

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert R. Kübler

**Molekulargenetische Analyse der perioperativen Kolonisation infektionsrelevanter
Mikroorganismen bei Patienten mit intraoralen mikrovaskulären Transplantaten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Kommer (geb. Bek)

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Dr. Majeed Rana

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Birgit Henrich

Auflistung eigener Publikationen

Moellmann, H.L. †; Kommer, K. †; Karnatz, N.; Pfeffer, K.; Henrich, B.; Rana, M. Molecular Genetic Analysis of Perioperative Colonization by Infection-Related Microorganisms in Patients Receiving Intraoral Microvascular Grafts. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, 4103. <https://doi.org/10.3390/jcm13144103> (1)

† Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen und teilen sich die Erstautorenschaft

I Zusammenfassung (deutsch)

Die Rekonstruktion großflächiger Defekte in der Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie beinhaltet häufig den Transfer von extraoralem Gewebe in die Mundhöhle mittels mikrovaskulärer Transplantation. Diese Studie untersuchte postoperative Veränderungen der mikrobiellen Besiedlung nach derartigen Eingriffen sowie potenzielle Einflussfaktoren.

Bei 37 Patienten, die intraorale Rekonstruktionen mittels mikrovaskulärer Transplantate erhielten, wurden präoperativ sowie 1–3 bzw. 6–9 Tage postoperativ Abstriche von Donor- und Empfängerregion entnommen, um sieben ausgewählte Markerkeime mittels TaqMan-PCR zu quantifizieren. Die Markerkeime waren entweder Vertreter der normalen Mundflora (*Streptococcus mitis* und *Mycoplasma salivarium*) oder waren mit postoperativen Infektionen assoziiert (*Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Acinetobacter baumannii*). Um Einflussfaktoren auf die perioperative Besiedlung durch die detektierten Keime zu untersuchen, wurden zusätzlich patientenspezifische Faktoren (Alter, Geschlecht, BMI, ASA-Score, Tabakkonsum) sowie klinische Daten (Antibiotikatherapie, Mundgesundheitsindizes, Hospitalisierungsdauer, postoperative Mundtrockenheit, Entzündungszeichen) erfasst.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich das Kolonisierungsmuster der untersuchten Keime auf der Transplantatoberfläche postoperativ der intraoralen Kolonisierung anpasste. Die Gewebsunterschiede von Derma und Mukosa hatten einen eher geringen Einfluss auf die Entwicklung einer postoperativen Dysbiose nach mikrochirurgischer Transplantation. Es wurde postoperativ eine tendenzielle Vermehrung potenzieller Infektionserreger wie *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* beobachtet, ohne dass dies direkt mit der Entstehung von Wundinfektionen in Zusammenhang stand. Der Vertreter der gesunden Mundflora *S. mitis* zeigte postoperativ eine signifikante Abnahme und wurde durch andere Bakterien, wie z. B. *M. salivarium* (positive Selektion), verdrängt. Diese postoperativen dysbiotischen Veränderungen schienen insbesondere durch die Verabreichung von Ampicillin/Sulbactam begünstigt worden zu sein. Eine zurückhaltende Haltung bei der längerfristigen Anwendung von Standardantibiotika nach mikrochirurgischer Transplantation wird empfohlen. Dieser Ansatz zielt darauf ab, Dysbiosen zu verhindern und die Selektion von resistenten, potenziell infektionsrelevanten Spezies zu vermeiden.

II Zusammenfassung (englisch)

The reconstruction of large defects in oral and maxillofacial surgery often involves the transfer of dermal skin tissue into the oral cavity using microvascular transplantation. This study investigated postoperative changes in microbial colonization after such procedures, as well as potential influencing factors.

In 37 patients who underwent intraoral reconstructions using microvascular grafts, swabs were taken from the donor and recipient regions preoperatively, as well as 1–3 and 6–9 days postoperatively, to quantify seven selected marker bacteria using TaqMan PCR. The marker bacteria were either representatives of the normal oral flora (*Streptococcus mitis* and *Mycoplasma salivarium*) or were associated with postoperative infections (*Enterococcus faecalis*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*). To investigate factors influencing the perioperative colonization by the detected microorganisms, patient-specific factors (age, gender, BMI, ASA score, tobacco use) as well as clinical data (antibiotic therapy, oral health indices, length of hospitalization, postoperative oral dryness, and signs of inflammation) were also recorded.

The results showed that the colonization pattern of the examined microorganisms on the graft surface postoperatively adapted to the intraoral colonization. The tissue differences between dermis and mucosa had a relatively minor influence on the development of postoperative dysbiosis after microsurgical transplantation. A postoperative increase in potential infection-causing pathogens such as *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis*, and *P. aeruginosa* was observed, although this was not directly linked to the development of wound infections. The representative of the healthy oral flora, *S. mitis*, showed a significant postoperative decrease and was displaced by other bacteria, such as *M. salivarium* (positive selection). These postoperative dysbiotic changes appeared to be particularly promoted by the administration of ampicillin/sulbactam. A cautious approach to the long-term use of standard antibiotics following microsurgical transplantation is recommended. This approach aims to prevent dysbiosis and avoid the selection of resistant, potentially infection-relevant species.

III Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Amp	Ampicillin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
Ct	Threshold-Cycle (Zyklusschwellenwert)
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GE	Genomäquivalente
h	Stunde
M	Molar
min	Minute
MKG	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
MRONJ	Medikamentenassoziierte Osteonekrose des Kiefers (engl. <i>Medication-related osteonecrosis of the jaw</i>)
OP	Operation
s	Sekunde
Zn	Zustand nach

IV Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Orale postoperative Dysbiosen.....	1
1.2	Transplantationen im kieferchirurgischen Bereich	3
1.2.1	Gewebsdefekte im Kopf-Hals-Bereich	3
1.2.2	Transplantationsformen	4
1.2.3	Mikrovaskuläre Transplantationen	5
1.2.4	Komplikationen nach mikrovaskulären Transplantationen.....	6
1.3	Mikrobielle Besiedlung im Operationsgebiet	7
1.3.1	Orales Mikrobiom.....	7
1.3.2	Dermales Mikrobiom.....	8
1.3.3	Orales Mikrobiom bei postoperativen Infektionen.....	9
1.4	Steckbriefe ausgewählter Mikroorganismen	10
1.4.1	<i>Streptococcus mitis</i>	10
1.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.4.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	11
1.4.4	<i>Enterobacteriaceae</i>	12
1.4.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.4.6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	13
1.4.7	<i>Mycoplasma salivarium</i>	14
1.5	TaqMan-PCR als molekulargenetisches Diagnostikverfahren	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Materialien und Methoden.....	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	PCR-Mastermixe	20
2.1.4	Primer und Sonden.....	20

2.1.5	Kits	22
2.1.6	Puffer und Medien	22
2.1.7	Bakterienstämme.....	22
2.1.8	Klonierungsvektor	23
2.1.9	Geräte	23
2.1.10	Software	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Patientenkollektiv.....	24
2.2.2	Probengewinnung und klinische Datenerhebung	25
2.2.3	Probenlagerung	30
2.2.4	DNA-Präparation	30
2.2.5	PCR.....	30
2.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	32
2.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	33
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung	33
2.2.9	Klonierung eines PCR-Produkt tragenden Plasmids mit anschließender Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	33
2.2.10	Herstellung von Glycerin-Stocks	33
2.2.11	Plasmid-Präparation	34
2.2.12	Normalisierung der Rohdaten	34
2.3	Stichprobenumfang und Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Validierung der Methodik.....	36
3.1.1	Quantifizierungsstandards	36
3.1.2	PCR-Linearitätsbestimmung	41
3.1.3	Nachweisgrenzen und Validierung der Quantifizierung	46
3.1.4	Etablierung von Duplex-PCRs	48
3.1.5	PCR-Plattenbelegung	53
3.2	Patienten und Patientenproben	55

3.3	Perioperative Keimnachweise	59
3.4	Wundkomplikationen und Entzündungsparameter.....	63
3.5	Untersuchung von Einflüssen auf die perioperative Keimbesiedlung	66
3.5.1	Antibiotika.....	66
3.5.2	Mundgesundheit und Xerostomie	72
3.5.3	Hospitalisierungsdauer	74
3.5.4	<i>M. salivarium</i> und Zahnbestand	75
3.5.5	Besiedlung extraoraler Haut im Mund.....	76
4	Diskussion.....	78
4.1	Methodik.....	78
4.1.1	PCR-Sensitivität.....	78
4.1.2	Anzahl der Genkopien pro Genom.....	79
4.2	Patienten und Patientenproben	80
4.2.1	Probensammlung.....	80
4.2.2	Patientencharakteristik.....	81
4.2.3	Entzündungsparameter.....	82
4.2.4	Komplikationen	83
4.2.5	Molekulargenetische und kulturelle Nachweise im Vergleich	83
4.3	Präoperative Kontrollabstriche (W_0 und T_0).....	85
4.4	Postoperative Störung der Keimbesiedlung.....	88
4.4.1	Selektion durch Antibiosen	88
4.4.2	Selektion durch Chlorhexidin	92
4.4.3	Dentaler Biofilm und biofilmassoziierte Erkrankungen	93
4.4.4	Xerostomie	94
4.4.5	Nosokomiale Keime.....	96
4.4.6	Bezahnung: Eine Voraussetzung für <i>M. salivarium</i>	97
4.4.7	Transfer von extraoralem Gewebe in den Mund	98
4.5	Schlussfolgerung.....	100
5	Literatur.....	101

6	Danksagung.....	125
---	-----------------	-----

1 Einleitung

1.1 Orale postoperative Dysbiosen

Im Rahmen chirurgischer Therapien im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Bereich ergeben sich oftmals großflächige Gewebsdefekte, welche mit schweren Funktionsverlusten einhergehen und kosmetisch entstellende und stigmatisierende Auswirkungen haben können (2–6). Wenn ein primärer Wundverschluss nicht möglich ist, haben sich für die plastische Deckung solcher Defekte mikrovaskulär gestielte Transplantate etabliert (3, 4, 7–9). Die Literatur lieferte bislang nur begrenzt Aufschluss über perioperative Veränderungen der mikrobiellen Besiedlung des Transplantates sowie des Mundraumes nach intraoralen mikrovaskulären Transplantationen.

Es wurde durch Meyer-Lückel et al. und Xinyi et al. beschrieben, dass Änderungen verschiedener Faktoren des oralen Milieus, wie eine veränderte Nährstoffverfügbarkeit, Sauerstoffkonzentration, Wirtsantwort oder ein veränderter pH-Wert, zu einer Dysbiose durch die Vermehrung opportunistischer Keime führen konnten (10, 11). Auch stark invasive Eingriffe wie mikrovaskuläre Transplantationen im Mundraum gehen mit schwerwiegenden Änderungen des oralen Milieus einher: Faktoren wie eine schwellungs- oder schmerzbedingte erschwerte Mundhygiene (12), eine längerfristige Hospitalisierung (13), die Anwendung antimikrobieller Mundspülungen (14), postoperative Antibiosen (15), mögliche postoperative Xerostomien (16) sowie der Transfer von extraoralem Gewebe in den Mund (17) machen eine Störung der homöostatischen Balance zwischen dem Wirt und der oralen Mikroflora wahrscheinlich. Von den Arbeitsgruppen Durand et al. und Eckert et al. wurde zudem beschrieben, dass Wundinfektionen nach oralen mikrovaskulären Transplantationen oftmals durch Erreger ausgelöst wurden, die nicht üblicherweise Teil der gesunden Mundflora sind (18, 19). Die Frage, inwiefern sich normalerweise ortsfremde Erreger wie *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* unter bestimmten Bedingungen in der Mundhöhle ansiedeln und vermehren können, ist schon seit Anfang der Jahrtausendwende Gegenstand intensiver Forschung (20–22).

Tranberg et al. publizierten, dass sich allein schon der Zustand der Hospitalisierung auf die orale Keimbesiedlung auswirken konnte: Das oropharyngeale Mikrobiom wurde bei längerfristigen Klinikaufenthalten gestört und war insbesondere durch das Auftreten von Darmbakterien wie *E. faecalis* und *Enterococcus faecium*, sowie verschiedenen Vertretern der *Enterobacteriaceae* gekennzeichnet (13). Es gab zudem starke Überschneidungen zwischen der Präsenz typischer Infektionserreger nach mikrovaskulären Transplantationen

und klassischen nosokomialen Keimen: Regelmäßig in der Literatur genannte Erreger nosokomialer Infektionen wie *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* sowie verschiedene Vertreter der *Enterobacteriaceae* (23–25) wurden zugleich auch häufig mit Infektionen nach mikrovaskulären Transplantationen in Verbindung gebracht (18, 19, 26–28). Doch nicht nur die Dauer der Hospitalisierung, sondern auch der Schweregrad einer Erkrankung schien einen Einfluss auf die orale Keimbesiedlung zu haben: So wurde bereits in den Sechzigerjahren durch Johanson et al. gezeigt, dass der Schweregrad von Erkrankungen positiv mit der pharyngealen Kolonisation gramnegativer Bazillen korrelierte (29).

Während einerseits orale Tumorerkrankungen starke Einflüsse auf die orale Keimbesiedlung zeigten (30–34), konnten andererseits auch Tumorexzisionen das orale Mikrobiom langfristig verändern. Chan et al. untersuchten das perioperative Mikrobiom oraler Spülproben mittels *Next-Generation Sequencing* und beobachteten sechs Monate postoperativ eine Abnahme einiger parodontopathogener Genera, wie *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, *Leptotrichia*, *Aggregatibacter* und *Treponema*, während die Kommensalen der Mundflora, *Streptococcus* und *Rothia*, zunahmen (35).

Weiterhin lieferte die Literatur Hinweise, dass sich Faktoren der Mundhygiene bzw. der dentalen und parodontalen Gesundheit auf die Entstehung postoperativer Infektionen im Mundraum auswirken konnten. Eine Studie von Sato et al. zeigte, dass eine professionelle Zahnreinigung und Mundhygieneanweisung das Risiko von Wundinfektionen nach der Exzision von oralen Plattenepithelkarzinomen signifikant reduzierten (36), und Usubuchi et al. publizierten, dass eine präoperative zahnärztliche Behandlung im Sinne einer Zahnsteinentfernung sowie die Behandlung tiefer kariöser Läsionen und schwerer Parodontitis das Risiko einer postoperativen Infektion nach mikrovaskulären Transplantaten im Kopf-Hals-Bereich senkte (37).

Auch die Oberflächenbeschaffenheit der oralen Epithelien scheint einen Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung zu haben: Kageyama et al. untersuchten mittels 16S rDNA-Sequenzierung und qPCR-Analyse das Mikrobiom stimulierter Speichelproben bei Patienten mit Tumorexzisionen im Zungenbereich und fanden eine signifikante postoperative Abnahme solcher Keime, die als prädominante Bewohner des Zungenrückens gelten (*Streptococcus salivarius*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella histicola* und *Actinomyces spp.*). Dagegen nahmen dentale Plaquebakterien, wie *Lautropia mirabilis*, *Neisseria flava*, *Streptococcus sanguinis* und *Fusobacterium nucleatum*, signifikant zu. Die Autoren diskutierten, dass sich das Speichelmikrobiom im Rahmen der durch die Tumorexzision bedingten Reduzierung der Zungenoberfläche offensichtlich zugunsten plaqueassoziiierter Keime verschob. Allerdings wurde von den Autoren insgesamt keine schwerwiegende postoperative Dysbiose durch übermäßiges Wachstum normalerweise ortsfremder Pathogene beobachtet, sondern

eher eine mikrobielle Verschiebung zugunsten auch sonst residenter Bewohner der Mundflora. Lediglich zwei der in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielten eine Defektrekonstruktion mittels mikrovaskulärer Transplantation. Die Autoren wiesen auf die Notwendigkeit weiterführender Forschung in größeren Stichprobenzahlen hin, um den Effekt mikrovaskulärer Transplantate auf die orale Keimbesiedlung zu untersuchen. Ein Einfluss der kutanen Haut auf die Keimbesiedlung sei naheliegend, da sie von der oralen Schleimhaut in ihrer epithelialen Beschaffenheit abweicht (38).

1.2 Transplantationen im kieferchirurgischen Bereich

1.2.1 Gewebsdefekte im Kopf-Hals-Bereich

Großflächige Gewebsdefekte im Kopf- und Halsbereich können mit Dysfunktionen des Schluckvorgangs, des Kauens, des Sprechens und der Atmung einhergehen. Oftmals sind auch kosmetisch entstellende und stigmatisierende Auswirkungen die Folge (2–6). Mikrovaskuläre Transplantate haben sich als Goldstandard zur Deckung und funktionalen Rehabilitation solcher großen Gewebsdefekte im Kopf-Halsbereich etabliert (3–5, 7, 9, 39, 40). Die Gründe für großflächige Defekte im Kopf-Halsbereich können vielfältig sein, wobei am häufigsten Tumorexzisionen ursächlich sind. Weitere Gründe können die chirurgische Exkochleation von Osteomyelitiden oder Osteoradionekrosen, Traumata oder ausgeprägte Unterkieferatrophien sein (41). Auch in der Pädiatrie werden in seltenen Fällen mikrovaskuläre Transplantate genutzt. Gründe hierfür können kongenitale faziale Anomalien wie beispielsweise Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sein (42).

Tumoren der Mundhöhle stellen die häufigste Indikation für intraorale mikrovaskuläre Transplantationen zur Defektdeckung dar (43). Der Mund- und Rachenraum ist weltweit die sechsthäufigste Tumorlokalisation (44). Tumorerkrankungen im Mundraum umfassen eine heterogene Gruppe von Tumoren, unter denen Plattenepithelkarzinome (87% bis 90%) mit Abstand am häufigsten auftreten, gefolgt von Adenokarzinomen (3%) (44, 45).

Die Ätiologie von Tumoren der Mundhöhle ist multifaktoriell: Rauchen und Alkoholkonsum zeigten einen synergistischen Effekt auf die Entstehung von Krebserkrankungen in Mund, Rachen, Kehlkopf und Speiseröhre (46). Bereits in den Achtzigerjahren wurde durch Blot et al. gezeigt, dass das Risiko einer Krebserkrankung im Mundraum bei starkem Rauchen in Kombination mit übermäßigem Alkoholkonsum um das 35-fache ansteigt. Das Risiko steigt somit eher multiplikativ als additiv, wenn beide Risikofaktoren vorliegen (47). Männer erkranken aufgrund einer höheren Exposition von Risikofaktoren 1,5-fach häufiger und zwei bis drei Jahre früher als Frauen (45, 48). Laut Wienecke et al. unterschied sich die Wirkung verschiedener Risikofaktoren lokalisationsabhängig: Die chronische Infektion mit humanen

Papillomaviren (HPV) begünstigte insbesondere die Entstehung von Tumoren des Zungengrundes, des oberen Rachenabschnitts und der Rachenmandeln. Lippentumoren wurden durch starke Sonneneinstrahlung begünstigt und Tumoren der Nasopharynx durch berufliche Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien und Holzstäuben (49). Als weitere Ursachen für die Entstehung von oralen Krebsarten wurden ungesunde Ernährungsweisen, zu wenig Bewegung, geringes Einkommen und soziale Benachteiligung beschrieben, die mit weniger Zugang zu gesundheitlichen Dienstleistungen und gesundheitlicher Aufklärung einhergehen (46).

1.2.2 Transplantationsformen

Unter einer Transplantation versteht man die Verpflanzung von Gewebe, um Defekte aufzufüllen und dadurch Form und Funktion des zu rekonstruierenden Areals zu verbessern. Ziel ist dabei das Einwachsen sowie die Funktionsübernahme des transplantierten Gewebes in der Empfängerregion. Dabei wird immer angestrebt, fehlendes durch gleichartiges Gewebe zu ersetzen (also Schleimhaut durch Schleimhaut oder Haut durch Haut), was jedoch insbesondere bei großen Schleimhautdefekten nicht immer realisierbar ist (50).

Man unterscheidet zwischen **allogenen** Transplantaten (Transplantat von anderem Organismus der gleichen Spezies), **xenogenen** Transplantaten (artfremdes Transplantat von einer anderen Spezies; z. B. tierisches Kollagen, Knochen oder Hyaluronsäure), **alloplastischen** Transplantaten (synthetische Materialien, z. B. Keramiken oder Titanimplantate), sowie **autogenen** Transplantaten (körpereigenes Gewebe wird an eine andere Körperregion übertragen). Die in der vorliegenden Studie genutzten Transplantate waren ausschließlich autogen. Da Spender und Empfänger des Transplantates hierbei identisch waren, sollte bei dieser sehr zuverlässigen Transplantationsform eine Abstoßungsreaktion ausbleiben (50).

Es werden grundsätzlich drei verschiedene Methoden der Transplantation unterschieden: Bei der **freien Transplantation** wird das Gewebe vollständig aus dem Gewebeverbund gelöst und in der Empfängerregion neu eingebettet. Die Ernährung eines freien Transplantats erfolgt bis zu dessen Revitalisierung (Einsprießen von Blutgefäßen) ausschließlich durch Diffusion durch das umliegende Gewebe. Bei der **gestielten Transplantation** behält das Transplantat über einen Stiel Kontakt zur Empfängerregion. Über den Stiel können zu- und abführende Gefäße überbrückt werden. Die dritte Methode der Transplantation ist die in der hiesigen Studie ausschließlich untersuchte **mikrovaskuläre Transplantation**, welche im folgenden Kapitel 1.2.3 detailliert beschrieben wird (50).

1.2.3 Mikrovaskuläre Transplantationen

Bei der mikrovaskulären Transplantation erfolgt die Verpflanzung des Transplantats mit ernährendem Blutgefäßsystem. Arterie, Vene und zwischengeschaltetes Kapillarbett werden mitsamt dem Transplantat aus der Donorregion (Entnahmestelle des Transplantats) entnommen und nach der Verpflanzung an ortsständige Gefäße mittels mikrochirurgischer Technik angeschlossen, sodass die Durchblutung des Transplantats gewährleistet ist (50). Wichtige Voraussetzungen für mikrovaskuläre Transplantate sind definierte und konstante anatomische Gegebenheiten im Bereich der Donorregion, kaliberstarke und unversehrte Blutgefäße mit möglichst variantenarmem Verlauf, sowie eine geringstmögliche Morbidität der Donorregion (51).

Die das Transplantat versorgenden Gefäße werden bei der Transplantation mittels Gefäß-anastomose an ein großes Halsgefäß angeschlossen. Die Gefäßenden werden vor Anastomosierung mit Heparin-Kochsalz-Lösung gespült, um mögliche residuale Blutreste zu entfernen (51). Nach Verlegung des Gefäßstiels durch einen Hauttunnel in die *Regio submandibularis* kann die Anastomose an das Halsgefäß erfolgen. Häufig wird hierbei die *Arteria facialis* gewählt (40). Möglich sind dabei End-zu-End-Anastomosen, bei denen Gefäße mit ähnlichen Lumina an den Enden vereint werden. Alternativ können End-zu-Seit-Anastomosen gewählt werden, wenn die zu verbindenden Gefäße stark differierende Durchmesser aufweisen oder wenn die Funktionalität einer funktionellen Endarterie erhalten werden muss. Die Stumpfenden werden mit Gefäßapproximatklemmen spannungsfrei angenähert und können mit monofilem, nicht resorbierbarem Nylon-Faden der Stärke 9-0 bis 11-0 mit Einzelknopfnähten oder fortlaufender Gefäßnaht vernäht werden (51).

Nachdem 1959 erstmals ein mikrovaskulär gestieltes Transplantat zur Defektdeckung im Kopf-Hals-Bereich eingesetzt wurde (52), gilt diese Art der Defektdeckung auch heute noch als Goldstandard bei großen Defekten im Kopf-Hals Bereich (53). Seit der routinemäßigen Nutzung mikrovaskulärer Transplantate in den späten 1980er Jahren wurden über 20 verschiedene Transplantate aus unterschiedlichen Donorregionen beschrieben, aus denen indikationsspezifisch ausgewählt werden kann (54, 55).

Zur Weichgewebsrekonstruktion oberflächlicher Defekte werden faszio- und septokutane Transplantate verwendet. Beispiele für faszio- und septokutane Transplantate sind der *Anterolateral Thigh (ALT)-Flap*, das Ulnaristransplantat, das Skapula-Paraskapula-Weichgewebstransplantat und das septokutane Oberarmtransplantat (51, 54). Das häufigste Transplantat im Kopf- und Halsbereich ist das fasziokutane Radialistransplantat. Es wird durch die *Arteria brachialis* versorgt, die sich in *Arteria radialis* und *Arteria ulnaris* aufteilt. Wird das Transplantat zur Defektdeckung in der Mundhöhle bzw. im Pharynx eingesetzt, wird dabei Schleimhaut durch dermale Haut ersetzt (40, 50, 51, 54, 56).

Für Defekte mit großer Tiefenausdehnung können muskulokutane Transplantate wie das Latissimus-dorsi-Transplantat oder das Rectus-abdominis-Transplantat genutzt werden (51, 54).

Zur knöchernen Rekonstruktion im Kieferbereich werden am häufigsten Fibulatrtransplantate, Beckenkammtransplantate oder osteokutane Skapulatrtransplantate gewählt (5). Fibulatrtransplantate sind insbesondere für große Knochendefekte geeignet und ermöglichen eine vollständige Unterkieferrekonstruktion sowie eine dentale Rehabilitation mit Implantaten (5, 43, 51, 54).

1.2.4 Komplikationen nach mikrovaskulären Transplantationen

Mikrovaskuläre Transplantationen haben Erfolgsraten von bis zu 95%. Dennoch kommt es immer wieder zu postoperativen Komplikationen (3, 4). Die Komplikationsraten von mikrovaskulären Transplantationen im Kopf-Hals-Bereich liegen bei 10 bis 24%, wobei komplette Transplantatverluste selten vorkommen (5-8%) (39, 43, 56).

Vaskuläre (insbesondere venöse) Thrombosen im Bereich des Transplantats sind der Hauptgrund für totale oder partielle Transplantatverluste (3, 57). Arterielle thrombotische Komplikationen können erkannt werden durch Temperatur-, Spannungs- und Durchblutungsverlust (bleiche Haut) des Transplantats. Venöse thrombotische Geschehen bewirken dagegen eine Stauung der Blutversorgung im Transplantat, die mit Ödemen, Petechien und weitergehend einer Vergrößerung und Zyanose des Gewebes einhergehen können (56). Weitere Transplantatkomplikationen können Nachblutungen, Hämatome oder Fistelgänge sein, die durch Stauungen der Speichelgänge oder Nahtabszesse entstehen können (4, 39, 56).

Da es sich bei Operationen im Oropharynx um sogenannte „sauber-kontaminierte“ Operationsfelder handelt (58), ist das relative Risiko für postoperative Wundinfektionen 6,4-fach erhöht (59). In der Literatur wurden postoperative Infektionsraten nach Rekonstruktionen im Kopf-Hals-Bereich von 13,3%- 40,6% beschrieben (2, 18, 60–62). Postoperative Infektionen im kieferchirurgischen Bereich schienen insbesondere nach Tumoroperationen relevant zu sein. Bartella et al. untersuchten in ihrer Studie Patienten, die sich aufgrund von unterschiedlichen Primär Diagnosen (Frakturen, Tumoren, orthognatischer Chirurgie, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten und Zysten) kieferchirurgischen Operationen unterzogen. Auffällig war, dass die Patienten, die sich einer Tumoroperation unterzogen, in Bezug auf die Entstehung postoperativer Wundinfektionen deutlich überrepräsentiert waren gegenüber Patienten mit anderen Primär Diagnosen. Insgesamt entwickelten nur 16 der untersuchten 901 Patienten eine postoperative Infektion, davon fielen jedoch 15 auf die tumoroperierten Patienten (28). Zur Vorbeugung von Infektionen durch Mundhöhlenkeime und aufgrund der

langen Operationszeit wird perioperativ eine breit angelegte antibiotische Prophylaxe gemeinhin als sinnvoll angesehen (51). Auch Wunddehiszenzen (ein Aufklaffen der Wundränder), die neben anderen Ursachen auch mit Wundinfektionen im Zusammenhang stehen können (63), sind regelmäßig auftretende Komplikationen nach mikrovaskulären Transplantationen, die laut Bianchi et al. bzw. Pohlenz et al. zwischen 14 und 29% der Transplantatkomplikationen ausmachten (7, 39).

Zudem sind Komplikationen der Donorregion möglich. Laut Chen et. al gaben 82% der Patienten nach Radialstransplantation vorübergehende Sensibilitätsstörungen im Bereich der Donorregion an. Weitere mögliche Komplikationen sind Schmerzen, Wunddehiszenzen, Nekrosen oder intraoperative Sehnenfreilegung, welche die Morbidität nach Radialstransplantationen erhöhte (39, 43, 56). Systemische Komplikationen der Operation reichten von Atembeschwerden, hypertensiven Krisen, Pneumonien bis zum Tod (39).

1.3 Mikrobielle Besiedlung im Operationsgebiet

Mikrovaskuläre Transplantationen finden simultan an zwei unterschiedlichen Operationsgebieten statt: Einerseits liegt ein OP-Gebiet im dermalen Bereich vor (Donorregion), andererseits eines im intraoralen Bereich (Empfängerregion).

Das dermale und das orale Mikrobiom unterscheiden sich grundlegend voneinander. Folgendes Kapitel gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Mikrobiome.

