

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik des

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid)

Eine prospektive Analyse der bakteriellen Kolonisation und
Risikofaktoren einer Sludgeformation bei biliären Endoprothesen

Julia Fremd

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten
Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Andreas Weber

2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 12.06.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 04.07.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Stellenwert der endoskopisch-retrograden Cholangiopankreatikographie.....	1
1.1.1 Die biliäre Stenttherapie – Indikationen.....	2
1.1.2 Die biliäre Stenttherapie – Komplikationen.....	4
1.1.2.1 Allgemeine Komplikationen.....	4
1.1.2.2 Stentokklusion als Komplikation einer biliären Stenttherapie	5
1.1.3 Stentdesign	6
1.2 Die Rolle von Bakterien in der Entwicklung einer Stentokklusion	9
1.2.1 Adhäsion von Bakterien an Oberflächen und Biofilmbildung.....	9
1.2.2 Sludgebildung als Risikofaktor einer Stentokklusion	11
1.2.3 Biliäres Spektrum	14
2 ZIELE DER STUDIE.....	18
3 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	19
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien	19
3.3 Datenerhebung.....	20
3.4 Die endoskopische Therapie	21
3.4.1 Durchführung der Stentextraktion während der ERCP.....	21
3.4.2 Vorgehensweise nach Stentextraktion und mikrobiologische Analyse	23
3.5 Statistische Auswertung	26
4 ERGEBNISSE.....	27

4.1	Basisdaten.....	27
4.2	Mikrobiologische Analyse	29
4.3	Analyse des Keimspektrums in Abhängigkeit von der Liegedauer	33
4.4	Einflussfaktoren auf eine Sludgeformation.....	39
5	DISKUSSION	45
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	QUELLEN	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
CHE	Cholezystektomie
CI	Konfidenzintervall
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (Konfokale Laser-Rastermikroskopie)
cm	Centimeter
C. perfringens	Clostridium perfringens
CRP	C-reaktives Protein
DHC	Ductus hepaticus communis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ERCP	Endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie
ERC	Endoskopisch-retrograde Cholangiographie
EST	Endoskopische Sphinkterotomie
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
et al.	et alii (und andere)
EUS	Endosonographie
Fr.	French
GG	Gallengang
ggf.	gegebenenfalls
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
i.e.	id est (das heißt)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
kHz	Kilohertz
LTX	Lebertransplantation
MIC	Minimal inhibitorische Konzentration
mm	Millimeter
MPD	Main Pancreatic Duct (Pankreashauptgang)
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
PEP	Post-ERCP-Pankreatitis
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
SEM	Scanning electron microscope (Rasterelektronenmikroskop)
Spp.	Subspecies
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
vs.	versus (gegenüber)
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
%	Prozent

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Stentdesign
- Abbildung 2: Entstehung eines Biofilms unter dem Einfluss von Bakterien
- Abbildung 3: Einflussfaktoren zur Aufrechterhaltung steriler Galle
- Abbildung 4: Vorgehensweise während der ERCP
- Abbildung 5: Verarbeitung der biliären Endoprothesen und mikrobiologische Analyse
- Abbildung 6: Indikationen für die Stenttherapie
- Abbildung 7: Prozentanteil von aeroben und anaeroben Bakterien sowie Pilzen (zu 99,47% bestehend aus *Candida spp.*) bezogen auf die Gesamtanzahl der isolierten Mikroorganismen (n=2283)
- Abbildung 8: Prozentuale Anteile von aeroben und anaeroben Bakterien sowie Pilzen (*Candida spp.*) bezogen auf die Anzahl der analysierten biliären Stents (n=343)
- Abbildung 9: Veränderung des Keimspektrums in Abhängigkeit von der Stentliegedauer
- Abbildung 10: Einfluss verschiedener Bakteriengattungen auf eine Sludgeformation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Indikationen für eine ERCP
Tabelle 2:	Basisdaten
Tabelle 3:	Von biliären Stents isoliertes Keimspektrum (aerob gramnegativ und grampositiv, anaerob)
Tabelle 4:	Von biliären Stents isoliertes Keimspektrum (Pilze)
Tabelle 5:	Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (aerob, grampositiv)
Tabelle 6:	Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (aerob, gramnegativ)
Tabelle 7:	Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (anaerob, Pilze)
Tabelle 8:	Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (aerob, grampositiv)
Tabelle 9:	Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (aerob, gramnegativ)
Tabelle 10:	Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (anaerob, Pilze)

1. Einleitung

1.1 Stellenwert der endoskopisch-retrograden Cholangiopankreatikographie

Die endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie ist ein etabliertes endoskopisch-radiologisch kombiniertes Verfahren, das sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie von obstruktiven Erkrankungen des pankreatikobiliären Systems eingesetzt wird [1]. Eine Übersicht der Indikationen für eine ERCP ist in Tabelle 1 dargestellt. Dabei stellt vor allem das transpapilläre Einsetzen von Plastik- und Metallstents eine wichtige therapeutische Option der ERCP zum Überbrücken von Stenosen oder nicht-extrahierbaren Gallengangssteinen dar, mit dem Ziel, eine suffiziente Drainage des pankreatikobiliären Systems wiederherzustellen.

Tab. 1: Indikationen für eine ERCP, nach [1, 81].

Gallenwegserkrankungen	Pankreaserkrankungen
Choledocholithiasis Mirizzi-Syndrom	Rezidivierende akute Pankreatitiden
Maligne und benigne biliäre Stenosen	Gallengangsobstruktionen bei chronischer Pankreatitis
- Kongenital	Leckage des Pankreasgangs
- Postoperativ (Z.n. CHE, LTX)	Pankreaspseudozysten, Nekrosen des Pankreas
- Primär und sekundär sklerosierende Cholangitis	Steine im Pankreasgang
- Choledochozele	Maligne Erkrankungen
- Strikturen nach Bauchtrauma	- Pankreaskarzinom/ andere pankreatische Malignitäten
- Radiogen induzierte GG-Stenosen	
- Gallengangskarzinom	
- Sphincter-Oddi-Dysfunktion	
Ampulläre Adenome	

1.1.1 Die biliäre Stenttherapie - Indikationen

Das endoskopische transpapilläre Einsetzen von Plastikstents in den Gallengang ist seit der erstmaligen Beschreibung 1979 eine bewährte Methode zur Behandlung von benignen und malignen Gallengangsobstruktionen [143]. Durch Einbringen von Endoprothesen soll ein Offenhalten der Gallengänge und infolgedessen ein suffizienter Gallenabfluss ermöglicht werden. Im Vordergrund der biliären Stenttherapie stehen dabei in erster Linie die Verbesserung von Symptomen wie Ikterus, Juckreiz und Übelkeit. Ebenso kann die Lebensqualität von Patienten mit maligner Gallengangsobstruktion durch andere Aspekte wie eine Verbesserung von Verdauungsstörungen und Appetitlosigkeit signifikant gesteigert werden [8].

Die biliäre Stenttherapie bietet eine Möglichkeit zur Behandlung von Krankheitsbildern wie der Choledocholithiasis, benignen und malignen Gallengangsobstruktionen, primär und sekundär sklerosierender Cholangitis und postoperativen Stenosen (Z.n. Cholezystektomie oder Lebertransplantation).

Im Falle einer Choledocholithiasis können Gallengangssteine durch Injektion von Kontrastmittel nicht nur dargestellt, sondern auch in mehr als 80% der Fälle unmittelbar durch Standardverfahren wie der endoskopischen Sphinkterotomie sowie Ballondilatation des biliären Sphinkters und anschließender Extraktion mittels (Dormia-)Körbchen therapiert werden [11, 16]. Bei sehr großen Steinen kann vor dem Entfernen eine Steinfragmentierung durch mechanische Lithotrypsie durchgeführt werden [93]. Gelingt es nicht die Steine zu extrahieren, wird zur Vermeidung einer Gallengangsobstruktion temporär eine biliäre Endoprothese oder eine nasobiliäre Sonde eingelegt [21, 141]. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung der Choledocholithiasis mit Stents im Verlauf eine Verkleinerung der Steine zu dokumentieren war [25].

Auch benigne Gallengangsobstruktionen unterschiedlicher Dignität werden mit einem Ballonkatheter dilatiert und darauffolgend (optional) ein Stent in den Gallengang platziert, um die Stenose offenzuhalten [1]. In einer Studie aus dem Jahr 2014 wurden die Langzeiterfolge der Stenttherapie unterschiedlicher Grunderkrankungen verglichen. Die besten Langzeitergebnisse zeigten sich bei Patienten mit steinassoziierten

(92% Langzeiterfolg) und post-operativen Strikturen (83%) sowie idiopathischen Stenosen (58%) [163]. In einer weiteren Untersuchung konnte evaluiert werden, dass eine Stenttherapie bei Patienten mit peripheren Gallengangsleckagen und Strikturen nach Cholezystektomie erfolgsversprechend ist [161]. Allerdings weisen trotz dieser vielversprechenden Erfolge 17% der Patienten eine Re-Stenosierung nach Stentextraktion auf [43].

2,7 - 45,6% der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis entwickeln eine distale Gallengangsobstruktion [2]. Diese Patienten profitieren kurzzeitig von einer Stenttherapie, allerdings ist die Effizienz der Langzeittherapie begrenzt [13, 53, 163]. Sowohl eine gleichzeitige Therapie mit mehreren Stents (Multistenttherapie), wie auch Singlestenttherapien, führten in vergangenen Studien nicht zum erhofften Erfolg [50]. Generell scheint die Multistenttherapie jedoch effektiver zu sein als eine Singlestenttherapie bei chronischer Pankreatitis [24]. Eine Kalzifizierung des Pankreaskopfes stellt einen besonders ungünstigen prognostischen Faktor dar [82].

Bei Patienten mit einer primär sklerosierenden Cholangitis können wiederholte endoskopische Therapien das Überleben verbessern [9]. Eine Studie von Gotthardt et al. wies ebenso gute Langzeitergebnisse auf [64]. Die Stenose wird entweder durch Ballondilatation alleine aufgedehnt oder nachfolgend ein Stent eingelegt. Dabei ist jedoch kein größerer Gewinn einer Ballondilatation kombiniert mit einer Stenttherapie im Vergleich zu einer alleinigen Ballondilatation zu erwarten, die Stenttherapie zeigte außerdem höhere interventionelle Komplikationsraten und ein größeres Cholangitisrisiko [83].

Die ERCP ist sowohl in der Diagnostik wie auch in der Behandlung von Gallengangleaks und Gallengangsstenosen nach Lebertransplantationen erfolgreich [138]. Patienten mit letzterem Krankheitsbild profitieren auch langfristig von einer Stenttherapie (90%) [111].

Bei Patienten mit malignen Veränderungen des pankreatikobiliären Systems hat die biliäre Stenttherapie ebenfalls bedeutende Relevanz. Stents können eingesetzt werden zur temporären Überbrückung bis zu einer chirurgischen Maßnahme (biliodigestive Anastomose) oder als Langzeitbehandlung. Die Arbeitsgruppe um Andersen et al.

verglichen die Faktoren Überlebenszeit, Komplikationsraten, Hospitalisationsbedarf und Lebensqualität nach endoskopischem Einsetzen von Stents im Vergleich zu einem operativen Bypass bei Patienten mit malignem Ikterus und konnten dabei keine signifikanten Unterschiede feststellen [4]. Auch in weiteren Studien wurde kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt, jedoch niedrigere interventionsabhängige Mortalität, geringere Komplikationsraten, ein kürzerer Krankenhausaufenthalt und erhöhte Ikterus-Rezidivraten in der Patientengruppe mit Stenttherapie [140, 142].

1.1.2 Die biliäre Stenttherapie - Komplikationen

1.1.2.1 Allgemeine Komplikationen

Die post-ERCP-Pankreatitis (PEP) ist die häufigste und eine sehr ernsthafte Komplikation [5, 59, 60, 98, 105] mit einer variierenden Inzidenz zwischen 2,6%-3,7% [5, 14, 37, 78]. Als Definition der PEP dient der Zusammenschluss folgender drei Kriterien: Klinische Symptome der Pankreatitis (neu aufgetretene oder zunehmende abdominelle Schmerzen), notwendige stationäre Aufnahme oder verlängerter Krankenhausaufenthalt für mindestens 2-3 Tage und ein ≥ 3 -fach über die Norm erhöhter Amylase-Wert nach mehr als 24 Stunden postinterventionell [38]. Mit welchen Risikofaktoren das Auftreten einer PEP zusammenhängt wird kontrovers diskutiert [27, 59, 78, 105].

Weitere wichtige Komplikationen bilden Blutungen mit einer Inzidenz von 0,9-1,34% [5, 29]. Blutungen werden - je nach Klassifikationssystem - in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt: Moderate, mittelschwere und lebensbedrohliche Blutungen. Die Häufigkeit von milden Blutungskomplikationen überwiegen, jedoch kann es auch zu einer lebensgefährlichen Blutung kommen [5]. Den größten Risikofaktor stellt die Sphinkterotomie dar [37].

Perforationen sind eine etwas seltenere Komplikation mit einem Vorkommen von 0,35% - 0,6% [5, 54, 98, 105]. Sie können nach dem Verletzungsmuster wie folgt eingeteilt werden: (1) Perforation des Gangs durch den Führungsdraht,

(2) periampulläre Perforation durch Sphinkterotomie und (3) duodenale Perforation entfernt von der Papille [76]. Sphinkterotomie, Oddisphinkterdysfunktion, ein dilatierter Hauptgallengang und eine längere Dauer der Prozedur gehen mit einem erhöhten Perforationsrisiko einher [54].

Die Inzidenz der Cholangitis liegt bei 1% oder weniger [98, 105]. Freeman et al. beobachteten, dass das Risiko, nach einer Sphinkterotomie an einer Cholangitis zu erkranken, erhöht ist bei kombiniert perkutan-endoskopischen Eingriffen, Stenttherapie von malignen Strikturen und fehlgeschlagenem biliären Zugang [60]. Als weitere seltene Komplikationen sind ergänzend noch die Cholezystitis und kardiopulmonale Komplikationen zu nennen [60, 105].

1.1.2.2 Stentokklusion als Komplikation einer biliären Stenttherapie

Eine Komplikation der biliären Stenttherapie kann in Form einer Stentokklusion auftreten, die auch heute noch einen entscheidenden limitierenden Faktor darstellt. Biliäre Polyethylenstents okkludieren nach einer medianen Liegedauer von 126 Tagen [42]. Darauf basierend müssen diese regelmäßig - im Regelfall nach drei Monaten - gewechselt werden, im Fall einer Stentokklusion mit klinischen Symptomen wie Cholangitiden bereits früher. Biliärem Sludge wird hierbei im Okklusionsprozess eine tragende Rolle zugeschrieben [66, 95]. Der Inhalt von okkludierten Stents besteht aus Proteinen, unlöslichen Resten (vor allem Pflanzenfasern), Gallekomponenten (Gallensäure, Lecithin), unkonjugiertem Bilirubin und Bakterien [66]. Dowidar et al. zeigten anhand eines *in-vitro*-Modells, dass die Sludgebildung bei Gallengangstents durch Exposition mit infizierter Galle im Vergleich zu steriler Galle signifikant gesteigert war [48]. Ebenfalls zu dem Schluss, dass vitale Bakterien für die Entstehung einer Sludgeformation notwendig sind, kam die Arbeitsgruppe um Leung et al. [95]. Bisherige Untersuchungen der bakteriellen Besiedelung von biliären Stents zeigten bereits eine Dominanz von *Enterococcus spp.*, *E. coli* und *Klebsiella spp.* (aerobe Bakterien), sowie im anaeroben Bereich von *Clostridium spp.* und *Bacteroides spp.* und im Bereich der Pilzgattungen häufig Isolate von *Candida spp.*, diese Studien erfolgten jedoch mit einer geringen Anzahl von analysierten Stents [15, 31, 47, 68].

Frühzeitige Stentokklusion tritt in 13% der Fälle auf. Weibliches Geschlecht ist mit einem niedrigeren Risiko der vorzeitigen Stentokklusion assoziiert, wohingegen hiläre Strikturen mit einem signifikant erhöhten Risiko einhergehen [84]. Die späte Stentokklusion mit wiederkehrendem Ikterus und/oder Fieber oder Schmerzen zeigte in einer Studie von Dowidar et al. eine Inzidenz von 33% [49].

1.1.3 Stentdesign

Gallengangstents werden gemäß des Materials in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Plastik- (z.B. Polyethylen, Polyurethan, Polytetrafluorethylen/Teflon) und Metallstents [45]. Sie variieren in ihrer Länge, ihrem Durchmesser und ihrer Form (gerade, gewinkelt, Monopigtail, Doppelpigtail, mit Seitenöffnungen oder ohne Seitenöffnungen), dargestellt in Abbildung 1. Die Größe des Durchmessers von Gallengangstents wird in French angegeben.

Jedes Stentdesign weist individuelle Vor- und Nachteile auf. Pigtailstents verankern sich durch die Endstücke in Schweineschwanzform besser in der Umgebung und haben daher eine geringere Migrationsgefahr. Allerdings ist die Gallendurchflussrate im Vergleich zu gleich großen geraden Stents deutlich geringer [136]. Letzteres ist gleichzeitig der Vorteil von geraden Stents. Seitenöffnungen sind von Bedeutung für eine gute Gallengangsdrainage, weisen aber eine erhöhte Tendenz zur Sludgeakkumulation auf [31, 47, 48].

Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die Reibungskoeffizienten der unterschiedlichen Materialien mit einer individuell ausgeprägten Okklusionswahrscheinlichkeit einhergehen. Es wurde eine direkte Korrelation zwischen dem Reibungskoeffizienten des Endoprothesenmaterials und der Menge des Inkrustationsmaterials festgestellt. Polytetrafluorethylen/Teflon zeigte sich mit geringerer Sludgebehaftung infolge seines niedrigeren Reibungskoeffizienten im Vergleich zu anderen Plastikmaterialien [31, 48]. Interessanterweise gingen Seitenöffnungen *in vitro* und *in vivo* mit einer signifikant erhöhten Sludgebildung einher und hoben alle bis dahin bestehenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien auf (Polytetrafluorethylen/Teflon, Polyurethan,

Polyethylen, Polyvinylchloride) [31]. Auch in einer weiteren Untersuchung korrelierten Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit von Polyethylen und C-Flex-Stents (unebenere Oberfläche) *in vitro* im Vergleich zu Vivathanen (ultraglatte Oberfläche) mit einer erhöhten Affinität zu bakteriellem Wachstum und Sludgeakkumulation [107]. Die bakterielle Anhaftungstendenz ist *in vitro* unter „fließenden“ Bedingungen niedriger an hydromerbeschichteten Polyurethanstents (niedriger Reibungskoeffizient) im Vergleich zu unbeschichteten Polyurethanstents, klinisch bestanden in einer randomisierten prospektiven Studie bezüglich der Okklusionsrate jedoch keine signifikanten Vorteile der beschichteten Stents im Vergleich zu Standardpolyethylenstents [34, 80].

Der Einfluss des Durchmessers eines Stents als Risikofaktor für eine Stentokklusion ist umstritten. Im Vergleich von geraden 10 Fr.- zu 8 Fr.-Pigtail-Stents konnte eine signifikant niedrigere Inzidenz von Akutkomplikationen wie einer Cholangitis und eine deutlich längere Offenheitsrate und Stentlebensdauer bei den größeren Prothesen festgestellt werden [144]. In einer Studie mit Pankreaskarzinompatienten zeigten sich allerdings keine Unterschiede in der Stentdurchgängigkeitsdauer zwischen 10 Fr.- und 11,5 Fr.-Stents, ebenso spielte die Länge der Stents keine Rolle [121].



Abb. 1: Stentdesign. Links: Gebogener Stent mit Seitenöffnungen, Durchmesser 10 Fr., Länge 6 cm (Polyethylen, Peter Pflugbeil GmbH, Deutschland). Rechts: Pigtailstent mit Seitenöffnungen, Durchmesser 7 Fr., Länge 7 cm (Polyethylen, Cook, Irland).

Metallstents sind selbstexpandierbare Prothesen, die sich nach der Platzierung im Gallengang entfalten und einen Durchmesser von bis zu 30 Fr. erreichen können [45]. Nachteile von Metallstents sind unter anderem das schwierigere Platzieren und ein erschwerter Austausch der Prothesen. Tumoren können in das Netz der Stents hineinwuchern und ebenso wie Sludgebildung zu einem Verschluss führen [158]. Ist dies geschehen, ist die Therapie dieser Komplikation sehr schwierig. Patienten mit irresektablen malignen distalen Gallengangsobstruktionen profitieren von einer signifikant längeren mittleren Offenheitsdauer der Metallstents im Vergleich zu Polyethylenstents (273 zu 126 Tage) und benötigten insgesamt weniger endoskopische

Prozeduren [42]. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Patienten mit Gallengangsobstruktion infolge von Metastasen beobachtet [158]. Auch in einer weiteren Studie von Marano et al. bieten selbstexpandierbare Metallstents (Wallstent, Schneider, UK) bei Patienten mit einer primär unresizierbaren, maligne bedingten Gallengangsobstruktion eine deutlich niedrigere Okklusionsrate und eine durchschnittliche Offenheitsdauer von 8 Monaten [117]. Allerdings wurden ein erhöhtes Risiko einer duodenalen Perforation und Blutungen unter anderem als Komplikationen einer Metallstenttherapie beschrieben [103].

1.2 Die Rolle von Bakterien in der Entwicklung einer Stentokklusion

1.2.1 Adhäsion von Bakterien an Oberflächen und Biofilmbildung

Die Lebensformen von Bakterien in der Natur lassen sich grundsätzlich unterscheiden in (1) frei schwebend in planktonischer Form in Suspensionen oder (2) als mikrobieller Biofilm auf Oberflächen. Der Begriff Biofilm wird grob definiert als mikrobielle Ansammlungen, die sich vor allem in fest-flüssigen Grenzflächen finden und von einer Matrix aus reichlich hydratisierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) umhüllt sind [57]. Diese EPS/ Matrix bestehen aus einem Komplex aus Exopolysaccharidosen, Proteinen (z.B. Enzyme, aber auch Strukturproteine), extrazellulärer DNA, Lipiden, Biosurfactant und Wasser [32, 57, 154, 166].

