurebakterien

Nach der taxonomischen Gliederung von Garrity et al. werden Milchsäurebakterien dem Phylum *Firmicutes*, der Klasse *Bacilli*, der Ordnung *Lactobacillales* und der Familie *Lactobacillacea* zugeordnet. Es werden drei Gattungen unterschieden: *Lactobacillus, Pediococcus und Paralactobacillus*, wovon bisher nur *Paralactobacillus selangorensis* bekannt ist (Garrity et al., 2007).
Milchsäurebakterien sind Gram- positive, nicht motile, nicht sporenbildende, Katalase-negative Stäbchen und Kokken. Ihnen fehlt die Eigenschaft Cytochrome und Porphyrine zu synthetisieren, weshalb sie nicht in der Lage sind, ATP mittels der Atmungskette zu generieren. Michsäurebakterien sind deshalb zur Energiegewinnung auf die Fermentation von Zucker angewiesen (Felis et al., 2007). Dabei wird die homofermentative, in welcher Laktat als einziges Endprodukt der Fermentation steht, von der heterofermentativen Gärung, welche zusätzliche Endprodukte wie Ethanol, Acetat und CO_2 beinhaltet, unterschieden. Milchsäurebakterien sind in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, sind aber aerotolerant, sodass es sich um fakultative anaerobe Bakterien handelt.
Die Gattung der *Lactobacillen* nimmt die größte Gruppe der Milchsäurebakterien ein. Bis dato sind in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen des

Leibniz Institutes 241 Spezies und Subspezies aufgeführt. Die gemittelte Genomgröße der verschiedenen *Lactobacillus*- Spezies kann auf 1.88 - 3.2 mb geschätzt werden (Klaenhammer et al., 2008; Drissi et al., 2014). Etwa 38 % aller *Lactobacillen* tragen ein oder mehrere Plasmide, deren Größe mit 1,2 – 150 kb angegeben wird (Wang et al., 1997). Viele *Lactobacillen* können empfänglich für Bacteriophagen sein, was ein Problem in der Lebensmittelindustrie, aber auch eine Chance in der Biotechnologie darstellen kann (Mahony et al., 2014; Villion et al., 2009).

1.5 Vorkommen von Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind überall dort zu finden, wo Kohlenhydrate zur Verfügung stehen: In Nahrungsmitteln wie Milchprodukten, fermentiertem Fleisch und Gemüse, Früchten und Mixed- Pickels oder Bier. Außerdem im Respirations-, Gastrointestinal- und Genitaltrakt von Menschen und Tieren sowie in stehenden Gewässern und auf Pflanzen (Felis et al., 2007; Stiles et al., 1997).

In der Lebensmittelindustrie spielen sie als Starterkulturen für Käse und Jogurt eine entscheidende Rolle. Zudem haben im letzten Jahrzehnt Milchsäurebakterien in der Nahrungsmittelindustrie durch ihre Verwendung in probiotischen Jogurtdrinks auf sich aufmerksam gemacht. Verwendet werden sie u.a. auch als probiotische Formula in der Säuglingsernährung.

Im medizinischen Bereich werden Milchsäurebakterien eingesetzt um z.B. die Dauer von Diarrhoen im Rahmen einer antibiotischen Therapie zu verkürzen (Hickson et al., 2007).

1.6 Probiotika

Probiotika werden definiert als lebende Mikroorganismen die, wenn sie in ausreichender Menge aufgenommen werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Vorteil bringen (Ceapa et al., 2013). Davon abzugrenzen sind Prebiotika, welche definiert sind als natürliche, nichtverdauliche Lebensmittelbestandteile, die die Gesundheit verbessern sollen, indem sie die Darmmikrobiota durch die selektive Stimulation gewisser probiotisch aktiver Bakterien günstig beeinflussen (Braegger, 2004). Als Synbiotikum wird die Kombination eines Probiotikums mit einem Prebiotikum bezeichnet.

Im letzten Jahrzehnt hat der Einsatz von Probiotika in der Nahrungsmittelindustrie, aber auch in der Medizin, stark zugenommen. Ihnen wird dabei die Rolle einer sicheren Manipulation der gastrointestinalen Darmmikrobiota zugesprochen, um dadurch die

Gesundheit positiv zu beeinflussen. In der Humanmedizin werden Probiotika häufig in Form von Milchsäurebakterien verwendet. Unter anderem wurde durch den Einsatz von *Lactobacillus rhamnosus GG* eine Verkürzung der Durchfalldauer bei akuter Gastroenteritis gezeigt (Szajewska et al., 2001). Auch eine immunmodulatorische Rolle wird manchen Probiotika zugeschrieben (Takeda et al., 2006).

Jedoch werden probiotische Produkte nicht nur in der Medizin verwendet. Aufgrund der zunehmenden Vermarktung von "gesunden Lebensmitteln" durch die Lebensmittelindustrie in den letzten beiden Jahrzehnten ist es zu einer exponentiellen Zunahme an probiotischen Produkten gekommen (Stanton et al., 2001).

Auch bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom spielen Probiotika seit jeher eine große Rolle. Probiotika wurden in den meisten bisher beschrieben Fallberichten im Rahmen der Therapie einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie zusammen mit Antibiotika eingesetzt (Reddy et al., 2013). Dabei sind auch Fälle beschrieben, in denen das verwendete Probiotikum selbst als Auslöser einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie angesehen wird (Munakata et al., 2010; Day et al., 1999; Ku et al., 2006). Auch das Auftreten einer Sepsis bei der Einnahme von Probiotika ist beschrieben worden (De Groote et al., 2005; Kunz et al., 2004). Insofern ist der Einsatz von Probiotika im Klinikalltag bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom nicht zwingend als ungefährlich einzustufen und sollte mit Bedacht gewählt werden. Dabei fehlen den Ärzten zumeist Information darüber, ob das verwendete Probiotika D- Laktat produziert (Mack 2004).

Zudem können die als ungefährlich geltenden *Lactobacillen* auch beim gesunden Menschen schwere Infektionen auslösen: In einer Übersichtsarbeit von 2005 wurden von den Autoren über 200 Fälle beschrieben, in denen *Lactobacillus*- assoziierte Infektionen beim Menschen aufgetreten waren. *Lactobacillen* waren dabei häufig Erreger von Endokarditiden und Bakteriämien. Jedoch konnten sie auch im Rahmen von Abszessen, einer Peritonitis oder einer Meningitis nachgewiesen werden. Die Mortalitätsrate lag dabei bei fast 30 % (Cannon et al., 2005).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Bei der D-Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom handelt es sich um eine vergleichsweiche seltene Erkrankung, die jedoch die betroffenen Kinder vor große Probleme stellen kann. So kann u.a. der Schulbesuch durch auftretende Symptome wie Konzentrationsstörungen, verwaschene Sprache, Gangunsicherheiten oder vermehrte Müdigkeit erheblich gestört sein. Dabei entwickelt nur ein kleiner Teil der Kinder mit KDS tatsächlich Symptome einer D- Laktat

assoziierten Encephalopathie. Der Grund dafür ist bis heute nicht sicher geklärt. Ein möglicher Erklärungsversuch könnte das Vorkommen spezifischer Milchsäurebakterien Spezies bei Kindern mit Symptomen sein. Diese spezifischen Milchsäurebakterien könnten beispielsweise vermehrt D- Laktat produzieren und somit das Auftreten einer D- Laktat Azidose begünstigen.
In dieser Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob tatsächlich einzelne Milchsäurebakterien eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom spielen könnten.

Zunächst sollte dabei die Hypothese bestätigt werden, dass Patienten mit KDS häufiger Milchsäurebakterien im Stuhl haben als Kinder ohne KDS. Von Interesse war dabei auch, ob die flüssige Konsistenz des Stuhls, wie sie bei Kindern mit KDS fast ausschließlich vorkommt, das Vorkommen von Milchsäurebakterien in den Stuhlproben beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob Patienten mit KDS, die Symptome einer Encephalopathie zeigen, Bakterien im Stuhl haben, die besonders viel D-Laktat produzieren, und somit das Vorhandensein bestimmter Bakterien das Risiko der Entstehung einer D- Laktat Azidose erhöhen könnte.
Außerdem sollte erörtert werden, welche Rolle Probiotika beim Auftreten von D- Laktat Azidosen spielen.
Abschließend sollten alle gefundenen Faktoren kombiniert werden, um Risikoparameter zu evaluieren, die das Auftreten einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie im Kindesalter begünstigen können, um betroffene Kinder schneller identifizieren zu können.

Dazu wurden Stuhlproben von Kindern mit und ohne KDS gesammelt und durch einen Fragebogen sowie ggf. einem Telefoninterview das Auftreten von Symptomen einer D-Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie erörtert. Aus den Stuhlproben wurden mittels verschiedener Methoden die Milchsäurebakterien isoliert und identifiziert und anschließend auf ihre Fähigkeit D- und L- Laktat zu produzieren getestet. Die erhoben Ergebnisse wurden dann mit den Angaben im Fragebogen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Probanden

2.1.1 Literaturrecherche

Die bisher publizierte Literatur zum Thema D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom beschränkt sich auf einzelne Fallberichte und wenige Übersichtsartikel. Epidemiologische Daten zum Auftreten des Krankheitsbildes im Kindesalter sind dementsprechend kaum zu finden. Im Rahmen der Literaturrecherche für diese Arbeit wurden alle Fallberichte mit Kindern seit der Erstbeschreibung einer D- Laktat Azidose beim Menschen durch Oh et al. im Jahre 1979 gesammelt. Die Recherche wurde computerbasiert durch Sichtung aller publizierten Fälle durchgeführt, welche nach Eingabe der Schlagwörter "d-lactic acidosis" und "d-lactate encephalopathy in children“ von 1979 bis 2014 über das Suchfeld der Literaturplattform „PubMed“ gefunden werden konnten. Ergänzend wurden die in den Artikeln gefundenen Quellenangaben verwendet.
Eingeschlossen wurden nur Berichte in denen die Patienten das 18. Lebensjahr nicht überschritten hatten und bei denen es im Rahmen einer D- Laktat Azidose zum Auftreten neurologischer Symptome gekommen war.

2.1.2 Patienten mit Kurzdarmsyndrom und Kontrollgruppe in dieser Studie

Die zu untersuchenden Stuhlproben stammten von Patienten mit Kurzdarmsyndrom, welche sich im Rahmen eines Jahrestreffens des Elternvereins K.i.s.E e.V. zur Teilnahme an der Studie bereit erklärten. Den Patienten und ihren Familien wurden per Post drei Stuhlprobenröhrchen sowie ein Fragebogen zugesandt. Insgesamt wurden 93 Familien angeschrieben und die eingegangenen Proben wurden innerhalb eines Tages verarbeitet. Der Sammelzeitraum erstreckte sich von Juli bis Oktober 2010. In einem beiliegenden Anschreiben wurden die Probanden angewiesen, drei aufeinanderfolgende Stuhlproben zu sammeln. Die Proben sollten, bis zum Versand an unser Labor mit Hilfe beiliegender Rückumschläge, kühl gelagert werden. Im Fragebogen (siehe Anhang) sollten Angaben zur Person, zur Krankengeschichte, zu neurologischen Symptomen sowie zur Einnahme von Probiotika gemacht werden.
Die Stuhlproben der Kontrollgruppen stammten von Kindern mit Diarrhoe und von Kindern ohne gastrointestinale Symptomatik, welche zum Zeitpunkt der Probegewinnung als Patienten in der Kinderklinik des UKGM stationär aufgenommen

waren. Die Proben wurden nach der Abnahme kühl gelagert und innerhalb eines Tages verarbeitet. Der Sammelzeitraum erstreckte sich von Juli bis Oktober 2010.
Die Ethikkommission erteilte ein positives Votum bzgl. Versuchsplanung und Patienteneinschluss (AZ 192/09).

2.2 Chemikalien und Geräte

2.2.1 Chemikalien und Materialien

- Agarose: Roth
- API® 50 CH: bioMeriéux
- API® 50 CHL Medium: bioMeriéux
- Auftragspuffer: 1,25 g Ficoll in 7,5 ml Destilliertem H2O über Nacht lösen plus Spatelspitze Bromphenolblau
- Aqua dest.: Braun
- BioVison® D + L- Laktat Assay Kit
- DNA- Aufreinigung: QIAquick® PCR Purifikation Kit
- DHPLC-Puffer: Transgenomic
- EB Puffer : QIAquick® PCR Purifikation Kit
- Elutiontubes, Maxwell® 16 Tissue LEV Total Purification Kit, Promega
- Impfschlingen: Sarstedt
- Jogurt Drinks: Actimel® und Yakult®
- Küvetten: Sarstedt
- Lysis-Solution: Destilliertes H2O (44,5 ml), KOH 5 M (4 ml), EDTA 0,5 M (1 ml), DTT1 M (0,5 ml)
- Maxwell® Kit: 16 Tissue LEV Total Purification Kit, Promega
- McFarland Standard: Remel
- NaCl 0,9 %: Fresenius, Braun
- Neutralisationspuffer: 40 % 1 M HCl, 60 % M Tris / HCl
- Nuklease freies Wasser: Promega
- Paraffinöl, bioMeriéux
- Pasteur Kapillarpipetten, 150 mm: WU Mainz
- PB Puffer : QIAquick® PCR Purifikation Kit
- PCR-Puffer: Tris / HCl 1M (10 ml), MgCl2 1 M (1 ml), KCl 1 M (12,5 ml), 10 % Tween20 (2,5 ml), Gelatine (5 ml), destilliertes H2O (19 ml)
- Phusion™ Flash PCR Master Mix: Finnzymes
- Piko-PCR Mastermix: : 35 µl Phusion™ Flash PCR Master Mix, 3,5 µl Primer 933 F (10 pmol/µl), 35 µl Primer 1407 R (10 pmol/µl), 24,5 µl Nuklease freies Wasser

- Pipetten: Gilson und Biohit
- Pipettenspitzen mit Filter: Nerbe plus
- Prokaryonten Mastermix (Rezept für 50 • 95 µl): 500 µl PCR-Puffer , 200 µl d´NTP-Mix (1,25mM), 10 µl Primer 933 F (100 pmol/µl), 10 µl Primer 1407 R (100 pmol/µl), 15 µl Taq- Polymerase ,destilliertes H2O (4015 µl)
- Reaktionsgefäße: 1,5ml, 2ml Eppendorf und Sarstedt
- Röhrchen 50 ml: Greiner bio-one
- TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer), 10x: TRIS 108g, 20 ml 0,5M EDTA pH 8,3, 55g Borsäure, destilliertes H2O

2.2.2 Geräte

- Brutschrank: Steri-Cult 200, Forma Scientific
- DHPLC: Transgenomic 3500 HT Wave® DHPLC System inkl. Fragment Collector
- Digitale Gel-Dokumentation: Biorad Universal Hood II
- Kühlschrank +2°C: Bosch
- Maxwell® 16 MD:, Promega
- Mikrovolumen Spektralphotometer: NanoDrop 1000, Thermo Scientific
- Photometer: Gene Quant 1300, General Electric Company
- Piko® Thermal Cycler: Finnzymes
- Sicherheitswerkbank: HeraSafe, Heraeus Instruments
- Thermocycler: GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems®
- Tiefkühltruhen: -25°C: Sanyo¸ -80°C Heraeus
- Vitek® MS Gerät: bioMeriéux
- Vortexer: Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Waage: Kern 822
- Zentrifuge: Perfect spin 24, peqLab

2.3 Kulturmedien

- **Columbia-Agar mit 5% Schafblut,** BD: Anzuchtmedium für Mikroorganismen, Gram- positive Keime und andere Spezies aus klinischem Untersuchungsmaterial. Geeignet zur Beurteilung der Hämolyseformen. (Pankreatisch abgebautes Casein 12 g, Peptisch abgebautes Tiergewebe 5 g, Hefeextrakt 3 g, Rindfleischextrakt 3 g, Maisstärke 1g, Natriumchlorid 5 g, Agar 13,5 g, Defibriniertes Schafblut 5 %)

- **LBS,** BBL™/BD: LBS (*Lactobacillus* Selection) Agar und Broth werden zur selektiven Isolation und Anzucht bzw. Kultivierung von *Lactobacillus*- Spezies verwendet. (Pankreatisch abgebautes Casein 10 g, Natriumacetathydrat 25 g, Hefeextrakt 5 g, Essigsäure 1,3 mL, Kaliumdihydrogenphosphat 6 g, Magnesiumsulfat 0,575 g, Ammonium-Citrat 2 g, Mangansulfat 0,12 g, Glucose 20,0 Eisen(II)-sulfat 0,034, Polysorbat 80 1 g, pH 5,5 +/- 0,2)

- **MRS,** Difco™/BP: MRS Agar und MRS Broth werden zur Isolation, Anzucht und Kultivierung von Lactobacilli verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums basiert auf dem Rezept von deMan, Rogosa and Sharpe (Man et al., 1960) (Proteose- Pepton 10 g, Rinderextrakt 10 g, Hefeextrakt 5 g, Dextrose 20 g, Polysorbat 80 1 g, Ammoniumcitrat 2 g, Natriumacetat 5 g, Magnesiumsulfat 0,1g, Mangansulfat 0,05 g, Dikaliumphosphat 2 g, pH 6,5 +/- 0,2).

2.4 Datenverarbeitung, Hard- und Software

- Citavi 4.4: Swiss Academic Software
- Identifizierungssoftware apiweb™
- MegAlign: DNA-Star Lasergene
- Myla™-Software, bioMeriéux
- NCBI BLAST® (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
- Office XP: Microsoft
- Quantity One Version 4.6.3: Bio-Rad Laboratories
- SepsiTest™ BLAST (http://www.sepsitest-blast.de/de/index.html)
- SEQMan: DNA-Star Lasergene®

2.5 Methoden

2.5.1 Stuhlprobenverarbeitung

2.5.1.1 Vorbereitung für PCR/DHPLC- Analyse

Aus den zu untersuchenden Stuhlprobenröhrchen wurden zunächst mit einer sterilen 10 µl Impfschlinge 0,2 g Stuhlprobe entnommen und in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 2 ml sterilem 0,9% NaCl wurden die Proben zur Herstellung einer homogenen Suspension gut gemischt. Nach zehnminütiger Wartezeit, in denen sich die groben Bestandteile der Mischung absetzten sollten, wurden 50 µl Überstand aus der Probe entnommen und in ein neues steriles Gefäß mit

500 ml 0,9% NaCl gegeben. Dieser Ansatz wurde erneut gut gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung mittels Maxwell (siehe Kapitel 2.5.2.1) bei - 20 °C eingefroren.

2.5.1.2 Kulturelle Anzucht der Milchsäurebakterien

Den Stuhlprobenröhrchen wurde nach Abnahme von 0,2 g Stuhlprobe für die PCR/DHPLC- Analyse einige Tropfen steriles NaCl 0,9 % hinzugefügt und die entstandene Mischung gut gemischt. Anschließend wurde die Probe auf drei verschiedenen Nährböden (Blut-, LBS- und MRS- Agar) fraktioniert ausgestrichen und für zwei Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Herstellung von Reinkulturen erfolgte zunächst der erneute Ausstrich der Einzelkolonien auf MRS und wiederum die oben beschriebene Inkubation. Zur Isolation der Milchsäurebakterien aus den verwendeten Jogurt Drinks wurde nach gleichem Schema ein fraktionierter Ausstrich auf MRS hergestellt.

2.5.2 Identifikation der einzelnen Milchsäurebakterien

2.5.2.1 16S rDNA- Sequenzierung

2.5.2.1.1 Zelllyse

Zunächst wurden 50 µl autoklaviertes Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde mit Hilfe einer 1 µl Impföse eine Kolonie der zur untersuchenden Kultur von der Platte abgenommen und mit dem Wasser vermischt, bis eine deutliche Trübung zu erkennen war. Nach Zugabe von 50 µl Lysis Solution wurde die Probe gut gemischt und für 15 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Danach erfolgte das Abstoppen der Reaktion mittels Zugabe von 50 µl Neutralisationslösung. Nach Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 rpm wurden 5 µl aus dem oberen Drittel des Reaktionsgefäßes entnommen und für die anschließende PCR verwendet.

2.5.2.1.2 Polymerase- Ketten- Reaktion

Die mit Hilfe der Zelllyse gewonnene DNA sollte nun durch PCR amplifiziert werden. Dazu wurde der zuvor aufgeführte Prokaryonten Mastermix angefertigt (siehe Kapitel 2.2.1). Die verwendeten Primer 933 F (5´- GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G - 3´) und 1407 R (5´- GAC GGG CGG TGT GTA CAA G - 3´) bestehen aus kurzen Sequenzen, die an das 16S rRNS- Gen von Prokaryonten binden (Domann et al., 2003; Imirzalioglu et al., 2008). Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 474 bp. Die Amplifizierung und Sequenzierung der 16S rRNS Gen Sequenzen gilt als etabliertes

und standardisiertes Instrument zur Identifikation verschiedener Prokaryonten (Janda et al., 2007). Zu 95 µl Mastermix wurden 5 µl Probe gegeben und die Mixtur leicht gemischt. Zum Thermocycling wurde folgendes Protokoll genutzt: 94°C für 2 Minuten, dann 94°C für 40 Sekunden, 56°C für 40 Sekunden, 72°C für 1 Minute für 25 Zyklen, dann, 72 °C für 5 Minuten und bei 4 °C kühlen.

2.5.2.1.3 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Produkte diente die Durchführung einer Elektrophorese. Dazu wurde ein Agarose- Gel hergestellt. Zu 400 ml 1x TBE Puffer wurden 4 g Agarose- Pulver gegeben und in der Mikrowelle für 6 min. zum Kochen gebracht.
Die nun homogene Mischung wurde unter ständigem Schwenken in einem Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 30 µl EtBr hinzu pipettiert und sanft geschwenkt. Das noch flüssige Gel wurde dann in eine Kammer mit Gelkämmen gegossen und die endgültige Trocknung und Härtung erfolgte für ca. 40 min.
Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Nach dem Herauslösen der Kämme konnten in die Taschen jeweils 6 µl PCR- Produkt und 6 µl Auftragspuffer gegeben werden. Zum Längenabgleich wurde ein DNA Marker aufgetragen. Nach dem Anschließen der Kammer an ein Netzgerät (150 V, 225 mA, 100W) für eine Stunde erfolgte die Dokumentation des Ergebnisses mittels UV-Fotoapparat. Eine Bande zeigte ein positives Ergebnis an und das PCR-Produkt konnte für die Sequenzierung aufgereinigt werden.

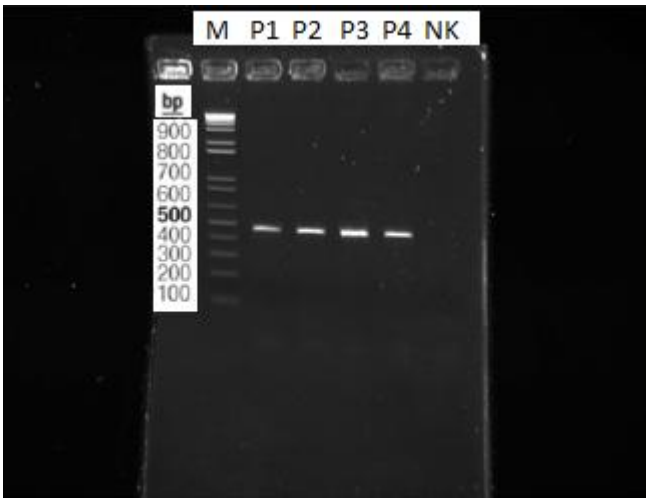


Abbildung 1: Gelelektrophorese: Agarose- Gel mit aufgetragenen PCR- Produkten und Negativ- Kontrolle nach 1 h Elektrophorese. M = Marker, P = Probe, NK = Negativ- Kontrolle, bp = base pairs.

2.5.2.1.4 DNA- Aufreinigung

Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purifikation Kit. Zu einem Volumen PCR Produkt wurden fünf Volumen PB Puffer gegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Eine Gelbfärbung des Gemisches zeigte den richtigen pH Wert an. Danach wurde die Probe auf eine QIAquick® Säule gegeben und bei 13.000 rpm für 60 Sekunden lang zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Bindung der DNA an die Säule. Der Durchfluss konnte verworfen werden. Zum Waschen wurde dann 0,75 ml PE Puffer auf die Säule gegeben und zweimalig bei 13.000 rpm 60 Sekunden lang zentrifugiert, wobei nach der ersten Zentrifugation der Durchfluss verworfen werden musste. Anschließend wurde die Säule auf eine neues steriles 1,5ml Reaktionsgefäß aufgesteckt und 30 µl Nuklease freies Wasser auf das Zentrum der Säulenmembran gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 60 Sekunden bei 13.000 rpm konnte die Säule verworfen werden und die nun aufgereinigte DNA zur Sequenzierung weiter vorbereitet werden.

2.5.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die AGOWA GmbH vorgenommen. Für ein bestmögliches Ergebnis sollte dazu ein Volumen von 10 µl mit einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl eingereicht werden. Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Mikrovolumen Spektralphotometer NanoDrop® 1000. Dazu wurden 1 µl Probe auf das Gerät aufgetragen. Der 260nm/280nm Quotient konnte als Reinheitsindex verwendet werden und sollte bei ~1.8 liegen. Bei zu hoher Konzentration wurde mit Nuklease freiem Wasser verdünnt. Den Proben wurden vor dem versenden zur Sequenzierung noch 4 µl des Primers 1407 R in einer Konzentration von 5 pmol/µl hinzugegeben.

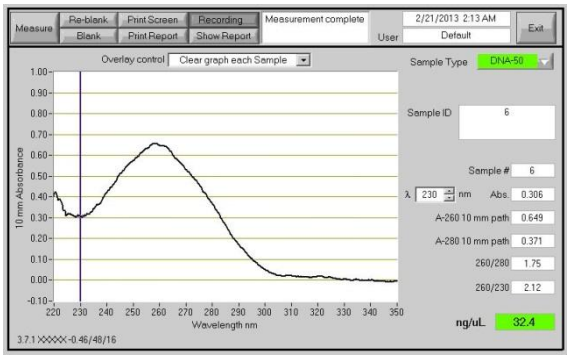


Abbildung 2: DNA- Konzentrationsbestimmung mit NanoDrop® Spektralphotometer: Gemessen wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der 260nm/280nm Quotient dient als Reinheitsindex; unten rechts grün hinterlegt die gemessene DNA- Konzentration in der getesteten Probe.

2.5.2.1.6 Bioinformatische Analyse

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden dem Institut per Email übermittelt und mit dem Programm DNA Star von Lasergene® verarbeitet. Die letztendliche Identifikation erfolgte dann durch Abgleich der ermittelten DNA- Sequenz mit bereits bekannten 16S rDNA- Sequenzen verschiedenster Prokaryonten durch die Internet-Datenbanken SepsiTest™ BLAST und NCBI BLAST®.

2.5.2.2 Biochemische Identifizierung

Milchsäurebakterien, die aufgrund einer zu großen Homologie der ermittelten 16S rDNA- Sequenz nicht eindeutig einer *Lactobacillus* Spezies zugeordnet werden konnten, wurden biochemisch mittels des API® 50 CH Testverfahrens identifiziert. Das Kit besteht aus 50 Mikroröhrchen zur Prüfung des Kohlenhydratstoffwechsels von Mikroorganismen. Durch Farbänderung während der Inkubation wird die Fermentation der Kohlenhydrate angezeigt. Die Testdurchführung wurde nach Anleitung des Kits durchgeführt: Zunächst wurde die komplette Reinkultur von der Anzuchtplatte (MRS) genommen und in einem Reagenzglas mit 2 ml Aqua dest. eine dichte Suspension hergestellt. Aus dieser Suspension wurden einige Tropfen in ein zweites Reagenzglas gefüllt mit 5 ml Aqua dest. titriert, bis die Trübung dem McFarland 2 Standard entsprach. Die benötigte Tropfenanzahl wurde notiert. Anschließend wurde das Doppelte der notierten Tropfenzahl in eine Ampulle API® 50 CHL Medium überführt. Das auf diese Weise beimpfte Medium wurde dann sofort verwendet und in die Röhrchen des API® 50 CH Kits pipettiert. Die Kammer des Kits wurde zuvor mit 10 ml Aqua dest. befeuchtet. Abschließend wurden die Röhrchen mit Paraffinöl überschichtet und für 48 h bei 37°C inkubiert. Ein Farbumschlag nach Gelb bzw. Schwarz zeigte eine Säurebildung an. Dem so entstanden biochemischen Profil konnte dann mit Hilfe der Identifizierungssoftware apiweb™ eine bestimmte *Lactobacillus* Spezies zugeordnet werden.

Abbildung 3:Biochemische Identifizierung mittels API® CH 50 : Mikroröhrchen des API® CH 50 Kits gefüllt mit beimpftem API® 50 CHE Medium und mit Paraffinöl überschichtet: links vor Inkubation, rechts nach 48 h Inkubation. Die ins Gelbe bzw. Schwarze umgeschlagenen Mikroröhrchen zeigen eine Säurebildung an.

2.5.2.3 Massenspektrometrische Identifizierung

Als weiteres Verfahren zur Identifizierung der isolierten Milchsäurebakterien wurde die MALDI-TOF-MS eingesetzt. Dabei werden die ribosomalen Proteine der Bakterienkultur zusammen mit einer Matrix nach Beschuss mit einem Laser desorbiert, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt. In einem Flugrohr trennen sie sich entsprechend ihrer Ladung und Masse auf und spezifische Massenspektren werden erzeugt (Schubert et al., 2010).

Bei der Durchführung wurde mit einer 1 µl Impfschlinge eine kleine Menge der zu identifizierenden Reinkultur auf einen Spot einer 3x16 Felder Targetplatte aufgebracht und anschließend mit 1 µl Matrix überschichtet. Als Standard wurde in die Mitte 16er Feldes der Targetplatte eine Escherichia coli Kultur aufgetragen. Die Platte wurde sodann ins Vitek® MS Gerät eingeführt. Dort wurde in einem Hochvakuum das Massenspektrum erstellt, welches später mit Hilfe der Myla™-Software mit Referenz-spektren verschiedener Bakterien verglichen wurde und durch Abgleich mit der internen Datenbank zu Identifizierung führte.

2.5.3 Untersuchung auf dominante Keime

2.5.3.1 DNA- Extraktion mittels Maxwell®

Die DNA- Extraktion aus den Stuhlproben der Patienten wurde durch das Maxwell® 16 MDx Aufreinigungssystem zur automatischen DNA- Isolierung vorgenommen. Das System besteht aus dem Maxwell® 16 MDx Gerät mit passendem Rack sowie einem Kit mit Kartuschen, Elutiontubes und Stößeln.