1.3.1 Orales Mikrobiom

Das Mikrobiom der menschlichen Mundhöhle beinhaltet eine große Diversität an über 700 verschiedenen bakteriellen Spezies, Pilzen, Viren, Archaeen, Protozoen und anderen Mikroorganismen. Humaner Speichel enthält 10^8 Organismen pro Milliliter (14, 64–66).

Die residente bakterielle Mundflora ist durch einige klassische Vertreter gekennzeichnet: Typische aerobe Spezies sind apathogene Vertreter der Gattung *Neisseria*, die regelmäßig in der gesunden Mundhöhle vorkommen. Fakultativ anaerobe Vertreter sind vergrünende Streptokokken der Viridansgruppe, koagulasenegative Staphylokokken, Vertreter der Gattung *Gemella* (65) und Corynebakterien. Als strikte Anaerobier können Vertreter der Gattung *Veillonella* (65), *Fusobacterium* und *Peptostreptococcus*, Vertreter der *Bacteroidaceae* oder mikroaerophile Streptokokken Teil der residenten Mundflora sein (67). In geringer Zahl finden sich auch Vertreter der transienten Mundflora. Zu diesen zählen Mikrokokken, Vertreter der *Enterobacteriaceae* oder β -hämolyisierende Streptokokken (67).

Das orale Mikrobiom wird durch zahlreiche Wirtsfaktoren, wie Alter, Ernährungsweise, Tabakkonsum, Mundhygiene, Antibiotikagaben oder Impfungen, beeinflusst (12). Zudem

zeigte sich die Zusammensetzung der bakteriellen Besiedlung stark lokalisationsabhängig: Da sich verschiedene Spezies aufgrund spezifischer Adhäsion-Rezeptor-Bindungen bevorzugt auf bestimmten oralen Oberflächen ansiedeln, variieren die kolonisierenden Keimgemeinschaften auf den verschiedenen Habitaten der Mundhöhle stark (14, 65). Spezies, die laut Aas et al. ubiquitär im Mund- und Rachenraum nachgewiesen wurden, gehörten zu den Genera *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* und *Veillonella* (65). Auf Zunge und Wangenschleimhaut waren laut Ryan et al. *Streptococcus spp.* aufgrund ihrer spezifischen Adhärenz prädominant. Auch gramnegative Diplokokken wie *Neisseria* und *Moraxella* wurden häufig isoliert (66). Im Speichel und auf dem Zungenrücken fanden sich bevorzugt *Veillonella parvula* und *Prevotella melaninogenica*, wobei *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* signifikant seltener nachzuweisen waren (68). In supra- und subgingivaler Plaque konnten höhere Konzentrationen an *Actinomyces spp.* nachgewiesen werden als in den restlichen intraoralen Arealen (68). Strikte Anaerobier und mikroaerophile Organismen der Mundhöhle besiedelten insbesondere die Nischen der Zahnfleischtaschen sowie die Tiefen der tonsillären Krypten (67). Obwohl strikte Anaerobier in geringem Maße auch als Teil der gesunden Mundflora nachgewiesen wurden, sind sie stark mit der Entstehung von Karies und parodontalen Erkrankungen assoziiert (66).

Einige Bakterien sind in der Lage, sich positiv auf die Mundgesundheit auszuwirken und pathogene Erreger durch Konkurrenz um Platzangebot und Nährstoffe zu verdrängen. So waren laut Jäsberg et al. und Miyoshi et al. *Gemella haemolysans* und Bifidobakterien in der Lage, den parodontalen Keim *Porphyromonas gingivalis* in seinem Wachstum zu hemmen (69, 70). *S. mitis* wirkte sich antiinflammatorisch auf das intraorale Gewebe aus, indem der Keim die IL-10- und PGE2-Sekretion steigerte, was die Immunreaktion von neutrophilen Granulozyten hemmte (71).

Gerät das Mikrobiom der Mundhöhle aus dem Gleichgewicht, so kann dies im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen wie Karies, Parodontitis, Pilzkrankungen, Tumorerkrankungen oder Bakteriämien stehen (12, 72). So können beispielsweise Streptokokken der Viridans-Gruppe, die physiologisch in der Mundhöhle vorkommen, nach Trauma oder Verletzung in die Blutbahn gelangen, die Herzklappen besiedeln und eine Endokarditis auslösen (66).

1.3.2 Dermales Mikrobiom

Wie die Mundflora variiert auch die Hautflora stark von Habitat zu Habitat: Generell werden in dauerhaft feuchten Arealen (z. B. Axel- oder Leistengegend) oder in öligen Arealen (z. B. Stirn, Hals oder Brust) eine größere Anzahl und Variabilität an Mikroorganismen gefunden als in dauerhaft trockenen Hautarealen. Neben der verschiedenen Lokalisation spielen

auch Alter und Geschlecht eine Rolle: Ältere Menschen zeigten durchschnittlich höhere Gesamtbakterienlasten als junge Menschen, und Männer höhere als Frauen (73).

Die äußere Haut beherbergt als residente Flora ca. 1000 Keime pro cm². Typische Vertreter der aeroben Hautflora sind laut Groß et al. und Christensen et al. apathogene Mykobakterien, welche insbesondere in Arealen der vermehrten Schweiß- und Talkproduktion zu finden sind. Fakultativ anaerobe Vertreter sind koagulasenegative Staphylokokken und Mikrokokken, sowie apathogene Corynebakterien. Als strikte Anaerobier können Propionibakterien, Clostridien und *Bacterioides spp.* vorkommen (67, 74).

Als häufigster Vertreter der gesunden Hautflora wurde *Staphylococcus epidermidis* beschrieben, welcher laut Cogen et al. über 90% der dermalen Flora ausmacht (75). Der Keim war laut Christensen et al. in der Lage, das Wachstum potenzieller Pathogene wie *S. aureus* und koagulasenegativer Staphylokokken, welche in Infektionsprozesse involviert sein können, durch antimikrobielle Substanzen zu hemmen (74). Ein weiterer Keim, welcher regelmäßig als Teil der gesunden Hautflora beschrieben wurde und zugleich zum Gleichgewicht der Normalflora beiträgt, ist *Cutibacterium acnes*. Der Keim wurde insbesondere an Haarfollikeln, Talgdrüsen, sowie im Gesichts- und Thoraxbereich nachgewiesen und zeigte sich in der Lage, freie Fettsäuren zu produzieren, welche wiederum antibakteriell gegen potenzielle Pathogene wie *Streptococcus pyogenes* oder *S. aureus* wirkten. So wurde *C. acnes* als ein limitierender Faktor für die Kolonisierung der Haut und Schutz vor Überbesiedlung identifiziert. Trotz dieser Eigenschaften wurde *C. acnes* aber auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen beschrieben: So wurde er bei gestörter Talgproduktion, wie sie beispielsweise durch hormonelle, nahrungsmittelbedingte oder erbliche Komponenten entstehen können, als Auslöser von Akne identifiziert (67, 74).

1.3.3 Orales Mikrobiom bei postoperativen Infektionen

Das Mikrobiom nicht-odontogener Infektionen wurde im MKG-Bereich, verglichen mit odontogenen Infektionen, bislang deutlich seltener untersucht (76). Das Erregerspektrum bei postoperativen Infektionen im Kopf-Hals-Bereich zeigte prinzipiell polymikrobielle aerob-anaerobe, sowie grampositive und gramnegative Erregergemische (77, 78), wobei laut einiger Autoren eine Dominanz an aeroben (18, 78) und gramnegativen Erregern vorlag (19). In der Literatur häufig genannte Erreger waren unter anderen *S. aureus* (18, 19, 28, 61, 77, 78), *P. aeruginosa* (18, 19, 61, 61, 78, 79), *E. faecalis* (28, 61, 78) und *A. baumannii* (19, 78, 79). Als Vertreter der *Enterobacteriaceae* (78) wurden oftmals *Klebsiella spp.* (18, 19), *E. coli* (18, 19, 28, 77) und *Enterobacter spp.* (18, 19, 61) beschrieben. Vertreter von Anaerobiern, oftmals *Prevotella spp.*, wurden in 15-19% der Wundinfektionen isoliert (19, 77, 80).

Obwohl laut gängiger Literatur die typischen Erreger nicht-odontogener intraoraler Infektionen zumeist nicht Bestandteil der üblichen residenten Mundflora waren (18, 19), wurden in einigen Studien auch Streptokokken der Viridans-Gruppe (wie *Streptococcus anginosus*) (61, 78, 80, 80, 81), sowie gelegentlich beta-hämolyisierende Streptokokken (18) oder Koagulase-negative Staphylokokken (77) genannt. Bei Yang et al. wurden Viridans-Streptokokken sogar am häufigsten aus Wundkulturen postoperativer Infektionen im Kopf-Hals-Bereich isoliert (79).

1.4 Steckbriefe ausgewählter Mikroorganismen

Im Rahmen der hiesigen Studie wurden exemplarisch sowohl Vertreter der gesunden Mundflora als auch infektionsrelevante Keime untersucht. *Streptococcus mitis* wurde als typischer Vertreter der gesunden Mundflora ausgewählt. *Mycoplasma salivarium* gilt gemeinhin als Kommensale der Mundflora, wobei laut einigen Autoren auch eine Rolle in Infektionsprozessen beschrieben wurde. *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* und die *Enterobacteriaceae* wurden als infektionsrelevante Keime ausgewählt, die häufig mit postoperativen Infektionen im kieferchirurgischen Bereich assoziiert sind (siehe 1.3.3). Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Infektionserreger wurde auf Basis der einschlägigen Literatur getroffen (19, 28, 77–82).

1.4.1 *Streptococcus mitis*

Streptococcus mitis gehört als Vertreter der Viridans-Gruppe zu den alpha-hämolyisierenden Kettenkokken, welche durch Umsetzung von Hämoglobin in Methämoglobin mittels Wasserstoffperoxid eine Vergrünung des Blutagars hervorrufen (66, 83). Die Spezies gilt als klassischer Vertreter der gesunden Mundflora, der auch im Respirations- und Gastrointestinaltrakt nachweisbar ist (84).

In der hiesigen Studie wurde *S. mitis* als Vertreter der gesunden Mundflora ausgewählt, da er stark mit einer gesunden Mundflora assoziiert ist und überdies in der Lage ist, sich positiv auf die Mundgesundheit auszuwirken. Eberhard et al. zeigten, dass die Inkubation von gingivalen epithelialen Zellen mit *S. mitis* zur Expression des humanen β -Defensins 2 führte, einem antimikrobiellen Peptid, das orale Pathogene abtöten kann (85). Laut Teughels et al. war die Spezies in der Lage, die Kolonisation des pathogenen *Aggregatobacter acinomycescomitans* zu hemmen, der für die Entstehung parodontaler Erkrankungen verantwortlich sein kann (86). Die Arbeitsgruppen Sliepen et al. bzw. Engen et al. beschrieben zudem antiinflammatorische Wirkungen durch *S. mitis* auf das umliegende Gewebe, was mit einem Schutz vor durch Parodontalerkrankungen ausgelöster Gewebeerstörung einhergeht: Durch Hemmung der IL-8-Sekretion (87), sowie Steigerung der IL10- und

PGE2-Sekretion wurden neutrophile Granulozyten in deren Immunreaktion gehemmt. So wurden weniger Proteasen sezerniert und die dadurch bedingte indirekte Schädigung des Parodonts fiel geringer aus (71).

Überdies zeigten mehrere Studien, dass *S. mitis* in dysbiotischen Zuständen und im Zusammenhang mit Erkrankungen in der Mundhöhle reduziert wurde: So beschrieben Groß et al. eine signifikante Abnahme von *S. mitis* bei fortschreitender Karies (88). Die Arbeitsgruppen Decsi et al. und Amer et al. zeigten, dass die relativen Anteile des Keims auf der Oberfläche von oralen Tumorstufen und Leukoplakien signifikant reduziert waren im Vergleich zur gesunden Schleimhaut (89, 90). Es wurden auch signifikante Reduzierungen von *S. mitis* im Speichelmikrobiom bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsentumoren gezeigt (91). Verlust oder Reduktion der *S. mitis*-Last in der Mundflora wurden daher in der vorliegenden Studie als Hinweis auf eine Dysbiose gewertet.

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind fakultativ anaerobe, grampositive Kokken, die sich traubenförmig anordnen können (92). *Staphylococcus aureus* ist fakultativ pathogen. Der Keim ist bei 20-50% der gesunden Bevölkerung nachweisbar und präsentiert sich zumeist asymptomatisch (75, 93). Der Hautkeim besiedelt bevorzugt Rachen, anterioren Nasenbereich sowie Axelhöhlen und Perineum (93). Die Spezies ist ein häufiger Auslöser von Wundinfektionen und machte laut Parlet et al. bis zu 76% der Haut- und Weichteilinfektionen aus (93). *S. aureus* wurde in der Literatur regelmäßig im Zusammenhang mit postoperativen Infektionen im Kopf-Hals-Bereich genannt (18, 19, 28, 61, 77). Der Keim machte zwischen 11 und 28% der postoperativen Weichteilinfektionen im kieferchirurgischen Bereich aus (19, 61, 77). Auch der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurde in diesem Zusammenhang häufig genannt (18, 61). *S. aureus* ist in der Lage, im Blutstrom zu überleben, wobei intravaskuläre Infektionen häufig mit lebensgefährlicher Schädigung der Herzklappen, thromboembolischen Komplikationen und Sepsen einhergehen (94).

1.4.3 *Enterococcus faecalis*

Enterokokken sind eine Gattung grampositiver, fakultativ anaerober Bakterien, welche sich kettenförmig anordnen. Medizinisch relevante Spezies sind *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (95). *E. faecalis* ist fakultativ pathogen und wird regelmäßig in der Darmflora nachgewiesen (96). Laut Dworkin et al. kamen gelegentlich (bei unter 20% der Bevölkerung) auch oropharyngeale oder vaginale Nachweise vor (97). Pathologische Entgleisungen durch *E. faecalis* können aus der endogenen Normalflora entstehen, doch auch Infektionen im nosokomialen Umfeld durch mangelnde Hygiene und Schmierinfektionen

(insbesondere bei immunsupprimierten Patienten) sind möglich (95, 97, 98). Die Isolation von *E. faecalis* aus infizierten Operationswunden im kieferchirurgischen Bereich wurde in der Literatur beschrieben (28, 61, 78). Enterokokken, darunter zu 90% *E. faecalis*, wurden laut Gattermann et al. regelmäßig aus Operationswunden isoliert, jedoch zumeist als Teil von Mischinfektionen (95). Der Keim machte laut zwei Studien 19 bis 21% der kultivierten Pathogene aus, die aus postoperativen Infektionen im kieferchirurgischen Bereich isoliert wurden. (28, 79) Im intensivmedizinischen Bereich erfolgten aufgrund von Selektion durch Cephalosporine und Aminoglykoside gehäufte Nachweise. Doch insbesondere Vancomycin-resistente Enterokokkenstämme (VRE) stellen das Gesundheitssystem in den letzten Jahren vor Herausforderungen und erforderten oftmals eine Behandlung nach Antibiotogramm (95).

1.4.4 *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae beschreibt eine große und diverse Bakterienfamilie fakultativ anaerob, gramnegativer Stäbchen (99, 100). Die Familie umfasst eine Vielzahl an Pathogenen und Opportunisten, deren Zellstrukturen typisch für gramnegative Bakterien sind. Sie besitzen eine innere und äußere Membran, wobei Lipopolysaccharide wichtige Bestandteile der äußeren Membran sind (101–103). *Enterobacteriaceae* können eine Polysaccharid-Kapsel, Flagellen, Oberflächenpili oder Fimbrien zur Adhäsion an die Wirtszelle besitzen. Einige *Enterobacteriaceae* produzieren Exotoxine, welche durch Schädigung der Membran, Inhibition der Proteinsynthese oder Beeinträchtigung des Stoffwechsels Wirtszellen angreifen können (100, 104). Anhand verschiedener antigener Komponenten können unterschiedliche Gattungen differenziert werden. Wichtige Genera sind *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* und *Shigella* (100).

Oral und oropharyngeal sind Vertreter der *Enterobacteriaceae* gelegentlich nachweisbar (105) und wurden häufig im Zusammenhang mit intraoralen postoperativen Wundinfektionen genannt (18, 19, 78, 82). Laut Belusic-Gobic et al. wurden aus 62% der Wundinfektionen nach oralen Tumorexzisionen *Enterobacteriaceae* isoliert (78). Durand et al. isolierten unter anderen *E. coli*, *Klebsiella spp.* und *Enterobacter spp.* aus Wundinfektionen nach mikrovaskulären Transplantationen (81). *E. coli* wurde in einer Studie von Penel et al. bei 26% der Patienten mit Wundinfektionen nach oropharyngealer Tumorexzision isoliert (77) und bei Bartella et al. in 21% der Wundinfektionen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen (28). Die Suszeptibilität der *Enterobacteriaceae* gegenüber Antibiotika variiert stark innerhalb der Gruppe und immer häufiger treten Resistenzen auf. Als besonders problematisch werden *Enterobacteriaceae* mit einer *Extended-Spectrum-Betalactamase* (ESBL) angesehen, welche das Gesundheitssystem vor Herausforderungen stellen (106, 107).

1.4.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein aerobes, motiles, gramnegatives Stäbchen, welches sich durch die positive Oxidase-Reaktion von den *Enterobacteriaceae* unterscheidet. Strukturell zeichnet sich der Keim durch den typischen Aufbau eines gramnegativen Erregers aus. Obwohl es große Ähnlichkeiten zwischen den Oberflächenstrukturen von *P. aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* gibt, ist die äußere Membran von *P. aeruginosa* deutlich weniger permeabel für Substanzen wie Antibiotika und antimikrobielle Agentien, weshalb der Keim breite Resistenzen aufweist (100). *P. aeruginosa* wird bei 2 bis 10% der gesunden Bevölkerung im Stuhl und/oder oropharyngeal nachgewiesen. Während er für Gesunde ein eher geringes Risiko darstellt, so birgt er für vorerkrankte oder immunsupprimierte Patienten große Gefahren (75, 100). Im Zusammenhang mit postoperativen Weichteilinfektionen im Kopf-Hals-Bereich wird der Keim als relevant betrachtet. So konnte *P. aeruginosa* laut Eckert et al. bei 19% der postoperativen Weichgewebsinfektionen nach kieferchirurgischen Eingriffen nachgewiesen werden (19, 100). Belusic-Gobic et al. isolierten den Keim sogar aus 46% der Wundinfektionen nach oralen Tumorexzisionen (78). Laut Yang et al. wurde *P. aeruginosa* aus 35% der Wundinfektionen nach Rekonstruktionen mit mikrovaskulären Transplantationen im Kopf-Hals-Bereich isoliert. Zudem beschrieben die Autoren, dass *P. aeruginosa* als einer der wenigen der 42 untersuchten Keime bei postoperativem Nachweis häufig auch präoperativ bereits nachweisbar war. Die Autoren wiesen darauf hin, dass somit für *P. aeruginosa* ein präoperatives Screening sinnvoll sein könnte, um geeignete Präventionsmaßnahmen vor Wundinfektionen bzw. Antibiotikaphylaxen einzuleiten (79)

1.4.6 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii ist ein gramnegatives, Oxidase-negatives, strikt aerobes Bakterium (100, 108, 109). Der Gattungsname *Acinetobacter* rührt von der Beobachtung her, dass die meisten Vertreter der Gattung, wie auch *A. baumannii*, keine Flagellen besitzen, weshalb sie als *akinetisch*, also unbeweglich, gelten (109). Wie andere gramnegative Erreger exprimiert auch *A. baumannii* Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche, welche für toxische Effekte verantwortlich sind und es ermöglichen, der Wirtsabwehr zu entgehen (108). Im Zusammenhang mit postoperativen Infektionen im kieferchirurgischen Bereich wurde *A. baumannii* regelmäßig beschrieben (19, 78, 79). Laut Yang et al. wurde *A. baumannii* aus 35% der Wundinfektionen nach mikrovaskulären Transplantationen im Kopf-Hals-Bereich isoliert und war somit einer der drei häufigsten nachgewiesenen Erreger (79). Andere Autoren detektierten den Keim bei 4% bzw. 10% der postoperativen Infektionen nach kieferchirurgischen Eingriffen (19, 78). Durch zunehmend auftretende Multiresistenzen gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen, Fluorchinolonen und Carbapenemen stehen oftmals nur noch

wenige Substanzen zur Behandlung zur Verfügung. Je nach Ausmaß der Resistenzen werden bei multiresistenten gramnegativen Erregern (MRGN) zwischen 3MRGN (resistent gegen drei der vier genannten Substanzklassen) und 4MRGN (resistent gegen alle vier Substanzklassen) unterschieden. Derartige Infektionen stellen eine Herausforderung im klinischen Alltag dar und stehen mit einer hohen Mortalität in Verbindung (100, 108–110).

1.4.7 *Mycoplasma salivarium*

M. salivarium ist ein bislang wenig erforschtes, zellwandloses Bakterium, das der Klasse der kleinsten sich selbst-replizierenden Tenericutes angehört (111). Der Keim wurde als Teil der oralen Normalflora dentaler Plaques bzw. des gingivalen Sulkus beschrieben. Er wird gemeinhin als Kommensale der Mundflora betrachtet (112–115). *Mycoplasma spp.* wurden 1986 durch Watanabe et al. bei 97% der gesunden Bevölkerung im Speichel nachgewiesen, wobei *M. salivarium* und *M. orale* die häufigsten Vertreter waren (114). *M. salivarium* gilt als schwer kultivierbar, da der Keim sich durch routinemäßig angewandte Kulturmedien bzw. Inkubationszeiten nicht adäquat anzüchten lässt. So blieben Nachweise des Keims jahrzehntelang unter dem Radar. Erst molekulare Nachweisverfahren wie die PCR haben eine verbesserte Detektion ermöglicht, die die Basis für weitergehende Untersuchungen zu seiner Rolle bei pathologischen Prozessen lieferte (112).

M. salivarium wurde als Auslöser eines pleuralen Empyems (112) sowie eines Submasseter-Abszesses (113) identifiziert und war ursächlich für eine Arthritis einer Hypogammaglobulinämie-Patientin (116). Weiterhin wurde *M. salivarium* als Teil einer bakteriellen Mischinfektion aus Hirnabszessen von zwei Patienten isoliert (117). Es wurde eine signifikant höhere Quantität an *M. salivarium* im gingivalen Sulkus von Parodontitispatienten nachgewiesen als in der gesunden Kontrollgruppe (115). Eine Studie aus dem eigenen Hause zeigte eine signifikant erhöhte Last an *M. salivarium* auf Fanconi-Anämie-assoziierten oralen Plattenepithelkarzinomen sowie deren dysbiotischen Vorstufen (118) und es wurde von einer erhöhten Quantität an *M. salivarium* auf der Oberfläche von oralem Lichen Planus berichtet (119), so dass diese Befunde die Untersuchung dieser Spezies im Rahmen der hiesigen Studie begründeten.

1.5 TaqMan-PCR als molekulargenetisches Diagnostikverfahren

Molekulargenetische Diagnostikverfahren bieten weitreichende Vorteile gegenüber konventionellen Kulturverfahren zur Untersuchung der bakteriellen Besiedlung im Mundraum, da die orale Mikroflora in Kulturverfahren nicht vollständig abgebildet werden kann. Zum heutigen Kenntnisstand sind nur etwa 50% der oralen Mikroorganismen kultivierbar (120, 121). Zahlreiche Mikroorganismen der Mundhöhle können auf konventionellen Kulturmedien

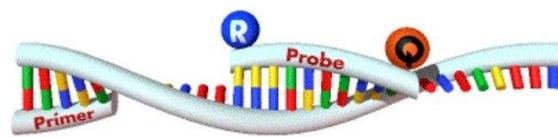
nicht oder nur unter Einsatz von Spezialmedien angezüchtet werden, sodass deren Detektion jahrzehntelang unter dem Radar blieb. Auch der in der hiesigen Studie untersuchte Keim *M. salivarium* ist nur schwierig kultivierbar. Erst molekulare Nachweisverfahren ermöglichten eine verbesserte Diagnostik solcher Spezies (112, 122). Die Verwendung eines molekulargenetischen Nachweisverfahrens bietet zudem eine höhere Sensitivität im Nachweis von obligaten Anaerobiern (123).

Die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), eine 1983 durch Kary B. Mullis entwickelte molekulargenetische Methode (124), ermöglicht *in vitro* die exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Diese Vervielfältigung der gewünschten Genomabschnitte (im hiesigen Falle spezies-spezifische Genombereiche der nachzuweisenden Bakterien) erfolgt in mehreren aufeinander folgenden Zyklen. Die pro Zyklus synthetisierten PCR-Produkte dienen ihrerseits als Matrize im nächsten Zyklus, sodass die Amplifikation annähernd exponentiell verläuft. Die Methode bietet den Vorteil, dass alle benötigten Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt werden können und die Reaktion vollautomatisch in einem sogenannten Thermocycler ablaufen kann.

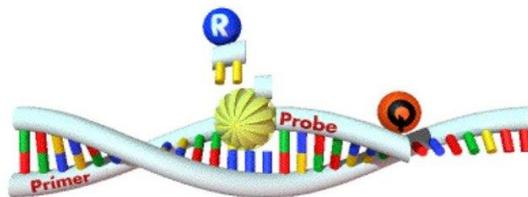
Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: Im ersten Schritt erfolgt die **Denaturierung** (Auftrennung) der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge bei 95°C. Im zweiten Schritt erfolgt das **Annealing**, die Anlagerung spezies-spezifischer Oligodesoxyribonukleotide (Forward- und Reverseprimer) an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge der zu amplifizierenden DNA. Hierfür muss die Temperatur auf eine für die jeweiligen Primer spezifische Temperatur abgesenkt werden. Die Primer werden im dritten Schritt der PCR, der **Elongation**, von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) in 3'-Richtung verlängert. Dieser Schritt erfolgt in der Regel bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase. In einen PCR-Ansatz können entweder einzelne oder auch mehrere Primerpaare eingesetzt werden, sodass die Reaktionen als Monoplex-, Duplex- oder Multiplex-PCR-Ansatz erfolgen können. Nach erfolgter PCR-Reaktion kann sich zur Detektion der PCR-Produkte eine gelelektrophoretische Auftrennung anschließen, um zu überprüfen, ob die erwarteten Fragmentgrößen vorliegen, die den positiven Nachweis der Spezies bedeuten (125).

Die konventionelle PCR mit sich anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte ist eine rein qualitative Analyse. Um den hohen Zeitaufwand dieser Technik zu verkürzen und um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, war man schnell bemüht, einen homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden (126). Dies wurde mit der Real-Time PCR realisiert, bei der die Quantität der amplifizierten Matrizen pro Zyklus in Echtzeit (engl. *Real-Time*) registriert wird (125, 126). In sogenannten TaqMan-PCRs werden neben den Forward- und Reverseprimern fluoreszenz-markierte Sonden eingesetzt,

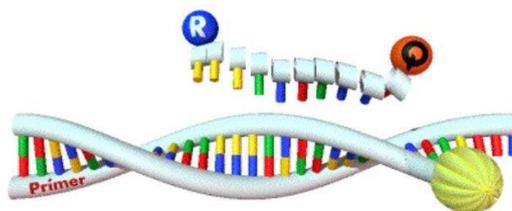
die am 5'-Ende ein Fluorophor (auch *Reporter* genannt) und am 3'-Ende ein *Quencher*-Molekül aufweisen. Die Funktionsweise der Fluorophore beruht darauf, dass sie nach Anregung durch kurzwelligeres Licht (<495nm) höherwelliges Lichts (500–800nm) emittieren. Diese Emissionen können von Detektionseinheiten registriert und ausgewertet werden. *Quencher*-Moleküle sind in räumlicher Nähe zum *Reporter* in der Lage, unspezifische Fluoreszenzsignale auszulöschen. Sie stellen sicher, dass die im Überschuss eingesetzten Real-Time-Sonden nicht permanent, sondern nur nach tatsächlicher Amplifikation des PCR-Fragmentes Fluoreszenzsignale emittieren (125). Abb. 1 demonstriert die Funktionsweise fluorogener Sonden:



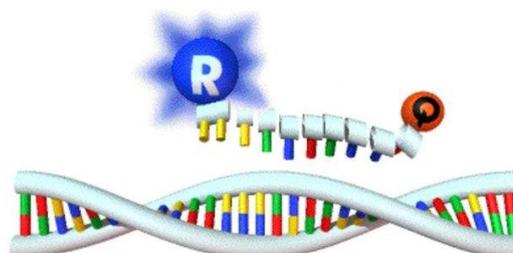
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)



2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

Abb. 1: **Funktionsweise von TaqMan-Sonden** (engl. Probe); Q: Quencher, R: Reporter (Fluorophor); Schild, T. A. (1996) Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. Weiterstadt, Germany: PE Applied Biosystems GmbH; mit freundlicher Genehmigung von Thomas Schild und Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

Das in der Studie genutzte TaqMan-System basiert auf der 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase. Nach Denaturierung der DNA-Matrize und Anlagerung der sequenz-spezifischen Oligonukleotide werden die 3'-Enden des Forward- und Reverseprimers gemäß des gebundenen Gegenstrangs durch die Taq-DNA-Polymerase elongiert, wobei das Enzym auf das gebundene, fluoreszenzmarkierte 5'- Ende der Real-Time-Sonde trifft und diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität degradiert (siehe Abb. 1; 2.). Der *Reporter* wird daraufhin räumlich vom *Quencher* getrennt, weshalb keine Signalauslöschung mehr gewährleistet ist und die spezifische Fluoreszenz des *Reporters* nun bei definierter Wellenlänge gemessen werden kann (siehe Abb. 1; 3 bis 1.4). Die Fluoreszenzsignale steigen so pro Zyklus proportional zur Quantität der amplifizierten Matrizen an (125).