Die Entstehung eines Biofilms erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 2). Anfangs steht die (reversible/irreversible) Adhäsion von frei flottierenden Zellen, unter anderem durch exprimierte extrazelluläre polymere Substanzen, an eine Oberfläche [19, 35]. Sekundär entstehen durch Zellteilung Mikrokolonien sowie lockere, freie Zellen, durch die bei Ablösung weitere Absetzungen entstehen können. Durch kontinuierliche Produktion von überwiegend anionischer extrazellulärer Matrix entwickelt sich ein umhüllendes dreidimensionales Gerüst [35]. Um eine „Gemeinschaft“ zu bilden besteht ein sehr reger Zell-zu-Zell-Kommunikationsaustausch zwischen Mikroorganismen eines Biofilms, was als Quorum sensing bezeichnet wird [74].

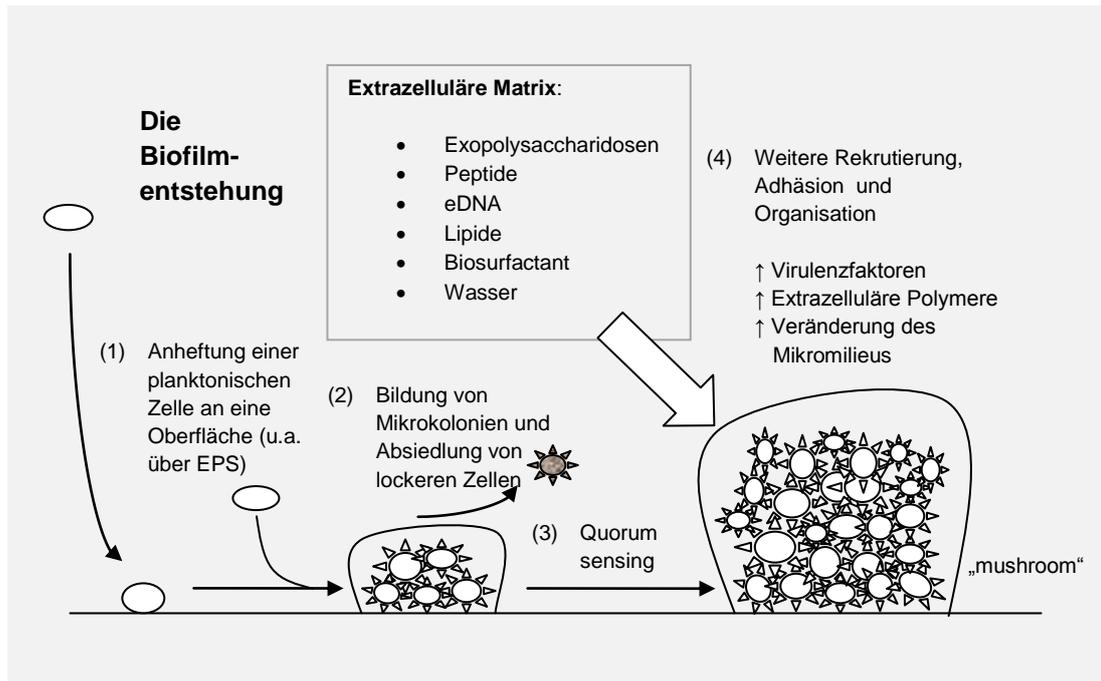


Abb. 2: Entstehung eines Biofilms unter dem Einfluss von Bakterien. Informationen aus [70].

Bakterien in einem Biofilm entwickeln über einige Mechanismen Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Agenzien [112]. Einerseits bildet der Film eine mechanische Schutzbarriere gegenüber „schädlichen“ Stoffen, andererseits ist ein konstantes Milieu geschaffen, in dem sich die Mikroorganismen befinden. Sternberg et al. zeigten, dass die Zellwachstumsaktivität im Zentrum des Biofilms/der Kolonie verglichen mit der Oberfläche und der Peripherie reduziert ist [145]. Ebenso ist der Sauerstoffgehalt im Zentrum des Biofilms vermindert und schafft so anaerobe Verhältnisse [36]. Die Mutabilität in Biofilmkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* ist verglichen mit planktonischen Kulturen erhöht [51]. Auch gesteigerter horizontaler Gentransfer in Form von Plasmidkonjugation und DNA-Transformation scheint für die günstige Entwicklung und Stabilität des Biofilms eine Rolle zu spielen [109]. Es ist anzunehmen, dass veränderte Oberflächenmoleküle, Effluxpumpen und Enzyme (z.B. β -Laktamase) die Resistenz begünstigen [97]. Ebenso ist die anionische Glykokalyx ein weiterer Resistenzfaktor [77]. „Alte“ Bakterien in *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen haben sich als sehr resistent gegenüber Tobramycin und Piperacillin im Vergleich zu planktonischen Zellen und „frisch“ gesetzten Bakterien erwiesen [6]. Um Bakterien abzutöten benötigt man eine bis zu 1000-fach höhere

Antibiotikakonzentration [116]. Ferner sind sogenannte „Persister Cells“ in den Toleranzmechanismus involviert. Diese stellen eine kleine, multiresistente Subpopulation von Zellen dar, die spontan in einen „schlafenden“, metabolisch inaktiven und nicht-teilenden Zustand übergehen können. Die grundlegende Voraussetzung für eine Eradikation durch antimikrobielle Substanzen (aktive, sich teilende Zellen) wird folglich durch diese „schlafenden“ Zellen entzogen [96].

Im medizinischen Gebiet entstehen durch Einbringung von Fremdmaterial in den menschlichen Körper und Prothesenimplantation Infektionsrisiken durch Biofilmbesiedelung. So wurden beispielsweise auf Urinkathetern, intravenösen und arteriellen Kathetern, Gelenksprothesen, künstlichen Herzklappen und nicht zuletzt Gallengangstents Biofilme nachgewiesen [41, 44, 46, 68, 104]. Aber auch auf natürlichen Oberflächen des Körpers können Biofilmformationen beobachtet werden: In der Mundhöhle/an Zähnen, im Mittelohr von Kindern mit chronischer Otitis media, auf Mucosa der Sinus bei Patienten mit chronischer Rhinosinusitis, im respiratorischen Trakt von Mukoviszidosepatienten und auf chronischen Wunden [18, 69, 79, 135, 155].

1.2.2 Sludgebildung als Risikofaktor einer Stentokklusion

Der Begriff „biliärer Sludge“ kam erstmals in den 70er Jahren durch genauere Ultraschalluntersuchungen der Gallenblase und Gallenwege auf und wird bis heute nicht einheitlich behandelt. Andere beschreibende Begriffe für Sludge sind beispielsweise biliäre Mikrolithiasis, biliärer Sand und Gallengries. Im Jahr 1979 wurde erstmals eine echoreiche, lageabhängige Schicht durch Ultraschalluntersuchungen beschrieben, allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht unterscheidbar, ob es sich um dicke oder abnorme Gallenflüssigkeit, Pus oder Cholesterolkristalle handelte [33]. Die Arbeitsgruppe um Filly et al. untersuchte, welcher Bestandteil des „biliären Sludge“ schallschattenerzeugend war, und wies nach, dass dieser vor allem Calciumbilirubinartikeln und Cholesterolkristalle enthält. Nach Filtration der Gallenflüssigkeit war das echoreiche Signal aufgehoben [56]. Bei einer genaueren Untersuchung der chemischen Zusammensetzung setzt sich Sludge aus einer

Suspension von Cholesterinmikrokristallen und Bilirubingranula zusammen, gebettet in eine Schicht aus Muzin [88].

Schon früh wurde festgestellt, dass Bakterien in der Entstehung von Sludge und damit im Okklusionsvorgang von Gallengangstents eine besondere Stellung einnehmen [31]. Vitale Mikroorganismen scheinen sowohl für die Entwicklung von Sludge, wie auch für die Beschleunigung von Okklusionsvorgängen notwendig zu sein. In verschiedenen *in vitro*-Studien, in denen die Perfusion von Gallengangstents getestet wurde mit bakteriell kontaminierter Galle im Vergleich zur Perfusion von Stents mit steriler Galle, entwickelte sich in den ersteren Prothesen signifikant mehr Sludge und infolgedessen eine verstärkte Okklusion in Anwesenheit von Bakterienkolonien [48, 95]. Leung et al. untersuchten 1998 weiterführend den synergistischen Effekt zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien bezüglich ihrer Adhärenz und Biofilmbildung. Die Anlagerung von *Enterococcus spp.* an die Stentoberfläche war signifikant langsamer als die von *E. coli*. Allerdings zeigten Enterokokken nach Präkolonisation der Oberfläche mit *E. coli* eine deutlich gesteigerte Adhärenzneigung [91]. Der Nachweis von Anaerobiern wie *Clostridium spp.* nach einer kurzen Stentimplantationszeit (mediane Stentliegedauer 33,4 Tage) könnte ein Hinweis darauf sein, dass Anaerobier bei der Stentokklusion eine Rolle spielen [90].

Die Sludgeformation scheint ferner durch bakterielle Enzyme gefördert zu werden. Das Enzym β -Glucuronidase dekonjugiert Bilirubindiglucuronid, welches in Kombination mit freien Kalziumionen zu einer Ausfällung von Kalziumbilirubinen führt [101].

Auf der Basis dieser Erkenntnisse bestimmten Leung et al. die enzymatische β -Glucuronidaseaktivität von, aus blockierten und unblockierten Stents und pigmentierten Gallengangssteinen isolierten, Bakterien. Es gelang der Nachweis von 202 Erregern, 61 davon wurden positiv auf β -Glucuronidaseaktivität getestet. *E. coli* und *C. perfringens* erwiesen sich als „Hauptproduzierer“. Aus einer signifikant (34-fach) höheren Enzymaktivität von *C. perfringens* im Vergleich zu *E. coli* wurde geschlossen, dass *C. perfringens* eine zentralere Rolle in der Ausfällung von Kalziumbilirubinen einnimmt [92]. In einer weiteren Untersuchung wiesen isolierte aerobe Bakterien keine β -Glucuronidaseaktivität auf, dafür aber 12 von 13 *C. perfringens*-Isolaten [90]. Andererseits wurde die Rolle der β -Glucuronidase in

der Pathogenese von Stentokklusionen in Frage gestellt, da die Perfusion mit enzymaktivitätspositiven Bakterien in Stents mit keiner größeren Sludgemenge einherging [48].

Das bakterielle Enzym Phospholipase C scheint ebenfalls in der Entwicklung von biliärem Sludge eine Rolle zu spielen. Phospholipase C unterstützt durch Hydrolysierung von biliärem Lecithin die Ausfällung von Kalziumpalmitaten [149]. Leung et. al fanden Phospholipase C-Aktivität in allen von Stents isolierten *Clostridium spp.* [90].

Als Einflussfaktor auf die Adhäsion von Bakterien an die Stentoberfläche sind Proteine wie z.B. Vitronectin und Fibronectin in der Diskussion. In einer Untersuchung von Moesch et al. wurden an der Lumenoberfläche von okkludierten Gallengangstents Proteine eruiert [108]. Fibronectin (unter anderem ein Bestandteil der Galle) fördert die Anlagerung von *Escherichia coli* an die Stentoberfläche [168]. In einer weiterführenden Studie mit vier Gallengangstents von Patienten mit malignen Veränderungen wurden vorwiegend die Proteine Fibronectin und Vitronectin gefunden. *In vitro* war die angelagerte Proteinmenge von den Materialien abhängig (Gummi>Polyurethan>Polytetrafluoroethylen>Polyethylen) und ging mit einer erhöhten bakteriellen Adhäsion einher, was ebenfalls ein Hinweis darauf sein könnte, dass Proteine als Adhäsionsrezeptoren für Bakterien dienen könnten [169].

Immer noch unklar ist, ob Immunglobuline in die Pathogenese von Stentokklusionen involviert sind. Ablagerungen von Immunglobulinen wurden immunhistochemisch an biliären Stents erforscht. Dabei waren Ablagerungen von IgA (als das vorherrschende Immunglobulin der Galle) und IgG in der Peripherie der okkludierten Stents in unmittelbarer Nähe zu Bakterienhäufungen sichtbar. Durch Immunglobulin-Bakterien-Komplexbildung könnte somit eine weiterer fördernder Faktor für die Okklusionsentstehung existieren [26]. Muzine (Glykoproteine) der Galle stellen in der Stentokklusion durch Förderung der Biofilmbildung und Bakterienanlagerung an die luminale Oberfläche der Prothese und Sludgeakkumulation durch eine „Klebstoffwirkung“ zwischen Bakterien und Calciumbilirubinen ebenfalls eine Bedeutung dar [170, 171].

Es ist weiterführend anzunehmen, dass die Gallenviskosität für den Fluss der Galle durch die Endoprothese von Bedeutung ist. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz ist die Effizienz des Galleabflusses von drei Parametern abhängig: Länge der Prothese, innerer Durchmesser der Prothese und Viskosität der Galle. Eine erhöhte Viskosität der Galle geht bei gleichem Stentdurchmesser mit einer Verlangsamung des Galleflusses einher [127]. Durch den verringerten Gallendurchfluss kann es spontan oder bakterienvermittelt zu einer Ausfällung von Gallensalzen kommen [45].

1.2.3 Biliäres Spektrum

Der biliäre Trakt ist im gesunden Zustand steril [40, 71]. Dies wird durch anatomische (Sphinktermuskel, Tight Junctions zwischen den Hepatozyten), physikalische (kontinuierlicher Gallefluss, Mucus), chemische (Gallensalze) und immunologische (Kupffer-Zellen, IgA) Faktoren aufrechterhalten [148].

In pathologischen Zuständen und Ungleichgewichten kann sich eine Bakterioblie entwickeln. Bapat et al. analysierten 1996 das Keimspektrum von Patienten mit chronischer Cholezystitis und obstruktivem Ikterus. Insgesamt dominierten deutlich aerobe Bakterien (99,7%). *E. coli* wurde am häufigsten isoliert (30%), gefolgt von *Klebsiella spp.* (21%), *Proteus mirabilis* (19%) und *Streptococcus faecalis*/*Staphylococcus aureus*. In 63,2% glich das Keimspektrum von Gallenblase und Gallengang dem des Duodenums [10]. In einer weiteren Studie von Suzuki et al. zeigte sich eine ähnliche Verteilung: *E.coli*, gefolgt von *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* und grampositiven Kokken. Anaerobier (*Bacteroides fragilis*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*) zeigten sich immer gemischt mit aeroben Bakterien. Im Vergleich von duodenaler Flüssigkeit und dem Keimspektrum der intraheptischen Galle ergab sich in 61% ein identisches Ergebnis mit dem Keimspektrum des Duodenums, in 26% der Fälle war es nur teilweise übereinstimmend. Auch in einer weiteren Analyse lässt das bakterielle Spektrum darauf schließen, dass die Bakterien aus dem Duodenum stammen [65].

Der Gallengang ist in der Regel frei von Bakterien des Gastrointestinaltrakts durch die physiologische Grenzwirkung des Oddisphinkters [151]. Maßnahmen, die zu einer Insuffizienz des Sphinkters führen können, unterstützen daher eine bakterielle Besiedlung des DHC. Bei der transpapillären Stenteinlage wird in der Regel eine Papillotomie durchgeführt, bei der der Sphinktermuskel teilweise oder ganz durchtrennt wird. Diese Prozedur führt zu einem (Teil-)Verlust der physiologischen Funktion des Sphinktermuskels und infolgedessen zu bilioduodenalem Reflux und einem Aufstieg von Bakterien in die Gallenwege [65, 150]. Das Auffinden von Pflanzenfasern in nicht okkludierten und okkludierten Stents in mehreren Studien unterstützt ebenso die Hypothese, dass durch bilioduodenalen Reflux eine ungünstige Teilrolle an der Entwicklung einer Stentokklusion besteht [47, 66, 68, 159, 164]. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden speziell designte Antireflux-Stents mit einer zunächst länger eruierten Dauer bis zur Stentokklusion entwickelt [52]. Eine Studie von Vihervaara et al. aus dem Jahr 2016 zeigte jedoch kürzere Offenheitsraten für Antirefluxstents im Vergleich zu konventionellen Plastikstents [160].

Eine andere Route, über die Bakterien Anschluss an die biliären Wege gewinnen können, ist das Portalvenensystem [153]. Die Trennung von biliärem und portalvenösem System erfolgt über Tight Junctions zwischen den Hepatozyten, die das Austreten von Bakterien von sinusoidalem Blut in die biliären Wege verhindern. Tight Junctions (auch Zonula occludentes genannt) bilden eine Abdichtung auf jeder Seite der Gallenkanälchen und somit zwischen interzellulärem Raum der Hepatozyten und den Gallenkanälchen [130]. Die Entwicklung von extrahepatischer Cholestase und damit verbundenem erhöhtem intrabiliärem Druck führt zu morphologischen Veränderungen des Aufbaus der Tight Junctions und folgend zu einem (partiellen) Verlust ihrer Funktion [130].

Das Immunglobulin (s)IgA ist das vorherrschende Immunglobulin in biliärer Galle. Es wird vermutet, dass seine Sekretion eine Rolle in der Abwehr der biliären Mucosa gegen Bakterien spielt [148]. Der Weg in intra- und extrahepatisches biliäres Epithel erfolgt vermutlich per Endozytose sc-vermittelt (sekretorische Komponente) [113]. Obstruktion des biliären Trakts aus unterschiedlichen Gründen (maligne oder Steine)

führt zu einer verminderten IgA-Sekretion, welche sich jedoch nach Einsetzen einer Drainage erholen kann [147].

Die durchschnittliche Gallensekretion pro Tag liegt zwischen 700-1200 ml. Die kontinuierliche Sekretion und der damit verbundene Fluss scheint einer bakteriellen Kolonisation der Mucosa im Gallengang entgegenzuwirken. Die physiologische Zusammensetzung der von den Hepatozyten produzierten Galle (Lebergalle) besteht zum größten Teil aus Wasser (ca 95%), gefolgt von Elektrolyten, Gallensalzen, Phospholipiden, Cholesterin und Proteinen. Gallensalze besitzen *in vitro* einen bakteriostatischen Effekt durch Auflösung der Zellwand [73]. Der Zellschaden beruht unter anderem auf Membranzerstörungen aufgrund metabolischer Veränderungen durch Langzeiteinwirkungen von Galle [63]. Dabei ist die Wirkung von hydrophoben Gallensalzen (*in vitro*) potenter als die von hydrophilen Gallensalzen [152]. Sie scheinen gegen aerobe gramnegative Bakterien schlechter zu wirken als gegen aerobe grampositive Keime und Anaerobier [58].

Auch Mucus des Gallengangs bildet eine wasserunlösliche Schicht zwischen biliärem Epithel und Lumen und stellt so eine Barriere gegen pathogene Keime dar [148].

Kupffer-Zellen sind gewebeständige Makrophagen des retikuloendothelialen Systems und machen etwa 30% der Zellen des sinusoidalen Systems der Leber aus [86]. Ihre Aufgabe besteht unter anderem darin, als Fresszelle verschiedene Substanzen (z.B. Abbaumaterial und Pathogene) zu phagozytieren, als Antigen-präsentierende Zelle eine antigenspezifische T-Zell-Immunantwort auszulösen oder selbst Zytokine wie Interleukine, Interferone und TNF zu produzieren [114, 128]. Chronische Lebererkrankungen führen zur Verminderung und Erschöpfung von Kupfferzellen und sind somit Risikofaktoren für eine Bakterioblie [102]. Ebenso geht eine biliäre Obstruktion - sowohl aus malignen wie auch benignen Gründen - mit einer verminderten Funktion der Kupffer-Zellen einher [75, 119].

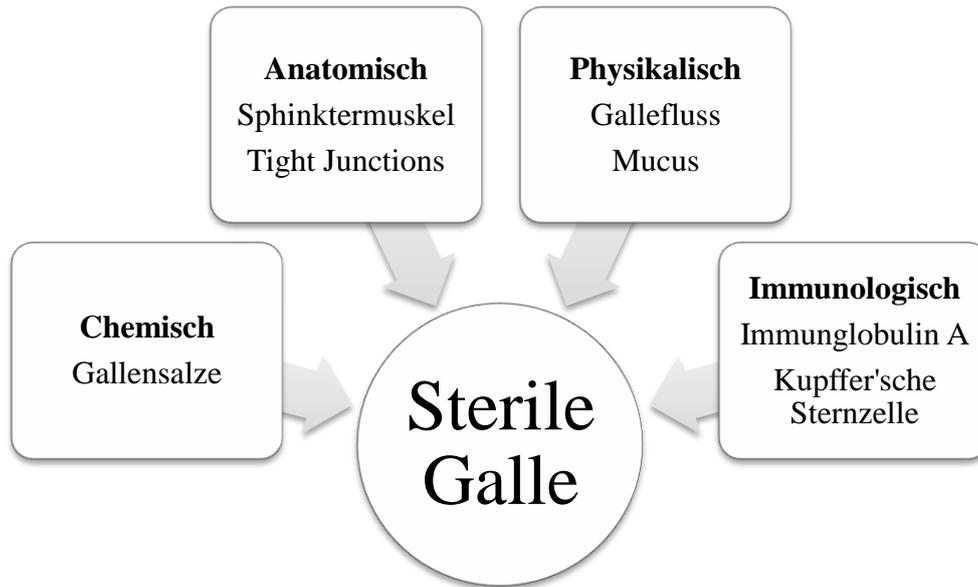


Abb. 3: Einflussfaktoren zur Aufrechterhaltung steriler Galle, Informationen aus [148].