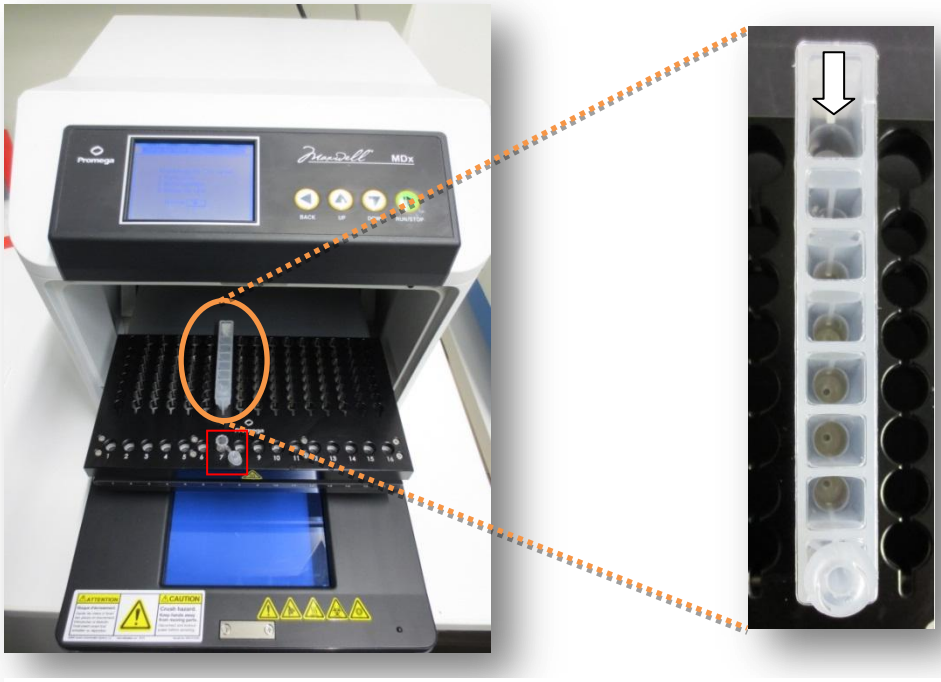


Abbildung 4: Maxwell® 16 MDx Aufreinigungsystem: Rechts ist die Kartusche zu sehen. In die erste Vertiefung (Pfeil) wird die Probe gegeben, in der achten Vertiefung ist der Stößel zu erkennen. Links die ins Rack des Maxwell® 16 MDx Aufreinigungsystem eingesetzte Kartusche. Davor ist das Elutiontube (Promega) zu sehen (roter Kasten).

Die zu untersuchenden Stuhlproben wurden zuvor abgemessen und mit 0,9 % NaCl vermischt (siehe Kapitel 2.5.1.1). Aus diesem Ansatz wurden dann 200 µl in die erste Vertiefung einer Kartusche des Maxwell® Kits gegeben. Als nächstes wurden die Elutiontubes des Kits in die dafür vorgesehen Versenkung im Rack gesteckt und 100 µl Nuklease freies Wasser hinein gegeben. Bevor das Gerät gestartet werden konnte, wurden noch Stößel in die achte Vertiefung der Kartusche gesteckt. Durch Lysierung und mehrmaliges Waschen wurde die DNA nun automatisch von dem Gerät extrahiert und in das vorbereitete Elutiontube gegeben. Am Ende wurden der extrahierten DNA noch 400 µl Nuklease freies Wasser hinzugegeben und die Probe bis zu weiteren Verarbeitung kühl gelagert bzw. bei – 30°C eingefroren.

2.5.3.2 PCR mittels Piko® Thermal Cycler

Die Amplifizierung der aus den Stuhlproben extrahieren DNA wurde mit dem Piko® Thermal Cycler durchgeführt. Mit Hilfe dieses Thermal Cyclers können auch kleinste Mengen DNA in sehr kurzer Zeit vervielfältigt werden.
Dem oben erwähnten Piko-PCR Mastermix (siehe Kapitel 2.2.1) wurden jeweils 3,5 µl Probe hinzugeben. Zum Thermocycling wurde dabei folgendes Protokoll genutzt:
98°C für 10 Sekunden, 68°C für 5 Sekunden, 72°C für 10 Sekunden und bei 4 °C kühlen. Die amplifizierten DNA Proben wurden dann bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C eingefroren.

2.5.3.3 PCR/DHPLC- Analyse mittels WAVE®

Die amplifizierte DNA aus den Stuhlproben der Patienten mit KDS wurde dann mit dem WAVE® System weiter analysiert. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Bakteriengemische aufzutrennen und charakteristische Peakprofile ihrer DNA zu erstellen. Gezeigt wurde dies in Untersuchungen an Urinproben (Domann et al., 2003; Imirzalioglu et al., 2008), Stuhlproben (Skraban et al., 2013; Rougé et al., 2010) sowie Schlamm, Kompost und Erde (Wagner et al., 2009). Ausgangsmaterial für diese Untersuchung waren die PCR Produkte, welche mittels Maxwell und Piko Cycler aus den Stuhlproben der Patienten und Kontrollgruppen erstellt wurden (siehe Kapitel 2.5.3.1 und 2.5.3.2). Dabei wurden jeweils 15µl des PCR Produktes in eine 96- well-Platte pipettiert und der Durchlauf gestartet. Nach einer Equiliebriungsphase wird die DNA auf eine Chromatographiesäule gegeben und anschließend eluiert. Die einzelnen DNA- Stücke binden dann, mit Hilfe von Temperaturveränderungen und der Verwendung spezieller Puffer, aufgrund ihrer unterschiedlichen Basensequenzen und damit verbundenen Unterschieden in GC- Gehalt und Ladung, mit unterschiedlicher Affinität an die Säule.
Durch Messung der UV- Absorption im zeitlichen Verlauf entstehen dabei basensequenzspezifische Peaks, die in einem Schaubild, mit UV-
Absorption als y- Achse und Zeit als x- Achse, dargestellt werden können. Je nach Bakteriengehalt der einzelnen Proben entstehen so unterschiedliche Profile.

2.5.4 D- + L- Laktatbestimmung

2.5.4.1 Versuchsaufbau

Die aus den Stuhlproben isolierten und identifizierten Michsäurebakterien (siehe Kapitel 2.5.1 + 2.5.2) wurden als Reinkulturen zunächst auf MRS- Agar Platten ausgestrichen und für mindestens 48h in einem 5%- CO_2- Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde je eine Kolonie der Kultur in ein Reagenzglas mit 10 ml MRS-Flüssigmedium gegeben und verschlossen. Diese wurden dann über mehrere Tage ebenfalls in einem 5%- CO_2- Brutschrank inkubiert. Im Verlauf wurde mittels eines Photometers die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt und somit eine Wachstumskurve der einzelnen Bakterien erstellt. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurden, nach kurzer Zentrifugation, 1 ml der Probe asserviert und bis zur Bestimmung der darin enthalten Laktatkonzentration bei - 80 °C eingefroren. Um eine weitere Laktatproduktion zu vermeiden wurden vorher die Zellbestandteile für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand entnommen.

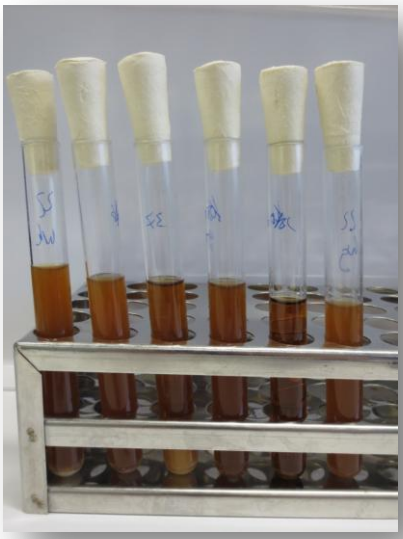


Abbildung 5: Reagenzgläser mit MRS- Flüssigmedium: In die mit MRS- Flüssigmedium gefüllten Reagenzgläser wurde je eine Kolonie der verschiedenen Milchsäurebakterien gegeben und im Brutschrank inkubiert. Am Boden der Reagenzgläser sind gewachsene Bakterienrasen zu erkennen.

2.5.4.2 D- + L- Laktat Enzym- Assays

Die Bestimmung der D- und L- Laktatkonzentration wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie , Molekulare Diagnostik, durch Frau Dr. Giffhorn- Katz durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Literaturrecherche

Autor, Jahr	Alter (Jahren),Geschlecht	Grunderkrankung	Bakterium
Schoorel et al, 1980	3 J, männlich	Mesenterialinfarkt	-
Satohet al., 1982	2 9/12, weiblich	Volvulus	*Lactobacillus buchneri*
	5 9/12, männlich	Volvulus	*Lactobacillus fermentum*
Perlmutter et al., 1983	5, männlich	Malrotation/Volvulus	*Lactobacillus acidophilus*
	1 6/12, männlich	Volvulus	
Rosenthal et al., 1985	2 6/12, männlich	Volvulus	-
Haan et al., 1985	8, männlich	Volvulus	*Lactobacillus rhamnosus*
Scully et al., 1989	16, männlich	Resektion nach Trauma	-
Mayne et al., 1990	9, weiblich	Volvulus	*Lactobacillus fermentum* *Lactobacillus acidophilus*
Gurevitch, et al., 1993	1 8/12, männlich	Malrotation/Volvulus	-
Koletzko et al., 1994	9, männlich	Volvulus	-
Bongaerts G et al.,1995	1, weiblich	Keine Angaben	*Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus fermentum*
	3, weiblich	Keine Angaben	*Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus fermentum*
Kaneko et al., 1997	5, männlich	Volvulus	*Lactobacillus delbrueckii*
Day et al., 1999	5, männlich	Gastroschisis	*Lactobacillus acidophilus*
Godey et al.2000	2 9/12, weiblich	Volvulus	-
Zhang et al., 2003	12, männlich	Volvulus	-
Soler et al., 2003	11, männlich	Nekrotisierende Enterocolitis	-
Puwanant et al., 2005	14, männlich	Volvulus	-
Ku et al., 2006	5, männlich	Volvulus	*Lactobacillus acidophilus*
Dahhak et al., 2008	6, unbekannt	Gastroschisis	*Lactobacillus fermentum*
Munakata et al. 2010	5, weiblich	Jejunoileale Atresie	*Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus acidophilus*

Tabelle 1: Übersicht über Fallberichte zum Thema D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie bei Kindern mit KDS: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Fallberichte bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom und D-Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie. Angegeben sind Autor und Jahr sowie das Alter der Patienten, das Geschlecht, die Grunderkrankung und das mit der Laktat- Azidose in Verbindung gebrachte Milchsäurebakterium.

Im Rahmen der Literaturrecherche für diese Arbeit wurden 19 Fallberichte mit 22 Kindern mit D-Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie gefunden. Der Zeitraum erstreckt sich von der Erstbeschreibung einer D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie beim Menschen im Jahre 1979 (Oh et al., 1979) bis 2013 (siehe Tabelle 1).

Das Durchschnittsalter der Kinder lag in der bisherigen Literatur bei 6,1 Jahren.

Das Geschlechterverhältnis belief sich bei 15 Jungen und 6 Mädchen, sowie einen Patienten ohne Angabe, auf 2,5:1.

Alter	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Literatur	22	1	16	6,1	5

Tabelle 2: Altersverteilung in den Fallberichten: Verteilung der Patienten mit D-Laktat- Azidose assoziierter Encephalopathie aus den in dieser Arbeit verwendeten Fallberichten nach Alter in Jahren.

Geschlecht	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
Weiblich	6	27,3 %
Männlich	15	68,2 %
Unbekannt	1	4,5 %
Gesamt	22	100 %

Tabelle 3: Geschlechtsverteilung in den Fallberichten: Verteilung der Patienten mit D- Laktat- Azidose assoziierter Encephalopathie aus den in dieser Arbeit verwendeten Fallberichten nach Geschlecht mit absoluter und relativer Häufigkeit.

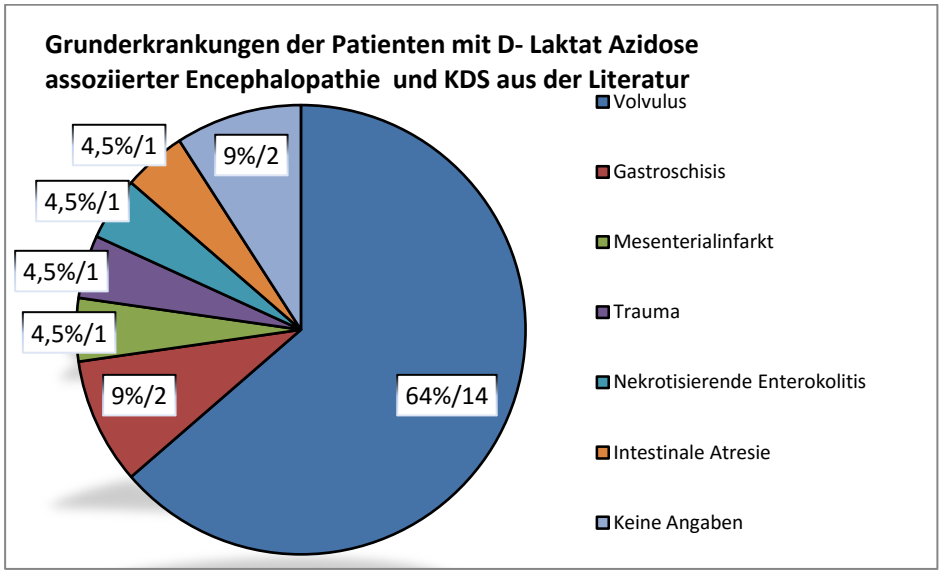


Abbildung 6: Grunderkrankungen der Patienten mit D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie und KDS aus der Literatur. Dargestellt sind die relative und absolute Häufigkeit der einzelnen Grunderkrankungen.

Die häufigste Grunderkrankung war ein Volvulus mit 64%, gefolgt von einer Gastroschisis (9 %). Je einmal vertreten waren ein Mesenterialinfarkt, eine

ausgedehnte Resektion nach Trauma, eine nekrotisierende Enterocolitis sowie eine intestinalen Atresie. In zwei Fällen wurde keine Angabe zur Grunderkrankung gemacht. Bei zwölf Fällen wurde Angaben zur gefundenen *Lactobacillus*- Spezies gemacht. Dabei wurde *Lactobacillus acidophilus* siebenmal und *Lactobacillus fermentum* fünfmal beschrieben. *Lactobacillus delbrueckii* wurde zweimal erwähnt. Je einmal wurden *Lactobacillus buchneri und Lactobacillus rhamnosus* aus den Stuhlproben isoliert.

3.2 Patienten und Probanden dieser Studie

Von den 93 angeschrieben Familien der Patienten mit Kurzdarmsyndrom beteiligten sich 18 Patienten durch ausgefüllte Fragebögen sowie der Einsendung dreier Stuhlproben an dieser Studie. Eine Patientin wurde aufgrund fehlender Angaben zum Vorliegen eines KDS und der Grunderkrankung einer Trisomie 11 und damit verbundenen Schwierigkeiten in der Verwertung neurologischer Auffälligkeiten von der Studie ausgeschlossen.
Das Durchschnittsalter der in die Studie aufgenommener Patienten betrug 11,5 Jahre. Das Geschlechterverhältnis belief sich bei zwölf Jungen und fünf Mädchen auf 2,4:1.

Alter	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
KDS	17	2	29	11,5	14

Tabelle 4: Altersverteilung der Patienten mit KDS in dieser Studie: Verteilung der Patienten mit KDS nach Alter in Jahren.

Geschlecht	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
Weiblich	5	29,4 %
Männlich	12	70,6 %
Gesamt	17	100 %

Tabelle 5: Geschlechtsverteilung der Patienten mit KDS in dieser Studie: Verteilung der Patienten mit KDS nach Geschlecht mit absoluter und relativer Häufigkeit.

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 69 Probanden, wobei 26 Stuhlproben von Kindern ohne gastrointestinale Symptome (Gruppe G) und 43 Stuhlproben von Kindern mit Diarrhoe (Gruppe DIA) gesammelt wurden. Dabei betrug das Durchschnittsalter der Gruppe DIA 7,5 Jahre und das Durchschnittsalter der Gruppe G 6,5 Jahre. In der gesamten Kontrollgruppe (KG) lag das Durchschnittsalter bei 7,2 Jahren. Der Median lag in allen Gruppen bei 6 Jahren.

Alter	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
DIA	43	0	19	7,5	6
G	26	1	19	6,5	6
KG	69	0	19	7,2	6

Tabelle 6: Altersverteilung der Patienten in der Kontrollgruppe: Verteilung der beiden Kontrollgruppen mit Kinder ohne gastrointestinale (G) und mit gastrointestinaler Symptomatik (DIA) nach Alter in Jahren sowie kombiniert als Kontrollgruppe- Gesamt (KG)

Das Geschlechterverhältnis belief sich in der Gruppe DIA bei 26 Jungen und 17 Mädchen auf 1,5:1, in der Gruppe G bei 11 Jungen und 15 Mädchen auf 1,4:1.
Das Geschlechtsverhältnis beider Kontrollgruppen zusammen betrug 1,2:1.

Geschlecht	Absolute Häufigkeit			Relative Häufigkeit		
	DIA	G	KG	DIA	G	KG
Weiblich	17	15	32	39,5 %	57,7%	46,4%
Männlich	26	11	37	60,5 %	42,3%	53,6%
Gesamt	43	26	69	100 %	100%	100%

Tabelle 7: Geschlechtsverteilung in den Kontrollgruppen: Verteilung beider Kontrollgruppen nach Geschlecht mit absoluter und relativer Häufigkeit eingeteilt in die Gruppe mit gastrointestinaler Symptomatik (DIA), ohne gastrointestinaler Symptomatik (G) und kombiniert (KG).

3.3 Auswertung des Fragebogens

Die zugeschickten Fragebögen wurden von den Eltern der Patienten nach bestem Wissen ausgefüllt und zusammen mit den Stuhlproben an uns zurückgesandt. Neben Angaben zur Person und zur Krankengeschichte sollten Angaben zu neurologischen Symptomen, wie sie im Rahmen einer D-Laktat Azidose vorkommen können, gemacht werden (ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit, Sprachstörungen, Störungen der Bewegungskoordination, sonstige Verhaltensauffälligkeiten). Außerdem sollten Angaben zum zeitlichen Auftreten der Symptome sowie zur Einnahme von Probiotika gemacht werden (siehe Tabelle 5).

N	A	G	Grunderkrankung	Neurologische Auffälligkeiten zum Abnahmezeitpunkt	Frühere Laktat Azidosen/ Zeitraum/ Symptome	Angegebene Medikation/ Probiotika
1	14	w	Vesico- intestinale Fissur	Nein	Nein	Rez. Antibiotika, 3 x tgl 3 Tbl. Nephrotrans (Natriumhydrogencarbonat)
2	14	m	Aganglionose	Nein	Nein	Nein
3	15	w	Omphalozele	Nein	Nein	Nein
4	16	m	Volvulus	Nein	Nein	Nein
5	12	m	Nekrotisierende Enterocolitis	Nein	Nein	3 x Monat No-Name Probiotika
6	10	m	Aganglionose	Nein	Nein	Nein
7	14	m	Volvulus	Nein	Einmalige Episode/ 2002, Ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit, Sprachstörung: wirkte wie stark alkoholisiert, Störung der Bewegungskoordination	20 ml Natriumbicarbonat p.o. alle 2 Tage
8	14	w	Gastroschisis	Nein	Nein	Nein
9	14	m	Dünndarmatresie	Nein	Einmalige Episode 01/04 Ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit, Sprachstörung: lallende Sprache, Störung der Bewegungskoordination: torkliger Gang, konnte ohne Hilfe nicht laufen	2x Woche Actimel (L. Casei Danone®)
10	22	w	Neuronale intestinale Dysplasie Typ B	Nein	Nein	3- 4x Woche Activia (Bifidus Kultur ActiRegularis®)
11	29	m	Volvulus	Nein	Zweimalige Episoden, jeweils nach 1- 2 Wochen ohne parenterale Ernährung, Ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit, Sprachstörung: lallende Sprache, Störung der Bewegungskoordination: torkliger Gang, wie Bertrunken	Nein
12	9	w	Aganglionose	Nein	Nein	Nein
13	17	m	Aganglionose	Nein	Nein	Nein
14	7	m	Volvulus	Nein	Ja (2004, 2009), Schwindel, Gangunsicherheit, sehr undeutliche Sprache, starke Müdigkeit/Schläfrigkeit	3 Kps LGG pro Tag (*Lactobacillus rhamnosus GG*)
15	2	m	Volvulus	**Ja:** Ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit,Störung der Bewegungskoordination: torkliger Gang	Ja (12/09, 01/10)	Nein
16	5	m	Omphalozele	Nein	Nein	2 x 1 Btl. LGG Infectodiarrstop (*Lactobacillus rhamnosus GG*)
17	4	m	Volvulus nach Malrotation	**Ja:** Ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit, Sprachstörung, Störung der Bewegungskoordination	Nein	Mutaflor (E. coli Nissle)

Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Fragebögen: Liste der KDS-Patienten mit Alter (A), Geschlecht (G), Grunderkrankung, neurologischen Auffälligkeiten vor und während der Studie sowie Angaben zur Probiotika- bzw. Medikamenten- Einnahme. w =weiblich, m = männlich, N = Zugeordnete Patientennummer.

3.3.1 Grunderkrankung der Patienten mit KDS

Alle 17 Patienten mussten sich aufgrund ihrer Grunderkrankung bereits im Neugeborenenalter einer großen Darmoperation unterziehen aus welcher ein Kurzdarmsyndrom resultierte. Die häufigste Grunderkrankung war dabei ein Volvulus (35,3 %), gefolgt von der Aganglionose (23,5%). An dritter Stelle Stand mit zweimaligen Auftreten die Omphalozele (11,8%). Jeweils einmalig war eine Gastrochisis, eine nekrotisierende Enterocolitis, eine intestinale neuronale Dysplasie Typ B, eine Dünndarmatresie sowie eine Vesico- intestinale Fissur Ursache eines Kurzdarmsyndroms.

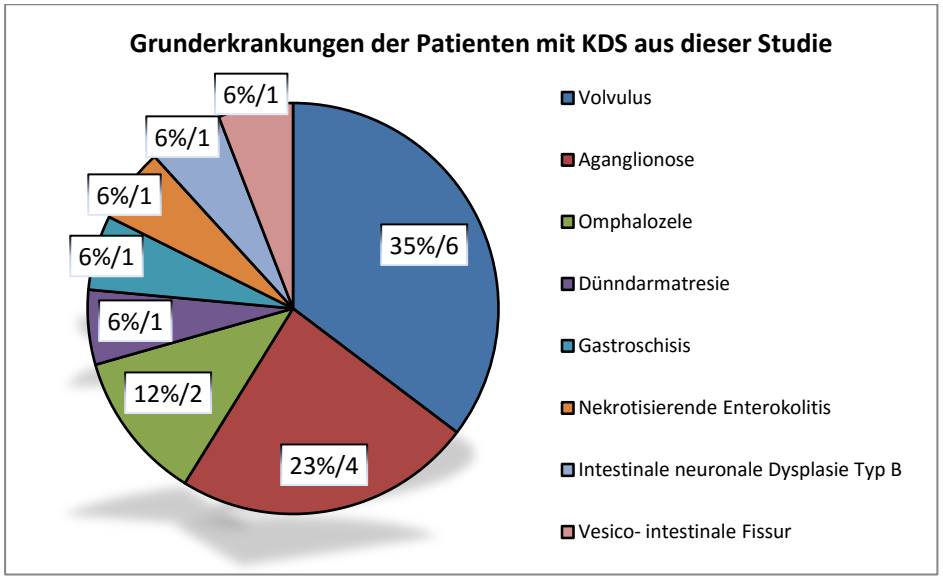


Abbildung 7: Grunderkrankungen der Patienten mit KDS aus dieser Studie: Verteilung der Grunderkrankung der an der Studie beteiligten Patienten mit KDS mit relativer und absoluter Häufigkeit.

3.3.2 Angaben zu neurologischen Auffälligkeiten

Insgesamt gaben sechs der 17 Patienten an, zum Zeitpunkt der Stuhlprobeentnahme oder früher an neurologischen Symptomen gelitten zu haben (35,3%). Von diesen sechs Patienten zeigten zwei Patienten während der Abnahme der Stuhlproben neurologische Symptome, die mit einer D- Laktat Azidose einher gehen können. Einer dieser Patienten hatte bereits früher zweimalige Episoden mit D- Laktat Azidosen, wobei er ähnliche Symptome zeigte. Beim zweiten Patient traten diese Symptome erstmalig auf. Die Eltern beider Patienten bestätigten die Angaben der neurologischen Symptomatik während der Stuhlprobenabnahme im Rahmen eines Telefonates.

Bei elf Patienten wurde das Auftreten von Symptomen verneint (64,7%).

Vier Patienten zeigten in der Vergangenheit Symptome eine D-Laktat Azidose jedoch nicht zum Studienzeitpunkt. Einer der Patienten hatte dabei rezidivierende Symptome

nach 1 – 2 Wochen ohne parenteraler Ernährung. Ein Patient zeigte in den Jahren 2004 und 2009 neurologische Auffälligkeiten. Die anderen beiden Patienten hatten nur eine Episode in den Jahren 2004 bzw. 2002.

3.3.3 Angaben zu Probiotika- Einnahme bzw. zu weiterer Medikation

8 der 17 Patienten machten Angaben zur Einnahme von Probiotika bzw. anderen Medikamenten, die die Darmmikrobiota beeinflussen könnten. Dabei wurden dreimal Produkte angeben, die sicher Milchsäurebakterien als probiotische Kultur beinhalten. Zweimal handelt es sich dabei um *Lactobacillus rhamnosus GG* und einmal um *Lactobacillus casei* Danone®. Einmal wurde ein No-Name Produkt angegeben, bei dem die Bakterienkultur nicht zu ermitteln war. Ein angegebenes Produkt beinhaltete die Bifidus Kultur ActiRegularis®, ein *Bifidobakterium*. Ein weiteres probiotisches Produkt enthielt *E. coli* Nissle.
Zweimalig wurde zudem Natriumbicarbonat als regelmäßig eingenommenes Medikament angegeben, wobei einer dieser Patienten zudem rezidivierend Antibiotika einnehmen würde. Neunmal wurde die regelmäßige Einnahme von Probiotika verneint.

3.4 Vorkommen von Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen

3.4.1 Patienten mit KDS

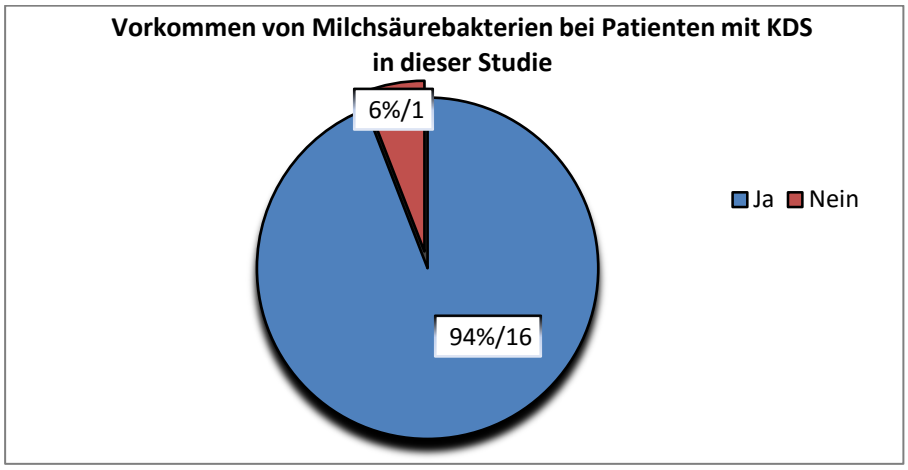


Abbildung 8: Vorkommen von Milchsäurebakterien bei Patienten mit KDS in dieser Studie mit relativer und absoluter Häufigkeit.

Von jedem der 17 Patienten wurden jeweils drei Stuhlproben bearbeitet, sodass insgesamt 51 Stuhlproben auf das Vorkommen von Milchsäurebakterien untersucht wurden. Dabei konnten bei 16 Patienten Milchsäurebakterien nachgewiesen werden (94%). Nur bei einem Patient (N1) wurden keine Milchsäurebakterien im Stuhl gefunden.

3.4.2 Kontrollgruppen

In der Gruppe der Kinder ohne gastrointestinale Symptomatik (Gruppe G) konnten bei 16 Probanden Milchsäurebakterien nachgewiesen werden (62%). Bei zehn Kindern kam es zu keinem Wachstum von Milchsäurebakterien in den Stuhlausstrichen auf den MRS- Agarplatten (38%). Sechs dieser Proben stammten dabei von männlichen Teilnehmern.
In der Gruppe der Kinder mit Diarrhoe (Gruppe DIA) wuchsen bei 30 Probanden Milchsäurebakterien (70%), in 13 Proben konnten keine Milchsäurebakterien nachgewiesen werden (30%). Davon stammten zehn Stuhlproben von männlichen Teilnehmern.
Das Geschlechtsverhältnis belief sich demnach in der Gruppe der Milchsäurebakterien-freien Proben auf 2,3:1

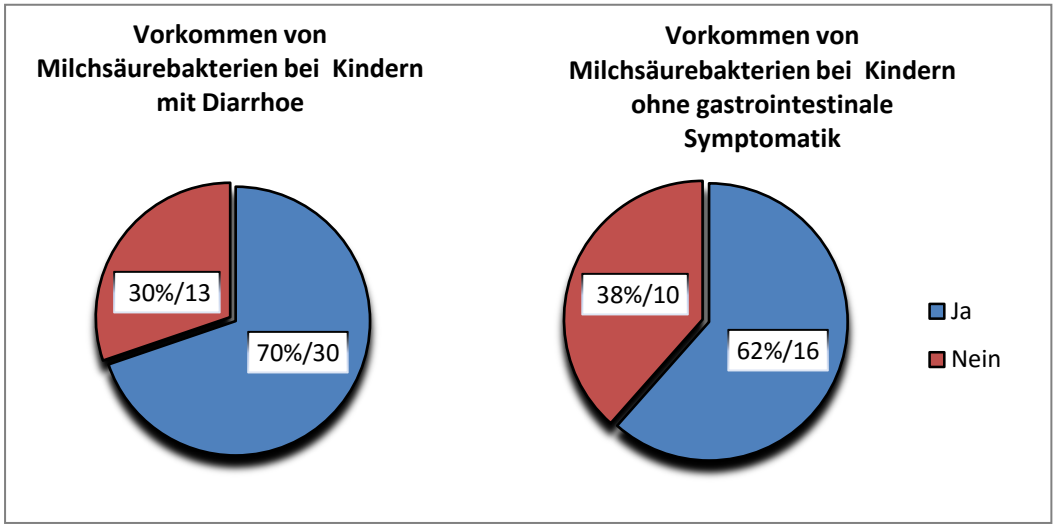


Abbildung 9: Vorkommen von Milchsäurebakterien bei Kindern mit Diarrhoe und ohne gastrointestinale Symptomatik mit relativer und absoluter Häufigkeit.