Mittels der Software Bio-Rad CFX Manager, Version 3.1 können die im jeweiligen Zyklus gemessenen Fluoreszenzsignale visualisiert werden:

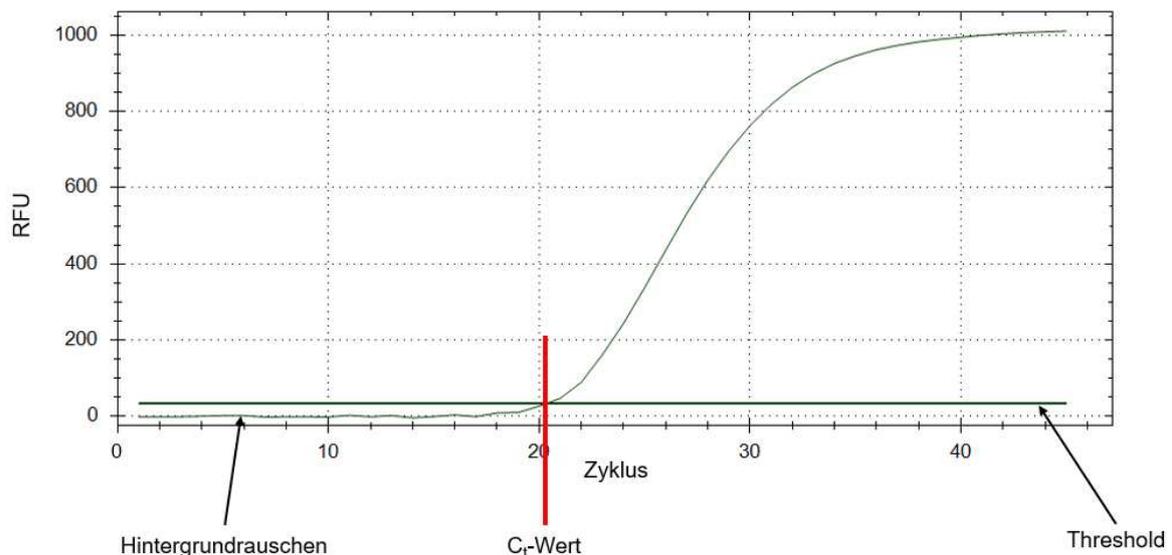


Abb. 2: **Exemplarisch dargestellte Amplifikationskurve** eines positiven Nachweis in der TaqMan-PCR; C_T -Wert = Threshold-Cycle-Wert; RFU = Relative Fluorescence Units

Die Grafik in Abb. 2 zeigt exemplarisch die Amplifikationskurve einer ab dem 20. Zyklus positiven TaqMan-PCR. Der Threshold beschreibt einen Schwellenwert, ab welchem laut Definition erstmals ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals gegenüber des Hintergrundrauschens erkennbar ist. Der C_T -Wert entspricht dem PCR-Zyklus, in dem erstmals Fluoreszenzsignale registriert werden, die den Threshold-Wert überschreiten. Ab diesem Zeitpunkt tritt die Reaktion in die exponentielle Phase ein und gilt als positiv.

Je höher die Kopienzahl der in die TaqMan-PCR eingesetzten Probe ist, desto früher wird der Threshold überschritten und desto kleiner ist dementsprechend der C_T -Wert. Um eine

Quantifizierung der Probe zu ermöglichen, müssen in jeder TaqMan-PCR simultan drei Quantifizierungsstandards in definierter Anzahl des nachzuweisenden Amplikons mitgeführt werden. Da die Kopienzahl der Quantifizierungsstandards bekannt ist, kann anhand deren C_T -Werte die Quantität der Probe errechnet werden (127, 128).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der hiesigen Studie war die Charakterisierung perioperativer Veränderungen der mikrobiellen Besiedlung der Operationsregion bei Patienten nach intraoralen Rekonstruktionen mittels mikrovaskulärer Transplantate zur Defektdeckung. Sieben ausgewählte Markerkeime, welche entweder als Vertreter der normalen Mundflora gelten (*S. mitis* und *M. salivarium*) (71, 85–88, 112–115, 129), oder häufig mit Komplikationen nach intraoralen mikrovaskulären Transplantationen assoziiert wurden (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* und *Enterobacteriaceae*) (19, 28, 77–82), sollten molekulargenetisch qualitativ und quantitativ erfasst werden. Insbesondere die mikrobielle Besiedlung der Operationswunde stand dabei im Fokus, welche vergleichend mit der präoperativen mikrobiellen Kolonisation im Operationsgebiet, sowie der perioperativen Besiedlung auf der kontralateralen Mundseite untersucht werden sollte.

Angestrebt wurden im Einzelnen 1.) die Etablierung eines routinefähigen *Real-Time* qPCR-Sets zum Nachweis der sieben Markerkeime, 2.) die Untersuchung postoperativer Veränderungen der Besiedlung des Operationsgebiets durch die Markerkeime im Vergleich zu präoperativen bzw. kontralateralen Kontrollen und 3.) die Identifizierung von Einflussfaktoren auf die perioperative Keimbesiedlung (z. B. verabreichte Antibiotika, postoperative Mundtrockenheit, Zustand der Mundhygiene und oralen Gesundheit).

Die Erkenntnisse dieser Studie sollten als Grundlage für weiterführende Forschung dienen, um Wundinfektionen oder infektionsbedingte Wunddehiszenzen nach intraoraler mikrovaskulärer Transplantation in Zukunft besser erklären und vermeiden zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

96 Well-Platte mit Deckelstreifen	4titude, Surrey, England
Colorvue Plastic Probe Tips	Hu-Friedy, Frankfurt, Deutschland
eSwab Abstrichtupfer	Hain Lifescience, Nehren, Deutschland
Latexhandschuhe Powder-Free M7-8	Ansell, Richmond, Australien
Safe Lock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TipOne-Pipettenspitzen	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym, Oldendprf, Deutschland
Borsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EDTA	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glucose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Invitrogen destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Magnesiumchlorid	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Primer/ Sonden	Metabion, Planegg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.3 PCR-Mastermixe

2x iQ-Supermix	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Takyon™ No Rox Probe MasterMix UNG	Eurogentec, Seraing, Belgium

2.1.4 Primer und Sonden

Primer und Sonden wurden bei der Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) als Lyophilisat bestellt und im vom Hersteller angegebenen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt, um eine Endkonzentration von 100 µM zu erreichen.

Tabelle 1: Primer- und Sondencharakteristik

PCR	Forwardprimer (F) Reverseprimer (R) Sonde (S)	Sequenz 5' – 3'	Länge des Amplikons	Zielgen	Anzahl Genkopien pro Genom	Literatur
Eubakterien	Euba-for (F)	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	143 bp	16S rDNA	variiert je Spezies	(130)
	Euba-rev (R)	TGCGGGACTTAACCCAACA				
	Euba-S (S)	TexRed-CACGAGCT- GACGACARCCATGCA- BHQ2				
Humane Zellzahl	hgap-F (F)	CCACCCATGGCAAATTCC	69 bp	<i>gapdh</i>	1x	(131)
	hgap-R (R)	ATGGGATTTCCATTGATGACAAG				

	hgap-S (S)	Fam-TGGCACCGTCAAGGCT-GAGAACG				
<i>S. aureus</i>	nuc_for (F)	CAAAGCATCCTAAAAAAGGTGTAG-AGA	89 bp	<i>nuc</i>	1x	(132)
	nuc_rev (R)	TTCAATTTTCTTTGCATTTTCTACCA				
	nuc_S (S)	TTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAG-GACCA				
<i>S. mitis</i>	Smi74F (F)	GAGCTTGCTTCTCCGGATGA	141 bp	16S rDNA	4x	(130)
	Smi214R (R)	AATTGCACCTTTTAAGCAAATGTCA				
	Smi95S (S)	Hex-TTGCGAACGGGTGAG-TAACGCGT-BHQ1				
<i>E. faecalis</i>	Encfis-for (F)	GACAGGAAAGAACTAGGAGGAC	84 bp	<i>ddl</i>	2x	(133)
	Encfis-rev (R)	AAACAGACACATCGTGCT				
	Encfis-S (S)	TexRed-CACT-CTGCCGCCATACAACAA -BHQ2				
Enterobacteriaceae	tuf-for (F)	TGGTCAGGTAAGTGGCTAAGC	78 bp	<i>tuf</i>	2x	(134)
	tuf-rev (R)	TCTTTGGACAGAATGTACTTCA				
	tuf-S (S)	FAM-CCATCAAGCCGCACACCA-AGTTTCG -BHQ1				
<i>P. aeruginosa</i>	Paeru_F (F)	AAC AAG GTC TGG GAA CAG GTC TAC	73 bp	<i>gyr B</i>	1x	(135)
	Paeru_R (R)	CAT CGG TCT CGC CCA CTT C				
	Paeru_S (S)	TedRed-CCA CGG CGT TCC GCA GTT CC-BHQ2				
<i>A. baumannii</i>	Abau_F (F)	CGCTGCAGCATCAAATCATG	97 bp	<i>bap</i>	1x	(136)
	Abau_R (R)	TGGGTCAACCGAGAAAGTTACG				
	Abau_S (S)	HEX-AGCACCTGCTGACACCA-CTCCACCA-BHQ1				
<i>M. salivarium</i>	Msal-F (F)	CCGTCAAATGATTTGATTGC	100 bp	<i>rpoB</i>	1x	(132)
	Msal-R (R)	GAAGTGGCTTGACGTTGCATGTT				
	Msal-S (S)	HEX-ATGATGCTAACCGTGCGCT-TATGGGTG-BHQ1				

2.1.5 Kits

EZ1 DNA Tissue Kit (48)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Puffer und Medien

Bezeichnung des Mediums/ Puffers	Chemikalien*
LB-Amp-Medium	5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 % (w/v) Trypton; 5 % (w/v) Natriumchlorid; 50 µg/ml Ampicillin; pH 7,0
SOC-Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucose; pH 7,0
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	89 mM TRIS; 89 mM Borat; 0,5 mM EDTA; pH 8,0

*Die zugehörigen Chemikalien sind dem Kap. 2.1.2 zu entnehmen.

2.1.7 Bakterienstämme

Die genutzten Bakterienspezies wurden entweder bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Deutschland) bzw. bei der Firma GIBCO Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) bestellt oder stammten aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Tabelle 2: Nachgewiesene Spezies sowie Bezeichnung der Bakterienstämme

Spezies	Name des Stammes/ Isolates
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC B1A767

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	DH5α
Humanzellen (HeLa-S3)	ATCC CCL2.2
<i>Mycoplasma salivarium</i>	ATCC 23064
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC 29934
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456

2.1.8 Klonierungsvektor

Tabelle 3: **Charakteristik des Klonierungsvektors**

Plasmid	Größe (kb)	Resistenzgen	Charakteristika	Hersteller
pGEM-T	3	Ampicillin	LacZ' Gen, SP6- und T7 Promotor, f1-ori	Promega, Madison, WI, USA

2.1.9 Geräte

BioRobot EZ1	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gel Doc XR+	BioRad, Hercules, CA, USA
NanoDrop 1000	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
T-Gradient Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler CFX 96 Touch	BioRad, Hercules, CA, USA
ThermoMixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortex Mixer Labinco L 46	Labinco BV, Breda, Niederlande
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.10 Software

Bio-Rad CFX Manager, Version 3.1	Bio-Rad, Hercules CA, USA
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
G*Power, Version 3.1 2014	Düsseldorf, Deutschland
Geneious, Version 5.5	Biomatters, Inc., Boston, MA, USA
GraphPad Prism. Version 5.01	GraphPad Software, Inc., Boston, MA, USA
NanoDrop 1000, Version 3.8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
rrnDB - the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database, Version 5.8	https://rrndb.umms.med.umich.edu
SPSS Statistics, Version 29.0.1.0	IBM, Chicago, IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie sowie konsiliarisch versorgte Patienten aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf. Voraussetzungen für den Studieneinschluss waren Volljährigkeit, OP-Indikation zur intraoralen Rekonstruktion von Gewebedefekten mittels mikrovaskulärer Transplantation, sowie die Einwilligung des Patienten.

Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Patienten bei Nicht-Einwilligung, sowie Patienten, bei denen bereits eine intraorale Rekonstruktion eines Gewebsdefektes erfolgt war (Zweiteingriff mittels mikrovaskulären Transplantats).

Ein entsprechendes Ethikvotum für die durchgeführte Studie lag seit dem 17.03.2021 mit der Studiennummer 2021-1342 vor. Antragsteller war Prof. Dr. Dr. Majeed Rana, Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.2 Probengewinnung und klinische Datenerhebung

2.2.2.1 Abstrichentnahmen

Die einzelnen Arbeitsschritte unterlagen sterilen Sicherheitsmaßnahmen. Zur Abstrichgewinnung und Indexerhebung wurde stets steriles Instrumentarium genutzt. Es wurde eine klar definierte Abstrichmethode genutzt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Abstrichentnahmen und Untersuchungen wurden nach Möglichkeit nur von der eigenen Person durchgeführt, um den Fehler durch ungleiche subjektive Einschätzungen oder Druckunterschiede auf das Gewebe bei den Messungen bzw. Abstrichentnahmen zu minimieren.

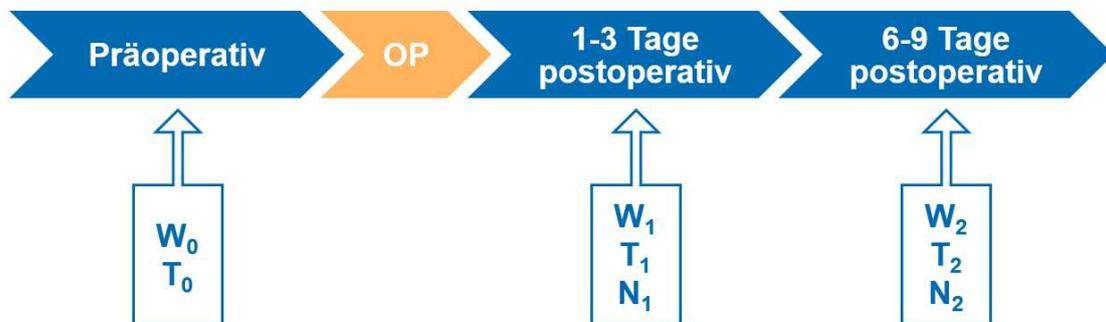


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Abstrichzeitpunkte und Lokalisationen im Zeitverlauf**
Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 von Wange (W); Transplantat (T) und Naht (N)

Die Abstrichentnahmen erfolgten präoperativ, 1-3 Tage postoperativ und 6-9 Tage postoperativ.

- Präoperativ erfolgten Abstriche der Wange (W₀) und der extraoralen Donorregion (T₀).
- 1-3 Tage postoperativ erfolgten Abstriche der Wange (W₁), des Transplantats (T₁) und der intraoralen Naht (N₁).
- 6-9 Tage postoperativ erfolgten erneut Abstriche der Wange (W₂), des Transplantats (T₂) und der intraoralen Naht. (N₂)

Die Wangenabstriche erfolgten stets an der intraoralen Wangenschleimhaut auf der kontralateralen Seite des zu deckenden Defektes. Der präoperative Wangenabstrich (W₀) galt als Referenzprobe.

Die Abstriche erfolgten mit e-Swabs des Herstellers Copan. Die Abstrichtupfer wurden mit leichtem Druck in einem Winkel von etwa 20° am abzustreichenden Gewebe angelegt. Für 15 s wurden auf einem Areal eines Quadratzentimeters leicht rotierende Bewegungen durchgeführt, wobei der Abstrichtupfer zusätzlich um die Längsachse rotiert wurde.

Im Verlauf der Studie wurde die Abstrichmethodik für präoperative (extraorale) Transplantatabstriche angepasst: Durch Benetzung des Tupfers vor Durchführung des Abstrichs in steriler NaCl-Lösung 0,9% (w/v) zeigte sich eine verbesserte Materialentnahme der Hautflora (siehe 3.1.5).

2.2.2.2 Klinische Datenerhebung

Zeitgleich zu den perioperativen Abstrichentnahmen erfolgten klinische Untersuchungen und Indexerhebungen, um Daten über patientenspezifische Faktoren, Mundhygiene, intra-orale Gesundheit sowie Trockenheit der Schleimhäute zu erhalten. Ziel dabei war es, Einflüsse der jeweiligen Faktoren auf die mikrobielle Besiedlung im Operationsgebiet zu ermitteln.

Die Indizes zur Plaquekontrolle und gingivaler bzw. parodontaler Gesundheit wurden selektiv an definierten Messpunkten erhoben. Als Messpunkte wurden die Zähne 16, 21, 24, 36, 41 und 44 ausgewählt. Bei Fehlen des entsprechenden Zahns, wurde der nächstliegende mesiale Zahn im entsprechenden Sextanten untersucht. Bei Fehlen aller Zähne im entsprechenden Sextanten, wurde der Sextant ausgelassen. Im 1. und 3. Quadranten erfolgte die Erhebung oral, im 2. und 4. Quadranten vestibulär.

Plaquekontrolle

Es wurde die Belagsakkumulation in Gingivanähe mittels modifizierter Form des Plaqueindex nach Silness/ Loe (137) erfasst:

Tabelle 4: Interpretation des Plaqueindexes

Wert	Ausprägung der Plaque
0	Keine Plaque
1	Hauchdünner Bakterienbelag, nur durch Schaben mit Sonde erkennbar
2	Mäßige Plaque, mit bloßem Auge gut sichtbar, Interdentalräume nicht ausgefüllt
3	Dicke Zahnbeläge, auch auf Zahnkrone übergreifend, Interdentalraum mit Belag ausgefüllt

Der Plaqueindex entsprach der Summe der Werte pro Anzahl der untersuchten Messpunkte.

Gingivale Gesundheit

Es wurde eine modifizierte Form des Papillenblutungsindex nach Saxer und Mühlemann (138) genutzt. Mit einer stumpfen Sonde wurde mit wenig Druck entlang der mesialen und distalen Sulki der oben genannten Zähne von der Papillenbasis zur -spitze sondiert.

Tabelle 5: Interpretation des Gingivaindexes

Wert	Ausprägung der Blutung
0	Keine Blutung
1	Auftreten eines Blutungspunkts
2	Auftreten verschiedener isolierter Blutungspunkte oder eines einzelnen kleinen Blutflecks
3	Das interdentale Dreieck füllt sich kurz nach der Sondierung mit Blut
4	Profuse Blutung beim Sondieren, Blut fließt sofort in den marginalen Sulkus

Der Gingivaindex entsprach der Summe der Werte pro Anzahl der untersuchten Messpunkte.

Parodontale Gesundheit

Der in der Studie genutzte Index entsprach einer modifizierten Form des Parodontalen Screening (PA-) Indexes (139). Zur Indexerhebung wurde eine WHO-Sonde genutzt (siehe Abb. 4), welche distal in den Sulkus der untersuchten Zähne eingeführt und mit leichtem Druck nach mesial um den Zahn geführt wurde.



Abb. 4: WHO-Sonde zur Erhebung des PA-Indexes

Tabelle 6: Interpretation des PA-Indexes

Wert	Parodontaler Befund
0	Das breite schwarze Band der Sonde bleibt an der tiefsten Stelle des Sulkus vollständig sichtbar. Kein Zahnstein oder defekte Restaurationsränder. Keine Blutung vorhanden.
1	Das breite schwarze Band der Sonde bleibt an der tiefsten Stelle des Sulkus vollständig sichtbar. Kein Zahnstein oder defekte Restaurationsränder. Nach (vorsichtigem) Sondieren tritt eine Blutung auf.
2	Das breite schwarze Band der Sonde bleibt vollständig sichtbar. Es sind Zahnstein und/oder defekte Restaurationsränder vorhanden.
3	Das breite schwarze Band der Sonde bleibt an der tiefsten Stelle des Sulkus nur teilweise sichtbar.
4	Das breite schwarze Band der Sonde verschwindet vollständig in der Tasche.

Der PA-Index entsprach der Summe der Werte pro Anzahl der untersuchten Messpunkte.

Erfassung der Mundtrockenheit

Mittels eigens entwickeltem Xerostomie-Index wurde die Mundtrockenheit der Studienteilnehmer systematisch erfasst.

Die Beurteilung der Schleimhaut erfolgte im Referenzbereich (Wangenschleimhaut kontralateral der Defektseite).

Tabelle 7: Interpretation des Xerostomie-Indexes

Wert	Schleimhautbefund
0	Glänzende, weiche Mucosa
1	Mucosa zeigt sich matt und glanzlos
2	Mucosa zeigt sich matt, glanzlos und rissig

Laborwerte

Es wurden für jeden Patienten präoperativ, 1-3 Tage postoperativ, sowie 6-9 Tage postoperativ die entzündungsspezifischen Laborwerte C-reaktives Protein und Leukozytenzahl miterfasst.

ASA-Score

Für jeden Studienteilnehmer wurde präoperativ der ASA-Score erhoben, ein Scoring-System der American Society of Anesthesiologists, welches Patienten bezüglich ihres körperlichen Gesamtzustands einteilt und so Risikopatienten identifizieren kann. Die aktuelle Einteilung ist in Tabelle 8 zusammengefasst (140):

Tabelle 8: Einteilung des ASA-Scores

ASA-Score	Interpretation
1	Normaler, sonst gesunder Patient
2	Patient mit leichter Allgemeinerkrankung
3	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung
4	Patient mit lebensbedrohlicher Allgemeinerkrankung
5	Moribunder Patient, der ohne die Operation voraussichtlich nicht überleben wird
6	Hirntoter Patient, dessen Organe zur Organspende entnommen werden

Patientenspezifische Faktoren

Es wurden operationsspezifische Daten zur Defektart, Defektlokalisierung und Art des Transplantats sowie perioperative Faktoren zu Körpertemperatur und möglichen Antibiosen erhoben.

Zusätzlich erfolgte die patientenspezifische Erfassung von Alter, Geschlecht, Body Mass Index und Tabakkonsum.

2.2.3 Probenlagerung

Nach Abstrichentnahme wurden die Abstrichtupfer umgehend in die im eSwab-Transportröhrchen enthaltene Amies-Flüssigkeit überführt und bei 4°C aufrecht gelagert. Binnen \leq 10 h erfolgte die weiterführende Aufarbeitung: Die Transportröhrchen wurden für 15 s auf dem Vortex-Schüttler vorbehandelt, um eine gleichmäßige Durchmischung des abgestrichenen Materials im Amies-Mediums zu erreichen. Das resuspendierte Zellmaterial (humane Zellen und Bakterien) wurde anschließend bei 13,000 x *g* für 10 min sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellsediment bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.4 DNA-Präparation

Nach Resuspension des Sediments in 200 μ l G2-Puffer erfolgte die Proteolyse der Zellen nach Supplementierung mit 10 μ l (1 mg/ml) Proteinase K während 30-minütiger Inkubation im Heizblock bei 56°C. Sowohl G2-Puffer als auch Proteinase K entstammten dem EZ1 DNA Tissue Kits (48), QUIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland.

Die freigesetzte DNA wurde mittels Nutzung des BioRobot EZ1 sowie des EZ1 DNA Tissue Kits (48) nach Herstellerangaben (Protokoll „Bact_200 μ l“) aufgereinigt und in einem Gesamtvolumen von 50 μ l eluiert. Anschließend wurde das DNA-Eluat bis zur Amplifikation bei -20°C gelagert.

2.2.5 PCR

2.2.5.1 TaqMan-PCR

Zur Quantifizierung der ausgewählten Keime bzw. der humanen Zellzahl (GAPDH) in den Proben wurden TaqMan-PCRs durchgeführt. Für alle durchgeführten TaqMan-PCRs wurden Geräte vom Typ CFX96 Real Time Systems (BioRad) genutzt.

Die Herstellung der PCR-Mastermixe und deren Verteilung auf die Wells einer 96-Well-

Platte (je 22,5µl/Well) wurden an einem speziell dafür ausgelegten DNA-freien Arbeitsplatz durchgeführt.

Tabelle 9: PCR-Mix für TaqMan-PCRs

Bestandteil	Volumen in der Monoplex-PCR (Endkonzentration)	Volumen in der Duplex-PCR (Endkonzentration)
2x Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
Forwardprimer (100 µM)	0,075 µl (0,3 µM)	Primer 1: 0,075 µl (0,3 µM)
		Primer 2: 0,075 µl (0,3 µM)
Reverseprimer (100 µM)	0,075 µl (0,3 µM)	Primer 1: 0,075 µl (0,3 µM)
		Primer 2: 0,075 µl (0,3 µM)
Sonde (100 µM)	0,05 µl (0,2 µM)	Sonde 1: 0,05 µl (0,2 µM)
		Sonde 2: 0,05 µl (0,2 µM)
Aqua dest.	10 µl	10 µl

Die Zugabe der 2,5 µl DNA-Probe (Patienten-DNA-Eluat / Plasmide oder Suspension einer Kolonie) erfolgte in einem anderen Raum, um eine Kontamination der PCR-Mastermixe und des Arbeitsplatzes zu vermeiden.

Die TaqMan-PCRs liefen unter folgendem Temperaturprofil ab:

Schritt	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	10:00 min	95°C	
Primerbindung (Annealing) + Elongation	0:15 min	95°C	} 45x
	01:00 min	60°C	

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software *BioRad CFX Manager 3.1*.

2.2.5.2 Konventionelle PCR

Für konventionelle PCRs (ohne Sondeneinsatz) wurde der T-Gradient Thermoblock genutzt. Die PCR-Bedingungen deckten sich mit den Bedingungen der TaqMan-PCRs.

Tabelle 10: PCR-Mix für konventionelle PCRs

PCR-Bestandteil	Volumen (Endkonzentration)
2x iQ Supermix	12,5 µl
Forwardprimer (100 µM)	0,25 µl (1 µM)
Reverseprimer (100 µM)	0,25 µl (1 µM)
Aqua dest.	10 µl

Anschließend wurden dem PCR-Mix an einem anderen Arbeitsplatz 2,5 µl der DNA-Probe zugesetzt, um eine Kontamination der PCR-Mastermixe und des Arbeitsplatzes zu vermeiden.

2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten

Zur Herstellung eines 3%igen (w/v) Agarosegels wurden 3 g Agarose in 100 ml 0,5-fachem TBE-Puffer erhitzt, woraufhin das flüssige Gel in die horizontale Gelkammer mit eingefügtem Taschenformer gefüllt wurde. Das erkaltete Agarosegel wurde anschließend vollständig mit 0,5-fachem TBE-Puffer bedeckt. Nach Vermischung von 2,5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des 6x DNA-Loading Dye und Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 6 µl mit destilliertem Wasser wurde die Probe in die Probentasche aufgetragen, worauf folgend die Gelelektrophorese mit einer Stromstärke von 50 mA gestartet wurde.

Der im DNA-Loading Dye enthaltene Farbstoff Bromphenolblau zeigte anhand der Lauffront im Gel an, wie weit die Auftrennung bereits fortgeschritten war. Um eine optimale Visualisierung der Proben zu ermöglichen, sollten die Proben möglichst die Mitte der Laufstrecke erreichen.

Anschließend erfolgte die Färbung des Gels in 0,1% (w/v) Ethidiumbromid-Lösung. Nach 20-minütigem Schütteln und anschließender 20-minütiger Entfärbung der DNA-freien Bereiche im Ethidiumbromid-freien Wasserbad wurden die DNA-Banden mittels Gel Doc XR+ (Bio-Rad) unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

2.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden aus dem PCR-Ansatz mittels des Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es wurden zwei Waschschriffe mittels 700 μl NT3-Puffer durchgeföhrt. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgten die Zentrifugationen bei 13,000 $\times g$ und die Elution der DNA in 20 μL .

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung (PCR-Produkte, genomische DNA oder Plasmide) wurde das NanoDrop 1000 Spektrometer nach Herstellerangaben sowie die zugehörige Software NanoDrop 1000, Version 3.8, unter der Einstellung „Nukleinsäure“ genutzt. Zur Kalibrierung wurde 1 μl des Elutionspuffers des DNeasy Blood & Tissue Kits auf den Probeneller aufgetragen, woraufhin zunächst die Messung des reinen Puffers erfolgte. Nach Entfernung des Puffers vom Probeneller wurden 1 μl der Probe aufgetragen, woraufhin die Konzentrationsbestimmung der Probe erfolgte.