Weitere Risikofaktoren für eine Bakterioblie sind eine Serumbilirubinkonzentration $>1,1$ mg/dl, Diabetes mellitus, akute Cholezystitis, Gallengangssteine und erhöhtes Alter (>70 Jahre) [85]. Desweiteren führt die Therapie von malignen und benignen Erkrankungen mit einer perkutanen transhepatischen biliären Drainage zu einer Bakterioblie [132]. Auch endoskopische Interventionen wie eine ERCP können das Risiko für eine Bakerioblie erhöhen [134]. Eine Studie von Schneider et al. zeigte eine signifikante Erhöhung der Pathogenanzahl in Galle assoziiert mit Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren. Desweiteren konnte im Zusammenhang mit PPI-Einnahme im Bakterienspektrum eine Zunahme der oropharyngealen Flora nachgewiesen werden [137].

2 Ziele der Studie

Die biliäre Stenttherapie spielt eine bedeutende Rolle in der Therapie multipler Erkrankungen des pankreatikobiliären Systems. Limitationen ergeben sich aus dem Auftreten von Stentokklusionen als Folge von biliären Sludgeformationen. Die Entstehung von Biofilm an Oberflächen und biliärem Sludge ist ein multifaktorieller, komplexer Prozess. Eine bakterielle Beteiligung an einer Sludgeformation gilt bis dato als gesichert. In dieser klinisch-prospektiven Studie soll eine genauere Evaluation des Einflusses von Mikroorganismen auf das Risiko einer Stentokklusion anhand einer mikrobiologischen Analyse erfolgen.

Folgende Fragestellungen werden evaluiert:

- I Welche Bakterienarten können von extrahierten biliären Stents isoliert werden?
- II Verändert sich das Keimspektrum in Abhängigkeit von der Liegedauer der extrahierten Stents?
- III Ist eine Sludgeformation bzw. eine Stentokklusion mit einem erhöhten Vorkommen spezieller Keime assoziiert?
- IV Existiert ein Zusammenhang zwischen Seitenöffnungen, Liegedauer, Anzahl der Mikroorganismen und einer erhöhten Sludgeformation?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Für diese klinische Studie wurden Patienten rekrutiert, bei denen im Zeitraum von November 2012 bis Dezember 2013 die Indikation für eine ERC(P) bei liegendem Gallengangstent gestellt wurde und ein Wechsel oder eine Extraktion der Endoprothese durch die II. Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar erfolgte. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München nach der Deklaration von Helsinki genehmigt. Die Studienteilnehmer wurden umfassend über das Projekt sowie die Datenerhebung aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Aus dieser Gruppe widerriefen sechs Teilnehmer ihr Einverständnis, in diesen Fällen erfolgte kein Studieneinschluss.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien wurden definiert:

- Gegebene Indikation zur ERCP

Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert:

- Hämaturie
- Blutung des Gastrointestinaltrakts
- Selektive Darmdekontamination (SDD)
- Unklare Stentliegedauer

3.3 Datenerhebung

Die Erhebung der Daten bestand aus zwei Teilen: der Auswertung der elektronischen endoskopischen Datenbank des Klinikums rechts der Isar und des Archivs der elektronischen Patientenakten.

Durch Auswertung der ERCP-Berichte der endoskopischen Datenbank (Endobase III) der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar konnten folgende Daten erhoben werden: Datum der Intervention, Extraktion der Prothesen, eventuelle Dislokation der Prothesen, Konkremente und Stenosen im Gallengang, Anzahl der endoskopischen Stent-Vortherapien, eventuelle bereits endoskopisch sichtbare Okklusion der Stents und Liegedauer. Ausgeschlossen sind Stents, die extern gelegt wurden, bei diesen wurde durch auswärtige Arztbriefe das Stenteinlagdatum ermittelt. Desweiteren wurde die Stentgröße, Stentlänge und das Stentdesign (gewinkelt, gerade, Pigtail, Doppelpigtail, Tannenbaum) sowie das Vorhandensein von Seitenöffnungen dokumentiert. Wir notierten, ob die Gallengangsprothese „geschützt“ durch den Arbeitskanal des Endoskops (meist bei kleineren Prothesen wie 7-Fr.-Stents) oder „ungeschützt“ durch den Gastrointestinaltrakt des Patienten bei Prothesen größeren Durchmessers gezogen wurde. Es wurde ebenfalls protokolliert, ob ein weiterer Stent gelegt wurde im Sinne eines Stentwechsels oder ob ein Stentauslassversuch unternommen wurde.

Über die elektronische Patientenakte aus dem Krankenhausinformationssystem SAP (SAP AG, Walldorf Deutschland) des Klinikums rechts der Isar konnten folgende Informationen gewonnen und dokumentiert werden: Medikamenteneinnahme, insbesondere Antibiose der letzten drei Monate, Protonenpumpeninhibitoren, Antazida, H₂-Blocker, Ursodesoxycholsäure, sowie Vordiagnosen bzw. Vorerkrankungen. Ebenfalls eruiert wurde der Grund für die Stenttherapie (Grunderkrankung), Voroperationen (insbesondere des oberen Gastrointestinaltrakts wie beispielsweise Whipple-Operation, Z.n. Cholezystektomie und Billroth-II-Operation), Alter, Geschlecht, stationäre Aufenthaltsdauer oder ob es sich um eine ambulante Behandlung handelte. Die Befunde der Blutproben des Patientenkollektivs wurden erfasst durch das Institut für klinische Chemie und Pathochemie des Klinikums rechts der Isar und

folgende Ergebnisse anonymisiert tabellarisch erfasst: CRP, Leukozyten, GOT, GPT, γ -GT, AP, Harnsäure, Bilirubin, Quick-Wert und Thrombozyten.

Alle erhobenen Informationen wurden anonymisiert in eine in Excel (Microsoft®OfficeExcel® 2007 [12.0.6765.5000] SP3 MSO [12.0.6762.5000]) entworfene Datenbank eingetragen.

3.4 Die endoskopische Therapie

3.4.1 Durchführung der Stentextraktion während der ERCP

Primäre ERCP:

Vor der Untersuchung erfolgte eine ausführliche Aufklärung über die Untersuchung durch eine/n qualifizierte/n Arzt/Ärztin. Nach Analgosedierung wurde mit einem Videoduodenoskop (Typ Olympus TJF-160 VR) mit Seitblickoptik von oral bis zur gemeinsamen Mündung des Ductus choledochus und Ductus pancreaticus, der Papilla Vateri, vorgespiegelt. Im Falle einer ERC erfolgte eine Kanülierung des Gallengangs mit Hilfe eines Sphinkterotoms (nach Anspülung) und eines hydrophilen Terumodrahts. Bei Schwierigkeiten, den Gallengang selektiv zu sondieren, wurden sogenannte „Precut“-Techniken angewendet. Bei der transpankreatischen „Precut“-Sphinkterotomie wurde das Papillotom über den gemeinsamen Ausführungsgang in Richtung Ductus pancreaticus vorgeschoben, dort erfolgte eine kontrollierte Inzision des Papillendachs. Bei der „needle-knife“-Precut Sphinkterotomie erfolgte mit einem Nadelmesser eine Sphinkterotomie durch einen Einschnitt der Papille bei 11-12 Uhr. Im nächsten Schritt folgte die retrograde Kontrastmittelinjektion, um die biliären Strukturen zu füllen und somit darzustellen. An diesem Punkt entstand ein erstes Röntgenbild, welches einem diagnostischen Blick zur Aufdeckung von Stenosen oder Gallengangssteinen diente. Bei den meisten Patienten wurde eine EST (endoskopische Sphinkterotomie) durchgeführt, um Steine oder biliären Sludge mittels eines Dormia-Körbchens verschiedener Größen entfernen zu können oder Stenosen mit Hilfe eines Ballons aufzudehnen und mit einem Bougie zu entfernen. Im Fall von biliären

Strikturen oder inkompletter Steinentfernung wurden Polyethylenstents eingesetzt (7-11,5 Fr.).

Stentwechsel:

Bei einem geplanten Stentwechsel oder einer Stentextraktion mit Stentauslassversuch wurde nach Auffinden und Kanülierung der Papilla Vateri und des Gallengangs Kontrastmittel injiziert. Die Position der Endoprothesen konnte so durch eine abdominelle Röntgenaufnahme eruiert und dokumentiert werden. Für die darauf folgende Stentextraktion gab es zwei unterschiedliche Möglichkeiten: Stents kleineren Durchmessers (7 Fr.) wurden in der Regel durch den Arbeitskanal des Endoskops extrahiert. Bei Stents größeren Durchmessers erfolgte die Extraktion durch kompletten Rückzug und Entfernung des gesamten Videoendoskops. Anschließend wurde ein 6 Fr.-Katheter in den biliären Trakt eingeführt und wiederholt Kontrastmittel injiziert. Die vorhergehenden und aktuellen Cholangiogramme konnten so verglichen und auf dieser Basis eine Entscheidung getroffen werden, ob ein weiterer Stent oder mehrere Stents eingesetzt werden oder die Stenttherapie in Form eines Stentauslassversuch beendet wurde.

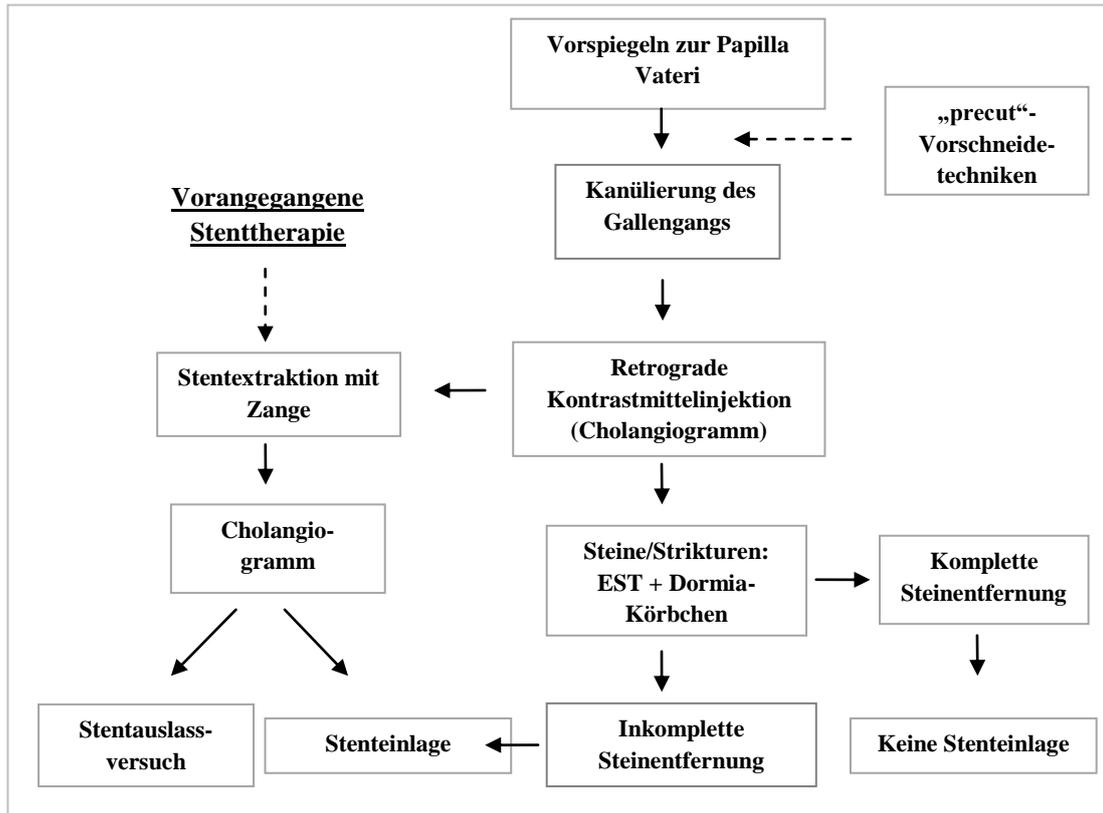


Abb. 4: Vorgehensweise während einer ERCP.

3.4.2 Vorgehensweise nach Stentextraktion und mikrobiologische Analyse

Alle Gallengangstents wurden nach der Extraktion umgehend unter sterilen Bedingungen in das mikrobiologische Institut des Klinikums rechts der Isar transportiert und dort anhand eines standardisierten Protokolls weiterverarbeitet. Die extrahierten Endoprothesen bestanden aus dem Plastikmaterial Polyethylen (Peter Pflugbeil GmbH, Germany; Cook Incorporation, Ireland) und wiesen einen Durchmesser zwischen 7- 11,5 Fr. auf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten für alle Stents gleiche Oberflächenbedingungen. Um eine möglicherweise während der Stentextraktion stattgefundenene Kontamination zu minimieren wurden 1,5 cm des distalen und proximalen Endes des Stents mithilfe eines sterilen Skalpell entfernt und die äußere Oberfläche mit einer sterilen Kompresse, getränkt in 70%igen Alkohol, abgerieben. Im nächsten Schritt wurde der Stent mit einem sterilen Skalpell longitudinal eröffnet und

die innere Oberfläche visuell analysiert. Der Status der Seitenöffnungen wurde dokumentiert.

Die weitere Verarbeitung des Stents erfolgte in einem Ultraschallbad (Bactosonic®, Bandelin, Germany). Bezüglich dieser Methodik wurde bereits unter anderem aus dem Bereich der infektiologischen Orthopädie wie auch Urologie Vorarbeiten geleistet. Nach vorangegangenem „Vortexen“ wird durch Beschallung mit niederfrequentem Ultraschall bei geringer Intensität die Haftung des Biofilms an der Stentoberfläche durch Bildung von Dampfblasen und Scherkräften vermindert, so dass sich der Biofilm von der Stentoberfläche ablösen kann [20, 118, 156]. Die im sogenannten Sonifikat gewonnenen Mikroorganismen werden direkt kultiviert und mithilfe der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie analysiert.

In unserer Studie wurde die Endoprothese in einem sterilen Gefäß (Lock&Lock®, Bandelin, Germany) in 60 ml Ringer-Lösung eingelegt. Darauf folgend wurde der Stent im nächsten Schritt für 30 Sekunden gevortext, um die Mikroorganismen aus dem Biofilm zu lösen und daraufhin 60 Sekunden in das Ultraschallbad eingesetzt bei einer Frequenz von 40 kHz. Anschließend wurde die Flüssigkeit nochmals gevortext für 30 Sekunden.

Für die mikrobiologische Analyse wurden 20 ml des Sonifikats für 10 Minuten bei 3000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für die weitere Kultivierung auf aeroben und anaeroben Agarplatten (Columbia-Schafblut-Agar, Schokoladenagar, Mac Conkey Agar, Schädler KV anaerober Agar, Schädler anaerober Agar, Sabouroud-Agar) ausgestrichen und inkubiert unter aeroben und anaeroben Verhältnissen bei 37° Celsius für 48 Stunden. Die Identifizierung der Keime erfolgte durch die MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionisation Time of Flight) - Massenspektrometrie (MALDI-TOF, Bruker Corporation, Billerica, U.S.A). Bei dieser Methodik wird mit einem sterilen Holzspatel eine geringe Menge von einer Bakterienkolonie genommen, auf eine Targetplatte aufgebracht und durch Laserstrahlen ionisiert. Durch Beschleunigung der Ionen entsteht in der „time-of-flight“-Analyse ein charakteristisches Muster für Proteine unterschiedlicher Bakterien, die mit einer großen Datenbank verglichen und damit charakterisiert werden können [165].

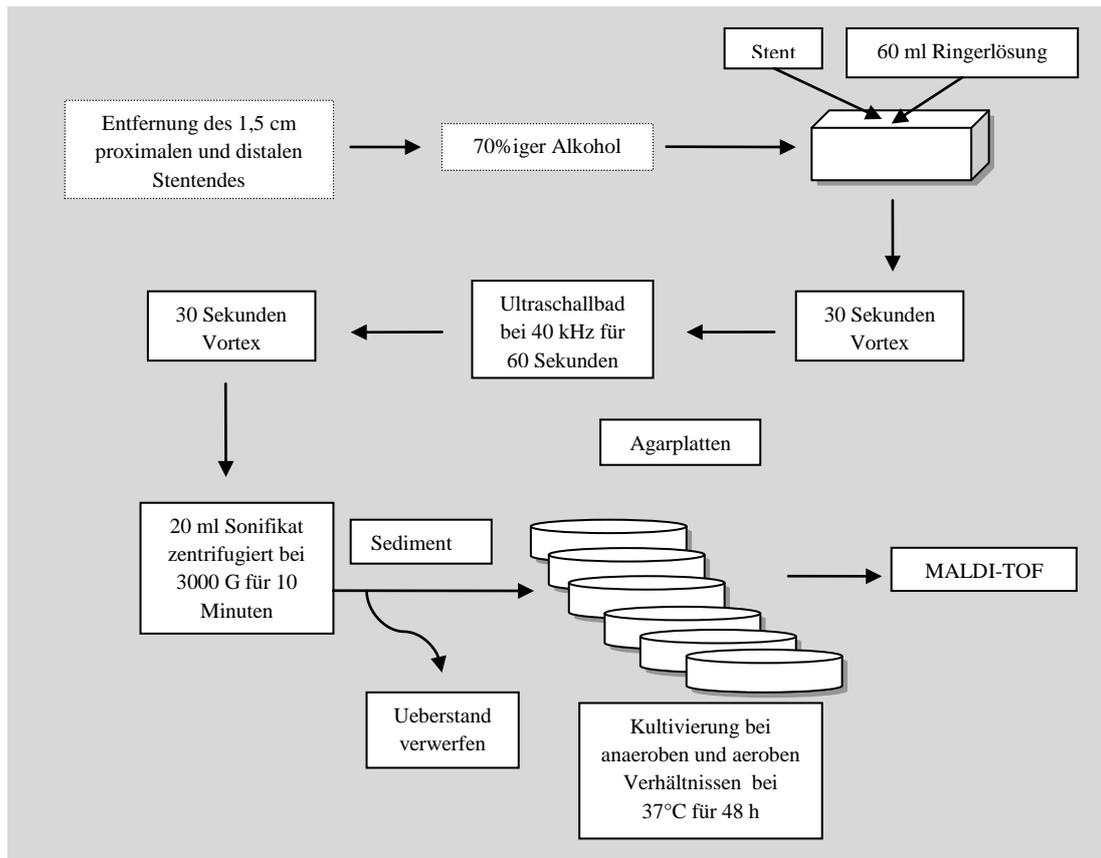


Abb. 5: Verarbeitung der biliären Endoprothesen und mikrobiologische Analyse.

Die Definition einer Sludgeformation wurde durch den Farbumschlag der Sonifikationslösung festgelegt. Ein Farbumschlag in gelb-bräunliche Farbe, der dem Sonifikationsprozess folgte, wurde als sludge-positiv gewertet. Der Sonifikationsprozess war standardisiert (60 ml Ringerlösung). Der Stent wurde als okkludiert definiert, wenn Sludge das innere Lumen vollständig ausgefüllt hat.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch SPSS ® (Version 22.0, IBM). Die Untersuchung von mehreren Stents eines Patienten wurden als voneinander unabhängig betrachtet. Die Verteilung der quantitativen und qualitativen Daten wird als Median oder absolute oder relative Häufigkeiten dargestellt. Pearson's Chi-Quadrat- Test und Fisher's exakter Test wurden genutzt um die Relation des Keimspektrums zur kategorisierten Liegedauer und des Vorhandenseins von Sludge zu untersuchen. Zusätzlich zu dieser univariaten Analyse der potentiellen Risikofaktoren wurde eine multivariate Analyse durch logistische Regression durchgeführt. Risikofaktoren, die sich in der univariaten Analyse als signifikant herausstellten, wurden also durch eine weitere multivariate Analyse untersucht. Alle Tests wurden ausgeführt auf einem zweiseitigen 5% Signifikanzniveau.

4 Ergebnisse

4.1 Basisdaten

Insgesamt wurden 130 Patienten (53 Frauen, 77 Männer) mit einem medianen Alter von 67 Jahren in die Studie eingeschlossen. Vom Patientenkollektiv wurden 343 extrahierte biliäre Stents analysiert. Diese Stentextraktionen erfolgten in insgesamt 234 Sitzungen, hiervon waren 197 als elektiv zu bezeichnen.

Die Indikation für die Stenttherapie war in 34,62% maligner, 61,54% benigner und 3,85% idiopathischer Genese. Innerhalb der malignen Gruppe war das cholangiozelluläre Karzinom an erster Stelle der Ursachen (20/45), gefolgt von Karzinomen des Pankreas (14/45). In der benignen Gruppe dominierte die inkomplette Entfernung von Gallengangssteinen (47/80).

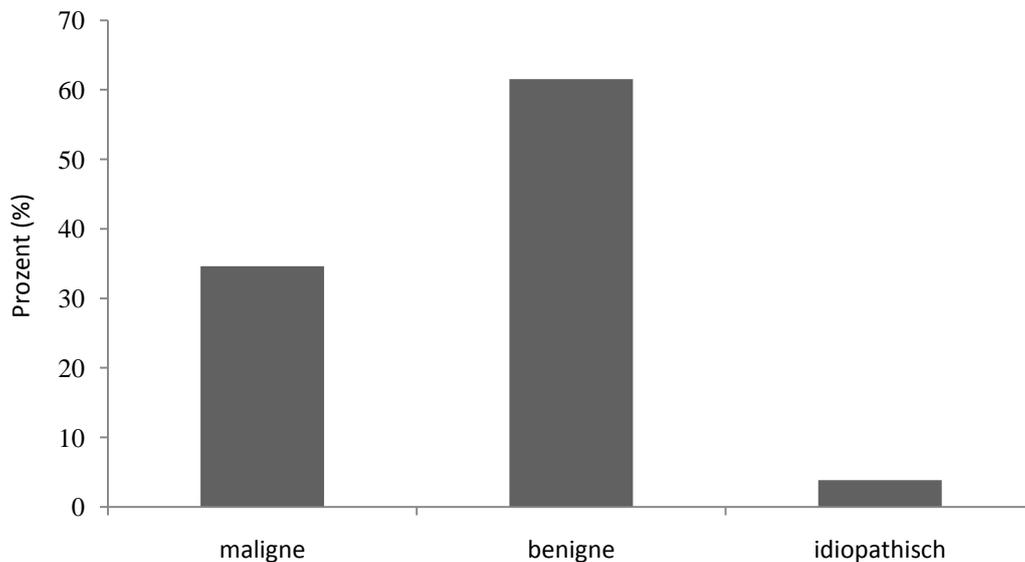


Abb. 6: Indikationen für die Stenttherapie.