Fasst man beide Gruppen in eine große Kontrollgruppe mit Stuhlproben von Kindern ohne KDS zusammen (Gruppe KG), ergibt sich bei insgesamt 69 Proben eine relative Häufigkeit von 33 % Milchsäurebakterien- freien Proben.

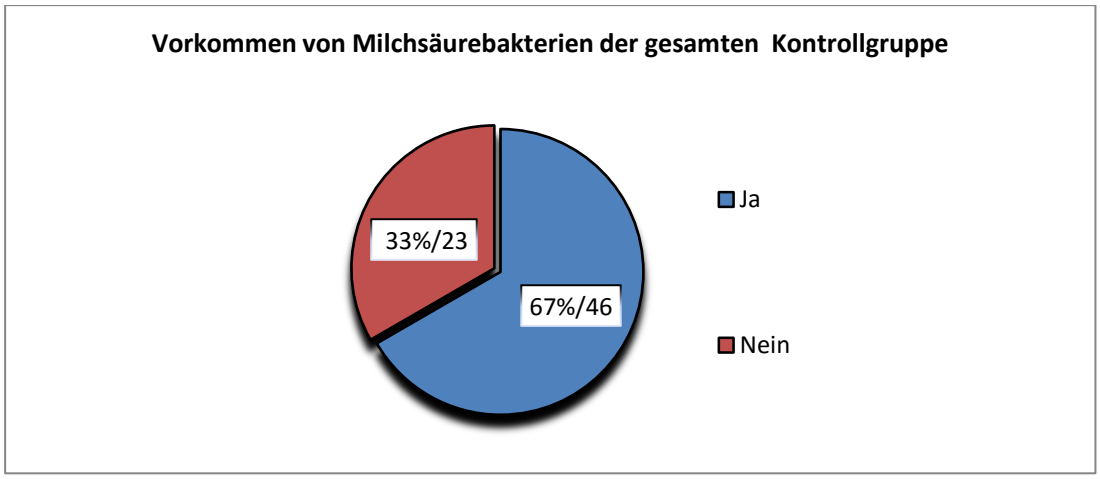


Abbildung 10: Vorkommen von Milchsäurebakterien der gesamten Kontrollgruppe mit relativer und absoluter Häufigkeit.

3.5 Anzahl identifizierter Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen

3.5.1 Patienten mit KDS

In den 51 Stuhlproben der Patienten mit KDS wurden insgesamt 21 verschiedene Milchsäurebakterien identifiziert, davon 20 verschiedene *Lactobacillus*- Spezies sowie einmal *Pediococcus acidilactici*. Im Durchschnitt wurden 3,3 verschiedene Michsäurebakterienarten pro Patient gefunden, der Median betrug drei. Bei einem Patienten konnten keine Milchsäurebakterien gefunden werden. Ebenfalls bei einem weiteren Patienten nur eine Spezies. Vier Patienten hatten zwei verschiedene und weitere vier hatten drei verschiedene Spezies im Stuhl. Bei drei Patienten wurden vier, bei zwei weiteren fünf verschiedene Spezies nachgewiesen. Zwei Patienten hatten als Höchstwert sechs verschiedene Milchsäurebakterienarten im Stuhl.

3.5.2 Kontrollgruppen

In den 26 Proben der Gruppe der gesunden Kinder (Gruppe G) wurden zwölf verschiedene Milchsäurebakterien identifiziert, davon zehn verschiedene *Lactobacillus*-Spezies sowie zwei *Pediococcus*- Spezies. Im Durchschnitt wurden 1,4 verschiedene Michsäurebakterienspezies pro Patient gefunden, der Median betrug eins. Bei insgesamt zehn Kindern konnten keine Milchsäurebakterien gefunden werden. Bei neun Kindern wurde nur eine Spezies gefunden. Sieben Patienten hatten zwei verschiedene Spezies im Stuhl.

In den 43 Proben der Gruppe der Kinder mit Diarrhoe (Gruppe DIA) wurden elf verschiedene Milchsäurebakterien identifiziert, davon neun verschiedene *Lactobacillus*-

Spezies sowie zwei *Pediococcus*- Spezies. Im Durchschnitt wurden 1,6 verschiedene Michsäurebakterienspezies pro Patient gefunden, der Median betrug eins. Bei insgesamt 13 Kindern konnten keine Milchsäurebakterien gefunden werden. Bei 16 Kindern wurde eine Spezies gefunden. Zwölf Patienten hatten zwei verschiedene Spezies im Stuhl. Bei einem Patienten wurden drei, bei einem weiteren vier verschiedene Milchsäurebakterienspezies gefunden.
Kombiniert man beide Kontrollgruppen in eine Gruppe von 69 Patienten ohne KDS (Gruppe KG), so zeigen sich in den 46 Milchsäurebakterien- positiven Proben im Mittel 1,5 verschieden Arten.

	N	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
KDS	17	16	1	6	3,3	3
DIA	43	30	1	4	1,6	1
G	26	16	1	2	1,4	1
KG	69	46	1	4	1,5	1

Tabelle 9: Anzahl identifizierter Milchsäurebakterien in den Stuhlproben: Anzahl Milchsäurebakterien-positiver Stuhlproben der Kinder mit KDS und den beiden Kontrollgruppen mit flüssigem Stuhlgang (DIA) und normalen Stuhlgang (G) sowie kombiniert als Kontrollgruppe (KG). Angegeben sind zudem minimale und maximale Anzahl.

3.6 Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien in den Stuhlkulturen

3.6.1 Patienten mit KDS

Bei den 17 an der Studie teilnehmenden Patienten mit KDS wurden insgesamt 21 verschiedene Michsäurebakterien gefunden. Am häufigsten wurde *Lactobacillus kitasatonis* nachgewiesen. Dieser konnte bei neun der 17 Patienten festgestellt werden. Am zweithäufigsten wurde *Lactobacillus mucosae* ermittelt. Bei sieben Patienten war dieser Keim im Stuhl zu finden. Bei vier Patienten wurde *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus rhamnosus* nachgewiesen. Die Bakterien *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* und *Lactobacillus reuteri* wurden bei jeweils drei Patienten identifiziert. Bei je zwei Patienten wurden *Lactobacillus oris/antri*, und *Lactobacillus salivarius* und *Pediococcus acidilactici* nachgewiesen. Nur je ein Patient hatte einer der folgenden Milchsäurebakterien im Stuhl: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus pentosus, Lactobacillus gasseri* und *Lactobacillus pontis/panis*.

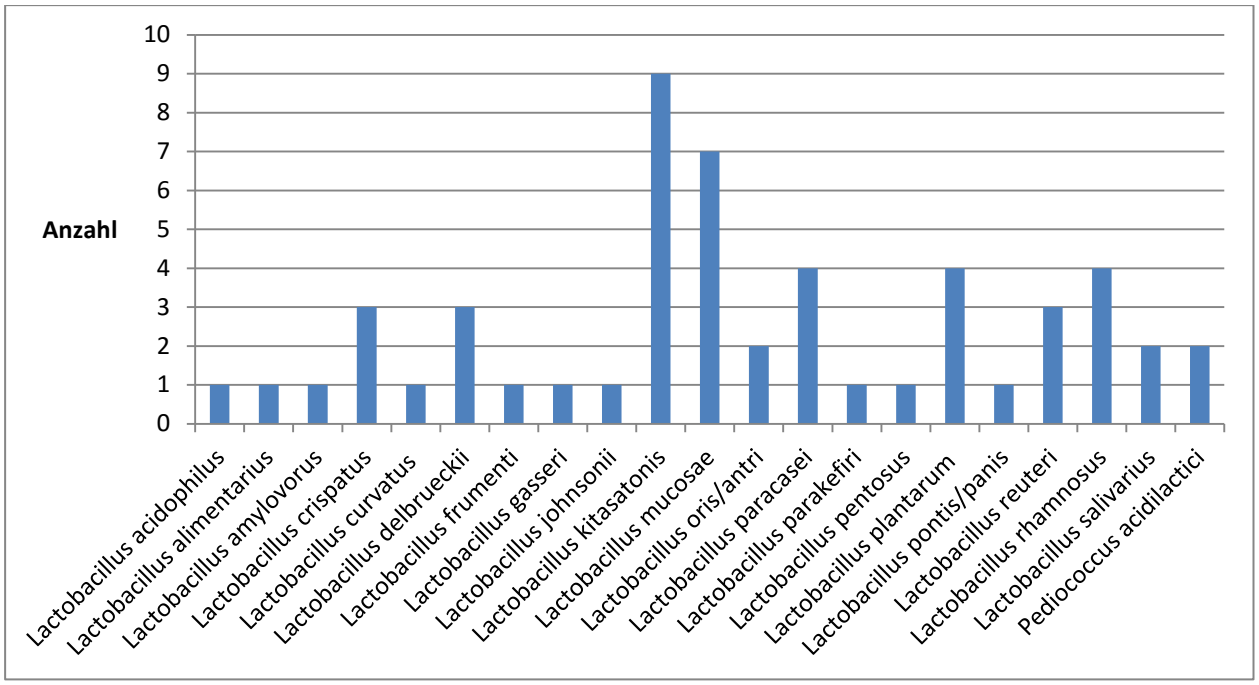


Abbildung 11: Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien bei Patienten mit KDS in absoluter Häufigkeit.

3.6.2 Kontrollgruppen

In der Gruppe der Patienten ohne gastrointestinale Symptomatik wurden in den 26 gesammelten Stuhlproben elf verschiedene Michsäurebakterienarten gefunden. Am häufigsten ließ sich dabei *Lactobacillus paracasei* nachweisen. Bei sieben der 26 Kinder konnte dieses Milchsäurebakterium im Stuhl identifiziert werden.

Mit einer absoluten Häufigkeit von drei stand *Lactobacillus rhamnosus* an zweiter Stelle. Je zweimal wurden *Lactobacillus plantarum* sowie *Pediococcus acidilactici* und *Pediococcus pentosaceus* nachgewiesen. Einmal wurde einer der folgenden Milchsäurebakterien identifiziert: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ruminis* und *Lactobacillus salivarius*.

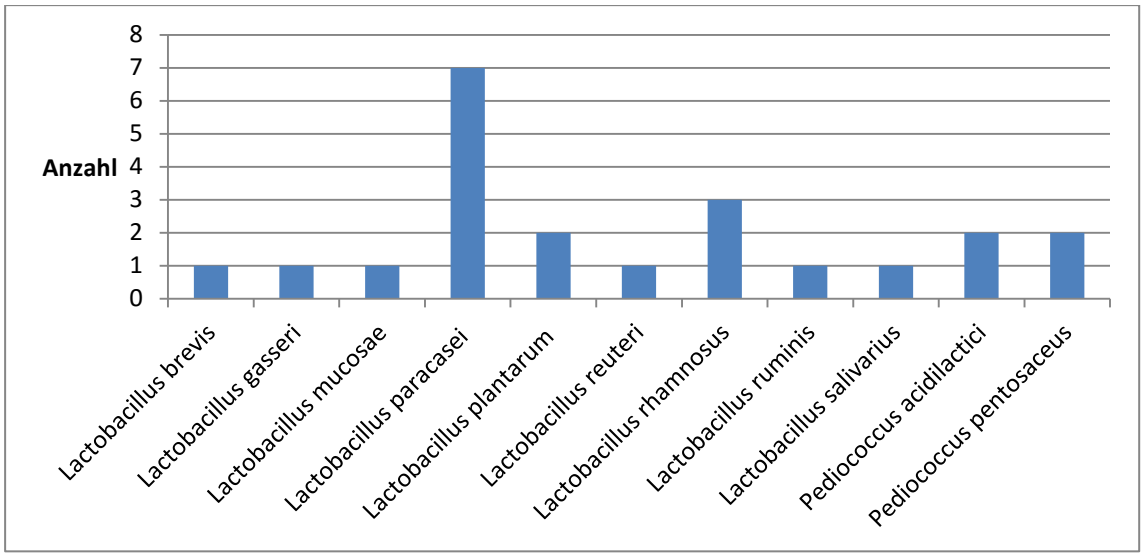


Abbildung 12: Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien der Patienten ohne gastrointestinale Symptomatik in absoluter Häufigkeit.

In der Gruppe der Kinder mit Diarrhoe wurden insgesamt elf verschiedene Michsäurebakterienarten nachgewiesen. Mit einer Anzahl von zehn war *Lactobacillus paracasei* das am häufigsten zu findende Bakterium. Am zweithäufigsten wurde *Lactobacillus gasseri* nachgewiesen, welches bei neun Patienten gefunden wurde. Sechsmal wurden die beiden Milchsäurebakterien *Lactobacillus mucosae* und *Lactobacillus salivarius* nachgewiesen. Viermal wurde *Pediococcus acidilactici* identifiziert. Je dreimal waren *Lactobacillus rhamnosus* und *Pediococcus pentosaceus* zu finden. Zweimal wurde *Lactobacillus plantarum* nachgewiesen. Je einmal war einer der folgenden Milchsäurebakterien im Stuhl der Kinder mit Diarrhoe zu finden: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* und *Lactobacillus kitasatonis*.

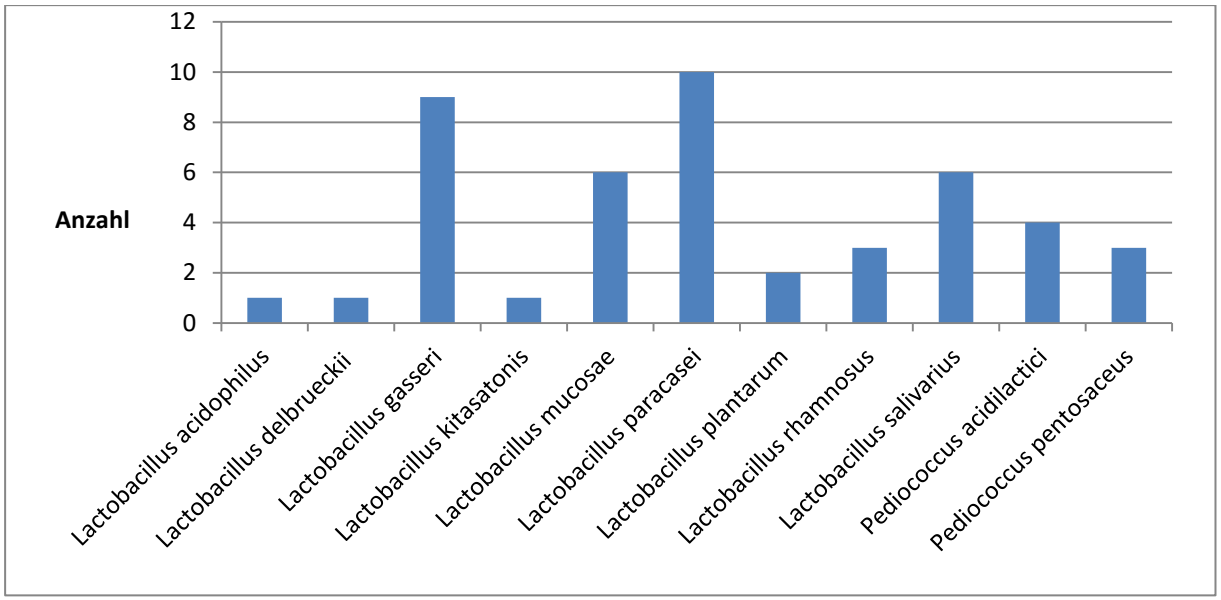


Abbildung 13: Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien der Kinder mit Diarrhoe in absoluter Häufigkeit.

Zusammenfassend konnten bei Patienten mit KDS, mit einer Ausnahme, aus allen Stuhlproben Michsäurebakterien isoliert werden, wohingegen sich in den beiden Kontrollgruppen ca. 1/3 der Stuhlproben frei von Michsäurebakterien zeigten. Zudem waren deutlich mehr verschiedene Arten von Milchsäurebakterien bei Patienten mit KDS zu finden, und die Stuhlproben der Kinder mit KDS hatten eine größere Vielfalt an einzelnen Milchsäurebakterien. Wo in den Kontrollgruppen in den Stuhlproben der Probanden nur 1,4 bzw. 1,6 verschiedenartige Michsäurebakterien zu finden waren, zeigten die Stuhlproben der Kinder mit KDS im Durchschnitt 3,4 unterschiedliche Milchsäurebakterien. Auch das Vorkommen der einzelnen Arten zeigte deutliche Unterschiede. Das am häufigsten gefundene Milchsäurebakterium bei Patienten mit KDS, *Lactobacillus kitasatonis*, spielte in den beiden Kontrollgruppen nur eine untergeordnete Rolle, wohingegen der häufigste Keim der beiden Kontrollgruppen, *Lactobacillus paracasei*, nur bei ungefähr einem Viertel der Patienten mit KDS vorkommt. Weitere Unterscheide bzgl. des Vorkommens der einzelnen Milchsäurebakterien lassen sich in Abbildung 15 ablesen.

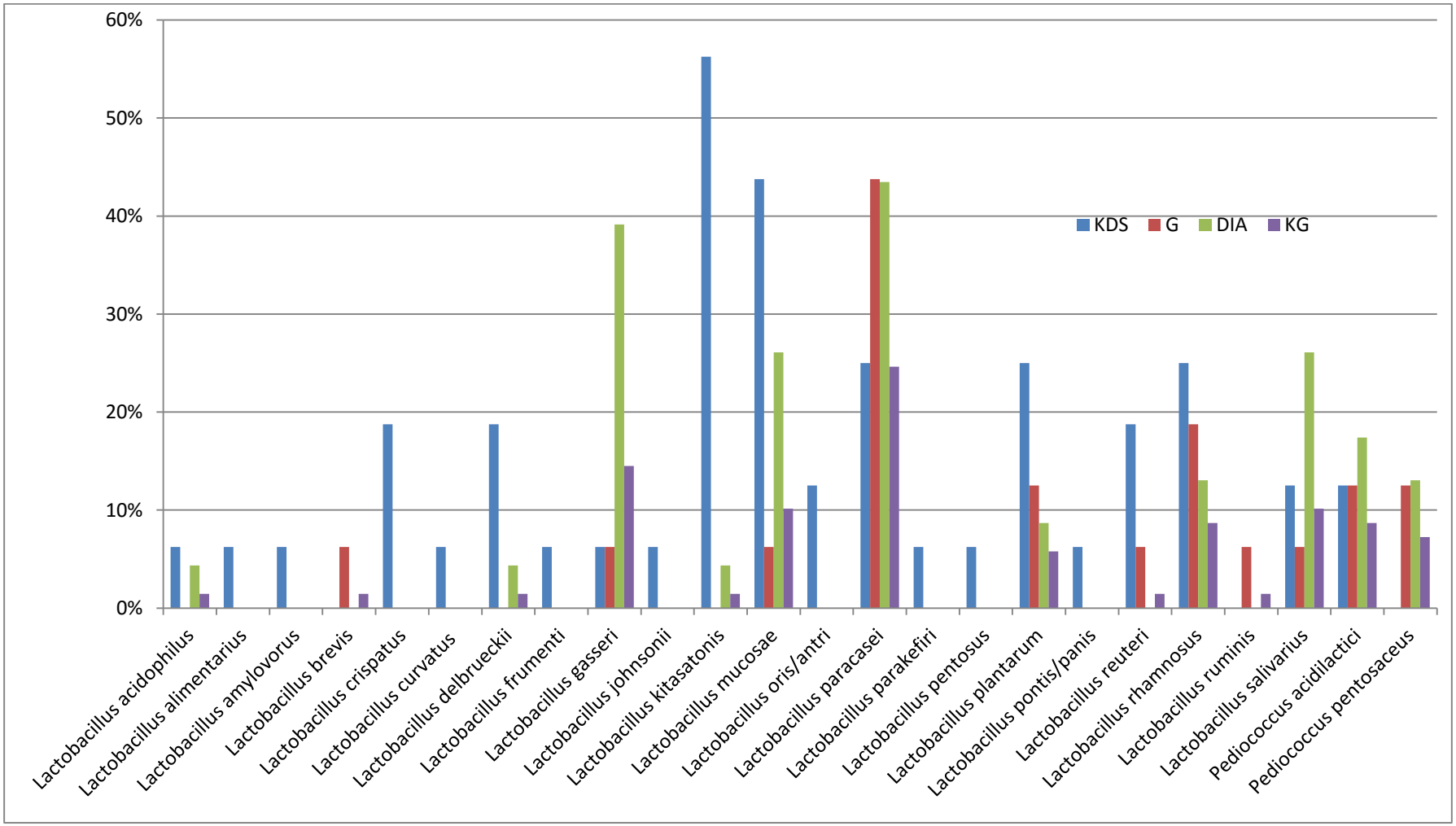


Abbildung 14: Relative Häufigkeit des Vorkommens einzelner Milchsäurebakterien in allen Gruppen: Patienten mit Kurzdarmsyndrom (KDS) sind in blau, ohne gastrointestinale Symptomatik (G) in rot, mit Diarrhoe (DIA) in grün und die kombinierte Kontrollgruppe (KG) in lila dargestellt.

3.7 Zuordnung der identifizierten Milchsäurebakterien zu den einzelnen Patienten

Die genaue Zuordnung der identifizierten Milchsäurebakterien zu den Patienten mit KDS wird in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst. Auf eine Darstellung der Zuordnung der Kontrollgruppen wird verzichtet.

N	Geschlecht	Bakterium
1	w	-
2	m	*Lactobacillus kitasatonis*
3	w	*Lactobacillus johnsonii,* *Lactobacillus acidophilus*
4	m	*Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus mucosae*
5	m	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus mucosae*
6	m	*Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus kitasatonis*
7	m	*Lactobacillus paracasei* *Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus mucosae* *Lactobacillus rhamnosus*
8	w	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus mucosae* *Lactobacillus rhamnosus*
9	m	*Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus alimentarius* *Lactobacillus pentosus* *Lactobacillus oris/antri* *Lactobacillus plantarum*
10	w	*Pediococcus acidilactici* *Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus parakefiri* *Lactobacillus rhamnosus* *Lactobacillus paracasei*
11	m	*Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus plantarum*
12	w	*Lactobacillus curvatus* *Lactobacillus paracasei*
13	m	*Lactobacillus mucosae* *Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus amylovorus*
14	m	*Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus mucosae*
15	m	*Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus mucosae*
16	m	*Lactobacillus kitasatonis* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus pontis/panis* *Lactobacillus paracasei* *Lactobacillus oris/antri* *Lactobacillus frumenti*
17	m	*Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus gasseri* *Pediococcus acidilactici* *Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus rhamnosus*

Tabelle 10: Tabellarische Zuordnung der identifizierten Michsäurebakterien zu den Patienten mit KDS. Aufgeführt sind Probennummer und Geschlecht. w = weiblich, m = männlich, N = zugeordnete Patientennummer.

3.8 Untersuchung auf dominante Keime

Aus allen 17 Stuhlproben der Patienten mit KDS, sowie aus 20 Stuhlproben der Gruppe der Kinder ohne gastrointestinale Symptome und aus 25 Stuhlproben der Gruppe der Kinder mit Diarrhoe, wurden zur Untersuchung auf dominante Keime zu

Beginn der Stuhlprobenverarbeitung eine gleiche Menge Stuhl (0,2g) entnommen und die darin enthaltene DNA mittels Maxwell® extrahiert und mittels Pico- Cykler PCR vervielfältigt. Anschließend wurden die Proben der PCR/DHPLC- Analyse mittels WAVE® zugeführt. Damit wurden die Bakteriengemische der Stuhlproben aufgetrennt und eine Art Fingerabdruck jedes Gemisches in Form eines charakteristischen Peakprofiles erstellt. Im Folgenden sind exemplarisch aus der Gruppe der Patienten mit KDS sowie den beiden Kontrollgruppen Peakprofile der Patienten N15 und N17 bzw. G22 und DIA361 dargestellt. Die restlichen Profile der Patienten mit KDS befinden sich im Anhang.

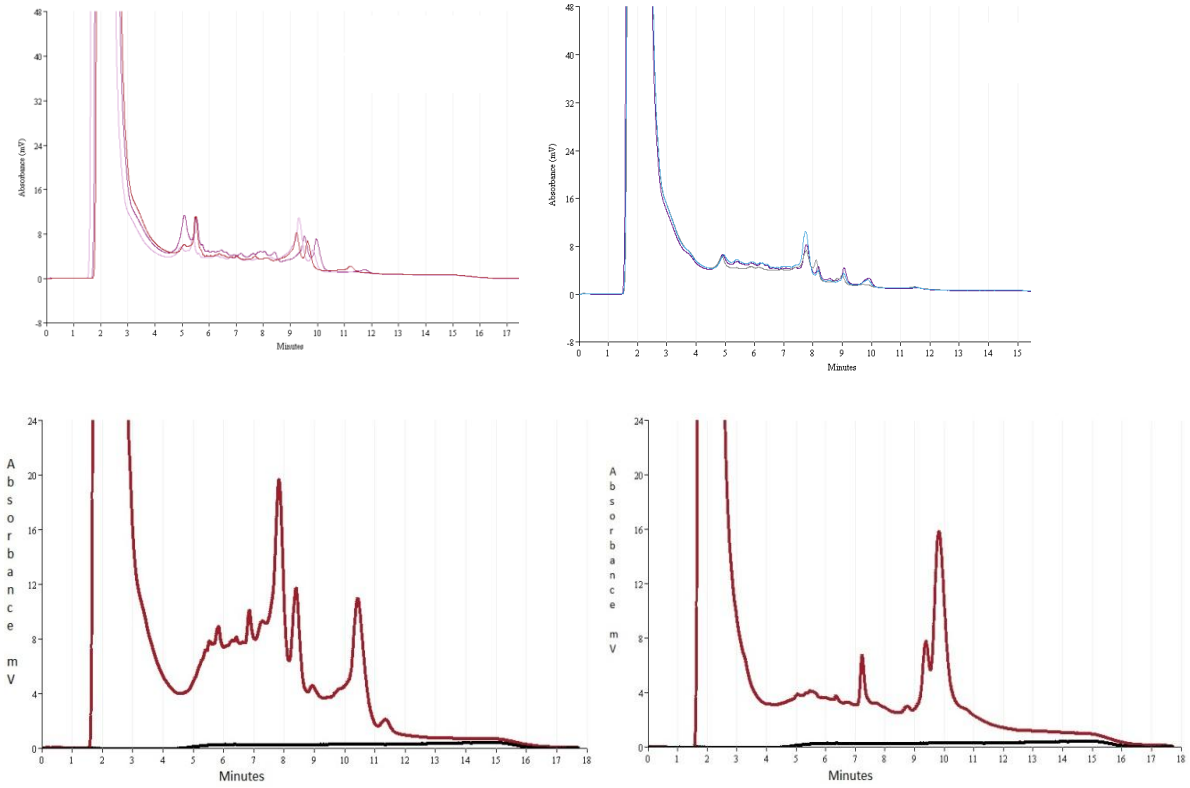


Abbildung 15: Auswahl DHPLC- Analysen: Peakprofile der Proben von KDS- Kindern N 15 (oben- links) ,N 17 (oben- rechts) und der Kontrollgruppe G22 (links- unten) und DIA 361 (rechts- unten). Auf der x- Achse ist die Zeit in Minuten angegeben, auf der y- Achse die Absorption. Die einzelnen Peaks könnten DNA- Stücken spezifischer Bakterien entsprechen.

Ein Peak in den Profilen kann charakteristisch für ein bestimmtes Bakterium sein. Die Höhe des Ausschlags gibt die Menge an DNA, sodass bei gleicher Stuhlmengenbestimmung und gleichen Untersuchungsvoraussetzungen eine Aussage über die Menge des Bakteriums im Stuhl getroffen werden kann (Domann et al. 2003; Imirzalioglu et al. 2008). Bei dominanten Keimen in einer Probe müsste so ein Profil mit einem hohen Peak entstehen. In einigen Stuhlproben war so ein Profil zu sehen, wie z.B. in der Probe N 17 in Abbildung 16. Der Peak bei 8 Minuten könnte ein dominantes

Bakterium repräsentieren. Leider konnte dies nur in seltenen Fällen dargestellt werden. In den meisten Stuhlproben wurden keine Peakprofile, die auf einen dominanten Keim hindeuten, gefunden. Insbesondere in den Proben der beiden Patienten N15 und N17, die zum Zeitpunkt der Stuhlprobenentnahme Symptome einer D-Laktat assoziierten Encephalopathie zeigten, konnte keine Profile erstellt werden, die auf das Vorhandensein eines dominanten Keimes hindeuten.

Jedoch ließen sich die Peakprofile der Patienten mit KDS in ihrer Gesamtheit von den Profilen der Kinder ohne KDS unterscheiden. Dazu sind in Abbildung 16 die Profile aller KDS- Proben mit den Profilen aller Kinder ohne KDS überlagert. Man erkennt einen Unterschied der Profile im Zeitraum von 9,5 min – 12 min (Box). In diesem Zeitraum wurde in den Proben der Patienten mit KDS nur wenig DNA absorbiert, wohingegen in den beiden Kontrollgruppen Peaks zu erkennen sind. Somit konnte auch mittels DHPLC ein Unterschied in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota der Patienten mit und ohne KDS gezeigt werden.