2.2.9 Klonierung eines PCR-Produkt tragenden Plasmids mit anschließender Transformation von *E. coli* DH5 α

Zur Ligation eines PCR-Produktes mittels Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden 25ng 3 kb pGEM-T-Vektors mit der dreifachen Molekülzahl an PCR-Produkt versetzt und auf 3,5 μl mit aqua dest. eingestellt. Der Ligationsansatz wurde mit 5 μl 2x Rapid Ligationspuffer, 2 μl 5x Dilutionspuffer und 0,5 μl Ligase (5U/ μl) komplettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl der kompetenten *E. coli* DH5 α -Bakterien zum Ligationsansatz und schonender Durchmischung erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Auf sich anschließende 90-sekündige Erwärmung im Wasserbad auf 42°C folgte die erneute Inkubation des Transformationsansatzes für 1-2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 μl SOC-Medium erfolgte eine einstündige Inkubation unter Schütteln bei 37°C. 1/10 und 9/10 des Transformationsansatzes wurden anschließend auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Herstellung von Glycerin-Stocks

Die Herstellung von Glycerin-Stocks erfolgte für selektierte, Insert-tragende Klone aus einer (o/n)-Kultur in LB-Amp-Medium. Es wurden 500 μl (o/n)-Kultur auf 50% (v/v) Glycerin eingestellt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.11 Plasmid-Präparation

Nach Anzucht der im Glycerin-Stock gelagerten Plasmid-tragenden *E. coli*-Bakterien in LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C (unter Schütteln) erfolgte aus 4 ml Kultur die Plasmidpräparation. Nach 5-minütiger Zentrifugation von 4ml Bakterien-(o/n)-Kultur bei 14,000 x g erfolgte die Aufarbeitung des Bakteriensediments mittels High Pure Plasmid Isolation Kit nach Herstellerangaben. Die reine Plasmid-DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Plasmidkonzentration gemäß Kap. 2.2.8 bestimmt.

2.2.12 Normalisierung der Rohdaten

Nach Durchführung der TaqMan-PCRs und Sammlung der Rohdaten erfolgte vor jeglicher weiterführender Datenanalyse zunächst (für alle PCRs außer der Eubakterien-PCR) eine Umrechnung der ermittelten Kopienzahlen pro PCR auf die Anzahl der Genomäquivalente (*GE*) pro Probe:

Die Kopienzahlen der Negativkontrollen wurden von den Rohdaten der Proben in der jeweiligen PCR abgezogen. Anschließend wurden die Kopien auf das komplette Probenvolumen von 50 µl DNA-Eluat hochgerechnet, welches dem 20-fachen des in die PCR eingesetzten Volumens entsprach. Um die Anzahl der nachgewiesenen Genomäquivalente pro Probe zu bestimmen, erfolgte eine Division der Kopien pro Probe durch die Anzahl des jeweiligen Gens im Genom (siehe Spalte „Anzahl Genkopien pro Genom“ in Tabelle 1). Die Anzahl der Genkopien pro Genom war mittels BLAST-Analyse ermittelt worden.

$$\frac{GE}{Probe} = \frac{\left(\frac{Kopien}{PCR} - \frac{Kopien}{Negativkontrolle} \right) \times 20}{Kopien\ des\ Gens\ pro\ Genom}$$

Um innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* die Anzahl der *tuf*-Gene pro Genom zu ermitteln, wurden für mehrere zufällig ausgewählte Vertreter der Familie BLAST-Analysen durchgeführt und ein Durchschnittswert gebildet. Da laut Větrovský et al. die Anzahl der zum Nachweis der Eubakterien detektierten 16S rDNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies der Eubakterien stark variiert (1-15 Genkopien pro Genom) (141), war eine Berechnung von Eubakterien-Genomäquivalenten nicht möglich. Es wurde stattdessen zur Datennormalisierung die Kopienzahl der 16S rDNA pro Probe genutzt.

Zu weitergehenden Normalisierungen wurden zusätzlich die im Abstrich enthaltene Gesamtbakterienzahl und Anzahl an abgestrichenen Humanzellen mitbestimmt. Beim humanen GAPDH-Gen (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen) handelt es sich um ein *Housekeeping*-Gen, das in jeder humanen Zelle genau einmal vorkommt (*Single-Copy*-

Gen) und häufig zur Datennormalisierung genutzt wird. Die Quantität der GAPDH-Genomäquivalente pro Probe konnte mit der Anzahl an humanen Zellen pro Probe gleichgesetzt werden (142). Durch Division der jeweiligen Genomäquivalente pro Probe durch die entsprechende ermittelte Gesamtbakterienzahl bzw. humane GAPDH wurden die Ergebnisse normalisiert.

$$\frac{GE \text{ (normalisiert)}}{\text{Probe}} = \frac{GE \text{ pro Probe}}{\text{Gesamtbakterienzahl bzw. humane Zellzahl pro Probe}}$$

Somit lagen pro speziesspezifischer PCR drei normalisierte Werte vor: die Genomäquivalente der jeweiligen Spezies 1.) pro Probe („Roh“), 2.) pro Gesamtbakterienzahl („Normal.Euba“) und 3.) pro humaner GAPDH („Normal.Gap“). Ein Ergebnis wurde im Rahmen der vorliegenden Studie als statistisch signifikant betrachtet, wenn zwei der drei Datensätze statistisch signifikante Ergebnisse lieferten. Die zusätzliche Hürde wurde eingeführt, um eine verbesserte Validität der Ergebnisse sicherzustellen.

2.3 Stichprobenumfang und Statistik

Die mindestens benötigte Stichprobenmenge wurde mittels der Software G*Power 3.1 ermittelt. Als statistischer Test wurde für die Probenberechnung eine Varianzanalyse (ANOVA) für verbundene Stichproben genutzt, da zunächst unklar war, ob eine Normalverteilung der Messwerte vorliegt. Bei einer geschätzten Effektstärke von 0,29, einer Testpower von 95% und einem Signifikanzniveau von 5% ergab sich eine minimale Anzahl von 33 Studienteilnehmern.

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software SPSS in der Version 28.0.0.0 durchgeführt. Die Untersuchungen der bakteriellen Besiedlungen mittels TaqMan-PCR lieferten metrische Variablen. Die Erfassung der Indizes der Mundhygiene, Schleimhauttrockenheit und der intraoralen Gesundheit lieferten ordinalskalierte Variablen. Eine Normalverteilung der Messwerte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft (143). Für die Genomäquivalente pro Probe aller untersuchten Keime lagen nichtparametrische Daten vor. Für die vergleichende Analyse zweier metrischer Messwerte wurde der Wilcoxon-Test angewandt (144). Für die vergleichende Analyse von mehr als zwei metrischen Messwerten wurde der Friedman-Test angewandt (145). Zur Zusammenhangsanalysen ordinalskalierter Indizes mit metrischen Messdaten (mikrobielle Besiedlung) wurde die Spearman-Korrelation genutzt (146). Für die vergleichende Analyse von zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet (146). Für vergleichende Analysen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet (147).

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Methodik

Vor Analyse der Patientenproben war eine Validierung der genutzten PCR-Verfahren notwendig, um die Güte der PCRs und die jeweiligen Sensitivitäten und Spezifitäten zu überprüfen. Die Monoplex-PCRs zum Nachweis von Eubakterien (gesamt), humaner Zellzahl (GAPDH), *S. aureus*, *S. mitis*, *Enterobacteriaceae* und *M. salivarium* waren bereits im Hause etabliert worden und mussten im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch validiert werden. Die TaqMan-PCRs von *E. faecalis*, *A. baumannii* und *P. aeruginosa* mussten zunächst von mir neu etabliert und im Anschluss validiert werden, ob alle durchzuführenden PCRs für die spätere Analyse der Patientenproben unter identischem Temperaturprofil der TaqMan-PCR abliefen. Zur optimalen Ausnutzung der PCR-Platte mit 8x12 Tubes sollten zwei der ausgewählten PCRs gemeinsam in einem Duplex-Ansatz durchgeführt werden, um auf acht PCRs pro Patientenprobe zu kommen. Dieser Duplex-Ansatz wurde im Rahmen der Studie von mir etabliert.

Größtenteils lagen bereits Quantifizierungsstandards für die durchzuführenden PCRs vor; lediglich das Plasmid zum Nachweis von *E. faecalis* musste noch von mir kloniert werden.

3.1.1 Quantifizierungsstandards

Zur Generierung eines klonierungsfähigen *E. faecalis*-Amplikons kam eine konventionelle PCR zur Anwendung (siehe Kap. 2.2.5.2). In die PCR wurde genomische DNA des *E. faecalis* ATCC 29212- Stamms eingesetzt (siehe Kap. 2.1.4 und 2.1.7). Zu Verifizierungszwecken wurde das PCR-Produkte (84 bp) auf einem 3%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb. 5, Spur B). Die Herstellung des Agarosegels bzw. die Bedingungen der Agarose-Gelelektrophorese sind im Kap. 2.2.6 beschrieben. Als Längenstandard wurde der Mass RulerDNA Ladder Mix in der Probenspur A aufgetrennt. Als Nachweis, dass der *E. faecalis*-PCR-Mix frei von *E. faecalis*-DNA gewesen war, wurde die Negativkontrolle der konventionellen PCR - ohne Zusatz von DNA - in Spur C aufgetrennt.

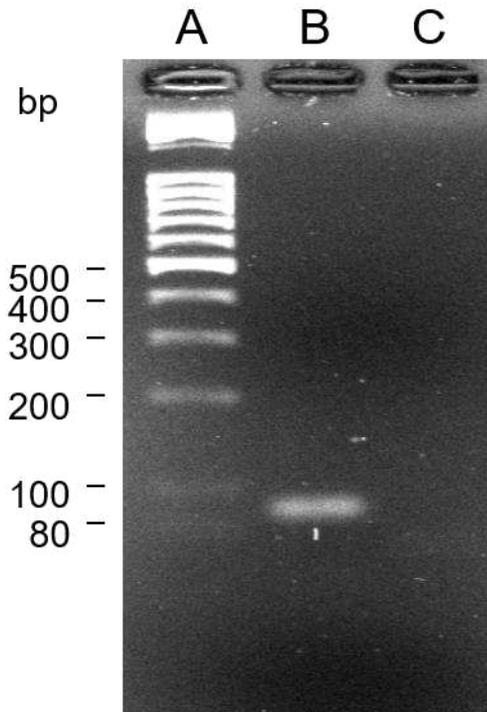


Abb. 5: Gelelektrophoretische Überprüfung des *E. faecalis*-PCR Produktes

Wie zu erwarten, zeigte sich in der *E. faecalis*-DNA-haltigen PCR-Probe (Spur B) eine Bande zwischen 80-100 bp, was der Länge des *E. faecalis*-Amplikons entsprach, wohingegen die Negativkontrolle in Probenspur C lediglich eine sehr schwache Bande < 80 bp aufwies, welche vermutlich den Primer-Dimeren entsprach.

Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt (siehe Kap. 2.2.7) und nach Konzentrationsbestimmung (siehe Kap. 2.2.8) in den Klonierungsvektor pGem-T ligiert (siehe Tabelle 3). Da konventionelle Taq-Polymerasen bei der Amplifikation des Inserts am 3'-Ende einen Adenylrest anhängen, konnte das Insert mittels *sticky ends* in den pGEM-T-Vektor (Promega) inseriert werden, welcher über einen Thymin-Überhang verfügt. Das PCR-Produkt (84 bp) wurde dem pGEM-T-Vektor (3000 bp) im Ligationsansatz in dreifacher Molekülmenge zugesetzt. Der Überschuss an PCR-Produkt wurde gewählt, um ein direktes Schließen des Plasmids ohne Aufnahme des Inserts bestmöglich zu verhindern.

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der sich lediglich durch die fehlende Zugabe der PCR-Produkt und Ausgleich der Volumendifferenz durch destilliertes Wasser vom oben beschriebenen Ansatz unterschied. Zur Transformation (siehe Kap. 2.2.9) wurden kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien verwendet (Transformationsrate $1 \times 10^7 / \mu\text{g}$ Plasmid).

Es wurden 1/10 bzw. 9/10 des Volumens der Positivprobe bzw. Negativkontrolle auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Abb. 6).

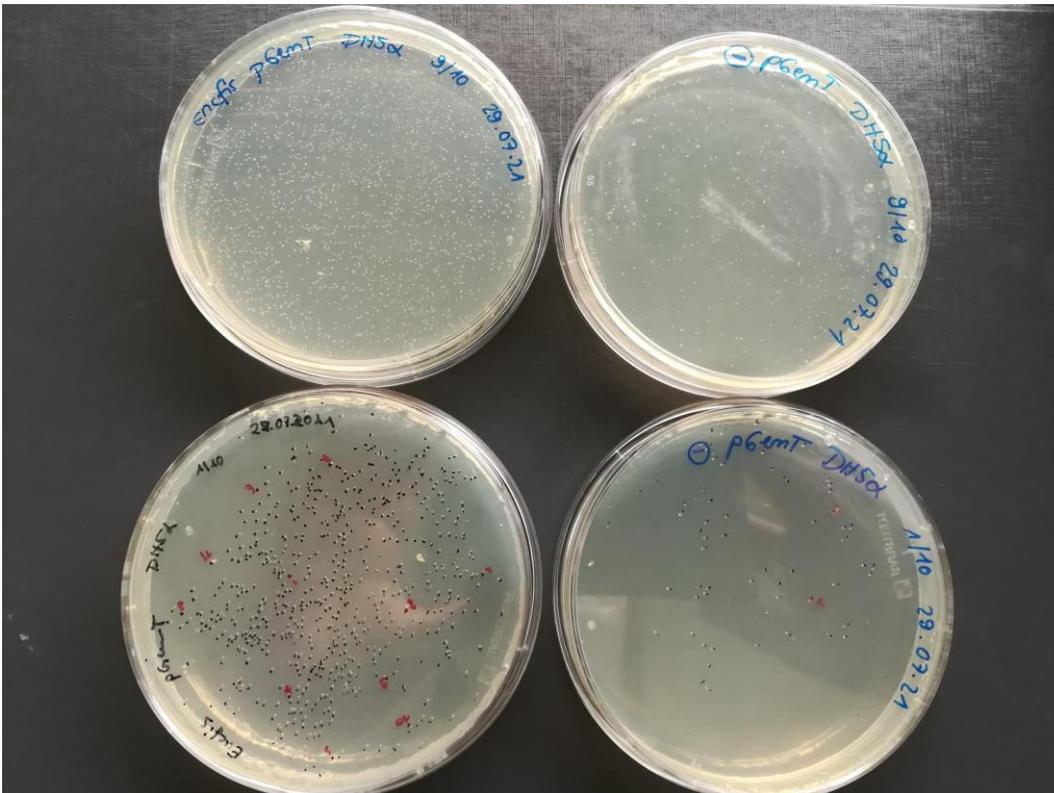


Abb. 6: Ausstrich des *E. faecalis*-Klonierungs-Ansatzes

9/10 des Volumens der Positivprobe (oben links), 1/10 des Volumens der Positivprobe (unten links), 9/10 des Volumens der Negativkontrolle (oben rechts) und 1/10 des Volumens der Negativkontrolle (unten rechts)

Da der pGEM-T Easy Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, war eine Anzucht der Kolonien nur möglich, sofern Plasmide von den kompetenten Bakterien aufgenommen wurden. Wie Abb. 6 zeigt, wuchsen auch einige wenige Kolonien auf Seiten der Negativkontrolle, obwohl hier kein PCR-Produkt zugesetzt worden war. Ursächlich hierfür war vermutlich, dass auch Plasmide aufgenommen werden konnten, die kein Insert trugen und sich lediglich geschlossen hatten. Das Verhältnis von Kolonien auf Seite der Positivprobe zu Kolonien auf Seite der Negativkontrolle betrug circa 10:1 (ca. 600 Kolonien auf Seiten der 1/10 Positivprobe zu ca. 60 Kolonien auf Seiten der 1/10 Negativkontrolle).

Um einzelne Kolonien auf Insert-tragende Plasmide zu kontrollieren, erfolgte eine Überprüfung von elf zufällig ausgewählten Kolonien der Positivprobe mittels *E. faecalis*-Real-Time PCR (für PCR-Bedingungen siehe Kap. 2.2.5.1). Mittels steriler Pipettenspitze wurde Koloniematerial aufgenommen und kurz in den entsprechenden PCR-Mix auf einer Mikrotiterplatte eingetaucht und die anhaftenden Bakterien mittels Spitzendrehung resuspendiert.

Die entsprechenden Pipettenspitzen wurden anschließend nicht verworfen, sondern direkt zwecks Kultivierung in LB-Amp-Medium überführt (siehe unten.)

Zusätzlich zu den PCRs der Kolonien, erfolgten jeweils eine Positivkontrolle (Mastermix mit zugesetztem PCR-Produkt) sowie eine Mastermixkontrolle (reiner Mastermix) und eine Negativkontrolle (Mastermix mit zugesetztem koloniefreiem Material (Picken der Spitze in koloniefreiem Bereich der Platte)).

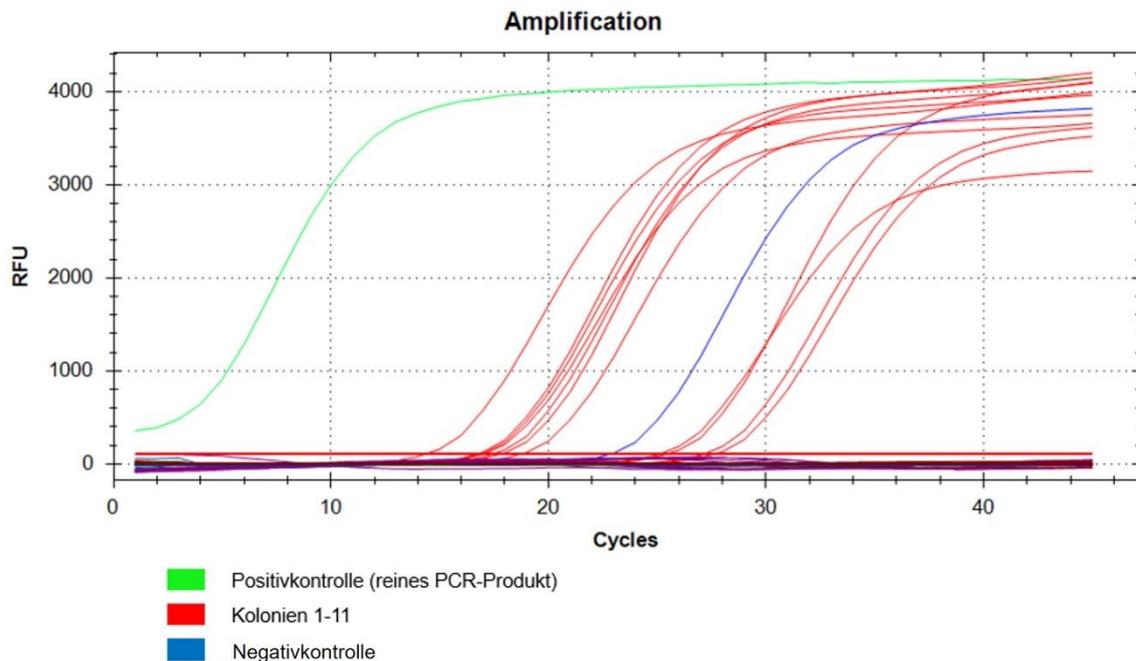


Abb. 7: **Real-Time PCR an Kolonien zum Nachweis Insert-tragende Plasmide**

Die Positivkontrolle zeigte wie erwartet eine frühe Amplifikation in der Real-Time PCR. Auch alle elf ausgewählten Kolonien zeigten Amplifikationen. Die Negativkontrolle mit koloniefreiem Material zeigte eine Amplifikation, welche vermutlich auf frei verfügbares PCR-Produkt auf der Agarplatte zurückzuführen war. Für jene 4 Kolonien, die erst nach der Negativkontrolle eine Amplifikation in der Real-Time-PCR aufwiesen, konnte folglich nicht sicher von einer Aufnahme des Inserts in den pGem-T-Vektor ausgegangen werden. Für jene 7 Kolonien, die bereits in früheren Zyklen als die Negativkontrolle Amplifikationen zeigten, war eine Aufnahme des Inserts anzunehmen. Die durchgeführten Mastermixkontrollen zeigten wie erwartet keine Amplifikationen.

Das mittels Pipettenspitze aufgenommene Koloniematerial, welches einerseits zur oben beschriebenen Überprüfung der Kolonien auf die Aufnahme des Inserts genutzt wurde, wurde weiterführend kultiviert. Zu diesem Zweck wurde die jeweilige Pipettenspitze (mit noch anhaftendem Bakterienmaterial) in 5ml LB-Amp-Medium überführt und die Bakterien

dieser Kolonie o/n bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

Für die Klone 4 und 10 erfolgte aus der entsprechenden o/n-Kultur eine Plasmid-Präparation (siehe Kap. 2.2.11) und die Herstellung eines Glycerin-Stocks (siehe Kap. 2.2.10).

Die Insertsequenz von zwei der präparierten Encfis-Plasmide (Klone 4 und 10) wurden anschließend im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Sanger-sequenziert, um eine Übereinstimmung mit der in der Datenbank abgelegten Genomsequenz von *E. faecalis* ATCC 29212 sicherzustellen.

Beide Klone enthielten die gleiche amplifizierte *E. faecalis*-Region, wie in Abb. 8 exemplarisch für den Klon 10 gezeigt.

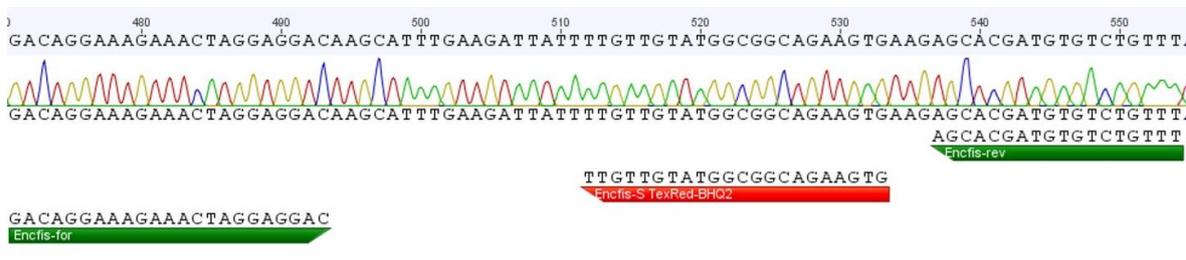


Abb. 8: **Sequenzierungschromatogramm des *E. faecalis*-Klons 10** mit Lokalisation von Forwardprimer (*Encfis-for*), Reverseprimer (*Encfis-rev*) und Sonde (*Encfis-S*)

Die Abb. 8 zeigt das mittels der Software Geneious erstellte Sequenzierungschromatogramm des klonierten *E. faecalis*-Amplikons mit der Position der entsprechenden Forward- und Reverseprimer (in grün) und der Sonde (in rot). Es zeigte sich eine 100% Übereinstimmung der Primer- und Sondensequenzen mit der Sequenz des Klons.

Nachfolgend wurde die Sequenz von Klon 4 mittels BLAST-Analyse verifiziert.

Enterococcus faecalis ATCC 29212, complete genome

Sequence ID: [CP008816.1](#) Length: 2939973 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
156 bits(84)	2e-38	84/84(100%)	0/84(0%)	Plus/Plus
<u>Query</u> 475		GACAGGAAAGAAACTAGGAGGACAAGCATTGGAAGATTATTTGTTGTATGGCGGCAGAA		534
<u>Sbjct</u> 2829068		GACAGGAAAGAAACTAGGAGGACAAGCATTGGAAGATTATTTGTTGTATGGCGGCAGAA		2829127
<u>Query</u> 535		GTGAAGAGCACGATGTGTCTGTTT		558
<u>Sbjct</u> 2829128		GTGAAGAGCACGATGTGTCTGTTT		2829151

Abb. 9: **Paarweises Sequenzalignment des Encfis-Inserts** aus Klon 4 (Query) mit der ncbi-Sequenz von *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Acc.-Nummer CP008816.1)

Es zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung des Inserts mit der ncbi-Sequenz von *E. faecalis*. Der generierte *E. faecalis* - Quantifizierungsstandard konnte somit zur weiterführenden Analysen benutzt werden.

Nach Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA (siehe Kap. 2.2.8) wurden Verdünnungen der Plasmide in 10 mM Tris/ HCl, pH 8,0 hergestellt und als Quantifizierungsplasmide eingesetzt. Die Stocklösung von Quantifizierungsstandards, die in einer Konzentration von 10^9 Kopien Plasmid/ μ l vorlagen, waren dauerhaft bei -20°C eingefroren. Gebrauchslösungen mit Verdünnungen von 10^7 bis 10^{-1} Kopien Plasmid/ μ l wurden bei 4°C gelagert und ihre Gebrauchsfähigkeit bzw. Intaktheit der Plasmide regelmäßig validiert. Bei Degradation der Plasmide, die sich an einer Erhöhung der Ct-Werte ablesen ließ, wurden die Gebrauchslösungen der Quantifizierungsstandards aus der 10^9 -Stocklösung neu verdünnt.

3.1.2 PCR-Linearitätsbestimmung

Qualitätskriterien einer Real-Time PCR sind der E-Wert, der die Effizienz der qPCR beschreibt, sowie der R^2 -Wert, der das Bestimmtheitsmaß angibt. Diese Werte wurden vor Beginn der Analyse der Patientenproben für jedes der genutzten TaqMan-PCR-Verfahren bestimmt.

Die Effizienz E einer Real-Time PCR kann festgestellt werden, indem Verdünnungsreihen mit einheitlichem Verdünnungsfaktor von plasmidklonierten Quantifizierungsstandards in

die qPCR eingesetzt werden. In einer Kalibrierungsgrafik wird anschließend der Logarithmus der anfänglichen Standardkonzentration auf der x-Achse aufgetragen, während der Ct-Wert (siehe 1.5) auf der y-Achse aufgetragen wird. Eine lineare Regressionsgerade durch die Datenpunkte besitzt die Steigung m. Mittels folgender Formel lässt sich die Effizienz einer qPCR berechnen:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung m von -3,32 würde somit eine Effizienz von 1 (100%) ergeben, also eine exakte Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus, was der optimalen qPCR-Effizienz entspricht (148). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Güte eines qPCR-Verfahrens als gegeben betrachtet, wenn E-Werte von $100\% \pm 5\%$ vorlagen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beschreibt, wie gut die Korrelation zwischen den gemessenen Ct-Werten und der eingesetzten Konzentration ist, also die Nähe der gemessenen Datenpunkte zur Regressionsgeraden. Somit können Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der PCR-Analyse gezogen werden. Da der Optimalwert von R^2 1,0 ist (149), wurde im Rahmen der vorliegenden Studie ein R^2 -Wert von $\geq 0,99$ als ausreichend betrachtet.

Zur Überprüfung der Linearitäten der in dieser Arbeit verwendeten TaqMan-PCRs wurden für jeden der genutzten Quantifizierungsstandards 1/10er Verdünnungsreihen von 10^7 bis 10^{-1} Kopien/ μ l in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 hergestellt. In Vierfachbestimmung erfolgte die Quantifizierung mittels TaqMan-PCR nach den im Kap. 2.2.5.1 genannten PCR-Bedingungen. Eine PCR-Linearität wurde als gegeben betrachtet, sofern die TaqMan-PCRs über mindestens vier Verdünnungsstufen linear verliefen.

Die folgende Abb.10 zeigt die Linearitäten für die genutzten TaqMan-PCRs im Konzentrationsbereich $2,5E+07$ bis $2,5E+01$ Kopien/PCR.

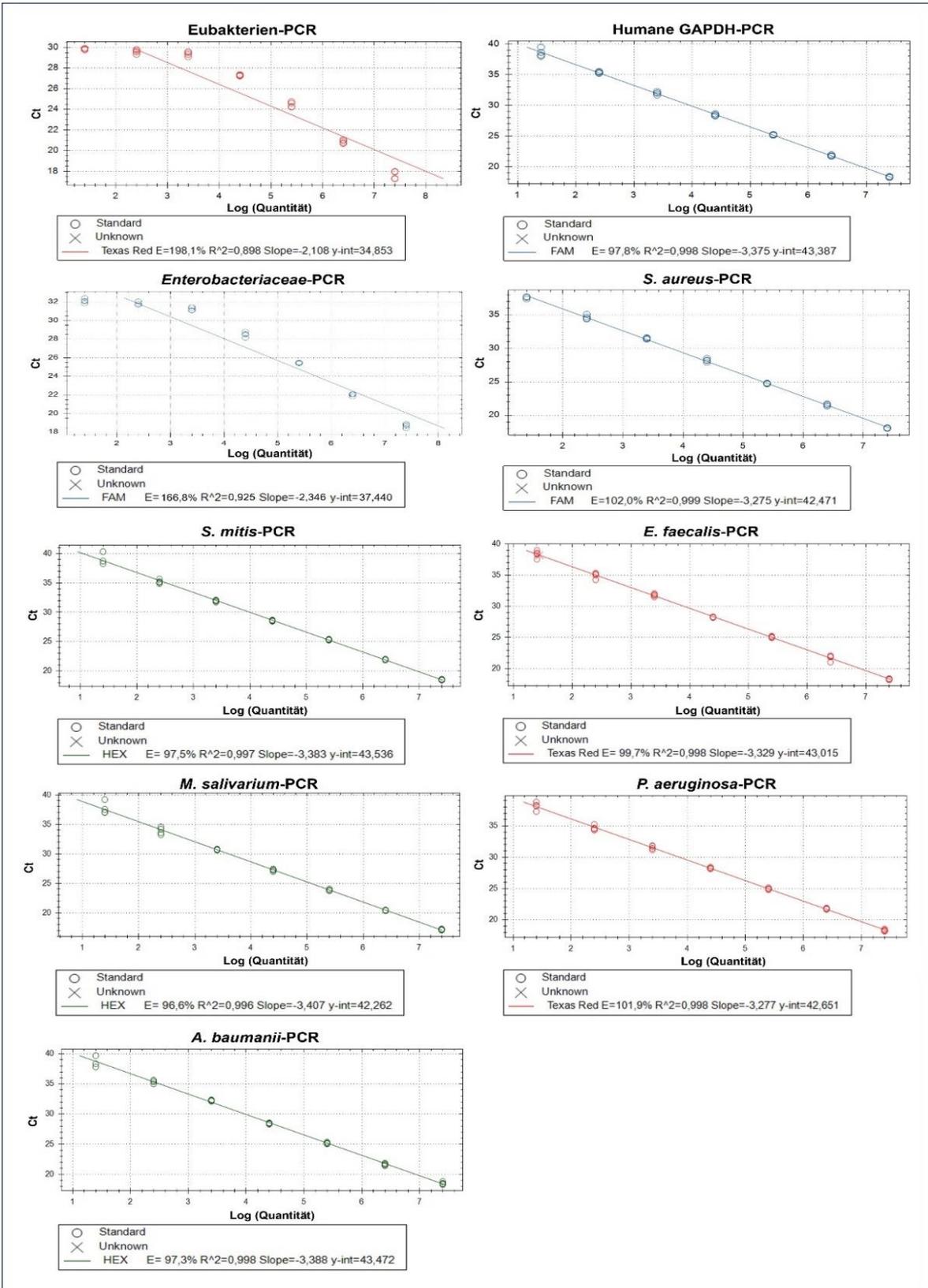


Abb.10: Linearitäten der TaqMan-Monoplex-PCRs im Konzentrationsbereich 2,5E+07 bis 2,5E+01

Angegebene Parameter sind die Effizienz (E), das Bestimmtheitsmaß (R²), die Steigung m (Slope), der y-Achsenabschnitt der linearen Regressionsgeraden (y-int) sowie der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff.