Tab. 2: Basisdaten.

Patientenanzahl	130
Medianes Alter in Jahren (Range)	67 (22-91)
Grund für die Stenttherapie	
<u>Maligne Genese</u>	45
- Cholangiokarzinom	20
- Pankreaskarzinom	14
- Hepatozelluläres Karzinom	1
- Lebermetastasen mit intrahepatischer biliärer Obstruktion	
• Mammakarzinom	1
• Kolorektale Karzinome	6
• Magenkarzinom	1
• Malignes Melanom	1
• Lymphom	1
<u>Benigne Genese</u>	80
- Anastomosenstenose nach LTX	7
- Biliäre Leckage nach LTX	4
- Chronische Pankreatitis mit extrahepatischer Gallengangsobstruktion	4
- Biliäre Striktur nach CHE	8
- Adenom der Papilla Vateri	1
- Insuffizienz des Ductus cysticus nach CHE	1
- Radiogene Gallengangsstenose	2
- Inkomplette Entfernung von Gallensteinen	47
- Primär sklerosierende Cholangitis	2
- Sekundär sklerosierende Cholangitis	2
- Biliom	2
<u>Idiopathische Gallengangsstenosen</u>	5
Totale Anzahl der biliären Stents	343
Anzahl der biliären Stents mit Sludge	149
Anzahl der biliären Stents mit Okklusion	70
Mediane Stentliegedauer in Tagen (Range)	70 (1-3087)
Totale Anzahl der Stentextraktionen	234
Anzahl der Multistentingtherapie	90
Anzahl der elektiven Stentextraktionen	197

Von 343 Stents konnte bei 149 biliärer Sludge nachgewiesen werden. Zudem waren 70 der 343 Stents (20,41%) okkludiert. In 35,19 % (19/54) der Fälle resultierte aus einer Stentokklusion eine Cholangitis oder Cholestase. Die mediane Liegedauer bis zur Stentextraktion betrug 70 Tage (1-3087 Tage).

4.2 Mikrobiologische Analyse

Von 343 biliären Stents wurden insgesamt 2283 Mikroorganismen isoliert. An der Gesamtanzahl der isolierten Mikroorganismen stellten aerobe Bakterien den Hauptteil dar (1685/2283; [73,81%]), zu unterteilen in aerobe grampositive Bakterien (914/2283; [40,04%]) und aerobe gramnegative Bakterien (771/2283; [33,77%]). Anaerobier (409/2283; [17,92%]) und Hefepilze (genauer: *Candida spp.*) (188/2283; [8,23%]) waren die dritthäufigsten und vierthäufigsten nachgewiesenen Mikroorganismen. Insgesamt wurden 56 Gattungen mit 158 unterschiedlichen Arten isoliert.

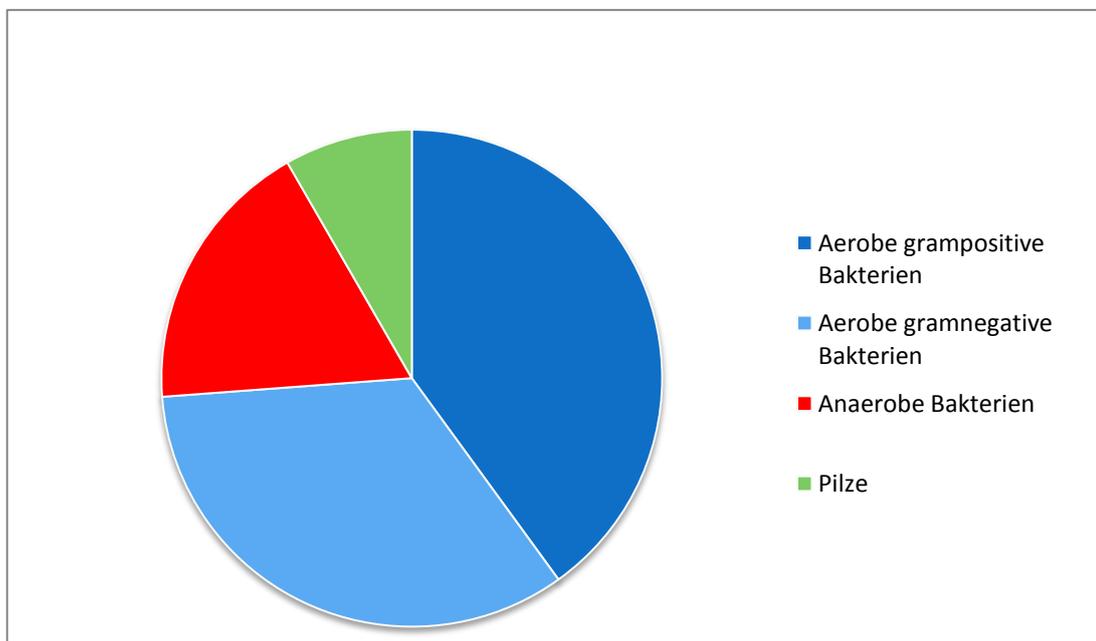


Abb. 7: Prozentanteil von aeroben und anaeroben Bakterien sowie Pilzen (zu 99,47% bestehend aus *Candida spp.*) bezogen auf die Gesamtanzahl der isolierten Mikroorganismen (n=2283).

Bezogen auf die Anzahl der analysierten Stents (n=343), zeigte sich folgende Verteilung: aerobe grampositive Bakterien konnten von 332 der 343 Stents (332/343; [96,79%]) isoliert werden, gefolgt von aeroben gramnegativen Bakterien (297/343; [86,59%]), Anaerobiern (212/343; [61,81%]) und *Candida spp.* (155/343; [45,19%]).

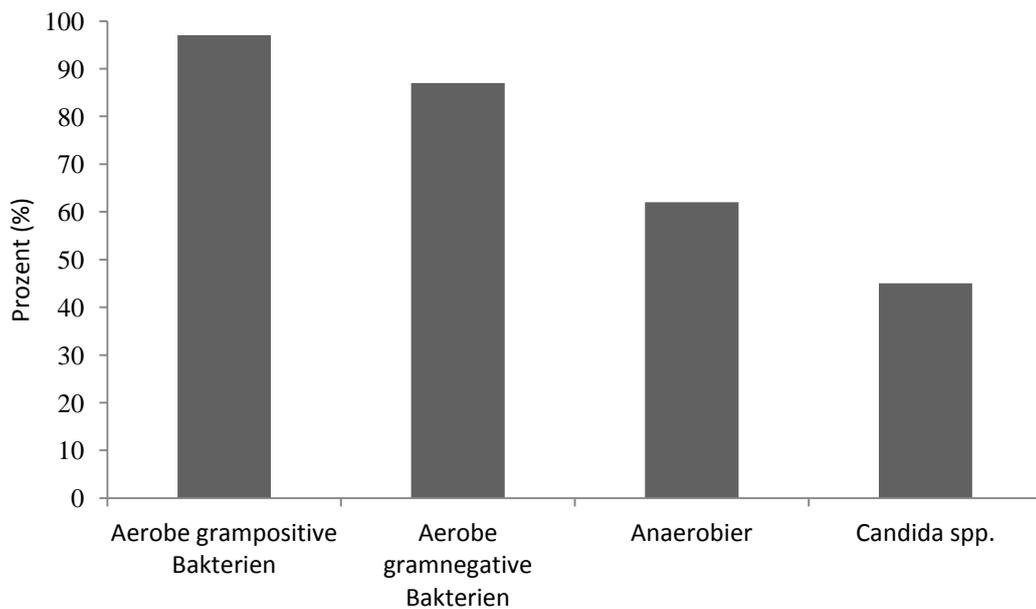


Abb. 8: Prozentuale Anteile von aeroben und anaeroben Bakterien sowie Pilzen (*Candida spp.*) bezogen auf die Anzahl der analysierten biliären Stents (n=343 [100%]).

Insgesamt war *Enterococcus spp.* die am häufigsten zu identifizierende Keimspezies (504/2283; [22,08%]), zu finden auf 297 von 343 (86,59%) Stents. Es folgten *Klebsiella spp.* (218/2283; [9,55%]), *Streptococcus spp.* (213/2283; [9,33%]), *Candida spp.* (188/2283; [8,23%]) und *Escherichia spp.* (182/2283; [7,97%]), welche auf 180 (52,48%), 170 (49,56%), 155 (45,19%) und 170 (49,56%) Stents nachgewiesen wurden.

Innerhalb der Gruppe der grampositiven Bakterien isolierten wir (nach *Enterococcus spp.*) an zweit- und dritthäufigster Stelle *Streptococcus spp.* (213/2283; [9,33%]) sowie *Staphylococcus spp.* (39/2283; [1,71%]), kultiviert von 170 (49,56%) und 37 (10,79%) biliären Endoprothesen.

In der aerob gramnegativen Kategorie führte die Gruppe der *Enterobacteriaceae* (665/2283; [29,13%]), isoliert von 279 (81,34%) Stents. Hier wurde *Klebsiella spp.* am häufigsten nachgewiesen (218/2283; [9,55%]), darauf folgend *Escherichia spp.* (182/2283; [7,97%]) und *Enterobacter spp.* (112/2283; [4,91%]), zu finden auf 180 (53,48%), 170 (49,56%) und 98 (28,57%) Stents. Nicht-fermentierende Bakterien (36/2283; [1,58%]) wie bspw. *Pseudomonas spp.* und *Acinetobacter spp.* waren nachweisbar auf 36 von 343 Stents (10,50%).

Weiterführend konnten zudem 409 Anaerobier (17,92% von der Gesamtzahl der Mikroorganismen) auf insgesamt 212 (61,81%) Stents dokumentiert werden. Davon waren 149 *Prevotella spp.* (6,53%) von 123 Stents (35,86%) zu isolieren, anschließend *Clostridium spp.* (106/2283; [4,64%]) von 98 (28,57%), *Bacteroides spp.* (64/2283; [2,80%]) von 50 (14,58%) sowie *Veillonella spp.* (47/2283; [2,06%]) von 45 (13,12%) der Stents. *Fusobacterium spp.* fanden sich auf 19 von 343 (5,54%) sowie *Propionibacterium spp.* auf 14 von 343 (4,08%) Stents.

Die fast ausschließlich nachgewiesene Pilzgattung war *Candida* (188/2283; [8,23%]) auf 155 (45,19%) Stents, in genauerer Betrachtung: *Candida albicans* (84/2283; [3,68%]), *Candida glabrata* (51/2283; [2,23%]) und *Candida tropicalis* 0,74% (17/2283). *Candida albicans* war auf 84 (24,49%), *Candida glabrata* auf 51 (14,87%) und *Candida tropicalis* auf 17 (4,96%) der biliären Endoprothesen zu dokumentieren.

	Totale Anzahl an Mikroorganismen [%]	Anzahl der isolierten Stents [%]
Anzahl der Stents		343
Totale Anzahl der Mikroorganismen	2283	
Mediane Anzahl von Mikroorganismen		7 (0-14)
Aerobe grampositive Bakterien	914; [40%]	332; [97%]
<u>Enterococcus spp.</u>	504; [22%]	297; [87%]
<i>Enterococcus faecium</i>	126; [6%]	126; [37%]
<i>Enterococcus faecalis</i>	223; [10%]	223; [65%]
Andere <i>Enterococcus spp.</i>	155; [7%]	133; [39%]
<u>Streptococcus spp.</u>	213; [9%]	170; [50%]
<i>Streptococcus viridans</i> Gruppe	211; [9%]	169; [49%]
B-hämolysierende Streptokokken	2; [1%]	2; [1%]
<u>Staphylococcus spp.</u>	39; [2%]	37; [11%]
<i>Staphylococcus aureus</i>	12; [1%]	12; [3%]
Koagulase-negative Staphylokokken	27; [1%]	27; [8%]
<u>Andere aerobe grampositive Bakterien</u>	158; [17%]	117; [34%]
Aerobe gramnegative Bakterien	771; [34%]	297; [87%]
<u>Enterobacteriaceae</u>	665; [29%]	279; [81%]
<i>Escherichia spp.</i>	182; [8%]	170; [50%]
<i>Klebsiella spp.</i>	218; [10%]	180; [52%]
<i>Citrobacter spp.</i>	77; [3%]	61; [18%]
<i>Proteus spp.</i>	39; [2%]	39; [11%]
<i>Morganella spp.</i>	17; [1%]	17; [5%]
<i>Enterobacter spp.</i>	112; [5%]	98; [29%]
<i>Serratia spp.</i>	1; [1%]	1; [1%]
Andere <i>Enterobacteriaceae</i>	19; [1%]	19; [6%]
<u>Nicht-fermentierende Bakterien</u>	36; [2%]	36; [10%]
<i>Pseudomonas spp.</i>	29; [1%]	29; [8%]
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	3; [1%]	3; [1%]
<i>Acinetobacter spp.</i>	3; [1%]	3; [1%]
Andere nicht-fermentierende Bakterien	1; [1%]	1; [1%]
<u>Andere aerobe gramnegative Bakterien</u>	70; [3%]	58; [17%]
Anaerobe Bakterien	409; [18%]	212; [62%]
<i>Bacteroides spp.</i>	64; [3%]	50; [15%]
<i>Prevotella spp.</i>	149; [7%]	123; [36%]
<i>Fusobacterium spp.</i>	19; [1%]	19; [6%]
<i>Veillonella spp.</i>	47; [2%]	45; [13%]
<i>Clostridium spp.</i>	106; [5%]	98; [29%]
<i>Propionibacterium spp.</i>	14; [1%]	14; [4%]
Andere Anaerobier	10; [1%]	10; [3%]

Tab. 3: Von biliären Stents isoliertes Keimspektrum (aerob gramnegativ und grampositiv, anaerob).

	Totale Anzahl an Mikroorganismen [%]	Anzahl der isolierten Stents [%]
Anzahl der Stents		343
Totale Anzahl der Mikroorganismen	2283	
Mediane Anzahl von Mikroorganismen		7 (0-14)
Pilze		
<i>Candida spp.</i>	188; [8%]	155; [45%]
<i>Candida albicans</i>	84; [4%]	84; [24%]
<i>Candida tropicalis</i>	17; [1%]	17; [5%]
<i>Candida glabrata</i>	51; [2%]	51; [15%]
<i>Candida krusei</i>	3; [1%]	3; [1%]
<i>Candida norvegensis</i>	1; [1%]	1; [1%]
<i>Candida dublinensis</i>	2; [1%]	2; [1%]
<i>Candida robusta</i>	1; [1%]	1; [1%]
Andere <i>Candida spp.</i>	29; [1%]	28; [8%]
<i>Magnusiomyces spp.</i>	1; [1%]	1; [1%]

Tab. 4: Von biliären Stents isoliertes Keimspektrum (Pilze).

4.3 Analyse des Keimspektrums in Abhängigkeit von der Liegedauer

Abhängig von der Liegedauer der extrahierten Stents definierten wir drei unterschiedliche Gruppen: Gruppe I (1-15 Tage; 49 Stents), Gruppe II (20-59 Tage, 100 Stents) und Gruppe III (60-3087 Tage, 184 Stents). Abhängig von der Liegedauer wurde die Keimzahl- und das Spektrum analysiert.

Insgesamt dominierten in allen drei Zeitgruppen aerobe grampositive Bakterien: Es zeigten sich 87,76% der Stents von Gruppe I (43/49), 98,00% von Gruppe II (98/100) und 99,46% von Gruppe III (183/184) besiedelt mit aeroben grampositiven Bakterien.

In Gruppe I herrschten neben den aeroben grampositiven Bakterien (43/49; [87,76%]) *Candida spp.* (25/49; [51,02%]) vor. Aerobe gramnegative Bakterien und Anaerobier wiesen einen Anteil von 44,90% (22/49) und 24,49% (12/49) auf. Die biliären Stents der Gruppe II waren in 98,00% (98/100) von grampositiven aeroben Bakterien, 90,00% (90/100) von gramnegativen aeroben Bakterien, 67,00% (67/100) von Anaerobiern und 42,00% (42/100) von *Candida spp.* besiedelt. In Gruppe III waren fast gleiche Anteile an aeroben grampositiven (183/184; [99,46%]) und aeroben gramnegativen Bakterien (176/184; [95,65%]) sowie ein hoher Anteil an Anaerobiern

(127/184; [69,02%]) festzustellen. *Candida* spp. wurde am seltensten isoliert werden (83/184; [45;11]).

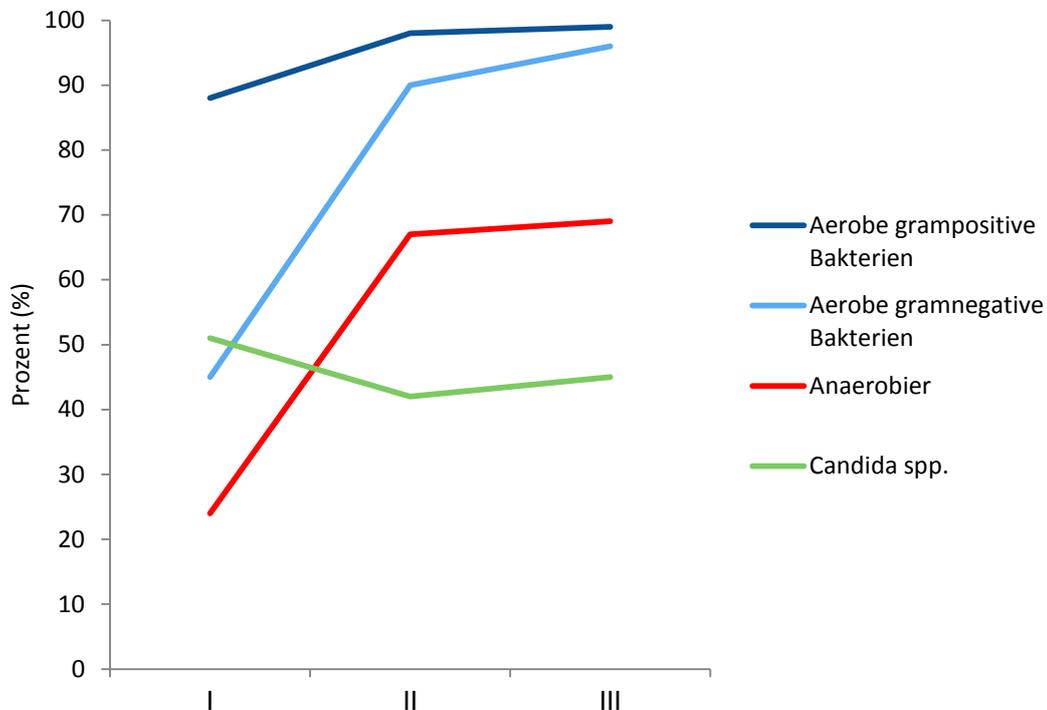


Abb. 9: Veränderung des Keimspektrums in Abhängigkeit von der Stentliegedauer. Es wurden drei Zeitgruppen (Liegedauer) festgelegt: Gruppe I: 1-15 Tage, Gruppe II: 20-59 Tage, Gruppe III: 60-3087 Tage, dargestellt durch die x-Achse.

Innerhalb der grampositiven Bakterien [p=0,01; 87,76% (Gr. I); 98,00% (Gr. II); 99,46% (Gr. III)] stieg die Inzidenz von *Enterococcus* spp. signifikant mit längerer Liegedauer an [p=0,01; 48,97% (Gr. I); 90,00% (Gr. II); 95,11% (Gr. III)]. Parallel dazu ließen sich signifikant mehr Anaerobier mit längerer Liegedauer feststellen [p=0,01; 24,49% (Gr. I); 67,00% (Gr. II); 69,02% (Gr. III)]. Ebenso verhielt es sich mit aeroben gramnegativen Bakterien [p=0,01; 44,90% (Gr. I), 90,00% (Gr. II), 95,65% (Gr. III)], im Besonderen mit Hinblick auf die Gruppe der *Enterobacteriaceae* [p=0,01; 34,69% (Gr. I), 82,00% (Gr. II), 92,93% (Gr. III)].

Eine längere Stentliegedauer ging insgesamt mit einer steigenden Anzahl an isolierten Mikroorganismen einher [Gr. I: 178 Keime; Gr. II: 660 Keime; Gr. III: 1386 Keime].

Auch die mediane Keimanzahl pro Stent nahm zu [Gr. I: 3(0-10); Gr. II: 6(2-13); Gr. III: 8(2-14)]. Das Spektrum sowie die Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer ist in Tabelle 5-7 dargestellt.

Tab. 5: Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (aerob, grampositiv).