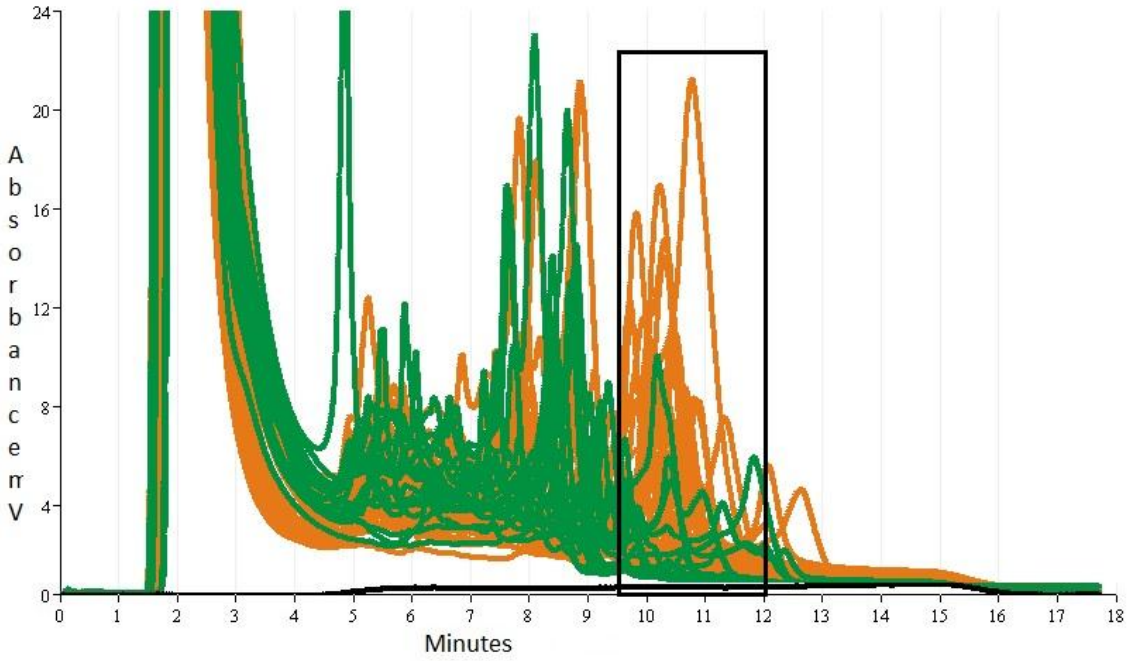


Abbildung 16: Übereinandergelegte DHPLC- Analysen: Peakprofile aller Patienten mit KDS (grün) und der Kinder ohne KDS (orange): Man erkennt in der schwarzen Box deutlich weniger Profile in der KDS-Gruppe im Zeitraum von 9,5 min - 12 min.

3.9 D- + L- Laktatproduktion der identifizierten Milchsäurebakterien

3.9.1 D- + L- Laktatwerte der einzelnen Milchsäurebakterien

Die identifizierten Milchsäurebakterien aus den Stuhlproben der Patienten mit KDS und den beiden Kontrollgruppen, sowie die beiden isolierten *Lactobacillen* aus zwei probiotischen Jogurtdrinks wurden über mindestens 30 h, aber in jedem Fall bis zum Erreichen der stationären Phase, kultiviert. Zur Kontrolle des kulturellen Wachtums wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm herangezogen. Ein Anzüchtung von *Lactobacillus curvatus* gelang dabei nicht. Aus den Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Laktatkonzentrationen im Medium bestimmt. Die ermittelten Werte wurden in den folgenden Diagrammen zusammengefasst.

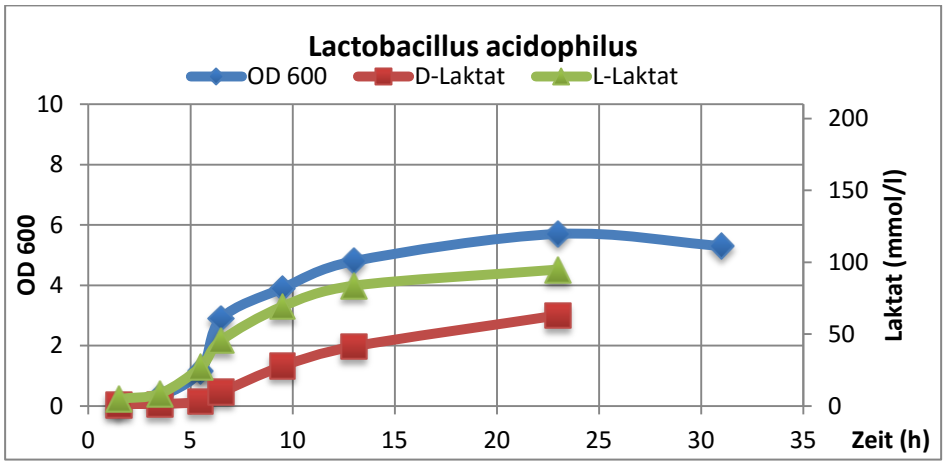


Abbildung 17: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus acidophilus*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert, wobei die L- Laktatproduktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

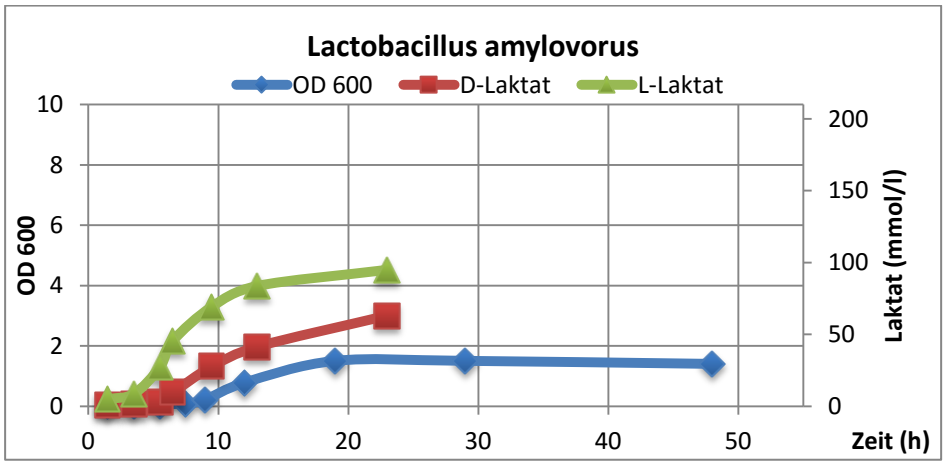


Abbildung 18: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus amylovorus*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L-Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

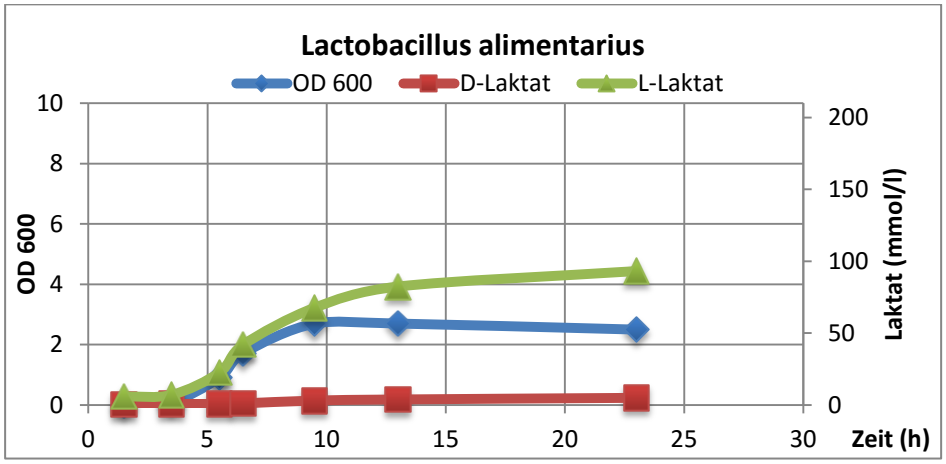


Abbildung 19: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus alimentarius*: Die L- Laktatproduktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

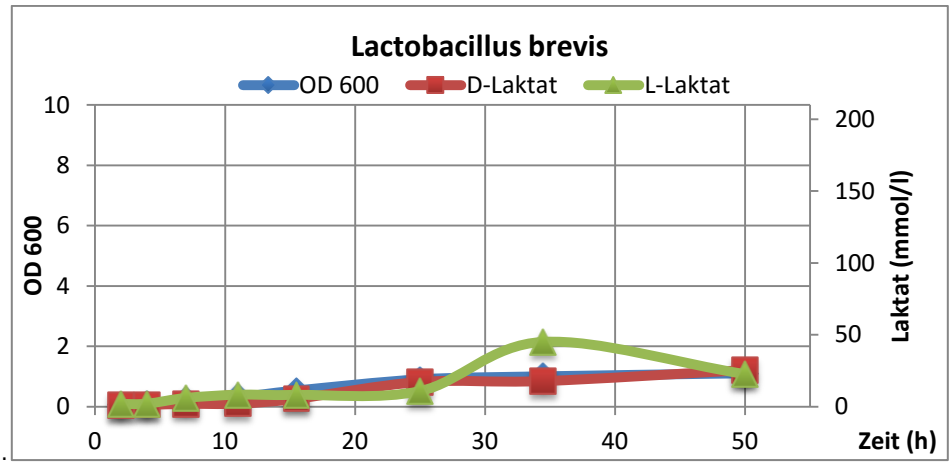


Abbildung 20: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus brevis*: Es wird sowohl D- als auch L- Laktat produziert, wobei die L- Laktatproduktion zunächst überwiegt und dann gegen Ende der Messung wieder sanft abfällt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

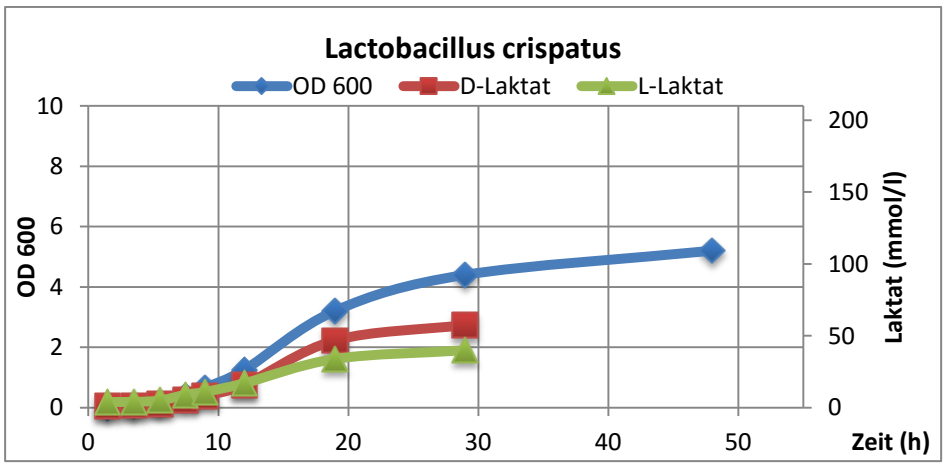


Abbildung 21: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus crispatus*: Es wird sowohl D- als auch L- Laktat produziert, wobei die D- Laktatproduktion leicht überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

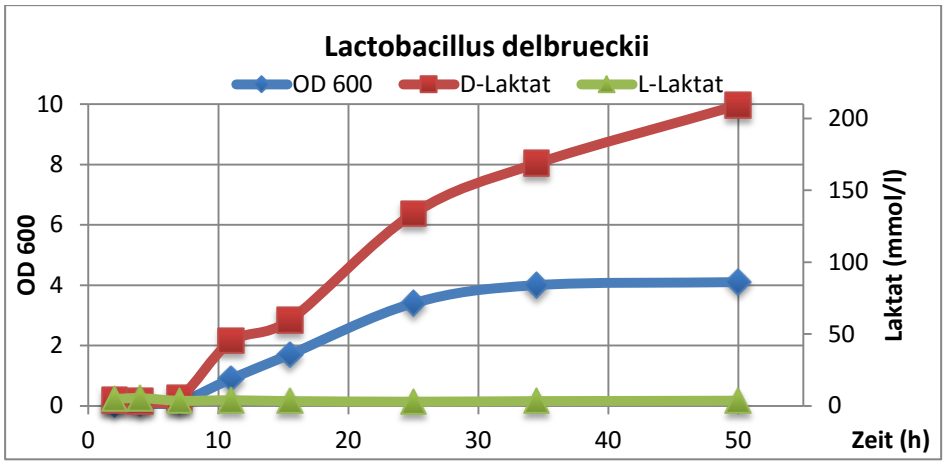


Abbildung 22: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus delbrueckii*: Es wird ausschließlich D- Laktat produziert, wobei die Produktion auch in der stationären Phase anhält. *Lactobacillus delbrueckii* steht bei den gemessenen D-Laktat Werten mit weitem Abstand an erster Stelle. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

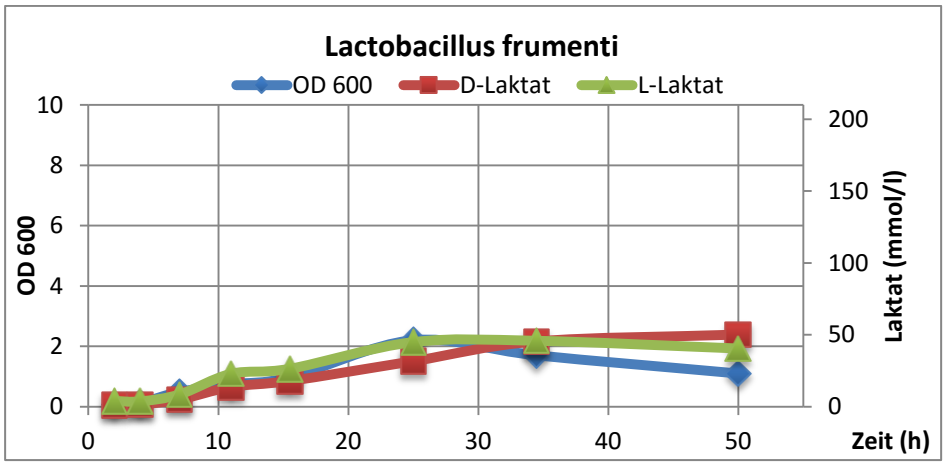


Abbildung 23: D + L -Laktatkonzentration von *Lactobacillus frumenti*: Es wird sowohl D- als auch L- Laktat in annähernd gleichem Verhältnis produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

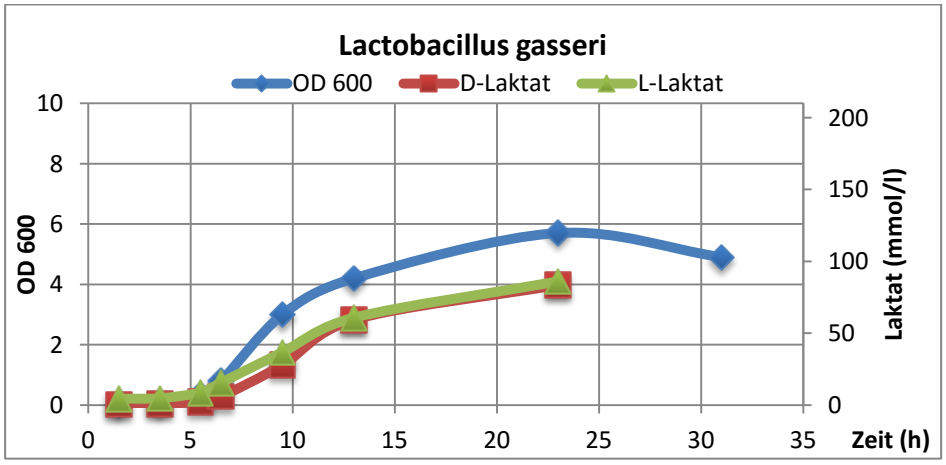


Abbildung 24: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus gasseri* : Es wird sowohl D- als auch L- Laktat in annähernd gleichem Verhältnis produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

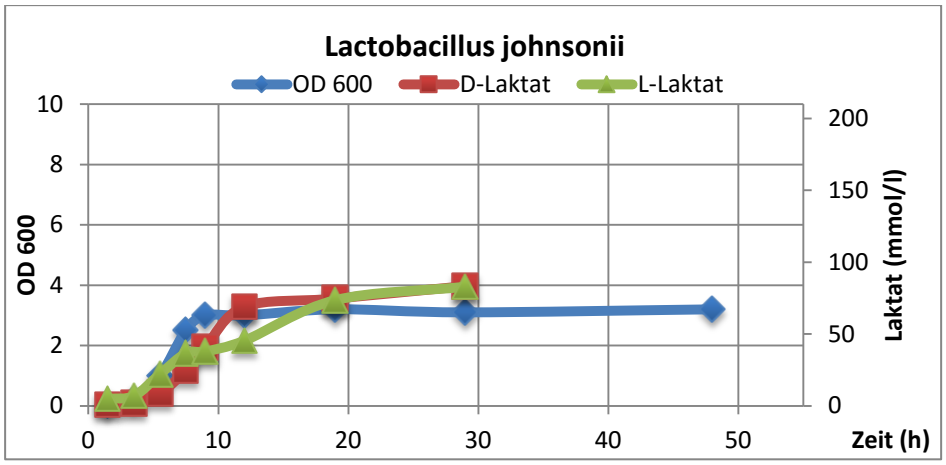


Abbildung 25: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus johnsonii*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in annähernd gleichem Verhältnis produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

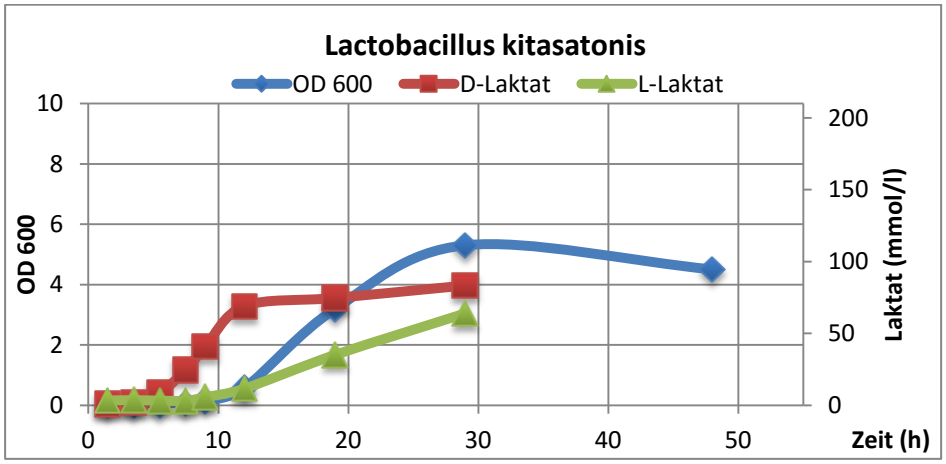


Abbildung 26: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus kitasatonis*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert, wobei die D- Laktat Produktion gerade zu Beginn überwiegt und mit dem Erreichen der stationären Phase von der L- Laktat Produktion wieder eingeholt wird. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

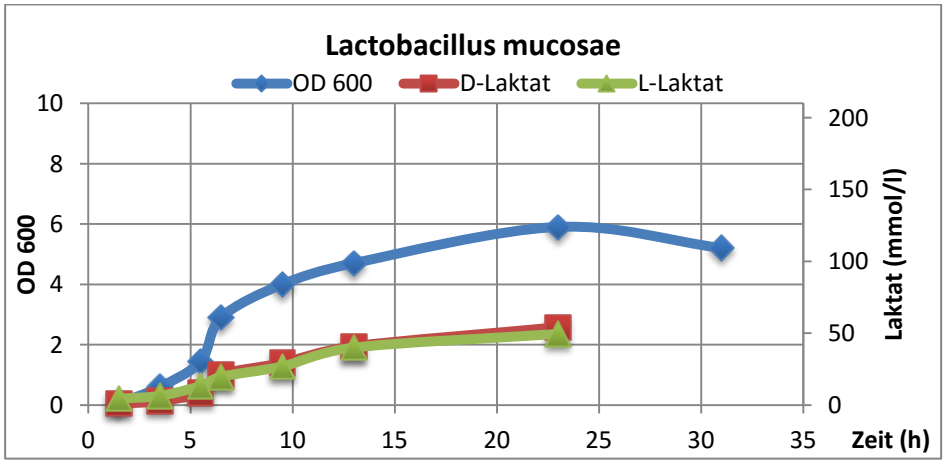


Abbildung 27: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus mucosae*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in annähernd gleichem Verhältnis produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

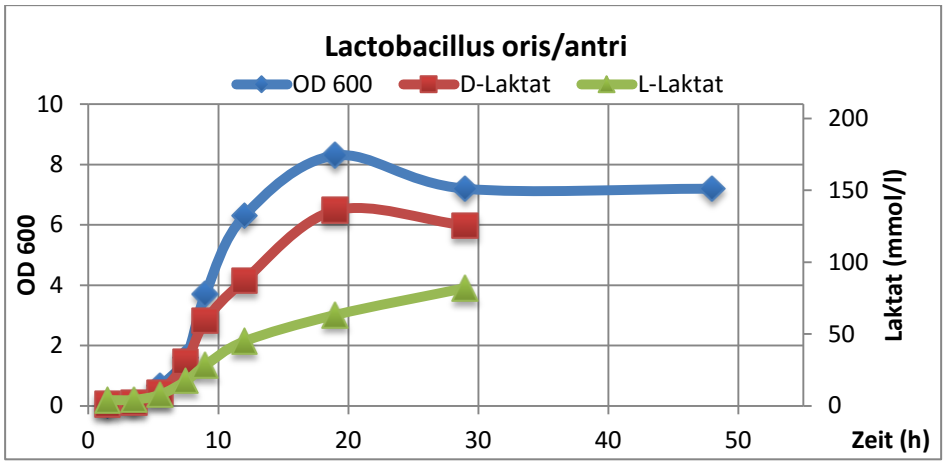


Abbildung 28: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus oris/antri* : Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in produziert, wobei die D- Laktat- Produktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

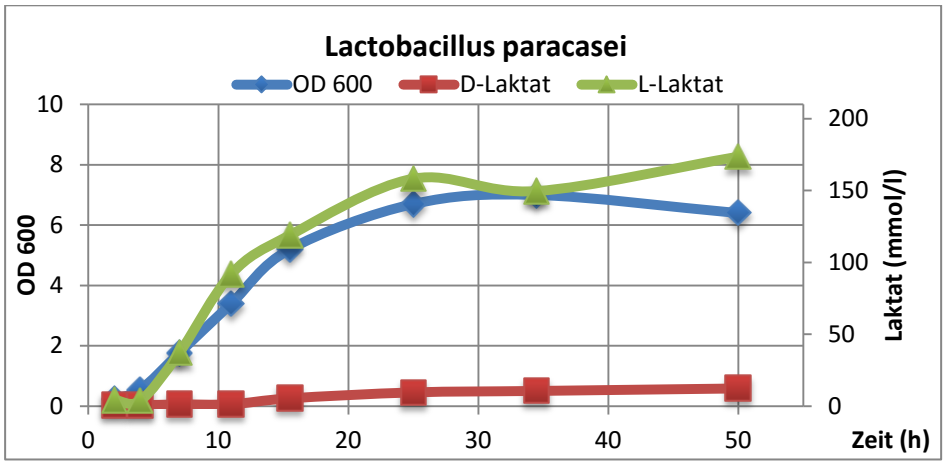


Abbildung 29: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus paracasei*: Es wird fast ausschließlich LLaktat produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

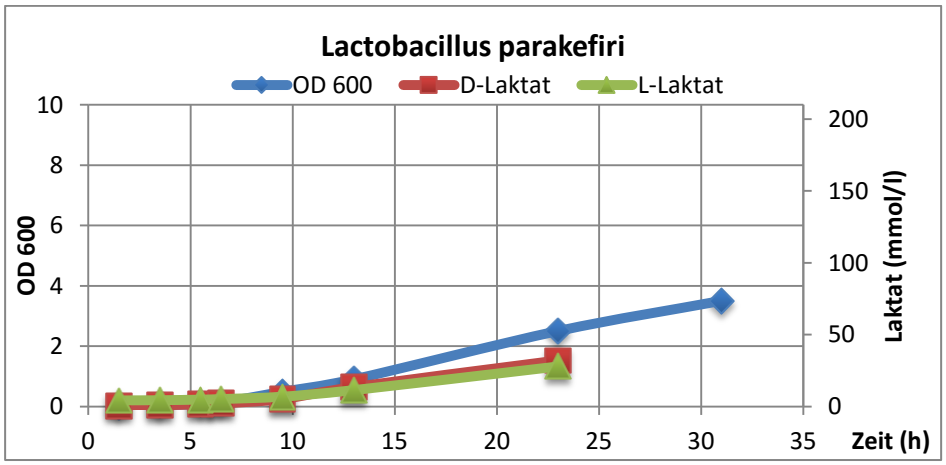


Abbildung 30: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus parakefiri*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in produziert in annähernd gleichen Mengen produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

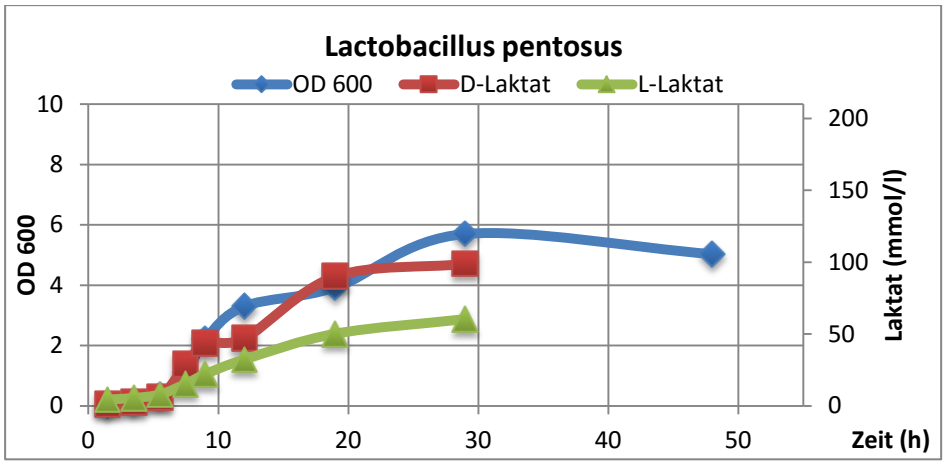


Abbildung 31: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus pentosus*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in produziert, wobei die D-Laktatproduktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

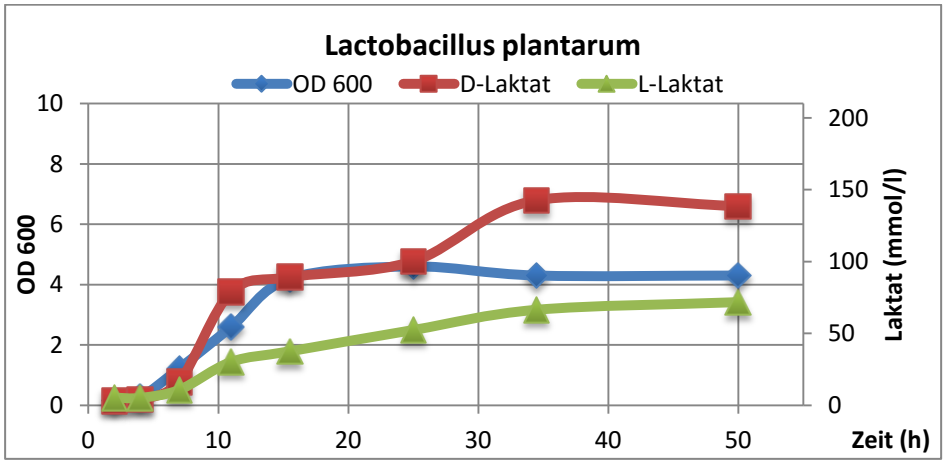


Abbildung 32: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus plantarum*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert, wobei die D-Laktatproduktion überwiegt und nach einer kurzen Phase der Stagnation noch einmal ansteigt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

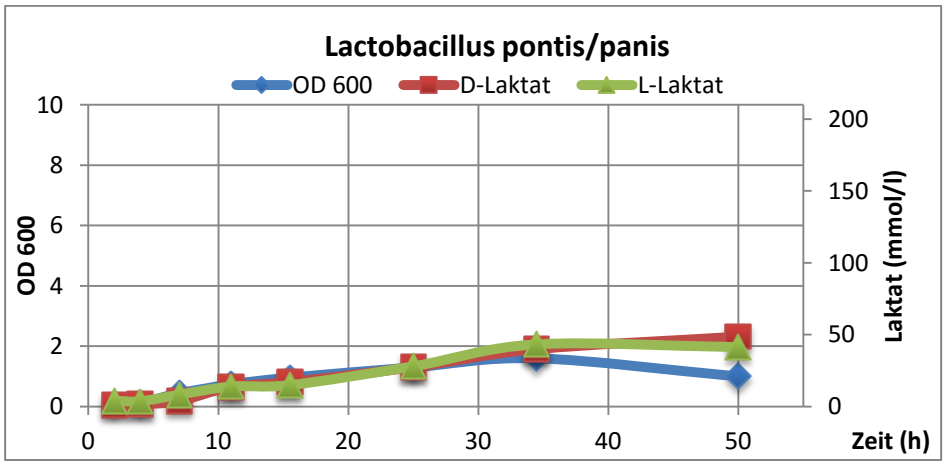


Abbildung 33: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus pontis/panis*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat in gleichen Mengen produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

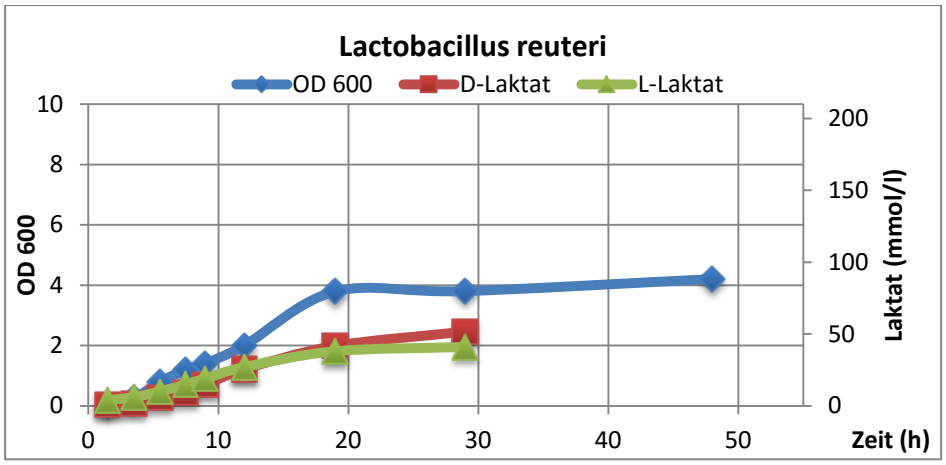


Abbildung 34: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus reuteri*: Es wird sowohl D- als auch L- Laktat in gleichen Mengen produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