Für die TaqMan-PCR zum Nachweis der humanen GAPDH, *S. aureus*, *S. mitis*, *E. faecalis*, *M. salivarium*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii* war eine Linearität für den dargestellten Konzentrationsbereich von $2,5E+07$ bis $2,5E+01$ Kopien/PCR gegeben. Dagegen zeigten die TaqMan-PCRs zum Nachweis der Gesamtbakterienlast (Eubakterien) bzw. der *Enterobacteriaceae* in geringen Konzentrationsbereichen starke Abweichungen der Datenpunkte von einem linearen PCR-Verlauf. Auch zeigte sich für beide PCRs, dass Werte in geringen Konzentrationen nicht zuverlässig abgebildet werden konnten, da sie sich nicht ausreichend von der Negativkontrolle unterschieden (nicht in der Grafik abgebildet). Sowohl die E-Werte als auch die R^2 -Werte lagen mit Werten von 198,1% bzw. 166,8% und 0,898 bzw. 0,925 weit außerhalb des Toleranzbereichs. Es lag folglich für beide Verfahren aufgrund einer geringen Sensitivität keine Linearität im Bereich von $2,5E+07$ bis $2,5E+01$ Kopien/PCR vor. Daher wurde für die beiden TaqMan-PCRs im Anschluss untersucht, ob eine Linearität für einen weniger breit gefassten Konzentrationsbereich von $2,5E+07$ bis $2,5E+04$ Kopien/PCR vorlag und ob sich die Linearität in höhere Konzentrationsbereiche ausdehnte. Zu diesem Zweck wurden für beide PCRs weitere Verdünnungsreihen der genutzten Standards von 10^9 bis 10^3 Kopien/ μl in 10 mM Tris/ HCl hergestellt und in Vierfachbestimmung getestet.

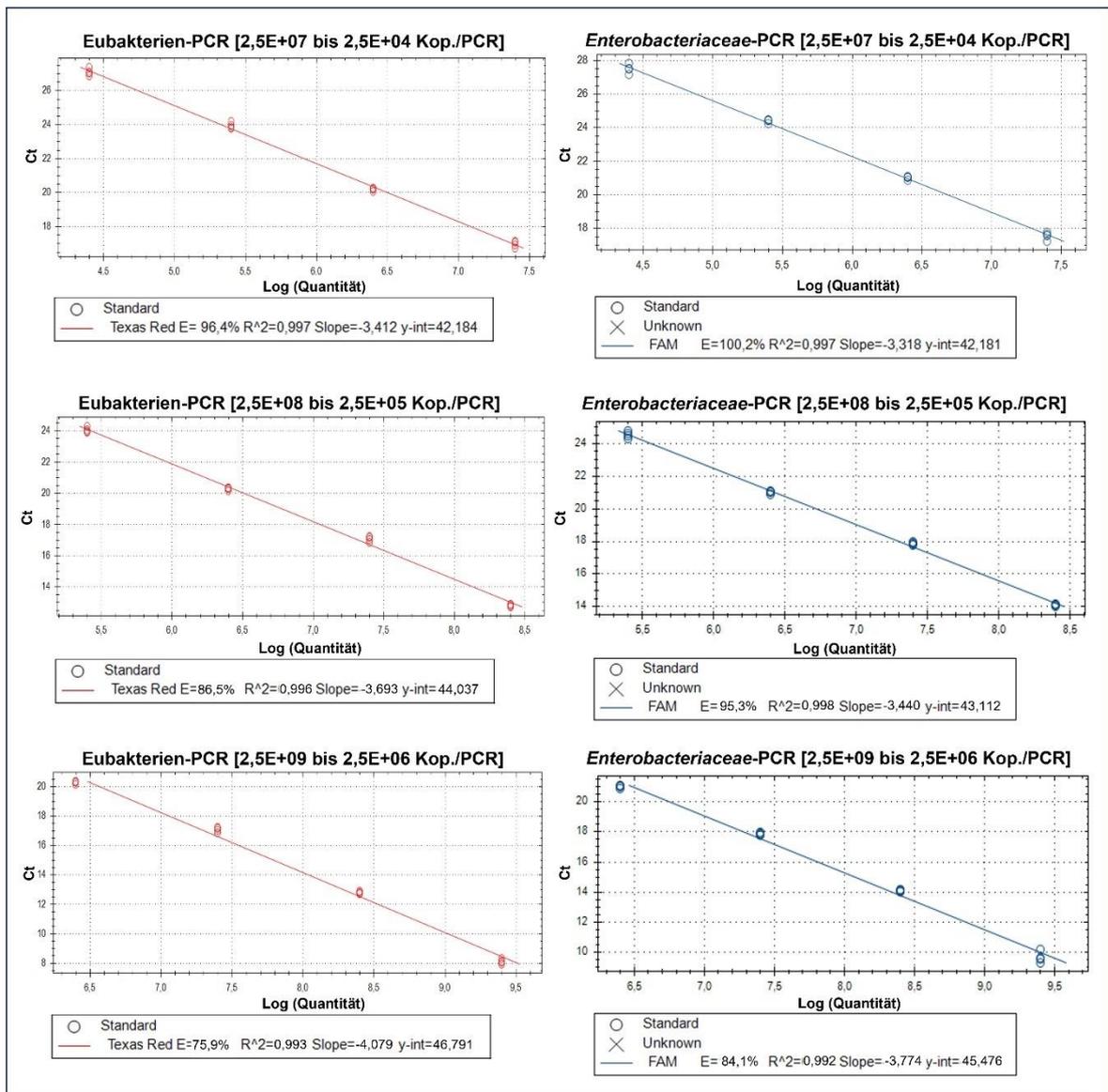


Abb. 11: PCR-Güte der TaqMan-PCRs zum Nachweis von Eubakterien (links) und Enterobacteriaceae (rechts) in den Konzentrationsbereichen $2,5E+07$ bis $2,5E+04$ (oben), $2,5E+08$ bis $2,5E+05$ (Mitte) und $2,5E+09$ bis $2,5E+06$ (unten)

Für die Eubakterien-PCR wurde im Konzentrationsbereich von $2,5E+07$ bis $2,5E+04$ Kopien/PCR mit einem E-Wert von 96,4% und einem R^2 -Wert von 0,997 eine Linearität nachgewiesen. Dagegen war sowohl im Konzentrationsbereich von $2,5E+08$ bis $2,5E+05$ als auch im Konzentrationsbereich von $2,5E+09$ bis $2,5E+06$ Kopien/PCR mit E-Werten von 86,5% bzw. 75,9% keine PCR-Linearität über vier Verdünnungsstufen erkennbar.

Für die Enterobacteriaceae-PCR lagen in Konzentrationsbereichen von $2,5E+07$ bis $2,5E+04$ und $2,5E+08$ bis $2,5E+05$ Kopien/PCR mit E-Werten von 100,2% bzw. 95,3% und

R²-Werten von 0,997 bzw. 0,998 Linearitäten vor. Dagegen war im noch höheren Konzentrationsbereich von 2,5E+09 bis 2,5E+06 Kopien pro PCR bei einem E-Wert von 84,1% keine PCR-Linearität gegeben.

Es ergaben sich somit folgende Werte für E und R² für die jeweiligen Monoplex-Ansätze:

Tabelle 11: Effizienzen und Bestimmtheitsmaße der TaqMan-Monoplex-PCRs

PCR	E-Wert	R ² -Wert	Konzentrationsbereich [Kopien pro PCR]
Eubakterien	96,4%	0,997	2,5E+07 bis 2,5E+04
Humane GAPDH	97,8%	0,998	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>S. aureus</i>	102,0%	0,999	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>S. mitis</i>	97,5%	0,997	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>E. faecalis</i>	99,7%	0,998	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>Enterobacteriaceae</i>	100,2%	0,997	2,5E+07 bis 2,5E+04
	95,3%	0,998	2,5E+08 bis 2,5E+05
<i>M. salivarium</i>	96,6%	0,996	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>P. aeruginosa</i>	101,9%	0,998	2,5E+07 bis 2,5E+01
<i>A. baumannii</i>	97,3%	0,998	2,5E+07 bis 2,5E+01

Somit war die Güte der einzelnen TaqMan-Monoplex-PCRs für die in Tabelle 11 angegebenen Konzentrationsbereiche gegeben.

3.1.3 Nachweisgrenzen und Validierung der Quantifizierung

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle genutzten TaqMan-PCRs eine Sensitivität definiert, welche der niedrigsten gemessenen Standardkonzentration entsprach, bei der alle vier Proben der Vierfachbestimmung nachgewiesen werden konnten. Für die Eubakterien- bzw. *Enterobacteriaceae*-PCR entsprach die Sensitivität der niedrigsten gemessenen Standardkonzentration, bei der alle vier Proben deutlich von der Negativkontrolle unterscheidbar waren. Zudem wurde für alle genutzten TaqMan-PCRs eine sichere Nachweisgrenze definiert, welche eine Konzentration beschreibt, oberhalb derer ein Nachweis stets zuverlässig möglich war. Da die sichere Nachweisgrenze einen Sicherheitsabstand zur gemessenen Sensitivität einhalten sollte, wurde sie auf die 1,5-fache Konzentration der Konzentration der Sensitivität festgelegt.

Weiterführend wurde für jede TaqMan-PCR zwischen einem Konzentrationsbereich einer unsicheren bzw. einer sicheren Quantifizierung unterschieden. Im Bereich der unsicheren

Quantifizierung wurden zwar alle vier Proben der Vierfachbestimmung nachgewiesen, allerdings lag eine Streuung der einzelnen Datenpunkte vor: Mindestens ein Einzelwert wich über einen Ct-Wert vom Mittelwert aller vier ermittelten Ct-Werte ab. Dagegen wichen im Bereich der sicheren Quantifizierung die Einzelwerte maximal einen Ct-Wert vom Mittelwert aller ermittelten Ct-Werte der Vierfachbestimmung ab.

Für die Bestimmung von Sensitivität, sicherer Nachweisgrenze sowie für die Bereiche einer sicheren bzw. unsicheren Quantifizierung wurden die Messwerte der Linearitätsbestimmungen genutzt. Es ergaben sich folgende Konzentrationen bzw. Konzentrationsbereiche:

Tabelle 12: Sensitivitäten, sichere Nachweisgrenzen und quantifizierungssichere- bzw. unsichere Konzentrationsbereiche der genutzten TaqMan-PCRs

TaqMan-PCR	Sensitivität [Kopien/ PCR]	Sichere Nachweisgrenze [Kopien/ PCR]	Quantifizierungsunsicherer Konzentrationsbereich [Kopien/ PCR]	Quantifizierungssicherer Konzentrationsbereich [Kopien/ PCR]
Eubakterien	2,5E+04	3,75E+04	entfällt	2,5E+04 bis 2,5E+07
Humane GAPDH	2,5E+01	3,75E+01	2,5E+01 bis 2,5E+02	2,5E+02 bis 2,5E+07
<i>S. aureus</i>	2,5E+01	3,75E+01	2,5E+01 bis 2,5E+02	2,5E+02 bis 2,5E+07
<i>S. mitis</i>	2,5E+02	3,75E+02	entfällt	2,5E+02 bis 2,5E+07
<i>E. faecalis</i>	2,5E+01	3,75E+01	entfällt	2,5E+01 bis 2,5E+07
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,5E+04	3,75E+04	entfällt	2,5E+04 bis 2,5E+08
<i>M. salivarium</i>	2,5E+01	3,75E+01	2,5E+01 bis 2,5E+02	2,5E+02 bis 2,5E+07
<i>P. aeruginosa</i>	2,5E+01	3,75E+01	entfällt	2,5E+01 bis 2,5E+07
<i>A. baumannii</i>	2,5E+02	3,75E+02	entfällt	2,5E+02 bis 2,5E+07

Tabelle 12 zeigt, dass die Sensitivitäten der einzelnen TaqMan-PCRs variierten: Als sehr sensitiv konnten die PCRs zum Nachweis von humaner GAPDH, *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. salivarium* und *P. aeruginosa* beurteilt werden, da 2,5E+01 Kopien/PCR zum Nachweis aller Proben der Vierfachbestimmung ausreichten. Somit konnte für diese PCRs ab Konzentrationen von über 3,75E+01 Kopien/PCR von einem sicheren Nachweis ausgegangen werden. Etwas geringere Sensitivitäten mit 2,5E+02 Kopien/PCR wiesen die PCRs zum Nachweis von *S. mitis* und *A. baumannii* auf. Für diese beiden PCRs konnte ab einer Konzentration von 3,75E+02 Kopien/PCR von einem sicheren Nachweis ausgegangen werden. Als sehr wenig sensitiv waren die PCRs zum Nachweis der Eubakterien bzw. der *Enterobacteriaceae* zu beurteilen. Unterhalb einer Konzentration von 2,5E+04 Kopien/PCR war

keine Unterscheidung von der Negativkontrolle mehr möglich, da die Negativkontrollen bei-der PCRs Amplifikationen um den 30. Zyklus zeigten (siehe 4.1.1).

Für die PCRs zum Nachweis von humaner GAPDH, *S. aureus* und *M. salivarium* wurde ein quantifizierungsunsicherer Bereich von $2,5E+01$ bis $2,5E+02$ Kopien/PCR festgelegt, in dem eine Streuung der Einzelwerte der Vierfachbestimmungen vorlag. In diesem Bereich war ein Nachweis zwar wahrscheinlich bzw. ab $3,75E+01$ Kopien/PCR sicher möglich, allerdings war eine sichere Quantifizierung unterhalb von $2,5E+02$ Kopien/PCR nicht gegeben. Für alle anderen PCRs entfiel der Bereich der unsicheren Quantifizierung, da bereits in den Konzentrationen der jeweilige Sensitivitäten keine Streuung der Einzelwerte der Vierfachbestimmung von über einem Ct-Wert vorlag.

Die quantifizierungssicheren Bereiche geben an, in welchen Konzentrationen sowohl die Nachweise als auch die Quantifizierungen zuverlässig und sicher möglich waren.

3.1.4 Etablierung von Duplex-PCRs

Es wurde angestrebt, pro Studienpatienten nur einen TaqMan-PCR-Lauf durchführen zu müssen. Somit sollten die neun genutzten TaqMan-PCRs für alle acht Abstriche eines Patienten simultan auf einer Mikrotiterplatte ablaufen. Da handelsübliche Mikrotiterplatten allerdings auf 96 Probenaschen limitiert sind und für die jeweiligen Negativproben und Quantifizierungsstandards bereits 32 Probenaschen der Platte benötigt wurden, blieben für die Abstriche des Patienten nur noch 64 Probenaschen übrig. Um die neun verschiedenen TaqMan-PCRs für diese acht Abstriche simultan durchzuführen zu können, war es also nötig, zwei der TaqMan-PCRs in einem Duplex-Ansatz zu kombinieren.

Es wurden die drei folgenden Duplex-Ansätze getestet:

- Eubakterien und *Enterobacteriaceae*
- *S. mitis* und die humane GAPDH
- *P. aeruginosa* und *A. baumannii*

Bei der Zusammenstellung zweier TaqMan-PCRs musste beachtet werden, dass diese mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen arbeiteten. Die jeweiligen PCRs wurden wie oben genannt zusammengestellt, um eventuellen Fehlerquellen durch gegenseitige Inhibitionen der Fluoreszenzsignale durch stark ungleiche Kopienzahlen vorzubeugen: So wurde sowohl bei *S. mitis* als auch bei der humanen GAPDH vermutet, dass beide in großer Zahl in den Abstrichen nachzuweisen sind. Für *P. aeruginosa* und *A. baumannii* wurde ange-

nommen, dass beide Keime nur sporadisch vorkommen. Die Eubakterien und *Enterobacteriaceae* wurden zusammengestellt, da beide PCRs einen großen Hintergrund zeigten und die sicheren Nachweisgrenzen für beide PCRs sehr hoch lagen (siehe Kap. 3.1.3).

Die beiden Komponenten X (gemessene Komponente) und Y (zusätzlicher nicht-gemessener Duplexpartner) wurden zur Etablierung der Duplex-PCRs jeweils sowohl durch plasmidklonierte Quantifizierungsstandards als auch durch genomische DNA der jeweiligen Bakterien in definierten Konzentrationen simuliert. Sämtliche TaqMan-PCRs erfolgten in Dreifachbestimmung. Die Konzentrationen von Primern und Sonden im Monoplex- und Duplex-Ansatz stimmten überein. Für die Zellstämme der genomischen DNA siehe Kap. 2.1.7, für TaqMan-PCR-Bedingungen sowie für Mastermixe der Monoplex- bzw. Duplex-Ansätze siehe Kap. 2.2.5.1. und für die eingesetzten Primer und Sonden siehe Kap. 2.1.4. Um in der Eubakterien-PCR genomische DNA zu testen, wurde zufällig der *P. aeruginosa*-Bakterienstamm ATCC 27853 ausgewählt und eingesetzt, da die Eubakterien-PCR die Gesamtheit aller Bakterien erfasst und alle Bakterien mit 16S rDNA nachgewiesen werden können.

Für Quantifizierungsstandards wurde eine hohe Konzentration [2,5E+05 Kopien/ PCR bzw. 2,5E+07 Kopien/ PCR für Eubakterien und *Enterobacteriaceae*] sowie eine geringe Konzentration [2,5E+02 Kopien/ PCR bzw. 2,5E+04 Kopien/ PCR für Eubakterien und *Enterobacteriaceae*] eingesetzt. Analog dazu wurde auch für die reine DNA eine hohe Konzentration [10ng/ PCR] sowie eine geringe Konzentration [0,1ng/ PCR] eingesetzt.

Zur Etablierung von Duplex-Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Versuchsansätze durchgeführt, in denen die beiden Komponenten X und Y in verschiedenen Konstellationen und Konzentrationen im Monoplex- und Duplexansatz kombiniert getestet wurden:

Die gemessene Komponente X wurde jeweils in *hoher* Konzentration in folgenden Kombinationen getestet:

- im Monoplex-Ansatz ohne Zusatz von Y (M₁)
- im Duplex-Ansatz ohne Zusatz von Y (D₁)
- im Duplex-Ansatz mit Zusatz von Y in hoher Konzentration (D₂)
- im Duplex-Ansatz mit Zusatz von Y in geringer Konzentration (D₃)

Weiterführend wurde die gemessene Komponente X jeweils in *geringer* Konzentration in folgenden Kombinationen getestet:

- im Monoplex-Ansatz ohne Zusatz von Y (M₂)
- im Duplex-Ansatz ohne Zusatz von Y (D₄)

- im Duplex-Ansatz mit Zusatz von Y in hoher Konzentration (D₅)
- im Duplex-Ansatz mit Zusatz von Y in geringer Konzentration (D₆)

Als Negativkontrollen wurden der Monoplex- bzw. Duplex-Ansatz ohne Zugabe einer Probe getestet (M₀ bzw. D₀).

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze sind in Tabelle 13 für alle TaqMan-PCRs dargestellt. Zudem zeigt die Tabelle die Ct-Differenzen der einzelnen Duplex-Ansätze zum entsprechenden Monoplex-Ansatz ($\Delta D - M$).

Tabelle 13: Mittelwerte der dreifachbestimmten Ct-Werte für die jeweils durchgeführten Versuchsansätze („Versuchsansatz“) und Differenzen zwischen Ct-Werten der Duplex-Ansätze zum Monoplex-Ansatz („ $\Delta D - M$ “)

TaqMan-PCR	Quantifizierungsstandards						Genomische DNA					
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. mitis</i>	Humane GAPDH	Eubakterien	Enterobacteriaceae	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. mitis</i>	Humane GAPDH	Eubakterien	Enterobacteriaceae
Versuchsansatz												
M ₀ [X-; Y-]	N/A	N/A	N/A	N/A	30,0	30,6	N/A	N/A	N/A	N/A	30,2	32,1
D ₀ [X-; Y-]	N/A	N/A	N/A	N/A	29,9	30,8	N/A	N/A	N/A	N/A	30,5	32,2
M ₁ [X+++; Y-]	27,3	26,2	28,0	25,3	17,9	17,3	20,5	19,3	17,8	25,3	18,2	16,5
D ₁ [X+++; Y-]	27,0	26,1	27,8	25,6	18,0	17,2	20,3	19,2	17,9	25,2	18,3	16,6
D ₂ [X+++; Y+++]	26,8	26,2	27,6	25,6	16,7	16,5	20,1	19,4	17,4	25,0	15,2	16,9
D ₃ [X+++; Y+]	26,8	26,2	27,3	25,5	16,8	17,2	20,2	19,7	17,3	24,9	18,0	17,0
M ₂ [X+; Y-]	37,2	36,4	38,3	35,5	27,9	27,3	29,0	26,8	25,9	38,8	26,6	26,1
D ₄ [X+; Y-]	36,5	37,1	36,9	35,4	27,8	27,3	28,6	26,7	25,3	37,8	26,6	26,0
D ₅ [X+; Y+++]	36,9	36,5	37,3	35,1	30,5	25,8	27,2	26,2	24,4	37,2	15,5	24,8
D ₆ [X+; Y+]	36,4	36,1	37,6	35,4	27,6	27,4	28,4	26,9	25,6	36,1	23,2	25,2
$\Delta D - M$												
$\Delta D_1 - M_1$	-0,3	-0,1	-0,2	0,3	0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,1	-0,1	0,1	0,1
$\Delta D_2 - M_1$	-0,5	0,0	-0,4	0,3	-1,2	-0,8	-0,4	0,1	-0,4	-0,3	-3,0	0,4
$\Delta D_3 - M_1$	-0,5	0,0	-0,7	0,2	-1,1	-0,1	-0,3	0,4	-0,5	-0,4	-0,2	0,5

$\Delta D_4 - M_2$	-0,7	0,7	-1,4	-0,1	-0,1	0,0	-0,4	-0,1	-0,6	-1,0	0,0	-0,1
$\Delta D_5 - M_2$	-0,3	0,1	-1,0	-0,4	2,6	-1,5	-1,8	-0,6	-1,5	-1,6	-11,1	-1,3
$\Delta D_6 - M_2$	-0,8	-0,3	-0,7	-0,1	-0,3	0,1	-0,6	0,1	-0,3	-2,7	-3,4	-0,9

- M Monoplex
- D Duplex
- [X] Kopien der getesteten Komponente X
- [Y] Kopien des jeweiligen, nichtgemessenen Duplexpartners Y
- Keine Plasmid- oder DNA-Zugabe
- + 2,5E2/E4 Plasmidkopien bzw. 0,1 ng genomische DNA
- +++ 2,5E5/E7 Plasmidkopien bzw. 10 ng genomische DNA/PCR
- N/A Kein Nachweis erfolgt

Wie zu erwarten, blieben die Negativkontrollen der Monoplex- und Duplexansätze zum Nachweis von *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. mitis* sowie humaner GAPDH negativ, während in den Monoplex- und Duplexansätze zum Nachweis von Eubakterien und *Enterobacteriaceae* Amplifikationen im 29. bis 32. Zyklus auftraten. Die Positivität der Negativkontrollen der TaqMan-PCRs Eubakterien und *Enterobacteriaceae* war schon für die Monoplex-PCRs bekannt und wird im Kap. 4.1.1 genauer beleuchtet.

Ein Duplexansatz wurde in der vorliegenden Arbeit als gut bewertet, sofern Amplifikationen maximal einen Ct-Wert später auftraten als im entsprechenden Monoplexansatz ($\Delta D - M < 1$ Ct). Δ Ct-Werte, für welche dies zutreffend war, wurden in der Tabelle 13 in grün gekennzeichnet. Ein Δ Ct-Wert, für welchen dies nicht zutraf, wurde in Gelb gekennzeichnet (siehe unten). Auffällig war, dass in den meisten Versuchsansätzen Amplifikationen in den jeweiligen Duplexansätzen noch vor den Monoplexansätzen auftraten. Die durchgeführten Duplex-PCRs schienen somit tendenziell die Nachweise sogar noch zu verbessern.

Beim Einsetzen des Eubakterien-Standards in 2,5E+04 Kopien/PCR und gleichzeitigem Einsetzen von *Enterobacteriaceae*-Standards in 2,5E+07 Kopien/PCR in den Versuchsansatz D₅ kam es zu einer Inhibition der Eubakterien-PCR. Die gemessenen Ct-Werte unterschieden sich nicht von der Negativkontrolle, weshalb die Gesamtbakterienlast in dieser Konstellation nicht nachweisbar war. Dies ist als unkritisch zu bewerten, da *Enterobacteriaceae* Bakterien sind und somit unter *in-situ*-Bedingungen niemals höher als die Last der Eubakterien sein können.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die Duplex-PCRs von *S. mitis* mit humaner GAPDH und *P. aeruginosa* mit *A. baumannii* gleich gut funktionierten. Die jeweiligen Komponenten Y schienen in keiner der getesteten Kombination bzw. Konzentrationen den Reaktionsverlauf zu stören. In der Regel funktionierten die Duplex-PCRs sogar besser als die Monoplexansätze, was sich an den negativen Δ Ct-Werten ablesen ließ.

Die bereits in Kap. 3.1.2 gezeigten PCR-Linearitäten für die beiden Monoplexansätze von *P. aeruginosa* und *A. baumannii* sind in Abb. 12 den PCR-Linearitäten des Duplexansatzes gegenübergestellt:

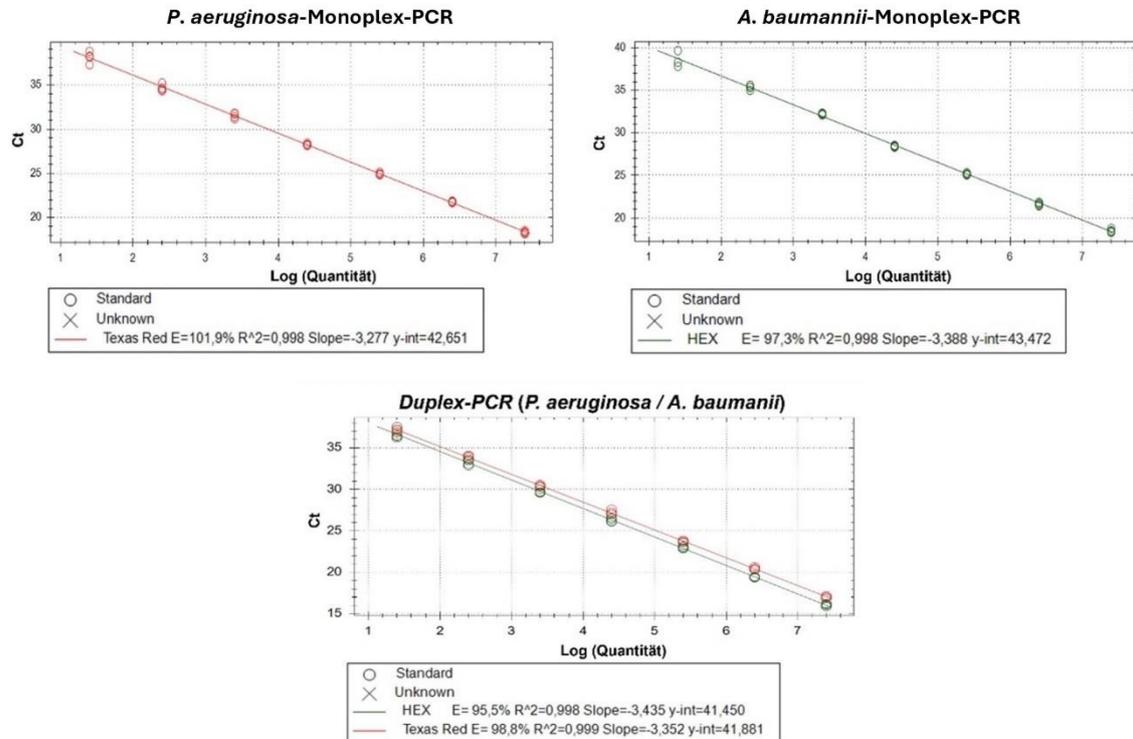


Abb. 12: Linearitäten des *P. aeruginosa*-Monoplexansatzes (oben links), des *A. baumannii*-Monoplexansatzes (oben rechts) sowie des Duplexansatzes (unten)

Angegebene Parameter sind die Effizienz (E), das Bestimmtheitsmaß (R²), die Steigung m (Slope), der y-Achsenabschnitt der linearen Regressionsgeraden (y-int) sowie der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff.