	Anzahl der von Stents isolierten Mikroorganismen mit einer Liegedauer von:			Anzahl der isolierten Stents pro Keim bezogen auf die Liegedauer:			p-Wert
	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr.III)	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr. III)	
Stentanzahl	-	-	-	49	100	184	-
Totale Anzahl (Mikroorganismen)	178	660	1386	-	-	-	-
Mediane Anzahl (Mikroorganismen)	3; [0-10]	6; [2-13]	8; [2-14]	-	-	-	-
Aerobe grampositive Bakterien	92; [52%]	277; [42%]	524; [38%]	43; [88%]	98; [98%]	183; [99%]	p=0,01
<i>Enterococcus spp.</i>	28; [16%]	162; [25%]	300; [22%]	24; [49%]	90; [90%]	175; [95%]	p=0,01
<i>Enterococcus faecalis</i>	6; [3%]	69; [10%]	142; [10%]	6; [12%]	69; [69%]	142; [77%]	p=0,01
<i>Enterococcus faecium</i>	16; [9%]	46; [7%]	61; [4%]	16; [33%]	46; [46%]	61; [33%]	p=0,08
Andere <i>Enterococcus spp.</i>	6; [3%]	47; [7%]	97; [7%]	6; [12%]	37; [37%]	85; [46%]	p=0,01
<i>Streptococcus spp.</i>	29; [16%]	59; [9%]	119; [9%]	21; [43%]	47; [47%]	98; [53%]	p=0,34
<i>Streptococcus viridans</i>	29; [16%]	58; [9%]	118; [9%]	21; [43%]	46; [46%]	98; [53%]	p=0,30
β-hämolisierende Streptokokken	0; [0%]	1; [1%]	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	1; [1%]	p=1,00
<i>Staphylococcus spp.</i>	12; [7%]	8; [1%]	18; [1%]	10; [20%]	8; [8%]	18; [10%]	p=0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	1; [1%]	3; [1%]	7; [1%]	1; [2%]	3; [3%]	7; [4%]	p=1,00
Koagulase-negative Staphylokokken	11; [6%]	5; [1%]	11; [1%]	9; [18%]	5; [5%]	11; [6%]	p=0,02
<u>Andere aerobe grampositive Bakterien</u>	23; [13%]	48; [7%]	87; [6%]	18; [37%]	32; [32%]	67; [36%]	-

Tab. 6: Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (aerob, gramnegativ).

	Anzahl der von Stents isolierten Mikroorganismen mit einer Liegedauer von:			Anzahl der isolierten Stents pro Keim bezogen auf die Liegedauer:			p-Wert
	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr. III)	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr. III)	
Stentanzahl	-	-	-	49	100	184	-
Totale Anzahl (Mikroorganismen)	178	660	1386	-	-	-	-
Mediane Anzahl (Mikroorganismen)	3; [0-10]	6; [2-13]	8; [2-14]	-	-	-	-
Aerobe gramnegative Bakterien	35; [20%]	204; [31%]	511; [37%]	22; [45%]	90; [90%]	176; [96%]	p=0,01
<u>Enterobacteriaceae</u>	26; [15%]	165; [25%]	453; [33%]	17; [35%]	82; [82%]	171; [93%]	p=0,01
<i>Escherichia spp.</i>	8; [4%]	44; [7%]	122; [9%]	8; [16%]	43; [43%]	112; [61%]	p=0,01
<i>Klebsiella spp.</i>	5; [3%]	54; [8%]	154; [11%]	4; [8%]	48; [48%]	123; [67%]	p=0,01
<i>Citrobacter spp.</i>	2; [1%]	23; [3%]	51; [4%]	2; [4%]	18; [18%]	40; [22%]	p=0,02
<i>Proteus spp.</i>	0; [0%]	8; [1%]	29; [2%]	0; [0%]	8; [8%]	29; [16%]	p=0,01
<i>Morganella spp.</i>	0; [0%]	4; [1%]	13; [1%]	0; [0%]	4; [4%]	13; [7%]	p=0,12
<i>Enterobacter spp.</i>	11; [6%]	27; [4%]	69; [5%]	8; [16%]	23; [23%]	62; [34%]	p=0,02
<i>Serratia spp.</i>	0; [0%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	0; [0%]	1; [1%]	p=1,00
Andere Enterobacteriaceae	0; [0%]	5; [1%]	14; [1%]	0; [0%]	5; [5%]	14; [8%]	-
<u>Nicht-fermentierende Bakterien</u>	4; [2%]	15; [2%]	17; [1%]	4; [8%]	15; [15%]	17; [9%]	p=0,27
<i>Pseudomonas spp.</i>	1; [1%]	13; [2%]	15; [1%]	1; [2%]	13; [13%]	15; [8%]	p=0,07
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	0; [0%]	2; [1%]	1; [1%]	0; [0%]	2; [2%]	1; [1%]	p=0,56
<i>Acinetobacter spp.</i>	2; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	2; [4%]	0; [0%]	1; [1%]	p=0,08
Andere nicht fermentierende Bakterien	1; [1%]	0; [0%]	0; [0%]	1; [2%]	0; [0%]	0; [0%]	-
<u>Andere aerobe gramnegative Bakterien</u>	5; [3%]	24; [4%]	41; [3%]	3; [6%]	20; [20%]	35; [19%]	-

Tab. 7: Spektrum und Anzahl der Mikroorganismen in Relation zur Stentliegedauer (Anaerobier, Pilze).

	Anzahl der von Stents isolierten Mikroorganismen mit einer Liegedauer von:			Anzahl der isolierten Stents pro Keim bezogen auf die Liegedauer:			p-Wert
	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr. III)	1-15 d (Gr. I)	20-59 d (Gr. II)	60-3087d (Gr. III)	
Stentanzahl	-	-	-	49	100	184	-
Totale Anzahl (Mikroorganismen)	178	660	1386	-	-	-	-
Mediane Anzahl (Mikroorganismen)	3; [0-10]	6; [2-13]	8; [2-14]	-	-	-	-
Anaerobier	18; [10%]	125; [19%]	254; [18%]	12; [24%]	67; [67%]	127; [69%]	p=0,01
<i>Bacteroides spp.</i>	2; [1%]	18; [3%]	44; [3%]	2; [4%]	13; [13%]	35; [19%]	p=0,03
<i>Prevotella spp.</i>	10; [6%]	48; [7%]	87; [6%]	8; [16%]	39; [39%]	73; [40%]	p=0,01
<i>Fusobacterium spp.</i>	0; [0%]	2; [1%]	15; [1%]	0; [0%]	2; [2%]	15; [8%]	p=0,02
<i>Veillonella spp.</i>	5; [3%]	21; [3%]	18; [1%]	5; [10%]	21; [21%]	17; [9%]	p=0,08
<i>Clostridium spp.</i>	1; [1%]	28; [4%]	75; [5%]	1; [2%]	26; [26%]	69; [38%]	p=0,01
<i>Propionibacterium spp.</i>	0; [0%]	5; [1%]	8; [1%]	0; [0%]	5; [5%]	8; [4%]	p=0,30
<i>Andere Anaerobier</i>	0; [0%]	3; [1%]	7; [1%]	0; [0%]	3; [3%]	7; [4%]	-
Pilze							
<i>Candida spp.</i>	33; [19%]	54; [8%]	96; [7%]	25; [51%]	42; [42%]	83; [45%]	p=0,58
<i>Candida albicans</i>	17; [10%]	27; [4%]	36; [3%]	17; [35%]	27; [27%]	36; [20%]	p=0,62
<i>Candida tropicalis</i>	1; [1%]	7; [1%]	9; [1%]	1; [2%]	7; [7%]	9; [5%]	p=0,48
<i>Candida glabrata</i>	5; [3%]	12; [2%]	33; [2%]	5; [10%]	12; [12%]	33; [18%]	p=0,24
<i>Candida krusei</i>	0; [0%]	2; [1%]	1; [1%]	0; [0%]	2; [2%]	1; [1%]	p=0,56
<i>Candida norvegensis</i>	1; [1%]	0; [0%]	0; [0%]	1; [2%]	0; [0%]	0; [0%]	p=0,15
<i>Candida dublinensis</i>	0; [0%]	1; [1%]	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	1; [1%]	p=1,00
<i>Candida robusta</i>	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p=0,45
<i>Andere Candida spp.</i>	9; [5%]	4; [1%]	16; [1%]	8; [16%]	4; [4%]	16; [9%]	-
<i>Magnusiomyces</i>	0; [0%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	0; [0%]	1; [1%]	p=1,00

4.4 Einflussfaktoren auf eine Sludgeformation

Wir analysierten mögliche Zusammenhänge zwischen einer Sludgeformation, Seitenöffnungen, Keimbesiedlung und Durchmesser der Stents. In den Tabellen 8-10 ist der Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge dargestellt. Um einen störenden Einfluss der Liegedauer zu vermeiden, wurden nur Stents mit einer Liegedauer von ≥ 60 Tagen in die Analyse eingeschlossen. Dies umfasste insgesamt 184 Stents (entsprechend der Gruppe III), von welchen 98 Stents mit Sludge, sowie 86 Stents ohne Sludge kategorisiert wurden. Insgesamt wurden 831 Mikroorganismen von der ersteren Gruppe, 555 Mikroorganismen von Stents ohne Sludge isoliert. Die mediane Liegedauer betrug 93 Tage.

In der univariaten Analyse war ein signifikanter Unterschied von okkludierten zu offenen Stents bei einem Nachweis von *Streptococcus spp.* [$p=0,02$; 60/98 (61,22%) vs. 38/86 (44,19%)], *Staphylococcus spp.* [$p=0,01$; 15/98 (15,31%) vs. 3/86 (3,49%)], *Bacteroides spp.* [$p=0,04$; 24/98 (24,49%) vs. 11/86 (12,79%)], *Prevotella spp.* [$p=0,03$; 47/98 (47,96%) vs. 27/86 (31,40%)], *Fusobacterium spp.* [$p=0,03$; 12/98 (12,24%) vs. 3/86 (3,49%)] und *Clostridium spp.* [$p=0,02$; 47/98 (47,96%) vs. 22/86 (25,58%)] festzustellen.

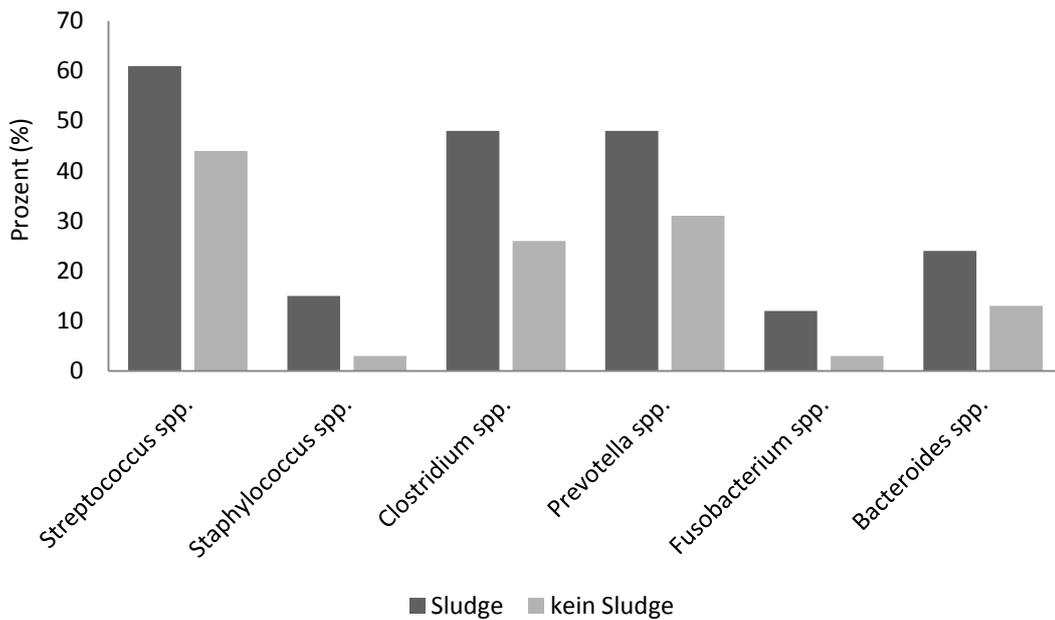


Abb. 10: Einfluss verschiedener Bakteriengattungen auf eine Sludgeformation. Die Grafik zeigt das in der univariaten Analyse signifikant gesteigerte Vorkommen von *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* und *Bacteroides spp.* auf Stents mit Sludge (98=100%) im Vergleich zu Stents ohne Sludge (86=100%).

Alle Kategorien, die in der univariaten Analyse eine Signifikanz zeigten, wurden weiterführend einer multivariaten Regressionsanalyse (Odds ratio 95% CI) unterzogen. Dabei zeigte sich nur noch bei zwei Bakteriengattungen ein signifikanter Unterschied: *Clostridium spp.* [p=0,02; OR (95% CI): 2,4(1,1-4,9)] und *Staphylococcus spp.* [p=0,03; OR (95% CI): 4.3(1,1-16,5)].

Ebenfalls durch die multivariate Regressionsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikroorganismen, Seitenöffnungen, dem Durchmesser der Stents und der Liegedauer im Bezug auf das Vorkommen einer Sludgeformation untersucht.

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikroorganismen [p=0,01; OR (95% CI): 1,3(1,1-1,5)], der Liegedauer [p=0,01; 1-15 Tage vs. 20-59 Tage: OR (95% CI): 5,6(1,4-22); 1-15 Tage vs. 60-3087 Tage: OR (95% CI): 9,5(2,5-35,7)], dem Vorkommen von Seitenöffnungen [p=0,01; OR (95% CI): 3.5

(1,6-7,9)] und dem Vorkommen einer Sludgeformation. Kein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen Sludge und dem Stentdurchmesser [$p=0,32$; OR (95%CI): 1,1(0,8-1,5)].

Tab. 8: Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (aerob, grampositiv).

	Sludge	kein Sludge	Sludge	kein Sludge	Uni- variante Analyse	Multivariate Analyse p-Wert OR(95%CI)
	Anzahl der isolierten Mikroorganismen		Anzahl der Stents			
Anzahl der Mikroorganismen	831; [100%]	555; [100%]	-	-	-	-
Stentanzahl	-	-	98; [100%]	86; [100%]	-	-
Mediane Liegedauer in Tagen	93	93	93	93	-	-
Aerobe grampositive Bakterien	317; [38]	207; [37%]	98; [100%]	85; [99%]	p= 0,47	-
<i>Enterococcus spp.</i>	176; [21%]	124; [22%]	95; [97%]	80; [93%]	p= 0,30	-
<i>Enterococcus faecium</i>	34; [4%]	27; [5%]	34; [35%]	27; [31%]	p= 0,64	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	78; [9%]	64; [12%]	78; [80%]	64; [74%]	p= 0,40	-
Andere <i>Enterococcus spp.</i>	64; [8%]	33; [6%]	55; [56%]	30; [35%]	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>	74; [9%]	45; [8%]	60; [61%]	38; [44%]	p= 0,02	p= 0,16; 1,6(0,8-3,1)
<i>Streptococcus viridans</i>	74; [9%]	44; [8%]	60; [61%]	38; [44%]	p= 0,02	-
β-hämolysierende Streptokokken	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	p=0,47	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	15; [2%]	3; [1%]	15; [15%]	3; [3%]	p=0,01	p=0,03; 4,3(1,1-16,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7; [1%]	0; [0%]	7; [7%]	0; [0%]	p=0,02	-
Koagulasenegative Staphylokokken	8; [1%]	3; [1%]	8; [8%]	3; [3%]	p= 0,18	-
Andere <i>grampositive Bakterien</i>	52; [6%]	35; [6%]	40; [41%]	27; [31%]	-	-

Tab. 9: Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (aerob, gramnegativ).

	Sludge	kein Sludge	Sludge	kein Sludge	Uni-	Multivariate
	Anzahl der isolierten Mikroorganismen		Anzahl der Stents		variante Analyse	Analyse
					p-Wert	p-Wert
						OR(95%CI)
Anzahl der Mikroorganismen	831; [100%]	555; [100%]	-	-	-	-
Stentanzahl	-	-	98; [100%]	86; [100%]	-	-
Mediane Liegedauer in Tagen	93	93	93	93	-	-
Aerobe gramnegative Bakterien	302; [36%]	209; [38%]	95; [97%]	81; [94%]	p= 0,48	-
<u>Enterobacteriaceae</u>	260; [31%]	193; [35%]	93; [95%]	78; [91%]	p= 0,27	-
<i>Escherichia spp.</i>	69; [8%]	53; [10%]	65; [66%]	47; [55%]	p= 0,11	-
<i>Klebsiella spp.</i>	91; [11%]	63; [11%]	70; [71%]	53; [62%]	p= 0,16	-
<i>Citrobacter spp.</i>	29; [3%]	22; [4%]	25; [26%]	15; [17%]	p= 0,19	-
<i>Proteus spp.</i>	16; [2%]	13; [2%]	16; [16%]	13; [15%]	p= 0,82	-
<i>Morganella spp.</i>	5; [1%]	8; [1%]	5; [5%]	8; [9%]	p= 0,27	-
<i>Enterobacter spp.</i>	41; [5%]	28; [5%]	36; [37%]	26; [30%]	p=0,35	-
<i>Serratia spp.</i>	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p=1,00	-
Andere <i>Enterobacteriaceae</i>	8; [1%]	6; [1%]	8; [8%]	6; [7%]	-	-
<u>Nicht-fermentierende Bakterien</u>	10; [1%]	7; [1%]	10; [10%]	7; [8%]	p= 0,63	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	8; [1%]	7; [1%]	8; [8%]	7; [8%]	p=1,00	-
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p=1,00	-
<i>Acinetobacter spp.</i>	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p=1,00	-
<u>Andere nicht-fermentierende Bakterien</u>	0; [0%]	0; [0%]	0; [0%]	0; [0%]	-	-
<u>Andere gramnegative Bakterien</u>	32; [4%]	9; [2%]	27; [28%]	8; [9%]	-	-

Tab. 10: Vergleich des Keimspektrums einer Stentbesiedlung mit und ohne Sludge (Anaerobier, Pilze).

	Sludge	kein Sludge	Sludge	kein Sludge	Uni- variante Analyse	Multivariate Analyse p-Wert OR(95%CI)
	Anzahl der isolierten Mikroorganismen		Anzahl der Stents			
Anzahl der Mikroorganismen	831; [100%]	555; [100%]	-	-	-	-
Stentanzahl	-	-	98; [100%]	86; [100%]	-	-
Mediane Liegedauer in Tagen	93	93	93	93	-	-
Anaerobier	167; [20%]	87; [16%]	79; [81%]	48; [56%]	p=0,01	-
<i>Bacteroides spp.</i>	30; [4%]	14; [3%]	24; [24%]	11; [13%]	p= 0,04	p= 0,83; 2,2(0,9-5,3)
<i>Prevotella spp.</i>	57; [7%]	30; [5%]	47; [48%]	27; [31%]	p= 0,03	p= 0,44; 1,3(0,6-2,8)
<i>Fusobacterium spp.</i>	12; [1%]	3; [1%]	12; [12%]	3; [3%]	p= 0,03	p=0,24; 2,3(0,5-9,2)
<i>Veillonella spp.</i>	11; [1%]	7; [1%]	10; [10%]	7; [8%]	p= 0,14	-
<i>Clostridium spp.</i>	49; [6%]	26; [5%]	47; [48%]	22; [26%]	p= 0,02	p= 0,02; 2,4(1,1-4,9)
<i>Propionibacterium spp.</i>	7; [1%]	1; [1%]	7; [7%]	1; [1%]	p= 0,07	-
<u>Andere Anaerobier</u>	1; [1%]	6; [1%]	1; [1%]	6; [7%]	-	-
<u>Candida spp.</u>	44; [5%]	52; [9%]	39; [40%]	44; [51%]	p=0,12	-
<i>Candida albicans</i>	21; [3%]	15; [3%]	21; [21%]	15; [17%]	p=0,50	-
<i>Candida tropicalis</i>	6; [1%]	3; [1%]	6; [6%]	3; [3%]	p= 0,51	-
<i>Candida glabrata</i>	10; [1%]	23; [4%]	10; [10%]	23; [27%]	p=0,04	p=0,10; 0,5(0,2-1,2)
<i>Candida krusei</i>	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p= 1,00	-
<i>Candida robusta</i>	0; [0%]	0; [0%]	0; [0%]	0; [0%]	-	-
<i>Candida dublinensis</i>	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	p= 0,47	-
<u>Andere Candida spp.</u>	6; [1%]	10; [2%]	6; [6%]	10; [12%]	-	-
<i>Magnusiomyces</i>	1; [1%]	0; [0%]	1; [1%]	0; [0%]	p=1,00	-

5 Diskussion

Die biliäre Stenttherapie gehört zu den Standardtherapieverfahren von multiplen Krankheitsbildern in der heutigen endoskopischen Gastroenterologie. Durch intraluminale Sludgeakkumulation kann es jedoch zu Stentokklusionen kommen, weshalb biliäre Plastikstents nach spätestens 3 Monaten gewechselt werden sollten. Die Biofilmentstehung an Oberflächen und nachfolgende Sludgeentwicklung ist ein multifaktorieller Prozess. Eine bakterielle Beteiligung an einer Sludgeformation gilt heute als gesichert [48, 95].

In dieser Studie wurden 2283 Mikroorganismen von insgesamt 343 biliären Stents isoliert. Vorhergegangene Untersuchungen des Keimspektrums von Gallengangstents erfolgten mit einer weit geringeren Fallzahl an Endoprothesen (n= 18-51) [15, 47, 68, 90, 131]. Mit unserer hohen Fallzahl gewährleisteten wir somit eine repräsentativere Keimanalyse.

Von den insgesamt 2283 isolierten Mikroorganismen wurden 914 (40,04%) als aerob grampositiv, 771 (33,77%) aerob gramnegativ, 409 (17,92%) anaerob und 188 (8,23%) *Candida spp.* identifiziert.

Enterococcus spp. traten am häufigsten auf (504 von 2283 Keimen [22,08%]) und wurden von 297 von 343 Stents (86,59%) isoliert. Der bisherige Stand der Literatur bestärkt diese Ergebnisse. *Enterococcus spp.* war stets die häufigste bakterielle Art, die von biliären Stents isoliert wurden [15, 67, 68, 99, 110, 162]. Darauf folgend wurden ebenfalls die Häufigkeit betreffend in absteigender Reihenfolge *Klebsiella spp.* (218 von 2283 Keimen [9,55%]); 52,48% der Stents), *Streptococcus spp.* (213 von 2283 Keimen [9,33%]; 49,56% der Stents), *Candida spp.* (188 von 2283 Keimen [8,23%]; 45,19% der Stents) und *Escherichia spp.* (182 von 2283 Keimen [7,97%]; 49,56% der Stents) isoliert. Das bakterielle Spektrum lässt darauf schließen, dass die Bakterien aus dem Duodenum stammen. Dies könnte erklärbar sein durch die Hypothese, dass beim transpapillären Einsetzen von biliären Stents ein (Teil-)Verlust der Funktion des Sphinktermuskels erfolgt und Bakterien aus dem Duodenum ascendieren können [150]. Das Auffinden von pflanzlichen Fasern bei

der mikroskopischen Untersuchung von biliären Stents unterschiedlicher Plastikmaterialien unterstützt diese Hypothese zusätzlich [159]. Der Ansatz, durch spezielle Anti-Refluxstent-Designs bilioduodenalen Reflux zu verhindern und einer Stentokklusion vorzubeugen, zeigte in einer Studie aus dem Jahr 2007 eine klinisch längere Offenheitsdauer in der Patientengruppe mit Anti-Refluxstents (145 Tage vs. 101 Tage bei herkömmlichen biliären Plastikstents; $p < 0,01$) [52]. Eine Studie von Vihervaara et al. aus dem Jahr 2016 zeigte jedoch kürzere Offenheitsraten für Antirefluxstents im Vergleich zu konventionellen Plastikstents [160].