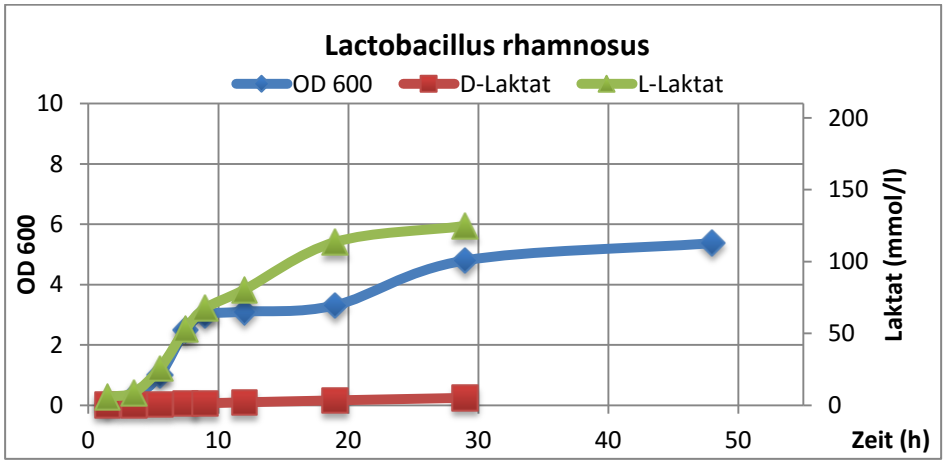


Abbildung 35: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus rhamnosus*: Es wird ausschließlich L- Laktat produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

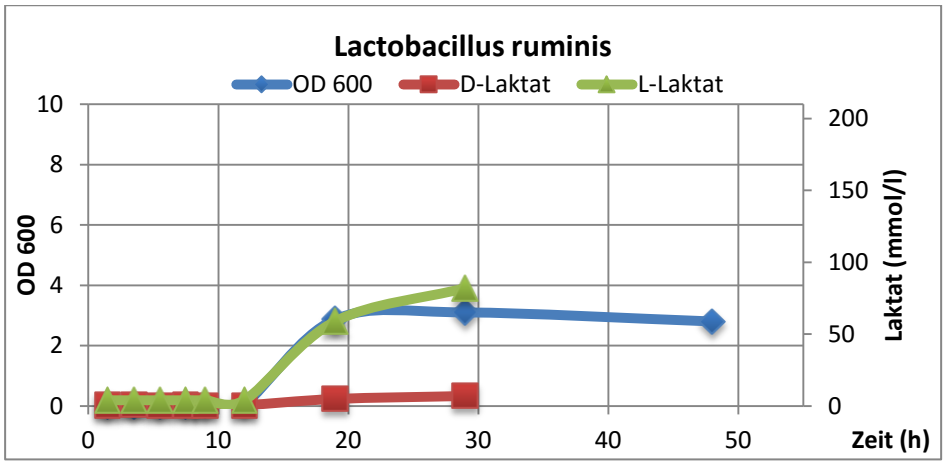


Abbildung 36: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus ruminis*: Es wird fast ausschließlich L- Laktat produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

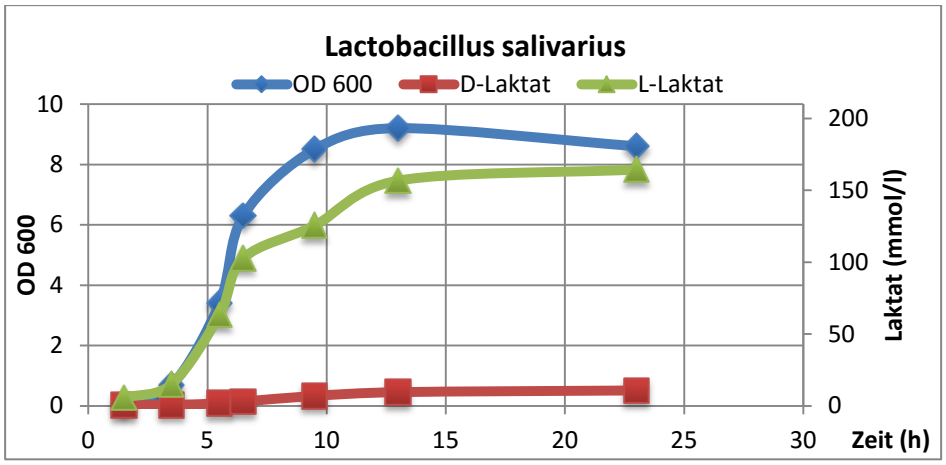


Abbildung 37: : D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus salivarius*: Es wird fast ausschließlich L-Laktat produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L-Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

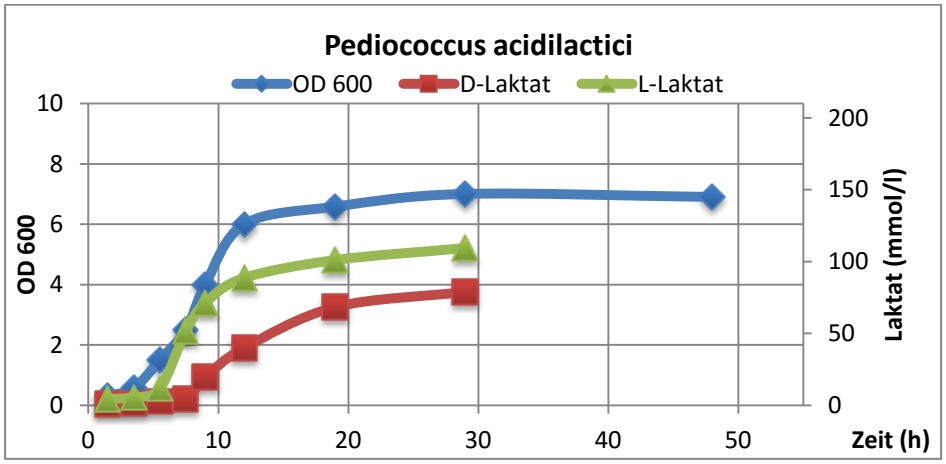


Abbildung 38: D- + L- Laktatkonzentration von *Pediococcus acidilactici*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert, wobei die L- Laktatproduktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

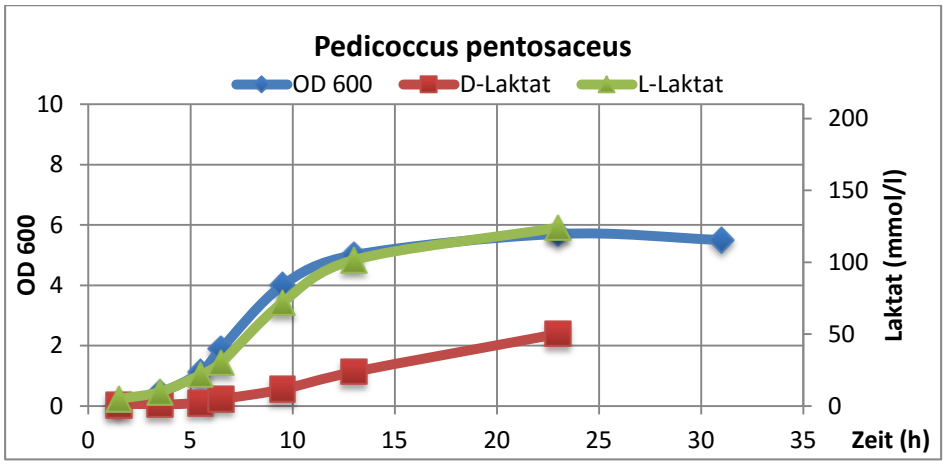


Abbildung 39: D- + L- Laktatkonzentration von *Pediococcus pentosaceus*: Es wird sowohl D- als auch L-Laktat produziert, wobei auch hier, wie bei der anderen getesteten *Pediococcus*- Spezies die L-Laktatproduktion überwiegt. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

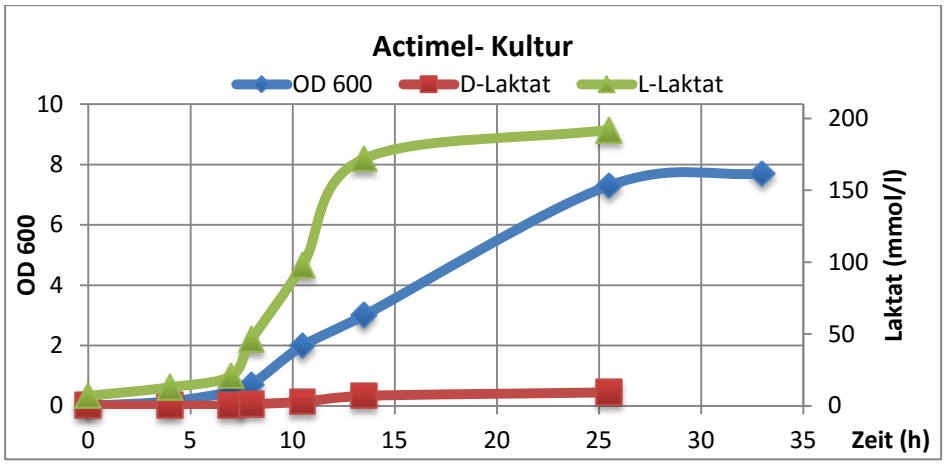


Abbildung 40: D- + L- Laktatkonzentration der isolierten Actimel- Kultur: Die L- Laktatproduktion überwiegt bei weitem und erreicht den zweithöchsten Messwert dieser Testreihe. D- Laktat wird kaum produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

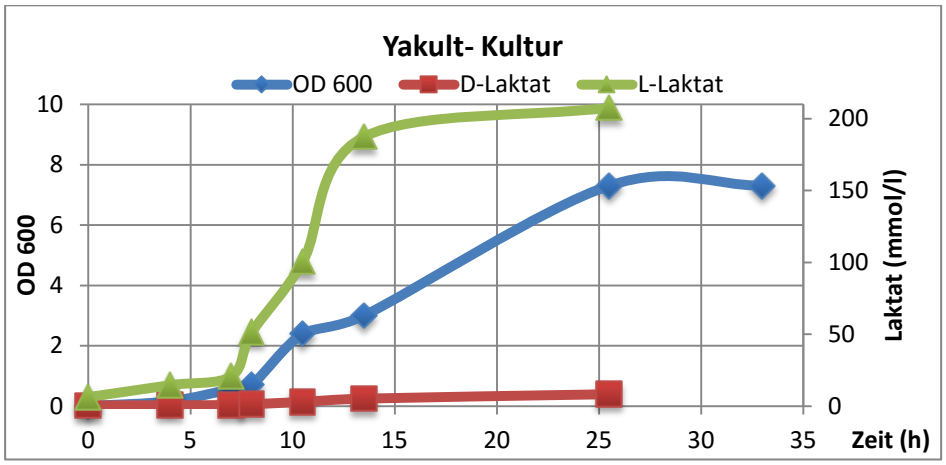


Abbildung 41: D- + L- Laktatkonzentration der isolierten Yakult- Kultur: Die L- Laktatproduktion überwiegt bei weitem und erreicht den höchsten Messwert dieser Testreihe. D- Laktat wird kaum produziert. Die blaue Kurve zeigt die erreichte optische Dichte an (OD 600), die grüne Kurve die L- Laktat- und die rote Kurve die D- Laktatproduktion in mmol/l.

Die getesteten Michsäurebakterien zeigen eine große Varianz in der Produktion von D- und L- Laktat. Neben Bakterien die ein Racemat des Moleküls herstellen, finden sich auch reine D- und L- Laktatbildner.

Nach Art der produzierten Milchsäure konnten drei Hauptgruppen gebildet werden: (1) reine D- Laktat-, (2) reine L- Laktat und (3) Racemat- Bildner. Letztere Gruppe konnte noch in die drei Untergruppen mit (3a) vermehrter D- Laktatproduktion, (3b) ausgeglichener Laktatproduktion und (3c) vermehrter L- Laktatproduktion unterteilt werden. Dabei wurden alle Bakterien, die mehr als 90 % eines Isomers produzierten zu den reinen Bildnern gezählt. Im Intervall von 60%-90% wurden die Bakterien in die Gruppe der vermehrten Produzenten eines Isomers zugeteilt und zwischen 40% und 60 % wurden sie als ausgeglichene Produzenten gewertet (siehe Abbildung 42 und Tabelle 11).

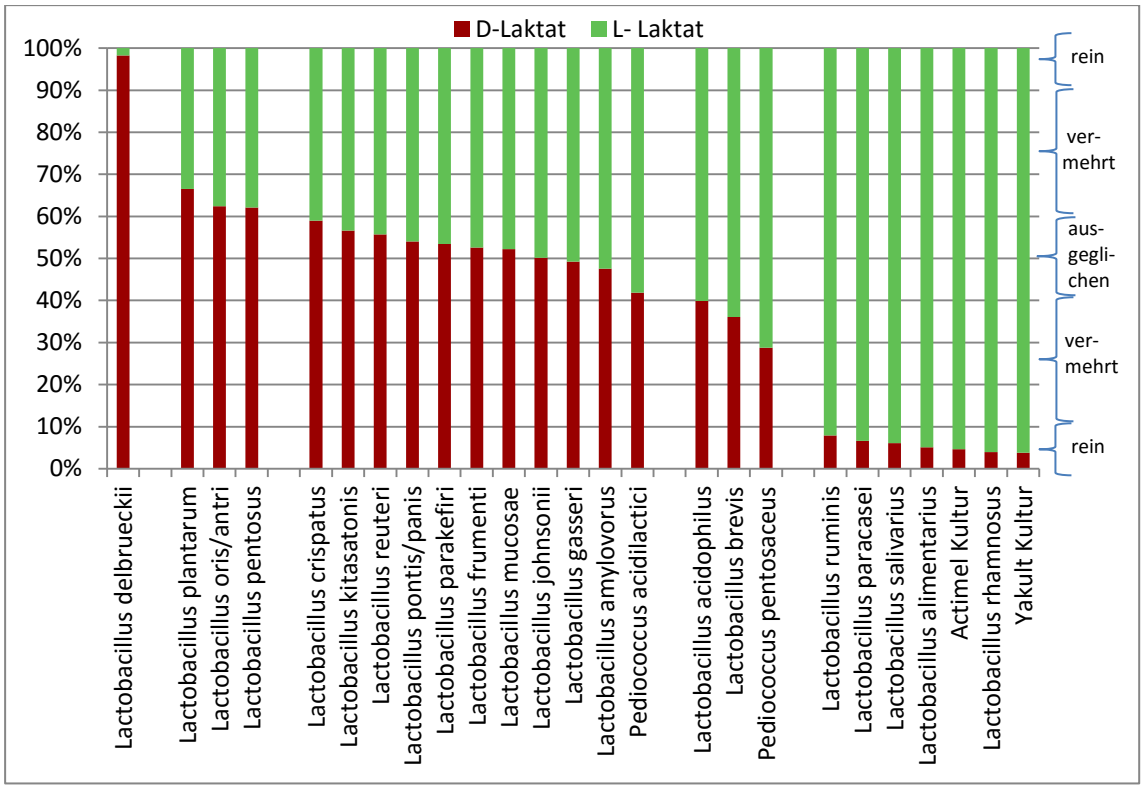


Abbildung 42: Schematische Darstellung der D + L-Laktatproduktion aller isolierten Milchsäurebakterien. Angegeben ist die anteilmäßige Produktion von D- und L - Laktat in Prozent der gesamten Laktatproduktion im Medium. Zur Berechnung wurde der Höchstwert während der Inkubation in MRS-Broth bis zum Erreichen der Stationären Phase verwendet. Die Produktion von über 90% eines Laktatisomeres wurde einer reinen, 60- 90% einer vermehrten und 40- 60% einer ausgeglichen Produktion gleichgesetzt. Die roten Balkenanteile zeigen die D- Laktat-, die grünen Balkenanteile die L-Laktatproduktion an.

Bei den in dieser Testreihe kultivierten Milchsäurebakterien zeigte alleinig *Lactobacillus delbrueckii* ein reine D-Laktat- Produktion. Sieben Bakterien produzierten fast ausschließlich L-Laktat. Dies waren *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, sowie die beiden Kulturen der Probiotika Drinks, welche ebenfalls als *Lactobacillus paracasei* identifiziert wurden.

Die Mehrzahl der Bakterien produzierten ein Racemat aus D- und L- Laktat, insgesamt 17 der 25 getesteten Bakterienarten. Neun davon produzierten eine ausgeglichene Menge an D- und L- Laktat. Dies waren *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus pontis/panis* und *Lactobacillus reuteri*. Vier Bakterien, *Lactobacillus kitasatonis*, *Lactobacillus oris/antri*, *Lactobacillus pentosus* und *Lactobacillus plantarum* produzierten mehr D- Laktat. Vier Bakterien, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici* und *Pediococcus pentosaceus* produzierten mehr L- Laktat.

Vermehrt D-Laktat (L-/D- Laktat in mmol/l)	**D- + L- Laktat Racemat (L- /D- Laktat in mmol/l)**			**Vermehrt L-Laktat (L-/D- Laktat in mmol/l)**
Reine D-Laktatproduktion	Vermehrte D-Laktatproduktion	Ausgeglichene Laktatproduktion	Vermehrte L-Laktatproduktion	Reine L-Laktatproduktion
Lb delbrueckii (3,71/209,19**)**	**Lb plantarum** (71,76/142,66) **Lb oris/antri** (81,98/135,97) **Lb pentosus** (60,31/98,82)	**Lb amylovorus** (26,00/23,59) **Lb crispatus** (40,00/57,45) **Lb frumenti** (45,07/50,07) **Lb gasseri** (86,13/83,67) **Lb johnsonii** (83,01/83,42) **Lb kitasatonis** (63,94/83,42) **Lb mucosae** (49,60/54,20) **Lb parakefiri** (27,93/32,02) **Lb pontis/panis** (41,36/48,70) **Lb reuteri** (41,00/51,65) **Pc acidilactici** (109,53/78,86)	**Pc pentosaceus** (124,07/50,20) **Lb acidophilus** (94,89/63,05) **Lb brevis** (45,03/25,38)	**Yakult- Kultur** (207,76/8,23) **Actimel- Kultur** (192,00/9,42) **Lb paracasei** (173,60/12,35) **Lb salivarius** (164,51/10,73) **Lb rhamnosus** (124,72/5,14) **Lb alimentarius** (93,18/5,02) **Lb ruminis** (82,00/7,05)

Tabelle 11: Tabellarische Einteilung der gefunden Michsäurebakterien anhand deren Laktatproduktion: Eingeteilt wurde in reine D- bzw. L- Laktatproduzenten und Racematproduzenten. Letztere wurden noch in vermehrt D- bzw. L- Laktatproduzenten und in eine Gruppe mit ausgeglichener Produktion unterteilt. Sortierung nach absolut produzierten Mengen während der Testreihe der jeweils vermehrt vorkommenden Säure; bei ausgeglichener Produktion alphabetisch. Abk. Lb= *Lactobacillus*, Pc= *Pediococcus*.

3.9.2 Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Angaben der Patienten

Ein besonderes Interesse dieser Studie lag in der Frage, ob Patienten, die Symptome einer Encephalopathie zeigen, Bakterien im Stuhl haben, die vermehrt D- Laktat produzieren und somit als wichtiger pathogener Faktor in der Entstehung einer D-Laktat Azidose identifiziert werden könnten. Bei den beiden Patienten die zum Zeitpunkt der Probeabgabe neurologische Symptome zeigten (N15 + N17), war als gemeinsames Bakterium *Lactobacillus delbrueckii* nachweisbar. Bei den in dieser Studie isolierten und in ihrer Laktatproduktion getesteten Milchsäurebakterien zeigte einzig *Lactobacillus delbrueckii* während seines Wachstums eine reine D- Laktat

Produktion. Auch absolut produzierte das Bakterium bis zum Erreichen der stationären Phase am meisten D- Laktat (169 mmol/l), wobei die Produktion anschließend noch anhielt und einen Wert von 209 mmol/l erreichte. *Lactobacillus delbrueckii* konnte außer bei den beiden Patienten N15 und N17 auch bei Patient N11 nachgewiesen werden. Dieser zeigte im Vorfeld der Studie zweimalig Episoden einer Encephalopathie, jeweils nach 1- 2 Wochen ohne parenteraler Ernährung (vgl. Tabelle 5). Somit war *Lactobacillus delbrueckii* ausschließlich bei Patienten mit KDS nachweisbar, die zum Zeitpunkt der Probeabgabe (N15+N17) bzw. rezidivierend im Vorfeld (N11) Symptome einer D- Laktat Azidose zeigten. Bei allen drei Patienten zeigten sich keine weiteren gemeinsamen Milchsäurebakterien.

Neben Patient N11 zeigten drei weitere Patienten im Vorfeld der Studie Symptome einer D- Laktat Azidose (N7, N9 und N14). Bei allen drei Patienten konnten Bakterien im Stuhl isoliert werden, die eine vermehrte D- Laktatproduktion zeigten. Dabei handelt es sich um *Lactobacillus kitasatonis*, der bei allen drei Patienten nachgewiesen werden konnte, sowie *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus oris/antri* und *Lactobacillus plantarum*, die nur bei Patient N9 nachgewiesen wurden. Diese Bakterien wurden, ausgenommen *Lactobacillus pentosus*, das sich nur bei Patient N9 zeigte, jedoch auch bei Patienten isoliert, die bisher keine Symptome einer D-Laktat- Azidose gezeigt hatten. Die weiteren Bakterienspezies der drei Patienten zeigten entweder eine ausgeglichene Laktatproduktion (*Lactobacillus mucosae*, nachgewiesen bei Patient N7 und N14, sowie *Lactobacillus reuteri*, nachgewiesen bei Patient N14) oder eine reine L-Laktatproduktion (*Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus rhamnosus* bei Patient N7).

Bezüglich der Einnahme von Probiotika gaben drei Patienten an, regelmäßig milchsäurebakterienhaltige Probiotika zu sich zu nehmen. Dabei konnte bei keinem der Patienten die laut Hersteller hauptsächlich verwendete Kultur im Stuhl nachgewiesen werden. Die beiden Patienten mit neurologischen Symptomen zum Abgabezeitpunkt der Stuhlprobe (N15 + N17) nahmen keine Milchsäurebakterien in Form von Probiotika zu sich. Von den Patienten bei denen neurologische Symptome im Vorfeld der Untersuchung aufgetreten waren, gaben zwei an, regelmäßig Probiotika mit *Lactobacillus casei* (Patient N9) bzw. *Lactobacillus rhamnosus* (Patient 14) einzunehmen. Der dritte Patient (Patient 7) nahm keine Probiotika zu sich.

3.10 Erstellung eines Risikoprofiles

Faktoren, die das Auftreten einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie begünstigen könnten, wurden gesammelt und zu einem Risikoprofil zusammengefasst.

Dabei wurden aus dieser Arbeit die Angaben aller Patienten berücksichtigt die aktuell oder zu einem früheren Zeitpunkt eine D- Laktat Azidose hatten. Diese wurden mit den bisherigen Fällen aus der Literatur kombiniert.
Einbezogen in das Profil wurden das Geschlecht, der Grund für das KDS, der Median des Alters der Patienten, und Angaben zur Einnahme von Probiotika.

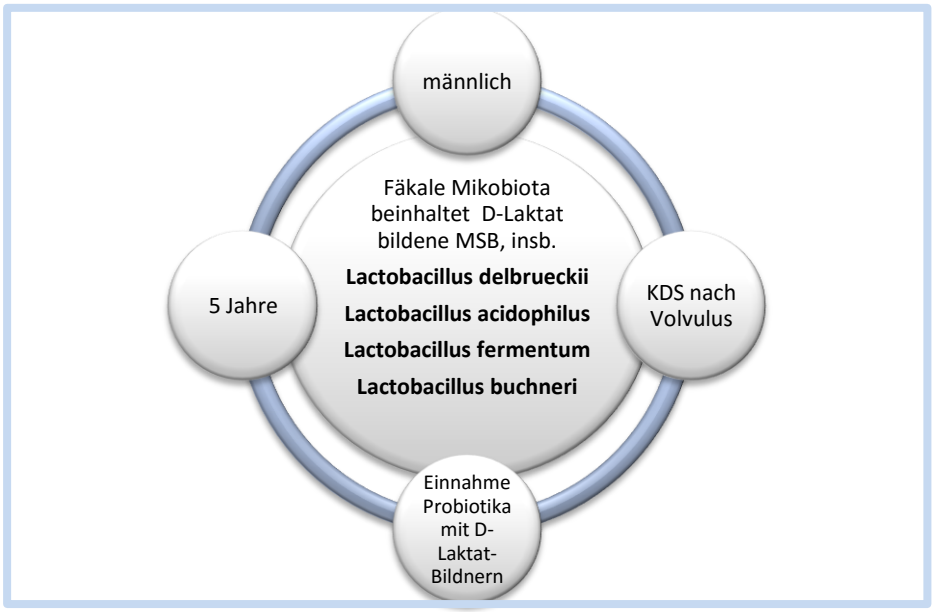


Abbildung 43: Risikoprofil für die Entstehung einer D- Laktat assoziierten Encephalopathie: Gezeigt werden die in dieser Studie gefunden Faktoren, die das Auftreten einer D- Laktat- assoziierten Encephalopathie begünstigen können. Angegeben sind Alter, Geschlecht, Grunderkrankung und Probiotikaeinnahme. MSB=Milchsäurebakterien, insb.=insbesondere, KDS=Kurzdarmsyndrom.

Kinder die eine D- Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie entwickeln können sind demnach häufig ca. 5 Jahre alte, männliche Patienten, mit KDS in Folge eines Volvulus, die Probiotika mit D- Laktat bildenden Kulturen zu sich nehmen und deren fäkale Mikrobiota D- Laktat bildende Milchsäurebakterien beinhaltet, insbesondere einer oder mehrere der folgenden Keime: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri.*

4 Diskussion

Ein Kurzdarmsyndrom entsteht durch eine chirurgische Resektion, einen kongenitalen Defekt oder einen krankheitsassoziierten Verlust der Absorptionsfähigkeit des Dünndarmes und ist charakterisiert durch die Unfähigkeit zur Aufrechterhaltung des Protein-, Energie-, Flüssigkeits-, Elektrolyt- oder Spurenelemente- Haushaltes bei normaler Ernährung (O'Keefe et al., 2006). Die alte Definition mit Bezug zur Längenangabe den Restdünndarm betreffend, wird zugunsten der neuen funktionellen Definition zunehmend nicht mehr verwendet (Lamprecht et al., 2014). Gerade bei Kindern ist im Zuge des Wachstums die Aufrechterhaltung dieser Haushalte enorm wichtig, sodass die meisten Kinder mit KDS in den ersten Monaten postoperativ fast ausschließlich parenteral ernährt werden müssen. Zur Vermeidung der mit der langzeitparenteralen Ernährung einhergehenden Komplikationen wie beispielsweise ein fortschreitendes Leberversagen, das Auftreten von Katheterinfektionen bzw. Fehlfunktionen oder Thrombosen der zentralvenösen Gefäße, sowie zur Erlangung eines möglichst normalen Lebensstils mit normaler Nahrungsaufnahme, wird dennoch auch bei nur noch kurzen Dünndarmabschnitten versucht, möglichst früh eine enterale Ernährung hinzuzunehmen oder gar alleinig zu etablieren.

Neben dem Auftreten von Diarrhoen und den Folgen der Malabsorption stellt auch das Auftreten einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie eine wichtige Komplikation bei Vorliegen eines Kurzdarmsyndroms dar. Dabei kommt es durch eine übermäßige Besiedelung des verkürzten Dünndarms mit Milchsäurebakterien zu einer vermehrten Bildung von D- Laktat. Nach Resorption kann dieses neben einer metabolischen Azidose neurologische Symptome wie Verwirrtheit, zerebelläre Ataxie, verwaschene Sprache und Amnesien bewirken (Bach et al., 2009).
Das Vorhandensein einer übermäßigen Besiedelung des verkürzten Dünndarms mit Milchsäurebakterien bei Patienten wurde durch mehrere Studien gezeigt und gilt als Voraussetzung für das Entstehen ein D-Laktat- Azidose (Joly et al., 2010; Kang et al., 2006; Bongaerts et al., 1997b).
In dieser Arbeit sollte geklärt werden warum, trotz angenommener bakterieller Überwucherung mit Milchsäurebakterien bei allen Kindern mit KDS, dennoch nicht alle Patienten eine D- Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie entwickeln. Dafür wurden zunächst die bisher publizierten Fälle gesammelt. Nach unserer eigenen Erhebung wurden die Daten dann mit denen der bisher beschriebenen Patienten verglichen.

Im Rahmen der Literaturrecherche für diese Arbeit wurden, im Zeitraum von der Erstbeschreibung durch Oh et al. im Jahre 1979 bis 2013, 19 Fallberichte mit 22 Kindern mit D-Laktat- Azidose assoziierter Encephalopathie gefunden. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag dabei bei 6,1 Jahren, der Median bei 5 Jahren.