Die E-Werte bzw. R²-Werte für die Monoplexansätze sowie den Duplexansatz sind in Tabelle 14 dargestellt:

Tabelle 14: Effizienz und Bestimmtheitsmaße der Monoplex- bzw. Duplex-Ansätze von *P. aeruginosa* und *A. baumannii* im Vergleich

<i>P. aeruginosa</i>	Monoplex-PCR	Duplex-PCR
R ² -Wert	0,998	0,999
E-Wert	101,9%	98,8%

<i>A. baumannii</i>	Monoplex-PCR	Duplex-PCR
R ² -Wert	0,998	0,999
E-Wert	97,3%	95,1%

Wie in Kap. 3.1.2 bereits für die beiden Monoplex-Ansätze gezeigt, so konnten analog dazu auch für den Duplexansatz aus *P. aeruginosa* und *A. baumannii* PCR-Linearitäten im Konzentrationsbereich von 2,5E+07 bis 2,5E+01 Kopien/PCR nachgewiesen werden. Obwohl die E-Werte im jeweiligen Monoplex-Ansatz noch geringfügig bessere Ergebnisse lieferten, so konnte auch im Duplex-Ansatz von einer hohen Güte des Verfahrens ausgegangen werden, da die Werte sich im Toleranzbereich von 100% ± 5% befanden. Der ausgewählte Duplex-Ansatz galt somit als valide. Zur Analyse der Patientenproben wurde die Duplex-PCR zum Nachweis von *P. aeruginosa* und *A. baumannii* ausgewählt, alle anderen TaqMan-PCRs erfolgten als Monoplex-PCRs.

3.1.5 PCR-Plattenbelegung

Auf Grundlage der in Kap. 3.1.1 bis Kap. 3.1.4 dargestellten Ergebnisse wurde ein Pipetierschema für die PCR-Platten entwickelt:

	PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eubakterien	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ⁴	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
B	Humane Zellzahl	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
C	<i>S. aureus</i>	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
D	<i>S. mitis</i>	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
E	<i>E. faecalis</i>	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
F	Enterobacteriaceae	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ⁴	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
G	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂
H	<i>M. salivarium</i>	H ₂ O	Std. 10 ⁷	Std. 10 ⁵	Std. 10 ²	W ₀	T ₀	W ₁	T ₁	N ₁	W ₂	T ₂	N ₂

Abb. 13: PCR-Plattenbelegung zur simultanen Analyse der acht Patientenabstriche

H₂O = Negativkontrolle (reiner Mastermix); Std. = Quantifizierungsstandard in angegebener Kopienzahl/ Probe; W = Wange; T = Transplantat; N = Naht; 0 = präoperativ; 1 = 1-3 Tage postoperativ; 2 = 6-9 Tage postoperativ

Wie aus Abb. 13 ersichtlich wird, war es mit der gewählten Plattenbelegung möglich, simultan für die acht Abstriche eines Patienten die neun TaqMan-PCRs durchführen zu können. Das erste Studienziel der Etablierung eines routinefähigen *Real-Time* qPCR-Sets zum Nachweis der sieben Markerkeime konnte somit als erfüllt angesehen werden. Schlussendlich konnten die Proben von 37 Patienten mittels 37 PCR-Platten analysiert und ausgewertet werden.

3.2 Patienten und Patientenproben

In der vorliegenden Studie wurden 37 Studienpatienten mit insgesamt 292 Proben eingeschlossen. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten ließen sich anhand folgender Kriterien charakterisieren:

Tabelle 15: Patienten- und operationsspezifische Faktoren in der gesamten Stichprobe von 37 Patienten

Patientenspezifische Faktoren	Alter	20 bis 84 Jahre; Durchschnittsalter bei 65,2 Jahren
	Geschlecht	Männlich: n=18 (49%) Weiblich: n=19 (51%)
	ASA-Score	ASA I: n=5 (14%) ASA II: n=18 (49%) ASA III: n=12 (32%) ASA IV: n=2 (5%)
	BMI	Zwischen 14,5 und 37,7; Durchschnitts-BMI bei 25,4
	Tabakkonsum	Rauchervergangenheit: Ja: n=24 (65%); Nein: n=13 (35%) Rauchgewohnheit zum Zeitpunkt der OP: Ja: n=15 (40%); Nein: n= 15 (60%) Packungsjahre (engl. <i>pack years</i>): Mittelwert 31 <i>pack years</i> ; Verteilung 2 bis 98 <i>pack years</i>
Operationsspezifische Faktoren	Art des Transplantates	Radialis-Transplantat: n=26 (71%) Fibula-Transplantat: n=10 (26%) Anterolaterales Oberschenkel- (ALT-) Transplantat n=1 (3%)
	Lokalisation des Defektes	Unterkiefer: n=12 (32%) Oberkiefer / Gaumen: n=7 (19%) Zunge / Zungenrand: n=5 (14%) Mundboden: n=6 (16%) Lippe: n=1 (3%) Sonstiges / Strukturübergreifende Lokalisationen: n=6 (16%)
	Art des Defektes	Reine Rekonstruktion (Zn. Tumorexzision ¹): n=5 (14%) Plattenepithelkarzinom: n=26 (70%) Andere Tumorart ² : n=2 (5%) Kiefernekrose ³ : n=3 (8%) Keratozyste: n=1 (3%)
	Tumorstadium	Kein Tumor: n=9 (24%) Stage 1: n=6 (16%) Stage 2: n=9 (24%) Stage 3: n=6 (16%) Stage 4: n=6 (16%) Rezidiv: n=1 (3%)

Postoperative Transplantatkomplikationen

Reizlose Einheilung: n=34
Intraorale Wundinfektion: n=1
Wunddehiszenz: n=1⁴
Vollständiger Transplantatverlust: n=1

¹ Zn. Mukoepidermoidkarzinom n=1, Fibrosarkom n=1, Plattenepithelkarzinom n=1, Strahleninduziertes Sarkom n=1 und Adenozystisches Karzinom n=1

² Adenokarzinom n=1; Myoepitheliales Karzinom n=1

³ MRONJ n=2; Osteoradionekrose n=1

⁴ rein extraoral

Männliche und weibliche Studienteilnehmer waren in der vorliegenden Untersuchung annähernd gleich verteilt. Bei 63% der Patienten wurde ein guter Allgemeinzustand mit – abgesehen von der Operationsursache – keiner oder lediglich einer milden Allgemeinerkrankung festgestellt (ASA I oder II). Dagegen wurde bei 37% der Patienten eine schwere oder lebensbedrohliche Allgemeinerkrankung festgestellt (ASA III oder IV).

Das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Transplantat war das Radialis-Transplantat, gefolgt vom Fibula-Transplantat. In nur einem Fall wurde das ALT- (engl. *Anterolateral thigh*) - Transplantat eingesetzt.

Während bei 76% der Patienten Tumorexzisionen mit sich direkt anschließender Defektdeckung durch mikrovaskuläre Transplantation durchgeführt wurden, waren 24% der Patienten (n=9) zum OP-Zeitpunkt tumorfrei. Davon wurden bei fünf Patienten reine Rekonstruktionen bei Zustand nach Tumorexzision durchgeführt, während bei vier Patienten bereits primär keine Tumordiagnosen, sondern andere Indikationen (Kiefernekrose n=3 oder Keratozyste n=1) für die Transplantation vorlagen.

Die Probensammlung und Datenerhebung erfolgte im Zeitraum von April 2021 bis Januar 2023. Perioperative Abstrichentnahmen erfolgten im Mittel 3,5 Tage präoperativ und 1,8 bzw. 6,4 Tage postoperativ. Während präoperative Abstriche bei 75% bzw. 86% der Studienpatienten innerhalb von drei bzw. zehn Tagen vor der Operation durchgeführt wurden, war es (aufgrund von kurzfristigen Änderungen der Operationspläne bedingt durch den pandemiebedingten Mangel an freien Intensivbetten) nicht vermeidbar, bei einigen wenigen Patienten die präoperativen Abstrichentnahmen schon deutlich vor dem Operationszeitpunkt abzunehmen. Für n=5/37 Patienten erfolgten die präoperativen Abstrichentnahmen über zehn Tage vor der Operation mit Verteilungen von 17 Tagen bis 29 Tagen vor der präoperativen Abstrichentnahme. Alle postoperativen Abstriche wurden innerhalb eines Zeitraums von maximal neun Tagen nach der Operation gesammelt.

Die Abstrichentnahmen wurden zum größten Teil (>90%) durch dieselbe Person (durch mich selbst) durchgeführt, um den Fehler durch ungleiche subjektive Einschätzungen und Druckunterschiede bei der Abstrichentnahme zu minimieren.

Zur Auswertung der je acht Proben von 37 Studienteilnehmern waren 3552 einzelne TaqMan-PCRs nötig. Aufgrund der Vielzahl an PCRs wurde entschieden, die qPCRs wie Routine-Diagnostik-PCRs in Einfachbestimmung durchzuführen, um den finanziellen und zeitlichen Aufwand vertretbar zu halten. Testweise wurde eine Auswertung in Doppelbestimmung für die jeweils acht Proben von zwei zufällig ausgewählten Patienten (3 und 18) durchgeführt. Die Doppelbestimmung der Proben von Patient 3 wurden mit einer zeitlichen Differenz von 20 Tagen analysiert, die von Patient 18 mit einer Zeitverzögerung von acht Monaten. Die DNA-Eluat lagerten in der Zwischenzeit bei -20°C . Es erfolgten Nachweise der Eubakterien sowie der humanen GAPDH nach den in Kap. 2.2.5.1 beschriebenen TaqMan-PCR-Bedingungen. Für die je acht Proben beider Patienten wichen die sich entsprechenden Ct-Werte der Doppelbestimmungen für Nachweise der humanen GAPDH-PCR lediglich um $\leq 1,5$ voneinander ab, während sie für Nachweise der Eubakterien-PCR sogar nur um $\leq 0,6$ voneinander abwichen. Auswertungen, die in zeitverzögerter (nach acht Monaten) oder zeitnaher (innerhalb von 20 Tagen) Doppelbestimmung ausgewertet wurden, zeigten vergleichbar gute Ergebnisse. Die Ergebnisse machten es vertretbar, die restlichen PCRs in Einfachbestimmung durchzuführen.

Im Laufe der Probenanalysen zeigte sich, dass Abstriche der Donorregion, welche von der äußeren Haut abgenommen wurden, weniger humane Zellen enthielten als intraoral abgenommene Abstriche. Da die humane GAPDH jedoch als Normalisierungsfaktor genutzt werden sollte, war es wichtig, dass auch in den Abstrichen der äußeren Haut ausreichend humanes Zellmaterial enthalten war. Daher wurde eine neue Abstrichmethodik entwickelt, welche zunächst testweise anhand von Abstrichen der äußeren Haut von vier exemplarisch ausgewählten Probanden mit der bislang durchgeführten Methodik verglichen wurde: Einerseits wurden die Abstriche der äußeren Haut wie bislang mit trockenem Tupfer abgenommen. Andererseits wurden die Abstrichtupfer vor dem Hautabstrich mit drei Tropfen steriler Kochsalzlösung benetzt, um eine Befeuchtung des Tupfers zu bewirken. Die Abstrichtechnik unterschied sich ansonsten nicht. Zum Vergleich der beiden Abstrichmethoden wurden TaqMan-PCRs (siehe Kap. 2.2.5.1) zum Nachweis der humanen GAPDH durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit befeuchteten Abstrichtupfern eine verbesserte Materialabnahme erfolgte, da bei allen vier Probanden mehr humanes Zellmaterial von der äußeren Haut abgenommen werden als mit trockenen Abstrichtupfern. Im Mittel betrug die Differenzen $7,7\text{E}+02$ Kopien/PCR. Aufgrund der neuen Erkenntnisse wurde für die Patienten 23 und 26 bis 38 die Abstrichmethodik für den jeweiligen Abstrich der (dermalen) Donorregion geändert. Die je sieben weiteren pro Patienten durchgeführten (intraoralen) Abstriche wurden weiterhin mit der ursprünglichen Abstrichmethodik durchgeführt, da intraoral schon ein feuchtes Milieu vorlag.

Nachweise der humanen GAPDH wurden neben ihrer Funktion als Normalisierungsfaktor auch als Positivprobe genutzt, um eine Inhibition der PCR auszuschließen. Bei einer einzigen der 292 Proben erfolgte kein GAPDH-Nachweis, weshalb von einer Inhibition der PCR oder unzureichender Güte der Probenentnahme ausgegangen werden musste. Um eine Inhibition auszuschließen, wurden die Probe erneut in 1:10-facher bzw. 1:100-facher Verdünnung der DNA getestet. Da auch nach dieser weiterführenden Analyse keine positiven Nachweise vorhanden waren, wurde die Probe aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.3 Perioperative Keimnachweise

Als zweites zentrales Studienziel erfolgte die Charakterisierung postoperativer Veränderungen der Besiedlung des Operationsgebiets durch die ausgewählten Markerkeime. Nach Durchführung der TaqMan-PCRs für alle Proben der 37 Studienteilnehmer und Normalisierung der Rohdaten (siehe 2.2.12) erfolgte die Datenauswertung. Folgende Grafik gibt einen Überblick über die jeweiligen Nachweise pro Studienteilnehmer:

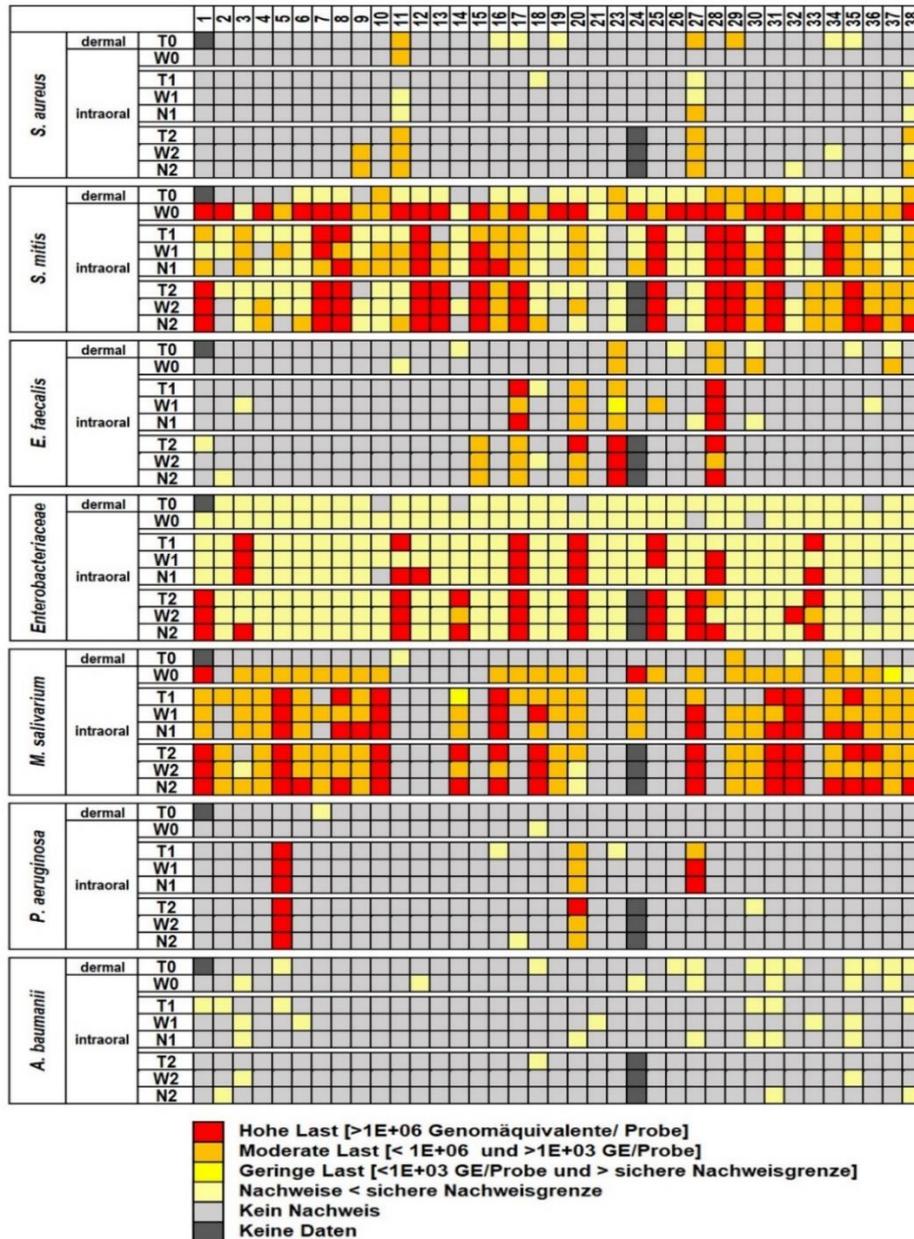


Abb. 14: Perioperative Keimlasten der 37 Studienteilnehmer 1-38 (ohne 22)

Dargestellt sind die auf den Abstrich normalisierten Nachweise (GE/Probe) der Studienteilnehmer 1-38 (ohne 22) auf Wange (W), Transplantat (T) und Naht (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2)

Die Abb. 14 zeigt die am Abstrich normalisierten GE aller gesammelten Proben eines jeden in die Studie eingeschlossenen Studienteilnehmers. In der Grafik sind Abstriche in dunkelgrau markiert, für die keine Daten vorlagen: Patient 22 wurde nachträglich aus der Analyse exkludiert, da er aufgrund seiner Vorerkrankung (Zweiteingriff mittels mikrovaskulären Transplantats) nicht ins Studienprofil passte. Patient 24 erlitt einen Transplantatverlust zwischen dem früh- und spät-postoperativen Zeitpunkt, weshalb für den spät-postoperativen Zeitpunkt keine Daten erhoben wurden. Ein Abstrich (Patient 1; T₀) wurde nachträglich aus der Analyse exkludiert (fehlender Nachweis der humanen GAPDH; siehe Kap. 3.2).

Wie Abb. 14 veranschaulicht, wurden *S. mitis*, *Enterobacteriaceae* und *M. salivarium* regelmäßig nachgewiesen, während Nachweise von *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii* eher sporadisch auftraten.

Nachweise von ***S. aureus*** traten insgesamt selten auf. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurde der Keim bei 32% der Studienpatienten in geringer oder moderater Last nachgewiesen, wobei die Hälfte der Nachweise am unteren Detektionslimit lagen (in Abb. in hellgelb gekennzeichnet). In solch geringen Konzentrationsbereichen sind Quantifizierungen aufgrund der limitierten PCR-Sensitivität unmöglich und Nachweise kritisch zu hinterfragen. Gleiches gilt für Nachweise von ***A. baumannii***, welche alle am unteren Detektionslimit lagen. Aus den Daten kann die Tendenz einer Abnahme der Nachweise von *A. baumannii* im Laufe des Untersuchungszeitraums abgeleitet werden, wobei keine statistische Signifikanz festgestellt wurde.

Während ***E. faecalis*** in geringer oder moderater Last sowohl prä- als auch postoperativ nachweisbar war, traten Nachweise in hoher Last ausschließlich postoperativ auf. Es zeigte sich somit die Tendenz einer postoperativen Zunahme des Keims. Hohe Nachweise an *E. faecalis* traten kaum isoliert auf, sondern fast immer an mehreren untersuchten Regionen zugleich (siehe Abb. 14; „*E. faecalis*“; Patienten 15, 17, 20, 23 und 28).

Während ***P. aeruginosa*** präoperativ lediglich bei 3% der Patienten in sehr geringer Konzentration nachgewiesen wurde, gab es postoperativ bei drei Studienteilnehmern (Patienten 5, 20 und 27) Nachweise in hoher oder moderater Last. Bei allen anderen Studienteilnehmern wurden weiterhin keine oder selten sehr geringe Nachweise am unteren Detektionslimit ermittelt.

Bei Betrachtung der Nachweise der ***Enterobacteriaceae*** in Abb. 14 stechen postoperativ starke Anstiege der Bakterienfamilie ins Auge, welche bei 32% der Patienten auftraten. Hohe und moderate Lasten traten ausschließlich postoperativ auf und fanden sich zumeist an mehreren untersuchten Lokalisationen zeitgleich. Obwohl für die postoperative Zunahme der *Enterobacteriaceae* (vermutlich aufgrund der limitierten Zahl der Studienteilneh-

mer) keine Signifikanz vorlag, war dennoch eine klare Tendenz einer postoperativen Zunahme dieser Bakterienfamilie erkennbar.

Die Ergebnisse für den Kommensalen der Mundflora *M. salivarium* zeigten, dass nicht alle Patienten Träger des Keims waren: Bei acht Patienten wurde er in keinem Abstrich nachgewiesen. Präoperativ war er im Bereich der Donorregion T₀ nur bei 14% der Patienten nachweisbar, während hingegen im oralen Bereich regelmäßig positive Nachweise auftraten. Postoperativ stieg die Keimlast deutlich an, sowohl im oralen Bereich als auch auf der intraoralen Transplantatoberfläche, wo er ausschließlich postoperativ in hoher Last nachweisbar war.

Der Vertreter der gesunden Mundflora *S. mitis* wurde präoperativ bei ausnahmslos allen Patienten im Wangenbereich nachgewiesen, zumeist in moderater oder hoher Last. Dagegen wurde der Keim früh-postoperativ im Wangenbereich nur noch bei 92% der Patienten überhaupt nachgewiesen, während gleichzeitig der Anteil an hohen Keimlasten abnahm und der Anteil an geringen Lasten anstieg. Auf der Transplantatoberfläche stieg die Nachweisrate im Bereich der Donorregion von 78% präoperativ auf 92% postoperativ an. Die Quantitäten auf der Transplantatoberfläche verschoben sich nach dem Transfer nach intraoral zugunsten hoher Nachweise. Insgesamt nahm *S. mitis* im Bereich der Wange postoperativ ab, während der Keim auf der Transplantatoberfläche zunahm.

Um die perioperative Kolonisation von *S. mitis* und *M. salivarium* genauer zu untersuchen und besser zu veranschaulichen, wurde eine zweite Form der Darstellung gewählt. Die Boxplots in Abb. 15 zeigen die quantitative Nachweise der beiden Spezies je durchgeführten Abstrich gemittelt über alle 37 Studienteilnehmer. Die jeweiligen Abstriche sind im zeitlichen Verlauf dargestellt:

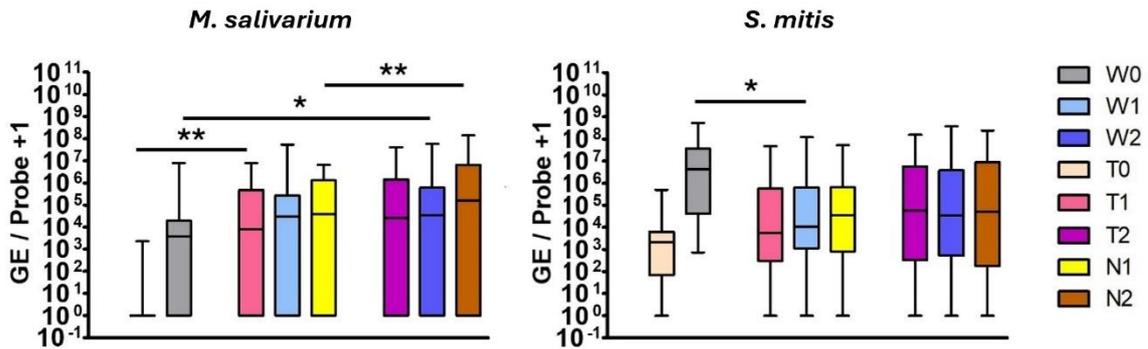


Abb. 15: **Mittlere Nachweisraten von *M. salivarium* und *S. mitis***

Am Abstrich normalisierte GE/Probe +1 zur logarithmischen Darstellung aller 37 Studienteilnehmer; dargestellt sind die Nachweise auf Wangen- (W), Transplantat- (T) und Nahtabstrichen (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2)

M. salivarium zeigte auf der Transplantatoberfläche einen statistisch signifikanten Anstieg von präoperativ praktisch nicht nachweisbar auf einen früh-postoperativen Median von $8,3E+03$ GE/Probe ($T_0 \rightarrow T_1$: $p_{\text{Roh}}=0,005$; $p_{\text{Normal.Euba}}=0,007$; $p_{\text{Normal.Gap}}=0,015$). Das Transplantat wurde folglich nach dem Transfer nach intraoral durch den typischerweise in der Mundhöhle auffindbaren *M. salivarium* kolonisiert. Auch an den untersuchten intraoralen Regionen (Wange und Naht) wurden signifikante postoperative Anstiege beobachtet ($W_0 \rightarrow W_2$: $p_{\text{Roh}}=0,203$; $p_{\text{Normal.Euba}}=0,024$; $p_{\text{Normal.Gap}}=0,005$ und $N_1 \rightarrow N_2$: $p_{\text{Roh}}=0,002$; $p_{\text{Normal.Euba}}=0,412$; $p_{\text{Normal.Gap}} < 0,001$). *M. salivarium* nahm somit nicht nur auf dem von extraoral nach intraoral verlagerten Transplantat signifikant zu, sondern vermehrte sich postoperativ auch an Wangenschleimhaut bzw. Naht signifikant.

S. mitis nahm auf der Transplantatoberfläche perioperativ stetig zu. Auf Basis der am Abstrich normalisierten Daten war dieser Anstieg als statistisch signifikant zu bewerten ($T_0 \rightarrow T_2$: $p_{\text{Roh}}=0,018$), jedoch wurde eine statistische Signifikanz nach Normalisierung an der Eubakterienzahl bzw. der humanen GAPDH nicht mehr kalkuliert. Es kann dennoch die Tendenz abgeleitet werden, dass der Keim auf der (dermalen) Donorregion in eher geringer Last vorlag, während er nach Transfer des Transplantates nach intraoral allmählich durch den klassischen Mundkeim *S. mitis* kolonisiert wurde. Schlussendlich hatte sich bereits zum spät-postoperativen Zeitpunkt 2 die Besiedlung der Transplantatoberfläche durch *S. mitis* an jene der Wangenschleimhaut angeglichen.

Während *S. mitis* auf der Transplantatoberfläche im perioperativen Verlauf zunahm, verhielt sich der Keim bei gesonderter Betrachtung der Wangenabstriche konträr: Der Keim nahm vom präoperativen Zeitpunkt 0 zum früh-postoperativen Zeitpunkt 1 signifikant ab ($W_0 \rightarrow W_1$: $p_{\text{Roh}}=0,01$; $p_{\text{Normal.Euba}}=0,034$; $p_{\text{Normal.Gap}} < 0,001$). *S. mitis*, welcher als typischer Vertreter der

gesunden Mundflora gilt, wurde folglich postoperativ im Mundraum reduziert, was auf eine postoperativ vorliegende Dysbiose hindeutet.