Die hohe Inzidenz von Anaerobiern (17,92%) in unserer Studie könnte auf gute präanalytische anaerobe Verhältnisse und eine korrekte Verarbeitung der Stents hinweisen. Die Inzidenz von Anaerobiern in Galle oder aus Biofilmen von biliären Stents wird in der Literatur zwischen 2% und 54% beschrieben [15, 68, 90, 139]. In der Mehrzahl der Publikationen wurden *Bacteroides spp.* und *Clostridium spp.* als häufigste anaerobe Keimarten analysiert [47, 68, 90, 139]. In unserer Studie dominierten *Prevotella spp.* und *Clostridium spp.* an erster und zweiter Stelle. Eine mögliche Ursache der Variabilität bzw. Spannbreite der Ergebnisse, vor allem bezüglich der Inzidenz, könnte zum einen durch die Präanalytik (die Stents wurden nach Extraktion umgehend präpariert und angelegt) als auch durch die Differenzierungsmethode zu erklären sein. MALDI-TOF (matrix-associated laser desorption/ ionization-time of flight mass spectrometer) ist eine relativ neuartige Methode zur molekularen Speziesidentifizierung mit hoher Sensitivität und Spezifität. Diese beruht auf der Analyse ribosomaler Proteine und erlaubt eine schnellere Differenzierung im Vergleich zu biochemischen Testmethoden [30, 165].

Bakterielle Mikroorganismen sind zudem innerhalb des Biofilms in eine amorphe Schicht eingebettet, die wie eine „Schutzbarriere“ fungiert. Durch Beschallung mit niederfrequentem Ultraschall bei geringer Intensität wird die Haftung des Biofilms an der Stentoberfläche durch Bildung von Dampfblasen und Scherkräften vermindert, so dass sich der Biofilm von der Stentoberfläche ablösen kann [20, 118, 156]. Durch zuvor durchgeführtes „Vortexen“ werden zusätzlich Mikroblasen erzeugt, die den Kavitationseffekt der anschließenden Ultraschallbehandlung verbessern [156]. Es wurde zudem gezeigt, dass bei der Behandlung mit niederfrequentem Ultraschall und geringer

Intensität die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen erhalten bleibt [123]. Die im sogenannten Sonifikat gewonnenen Mikroorganismen werden dann direkt kultiviert und mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie analysiert. Diese neuartige Ultraschallmethode wurde bereits mehrfach angewandt sowie getestet und zeigte eine erfolgreiche Ablösung von Mikroorganismen aus Biofilmen von Stent- und Implantatoberflächen [20, 118, 122, 129, 156].

Candida spp. konnte auf 155 Stents (45,19%) nachgewiesen werden. *Candida albicans* (84 von 2283 Keimen [3,68%]) wurde am häufigsten isoliert, gefolgt von *Candida glabrata* (51 von 2283 Keimen [2,23%]). Auch in weiteren Studien konnte das Vorkommen von *Candida spp.* belegt werden [68]. *Candida* ist ein Hefepilz und physiologischer Kommensale, der sich auf den Schleimhäuten vieler Menschen befindet und fakultativ pathogen ist. Es ist bereits bekannt, dass *Candida spp.* Biofilme auf implantierten Biomaterialien wie beispielsweise zentralen und peripheren Venenkathetern, Urinkathetern und Gelenksprothesen bildet [124]. Die *in-vitro*-Entwicklung eines Biofilms von *Candida albicans* (strukturell mikroskopisch zu beschreiben als ein dichtes Netzwerk aus Hefezellen und Hyphen, eingebettet in exopolymerem Material) verläuft - ähnlich zu der Entwicklung von bakteriellen Biofilmen - zusammengefasst in den Schritten Adhärenz, Formation von Mikrokolonien, Filamentbildung und darauffolgend Entwicklung eines einschichtigen Zellrasens, Proliferation und weitere Reifung [125]. Auch in *in-vitro*-Biofilmen von *Candida albicans* zeigt sich eine erhöhte Resistenz gegen antifungale Agenzien wie klinisch verwendetes Fluconazol und Amphotericin B im Hinblick auf die Wirksamkeit bei vergleichbaren planktonischen Zellen [125]. Das Vorkommen von *Candida spp.* trat in einer Studie aus dem Jahr 2016 vermehrt bei Patienten mit kürzlich vorausgegangener prolongierter antibiotischer Therapie auf [99].

In unserer Auswertung (univariate Analyse) besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Sludgeformation und dem Vorkommen von *Streptococcus spp.* [p=0,02; 60(61,22%) vs. 38(44,19%)], *Staphylococcus spp.* [p=0,01; 15(15,31%) vs. 3(3,49%)] und vor allem Anaerobiern wie *Bacteroides spp.* [p=0,04; 24(24,49%) vs. 11(12,79%)], *Prevotella spp.* [p=0,03; 47(47,96%) vs. 27(31,40%)], *Fusobacterium*

spp. [p=0,03; 12(12,24%) vs. 3(3,49%)] und *Clostridium spp.* [p=0,02; 47(47,96%) vs. 22(25,58%)]. In der multivariaten Regressionsanalyse ist nur noch ein signifikanter Zusammenhang durch *Clostridium spp.* [p=0,02; OR (95% CI): 2,4(1,1-4,9)] und *Staphylococcus spp.* [p=0,03; OR (95%): 4,3(1,1-16,5)] zu beobachten. In einer früheren Studie von Guaglianone et al. wurde eine stark erhöhte Schleimproduktion sowohl bei *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* und *Veillonella spp.*, sowie *Clostridium baratii*, *Clostridium perfringens* und *Peptostreptococcus magnus* festgestellt [68]. Diese gesteigerte Schleimproduktion scheint mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms β -Glukuronidase durch Dekonjugation von Bilirubin und nachfolgender Ausfällung von Calciumbilirubinen und Sludgeformation in Zusammenhang zu stehen [101]. Vor allem *Clostridium perfringens* wies in mehreren Studien eine erhöhte Expression der bakteriellen β -Glukuronidase auf [47, 90, 92]. Auch das Enzym Phospholipase C kann Lecithin hydrolysieren und Calciumpalmitat ausfällen und so zu vermehrter Sludgebildung führen. Phospholipase C wird ebenfalls vor allem durch - von biliären Stents isolierten - Clostridien produziert [90]. Infolgedessen könnte der Zusammenhang zwischen Anaerobiern und einer Sludgeformation durch eine gesteigerte bakterielle Enzymaktivität zu erklären sein. In jedem Fall kann die große Menge an Anaerobiern in okkludierten Stents auf ideale anaerobe Verhältnisse innerhalb des Biofilms hinweisen.

Ebenfalls in signifikant erhöhten Mengen konnten Staphylokokken von okkludierten Stents im Vergleich zu nicht-okkludierten Stents nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Studie der Arbeitsgruppe um Rosa et al. [131]. Derzeit geht man davon aus, dass Staphylokokken eine bedeutende Rolle in der Biofilmbildung auf implantierten Biomaterialien einnehmen [7]. Staphylokokken haben die Fähigkeit zu einer erhöhten Schleimproduktion, die vor allem bei *Staphylococcus aureus* und *epidermidis* beobachtet werden kann [3]. Als für die Biofilmbildung bedeutsame genetische Grundlage wurde der *ica* (intercellular adhesion)-Locus erstmals in *S. epidermidis* entdeckt, welcher für die Synthese des extrazellulären Polysaccharids PIA (polysaccharide intercellular adhesion) und somit für die Zell-Zell-Adhäsion von großer Relevanz ist [72]. Etwas später wiesen Cramton et al. den *ica*-Locus ebenfalls in *S. aureus* nach [39]. Aber auch eine Vielzahl anderer Oberflächenproteine (z.B. BAP

(biofilm-associated-protein), AAP (accumulation-associated-protein), SasC, Protein A etc.) fördern die Adhäsion und Zell-Zell-Verbindungen der Bakterien untereinander [7].

Wir können nur annehmen, dass ein verändertes biliäres Keimspektrum von okkludierten Stents mit einer klinischen Relevanz einhergeht. Die Hauptzahl der Stentextraktionen wurden elektiv durchgeführt, weshalb Blutkulturen nur in einer sehr geringen Anzahl bei Patienten mit akuten Symptomen einer Cholangitis abgenommen wurden. Dementsprechend wurde keine vergleichende Analyse durchgeführt, ob sich das von Biofilmen von okkludierten Stents isolierte Keimspektrum von dem von Blutkulturen unterscheidet. Hierzu analysierten Park et al. das Keimspektrum von Blutkulturen von Patienten mit bakteriämischer Gallengangsinfektion mit dem Keimspektrum der Gallenflüssigkeit. Von 266 Proben waren 258 Galleflüssigkeiten bakteriell positiv. Von diesen 258 Galleproben enthielten 80 dieselben Mikroorganismen wie das Keimspektrum des Blutes, 129 zeigten teilweise eine Übereinstimmung und 49 ergaben ein komplett unterschiedliches Keimspektrum verglichen mit Blutkulturen [120]. In unserer Studie erfolgte keine parallele Gallenuntersuchung, so dass man nur spekulieren kann, ob das Keimspektrum des Biofilms auf biliären Stents mit demselben Keimspektrum der Gallenflüssigkeit einhergeht.

Es existieren bereits mehrere Untersuchungen, die eine eindeutige Veränderung des Keimspektrums der Gallenflüssigkeit bei liegendem biliärem Stent nahelegen. In einer Studie von Rerknimitr et al. unterschied sich das bakterielle Spektrum der Galle von Patienten ohne Stent verglichen mit Patienten mit biliärem Stent signifikant ($p=0,05$): es konnten mehr Enterokokken bei Patienten mit biliärer Endoprothese und häufiger eine Bakteriämie bei Patienten mit positiver Galle nachgewiesen werden [126]. In einer weiteren Studie wurde das Keimspektrum bei Patienten mit Cholangitis mit Endoprothese und ohne Endoprothese untersucht. Die Inzidenz von *Enterococcus spp.* ($p=0,011$) und nicht-fermentierenden Bakterien ($p=0,001$) war signifikant gesteigert in Cholangitisepisoden mit biliärer Endoprothese verglichen mit Cholangitisepisoden ohne biliären Endoprothesen. Ebenfalls wurden signifikant mehr *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0,027$) und *Enterococcus faecium* isoliert von Patienten mit biliärer Stenteinlage ($p=0,013$). Die Anzahl der Enterokokken, die von Blutkulturen isoliert wurden, war

interessanterweise in Cholangitisepisoden mit liegendem Stent höher als in Cholangitisepisoden ohne Stent [162]. Ob eine Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren bei Patienten mit einer akuten Cholangitis einen Einfluss auf das biliäre Keimspektrum hat, wurde ebenfalls analysiert. PPI-Einnahme resultierte dabei in 23% der Fälle in eine erhöhte Anzahl von biliären Keimen. Stenttherapie, vorausgegangene Interventionen (ERCP, PTCD), Alter, Geschlecht und Genese spielten in dieser Studie keine signifikante Rolle für die Bakterienanzahl. Allerdings zeigte sich eine signifikant höhere Inzidenz von oropharyngealer Flora im biliären Trakt [137].

In der Vergangenheit verdichteten sich Hinweise, dass das Vorhandensein von Seitenöffnungen an biliären Stents mit einer vermehrten Sludgebildung und Stentokklusion einhergehen [31, 48]. Auch in unserer Studie war das Vorhandensein von Seitenöffnungen mit signifikant vermehrtem Sludge verbunden [$p=0,01$; OR(95% CI): 3.5(1.6-7.9)]. Stents mit Seitenöffnungen wurden entwickelt, um einen besseren Abfluss der Galle zu gewährleisten. Bereits 1985 erforschten Rey et al. allerdings, dass multiple Seitenöffnungen keine erhöhte Effizienz der Endoprothese induzieren, sondern durch feine Störungen des Flüssigkeitsflusses zu einem erhöhten Widerstand der Prothese führen [127]. Die Bedeutung dieser Erkenntnisse für die Klinik ist weiterhin unklar. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse erhoffte man sich durch die Entwicklung von Teflonstents ohne Seitenöffnungen (sogenannte Tannenbaumstents) eine signifikant niedrigere Verkrustung mit Sludge [17]. Sung et al. verglichen die klinische Wirksamkeit von Polyethylenstents mit Seitenöffnungen mit Polyethylenstents ohne Seitenöffnungen bei Patienten mit maligner oder benigner Gallengangsobstruktion. Zwischen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Gewinn der Stents ohne Seitenöffnungen bezüglich der Okklusionshäufigkeit gezeigt werden (Seitenöffnungen 7.8 Wochen, ohne Seitenöffnungen 7.9 Wochen) [146]. Auch die klinische Arbeitsgruppe um Catalano et al. stellten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stentdesigns „Tannenbaum“ Teflon-Stents (keine Seitenöffnungen, niedriger Friktionskoeffizient) und herkömmlichen Polyethylenstents bezüglich der Okklusionsresistenz fest [23]. In einer anderen klinischen Studie konnte jedoch eine signifikant bessere Durchgängigkeitsdauer von Plastikstents ohne Seitenöffnungen und Metallstents im Vergleich zu Plastikstents mit Seitenöffnungen beobachtet werden bei

Patienten mit maligner Obstruktion (vor allem Patienten mit Pankreaskarzinom als Genese der Obstruktion profitierten) [115].

Der Stentdurchmesser spielte in unserer Studie keine signifikante Rolle im Hinblick auf eine gesteigerte Sludgeformation [$p=0,32$; OR (95% CI):1.1(0.8-1.5)]. In der bisherigen Literatur wird die Bedeutung des Stentdesigns und Durchmessers kontrovers diskutiert. In einer Studie von Speer et al. zeigte sich eine signifikant reduzierte Inzidenz einer Cholangitis bei Patienten mit 10 Fr.- im Vergleich zu 8 Fr.-Stents, ebenso wie eine längere Stentüberlebensdauer bis zur Okklusion [144]. Bei Patienten mit Pankreaskarzinom konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen 10 Fr.- und 11,5 Fr.-Stents festgestellt werden [121]. Eine neuere Studie aus dem Jahr 2014 unterstützt die Hypothese, dass weder Durchmesser (10-Fr./7-Fr.) noch Form (gerade/pigtail) einen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von Mikroorganismen hat [15].

In unserer Studie wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikroorganismen [$p=0,01$; OR(95% CI):1,3(1,1-1,5)] und der Liegedauer [$p=0,01$; 1-15 Tage vs. 20-59 Tage: OR (95% CI): 5,6(1,4-22); 1-15 Tage vs. 60-3087 Tage: OR (95% CI): 9,5(2,5-35,7)] auf die Sludgebildung ermittelt. Es gab bis zu unserer Datenerhebung noch keine andere vergleichbare Studie, die über eine so große Zeitspanne der Liegedauer (Gruppe I: 1-15 Tage, Gruppe II: 20-59 Tage, Gruppe III: 60-3087 Tage) verfügte und ihre Auswirkung auf ein vermehrtes Vorkommen von Sludge untersucht hat. Basioukas et al. beobachteten im Jahr 2014 eine statistische Korrelation zwischen Stentliegedauer und Anzahl der Mikroorganismen ($p<0,05$). Jedoch waren keine speziellen Bakterienarten mit einer bestimmten Liegedauer assoziiert. *Escherichia coli* konnte häufiger bei benignen Erkrankungen isoliert werden ($p<0,05$) [15]. Eine Studie aus dem Jahr 2012 untersuchte Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Variablen und einer frühzeitigen Stentokklusion. Weibliches Geschlecht scheint protektiv zu sein, wohingegen hiläre Strikturen mit einem signifikant erhöhtem Vorkommen einer frühzeitigen Stentokklusion einhergeht. Eine größere Anzahl von Stents (Multistenttherapie), vorangegangene Stentokklusion, das Alter, eine noch vorhandene Gallenblase und durchgeführte Sphinkterotomie waren nicht signifikant mit dem Auftreten einer frühen Stentokklusion assoziiert. Ebenso existierte

kein Unterschied zwischen dem Indikationsgrund und einer frühen Stentokklusion (benigne vs. maligne Grunderkrankung) [84].

In unserer Studie trat eine Stentokklusion im medianen Durchschnitt nach einer Liegedauer von 70 Tagen auf. Insgesamt waren 70 von 343 Stents (20%) okkludiert. Von diesen 70 Stents führten nur 35% der Stentokklusionen zu einer klinischen Cholestase mit oder ohne Cholangitis.

Die Stentoffenheitsdauer von konventionellen biliären Plastikstents liegt in zwei weiteren klinischen Studien zwischen 94,6-126 Tagen [28, 42]. Bei beiden Untersuchungen wurde die Stentoffenheitsdauer bei Patienten mit malignen Gallengangsobstruktionen untersucht und die Ergebnisse von selbst expandierbaren Metallstents und Plastikstents verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant längere Offenheitsdauer bei Metallstents, jedoch keine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben [28, 42]. Es scheinen keine Unterschiede in der Stentoffenheitsdauer zwischen Patienten mit benigner und maligner Grunderkrankung zu existieren [106].

Um eine frühzeitige Stentokklusion möglicherweise zu verhindern, wurden in der Vergangenheit bereits Ideen entwickelt, um eine längere Offenheitsdauer zu gewährleisten. Studien, die den Einfluss von einer systemischen Antibiotikagabe auf die Stentoffenheitsdauer untersucht haben, führten zu gegensätzlichen Ergebnissen. Durch Gabe von Ursodesoxycholsäure und Norfloxacin wurde eine deutlich längere Offenheitsdauer, ein längeres medianes Überleben und eine kürzere Klinikaufenthaltsdauer berichtet [12]. In einer *in-vitro*-Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Beschichtung von Polyethylenstents mit Ampicillin/Sulbactam mit einer signifikant geringeren Biofilmbildung einhergeht [157]. Ebenso reduzierte Ciprofloxacin *in vitro* 10- bis 100-fach die Anzahl der angelagerten *Escherichia coli* [89]. Diese Ergebnisse konnten klinisch jedoch nicht die erhofften Erfolge hinsichtlich einer signifikant reduzierten Stentokklusionsrate und einem längeren Gesamtüberleben zeigen. Eine Kombination aus Ciprofloxacin und Rowachol, einem pflanzlichen Öl, welches die Gallesekretion steigert, konnte in einer klinischen Studie von Luman et al. keine Verbesserungen erzielen [100]. Die Gabe von Ursodesoxycholsäure und/oder Antibiotika als Stentokklusionsprophylaxe zeigte bei Patienten mit malignen Strikturen der Gallengänge, die mit Polyethylenstents therapiert wurden, keine signifikanten

Unterschiede in der Stentoffenheitsdauer oder Mortalität im Vergleich zu den Kontrollen [61]. Auch eine Follow-Up-Studie von Ghosh et al. belegte keinen signifikanten Nutzen einer Kombinationstherapie mit Ursodesoxycholsäure und Antibiotika hinsichtlich der Stentoffenheitsdauer und des Gesamtüberlebens [62].

Ein vielversprechender Ansatz zur Reduktion der Stentokklusionsrate sind antimikrobiell beschichtete Stents. Leung et al. testeten *in vitro* silberüberzogene Polyurethanstents als Oberflächenmodifikation. Dabei wurde eine 10- bis 100-fache Reduktion der bakteriellen Adhärenz beobachtet [94]. Auch in einer *in-vitro*-Studie aus dem Jahr 2016 war elektronenmikroskopisch eine begrenzte Anzahl von Bakterien sowie keine ersichtliche Biofilmbildung auf silberbeschichteten Plastikstents beobachtet worden [167]. *In-vivo*-Studien, die diesen Sachverhalt untersuchen, stehen noch aus. Die Beschichtung der Stentoberfläche mit Heparin korrelierte ebenfalls mit einer signifikant geringeren Akkumulation von Sludge [55]. Vielversprechendes Material für Stents ist das „Diamond-like carbon“ (i.e. Diamantähnliche Kohlenstoffschicht), welches mit einem niedrigen Reibungskoeffizienten, einer extrem hohen Materialhärte, Abriebfestigkeit, Antithrombogenität und chemischen Resistenz für eine geringere Stenosierungsrate und Biofilmbildung von und auf medizinischen Endoprothesen überzeugen könnte [133] [22]. Auch aus dem Gebiet der Urologie zeigten sich diesbezüglich neue Perspektiven. Herkömmliche Harnleiterschienenmaterialien wurden mit plasmadeponierten amorphen kohlenstoffbeschichteten Testschienen *in vitro* verglichen, hierbei zeigte sich bis zu 30x weniger Mineralisat auf beschichtetem Material im Sinne einer deutlich verminderten Inkrustationstendenz sowie ein niedrigerer Reibungskoeffizient [87].

Die antimikrobielle bzw. antiadhäsive Beschichtung von biliären Endoprothesen ist ein vielversprechender Ansatz die Stentokklusionsrate zu reduzieren. Dieser Ansatz muss jedoch in weiteren Studien aufgegriffen und diskutiert werden.