An unserer aktuellen Studie beteiligten sich 17 Patienten mit Kurzdarmsyndrom, die über den Elternverein K.i.s.E e.V. per Postanschrieben kontaktiert wurden. Das durchschnittliche Alter aller teilnehmenden Patienten mit KDS lag bei 11, 5 Jahren, der Median bei 14. Auch nach Streichung der, an dieser Studie teilnehmenden, beiden über 18- jährigen Patienten verringerte sich der Mittelwert, bei gleichbleibendem Median, nur auf 11,1 Jahre. Somit lag das durchschnittliche Alter der an dieser Studie teilnehmenden Patienten über dem aus der bisherigen Literatur bekanntem Altersdurchschnitt. Beschränkt man den Altersdurchschnitt auf die Patienten, die im Fragebogen Angaben zu in der Vergangenheit oder akut aufgetretenen Symptomen einer Encephalopathie machten, auf den Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens neurologischer Symptome und vernachlässigt dabei den Patienten 11, der zum einen keine Angaben zum erstmaligen Auftreten machte und zum anderen zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits über 18 Jahre alt war, ergibt sich ein mittleres Alter von vier Jahren in dieser Studie.
Die Verteilung des Geschlechts in der bisher veröffentlichen Literatur zeigt eine Wendigkeit in Richtung der Jungen bei einem Verhältnis von 2,5:1. Von den 22 Patienten waren dabei 15 Jungen und 6 Mädchen, bei einem Patienten war das Geschlecht nicht angegeben. Im Rahmen dieser Studie waren alle Patienten, die aktuell oder im Vorfeld, Symptome einer Encephalopathie zeigten, männlich. Eine Wendigkeit zum männlichen Geschlecht lässt sich dadurch erahnen, wobei bei einem Verhältnis von 2,4:1 bei den an dieser Studie teilnehmenden Patienten mit KDS auch mehr Jungen vertreten waren. Verlässliche Angaben was das Geschlechterverhältnis beim Kurzdarmsyndrom angeht fehlen bisher. In einer retrospektiven Studie von Wales et al. zum Auftreten eines neonatalen Kurzdarmsyndroms waren 55 % männliche Säuglinge aufgefallen (Wales et al., 2004). In einer Studie von Spencer et al., welche sich über einen Zeitraum von 26 Jahren erstreckte und in die 80 pädiatrische Patienten Einschluss fanden, waren wiederum 54 % der Patienten männlich (Spencer et al., 2005). Insofern scheint insgesamt keine eindeutige Häufung des Auftretens eines Kurzdarmsyndroms hinsichtlich des Geschlechtes zu bestehen.
Bezüglich der Häufigkeit der Grunderkrankungen, die zu einer ausgedehnten Resektion und damit zu einem KDS führen können, variieren die relativen Angaben je nach Erhebung, wobei die Reihenfolgen sich dabei kaum unterscheiden. Absteigend in

ihrer Häufigkeit sind in der Literatur das Auftreten einer Enterocolitis, einer intestinalen Atresie, eines Volvulus, einer Gastroschisis und einer Aganglionose beschrieben (Schwartz 2013; Spencer et al., 2005). Die häufigsten Grunderkrankung der an dieser Studie teilnehmenden Patienten war ein Volvulus mit 35,3 %, gefolgt von der Aganglionose 23,5%. Eine Gastroschisis und eine nekrotisierende Enterocolitis waren jeweils nur einmalig aufgetreten (6%). Insofern waren bei der Häufigkeit der Grunderkrankungen Unterschiede im Vergleich zur Gesamtpopulation der Patienten mit KDS vorhanden. Diese sind sicherlich auf die kleine Studienteilnehmerzahl in dieser Erhebung zurückzuführen. Bei den sechs Patienten die akut oder früher Symptome einer Encephalopathie zeigten, hatten fünf einen Volvulus als Grunderkrankung (83%), einer eine intestinale Atresie. Vergleicht man diese mit den aus der Literatur bekannten Patienten mit D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie, zeigt sich auch hier als häufigste Grunderkrankung ein Volvulus (64 %). Alle anderen Entitäten waren nur einmalig oder zweimalig vorhanden. Insofern scheint das Vorliegen eines Volvulus ein prädisponierender Faktor für das Auftreten einer D-Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie zu sein. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich ein Volvulus, im Vergleich zur Gastroschisis oder einer intestinalen Atresie, oft erst postnatal entwickelt. Der Darm ist damit zum Zeitpunkt der Operation bereits mit einer heterogenen Mikrobiota besiedelt. Jedoch ist auch bei den anderen Grunderkrankungen von einer zügigen Besiedelung des Dünndarmes mit Milchsäurebakterien auszugehen (Arrieta et al., 2014).

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war zunächst die Klärung der Frage, ob Patienten mit KDS tatsächlich häufiger Milchsäurebakterien im Stuhl haben als Kinder ohne KDS und ob die flüssige Konsistenz des Stuhls, wie sie bei Kindern mit KDS fast ausschließlich vorkommt, das Vorkommen von Milchsäurebakterien im Stuhl beeinflusst. Hinweise darauf, dass verschiedene *Lactobacillus* Spezies die Stuhlform beeinflussen können, geben u.a. zwei Studien in denen gezeigt werden konnte, dass *Lactobacillus casei* Kulturen bei einer Obstipation helfen können (Valerio et al., 2010) und *Lactobacillen* bei Patienten mit KDS die Defäkationsfrequenz beeinflussen (Severijnen et al., 2005). Auch dass die Stuhlform Aufschlüsse über die intestinale Transitzeit gibt ist hinreichend bekannt. Dabei zeigt flüssiger Stuhl eine schnellere Transitzeit an (Lewis et al., 1997). Ob jedoch die flüssige Stuhlform, wie sie bei Kindern mit KDS regelhaft zu finden ist, und damit auch die intestinale Transitzeit, Einfluss auf die Ausscheidungshäufigkeit von Milchsäurebakterien hat, ist nicht geklärt. Möglich wäre beispielsweise, dass in flüssigem Stuhl, der den Gastrointestinaltrakt schneller durchwandert, generell mehr Milchsäurebakterien zu finden sind. Damit wären die

bisherigen Ergebnisse, mit einem deutlich höheren Vorkommen von Milchsäurebakterien im Stuhl von Kindern mit KDS im Vergleich zu Kindern ohne KDS, auch durch die Stuhlkonsistenz beeinflusst und würden nicht sicher die tatsächliche Mikrobiota im Restdünndarm der Patienten wiederspiegeln. Um dies zu untersuchen wurden 69 Stuhlproben von Kindern mit und ohne durchfälligen Stuhl gesammelt. In den beiden Gruppen zeigte sich dabei kein eindeutiger Hinweis auf einen Unterschied was die Häufigkeit an Stuhlproben ohne Milchsäurebakterien anging. In der Gruppe der Kinder mit durchfälligem Stuhlgang konnten in 31% der Stuhlproben keine Milchsäurebakterien nachgewiesen werden, in der Gruppe der Kinder ohne gastrointestinale Symptomatik waren 38% frei von Milchsäurebakterien. Hinsichtlich des Alters der beiden Gruppen gab es dabei keine Unterschiede. Der Median lag bei beiden bei 6 Jahren. In der Geschlechterverteilung beider Gruppen waren jedoch Unterschiede vorhanden, wobei in der Gruppe der Kinder mit normalem Stuhlgang mehr Mädchen und in der Gruppe der Kinder mit durchfälligem Stuhlgang mehr Jungen vertreten waren. Dieser Umstand konnte jedoch vernachlässigt werden, da davon auszugehen ist, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Ausscheidungsrate von Milchsäurebakterien hat. Zusammenfassend wurde dadurch in dieser Untersuchung gezeigt, dass eine flüssige Stuhlkonsistenz nicht zu einer erhöhten Ausscheidungsrate von Milchsäurebakterien führt.

Kombiniert waren in beiden Kontrollgruppen in 33% der Stuhlproben keine Milchsäurebakterien nachzuweisen. Um zu klären ob in den Stuhlproben von Patienten mit KDS häufiger Milchsäurebakterien vorkommen, wurden für diese Arbeit von 18 Patienten mit KDS Stuhlproben gesammelt und auf das Vorhandensein von Milchsäurebakterien untersucht. Dabei wurde dieselbe Methode verwendet die auch zur Untersuchung der Stuhlproben der Kontrollgruppe angewendet wurde: Die Stuhlproben wurden auf MRS- Agar ausgestrichen und für 48 h mikroaerophil inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkulturen wurden, nach weiterer Selektion, mittels PCR, API oder Maldi- TOF identifiziert. Dabei konnten bei 16 der 17 Patienten Milchsäurebakterien nachgewiesen werden. Nur in den Proben eines Patienten waren keine Michsäurebakterien nachweisbar, was in der kleinen Gruppe einer relativen Häufigkeit von 6 % entspricht. Somit war in dieser Studie die Ausscheidungshäufigkeit von Milchsäurebakterien bei Patient mit KDS erwartungsgemäß höher als bei Patienten ohne KDS.

Lediglich bei Patient N1 konnten keine Milchsäurebakterien kultiviert werden. Auf den MRS- Platten wuchsen jedoch Hefepilzkulturen, welche als *Candida glabrata* identifiziert wurden. Auf den parallel durchgeführten Ausstrichen auf Blutagar wuchsen zudem *Pseudomonas aeruginosa* Kulturen. Eine mögliche Ursache für das Fehlen von

Milchsäurebakterien bei dieser Patientin könnte die Angabe im Fragebogen sein, dass das Mädchen rezidivierend Antibiotika und zudem 3 x tgl. drei Tabletten Nephrotrans (Natriumhydrogencarbonat) einnehmen würde. Dabei könnten zum einen durch die rezidivierenden Antibiotikaeinnahmen ein Teil der *Lactobacillen* eliminiert worden sein. Ob und wie die regelmäßige Einnahme von Natriumhydrogencarbonat die Darmmikrobita des Menschen verändert, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Allerdings zeigten Caldarini et al., dass eine pH- Änderung die Aktivität und das Wachstum von *Lactobacillen* durchaus verändert (Caldarini et al., 1996). In der Dentalmedizin gibt es Hinweise darauf, dass die Verwendung von natriumhydrogencarbonathaltiger Zahnpasta zu einer Verminderung von *Lactobacillen* im Speichel führt (Lanza et al., 2000; Legier-Vargas et al., 1995). Denkbar wäre, dass auch bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom durch die Einnahme der Natriumhydrogencarbonat- Tablette der pH- Wert im Darmlumen angehoben wird und somit die azidophilen Milchsäurebakterien schlechter wachsen können. *Candida glabrata* hingegen scheint unter diesen Umständen gute Wachstumsbedingungen vorzufinden. In einem Fallbericht von Bongaerts et al. wurde das Vorkommen von *Candida glabrata* bei einem Patienten mit KDS bereits beschrieben und als möglicher Schutzmechanismus für das Verhindern von D- Laktat- Azidosen diskutiert. Dabei konnte die Hefe in den Intervallen, in denen der Patient keine Azidose hatte, vermehrt nachgewiesen werden. Die Hefe könnte als mikrobiologischer und metabolischer Puffer agieren und somit die Vermehrung von Milchsäurebakterien stören und damit auch das Auftreten von D- Laktat Azidosen verhindern (Bongaerts et al., 2005). Das Fehlen von Milchsäurebakterien im Stuhl des an dieser Studie teilnehmenden Patienten ist somit wahrscheinlich auf die Einnahme der Antibiotika und der Natriumhydrogencarbonat- Tabletten zurückzuführen und wiederlegt nicht die Hypothese, dass alle Patienten mit KDS normalerweise vermehrt Milchsäurebakterien im Darm haben.
Auch unser Patient gab im Fragebogen an, bisher nicht unter Symptomen einer D-Laktat Azidose gelitten zu haben. Somit scheinen die Stuhlprobenergebnisse von Patient N1 die Hypothese von Bongaerts et al. zu bestätigen. Damit könnte die regelmäßige Einnahme von Natriumhydrogencarbonat Tabletten vielleicht auch eine mögliche Therapieoption bei rezidivierenden D- Laktat Azidosen darstellen.

Der Unterschied im Keimspektrum der Stuhlproben von Patienten mit und ohne KDS ließ sich auch durch die WAVE-Analysen zeigen. Dass sich diese Methode zur Detektion verschiedener polymikrobieller Keimspektren eignet, konnte durch Domann et al. gezeigt werden (Domann et al., 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurden

dafür alle Stuhlproben der Patienten mit KDS und 45 Proben der Kontrollgruppe mittels DHPLC analysiert. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in den Peak- Profilen der Patienten mit und ohne KDS. Bongaerts et al. zeigten in einer Studie von 1997 bereits, dass im Stuhl von Patienten mit KDS auch die absolute Menge an *Lactobacillen* deutlich über der von Patienten ohne KDS liegt. In einem Zeitraum von 4 Jahren wurden dabei 24 bzw. 32 Proben von zwei Kindern mit KDS und rezidivierenden D-Laktat Azidosen gesammelt. Außerdem wurden 12 Stuhlproben von erwachsenen Patienten mit KDS und 24 Stuhlproben gesunder Erwachsener untersucht. Dabei lag der Anteil an *Lactobacillen* bei Patienten mit KDS mit 10^{10}-10^{12} KBE/g Stuhl deutlich über dem der Kontrollgruppe, in der nur 10^{8}-10^{10} KBE/g *Lactobacillen* nachgewiesen wurden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach Beginn der oralen Nahrungsaufnahme bei Kindern mit KDS der *Lactobacillen*- Anteil innerhalb von 2- 3 Wochen von <1% auf 60% zunahm (Bongaerts et al. 1997b). Auch Caldarini et al. fanden im Stuhl von asymptomatischen KDS- Patienten eine abnorme Darmmikrobiota, hauptsächlich bestehend aus Gram- positiven Stäbchen mit *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus salivarius* als prädominante Spezies (Caldarini et al. 1996). Unter diesen Vorrausetzungen kann angenommen werden, dass der Shift der in dieser Studie festgestellten Peak-Profile in den WAVE- Analysen durch die höhere Anzahl an *Lactobacillen* verursacht wird.

Die Darstellung einzelner dominanter Keime mittels DHPLC im Stuhl jener Patienten, die zum Probeabnahmezeitpunkt unter einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie litten, gelang in dieser Untersuchung jedoch nicht. Eine mögliche Interpretation der Ergebnisse wäre eine ausgeglichene Anzahl verschiedener *Lactobacillen*, ohne dass eine bestimmte Spezies die anderen überwiegt. Jedoch ist auch denkbar, dass die Amplifikationen aufgrund der hohen Dichte von DNA Bruchstücken verschiedenster Bakterien in Stuhl nicht hinreichend funktioniert, um eine Quantifizierung ableiten zu können. Mit der Wiederholung der Versuche mit anderen, *Lactobacillen* spezifischen Primern, könnte diese These vielleicht besser geprüft werden.

Untersucht wurde in dieser Arbeit zudem, ob Patienten mit KDS auch vermehrt verschiedene Milchsäurebakterienspezies im Stuhl haben als Patienten ohne KDS. Dabei wurden in den Kontrollgruppen im Mittel nur 1,5 verschiedene Arten isoliert. Maximal waren bei einem Patienten vier verschiedene Milchsäurebakterien gefunden worden. Im Vergleich dazu wurden bei den Patienten mit KDS im Mittel 3,3 verschiedene Spezies gefunden. Bei einem Patienten wurden dabei sechs verschiedene *Lactobacillen* isoliert. Somit zeigte sich eine breitere Speziesvielfalt an

Milchsäurebakterien bei Patienten mit KDS. Es muss jedoch beachtet werden, dass von den Patienten mit KDS jeweils drei und in der Kontrollgruppe je nur eine Stuhlprobe pro Patient untersucht wurden. Jedoch wurden in allen Proben der Patienten mit KDS, respektive Patient N1, der in keiner der drei Proben Milchsäurebakterien hatte, Milchsäurebakterien nachgewiesen, wenn auch nicht immer dieselben. Das Ergebnis, was die Anzahl gefundener Bakterien pro Patient betrifft, kann dadurch jedoch zugunsten der Patienten mit KDS verfälscht sein.
Insgesamt wurden in den Stuhlproben der Kinder der Kontrollgruppe und der Kinder mit KDS 25 verschiedene Milchsäurebakterienspezies gefunden. Dabei war *Lactobacillus kitasatonis* mit 56, 25% der am häufigsten isolierte Keim bei Patienten mit KDS. In der Kontrollgruppe war dieser Keim nur bei 4,35% der Kinder zu finden. Der häufigste Keim in der Kontrollgruppe war *Lactobacillus paracasei*. Hierzu muss angeführt werden, dass die Genomunterschiede innerhalb der *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus casei* Gruppe, wie sie bei der Identifizierung mittels Sequenzierung aber auch bei der MALDI-TOF Analyse verwendet werden, sehr gering sind und auch die Fermentatiosanalysen mittels API nicht immer Unterschiede innerhalb dieser Gruppe zeigen (Vásquez et al., 2005). Ähnlich verhält es sich bei der Identifizierung von *Lactobacillus oris/antri* und *Lactobacillus pontis/panis*. Auch hier konnte mittels der gewählten Identifikationsmethoden keine sichere Zuordnung erzielt werden. Dies erklärt auch, warum *Lactobacillus casei* im Rahmen dieser Studie nicht identifiziert werden konnte: Auch die beiden aus den Probiotika isolierten *Lactobacillen* wurden, nicht wie vom Hersteller beschrieben als *Lactobacillus casei*, sondern als *Lactobacillus paracasei* identifiziert. Insofern ist das häufige Vorkommen von *Lactobacillus paracasei* in dieser Studie auch darauf zurückzuführen, dass sich innerhalb dieser Gruppe mehrere verschiedene Spezies befinden mögen. Insgesamt deckt sich das Ergebnis mit *Lactobacillus paracasei* als häufigstes Milchsäurebakterium in den Stuhlproben der Kontrollgruppe (25%) jedoch mit einer Studie bestehend aus 112 schwedischen Kindern, bei denen ebenfalls am häufigsten *Lactobacillus paracasei* (22%) nachgewiesen werden konnte (Ahrné et al., 2005).

Unter der bestätigten Voraussetzung, dass alle Patienten mit KDS eine übermäßige Besiedelung mit Milchsäurebakterien haben, war ein zentrales Anliegen dieser Arbeit die Untersuchung der Frage, ob einzelne dieser Bakterien vermehrt D-Laktat produzieren und somit als mögliche Ursache für die Entstehung einer D- Laktat Azidose bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom in Frage kommen. Um dies zu untersuchen wurden die aus den Stuhlproben isolierten Milchsäurebakterien auf ihre Laktatproduktion getestet. Dafür wurde jedes Bakterium für mindestens 30 h in

Flüssigmedium kultiviert. Bis zum Erreichen der stationären Phase wurden mehrfach Proben entnommen und mittels eines Enzymtestes die produzierten Mengen an D- und L- Laktat bestimmt. Anschließend wurden die Ergebnisse mit den Angaben der Patienten in einem Fragebogen zu neurologischen Symptomen verglichen und ein möglicher Zusammenhang erörtert.

In den Stuhlproben der teilnehmenden Kinder konnten insgesamt 24 verschiedene Michsäurebakterien isoliert werden, 22 *Lactobacillen*- und zwei *Pediococcus*- Spezies. Ob damit tatsächlich alle im Darm der Patienten vorkommenden Milchsäurebakterien gefunden wurden ist fraglich, da die angewendete Methode sicher nicht für alle Spezies ideale Wachstumsbedingungen bot. So wäre vielleicht die Inkubation unter anaeroben Bedingungen eine Möglichkeit gewesen, weitere Milchsäurebakterien zum Wachstum anzuregen. In den Vorversuchen dieser Studie zeigten sich allerdings bei Versuchen mit ausgewählten Milchsäurebakterien aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Universität Gießen keine Unterschiede im Wachstum unter aeroben und anaeroben Bedingungen, weshalb aus praktischen Gründen die Inkubation unter aeroben Bedingungen mit 5% CO_2- Atmosphäre gewählt wurde.

Auch der Versand der Stuhlproben der Patienten mit KDS per Post und der damit verbundene verzögerte Ausstrich von ca. 2- 3 Tagen nach Abgabe der Stuhlprobe, kann dazu geführt haben, dass einige eigentlich im Stuhl vorhandene Milchsäurebakterien nicht mehr zum Wachstum angeregt werden konnten.

Nichts desto trotz konnten im Rahmen dieser Arbeit die bisher größte Anzahl verschiedener Milchsäurebakterien aus Stuhlproben von Kindern mit KDS isoliert werden. Insgesamt stammten 20 der 23 Milchsäurebakterien- Spezies, die auf ihre Laktatproduktion getestet wurden, von Kindern mit KDS. Lediglich *Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus ruminis*, sowie *Pediococcus pentosaceus* stammten von Kindern aus der Kontrollgruppe.

Von entscheidendem Interesse war nun die Frage, in welcher isomeren Form das Laktat von den Milchsäurebakterien produzieren wird, und ob es Unterschiede in den produzierten Mengen gibt. Dabei konnte bei allen Michsäurebakterien eine Laktatproduktion festgestellt werden. Lediglich die Anzucht von *Lactobacillus curvatus* im Rahmen der Laktattestreihe gelang aus ungeklärten Gründen nicht. In der Literatur ist er jedoch als Racemat- Bildner beschrieben (Stetter et al.,1973).

Anhand ihrer Laktatproduktion konnten die Michsäurebakterien in drei Hauptgruppen unterteilt werden: Reine D- Laktat-, reine L- Laktat und Racemat- Bildner. Letztere Gruppe konnte noch in die drei Untergruppen mit vermehrter D- Laktatproduktion, ausgeglichener Laktatproduktion und vermehrter L- Laktatproduktion unterteilt werden. Dabei zeigten 19 Bakterien die Fähigkeit D- Laktat zu produzieren. Lediglich vier

Bakterien produzierten mit 90% fast ausschließlich L- Laktat: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis* und *Lactobacillus salivarius*. Beide aus den probiotischen Jogurt- Drinks isolierte Milchsäurebakterien (*Lactobacillus paracasei*) waren ebenfalls reine L- Laktat Produzenten. *Lactobacillus paracasei* zeigte sich auch absolut als potentester L- Laktat Produzent.
Die größte Gruppe war die der Racemat Produzenten. Dabei produzierten je drei Bakterien vermehrt D- bzw. L- Laktat, elf stellten beide Laktat- Isomere zu ungefähr gleichen Anteilen her.
Lediglich *Lactobacillus delbrueckii* produzierte ausschließlich D- Laktat. Auch absolut bildete *Lactobacillus delbrueckii* am meisten D- Laktat.
Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Ergebnissen von Stetter und Kandler, die in ihrer Arbeit von 1973 die D + L- Laktatproduktion verschiedener Lactobacillen beschrieben (Stetter et al., 1973).

Als mögliche Ursache für das Auftreten einer D- Laktat- Azidose wurden immer wieder das Vorkommen einzelner Milchsäurebakterien im Stuhl symptomatischer Patienten diskutiert. In den für diese Arbeit gesichteten Artikeln wurde dabei *Lactobacillus acidophilus* bei sechs Patienten und *Lactobacillus fermentum* bei fünf Patienten mit dem Auftreten einer Encephalopathie in Verbindung gebracht. (Satoh et al., 1982; Perlmutter et al., 1983; Mayne et al., 1990; Day et al., 1999; Dahhak et al., 2008; Bongaerts et al., 1997b). Bei je einem Patient wurden *Lactobacillus buchneri* (Satoh et al., 1982) und *Lactobacillus rhamnosus* (Haan et al., 1985) isoliert. Bei zwei Patienten war *Lactobacillus delbrueckii* mit der Entstehung einer D- Laktat Azidose in Verbindung gebracht worden. Bei einem der Patienten war *Lactobacillus delbrueckii* dabei in einem Probiotikum enthalten, welches der Patient zu sich genommen hatte (Munakata et al., 2010). Dass das Milchsäurebakterium nach dem Konsum von *Lactobacillus delbrueckii* haltigem Jogurt auch im Stuhl nachweisbar sein kann, wurde in zwei Studien mit zwanzig bzw. 13 gesunden Probanden gezeigt (Elli et al., 2006; Mater et al., 2005).
Im zweiten Fallbericht, in dem *Lactobacillus delbrueckii* im Zusammenhang mit der Entstehung einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie genannte wurde, konnte die Spezies auch tatsächlich aus dem Stuhl des Patienten isoliert werden (Kaneko et al., 1997). Auch die beiden zum Abgabezeitpunkt symptomatischen Kinder mit KDS dieser Studie hatten *Lactobacillus delbrueckii* im Stuhl.
Lactobacillus fermentum hingegen konnte im Rahmen dieser Studie bei keinem Probanden isoliert werden. Ob dies an der Kultivierungsmethode dieser Arbeit lag oder ob der Keim tatsächlich nicht in den Stuhlproben vorhanden war, bleibt offen. In einer Studie von Rubio et al. konnte *Lactobacillus fermentum* immerhin bei 9% der Patienten

gefunden werden, wobei es sich dabei um Säuglinge bis zu einem Alter von 6 Monaten handelte, die ausschließlich mit Milchnahrung ernährt wurden (Rubio et al., 2014). Auch in einer weiteren Studie bei Kindern unter zwei Jahren konnte das Bakterium im Stuhl der Kinder gefunden werden, wenn auch weniger häufig (Arici et al., 2004). In der Studie von Ahrné et al. mit Stuhlproben von 112 schwedischen Kindern konnte *Lactobacillus fermentum* ebenfalls häufig bei Säuglingen isoliert werden. Dabei verschwand der Keim aber aus dem Stuhl der Patienten ab einem Alter von 18 Monaten (Ahrné et al., 2005). Möglich wäre also auch, dass *Lactobacillus fermentum*, abhängig von der sicher unterschiedlichen Ernährung der älteren Kinder in dieser Studie, tatsächlich nicht mehr so häufig im Stuhl vorhanden war.

Auch *Lactobacillus buchneri* konnte in den Stuhlproben der an dieser Studie teilnehmenden Kinder nicht nachgewiesen werden. Bei Rubio et al. und Ahrné et al. war er ebenfalls nicht nachzuweisen. In einer weiteren Studie von Arici et al. konnten jedoch zwei Stämme aus dem Stuhl von gesunden Kindern unter zwei Jahren isoliert werden (Arici et al., 2004).

Als möglicher Auslöser einer D- Laktat Azidose kommen jedoch sowohl *Lactobacillus fermentum* als auch *Lactobacillus buchneri* in Frage, da sie beide ein Racemat aus D- und L- Laktat herstellen können (Johanningsmeier et al., 2013; Stetter er. al.,1973).

Die anderen beiden Bakterien, die in den bisher veröffentlichten Fallberichten bei Kindern mit KDS mit dem Entstehen ein D- Laktat Azidose in Verbindung gebracht wurden, *Lactobacillus rhamnosus* und *Lactobacillus acidophilus*, wurden in dieser Studie sowohl aus Stuhlproben von Patienten mit Kurzdarmsyndrom als auch aus Stuhlproben von Kindern der Kontrollgruppe isoliert. *Lactobacillus rhamnosus* war bei 9% der Kinder ohne KDS und 25 % der Kinder mit KDS zu finden. In der Laktattestung zeigte das Bakterium eine reine L- Laktat Produktion. Insofern dürfte *Lactobacillus rhamnosus* bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose keine Rolle spielen.

Lactobacillus acidophilus wurde ebenfalls bei einem Patienten mit KDS und einem Patienten der Kontrollgruppe isoliert. In der Laktattestreihe produzierte er ein Racemat aus D- und L- Laktat, wobei mehr L- Laktat produziert wurde. Insofern hat *Lactobacillus acidophilus* die Fähigkeit D- Laktat zu produzieren und kommt damit als möglicher auslösender Faktor bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie in Frage. In dieser Studie wurde der Keim allerdings bei einem Patient gefunden, der im Fragebogen das Auftreten von neurologischen Symptomen verneinte. Dahingegen war *Lactobacillus acidophilus* der am häufigsten isolierte Keim bei symptomatischen Patienten in den bisher veröffentlichten Fallberichten. Der Patient in unserer Studie war jedoch auch deutlich älter als die Patienten in den bisherigen Fallberichten. Bereits Bongarts et al. postulierten einen Zusammenhang mit einer

erhöhten Enzymaktivität der D-2-Hydroxyacid- Dehydrogenase beim erwachsenen Patienten und damit verbunden einem schnelleren und besseren D-Laktatmetabolismus (Bongaerts et al., 1997a). Dies würde auch erklären warum der Keim, der genauso wie *Lactobacillus delbrueckii* bei erwachsenen Patienten mit KDS sehr häufig vorkommt (Mayeur et al., 2013), ausgehend von einer ständigen D-Laktatproduktion, bei unserem Patienten keine Symptome hervorgerufen hat.

Lactobacillus delbrueckii wurde in dieser Studie aus vier Stuhlproben isoliert. Bei drei Patienten mit KDS und einem Patienten der Kontrollgruppe. Dabei konnte keine 100% Einordnung bezüglich der Subspezies getroffen werden. Zu über 97% wurde die isolierten DNA- Sequenz der Spezies *Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus* zugeordnet. Damit ist es in dieser Studie zum ersten Mal gelungen, *Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus* aus Stuhl zu isolieren. Bisher wurde die erst 2005 beschriebene Subspezies nur aus indischen Milchprodukten gewonnen (Dellaglio et al., 2005). Möglich wäre jedoch auch, dass im Rahmen dieser Arbeit die Isolation einer oder mehrerer neuer Subspezies gelungen ist.

Zwei der Kinder mit KDS die *Lactobacillus delbrueckii* im Stuhl hatten (N15 und N17) machten im Fragebogen eindeutige Angaben zu zeitgleichem Auftreten neurologischer Symptome bei Entnahme der Stuhlprobe. Beide Patienten hatten eine ungewöhnlich starke und zunehmende Schläfrigkeit und eine Störung der Bewegungskoordination. Patient N15 hatte zudem einen torkligen Gang und Patient N17 eine Sprachstörung. In einem Telefonat mit den Eltern beider Patienten wurden die angegebenen Symptome noch einmal bestätigt und zeitgleich aufgetretenes Fieber oder sonstige Auffälligkeiten wurden verneint. Bei beiden hatte die Episode einige Stunden angehalten. Unter Nahrungskarenz waren die Symptome dann wieder ohne weitere Maßnahmen abgeklungen. Die Eltern von Patient N15 gaben an, dass der Junge bereits im Vorfeld zwei Mal unter ähnlichen Episoden gelitten habe. Damals sei Blut abgenommen worden, wobei sich ein Azidose gezeigt habe. Bei Patient N17 war es die erste Episode dieser Art. Die Eltern des Patienten waren über das mögliche Auftreten und die Symptome einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie informiert, weshalb es zu keinem Arztbesuch kam. Der dritte Patient mit KDS, bei dem *Lactobacillus delbrueckii* im Stuhl nachgewiesen wurde, hatte zum Zeitpunkt der Stuhlprobenentnahme keine Symptome, hatte aber laut Fragebogen zweimalige Episoden mit Symptomen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie jeweils nach Absetzen der parenteralen Nahrung.