3.4 Wundkomplikationen und Entzündungsparameter

Bei drei Studienpatienten traten im postoperativen Verlauf Transplantatkomplikationen auf. Während bei Patient 24 das mikrovaskuläre Transplantat aufgrund einer thromboembolischen Komplikation nachfolgend wieder entfernt werden musste, war es bei zwei Patienten (11 und 20) möglich, das Transplantat trotz Wundheilungsstörungen durch geeignete Therapien zu erhalten. Auf diese beiden Fälle soll nachfolgend gesondert eingegangen sein und die jeweiligen perioperativen Keimbeseidlungen im Operationsgebiet beleuchtet werden. Folgende Grafik zeigt die perioperativen Keimnachweise von Patient 11, bei welchem sich im postoperativen Verlauf eine Wunddehiszenz (ein Aufklaffen der Wundränder) entwickelte, sowie von Patient 20, welcher eine intraorale Wundinfektion im Nahtbereich erlitt:

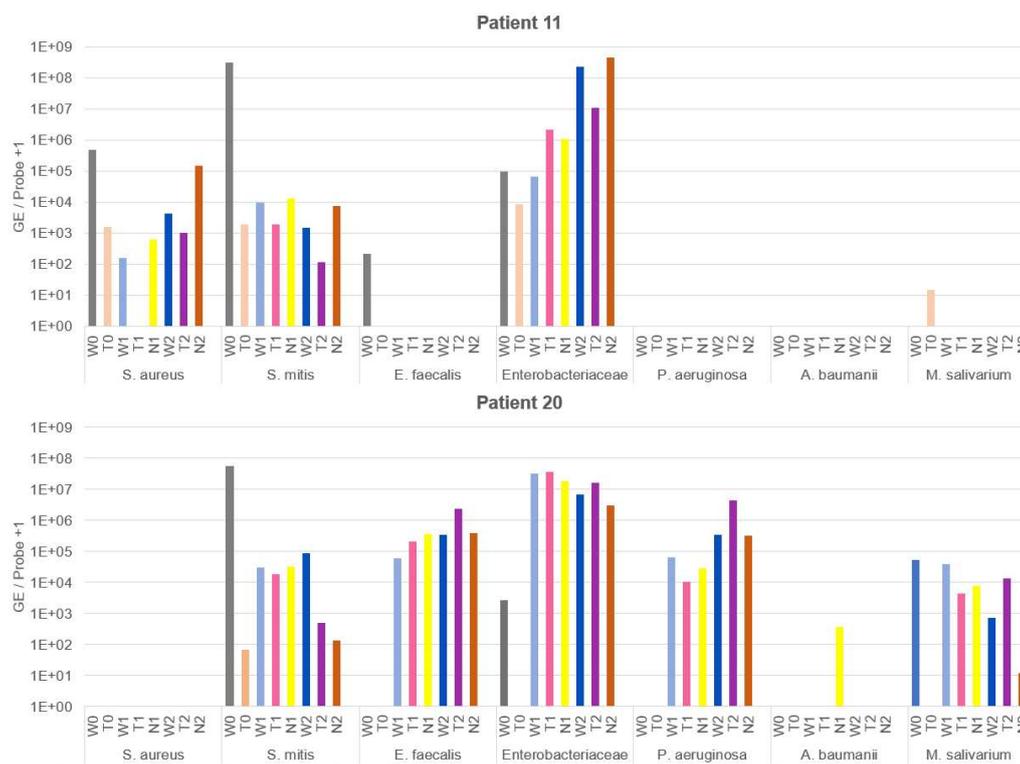


Abb. 16: Perioperative Keimbeseidlungen bei Patienten 11 und 20

Dargestellt sind die Bakteriennachweisraten auf Wangen- (W), Transplantat- (T) und Nahtabstrichen (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2)

Bei Patient 11 entwickelte sich im postoperativen Verlauf eine Wunddehiszenz im extraoralen Bereich des Transplantats, welche nachfolgend mittels lokaler Lappenplastik gedeckt

wurde. Im intraoral gelegenen Bereich heilte das Transplantat reizlos ein. Obwohl rein klinisch keine Infektionszeichen im Operationsgebiet erkennbar waren, zeigte die molekulargenetische Analyse starke postoperative Anstiege von *Enterobacteriaceae*, welche in fünf der sechs postoperativen Abstrichen in hoher Last ($>1E+06$ GE/Probe) vertreten waren. Nahezu im gesamten Untersuchungsverlauf wurde auch *S. aureus* nachgewiesen.

Bei Patient 20 entwickelte sich im postoperativen Verlauf eine Infektion mit klinischen Infektionszeichen (Rötung, Schwellung), welche intraoral im Nahtbereich lokalisiert war. In allen postoperativen Abstrichen dieses Patienten wurden *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* in moderater bzw. hoher Last nachgewiesen. Somit war die Infektion übereinstimmend mit der Literatur eine Mischinfektion, die von Keimen mitgetragen wurden, welche typisch für das nosokomiale Umfeld sind. Zu beachten ist allerdings, dass die nachgewiesenen Keime für diesen Patienten lediglich einen sehr geringen prozentualen Anteil an der Gesamtbakterienzahl der jeweiligen Abstriche ausmachten (siehe Abb. 19, Patient 20). Es ist somit anzunehmen, dass noch weitere Spezies, für die in dieser Studie kein Nachweis erfolgte, an der Infektion beteiligt waren.

Wie bereits in Kap. 3.3 gezeigt, wurden in der vorliegenden Untersuchung bei 32% der Studienpatienten postoperativ hohe Lasten der infektionsrelevanten *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Auch postoperative Anstiege der Infektionserreger *P. aeruginosa* und *E. faecalis* traten gelegentlich auf (siehe Abb. 14). Zudem gab es signifikante postoperative Anstiege des in seltenen Fällen ebenfalls infektionsrelevanten *M. salivarium*. Interessanterweise gingen derartige Anstiege von potenziellen Infektionserregern nur in den beiden genannten Einzelfällen mit der tatsächlichen Entstehung einer klinisch erkennbaren Infektion einher.

Neben den molekulargenetischen Analysen der perioperativen Keimbesiedlung erfolgten im Rahmen der Datensammlung die Erhebung von Entzündungsparametern, sowie die Erfassung febriler Temperaturen im Untersuchungszeitraum. Präoperativ waren alle Studienteilnehmer fieberfrei. Im postoperativen Verlauf hatten 61% weiterhin kein Fieber, während 30% leichtes Fieber ($38,0-38,5^{\circ}\text{C}$) und 9% mäßiges bis hohes Fieber ($>38,5^{\circ}\text{C}$) entwickelten, welches zumeist innerhalb der ersten zwei Tage postoperativ auftrat. Ein postoperativer Anstieg der Körpertemperatur war nicht statistisch signifikant. Bei nur $n=5/11$ Patienten trat leichtes postoperatives Fieber in Kombination mit einem postoperativen Anstieg von mindestens einem der untersuchten klassischen Infektionserreger *S. aureus*, *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae* oder *P. aeruginosa* auf. Bei $n=2/3$ Patienten mit hohem Fieber trat gleichzeitig eine postoperative Zunahme der *Enterobacteriaceae* auf. Es wurde kein

statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der perioperativen Körpertemperatur und den Nachweisen der untersuchten Keime ermittelt.

Es erfolgte zudem eine Erhebung der Entzündungsparameter Leukozytenzahl und C-reaktives Protein (CRP), welche zu den Zeitpunkten der jeweiligen Abstrichentnahmen präoperativ, 1-3 Tage postoperativ sowie 6-9 Tage postoperativ für jeden Studienpatienten erfasst wurden. Die Boxplots von Abb. 17 zeigen die perioperativen Leukozytenzahlen bzw. Plasmaspiegel des C-reaktiven Proteins für alle 37 Studienteilnehmer:

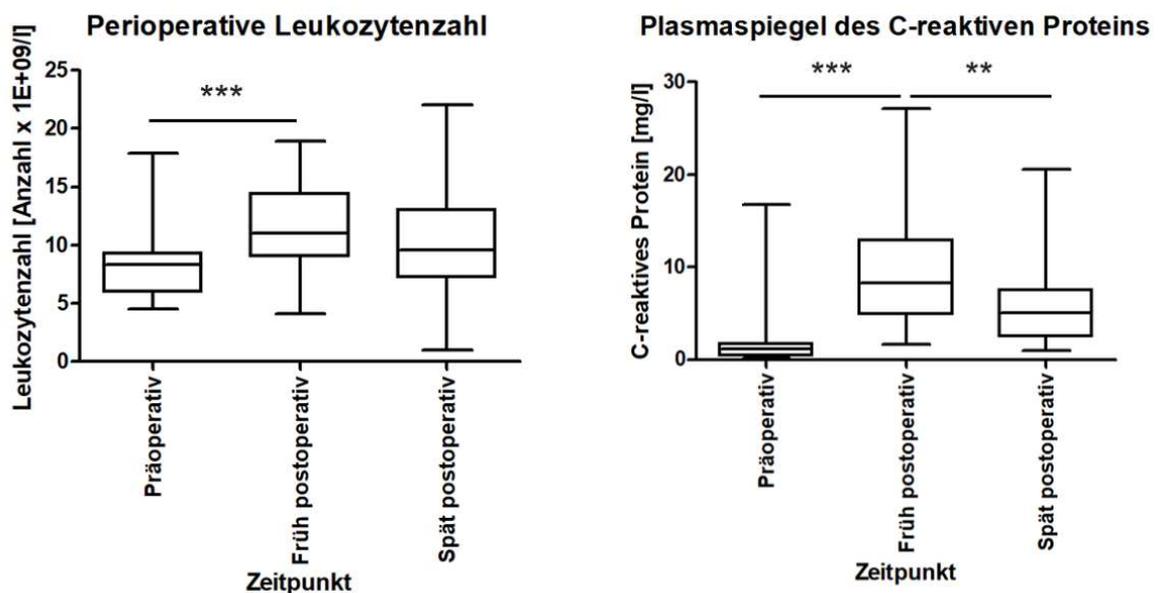


Abb. 17: Perioperative Leukozytenzahlen (links) und Werte des C-reaktiven Proteins (rechts) aller Studienteilnehmer

Sowohl die Leukozytenzahlen als auch die CRP-Werte waren früh-postoperativ erhöht und sanken bis zum Ende der postoperativen Phase wieder ab.

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung (bei Normalverteilung der Messwerte) zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl vom präoperativen zum früh-postoperativen Zeitpunkt ($p < 0,001$). Im postoperativen Verlauf erfolgte eine leichte Abnahme, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,093$).

Auch für die CRP-Werte zeigte sich mittels Friedman-Test (bei Nicht-Normalverteilung der Messdaten) ein hoch signifikanter Anstieg der CRP-Werte vom präoperativen zum früh-postoperativen Zeitpunkt ($p < 0,001$), auf den im postoperativen Verlauf ein sehr signifikanter Abfall vom früh-postoperativen zum spät-postoperativen Zeitpunkt folgte ($p = 0,003$).

Zwischen den perioperativen Nachweisen der untersuchten Keime und den ermittelten pe-

rioperativen Leukozytenzahlen bzw. CRP-Werten wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge ermittelt. Auch die Dauer einer postoperativen Leukozytose bzw. CRP-Erhöpfung stand in keinem signifikanten Zusammenhang zu den untersuchten Keimnachweisen. Postoperative Anstiege von CRP und Leukozytenzahlen gingen nur in Einzelfällen mit klinischen Infektionszeichen einher. Umgekehrt gingen allerdings beide oben genannten Fälle von Wundkomplikaationen (Patienten 11 und 20) mit früh-postoperativ stark erhöhten CRP-Werten (25,8 bzw. 27,1 mg/l) einher, was den höchsten gemessenen CRP-Werten der vorliegenden Untersuchung entsprach.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass postoperative Anstiege von Infektionserregern nur in Einzelfällen auch tatsächlich eine Wundinfektion auslösten. Analog dazu ließen postoperative Anstiege von CRP, Leukozytenzahl und Körpertemperatur ebenso wenig darauf schließen, dass eine Wundinfektion vorlag. Insgesamt gab es keinerlei signifikanten Zusammenhänge zwischen den gemessenen Entzündungsparametern und der nachgewiesenen perioperativen Keimbesiedlung.

3.5 Untersuchung von Einflüssen auf die perioperative Keimbesiedlung

Um gemäß des dritten zentralen Studienziels mögliche Ursachen für die in Kap. 3.3 beschriebenen bakteriellen Besiedlungen des Operationsgebietes bzw. für perioperative Veränderungen in der Keimbesiedlung zu identifizieren, wurden potenzielle Einflussfaktoren untersucht. Es wurden dabei Antibiotikaeinflüsse, Faktoren der Mundgesundheit und Xerostomie (Mundtrockenheit), Hospitalisierungsdauer, Zahnbestand sowie der Einfluss des Transfers extraoraler Haut in den Mund in die Untersuchung miteinbezogen.

3.5.1 Antibiotika

Als mögliche Einflussfaktoren auf die perioperative Keimbesiedlung wurden als erstes Antibiotikamedikationen im Untersuchungszeitraum analysiert.

Abb. 18 zeigt farblich markiert die Antibiotikaklassen, die den Studienpatienten im Untersuchungszeitraum verabreicht wurden, und gibt zusätzlich Aufschluss über die Zeitpunkte der jeweiligen Abstrichentnahmen 1-3.

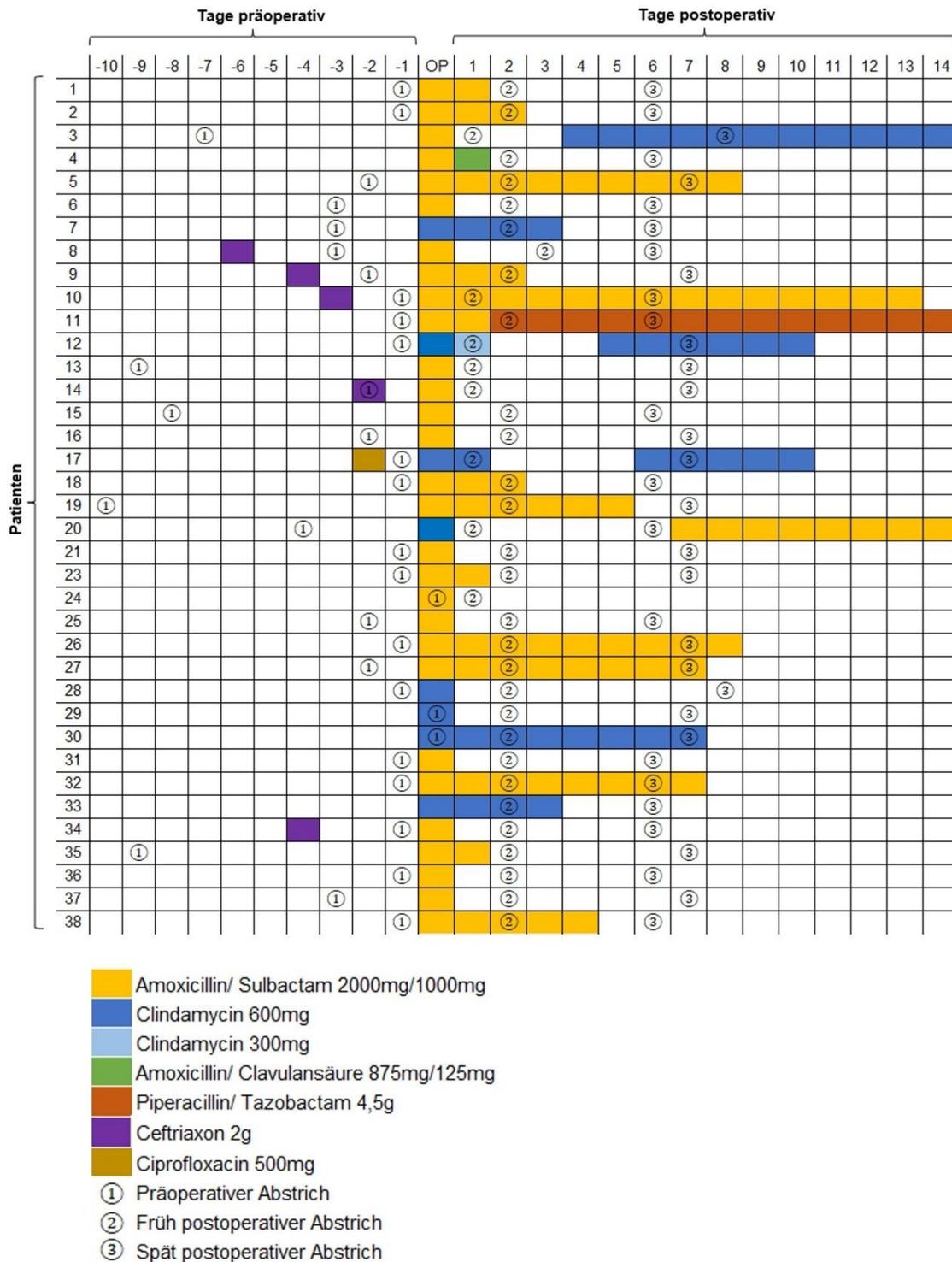


Abb. 18: Perioperative Antibiosen und Abstrichzeitpunkte der 37 Studienteilnehmer

Am Tag der Operation erhielten alle Studienpatienten ein Antibiotikum im Sinne einer intraoperativen *Single-Shot*-Antibiose, wobei die intraoperative Antibiose bei n=29 Patienten (78%) mit Ampicillin/ Sulbactam und bei n=8 Patienten (22%) aufgrund von Penicillin-Allergie mit Clindamycin erfolgte.

Prä- und postoperativ variierten die Antibiotikamedikationen dagegen stark. **Präoperativ**

erhielten sechs Patienten im Zeitraum zwischen dem sechstem und dem zweiten Tag vor der OP (unmittelbar vor Anlage der perkutane endoskopischen Gastrostomie (PEG)) einmalig 2g Ceftriaxon bzw. 500mg Ciprofloxacin. **Postoperativ** erhielten n=15 Patienten (41%) keine weitere antibiotische Behandlung im Untersuchungszeitraum, während n=15 Patienten (41%) noch mindestens einen weiteren Tag Ampicillin/ Sulbactam und n=6 Patienten (16%) noch mindestens einen weiteren Tag Clindamycin erhielten. In Einzelfällen wurde postoperativ Amoxicillin/ Clavulansäure bzw. Piperacillin/ Tazobactam eingesetzt.

Um die Auswirkungen von Antibiotikamedikationen auf die Keimbesiedlung im OP-Gebiet zu untersuchen, wurden vier Patientengruppen definiert, die sich in Antibiotikaklasse und/oder Anzahl der Tage, an welchen Antibiosen verabreicht wurden, unterschieden: 1. Antibiose für weniger als drei Tage; 2. Ampicillin/Sulbactam für mindestens drei Tage; 3. Clindamycin für mindestens drei Tage und 4. Piperazillin/Tazobactam für mindestens drei Tage (wobei letztere Gruppe lediglich von einem Patienten besetzt wurde). Es sollten die relativen Anteile der einzelnen nachgewiesenen Keime an der jeweils im Abstrich enthaltenen Gesamtbakterienlast im Fokus stehen. Die folgende Grafik zeigt, wie sich die Anteile der nachgewiesenen Keime an der Gesamtbakterienlast unter dem Einfluss verschiedener Antibiosen unterschieden:

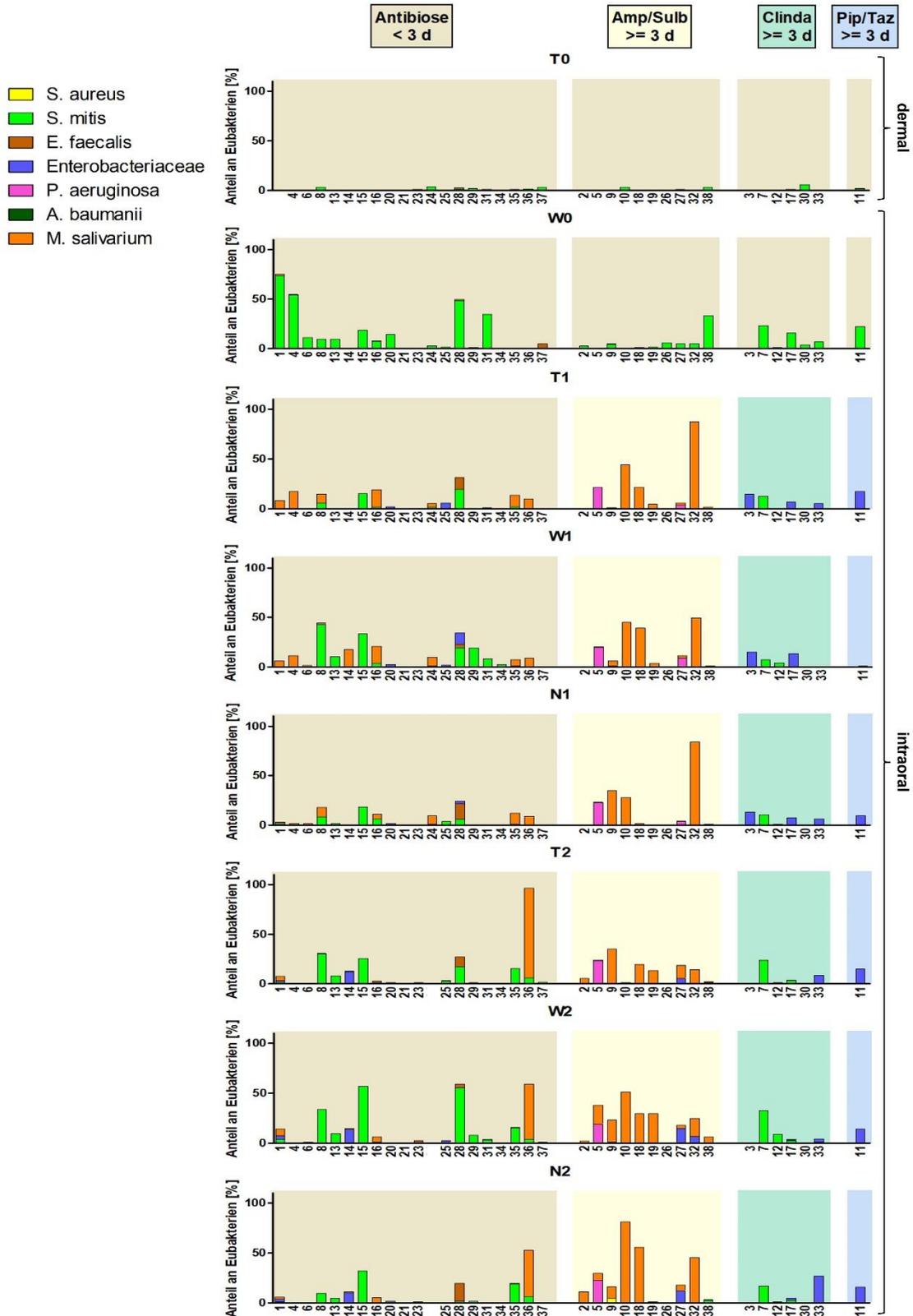


Abb. 19: **Quantitative Anteile der jeweiligen Spezieslast (GE/Probe) an der Gesamtbakterienlast nach Art und Dauer der Antibiotikagaben**

Dargestellt sind die Nachweise auf Wangen- (W), Transplantat- (T) und Nahtabstrichen (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2); Amp/Sulb = Ampicillin/ Sulbactam, Clinda = Clindamycin, Pip/ Taz = Piperacillin/ Tazobactam

Präoperativ hatte keiner der Studienpatienten eine Antibiose für mindestens drei Tage erhalten.

Auf der präoperativen Transplantatoberfläche (T_0) war keiner der untersuchten Keime in an der Gesamtbakterienlast gemessenem relevantem Maße aufzufinden. Auf der Wange nahm zum präoperativen Zeitpunkt (W_0) nur *S. mitis*, als einziger der sieben untersuchten Keime, relevante Anteile an der Gesamtbakterienzahl ein.

In allen sechs **postoperativ** durchgeführten Abstrichen ($T_1, W_1, N_1, T_2, W_2, N_2$) zeigte sich gleichermaßen, dass die Verteilung der untersuchten Keime deutlich variabler ausfiel als präoperativ: Neben *S. mitis* nahmen im postoperativen Verlauf auch andere Keime wie *Enterobacteriaceae*, *M. salivarium*, sowie seltener *P. aeruginosa* und *E. faecalis* relevante Anteile an der Gesamtbakterienzahl ein.

Die Beobachtung, dass *S. mitis* im postoperativen Verlauf anderen Keimen zu weichen schien, galt für alle vier Gruppen, jedoch war sie besonders augenscheinlich bei Medikation mit Ampicillin/ Sulbactam für mindestens drei Tage. In dieser Gruppe nahm der Vertreter der gesunden Mundflora in keinem der postoperativen Abstriche noch sichtbare Anteile an der Gesamtbakterienzahl ein. Stattdessen nahm in dieser Gruppe insbesondere *M. salivarium* stark zu, sodass teilweise sehr hohe Anteile von bis zu > 80% an der gesamtbakteriellen Last erreicht wurden. Dagegen zeigt die Abb. 19, dass es bei Clindamycin-Medikation für mindestens drei Tage nahezu keinerlei relevante Anteile von *M. salivarium* an der Gesamtbakterienzahl gab.

Es wurden auch patientenspezifische Betrachtungen vorgenommen, um Einflüsse der verabreichten Antibiosen auf die seltener postoperativ in hohen Lasten nachgewiesenen Erreger *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* treffen zu können. Für die *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* standen postoperativ hohe Nachweise in keinem signifikanten oder tendenziellen Zusammenhang zur Wahl oder Dauer der Antibiose (nicht in obiger Grafik dargestellt). Für *E. faecalis* zeigte sich bei der patientenspezifischen Betrachtung, dass fünf der sechs Patienten, bei denen postoperativ hohe oder moderate Lasten des Keims nachweisbar waren, lediglich eine kurzzeitige Antibiose (Clindamycin oder Ampicillin/Sulbactam) von unter drei Tagen erhalten hatten. Dagegen traten bei prolongierter Ampicillin/Sulbactam-Medikation von mindestens drei Tagen keinerlei postoperative hohe oder moderate Nachweise des Keims auf.

Um weiterführend auch kurzfristige Einflüsse der Antibiosen auf die perioperativen Keimnachweise zu untersuchen, wurden drei neue Gruppen definiert, bei denen nur Antibiosen innerhalb der letzten 24 h vor dem jeweiligen Abstrich berücksichtigt wurden. Es wurde unterschieden zwischen Patienten, die 1. keine Antibiose binnen 24 h erhalten hatten; 2. Ampicillin/Sulbactam oder 3. Clindamycin innerhalb von 24 h erhalten hatten. Mittels

Kruskal-Wallis-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Quantität der nachgewiesenen Keime untersucht: Antibiotikamedikationen binnen 24 h zeigten keine signifikanten Effekte auf die Kolonisation der untersuchten Lokalisationen durch *S. aureus*, *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* oder der Gesamtbakterienzahl. Dagegen wurden auch nach dieser erneuten Betrachtung deutliche Hinweise einer postoperativen Beeinflussung von *M. salivarium* und *S. mitis* durch Antibiotikamedikationen gezeigt. Abb. 20 veranschaulicht die quantitativen Unterschiede beider Keime:

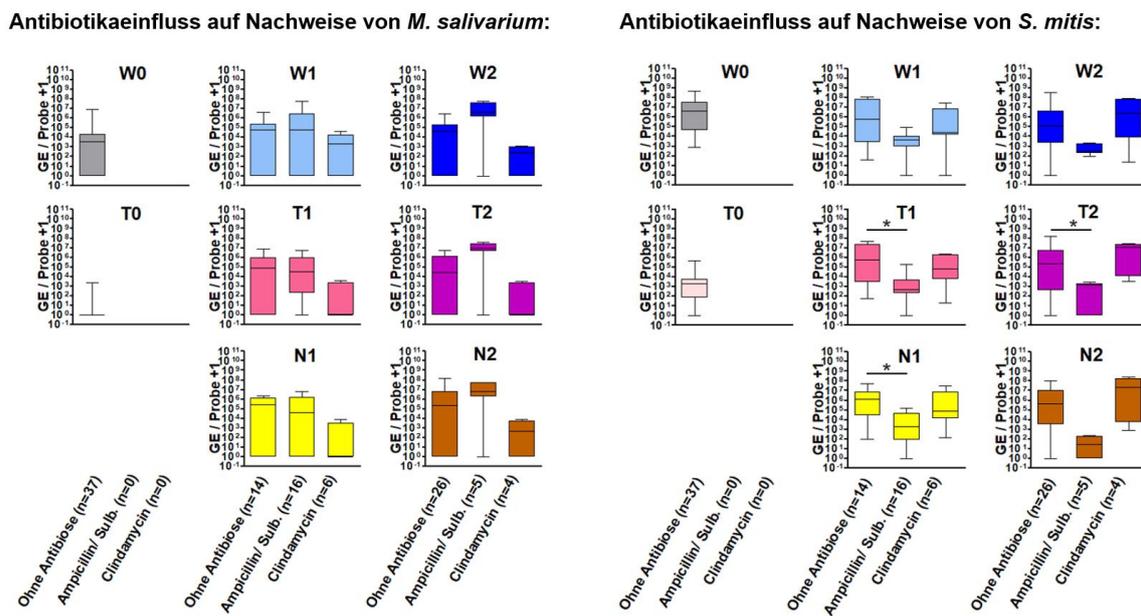


Abb. 20: **Einfluss von Antibiotikamedikationen binnen 24h vor Abstrichentnahme auf Nachweise von *M. salivarium* und *S. mitis***

Dargestellt sind die Boxplots der normalisierten Keimnachweise (GE/Probe) auf Wangen- (W), Transplantat- (T) und Nahtabstrichen (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2)

Alle präoperativen Abstriche wurden frühestens 24 h nach Antibiotikamedikation entnommen. Patient 11, der als einziger Patient Piperazillin/Tazobactam im Untersuchungszeitraum erhalten hatte, wurde wegen zu kleiner Gruppengröße (n=1) aus dieser Analyse exkludiert.