Die Limitationen dieser Studie sind darin zu sehen, dass die Wahl und Liegedauer der biliären Stents nicht beeinflusst werden konnte. Ebenso erfolgte die Datenerhebung unizentrisch, Keimspektren und folgend keimassoziierte Veränderungen können geographisch jedoch divergieren. Zudem war der Zeitpunkt der Stentextraktion und die Entscheidung, welcher Stent eingesetzt wurde, nicht standardisiert. Eine weitere

Limitation könnte sein, dass während der ERCP die Stentextraktion bei Stents größeren Durchmessers durch kompletten Rückzug des Untersuchungsgeräts erfolgte und damit eine Verunreinigung durch Keime des Duodenums und der Mundhöhle nicht sicher auszuschließen ist. Durch Abreiben der gezogenen Endoprothesen mit 70%igem Alkohol reduzierten wir das Risiko jedoch. Stents kleineren Durchmessers konnten geschützt durch den Arbeitskanal gezogen werden.

Abschließend lässt sich aus unserer Studie schlussfolgern, dass sich das mikrobielle Spektrum an der Oberfläche von biliären Stents in Abhängigkeit von der Liegedauer veränderte. Das Auftreten von biliärem Sludge war hierbei mit einem erhöhten Vorkommen von *Staphylococcus spp.* sowie *Clostridium spp.*, Seitenöffnungen und einer längeren Liegedauer assoziiert. Obwohl diese Faktoren eine Stentokklusion und nachfolgend eine Cholestase und Cholangitis fördern können, ist nicht zwingend eine Verbindung zu klinischen Symptomen herzustellen. In dem Wissen des (in Abhängigkeit der Liegedauer) veränderten Keimspektrums könnte bei klinischen Infektionszeichen eine spezialisiertere antibiotische Therapie verabreicht werden.

6 Zusammenfassung

Die ERCP ist ein endoskopisch-radiologisches Verfahren, welches eine bedeutende Rolle in der Diagnostik und Therapie multipler pankreatikobiliärer Erkrankungen einnimmt. Vor allem durch Einsetzen von Stents in das Gallengangssystem kann eine Stenose suffizient therapiert und der Gallefluss wiederhergestellt werden. Die Stenttherapie wird limitiert durch das Risiko einer Stentokklusion, weshalb in einem Intervall von 3 Monaten ein Stentwechsel erfolgen sollte. Eine bakterielle Kolonisation von Gallengangstents scheint eine treibende Kraft für Sludgebildung darzustellen, die nachfolgend zu einer Stentokklusion führen kann. Aus diesem Grund untersuchte diese Studie sowohl den Einfluss der Stentliegedauer auf das Keimspektrum wie auch den Einfluss von Quantität und Qualität der Keimspezies sowie weiterer Risikofaktoren auf die biliäre Sludgeformation.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit von 343 Stents 2283 Mikroorganismen isoliert. Eine Stentokklusion trat im Median nach einer Liegedauer von 70 Tagen auf. Von 343 Stents waren 70 (20%) okkludiert.

Enterococcus spp. war dabei die häufigste nachgewiesene Keimspezies, gefolgt von *Klebsiella spp.* und *Candida spp.*. Die Kolonisation der biliären Stents begann hauptsächlich mit aeroben grampositiven Bakterien und *Candida spp.*, wohingegen Stents mit einer Liegedauer von ≥ 60 Tagen eine annähernd gleiche Kolonisationsrate von aeroben gramnegativen und aeroben grampositiven Bakterien sowie eine hohe Anzahl von Anaerobiern aufwiesen. Verglichen mit Stents ohne Sludge konnte von sludgebehafteten Endoprothesen gehäuft *Staphylococcus spp.* und *Clostridium spp.* kultiviert werden. In der multivariaten Analyse zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikroorganismen, der Liegedauer sowie dem Vorhandensein von Seitenöffnungen mit dem Vorkommen von biliärem Sludge. Eine signifikante Assoziation von Stentokklusion und klinischen Symptomen zeigte sich nicht.

Aufgrund des in dieser Arbeit erstmals gezeigten Einflusses der Liegedauer auf das Keimspektrum könnte bei klinischen Infektionszeichen eine spezialisiertere

antibiotische Therapie initiiert werden. Maßnahmen zur Reduktion von Inkrustationen durch prophylaktische systemische oder lokale Antibiotikaapplikation konnten in der Praxis bisher keinen eindeutigen klinischen Benefit erbringen. Aufgrund der – auch in dieser Studie nachgewiesenen - bakteriellen Beteiligung an Biofilm- und Sludgeformation, sollte weiterführend an der Konstruktion innovativer Stents mit antiadhäsiven bzw. antimikrobiellen Eigenschaften (z.B. silberbeschichtete Materialien, Diamond-like carbon) gearbeitet und dies auch in weiteren klinischen Studien aufgegriffen werden.

7 Quellen

1. Adler, DG, TH Baron, RE Davila, J Egan, WK Hirota, JA Leighton, W Qureshi, E Rajan, MJ Zuckerman, R Fanelli, J Wheeler-Harbaugh, DO Faigel. *ASGE guideline: the role of ERCP in diseases of the biliary tract and the pancreas*. *Gastrointest Endosc*, 2005. 62(1): p. 1-8.
2. Adler, DG, D Lichtenstein, TH Baron, R Davila, JV Egan, SL Gan, WA Qureshi, E Rajan, B Shen, MJ Zuckerman, KK Lee, T VanGuilder, RD Fanelli. *The role of endoscopy in patients with chronic pancreatitis*. *Gastrointest Endosc*, 2006. 63(7): p. 933-7.
3. Ammendolia, MG, R Di Rosa, L Montanaro, CR Arciola, L Baldassarri. *Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates*. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(10): p. 3235-8.
4. Andersen, JR, SM Sorensen, A Kruse, M Rokkjaer, P Matzen. *Randomised trial of endoscopic endoprosthesis versus operative bypass in malignant obstructive jaundice*. *Gut*, 1989. 30(8): p. 1132-5.
5. Andriulli, A, S Loperfido, G Napolitano, G Niro, MR Valvano, F Spirito, A Pilotto, R Forlano. *Incidence Rates of Post-ERCP Complications: A Systematic Survey of Prospective Studies*. *Am J Gastroenterol*, 2007. 102(8): p. 1781-1788.
6. Anwar, H, JW Costerton. *Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(9): p. 1666-71.
7. Arciola, CR, D Campoccia, P Speziale, L Montanaro, JW Costerton. *Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials*. *Biomaterials*, 2012. 33(26): p. 5967-5982.
8. Ballinger, AB, M McHugh, SM Catnach, EM Alstead, ML Clark. *Symptom relief and quality of life after stenting for malignant bile duct obstruction*. *Gut*, 1994. 35(4): p. 467-70.
9. Baluyut, AR, S Sherman, GA Lehman, H Hoen, N Chalasani. *Impact of endoscopic therapy on the survival of patients with primary sclerosing cholangitis*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2001. 53(3): p. 308-312.
10. Bapat, RD, AN Supe, A Patwardhan, HM Kocher, S Parab, MJ Sathe. *Biliary sepsis: an ascending infection*. *Indian J Gastroenterol*, 1996. 15(4): p. 126-8.
11. Baron, TH, GC Harewood. *Endoscopic Balloon Dilation of the Biliary Sphincter Compared to Endoscopic Biliary Sphincterotomy for Removal of Common Bile Duct*

- Stones During ERCP: A Metaanalysis of Randomized, Controlled Trials.* Am J Gastroenterol, 2004. 99(8): p. 1455-1460.
12. Barrioz, T, I Besson, V de Ledinghen, C Silvain, M Beauchant, P Ingrand. *Randomised trial of prevention of biliary stent occlusion by ursodeoxycholic acid plus norfloxacin.* The Lancet, 1994. 344(8922): p. 581-582.
 13. Barthet, M, JP Bernard, JL Duval, C Affriat, J Sahel. *Biliary stenting in benign biliary stenosis complicating chronic calcifying pancreatitis.* Endoscopy, 1994. 26(7): p. 569-72.
 14. Barthet, M, N Lesavre, A Desjeux, M Gasmi, P Berthezene, S Berdah, X Viviani, JC Grimaud. *Complications of endoscopic sphincterotomy: results from a single tertiary referral center.* Endoscopy, 2002. 34(12): p. 991-7.
 15. Basioukas, P, A Vezakis, O Zarkotou, G Fragulidis, K Themeli-Digalaki, S Rizos, A Polydorou. *Isolated microorganisms in plastic biliary stents placed for benign and malignant diseases.* Ann Gastroenterol, 2014. 27(4): p. 399-403.
 16. Bergman, JJ, EAJ Rauws, P Fockens, A-M van Berkel, PMM Bossuyt, JGP Tijssen, GNJ Tytgat, K Huibregtse. *Randomised trial of endoscopic balloon dilation versus endoscopic sphincterotomy for removal of bile duct stones.* The Lancet, 1997. 349(9059): p. 1124-1129.
 17. Binmoeller, KF, U Seitz, H Seifert, F Thonke, S Sikka, N Soehendra. *The Tannenbaum stent: a new plastic biliary stent without side holes.* Am J Gastroenterol, 1995. 90(10): p. 1764-8.
 18. Bjarnsholt, T, PØ Jensen, MJ Fiandaca, J Pedersen, CR Hansen, CB Andersen, T Pressler, M Givskov, N Høiby. *Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.* Pediatric Pulmonology, 2009. 44(6): p. 547-558.
 19. Blenkinsopp, SA, JW Costerton. *Understanding bacterial biofilms.* Trends in Biotechnology, 1991. 9(1): p. 138-143.
 20. Bonkat, G, M Rieken, CA Rentsch, S Wyler, A Feike, J Schafer, T Gasser, A Trampuz, A Bachmann, AF Widmer. *Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication.* World J Urol, 2011. 29(1): p. 133-8.
 21. Cairns, SR, L Dias, PB Cotton, PR Salmon, RC Russell. *Additional endoscopic procedures instead of urgent surgery for retained common bile duct stones.* Gut, 1989. 30(4): p. 535-40.
 22. Castellino, M, V Stolojan, A Virga, M Rovere, K Cabiale, M Galloni, A Tagliaferro. *Chemico-physical characterisation and in vivo biocompatibility assessment of DLC-*

- coated coronary stents*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405(1): p. 321-329.
23. Catalano, MF, JE Geenen, GA Lehman, JH Siegel, L Jacob, MJ McKinley, I Rajjman, P Meier, I Jacobson, R Kozarek, FH Al-Kawas, SK Lo, KS Dua, J Baille, GG Ginsberg, W Parsons, SM Meyerson, S Cohen, DB Nelson, JD McHattie, DL Carr-Locke. *"Tannenbaum" Teflon stents versus traditional polyethylene stents for treatment of malignant biliary stricture*. Gastrointestinal Endoscopy, 2002. 55(3): p. 354-358.
 24. Catalano, MF, JD Linder, S George, E Alcocer, JE Geenen. *Treatment of symptomatic distal common bile duct stenosis secondary to chronic pancreatitis: comparison of single vs. multiple simultaneous stents*. Gastrointestinal Endoscopy, 2004. 60(6): p. 945-952.
 25. Chan, AC, EK Ng, SC Chung, CW Lai, JY Lau, JJ Sung, JW Leung, AK Li. *Common bile duct stones become smaller after endoscopic biliary stenting*. Endoscopy, 1998. 30(4): p. 356-9.
 26. Chan, FK, M Suen, JY Li, JJ Sung. *Bile immunoglobulins and blockage of biliary endoprosthesis: an immunohistochemical study*. Biomed Pharmacother, 1998. 52(9): p. 403-7.
 27. Cheng, CL, S Sherman, JL Watkins, J Barnett, M Freeman, J Geenen, M Ryan, H Parker, JT Frakes, EL Fogel, WB Silverman, KS Dua, G Aliperti, P Yakshe, M Uzer, W Jones, J Goff, L Lazzell-Pannell, A Rashdan, M Temkit, GA Lehman. *Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study*. Am J Gastroenterol, 2006. 101(1): p. 139-47.
 28. Choi, JM, JH Kim, SS Kim, JH Yu, JC Hwang, BM Yoo, SH Park, HG Kim, DK Lee, KH Ko, KS Yoo, H Park do. *A comparative study on the efficacy of covered metal stent and plastic stent in unresectable malignant biliary obstruction*. Clin Endosc, 2012. 45(1): p. 78-83.
 29. Christensen, M, P Matzen, S Schulze, J Rosenberg. *Complications of ERCP: a prospective study*. Gastrointestinal Endoscopy, 2004. 60(5): p. 721-731.
 30. Claydon, MA, SN Davey, V Edwards-Jones, DB Gordon. *The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry*. Nat Biotech, 1996. 14(11): p. 1584-1586.
 31. Coene, PP, AK Groen, J Cheng, MM Out, GN Tytgat, K Huibregtse. *Clogging of biliary endoprostheses: a new perspective*. Gut, 1990. 31(8): p. 913-7.
 32. Conrad, A, M Kontro, M Keinänen, A Cadoret, P Faure, L Mansuy-Huault, J-C Block. *Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs*. Lipids, 2003. 38(10): p. 1093-1105.

33. Conrad, MR, JO Janes, J Dietchy. *Significance of low level echoes within the gallbladder*. American Journal of Roentgenology, 1979. 132(6): p. 967-972.
34. Costamagna, G, M Mutignani, G Rotondano, L Cipolletta, L Ghezzo, A Foco, A Zambelli. *Hydrophilic hydromer-coated polyurethane stents versus uncoated stents in malignant biliary obstruction: a randomized trial*. Gastrointestinal Endoscopy, 2000. 51(1): p. 8-11.
35. Costerton, JW, KJ Cheng, GG Geesey, TI Ladd, JC Nickel, M Dasgupta, TJ Marrie. *Bacterial Biofilms in Nature and Disease*. Annual Review of Microbiology, 1987. 41(1): p. 435-464.
36. Costerton, JW, Z Lewandowski, DE Caldwell, DR Korber, HM Lappin-Scott. *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. 49: p. 711-45.
37. Cotton, PB, DA Garrow, J Gallagher, J Romagnuolo. *Risk factors for complications after ERCP: a multivariate analysis of 11,497 procedures over 12 years*. Gastrointest Endosc, 2009. 70(1): p. 80-8.
38. Cotton, PB, G Lehman, J Vennes, JE Geenen, RC Russell, WC Meyers, C Liguory, N Nickl. *Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus*. Gastrointest Endosc, 1991. 37(3): p. 383-93.
39. Cramton, SE, C Gerke, NF Schnell, WW Nichols, F Gotz. *The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation*. Infect Immun, 1999. 67(10): p. 5427-33.
40. Csendes, A, M Fernandez, P Uribe. *Bacteriology of the gallbladder bile in normal subjects*. The American Journal of Surgery, 1975. 129(6): p. 629-631.
41. Curtis Nickel, J, JA Downey, J William Costerton. *Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters*. Urology, 1989. 34(5): p. 284-291.
42. Davids, PHP, AK Groen, EAJ Rauws, GNJ Tytgat, K Huibregtse. *Randomised trial of self-expanding metal stents versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction*. The Lancet, 1992. 340(8834-8835): p. 1488-1492.
43. Davids, PHP, EAJ Rauws, PPLO Coene, GNJ Tytgat, K Huibregtse. *Endoscopic stenting for post-operative biliary strictures*. Gastrointestinal Endoscopy, 1992. 38(1): p. 12-18.
44. Del Pozo, JL, R Patel. *Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints*. N Engl J Med, 2009. 361(8): p. 787-94.
45. Donelli, G, E Guaglianone, R Di Rosa, F Fiocca, A Basoli. *Plastic biliary stent occlusion: factors involved and possible preventive approaches*. Clin Med Res, 2007. 5(1): p. 53-60.

46. Donlan, RM. *Biofilms and device-associated infections*. Emerg Infect Dis, 2001. 7(2): p. 277-81.
47. Dowidar, N, HJ Kolmos, H Lyon, P Matzen. *Clogging of biliary endoprosthesis. A morphologic and bacteriologic study*. Scand J Gastroenterol, 1991. 26(11): p. 1137-44.
48. Dowidar, N, HJ Kolmos, P Matzen. *Experimental clogging of biliary endoprosthesis. Role of bacteria, endoprosthesis material, and design*. Scand J Gastroenterol, 1992. 27(1): p. 77-80.
49. Dowidar, N, F Moesgaard, P Matzen. *Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprosthesis*. Scand J Gastroenterol, 1991. 26(11): p. 1132-6.
50. Draganov, P, B Hoffman, W Marsh, P Cotton, J Cunningham. *Long-term outcome in patients with benign biliary strictures treated endoscopically with multiple stents*. Gastrointest Endosc, 2002. 55(6): p. 680-6.
51. Driffield, K, K Miller, JM Bostock, AJ O'Neill, I Chopra. *Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. 61(5): p. 1053-1056.
52. Dua, KS, ND Reddy, VG Rao, R Banerjee, B Medda, I Lang. *Impact of reducing duodenobiliary reflux on biliary stent patency: an in vitro evaluation and a prospective randomized clinical trial that used a biliary stent with an antireflux valve*. Gastrointestinal Endoscopy, 2007. 65(6): p. 819-828.
53. Eickhoff, A, R Jakobs, A Leonhardt, JC Eickhoff, JF Riemann. *Endoscopic stenting for common bile duct stenoses in chronic pancreatitis: results and impact on long-term outcome*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. 13(10): p. 1161-7.
54. Enns, R, MA Eloubeidi, K Mergener, PS Jowell, MS Branch, TM Pappas, J Baillie. *ERCP-related perforations: risk factors and management*. Endoscopy, 2002. 34(4): p. 293-8.
55. Farnbacher, MJ, R Lederer, A Blana, HT Schneider. *Does heparin coating reduce encrustation of biliary plastic endoprosthesis? A prospective randomized trial*. Scand J Gastroenterol, 2012. 47(10): p. 1141-7.
56. Filly, RA, B Allen, MJ Minton, R Bernhoft, LW Way. *In vitro investigation of the origin of echoes within biliary sludge*. Journal of Clinical Ultrasound, 1980. 8(3): p. 193-200.
57. Flemming, H-C, J Wingender. *The biofilm matrix*. Nat Rev Micro, 2010. 8(9): p. 623-633.
58. Floch, MH, W Gershengoren, S Diamond, T Hersh. *Cholic Acid Inhibition of Intestinal Bacteria*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1970. 23(1): p. 8-10.

59. Freeman, ML, JA DiSario, DB Nelson, MB Fennerty, JG Lee, DJ Bjorkman, CS Overby, J Aas, ME Ryan, GS Bochna, MJ Shaw, HW Snady, RV Erickson, JP Moore,JP Roel. *Risk factors for post-ERCP pancreatitis: A prospective, multicenter study.* *Gastrointestinal Endoscopy*, 2001. 54(4): p. 425-434.
60. Freeman, ML, DB Nelson, S Sherman, GB Haber, ME Herman, PJ Dorsher, JP Moore, MB Fennerty, ME Ryan, MJ Shaw, JD Lande,AM Pheley. *Complications of Endoscopic Biliary Sphincterotomy.* *New England Journal of Medicine*, 1996. 335(13): p. 909-919.
61. Galandi, D, G Schwarzer, D Bassler,HP Allgaier. *Ursodeoxycholic acid and/or antibiotics for prevention of biliary stent occlusion.* *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(3): p. CD003043.
62. Ghosh, S, KR Palmer. *Prevention of biliary stent occlusion using cyclical antibiotics and ursodeoxycholic acid.* *Gut*, 1994. 35(12): p. 1757-1759.
63. Gómez Zavaglia, A, G Kociubinski, P Pérez, E Disalvo,G De Antoni. *Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria.* *Journal of Applied Microbiology*, 2002. 93(5): p. 794-799.
64. Gotthardt, DN, G Rudolph, P Klöters-Plachky, H Kulaksiz,A Stiehl. *Endoscopic dilation of dominant stenoses in primary sclerosing cholangitis: outcome after long-term treatment.* *Gastrointestinal Endoscopy*, 2010. 71(3): p. 527-534.
65. Gregg, JA, PD Girolami,DL Carr-Locke. *Effects of sphincteroplasty and endoscopic sphincterotomy on the bacteriologic characteristics of the common bile duct.* *The American Journal of Surgery*, 1985. 149(5): p. 668-671.
66. Groen, AK, T Out, K Huibregtse, B Delzenne, FJ Hoek,GN Tytgat. *Characterization of the content of occluded biliary endoprotheses.* *Endoscopy*, 1987. 19(2): p. 57-9.
67. Guaglianone, E, R Cardines, P Mastrantonio, R Di Rosa, A Penni, G Puggioni, A Basoli, F Fiocca,G Donelli. *Role of multispecies microbial biofilms in the occlusion of biliary stents.* *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2011. 20(4).
68. Guaglianone, E, R Cardines, C Vuotto, R Di Rosa, V Babini, P Mastrantonio,G Donelli. *Microbial biofilms associated with biliary stent clogging.* *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. 59(3): p. 410-20.
69. Hall-Stoodley, L, FZ Hu, A Gieseke, L Nistico, D Nguyen, J Hayes, M Forbes, DP Greenberg, B Dice, A Burrows, PA Wackym, P Stoodley, JC Post, GD Ehrlich,JE Kerschner. *Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media.* *JAMA*, 2006. 296(2): p. 202-11.
70. Hall, MR, E McGillicuddy,LJ Kaplan. *Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians.* *Surg Infect (Larchmt)*, 2014. 15(1): p. 1-7.