In der Laktattestreihe war *Lactobacillus delbrueckii* das einzige Bakterium welches nur D- Laktat produzierte. Über den gesamten Zeitraum der Messung wurden nur geringe L- Laktat Mengen gebildet und die produzierten D- Laktat Mengen nahmen auch nach

dem Erreichen der stationären Phase weiter zu. Außerdem produzierte *Lactobacillus delbrueckii* auch die größten Mengen an D- Laktat im Vergleich zu den anderen Spezies. Der Keim produzierte als einziges Bakterium im Rahmen der Testreihe einen Wert von über 200 mmol/l. Die Messung wurde mehrmals wiederholt und zeigte stets ähnliche Ergebnisse. Am zweitmeisten D- Laktat produzierte, mit einem Wert von 142 mmol/l, *Lactobacillus plantarum*. Alle anderen Bakterien bildeten D- Laktat lediglich im zweistelligen Bereich. Insofern zeigte sich *Lactobacillus delbrueckii* als der bei weitem potenteste D- Laktat Produzent.

Da beide Patienten mit akuten Symptomen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie *Lactobacillus delbrueckii* im Stuhl hatten, scheint eine Assoziation mit dem Auftreten des Bakteriums im Stuhl der Patienten und der Entstehung einer D-Laktat Azidose nahezuliegen. Da im Rahmen dieser Studie jedoch keine Laktatwerte in vivo bestimmt wurden, bleibt natürlich die Frage, ob die beiden Patienten tatsächlich ein D- Laktat Azidose hatten. Um sicher zu gehen, wäre eine Blutentnahme oder Urinprobe von Vorteil gewesen. Eine Blutentnahme war aus technischen Gründen nicht möglich, da die Proben ohne vorherigen Arztbesuch per Post zu uns gesendet wurden. Die relativ langen Transportwege hätten sicherlich auch dazu geführt, dass die Laktatwerte im Urin verfälscht gewesen wären. Außerdem konnten Bongaerts und al. zeigen, dass die Konzentration von D- Laktat im Urin bei Kindern mit KDS einem circadianem Rhythmus unterliegt und auch in Phasen ohne Azidose oder Symptomen einer Encephalopathie erhöht sein können, was die Autoren auf das ständige Vorhandensein der intestinalen *Lactobacillen*- Mikrobiota und die Ernährung zurückführten (Bongaerts et al., 1995). Zu erwarten gewesen wären in dieser Studie demnach ebenfalls erhöhte D- Laktat Werte im Urin, auch bei Patienten ohne neurologische Symptome. Betrachtet man die fäkale Milchsäurebakterien- Mikrobiota der an dieser Studie teilnehmenden Patienten mit KDS, so lassen sich bei allen Patienten, bei denen Milchsäurebakterien vorhanden waren, auch D- Laktat Produzenten nachweisen. Insofern hätten uns erhöhte D- Laktatwerte im Urin keine neuen Aufschlüsse darüber gegeben, ob einzelne *Lactobacillen* eine Rolle bei der Entstehung der D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie spielen.

Bei den beiden Kindern die zum Abnahmezeitpunkt akute Symptome einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie zeigten, wurden neben *Lactobacillus delbrueckii* noch weitere Milchsäurebakterien identifiziert. Dabei konnte bei Patient N15 lediglich *noch Lactobacillus mucosae* isoliert werden. In der Laktattestreihe zeigte er eine ausgeglichene Produktion von D- und L- Laktat. *Lactobacillus mucosae* war zudem bei 44 % aller Patienten mit Kurzdarmsyndrom nachgewiesen worden.

Bei Patient N17 wurden neben *Lactobacillus delbrueckii* noch vier weitere Milchsäurebakterien gefunden. Die als *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* und *Pediococcus acidilactici* identifizierten Milchsäurebakterien zeigten eine ausgeglichene Produktion von D- und L- Laktat und der ebenfalls nachgewiesene *Lactobacillus rhamnosus* eine reine Produktion von L- Laktat. *Lactobacillus mucosae* hingegen wurde nicht nachgewiesen.
Bei den beiden Kindern mit akuten neurologischen Symptomen war demnach lediglich *Lactobacillus delbrueckii*, der potenteste und alleinige reine D- Laktat Produzent dieser Testreihe, als gemeinsames Milchsäurebakterium im Stuhl vorhanden.
Warum Patient N11, der ebenfalls zum Abnahmezeitpunkt *Lactobacillus delbrueckii* im Stuhl hatte, keine Symptome zeigte, kann mehrere Gründe haben. Da es nach Absetzten der parenteralen Nahrung beim Patient im Vorfeld zum Auftreten neurologischer Symptome gekommen war, wurde ihm möglicherweise zum Abgabezeitpunkt nur eine geringe Menge enteraler Nahrung zugeführt, weshalb den Milchsäurebakterien wenig Substrat zur Verfügung stand und somit auch die Laktatproduktion eingeschränkt war. Eine Klärung mittels Kontaktaufnahme mit dem Patienten gelang leider nicht. Doch selbst wenn genügend Substrat vorhanden war, handelte es sich bei Patient N11 um einen bereits 29 Jahre alten Mann. Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Altersklasse in einer Untersuchung von Mayeur et al. bereits bei mehreren Patienten mit KDS *Lactobacillus delbrueckii* im Darm nachgewiesen, ohne dass es bei den Patienten zu Symptomen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie gekommen war (Mayeur et al., 2013). Auch bei diesem Patienten könnte die Hypothese der erhöhten Aktivität der für den D- Laktat Abbau im beim Erwachsenen verantwortlichen D-2-Hydroxyacid- Dehydrogenase greifen (Yasuda et al., 1993).

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie sollte zumindest bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom die Aufnahme von *Lactobacillus delbrueckii* in den Gastrointestinaltrakt vermieden werden. Dazu ist es wichtig die Nahrungsmittel, die möglicherweise *Lactobacillus delbrueckii* beinhalten, zu kennen und dementsprechend zu meiden. Dies dürfte sich jedoch als schwierig erweisen. Zum einen wäre eine Kennzeichnungspflicht der verwendeten Bakterien auf Nahrungsmittel nötig, was jedoch für die als apathogen geltenden Milchsäurebakterien bisher nicht nötig ist.
Zum anderen gehört *Lactobacillus delbrueckii* zu den am häufigsten verwendeten Starterkulturen für Milchprodukte (Partanen et al., 2001). Danone, Marktführer für Milchfrischeprodukte in Deutschland, benutzt beispielsweise *Lactobacillus delbrueckii* zusammen mit *Streptococcus thermophilus* als Starterkulturen für ihre Jogurtprodukte.

Insofern dürfte es kaum möglich sein, die Verwendung von Milchprodukten, die sicher keine *Lactobacillus delbrueckii* Kulturen enthalten, zu gewährleisten.

Bei gesunden Kindern wird das vermehrt produzierte D- Laktat der Spezies nicht zu Symptomen führen, da selbst bei Vorhandensein von vermehrtem D- Laktat im Darm gesunder Kinder, ein ausreichende Anzahl D- Laktat konsumierender Bakterien im Darm anzunehmen ist und es somit zu keiner Akkumulation kommt (Bourriaud et al. 2005; Mayeur et al., 2013).

Noch wichtiger als die Kenntnis des Vorkommens von *Lactobacillus delbrueckii* oder anderer D- Laktat produzierender Milchsäurebakterien in „normalen“ Milchprodukten ist jedoch das Wissen über das Vorkommen der Bakterien in Probiotika- Produkten, da die Konzentrationen der verwendeten Kulturen in diesen Produkten ungleich höher sind. Dabei wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass die vom Hersteller beschriebenen beinhalteten probiotischen Kulturen nicht immer mit den tatsächlich vorhandenen Kulturen übereinstimmen (Fasoli et al., 2003; Hamilton-Miller et al., 1996). In einer Studie von Temmerman et al. wurden zehn kommerziell erhältliche probiotische Produkte kulturabhängig und kulturunabhängig auf das Vorhandensein der vom Hersteller deklarierten probiotischen Milchsäurebakterien geprüft. Dabei konnte durch die kulturunabhängige Methode zwar in den meisten Produkten das deklarierte Probiotikum gefunden werden, jedoch waren in vier der Produkte mehr Spezies enthalten als vom Hersteller beschrieben. Dabei waren bei zwei der Produkte *Lactobacillus delbrueckii* gefunden worden , obwohl er nicht als verwendete Kultur auf dem Etikett des Joghurts angegeben wurde (Temmerman et al., 2003).

Auch in der Humanmedizin fehlt den Ärzten häufig das Wissen darüber, ob die von ihnen verwendeten Probiotika D- Laktat produzieren oder nicht (Mack 2004).

Um zu untersuchen, ob der Einsatz von probiotischen Produkten auch bei den an dieser Studie teilnehmenden Kindern mit KDS eine Rolle spielte, wurde im Fragebogen nach der regelmäßigen Einnahme probiotischer Produkte gefragt. Dabei gaben lediglich fünf Patienten an, regelmäßig Probiotika zu sich zu nehmen. Zweimal wurden dabei Produkte mit *Lactobacillus rhamnosus* verwendet, je einmal waren laut Hersteller *Lactobacillus casei* und *Bifidobacterium* Kulturen beinhaltet. Einmal wurde ein probiotisches Produkt mit *E.coli* verwendet. Keines der angegeben probiotischen *Lactobacillus*- Spezies konnte aus dem Stuhl der entsprechenden Patienten isoliert werden. Somit ist von einem Einfluss der Probiotikums auf die Darmflora der Patienten nicht auszugehen.

Im Rahmen der Laktattestreihe konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus rhamnosus* und der aus einem Actimel- Joghurt isolierte Stamm *Lactobacillus paracasei* ausschließlich L- Laktat produzieren. Insofern scheint die Verwendung von Probiotika,

die diese beiden Spezies enthalten, unbedenklich. Jedoch muss erneut bedacht werden, dass in vielen der probiotischen Produkte neben den deklarierten Milchsäurebakterien noch weitere enthalten sind. Temmerman et al. zeigten zudem, dass aus Actimel- Joghurt kulturabhängig zwar nur *Lactobacillus casei* isoliert werden konnte, in der kulturunabhängigen Methode wurde jedoch zusätzlich *Lactobacillus delbrueckii* gefunden. Lediglich zwei probiotische Produkte zeigten sowohl in der kulturabhängigen als auch in der kulturunabhängigen Methode dieselben vom Hersteller deklarierten Probiotika. Eines davon war Yakult. Das deklarierte Bakterium war *Lactobacillus casei*. Auch in dieser Studie wurden die Milchsäurebakterien aus Yakult isoliert. Dabei war ebenfalls nur eine *Lactobacillus* Spezies in dem Joghurt Drink gefunden worden. Diese wurde im Rahmen der verwendeten Methoden als *Lactobacillus paracasei* identifiziert, wobei dabei jedoch wie erwähnt die Genomähnlichkeit von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus paracasei* eine sichere Unterscheidung nicht möglich machte, sodass es sich bei der gefundenen Spezies wahrscheinlich um die von Yakult als Kultur verwendete Spezies handelte (Vásquez et al., 2005). In der Laktattestreihe zeigte der aus Yakult isolierte Keim ein sehr gutes Wachstum und produzierte in großen Mengen ausschließlich L- Laktat. Insofern scheint der Konsum von Yakult für Kinder mit KDS unbedenklich zu sein.

Takahashi et al. behandelten einen Patienten, der rezidivierend unter D- Laktat Azidosen litt, mit einer Kombination aus einem Probiotikum und einem Prebiotikum. Nach einer exzessiven antibiotischen Therapie mit vier verschiedenen Antibiotika über 10 Tage und ausschließlicher parenteraler Ernährung zeigte der Patient trotz allem weiterhin erhöhte D- Laktat Werte im Stuhl, weshalb die Autoren zu dem Schluss kamen, dass eine komplette Elimination der D- Laktat bildenden Bakterien im Darm des Patienten nicht möglich war und stattdessen ein Unterdrückung der D- Laktat produzierenden Bakterien anzustreben sei. Sie begannen deshalb, zur Neukolonisierung des Darmes mit L- Laktat produzierenden Bakterien, dem Patienten *Lactobaillus casei Shirota*, enthalten in Yakult, sowie *Bifidobakterium breve* enteral zuzuführen. Zudem wurde ein Prebiotikum verabreicht. Die Therapie wurde vier Wochen unter alleiniger parenteraler Ernährung durchgeführt. Nach den vier Wochen zeigte sich zwar ein Anstieg der D- Laktat Konzentration im Stuhl, der sich nach Wiederbeginn der enteralen Ernährung noch verdreifachte, jedoch traten keine weiteren D- Laktat Azidosen mehr auf. Als Nebeneffekt berichtete der Patient, der vor der Therapie eher unter einer Obstipation zu leiden hatte, über eine Zunahme der Defäkationsfrequenz (Takahashi et al., 2013). Die Autoren führten die erfolgreiche Therapie auf eine Zunahme der intestinalen Motilität durch den Einsatz von Synbiotika und die dadurch schnelleren Elimination von D- Laktat über den Stuhl des Patienten

zurück. Möglich wäre auch eine Verdrängung von D- Laktat am Transporter durch die Darmwand durch das nun ebenfalls vermehrt produzierte L- Laktat von *Lactobacillus casei*. Insgesamt scheint die Begleittherapie von rekurrierenden D- Laktat Azidosen mit Yakult jedoch vielversprechend zu sein.

Auch Bustos et al. berichteten über erhöhte D- Laktat Konzentration im Stuhl von Patienten mit KDS, ohne dass es zu einer Erhöhung der D-Laktat Werte im Serum oder gar zu Symptomen einer D- Laktat Azidose gekommen war (Bustos et al., 1994). Die Autoren postulierten deshalb ebenfalls, dass die Entstehung einer D- Laktat Azidose nicht alleinig durch eine Überproduktion von D- Laktat im Darm entsteht, sondern weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Diese Einschätzung kann durch die im Rahmen dieser Studie erhoben Ergebnisse unterstützt werden. Alle Patienten mit KDS, bei denen Milchsäurebakterien im Stuhl nachweisbar waren, hatten auch D-Laktat bildende Spezies im Stuhl. Dennoch hatten viele Patienten noch nie unter den Symptomen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie gelitten. Dabei spielen sicherlich spezifische D- Laktat produzierende Bakterien im Darm, wie z.B. im Rahmen dieser Studie *Lactobacillus delbrueckii,* eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie. Die alleinige Anwesenheit von D- Laktat produzierenden Milchsäurebakterien führt jedoch nicht in jedem Fall zu einer D- Laktat Azidose. Mayeur et al. zeigten im Rahmen ihrer Untersuchung der D/L- Laktat- Ratio bei erwachsenen Patienten mit KDS, dass trotz gleicher Variabilität an Milchsäurebakterien, darunter auch *Lactobacillus delbrueckii*, nicht alle Patienten mit KDS dazu neigen, D- Laktat im Stuhl anzureichern (Mayeur et al., 2013). Neben der bereits erwähnten Aktivität der D-2-Hydroxy- Acid-Dehydrogenase, möglicherweise vermindert durch eine Hepatopathie im Rahmen der parenteralen Ernährung, muss auch die intestinale Motilität sowie die Durchlässigkeit und der Transportmechanismus von D- Laktat durch die Darmmukosa bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose berücksichtigt werden. Eine weitere entscheidende Rolle mögen zudem D- Laktat konsumierende Bakterien im Darm der Patienten mit KDS spielen. Das alleinige Vorkommen bestimmter Milchsäurebakterien im Stuhl der Patienten kann deshalb nicht klären, warum manche Patienten mit KDS eine D- Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie entwickeln und andere nicht.

Im Kindesalter wurden bisher lediglich vier Bakterien beschrieben, die im Stuhl von Patienten mit D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie isoliert wurden und für deren Entstehung mit verantwortlich gemacht wurden. Berücksichtigt man die Theorie der reduzierten Aktivität der D-2-Hydroxy- Acid- Dehydrogenase im Kindesalter sowie das mögliche Fehlen von D- Laktat konsumierenden Bakterien im Darm von Kindern mit KDS, scheint jedoch vielleicht zumindest im Kindesalter die Anwesenheit von

bestimmten Milchsäurebakterien Spezies, wie z.B. *Lactobacillus delbrueckii,* ein Risikofaktor für das Entstehen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie darzustellen.
Im Rahmen dieser Untersuchung wurden weitere Risikofaktoren, die das Auftreten einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie im Kindesalter begünstigen können, gesammelt. Dabei scheinen männliche Patienten mit ca. 5 Jahren, die aufgrund eines Volvulus an einem KDS leiden und Probiotika zu sich nehmen, die D-Laktat produzierende Milchsäurebakterien enthalten, ein höheres Risiko zu haben eine D- Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie zu entwickeln.

Als Fazit dieser Arbeit kann eine mögliche Vorgehensweise zur Prophylaxe des Auftretens rezidivierender D- Laktat Azidosen im Kindesalter vorgeschlagen werden.
Zunächst müssen Eltern und betreuende Ärzte von Kindern mit Kurzdarmsyndrom über das Krankheitsbild, deren Ursache und mögliche Symptome aufgeklärt werden. Wichtig sind dabei Information darüber, welche Produkte D- Laktat bildende *Lactobacillen* enthalten könnten und somit vermieden werden sollten. Die betreuenden Ärzte müssen beim Einsatz von Probiotika kritisch hinterfragen ob, die im Allgemeinen als apathogen geltenden enthaltenden Milchsäurebakterien, tatsächlich keine Gefahr für den Patienten darstellen. Dabei sollten insbesondere Probiotika, die D- Laktat bildende *Lactobacillen* enthalten, nicht verabreicht werden.
Kinder mit Kurzdarmsyndrom könnten auf das Vorkommen bestimmter Arten von D-Laktat produzierenden Milchsäurebakterien gescreent werden. Als Methode der Wahl kann der Ausstrich einer Stuhlprobe auf MRS-Agar und deren Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 und die anschließende Identifizierung der gewachsenen Kulturen mittels MALDI- TOF dienen. Sind dabei bekannte D- Laktat produzierende Milchsäurebakterien, wie z.B. *Lactobacillus delbrueckii,* nachweisbar, sollten Eradikationsmaßnahmen mittels Antibiotika ergriffen werden.
Da das Vorhandensein von L- Laktat bildenden Milchsäurebakterien möglicherweise das übermäßige Wachstum D- Laktat produzierender *Lactobacillen* einschränken kann, sollte der Aufbau einer Darmmikrobiota mit L- Laktat produzierenden Milchsäurebakterien mittels Synbiotika, welche z.B. *Lactobacillus casei* enthalten, begonnen werden.
Auch der Einsatz von oral verabreichten Hefepilzkulturen wie z.B. *Candida glabrata* kann versucht werden, um das Wachstum von D- Laktat bildenden *Lactobacillen* einzuschränken.

Durch die Kombination dieser Maßnahmen könnte das Auftreten von rezidivierenden D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathien bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom vermieden werden.

5 Zusammenfassung

Die D- Laktat Azidose assoziierte Encephalopathie ist eine wenig bekannte Komplikation, welche im Rahmen eines Kurzdarmsyndroms auftreten kann. Als Ursache gilt eine Fehlbesiedelung des verkürzten Dünndarmabschnittes mit D- Laktat produzierenden Milchsäurebakterien. Im Vergleich zu dem im Rahmen der Glykolyse anfallenden L- Laktat, hat der menschliche Körper nur wenige Kapazitäten, D- Laktat abzubauen. Das vermehrt anfallende D- Laktat im Darm der Patienten mit Kurzdarmsyndrom führt nach Resorption zu einer Azidose im Blut. Dabei können neurologische Symptome auftreten, die denen eines alkoholisierten Menschen gleichen. Betroffene Patienten leiden unter zeitlich begrenzten und meist selbstlimitierenden Phasen von Apathie, Störungen der Bewegungskoordination, verwaschener Sprache oder Konzentrationsstörungen. Trotz angenommener Überwucherung des Dünndarms mit Milchsäurebakterien bei allen Patienten mit Kurzdarmsyndrom, entwickelt nur ein kleiner Teil der Patienten tatsächlich Symptome einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie.

In dieser Arbeit wurde die Rolle verschiedener Milchsäurebakterien bei der Entstehungen einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie bei Kindern mit Kurzdarmsyndrom evaluiert. Dazu wurden von 18 Patienten mit Kurzdarmsyndrom Stuhlproben gesammelt und mittels eines Fragebogens das Auftreten von neurologischen Symptomen festgestellt. Durch Vergleich mit einer Kontrollgruppe mit Kindern ohne Kurzdarmsyndrom wurde gezeigt, dass in den Stuhlproben von Kindern mit Kurzdarmsyndrom tatsächlich häufiger Milchsäurebakterien zu finden waren. Des Weiteren wurde die D- und L- Laktat Produktion der aus den Stuhlproben isolierten Milchsäurebakterien gemessen und die Ergebnisse mit den Angaben im Fragebogen korreliert. Dabei gaben zwei Patienten während der Stuhlprobenabgabe akute Symptome einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie an. Im Stuhl beider Patienten konnte *Lactobacillus delbrueckii* identifiziert werden, welcher sich in der Laktattestung als potentester D- Laktat Produzent zeigte. Die Ergebnisse wurden mit den bisher in der Fachliteratur veröffentlichten Fallberichten verglichen. Dabei zeigte sich, dass *Lactobacillus delbrueckii* möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie im Kindesalter spielen könnte. Desweiteren wurden mögliche weitere Risikofaktoren, die das Auftreten einer D- Laktat Azidose assoziierten Encephalopathie im Kindesalter begünstigen können, evaluiert und eine mögliche Vorgehensweise zur Prophylaxe rezidivierender D- Laktat Azidosen im Kindesalter vorgeschlagen.

Summary

The D-lactic acidosis associated encephalopathy is a little- known complication which can appear within the course of a short bowel syndrome. A false settlement of the shortened small bowel segment with D-lactate producing lactic acid bacteria is proposed to be the cause of this complication. In comparison to L-lactate, which is produced during glycolysis, the human body has only low capacities to metabolize D-lactate. Therefore, after resorption, the elevated D-lactate- concentration in the bowel of the patients with short bowel syndrome leads to metabolic acidosis. During acidosis, neurological symptoms similar an alcohol intoxication may appear. Affected patients suffer from temporary and mostly self-limiting phases of apathy, gait disturbances, a slurred speech and drowsiness.

In spite of the widely accepted hypothesis that the small intestine is overgrown with lactic acid bacteria in all patients with short bowel syndrome, only a small part of the patients really develop symptoms of a D-lactic acidosis associated encephalopathy.

In this paper, the role of different lactic acid bacteria in the stool of children with short bowel syndrome suffering from D-lactate acidosis associated encephalopathy was evaluated. Therefore, stool samples of 18 patients with a short bowel syndrome were collected and by means of a questionnaire and telephone interview the appearance of symptoms of a D-lactic acidosis associated encephalopathy were evaluated.

In a comparison to a control group consisting of children without short bowel syndrome it was shown, that in the stool samples of children with short bowel syndrome, lactic acid bacteria were found more frequently than in stool samples of the control group indeed.

Afterwards, the D-and L-lactate production of the lactic acid bacteria that had been isolated from the stool samples were measured and the results were compared to the information given by the patients in the questionnaire. Besides, two patients showed acute symptoms of a D-lactic acidosis associated encephalopathy during their stool sample delivery. In these stool samples of both patients *Lactobacillus delbrueckii*, which appeared to be the most potent D-lactate producer, could be identified. The results of this analysis were compared to the case reports that have been published in the medical literature until now. Obviously, *Lactobacillus delbrueckii* appeared to play a crucial role in the origin of a D-lactic acidosis associated encephalopathy during infancy.

Furthermore, other risk factors, which may possibly favour the appearance of a D-lactic acidosis associated encephalopathy during infancy, were evaluated and a suggestion for the early diagnosis of affected children was submitted.

6 Abbildungsverzeichnis + Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Gelelektrophorese: 15
Abbildung 2: DNA- Konzentrationsbestimmung mit NanoDrop® Spektralphotometer. . 16
Abbildung 3:Biochemische Identifizierung mittels API® CH 50 18
Abbildung 4: Maxwell® 16 MDx Aufreinigungsystem 19
Abbildung 5: Reagenzgläser mit MRS- Flüssigmedium. 21
Abbildung 6: Grunderkrankungen der Patienten mit D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie und KDS aus der Literatur 23
Abbildung 7: Grunderkrankungen der Patienten mit KDS aus dieser Studie 27
Abbildung 8: Vorkommen von Milchsäurebakterien bei Patienten mit KDS in dieser Studie 28
Abbildung 9: Vorkommen von Milchsäurebakterien bei Kindern mit Diarrhoe und ohne gastrointestinale Symptomatik 29
Abbildung 10: Vorkommen von Milchsäurebakterien der gesamten Kontrollgruppe ... 30
Abbildung 11: Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien bei KDS Patienten .. 32
Abbildung 12: Spektrum der identifizierten Milchsäurebakterien der Patienten ohne gastrointestinale Symptomatik. 33
Abbildung 13: Spektrum d. identifizierten Milchsäurebakterien d. Kinder mit Diarrhoe 34
Abbildung 14: Relative Häufigkeit des Vorkommens einzelner Milchsäurebakterien in allen Gruppen 35
Abbildung 15: Auswahl DHPLC- Analysen. 37
Abbildung 16: Übereinandergelegte DHPLC- Analysen 38
Abbildung 17: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus acidophilus* 39
Abbildung 18: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus amylovorus* 39
Abbildung 19: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus alimentarius* 40
Abbildung 20: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus brevis* 40
Abbildung 21: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus crispatus* 40
Abbildung 22: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus delbrueckii* 41
Abbildung 23: D + L -Laktatkonzentration von *Lactobacillus frumenti* 41
Abbildung 24: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus gasseri* 41
Abbildung 25: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus johnsonii* 42
Abbildung 26: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus kitasatonis* 42
Abbildung 27: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus mucosae* 42
Abbildung 28: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus oris/antri* 43
Abbildung 29: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus paracasei* 43
Abbildung 30: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus parakefiri* 43
Abbildung 31: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus pentosus* 44

Abbildung 32: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus plantarum* 44
Abbildung 33: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus pontis/panis* 44
Abbildung 34: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus reuteri* 45
Abbildung 35: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus rhamnosus* 45
Abbildung 36: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus ruminis* 45
Abbildung 37: D- + L- Laktatkonzentration von *Lactobacillus salivarius* 46
Abbildung 38: D- + L- Laktatkonzentration von *Pediococcus acidilactici* 46
Abbildung 39: D- + L- Laktatkonzentration von *Pediococcus pentosaceus* 46
Abbildung 40: D- + L- Laktatkonzentration der isolierten Actimel- Kultur 47
Abbildung 41: D- + L- Laktatkonzentration der isolierten Yakult- Kultur 47
Abbildung 42: Schematische Darstellung der D + L-Laktatproduktion aller isolierten Milchsäurebakterien. 48
Abbildung 43: Risikoprofil für die Entstehung einer D- Laktat assoziierten Encephalopathie 51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Fallberichte zum Thema D- Laktat Azidose assoziierter Encephalopathie bei Kindern mit KDS 22
Tabelle 2: Altersverteilung in den Fallberichten 23
Tabelle 3: Geschlechtsverteilung in den Fallberichten 23
Tabelle 4: Altersverteilung der Patienten mit KDS in dieser Studie 24
Tabelle 5: Geschlechtsverteilung der Patienten mit KDS in dieser Studie 24
Tabelle 6: Altersverteilung der Patienten in der Kontrollgruppe 25
Tabelle 7: Geschlechtsverteilung in den Kontrollgruppen 25
Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Fragebögen ... 26
Tabelle 9: Anzahl identifizierter Milchsäurebakterien in den Stuhlproben 31
Tabelle 10: Tabellarische Zuordnung der identifizierten Michsäurebakterien zu den Patienten mit KDS 36
Tabelle 11: Tabellarische Einteilung der gefunden Michsäurebakterien anhand deren Laktatproduktion 49

7 Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cfu	colony forming units
dest.	destilliert
DHPLC	Denaturating High Performance Liquid Chromatography (Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonucleinsäue)
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
e.V.	eingetragener Verein
HCl	Chlorwasserstoffsäure
kb	Kilo-Basenpaare
KBE	koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
KDS	Kurzdarmsyndrom
K.i.s.E	Kinder in schwierigen Ernährungsituationen
KOH	Kaliumhydroxid
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Matrix-unterstütze Laserdesorptions/Ionisations- Flugzeit-Massenspektrometrie)
Mb	Mega- Basenpaare
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Ketten-Reaktion)
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleinacid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
u.a.	unter anderem
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg

8 Literaturverzeichnis

Ahrné, Siv; Lönnermark, Elisabet; Wold, Agnes E.; Aberg, Nils; Hesselmar, Bill; Saalman, Robert et al. (2005): Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. In: *Microbes Infect.* 7 (11-12), S. 1256–1262. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.04.011.

Arici, M.; Bilgin, B.; Sagdic, O.; Ozdemir, C. (2004): Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. In: *Food Microbiology* 21 (1), S. 19–24. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00044-3.

Arrieta, Marie-Claire; Stiemsma, Leah T.; Amenyogbe, Nelly; Brown, Eric M.; Finlay, Brett (2014): The intestinal microbiome in early life: health and disease. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 427. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00427.

Bach, B.; Grünert, S.; Schmidts, M.; Sass, J. O.; Pohl, M.; Greiner, P.; Hentschel, R. (2009): D-Laktatazidose: „Rechts-Links-Schwäche“ in der Laboranalytik. In: *Z Geburtshilfe Neonatol* 213 (S 01). DOI: 10.1055/s-0029-1223184.

Blottière, Hervé M.; de Vos, Willem M; Ehrlich, S. Dusko; Doré, Joël (2013): Human intestinal metagenomics: state of the art and future. In: *Ecology and industrial microbiology • Special Section: Innate immunity* 16 (3), S. 232–239. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.006.

Bongaerts, G.; Tolboom, J.; Naber, T.; Bakkeren, J.; Severijnen, R.; Willems, H. (1995): D-lactic acidemia and aciduria in pediatric and adult patients with short bowel syndrome. In: *Clin. Chem.* 41 (1), S. 107–110.

Bongaerts, G. P.; Tolboom, J. J.; Naber, A. H.; Bakkeren, J. A.; Severijnen, R. S.; Willems, J. L.; Sperl, W. J. (1997a): *Lactobacillus* flora in short bowel syndrome. In: *Digestive diseases and sciences* 42 (8), S. 1611–1612.

Bongaerts, G. P.; Tolboom, J. J.; Naber, A. H.; Sperl, W. J.; Severijnen, R. S.; Bakkeren, J. A.; Willems, J. L. (1997b): Role of bacteria in the pathogenesis of short bowel syndrome-associated D-lactic acidemia. In: *Microb. Pathog.* 22 (5), S. 285–293. DOI: 10.1006/mpat.1996.0122.