71. Hatfield, ARW, T Leung, Z Ahmet,JD Williams. *The microbiology of direct bile sampling at the time of endoscopic retrograde cholangiopancreatography*. Journal of Infection, 1982. 4(2): p. 119-125.
72. Heilmann, C, O Schweitzer, C Gerke, N Vanittanakom, D Mack,F Götz. *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Molecular Microbiology, 1996. 20(5): p. 1083-1091.
73. Hill, MJ. *Action of bile salts on bacterial cell walls*. Nature, 1967. 214(5093): p. 1152-4.
74. Holm, A, E Vikstrom. *Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions*. Front Plant Sci, 2014. 5: p. 309.
75. Holman Jr, JM, LF Rikkers. *Biliary obstruction and host defense failure*. Journal of Surgical Research, 1982. 32(3): p. 208-213.
76. Howard, TJ, T Tan, GA Lehman, S Sherman, JA Madura, E Fogel, ML Swack,KK Kopecky. *Classification and management of perforations complicating endoscopic sphincterotomy*. Surgery, 1999. 126(4): p. 658-665.
77. Hoyle, BD, J Jass,JW Costerton. *The biofilm glycocalyx as a resistance factor*. J Antimicrob Chemother, 1990. 26(1): p. 1-5.
78. Iorgulescu, A, I Sandu, F Turcu,N Iordache. *Post-ERCP acute pancreatitis and its risk factors*. J Med Life, 2013. 6(1): p. 109-13.
79. James, GA, E Swogger, R Wolcott, Ed Pulcini, P Secor, J Sestrich, JW Costerton,PS Stewart. *Biofilms in chronic wounds*. Wound Repair and Regeneration, 2008. 16(1): p. 37-44.
80. Jansen, B, LP Goodman,D Ruiten. *Bacterial adherence to hydrophilic polymer-coated polyurethane stents*. Gastrointest Endosc, 1993. 39(5): p. 670-3.
81. Judah, JR, PV Draganov. *Endoscopic therapy of benign biliary strictures*. World Journal of Gastroenterology : WJG, 2007. 13(26): p. 3531-3539.
82. Kahl, S, S Zimmermann, I Genz, B Glasbrenner, M Pross, H-U Schulz, D Mc Namara, U Schmidt,P Malfertheiner. *Risk factors for failure of endoscopic stenting of biliary strictures in chronic pancreatitis: a prospective follow-up study*. Am J Gastroenterol, 2003. 98(11): p. 2448-2453.
83. Kaya, M, BT Petersen, P Angulo, TH Baron, JC Andrews, CJ Gostout,KD Lindor. *Balloon dilation compared to stenting of dominant strictures in primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2001. 96(4): p. 1059-1066.

84. Khashab, M, K Kim, S Hutfless, A Lennon, A Kalloo, V Singh. *Predictors of Early Stent Occlusion Among Plastic Biliary Stents*. Digestive Diseases and Sciences, 2012. 57(9): p. 2446-2450.
85. Landau, O, I Kott, AA Deutsch, E Stelman, R Reiss. *Multifactorial analysis of septic bile and septic complications in biliary surgery*. World J Surg, 1992. 16(5): p. 962-4; discussion 964-5.
86. Laskin, DL. *Nonparenchymal Cells and Hepatotoxicity*. Semin Liver Dis, 1990. 10(04): p. 293-304.
87. Laube, N, L Kleinen, U Böde, C Fisang, A Meißner, J Bradenahl, I Syring, H Busch, W Pinkowski, SC Müller. *Plasmadeponierte funktionalisierte Kohlenstoffschichten zur Minderung von Inkrustationen auf urologischen Implantaten*. Der Urologe, 2007. 46(9): p. 1249-1251.
88. Lee, SP, JF Nicholls. *Nature and composition of biliary sludge*. Gastroenterology, 1986. 90(3): p. 677-86.
89. Leung, JW, Y-L Liu, TD Desta, ED Libby, JF Inciardi, K Lam. *In vitro evaluation of antibiotic prophylaxis in the prevention of biliary stent blockage*. Gastrointestinal Endoscopy, 2000. 51(3): p. 296-303.
90. Leung, JW, Y Liu, RC Chan, Y Tang, Y Mina, AF Cheng, J Silva, Jr.. *Early attachment of anaerobic bacteria may play an important role in biliary stent blockage*. Gastrointest Endosc, 2000. 52(6): p. 725-9.
91. Leung, JW, YL Liu, T Desta, E Libby, JF Inciardi, K Lam. *Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents?* Gastrointest Endosc, 1998. 48(3): p. 250-7.
92. Leung, JW, YL Liu, PS Leung, RC Chan, JF Inciardi, AF Cheng. *Expression of bacterial beta-glucuronidase in human bile: an in vitro study*. Gastrointest Endosc, 2001. 54(3): p. 346-50.
93. Leung, JW, R Tu. *Mechanical lithotripsy for large bile duct stones*. Gastrointestinal Endoscopy, 2004. 59(6): p. 688-690.
94. Leung, JWC, GTC Lau, JJY Sung, JW Costerton. *Decreased bacterial adherence to silver-coated stent material: an in vitro study*. Gastrointestinal Endoscopy, 1992. 38(3): p. 338-340.
95. Leung, JWC, TKW Ling, JLS Kung, J Vallance-Owen. *The role of bacteria in the blockage of biliary stents*. Gastrointestinal Endoscopy, 1988. 34(1): p. 19-22.
96. Lewis, K. *Persister Cells*. Annual Review of Microbiology, 2010. 64(1): p. 357-372.

97. Li, XZ, H Nikaido. *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. *Drugs*, 2009. 69(12): p. 1555-623.
98. Loperfido, S, G Angelini, G Benedetti, F Chilovi, F Costan, F De Berardinis, M De Bernardin, A Ederle, P Fina, A Fratton. *Major early complications from diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study*. *Gastrointest Endosc*, 1998. 48(1): p. 1-10.
99. Lubbert, C, K Wendt, J Feisthommel, A Moter, N Lippmann, T Busch, J Mossner, A Hoffmeister, AC Rodloff. *Epidemiology and Resistance Patterns of Bacterial and Fungal Colonization of Biliary Plastic Stents: A Prospective Cohort Study*. *PLoS One*, 2016. 11(5): p. e0155479.
100. Luman, W, S Ghosh, KR Palmer. *A combination of ciprofloxacin and Rowachol does not prevent biliary stent occlusion*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1999. 49(3): p. 316-321.
101. Maki, T. *Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone: role of E. coli, beta-glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation*. *Ann Surg*, 1966. 164(1): p. 90-100.
102. Manifold, IH, DR Triger, JCE Underwood. *Kupffer-cell depletion in chronic liver disease: implications for hepatic carcinogenesis*. *The Lancet*, 1983. 322(8347): p. 431-433.
103. Marano Jr, BJ, CA Bonanno. *Metallic biliary endoprosthesis causing duodenal perforation and acute upper gastrointestinal bleeding*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1994. 40(2): p. 257-258.
104. Marrie, TJ, JW Costerton. *Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters*. *J Clin Microbiol*, 1984. 19(5): p. 687-93.
105. Masci, E, G Toti, A Mariani, S Curioni, A Lomazzi, M Dinelli, G Minoli, C Crosta, U Comin, A Fertitta, A Prada, GR Passoni, PA Testoni. *Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study*. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(2): p. 417-23.
106. Matsuda, Y, K Shimakura, T Akamatsu. *Factors affecting the patency of stents in malignant biliary obstructive disease: univariate and multivariate analysis*. *Am J Gastroenterol*, 1991. 86(7): p. 843-9.
107. McAllister, EW, LC Carey, PG Brady, R Heller, SG Kovacs. *The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion*. *Gastrointest Endosc*, 1993. 39(3): p. 422-5.

108. Moesch, C, D Sautereau, F Cessot, P Berry, M Mounier, A Gainant, B Pillegand. *Physicochemical and bacteriological analysis of the contents of occluded biliary endoprostheses*. *Hepatology*, 1991. 14(6): p. 1142-1146.
109. Molin, S, T Tolker-Nielsen. *Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure*. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. 14(3): p. 255-61.
110. Molinari, G, V Pugliese, GC Schito, CA Guzmán. *Bacteria involved in the blockage of biliary stents and their susceptibility to antibacterial agents*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1996. 15(1): p. 88-92.
111. Morelli, J, HE Mulcahy, IR Willner, JT Cunningham, P Draganov. *Long-Term Outcomes for Patients with Post-Liver Transplant Anastomotic Biliary Strictures Treated by Endoscopic Stent Placement*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2003. 58(3): p. 374-379.
112. Moskowitz, SM, JM Foster, J Emerson, JL Burns. *Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis*. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(5): p. 1915-22.
113. Nagura, H, PD Smith, PK Nakane, WR Brown. *IGA in human bile and liver*. *The Journal of Immunology*, 1981. 126(2): p. 587-95.
114. Naito, M, G Hasegawa, Y Ebe, T Yamamoto. *Differentiation and function of Kupffer cells*. *Medical Electron Microscopy*, 2004. 37(1): p. 16-28.
115. Nakamura, S, H Ohara, T Yamada, T Nakazawa, H Sano, H Ando, S Kajino, T Hashimoto, T Ando, T Nomura, T Joh, Y Okayama, A Uchida, M Iida, M Itoh. *Efficacy of plastic tube stents without side holes for middle and lower biliary strictures*. *J Clin Gastroenterol*, 2002. 34(1): p. 77-80.
116. Nickel, JC, I Ruseska, JB Wright, JW Costerton. *Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1985. 27(4): p. 619-624.
117. O'Brien, S, AR Hatfield, PI Craig, SP Williams. *A three year follow up of self expanding metal stents in the endoscopic palliation of longterm survivors with malignant biliary obstruction*. *Gut*, 1995. 36(4): p. 618-621.
118. Padberg, FT, Jr., SM Smith, RH Eng. *Optimal method for culturing vascular prosthetic grafts*. *J Surg Res*, 1992. 53(4): p. 384-90.
119. Pain, JA. *Reticulo-endothelial function in obstructive jaundice*. *British Journal of Surgery*, 1987. 74(12): p. 1091-1094.

120. Park, JW, JK Lee, KT Lee, KH Lee, YK Sung, CI Kang. *How to interpret the bile culture results of patients with biliary tract infections*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014. 38(3): p. 300-9.
121. Pereira-Lima, JC, R Jakobs, M Maier, C Benz, B Kohler, JF Riemann. *Endoscopic biliary stenting for the palliation of pancreatic cancer: results, survival predictive factors, and comparison of 10-French with 11.5-French gauge stents*. Am J Gastroenterol, 1996. 91(10): p. 2179-84.
122. Piper, KE, MJ Jacobson, RH Cofield, JW Sperling, J Sanchez-Sotelo, DR Osmon, A McDowell, S Patrick, JM Steckelberg, JN Mandrekar, M Fernandez Sampedro, R Patel. *Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication*. J Clin Microbiol, 2009. 47(6): p. 1878-84.
123. Pitt, WG, SA Ross. *Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth*. Biotechnol Prog, 2003. 19(3): p. 1038-44.
124. Ramage, G, JP Martínez, JL López-Ribot. *Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem*. FEMS Yeast Research, 2006. 6(7): p. 979-986.
125. Ramage, G, K Vandewalle, BL Wickes, JL Lopez-Ribot. *Characteristics of biofilm formation by Candida albicans*. Rev Iberoam Micol, 2001. 18(4): p. 163-70.
126. Rerknimitr, R, EL Fogel, C Kalayci, E Esber, GA Lehman, S Sherman. *Microbiology of bile in patients with cholangitis or cholestasis with and without plastic biliary endoprosthesis*. Gastrointestinal Endoscopy, 2002. 56(6): p. 885-889.
127. Rey, JF, P Maupetit, M Greff. *Experimental study of biliary endoprosthesis efficiency*. Endoscopy, 1985. 17(4): p. 145-8.
128. Richman, LK, RJ Klingenstein, JA Richman, W Strober, JA Berzofsky. *The Murine Kupffer Cell: I. Characterization of the Cell Serving Accessory Function in Antigen-Specific T Cell Proliferation*. The Journal of Immunology, 1979. 123(6): p. 2602-2609.
129. Rieger, UM, G Pierer, NJ Lüscher, A Trampuz. *Sonication of Removed Breast Implants for Improved Detection of Subclinical Infection*. Aesthetic Plastic Surgery, 2009. 33(3): p. 404-408.
130. Robenek, H, J Herwig, H Themann. *The morphologic characteristics of intercellular junctions between normal human liver cells and cells from patients with extrahepatic cholestasis*. Am J Pathol, 1980. 100(1): p. 93-114.
131. Rosa, RD, A Basoli, G Donelli, A Penni, FM Salvatori, F Fiocca, L Baldassarri. *A microbiological and morphological study of blocked biliary stents*. Microbial Ecology in Health and Disease, 2011. 11(2).

132. Rosch, T, A Triptrap, P Born, R Ott, N Weigert, E Frimberger, HD Allescher, M Classen, K Kamereck. *Bacteriobilia in percutaneous transhepatic biliary drainage: occurrence over time and clinical sequelae. A prospective observational study.* Scand J Gastroenterol, 2003. 38(11): p. 1162-8.
133. Roy, RK, K-R Lee. *Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. 83B(1): p. 72-84.
134. Sand, J, I Airo, KM Hiltunen, J Mattila, I Nordback. *Changes in biliary bacteria after endoscopic cholangiography and sphincterotomy.* Am Surg, 1992. 58(5): p. 324-8.
135. Sanderson, AR, JG Leid, D Hunsaker. *Bacterial Biofilms on the Sinus Mucosa of Human Subjects With Chronic Rhinosinusitis.* The Laryngoscope, 2006. 116(7): p. 1121-1126.
136. Scheeres, D, W O'Brien, L Ponsky, J Ponsky. *Endoscopic stent configuration and bile flow rates in a variable diameter bile duct model.* Surgical Endoscopy, 1990. 4(2): p. 91-93.
137. Schneider, J, W Weidner, A Hapfelmeier, N Wantia, S Feihl, RM Schmid, B Neu, S von Delius, H Algül, W Huber, A Weber. *The use of proton pump inhibitors and the spectrum and number of biliary pathogens in patients with acute cholangitis.* Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2014. 39(10): p. 1194-1203.
138. Shah, JN, NA Ahmad, K Shetty, ML Kochman, WB Long, CM Brensinger, PR Pfau, K Olthoff, J Markmann, A Shaked, KR Reddy, GG Ginsberg. *Endoscopic Management of Biliary Complications After Adult Living Donor Liver Transplantation.* Am J Gastroenterol, 2004. 99(7): p. 1291-1295.
139. Sheen-Chen, S-M, W-J Chen, H-L Eng, C-W Sheen, F-F Chou, Y-F Cheng, T-Y Lee. *Bacteriology and antimicrobial choice in hepatolithiasis.* American Journal of Infection Control, 2000. 28(4): p. 298-301.
140. Shepherd, HA, G Royle, APR Ross, A Diba, M Arthur, D Colin-Jones. *Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: A randomized trial.* British Journal of Surgery, 1988. 75(12): p. 1166-1168.
141. Siegel, JH, RP Yattoo. *Biliary endoprosthesis for the management of retained common bile duct stones.* Am J Gastroenterol, 1984. 79(1): p. 50-4.
142. Smith, AC, JF Dowsett, RCG Russell, ARW Hatfield, PB Cotton. *Randomised trial of endoscopic stenting versus surgical bypass in malignant low bile duct obstruction.* The Lancet, 1994. 344(8938): p. 1655-1660.
143. Soehendra, N, V Reynders-Frederix. *Palliative bile duct drainage - a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain.* Endoscopy, 1980. 12(1): p. 8-11.

144. Speer, AG, PB Cotton, KD MacRae. *Endoscopic management of malignant biliary obstruction: stents of 10 French gauge are preferable to stents of 8 French gauge.* Gastrointest Endosc, 1988. 34(5): p. 412-7.
145. Sternberg, C, BB Christensen, T Johansen, A Toftgaard Nielsen, JB Andersen, M Givskov, S Molin. *Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms.* Appl Environ Microbiol, 1999. 65(9): p. 4108-17.
146. Sung, JJY, SCS Chung, C-P Tsui, AL Co, AKC Li. *Omitting side-holes in biliary stents does not improve drainage of the obstructed biliary system: A prospective randomized trial.* Gastrointestinal Endoscopy, 1994. 40(3): p. 321-325.
147. Sung, JJY, JCK Leung, CP Tsui, SCS Chung, KN Lai. *Biliary IgA secretion in obstructive jaundice: The effects of endoscopic drainage.* Gastrointestinal Endoscopy, 1995. 42(5): p. 439-444.
148. Sung, JY, JW Costerton, EA Shaffer. *Defense system in the biliary tract against bacterial infection.* Dig Dis Sci, 1992. 37(5): p. 689-96.
149. Sung, JY, JW Leung, EA Shaffer, K Lam, JW Costerton. *Bacterial biofilm, brown pigment stone and blockage of biliary stents.* J Gastroenterol Hepatol, 1993. 8(1): p. 28-34.
150. Sung, JY, JW Leung, EA Shaffer, K Lam, ME Olson, JW Costerton. *Ascending infection of the biliary tract after surgical sphincterotomy and biliary stenting.* J Gastroenterol Hepatol, 1992. 7(3): p. 240-5.
151. Sung, JY, ME Olson, JWC Leung, MS Lundberg, JW Costerton. *The Sphincter of Oddi is a Boundary for Bacterial Colonisation in the Feline Biliary Tract.* Microbial Ecology in Health and Disease, 2011. 3(4).
152. Sung, JY, EA Shaffer, JW Costerton. *Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens.* Digestive Diseases and Sciences, 1993. 38(11): p. 2104-2112.
153. Sung, JY, EA Shaffer, ME Olson, JW Leung, K Lam, JW Costerton. *Bacterial invasion of the biliary system by way of the portal-venous system.* Hepatology, 1991. 14(2): p. 313-7.
154. Sutherland, IW. *The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment.* Trends in Microbiology, 2001. 9(5): p. 222-227.
155. ten Cate, JM. *Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque.* Odontology, 2006. 94(1): p. 1-9.
156. Trampuz, A, KE Piper, MJ Jacobson, AD Hanssen, KK Unni, DR Osmon, JN Mandrekar, FR Cockerill, JM Steckelberg, JF Greenleaf, R Patel. *Sonication of removed*

- hip and knee prostheses for diagnosis of infection.* N Engl J Med, 2007. 357(7): p. 654-63.
157. Tsang, T-K, J Pollack, HB Chodash. *Inhibition of biliary endoprosthesis occlusion by ampicillin-sulbactam in an in vitro model.* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1997. 130(6): p. 643-648.
 158. van Berkel, AM, JJ Bergman, I Waxman, P Andres, K Huibregtse. *Wallstents for metastatic biliary obstruction.* Endoscopy, 1996. 28(5): p. 418-21.
 159. van Berkel, AM, J van Marle, AK Groen, MJ Bruno. *Mechanisms of biliary stent clogging: confocal laser scanning and scanning electron microscopy.* Endoscopy, 2005. 37(8): p. 729-34.
 160. Vihervaara, H, JM Gronroos, S Hurme, R Gullichsen, P Salminen. *Antireflux Versus Conventional Plastic Stent in Malignant Biliary Obstruction: A Prospective Randomized Study.* J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2016.
 161. Weber, A, H Feussner, F Winkelmann, JR Siewert, RM Schmid, C Prinz. *Long-term outcome of endoscopic therapy in patients with bile duct injury after cholecystectomy.* J Gastroenterol Hepatol, 2009. 24(5): p. 762-9.
 162. Weber, A, J Schneider, S Wagenpfeil, P Winkle, J Riedel, N Wantia, S Feihl, F Rommler, DM Baur, RM Schmid, H Algul, W Huber. *Spectrum of pathogens in acute cholangitis in patients with and without biliary endoprosthesis.* J Infect, 2013. 67(2): p. 111-21.
 163. Weber, A, S Zellner, S Wagenpfeil, J Schneider, C Gerngross, DM Baur, B Neu, M Bajbouj, S von Delius, H Algul, RM Schmid, C Prinz. *Long-term follow-up after endoscopic stent therapy for benign biliary strictures.* J Clin Gastroenterol, 2014. 48(1): p. 88-93.
 164. Weickert, U, T Venzke, J Konig, J Janssen, K Remberger, L Greiner. *Why do bilioduodenal plastic stents become occluded? A clinical and pathological investigation on 100 consecutive patients.* Endoscopy, 2001. 33(9): p. 786-90.
 165. Wieser, A, L Schneider, J Jung, S Schubert. *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review).* Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. 93(3): p. 965-974.
 166. Wingender, J, M Strathmann, A Rode, A Leis, H-C Flemming. [25] *Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from Pseudomonas aeruginosa,* in *Methods in Enzymology*, JD Ron, Editor. 2001, Academic Press. p. 302-314.

167. Yamabe, A, A Irisawa, I Wada, G Shibukawa, M Fujisawa, A Sato, R Igarashi, T Maki, K Hoshi. *Application of a silver coating on plastic biliary stents to prevent biofilm formation: an experimental study using electron microscopy*. *Endosc Int Open*, 2016. 4(10): p. E1090-E1095.
168. Yu, J-L, R Andersson, L-Q Wang, S Bengmark, Å Ljungh. *Fibronectin on the Surface of Biliary Drain Materials—A Role in Bacterial Adherence*. *Journal of Surgical Research*, 1995. 59(5): p. 596-600.
169. Yu, JL, R Andersson, Å Ljungh. *Protein adsorption and bacterial adhesion to biliary stent materials*. *J Surg Res*, 1996. 62(1): p. 69-73.
170. Zhang, H, T-K Tsang, CA Jack, J Pollack. *Role of bile mucin in bacterial adherence to biliary stents*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2002. 139(1): p. 28-34.
171. Zhang, H, TK Tsang, CA Jack. *Bile glycoprotein mucin in sludge occluding biliary stent*. *J Lab Clin Med*, 2003. 142(1): p. 58-65.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. med. Andreas Weber für die Überlassung dieses interessanten Themas, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine wertvollen Ratschläge.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Jochen Schneider, der mir mit seiner Erfahrung, Hilfsbereitschaft sowie für zahlreiche Fragen jederzeit zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie des Klinikums rechts der Isar, die in die Prozesse der Keimidentifizierung involviert waren. Herrn Alexander Hapfelmeier danke ich für die statistische Auswertung unserer Daten.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Elfriede und Jürgen Fremd, und meinem Bruder Carlo Fremd für ihre unermüdliche Unterstützung, motivierenden Worte und den emotionalen Rückhalt bedanken, ohne die das Studium und die Promotion so nicht möglich gewesen wären.