Bongaerts, Ger; Severijnen, Rene; Skladal, Daniela; Bakkeren, Jan; Sperl, Wolfgang (2005): Yeast mediates lactic acidosis suppression after antibiotic cocktail treatment in short small bowel? In: *Scand J Gastroenterol* 40 (10), S. 1246–1250. DOI: 10.1080/00365520510023459.

Bourriaud, C.; Robins, R. J.; Martin, L.; Kozlowski, F.; Tenailleau, E.; Cherbut, C.; Michel, C. (2005): Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal

microfloras but inter-individual variation is evident. In: *Journal of Applied Microbiology* 99 (1), S. 201–212. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02605.x.

Braegger, Christian P. (2004): Prebiotika. In: *Peadiatrica* (Vol. 04 No. 6), S. 20–21.

Buchman, Alan L. (2006): Etiology and initial management of short bowel syndrome. In: *Gastroenterology* 130 (2 Suppl 1), S. S5-S15. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.07.063.

Bustos, D.; Pons, S.; Pernas, J. C.; Gonzalez, H.; Caldarini, M. I.; Ogawa, K.; Paula, J. A. de (1994): Fecal lactate and short bowel syndrome. In: *Dig. Dis. Sci.* 39 (11), S. 2315–2319.

Caldarini, M. I.; Pons, S.; D'Agostino, D.; DePaula, J. A.; Greco, G.; Negri, G. et al. (1996): Abnormal fecal flora in a patient with short bowel syndrome. An in vitro study on effect of pH on D-lactic acid production. In: *Dig. Dis. Sci.* 41 (8), S. 1649–1652.

Ceapa, Corina; Wopereis, Harm; Rezaïki, Lahcene; Kleerebezem, Michiel; Knol, Jan; Oozeer, Raish (2013): Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27 (1), S. 139–155. DOI: 10.1016/j.bpg.2013.04.004.

Dahhak, S.; Uhlen, S.; Mention, K.; Romond, M-B; Fontaine, M.; Gottrand, F. et al. (2008): Acidose d-lactique chez un enfant présentant un syndrome de grêle court. In: *Arch Pediatr* 15 (2), S. 145–148. DOI: 10.1016/j.arcped.2007.11.009.

Day, A. S.; Abbott, G. D. (1999): D-lactic acidosis in short bowel syndrome. In: *The New Zealand medical journal* 112 (1092), S. 277–278.

De Groote, Mary Ann; Frank, Daniel N.; Dowell, Elaine; Glode, Mary P.; Pace, Norman R. (2005): *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. In: *The Pediatric infectious disease journal* 24 (3), S. 278–280.

Dellaglio, Franco; Felis, Giovanna E.; Castioni, Anna; Torriani, Sandra; Germond, Jacques-Edouard (2005): *Lactobacillus delbrueckii* subsp. indicus subsp. nov., isolated from Indian dairy products. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (Pt 1), S. 401–404. DOI: 10.1099/ijs.0.63067-0.

Domann, E.; Hong, G.; Imirzalioglu, C.; Turschner, S.; Kuhle, J.; Watzel, C. et al. (2003): Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. In: *J Clin Microbiol* 41 (12), S. 5500–5510.

Dunlop, R. H.; Hammond, P. B. (1965): D-lactic acidosis of ruminants. In: *Ann N Y Acad Sci* 119 (3), S. 1109–1132.

Duro, D.; Kamin, D.; Duggan, C. (2008): Overview of pediatric short bowel syndrome. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47 Suppl 1, S. S33-6. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181819007.

Elli, Marina; Callegari, Maria Luisa; Ferrari, Susanna; Bessi, Elena; Cattivelli, Daniela; Soldi, Sara et al. (2006): Survival of yogurt bacteria in the human gut. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (7), S. 5113–5117. DOI: 10.1128/AEM.02950-05.

Ewaschuk, Julia B.; Naylor, Jonathan M.; Zello, Gordon A. (2005): D-lactate in human and ruminant metabolism. In: *J. Nutr.* 135 (7), S. 1619–1625.

Fasoli, Sara; Marzotto, Marta; Rizzotti, Lucia; Rossi, Franca; Dellaglio, Franco; Torriani, Sandra (2003): Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. In: *International Journal of Food Microbiology* 82 (1), S. 59–70.

Felis, G. E.; Dellaglio, F. (2007): Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. In: *Curr Issues Intest Microbiol* 8 (2), S. 44–61.

Garrity, George M. et al. (2007): Part 9 - The Bacteria: Phylum Firmicutes, Class "Bacilli". Unter Mitarbeit von Timothy G Lilburn, James R. Cole, Scott H Harrison, Jean Euzeby, Brian J Tindall. Michigan State University. Online verfügbar unter http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/186/218, zuletzt geprüft am 02.03.2015.

Godey, F.; Bouasria, A.; Ropert, M.; Diakite, M.; Le, Treut A.; Balencon, M. (2000): Don't forget to test for D-lactic acid in short bowel syndrome. In: *Am J Gastroenterol* 95 (12), S. 3675–3677. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.03416.x.

Guarner, Francisco (2006): Enteric flora in health and disease. In: *Digestion* 73 Suppl 1, S. 5–12. DOI: 10.1159/000089775.

Guarner, Francisco; Malagelada, Juan-R (2003): Gut flora in health and disease. In: *The Lancet* 361 (9356), S. 512–519. Online verfügbar unter http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603124890.

Haan, E.; Brown, G.; Bankier, A.; Mitchell, D.; Hunt, S.; Blakey, J.; Barnes, G. (1985): Severe illness caused by the products of bacterial metabolism in a child with a short gut. In: *European journal of pediatrics* 144 (1), S. 63–65.

Halperin, M. L.; Kamel, K. S. (1996): D-lactic acidosis: turning sugar into acids in the gastrointestinal tract. In: *Kidney Int.* 49 (1), S. 1–8.

Hamilton-Miller, J. M.; Shah, S.; Smith, C. T. (1996): "Probiotic" remedies are not what they seem. In: *BMJ* 312 (7022), S. 55–56.

Hickson, M.; D'Souza, A. L.; Muthu, N.; Rogers, T. R.; Want, S.; Rajkumar, C.; Bulpitt, C. J. (2007): Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. In: *BMJ* 335 (7610), S. 80. DOI: 10.1136/bmj.39231.599815.55.

Horbach, T. (2006): Kurzdarmsyndrom. In: *Chirurg* 77 (12), S. 1169-81; quiz 1182. DOI: 10.1007/s00104-006-1261-9.

Hudson, M.; Pocknee, R.; Mowat, N. A. (1990): D-lactic acidosis in short bowel syndrome--an examination of possible mechanisms. In: *Q. J. Med.* 74 (274), S. 157–163.

Imirzalioglu, C.; Hain, T.; Chakraborty, T.; Domann, E. (2008): Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. In: *Andrologia* 40 (2), S. 66–71. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2007.00830.x.

Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2007): 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. In: *J Clin Microbiol* 45 (9), S. 2761–2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07.

Johanningsmeier, Suzanne D.; McFeeters, Roger F. (2013): Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations. In: *Food Microbiol.* 35 (2), S. 129–135. DOI: 10.1016/j.fm.2013.03.004.

Joly, Francisca; Mayeur, Camille; Bruneau, Aurélia; Noordine, Marie-Louise; Meylheuc, Thierry; Langella, Philippe et al. (2010): Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. In: *Biochimie* 92 (7), S. 753–761. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.02.015.

Kaneko, T.; Bando, Y.; Kurihara, H.; Satomi, K.; Nonoyama, K.; Matsuura, N. (1997): Fecal microflora in a patient with short-bowel syndrome and identification of dominant lactobacilli. In: *J Clin Microbiol* 35 (12), S. 3181–3185.

Kang, Kyung Pyo; Lee, Sik; Kang, Sung Kyew (2006): D-lactic acidosis in humans: review of update. In: *Electrolyte Blood Press* 4 (1), S. 53–56. DOI: 10.5049/EBP.2006.4.1.53.

Karton, M.; Rettmer, R. L.; Lipkin, E. W. (1987): Effect of parenteral nutrition and enteral feeding on D-lactic acidosis in a patient with short bowel. In: *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 11 (6), S. 586–589.

Khalisanni Khalid (2011): An overview of lactic acid bacteria. In: *Int. J. Biosci.* (Vol. 1, No. 3), S. 1–13.

Koletzko, S.; Waag, K. L.; Koletzko, B. (1994): [Recurrent D-lactic acidosis with encephalopathy in a boy with short-bowel syndrome]. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 119 (13), S. 458–462. DOI: 10.1055/s-2008-1058715.

Krause, H.; Heiduk, M.; Wachowiak, R.; Till, H. (2013): [Age-dependent visceral medicine: paediatric visceral medicine - visceral medical paediatrics -considerations on the short bowel syndrome in childhood]. In: *Zentralbl Chir* 138 (4), S. 463–470. DOI: 10.1055/s-0032-1315200.

Ku, W. H.; Lau, D. C.; Huen, K.F (2006): Probiotics Provoked D-lactic Acidosis in Short Bowel Syndrome: Case Report and Literature Review. In: *HK J Paediatr (new series)* (11), S. 246–254.

Kunz, Anjali N.; Noel, James M.; Fairchok, Mary P. (2004): Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 38 (4), S. 457–458.

Lagier, Jean-Christophe; Million, Matthieu; Hugon, Perrine; Armougom, Fabrice; Raoult, Didier (2012): Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations. In: *Front Cell Infect Microbiol* 2. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00136.

Lamprecht, G.; Pape, U.-F.; Witte, M.; Pascher, A. (2014): S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin e. V. in Zusammenarbeit mit der AKE, der GESKES und der DGVS. In: *Aktuel Ernahrungsmed* 39 (02), S. e57. DOI: 10.1055/s-0034-1369922.

LANZA, Célia Regina Moreira; LIMA, José Eduardo de Oliveira; TORRES, Sergio Aparecido; MACHADO, Maria Aparecida de Andrade Moreira (2000): Effect of professional dental prophylaxis with sodium bicarbonate jet on the cariogenic microbiota. In: *Pesqui. Odontol. Bras.* 14 (1), S. 0. DOI: 10.1590/S1517-74912000000100005.

Legier-Vargas, K.; Mundorff-Shrestha, S. A.; Featherstone, J. D.; Gwinner, L. M. (1995): Effects of sodium bicarbonate dentifrices on the levels of cariogenic bacteria in human saliva. In: *Caries Res* 29 (2), S. 143–147.

Lewis, S. J.; Heaton, K. W. (1997): Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 32 (9), S. 920–924. DOI: 10.3109/00365529709011203.

Mack, David R. (2004): D(-)-lactic acid-producing probiotics, D(-)-lactic acidosis and infants. In: *Can. J. Gastroenterol.* 18 (11), S. 671–675.

Mater, Denis D. G.; Bretigny, Laurent; Firmesse, Olivier; Flores, Maria-Jose; Mogenet, Agnès; Bresson, Jean-Louis; Corthier, Gérard (2005): Streptococcus thermophilus and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 250 (2), S. 185–187. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.006.

Mayeur, C.; Gratadoux, J. J.; Bridonneau, C.; Chegdani, F.; Larroque, B.; Kapel, N. et al. (2013): Faecal d/l lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. In: *PLoS One* 8 (1), S. e54335. DOI: 10.1371/journal.pone.0054335.

Mayne, A. J.; Handy, D. J.; Preece, M. A.; George, R. H.; Booth, I. W. (1990): Dietary management of D-lactic acidosis in short bowel syndrome. In: *Arch Dis Child* 65 (2), S. 229–231.

Munakata, Shun; Arakawa, Chikako; Kohira, Ryutaro; Fujita, Yukihiko; Fuchigami, Tatsuo; Mugishima, Hideo (2010): A case of D-lactic acid encephalopathy associated with use of probiotics. In: *Brain Dev.* 32 (8), S. 691–694. DOI: 10.1016/j.braindev.2009.09.024.

Oh, M. S.; Phelps, K. R.; Traube, M.; Barbosa-Saldivar, J. L.; Boxhill, C.; Carroll, H. J. (1979): D-lactic acidosis in a man with the short-bowel syndrome. In: *N. Engl. J. Med.* 301 (5), S. 249–252. DOI: 10.1056/NEJM197908023010505.

Oh, M. S.; Uribarri, J.; Alveranga, D.; Lazar, I.; Bazilinski, N.; Carroll, H. J. (1985): Metabolic utilization and renal handling of D-lactate in men. In: *Metab. Clin. Exp.* 34 (7), S. 621–625.

O'Keefe, Stephen J D; Buchman, Alan L.; Fishbein, Thomas M.; Jeejeebhoy, Khursheed N.; Jeppesen, Palle Bekker; Shaffer, Jonathan (2006): Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 4 (1), S. 6–10. DOI: 10.1016/j.cgh.2005.10.002.

Partanen, L.; Marttinen, N.; Alatossava, T. (2001): Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. In: *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (4), S. 500–506. DOI: 10.1078/0723-2020-00078.

Perlmutter, D. H.; Boyle, J. T.; Campos, J. M.; Egler, J. M.; Watkins, J. B. (1983): D-Lactic acidosis in children: an unusual metabolic complication of small bowel resection. In: *The Journal of pediatrics* 102 (2), S. 234–238.

Petersen, Craig (2005): D-lactic acidosis. In: *Nutr Clin Pract* 20 (6), S. 634–645.

Rajilić-Stojanović, Mirjana; Vos, Willem M. de (2014): The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 38 (5), S. 996–1047. DOI: 10.1111/1574-6976.12075.

Reddy, Vudum S.; Patole, Sanjay K.; Rao, Shripada (2013): Role of probiotics in short bowel syndrome in infants and children--a systematic review. In: *Nutrients* 5 (3), S. 679–699. DOI: 10.3390/nu5030679.

Rougé, Carole; Goldenberg, Oliver; Ferraris, Laurent; Berger, Bernard; Rochat, Florence; Legrand, Arnaud et al. (2010): Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. In: *Anaerobe* 16 (4), S. 362–370. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.002.

Rubio, Raquel; Jofré, Anna; Martín, Belén; Aymerich, Teresa; Garriga, Margarita (2014): Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. In: *Food Microbiol.* 38, S. 303–311. DOI: 10.1016/j.fm.2013.07.015.

Satoh, T.; Narisawa, K.; Konno, T.; Katoh, T.; Fujiyama, J.; Tomoe, A. et al. (1982): D-lactic acidosis in two patients with short bowel syndrome: bacteriological analyses of the fecal flora. In: *Eur. J. Pediatr.* 138 (4), S. 324–326.

Schubert, S.; Wieser, A. (2010): MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. In: *BIOspektrum* 16 (7), S. 760–762.

Schwartz, M. Z. (2013): Novel therapies for the management of short bowel syndrome in children. In: *Pediatr Surg Int. DOI:* 10.1007/s00383-013-3404-7.

Scully, T. B.; Kraft, S. C.; Carr, W. C.; Harig, J. M. (1989): D-lactate-associated encephalopathy after massive small-bowel resection. In: *J Clin Gastroenterol* 11 (4), S. 448–451.

Severijnen, René; Naber, Ton; Tolboom, Jules; Bongaerts, Ger (2005): The role of heterolactic lactobacilli in diarrhoea of short small bowel patients. In: *Microb Ecol Health Dis* 17 (2), S. 88–93. DOI: 10.1080/08910600510044831.

Simon, G. L.; Gorbach, S. L. (1986): The human intestinal microflora. In: *Dig. Dis. Sci.* 31 (9 Suppl), S. 147S-162S.

Skraban, Jure; Dzeroski, Saso; Zenko, Bernard; Mongus, Domen; Gangl, Simon; Rupnik, Maja (2013): Gut microbiota patterns associated with colonization of different Clostridium difficile ribotypes. In: *PLoS One* 8 (2), S. e58005. DOI: 10.1371/journal.pone.0058005.

Spencer, Ariel U.; Neaga, Andreea; West, Brady; Safran, Jared; Brown, Pamela; Btaiche, Imad et al. (2005): Pediatric Short Bowel Syndrome. In: *Transactions of the … Meeting of the American Surgical Association* 123 (&NA;), S. 102–110. DOI: 10.1097/01.sla.0000179647.24046.03.

Stanton, C.; Gardiner, G.; Meehan, H.; Collins, K.; Fitzgerald, G.; Lynch, P. B.; Ross, R. P. (2001): Market potential for probiotics. In: *The American journal of clinical nutrition* 73 (2 Suppl), S. 476S-483S.

Stetter, K. O.; Kandler, O. (1973): Untersuchungen zur Entstehung von Dl-Milchsäure bei *Lactobacillen* und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobacterium. In: *Archiv. Mikrobiol.* 94 (3), S. 221-247. DOI: 10.1007/BF00417453.

Stiles, Michael E.; Holzapfel, Wilhelm H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. In: *International Journal of Food Microbiology* 36 (1), S. 1–29. DOI: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0.

Szajewska, H.; Mrukowicz, J. Z. (2001): Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 33 Suppl 2, S. S17-25.

Takahashi, Kazuhiro; Terashima, Hideo; Kohno, Keisuke; Ohkohchi, Nobuhiro (2013): A stand-alone synbiotic treatment for the prevention of D-lactic acidosis in short bowel syndrome. In: *Int Surg* 98 (2), S. 110–113. DOI: 10.9738/CC169.

Takeda, K.; Suzuki, T.; Shimada, S-I; Shida, K.; Nanno, M.; Okumura, K. (2006): Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus* casei Shirota. In: *Clinical and experimental immunology* 146 (1), S. 109–115. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03165.x.

Temmerman, R.; Scheirlinck, I.; Huys, G.; Swings, J. (2003): Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. In: *Applied and environmental microbiology* 69 (1), S. 220–226.

Thornalley, P. J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. In: *Biochem J* 269 (1), S. 1–11.

Thurn, Joseph R.; Pierpont, Gordon L.; Ludvigsen, Carl W.; Eckfeldt, John H. (1985): d-lactate encephalopathy. In: *The American Journal of Medicine* 79 (6), S. 717–721. Online verfügbar unter http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934385905224.

Uribarri, J.; Oh, M. S.; Carroll, H. J. (1998): D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. In: *Medicine (Baltimore)* 77 (2), S. 73–82.

Valerio, Francesca; Russo, Francesco; Candia, Silvia de; Riezzo, Giuseppe; Orlando, Antonella; Lonigro, Stella Lisa; Lavermicocca, Paola (2010): Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei*-enriched artichokes on constipated patients: a pilot study. In: *J. Clin. Gastroenterol.* 44 Suppl 1, S. S49-53. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181d2dca4.

Vásquez, Alejandra; Molin, Göran; Pettersson, Bertil; Antonsson, Martin; Ahrné, Siv (2005): DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus* casei/paracasei and related species. In: *Syst. Appl. Microbiol.* 28 (5), S. 430–441. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.02.011.

Vrese, M. de; Koppenhoefer, B.; Barth, C. A. (1990): D-lactic acid metabolism after an oral load of DL-lactate. In: *Clin Nutr* 9 (1), S. 23–28.

Wagner, Andreas Otto; Malin, Cornelia; Illmer, Paul (2009): Application of denaturing high-performance liquid chromatography in microbial ecology: fermentor sludge, compost, and soil community profiling. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (4), S. 956–964. DOI: 10.1128/AEM.01411-08.

Wales, Paul W.; Christison-Lagay, Emily R. (2010): Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. In: *Semin. Pediatr. Surg.* 19 (1), S. 3–9. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2009.11.001.

Wales, Paul W.; Silva, Nicole de; Kim, Jae; Lecce, Loreto; To, Teresa; Moore, Aideen (2004): Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. In: *Journal of pediatric surgery* 39 (5), S. 690–695.

Yasuda, T.; Ozawa, S.; Shiba, C.; Maeba, T.; Kanazawa, T.; Sugiyama, M. et al. (1993): D-lactate metabolism in patients with chronic renal failure undergoing CAPD. In: *Nephron* 63 (4), S. 416–422.

9 Anhang

Fragebogen

UKGM
UNIVERSITÄTSKLINIKUM
GIESSEN UND MARBURG

Fragebogen zur Studie
„Enzephalopathie mit D-Laktat-Azidose bei Kurzdarmsyndrom“

Angaben zur Person:

Name, Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Größe: _____

Gewicht: _____

Anschrift: _____
_____
_____

Telefonnummer: _____

Angaben zur Krankengeschichte:

Art der Erkrankung/Ursache für KDS: _____

Operationsdatum/-ort: _____

Begleiterkrankungen: _____

I. Angaben zu neurologischen Symptomen:
(Bitte geben Sie an, ob die jeweiligen Symptome schon mal aufgetreten sind oder nicht und **wenn ja**, wann?)

1. Im Verlauf des Tages ungewöhnlich starke/zunehmende Schläfrigkeit:

Nein ☐ Ja ☐ wann ca.: _____

2. Sprachstörungen:
(z.B. undeutliche, lallende Sprache)

Nein ☐ Ja ☐ wann ca.: _____

Wenn ja, welcher Art? _____
_____

3. Störungen der Bewegungskoordination:
(z.B. torkeliger Gang „wie betrunken")

Nein ☐ Ja ☐ wann ca.: _____

Wenn ja, welcher Art? _____
_____

4. Sonstige Verhaltensauffälligkeiten:

Nein ☐ Ja ☐ wann ca.: _____

Wenn ja, welcher Art? _____
_____

5. Frühere Laktatazidosen:

Nein ☐ Ja ☐ wann ca.: _____

Damalige Symptome: _____
_____
_____

Therapie: _____
_____

6. Sonstiges: _____
_____
_____

II. <u>Angaben zu Ernährungsgewohnheiten:</u>

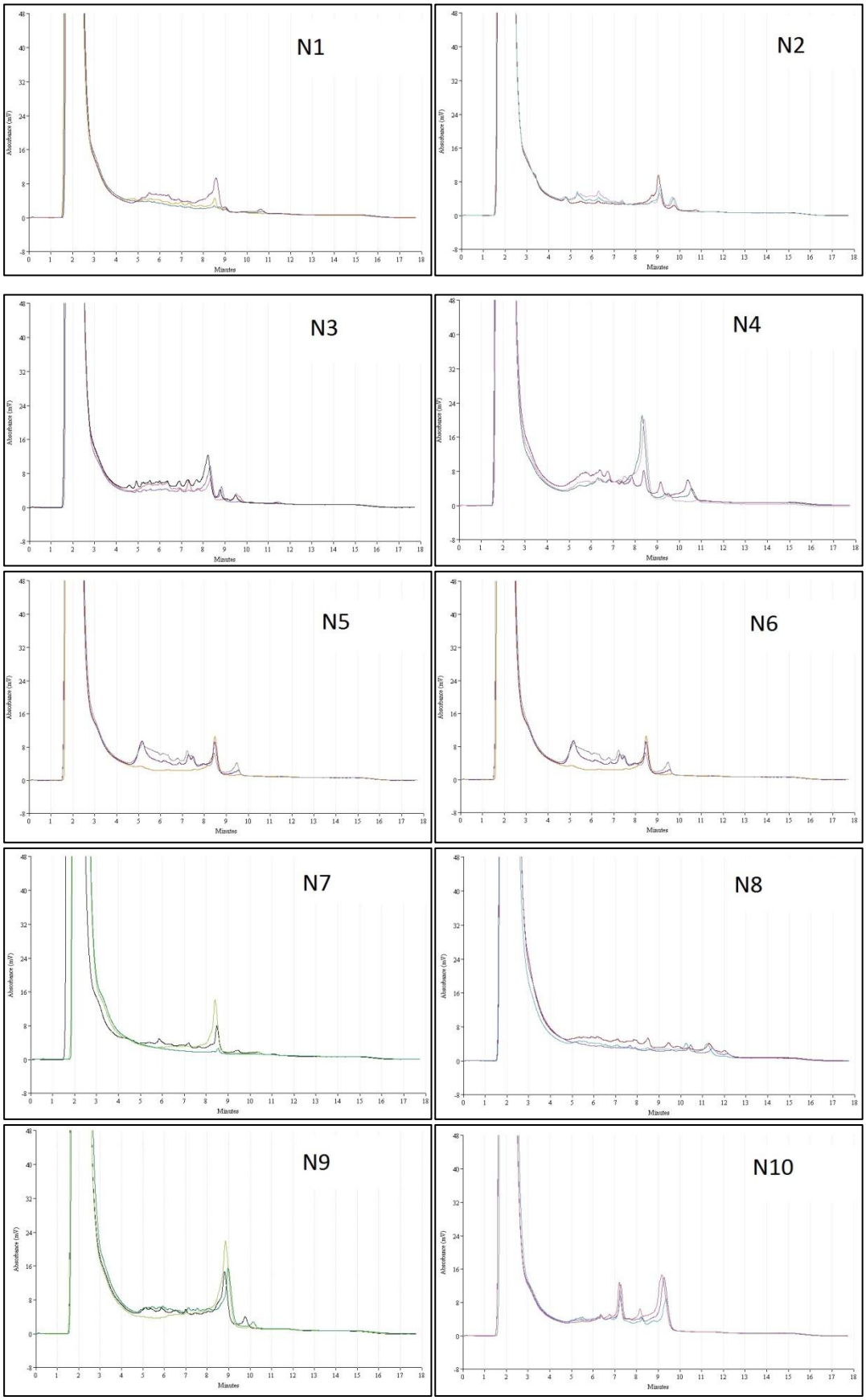
Nimmt Ihr Kind öfter probiotische Joghurtdrinks (z.B. Actimel®, Yakult® etc.) zu sich?

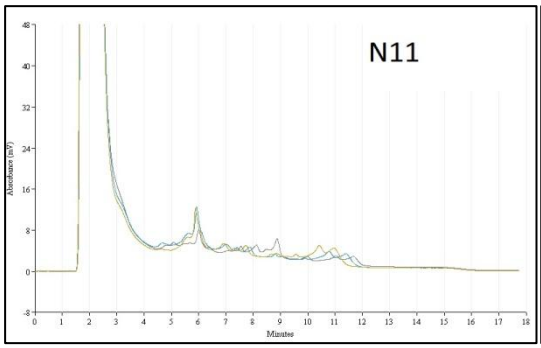
Nein ☐ Ja ☐ Wie oft? _____
Welches Produkt (Handelsname)?
_____

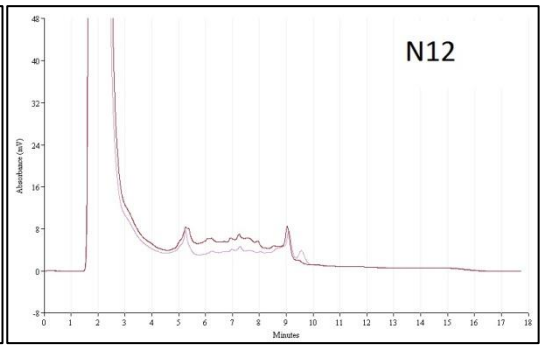
Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

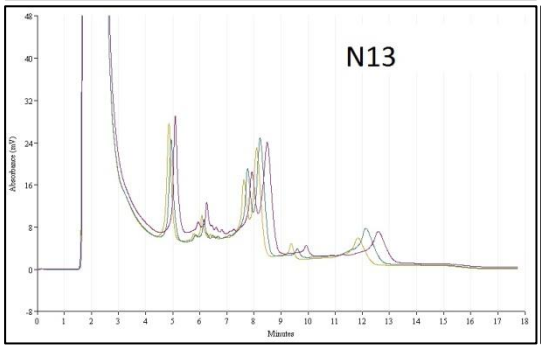
Ich möchte über das Ergebnis der Studie unterrichtet werden: Ja ☐
Nein ☐

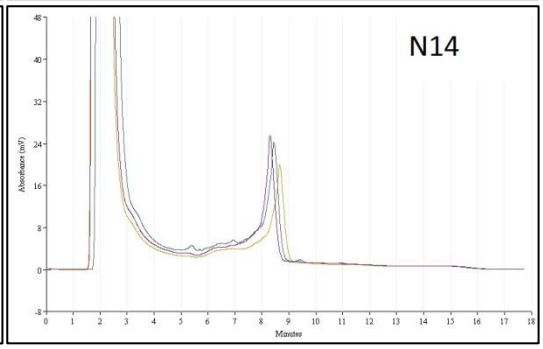
DHPLC- Analysen

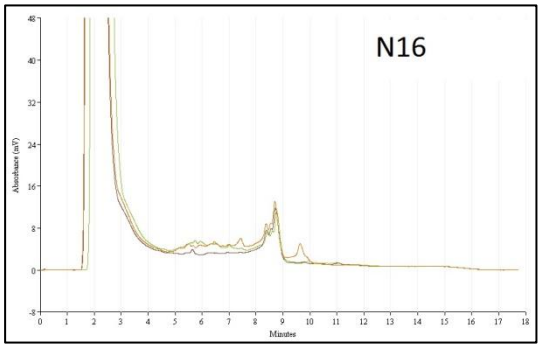



N11
Absorbance (mV)
Minutes


N12
Absorbance (mV)
Minutes


N13
Absorbance (mV)
Minutes


N14
Absorbance (mV)
Minutes


N16
Absorbance (mV)
Minutes

Erklärung zur Dissertation

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

Datum _____ Unterschrift _____

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Eugen Domann und Prof. Dr. Bernd Neubauer für die Überlassung des Promotionsthemas und Unterstützung sowie ihre Geduld bei der Fertigstellung der Arbeit herzlich bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für medizinische Mikrobiologie. Insbesondere Frau Silke Zechel- Gran danke ich für die kompetente Einarbeitung in die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Methoden, allen voran bei den Wave- Analysen, sowie für die persönliche Hilfestellung in Zeiten des Zweifelns und der Frustration. Vielen Dank auch an Frau Claudia Zörb für ihre Unterstützung bei den Sequenzierungen.

Frau Dr. Giffhorn- Katz danke ich für die Durchführung der Laktatmessungen im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie , Molekulare Diagnostik der Justus-Liebig Universität Gießen .

Ich bedanke mich bei meinem großen Bruder Manuel für das Korrekturlesen der Arbeit vor deren Abgabe.
Dank auch an Martin Fessler sowie Bernd und Hans Kammerer für ihre finanzielle Unterstützung während des Studiums und des Freisemesters für den experimentellen Teil dieser Arbeit. Dank auch meinem kleinen Bruder Julian für kleine Spenden an der richtigen Stelle.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern. Ihr habt es mir ermöglicht dieses Studium zu ergreifen. Ohne eure Unterstützung wäre dies alles nicht möglich gewesen.