Die Abb. 20 zeigt, dass für Nachweise von ***M. salivarium*** postoperativ in der Clindamycin-Gruppe geringere Medianwerte beobachtet werden konnten als in der Gruppe ohne Antibiose binnen 24 h. Diese Beobachtung kann als Hinweis gewertet werden, dass Clindamycin die Last an *M. salivarium* senkte. In den spät-postoperativen Abstrichen zeigte sich ein Anstieg von *M. salivarium* in der Ampicillin/Sulbactam-Gruppe. Obwohl sich die Nachweise

nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschieden, ist dennoch die starke Tendenz erkennbar, dass *M. salivarium* spät-postoperativ durch Ampicillin/Sulbactam selektiert wurde. Für *S. mitis* wurden postoperativ in der Ampicillin/Sulbactam-Gruppe sichtbar geringere Nachweise als in der Gruppe ohne Antibiose beobachtet. Der Effekt zeigte sich sowohl früh als auch spät-postoperativ auf Wange, Transplantat und Naht und war für die Abstriche T₁ (p_{Roh}=0,004; p_{Euba}=0,06; p_{Gap}=0,011), T₂ (p_{Roh}=0,057; p_{Euba}=0,028; p_{Gap}=0,032) und N₁ (p_{Roh}=0,014; p_{Euba}=0,15; p_{Gap}=0,021) signifikant. Insgesamt kann auf Basis dieser Daten die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die *S. mitis*-Nachweise durch Ampicillin/Sulbactam signifikant gesenkt wurden. Clindamycin hatte dagegen keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die Nachweise von *S. mitis*.

Zusammenfassend schien sich die orale Keimbildung postoperativ in eine Richtung zu verschieben, die mehr infektionsrelevante Keime beherbergte als präoperativ. Der gesunde Mundkeim *S. mitis* wurde bei Medikation mit Ampicillin/Sulbactam signifikant reduziert bzw. durch andere Keime verdrängt. Insbesondere *M. salivarium* erfuhr unter Ampicillin/Sulbactam-Medikation eine positive Selektion.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der bereits in Kapitel 3.3 gezeigten signifikanten postoperativen Zunahme von *M. salivarium* sowie der signifikanten postoperativen Abnahme von *S. mitis* im Wangenbereich. So scheinen diese perioperativen Verschiebungen in der Kolonisation beider Keime die Folge des routinemäßig verabreichten Ampicillin/Sulbactam-Antibiotikaregimes zu sein.

3.5.2 Mundgesundheit und Xerostomie

Wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben, wurden Daten zur Mundgesundheit an definierten Zähnen erhoben und nachfolgend die Mundgesundheitsindizes für jeden in die Analyse mit einbezogenen Patienten pro Zeitpunkt berechnet. Die Berechnung der Mundgesundheitsindizes soll beispielhaft anhand der Messdaten zur Plaqueakkumulation eines exemplarisch ausgewählten Patienten erläutert werden:

Tabelle 16: Berechnung der perioperativen Plaqueindizes des Patienten 5

Zeitpunkt	Zahn	16	21	24	36	41	44	$Index = \frac{\text{Summe der Messwerte}}{\text{Anzahl der Messpunkte}}$
		Präoperativ	1	0	1	1	3	1
Früh-postoperativ		1	1	1	1	-	-	$Index \text{ (früh postoperativ)} = \frac{4}{4} = 1$
Spät-postoperativ		2	3	2	2	-	-	$Index \text{ (spät postoperativ)} = \frac{9}{4} \approx 2,3$

Die Datenerhebung der Mundhygieneindizes erfolgte zu drei perioperativen Zeitpunkten an (sofern vorhanden) sechs ausgewählten Zähnen (Messpunkten). Dem hier dargestellten Patienten waren intraoperativ alle Zähne des 5. und 6. Sextanten extrahiert worden, so dass postoperativ die Messung nur noch an vier Messpunkten möglich war. Da die Summe der erhobenen Messwerte durch die Anzahl der Messpunkte dividiert wurde, lagen schlussendlich für den Patienten drei Plaqueindex-Werte vor (ein Wert pro perioperativen Zeitpunkt). Analog dazu wurden auch Gingivaindizes und PA-Indizes zu drei Zeitpunkten berechnet. Wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben wurde zusätzlich zu den Mundgesundheitsindizes der Xerostomie-Index zu den drei perioperativen Zeitpunkten erhoben.

Abb.: 21 zeigt die Ergebnisse der Plaqueindizes, Gingivaindizes, PA-Indizes und Xerostomie-Indizes aller in die Analyse miteinbezogenen Studienpatienten pro perioperativen Zeitpunkt:

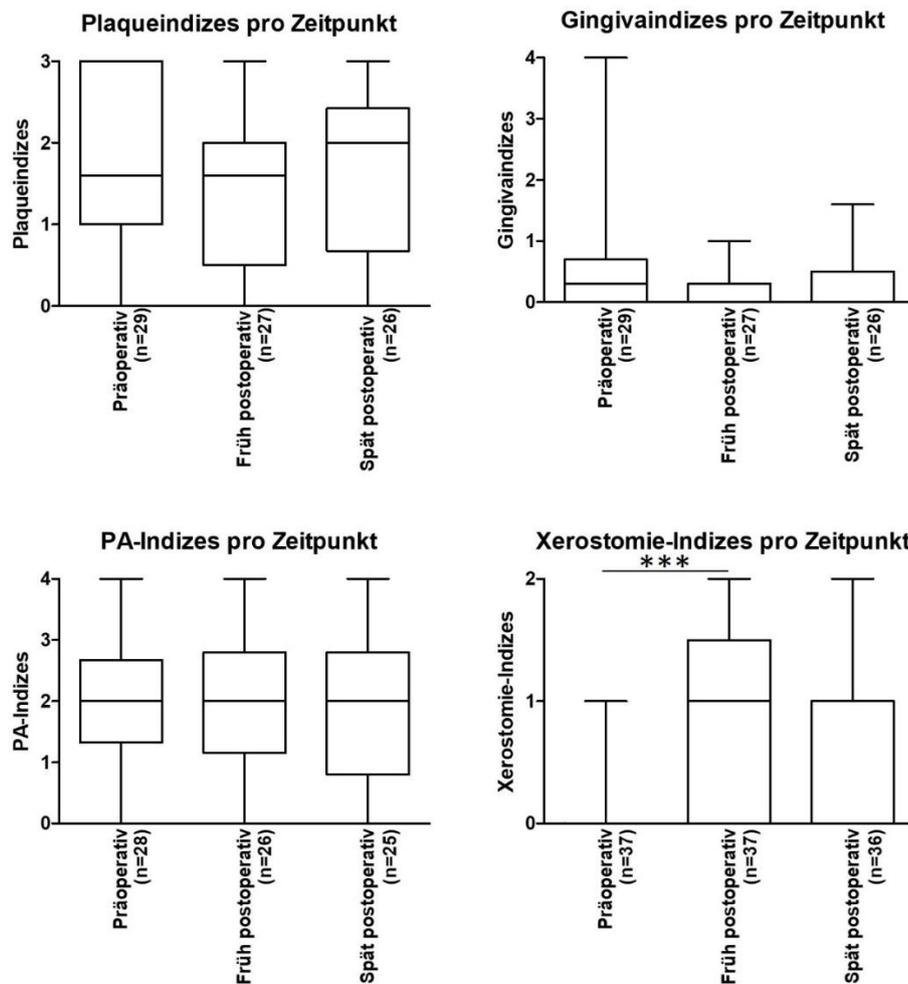


Abb.: 21: Perioperative Plaque-, Gingiva-, PA- und Xerostomie-Indizes aller in die Analyse miteinbezogenen Studienpatienten zu drei perioperativen Zeitpunkten

Bei einigen Patienten konnten Plaqueindex, Gingivaindex und PA-Index nicht erhoben werden: Bei acht Patienten war (wegen Zahnlosigkeit (n=7) bzw. retiniertem Wurzelrest (n=1)) keine Messung im Bereich der Zähne möglich, während bei zwei Patienten wegen postoperativer Zahnlosigkeit keine postoperative Messung möglich war. Ein Patient wurde wegen Transplantatverlust aus allen spät-postoperativen Analysen ausgeschlossen und ein weiterer Patient verweigerte die parodontale Messung.

Für den Plaqueindex, Gingivaindex und PA-Index gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten. Dagegen lagen bezüglich des Xerostomie-Indexes früh-postoperativ bei einem Großteil der Studienteilnehmer deutlich erhöhte Werte im Vergleich zur Ausgangssituation vor. Dieser postoperative Anstieg der Xerostomie-Indizes zeigte sich im Friedman-Test (bei Nicht-Normalverteilung der Messdaten) hoch signifikant ($p < 0,001$). Im postoperativen Verlauf schien sich diese früh-postoperativ eingetretene Zunahme an Xerostomien wieder zu erholen. Vom früh- zum spät-postoperativen Zeitpunkt war eine tendenzielle Abnahme der Xerostomie-Indizes zu beobachten, allerdings war das Ergebnis nicht statistisch signifikant ($p = 0,052$). Weder die untersuchten Faktoren der Mundgesundheit noch die gezeigte hoch signifikante Zunahme an früh-postoperativen Xerostomien hatte einen signifikanten Einfluss auf die Kolonisation durch die untersuchten Keime.

3.5.3 Hospitalisierungsdauer

Als ein weiterer potenzieller Einflussfaktor auf die perioperative Keimbesiedlung (insbesondere durch die typischen Krankenhauskeime *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *S. aureus* und *Enterobacteriaceae*) wurde die Hospitalisierungsdauer untersucht. Die mittlere Gesamtliegedauer aller Studienpatienten betrug 41,6 Tage (zwischen minimal 10 Tagen und maximal 109 Tagen).

Zur Beantwortung der Frage, inwiefern die Liegedauer die Keimbesiedlung beeinflusste, war jedoch weniger die Gesamtliegedauer und viel mehr die Dauer zwischen der Aufnahme und dem präoperativen Abstrich von Interesse, da präoperativ noch kaum andere potenzielle Einflussfaktoren (wie Antibiotika oder die postoperativ eingeschränkte Mundhygienefähigkeit) vorlagen. Die Differenz zwischen dem Tag der Aufnahme und dem Tag des präoperativen Abstrichs betrug für n=15 Patienten unter zwei Tagen, für n=14 Patienten zwei bis fünf Tage und für n=8 Patienten mindestens sechs Tage.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Liegedauer vor Durchführung des präoperativen Abstrichs und dem präoperativen Nachweis der untersuchten Keime (T_0 - und W_0 -Abstriche) festgestellt. Selbst eine sehr lange präoperative Liegedauer von über 15 Tagen (n= 5) bzw. über 20 Tagen (n=3) schien kein Risikofaktor für eine Besiedlung mit den untersuchten Keimen darzustellen. Es kann somit auf Basis der vorliegenden Daten nicht geschlussfolgert werden, dass eine längerfristige präoperative Hospitalisierungsdauer

mit vermehrten dermalen oder intraoralen Nachweisen bzw. erhöhten Quantitäten der untersuchten Infektionserreger einherging.

3.5.4 *M. salivarium* und Zahnbestand

Im Zuge der Analysen fiel mir auf, dass nicht alle Studienpatienten Träger von *M. salivarium* waren. Es wurden daraufhin verschiedene patientenspezifische Faktoren in Bezug auf positive Nachweise bzw. nachgewiesene Quantitäten von *M. salivarium* untersucht, um mögliche Voraussetzungen für eine Kolonisation zu ermitteln. Folgende Boxplots zeigen die intraoralen quantitativen Nachweise von *M. salivarium* in Bezug auf den Zahnbestand der Patienten.

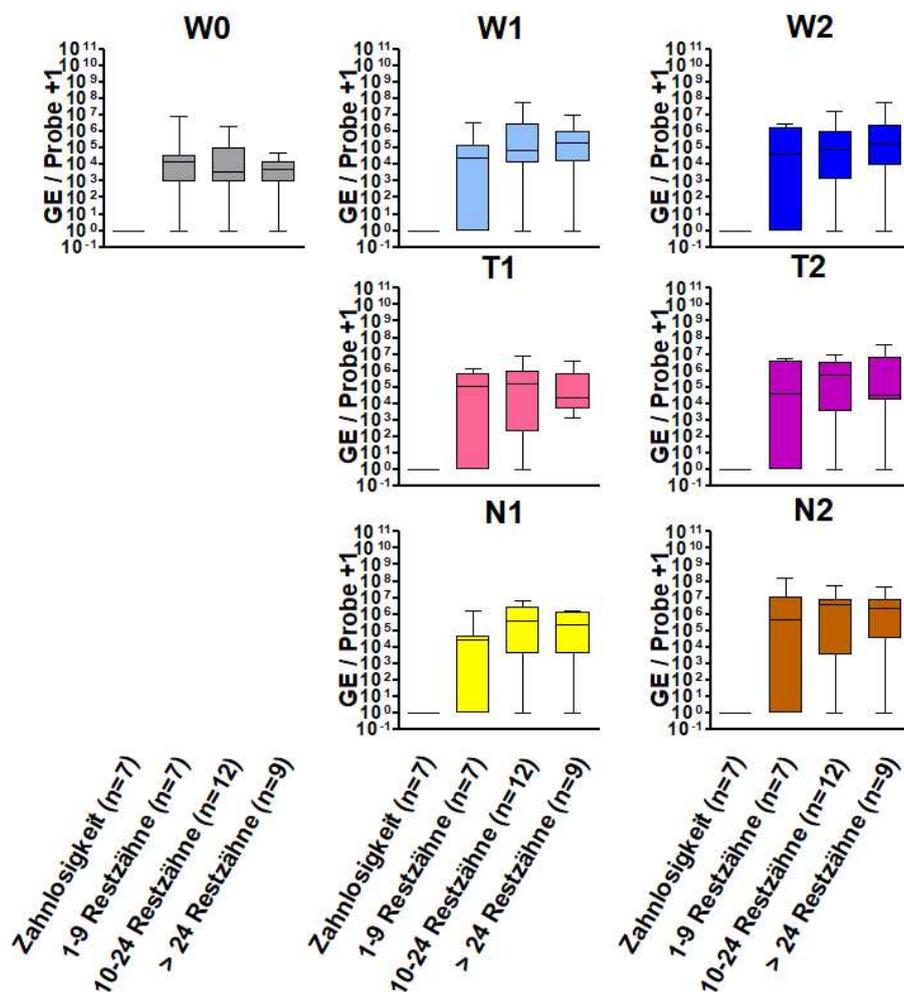


Abb. 22: Intraorale quantitative Nachweise von *M. salivarium* (am Abstrich normalisierte GE/Probe) in Bezug auf den Zahnbestand

Dargestellt sind die Nachweise auf Wangen- (W), Transplantat- (T) und Nahtabstrichen (N) zum präoperativen Zeitpunkt (0), früh-postoperativen Zeitpunkt (1) und spät-postoperativen Zeitpunkt (2); nicht inkludiert sind postoperativ zahnlose Patienten (n=2)

Unter den Studienteilnehmern waren sieben Patienten bereits zu Beginn des Untersuchungszeitraums zahnlos. Wie Abb. 22 zeigt, fehlt bei Zahnlosigkeit jeglicher positiver Nachweis von *M. salivarium*. Weder in den dargestellten je sieben intraoral entnommenen Abstrichen noch im (hier nicht dargestellten) dermalen Abstrich, die pro zahnlosen Patienten im Untersuchungszeitraum durchgeführten wurden, wurde der Keim nachgewiesen.

Allerdings war der Keim bei zwei weiteren Patienten nicht bzw. kaum nachweisbar, obwohl noch viele Restzähne vorhanden waren.

Es waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der Restzähne im Kolonisationsmuster von *M. salivarium* erkennbar. Tatsächlich hatte ein Studienpatient (Patient 37) nur noch einen einzigen Restzahn, welcher ein retinierter Wurzelrest war. Trotz des stark eingeschränkten Restzahnbestandes war *M. salivarium* intraoral bei diesem Patienten im gesamten Untersuchungszeitraum in moderater oder hoher Last nachweisbar.

Zwei Patienten (Patienten 8 und 29) wurden intraoperativ die letzten Restzähne entfernt. Sowohl früh- als auch spät-postoperativ war *M. salivarium* in moderatem und hohem Maße nachweisbar. Es gab bezüglich des Kolonisationsmusters keine Unterschiede zwischen Patienten, die erst postoperativ zahnlos waren, zu Patienten die einen (großen oder geringen) Restzahnbestand hatten. Somit scheint es folglich nach Extraktion aller Restzähne länger als den untersuchten Zeitraum anzudauern bis *M. salivarium* aus dem oralen Mikrobiom verschwindet.

Zusammenfassend schien ein Restzahnbestand somit zwar Voraussetzung für die Präsenz von *M. salivarium* zu sein; die Abwesenheit von *M. salivarium* schien jedoch andererseits nicht zwingend mit Zahnlosigkeit assoziiert zu sein. Es muss folglich noch weitere Faktoren neben Zahnbestand geben, die für eine Präsenz von *M. salivarium* essenziell sind.

3.5.5 Besiedlung extraoraler Haut im Mund

Um den Einfluss des Transfers von extraoraler Haut in die Mundhöhle und deren Besiedlung mit den ausgewählten Bakterienarten zu untersuchen, wurde eine weitere Betrachtung angestellt: Die in den einzelnen Abstrichen nachgewiesenen Pathogenlasten sollten in Relation zu einer ausgewählten Referenz untersucht werden. Da der Fokus der vergleichenden Analyse auf intraoralen perioperativen Veränderungen der Keimnachweise lag, wurde als Referenzabstrich der präoperative Wangenabstrich W_0 gewählt. Folgende Grafik zeigt die Differenz der Keimnachweise pro Abstrich zum jeweiligen entsprechenden Referenzabstrich W_0 pro Patienten:

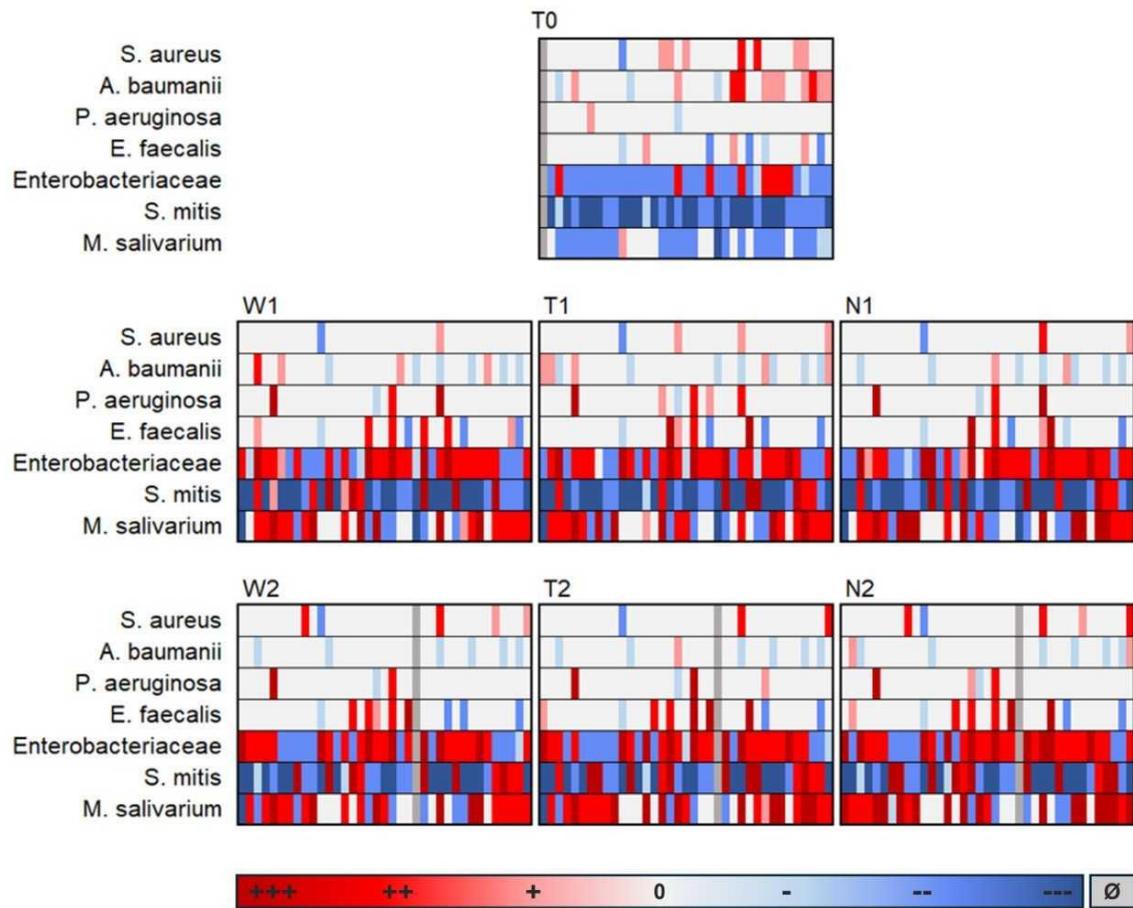


Abb. 23: **Differenzen der quantitativen Keimnachweise** der untersuchten Abstriche X (W = Wange, T = Transplantat; N = Naht; 0 = präoperativ; 1 = früh-postoperativ; 2 = spät-postoperativ) in Bezug auf Keimnachweise des entsprechenden Referenzabstrichs W_0 ($\Delta [X] - [W_0]$)
 +++ = Stark erhöhte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > 1E+06$ GE/ Probe); ++ = Moderat erhöhte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > 1E+03$ und $< 1E+06$ GE/Probe); + = Leicht erhöhte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > 0$ und $< 1E+03$ GE/ Probe); 0 = Keine positiven Nachweise; - = Leicht reduzierte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > -1E+03$ und < 0 bis GE/ Probe), -- = Moderat reduzierte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > -1E+06$ und $< -1E+03$ GE/ Probe); --- Stark reduzierte Keimlast ($\Delta [X] - [W_0] > -1E+06$ GE/ Probe); ∅ = Keine Daten vorhanden

Wie in Abb. 23 verdeutlicht, unterschied sich die Besiedlung der extraoralen Haut (präoperative Donorregion T_0) grundlegend von allen postoperativ durchgeführten Abstrichen, während sich die Besiedlung der postoperativen Abstriche (unabhängig von Lokalisation oder postoperativem Zeitpunkt) inklusive der nun intraoralen Derma (T_1 und T_2) kaum voneinander unterschieden. Umgekehrt schien es kaum eine Beeinflussung der oralen Komposition der analysierten Spezies durch die transplantierte äußere Haut zu geben. Der Einfluss des andersartigen, nicht-mukösen Gewebes auf die intraorale Besiedlung fiel somit überraschend gering aus.

4 Diskussion

Im folgenden Kapitel sollen methodische Aspekte sowie die Ergebnisse der Patientencharakteristik, der klinischen Datenerhebung und der perioperativen Keimdetektionen in einen literarischen Kontext gesetzt werden.

Überdies soll sich der eingangs beschriebenen Fragestellung angenähert werden, inwiefern es zu erklären ist, dass die in der Literatur beschriebenen typischen Erreger postoperativer Infektionen nach mikrovaskulären Transplantaten oftmals nicht Teil der üblichen residenten Mundflora sind (19, 81). Auch in der hiesigen Studie wurden tendenzielle Zunahmen der Infektionserreger *P. aeruginosa*, *E. faecalis* und *Enterobacteriaceae* beobachtet, welche nicht zur residenten Mundflora gezählt werden (21, 67, 150).

Wie also kam es zu derartigen postoperativen Vermehrungen normalerweise ortfremder Erreger in der Mundhöhle? Handelte es sich dabei um endogene Infektionen, die bereits initial Nischen der Mundhöhle (wie die dentale Plaque oder parodontale Taschen) als Reservoir genutzt hatten und sich unter günstigen Voraussetzungen wie beispielsweise bei erhöhter postoperativer Vulnerabilität vermehren konnten? Handelte es sich um „externe“ Besiedlungen, die entweder von anderen Körperarealen desselben Patienten in die Mundhöhle übertraten oder durch das nosokomiale Umfeld auf den Patienten übertragen wurden? Sind Medikationen für postoperative Veränderungen der Keimbesiedlung verantwortlich?

Die Erörterung dieser Fragestellungen erscheint grundlegend, um postoperative Veränderungen der mikrobiellen Besiedlung nach mikrovaskulären Transplantationen in Zukunft besser erklären und um Dysbiosen bzw. eventuelle Infektionen besser vermeiden zu können.

4.1 Methodik

4.1.1 PCR-Sensitivität

Wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, waren sowohl die Eubakterien-PCR als auch die *Enterobacteriaceae*-PCR mit Sensitivitäten von $1,67E+04$ bzw. $2,5E+04$ Kopien/ PCR wenig sensitiv. Es zeigten sich jeweils Amplifikationen der Negativkontrollen um den 30. Zyklus. Es ist wahrscheinlich, dass der hohe Hintergrund der beiden PCRs durch Kontaminationen der verwendeten Taq-Polymerasen mit bakterieller DNA zustande kam. Verunreinigungen kommerziell erhältlicher Polymerase-Lösungen wurden durch mehrere Studien beschrieben (151–154). Schätzungen zufolge reichen die Kontaminationen von 10-1000 Genomäquivalenten bakterieller DNA pro Einheit des Enzyms (155). Reagenzien, die mit bakteri-

eller DNA kontaminiert wurden, setzten die Sensitivität des PCR-Verfahrens herab und verhinderten somit der Detektion von bakterieller DNA in geringer Konzentration (155, 156). Einige Studien berichteten über Limitierungen im Nachweis von *E. coli* durch Kontaminationen der Polymerasen-Lösung (157–159). In der Literatur wird diskutiert, ob die bakterielle Herkunft der Taq-Polymerase durch deren Gewinnung aus *Thermus aquaticus* bzw. Klonierung und Expression in *E. coli* Ursache der bakteriellen Kontamination war. Andere Autoren legten nahe, dass Schritte während der Aufreinigung bzw. dem Enzym zugesetzte Reagenzien für die Kontamination verantwortlich waren (154, 155, 160). Da bakterielle DNA von *E. coli* sowohl in der *Enterobacteriaceae*-PCR als auch in der Eubakterien-PCR nachgewiesen würde, ist auch in der hiesigen Studie eine derartige Kontamination als Ursache für die geringe Sensitivität beider PCRs anzunehmen. Zwar sind DNA-freie Polymerasen im Handel erhältlich (Molzym GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland), allerdings war vor dem Hintergrund, dass in dieser Arbeit *Enterobacteriaceae*- und Eubakterien-Nachweise in hoher Last erwartet wurden, die limitierte Sensitivität der PCRs durch weniger kostenintensive nicht DNA-freie Polymerase tolerierbar.

4.1.2 Anzahl der Genkopien pro Genom

Um sich der Anzahl der *tuf*-Gene pro *Enterobacteriaceae*-Genom anzunähern, wurden für mehrere zufällig ausgewählte Vertreter der Familie BLAST-Analysen durchgeführt: Sowohl bei *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. enterica*, *C. brakii*, *R. electrica*, *E. hormaechei*, *E. cloacae*, *E. piscicida*, *E. ludwigii*, *Klebsiella michiganensis* und *E. albertii* lag das *tuf*-Gen jeweils zweifach pro Genom vor, während es für *C. freundii* zwei- bis dreifach vorlag. Es wurde entschieden, den Divisionsfaktor 2 zur Berechnung der *Enterobacteriaceae*-Genomäquivalente pro Probe zu wählen, um sich der tatsächlichen Anzahl der *tuf*-Gene innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* bestmöglich anzunähern. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Sela et al., die in ihrer Studie zwei Kopien des *tuf*-Genes in gramnegativen Bakterien wie z. B. *E. coli* fanden (161).

In der hiesigen Studie wurde zur Datennormalisierung anhand der Eubakterienzahl die detektierte Kopienzahl der 16S rDNA pro Probe genutzt, da aufgrund der speziesspezifisch stark variierenden Anzahl der 16S rDNA-Sequenzen pro Genom (141) eine Berechnung von Eubakterien-Genomäquivalenten nicht möglich war. Die Datenbank „rrnDB - the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database“ gibt Aufschluss über die tatsächliche Anzahl an 16S-Genkopien pro Genom einzelner Spezies (162). Die Datenbank beinhaltet zum aktuellen Stand 7203 Spezies und gibt eine Variationsbreite von 1-15 Genkopien mit einem Mittelwert von 5,3 Genkopien der 16S rDNA pro Genom an. Für *M. salivarium* liegt das Gen laut Datenbank einfach pro Genom vor, für *E. faecalis*, *S. mitis* und *P. aeruginosa* vierfach,

für *S. aureus* fünf- bis sechsfach, für *A. baumannii* sechsfach und für die *Enterobacteriaceae* zumeist sieben- bis achtfach, wobei laut der Datenbank für *Escherichia spp.* sogar bis zu elf Genkopien pro Genom möglich sind (163). Es ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die in der Arbeit ermittelten Kopienzahlen der 16S rDNA pro Probe nicht genau der Gesamtbakterienzahl entspricht, sondern letztere (entsprechend des Faktors der jeweiligen Anzahl der Genkopien pro Genom) geringer ausfällt.

4.2 Patienten und Patientenproben

4.2.1 Probensammlung

Dass in der hiesigen Studie alle postoperativen Abstriche innerhalb eines Zeitraums von maximal neun Tagen nach der Operation gesammelt wurden, ist begründet durch eine Studie von Rodrigo et al., in welcher Wundinfektionen nach tumorchirurgischen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich bereits innerhalb weniger Tage (im Mittel nach 5,2 Tagen) auftraten (80). Kawano et al. zeigten, dass es bereits zwei Tage postoperativ nach gastrointestinalen Tumorexzisionen zu signifikanten Anstiegen der Gesamtbakterienzahl auf Gingiva und *Arcus palatoglossus* kam (164). Zudem war innerhalb der ersten neun Tage postoperativ gesichert, dass sich alle Studienpatienten der hiesigen Studie noch in stationärer Behandlung befanden, wodurch die postoperativen Probensammlungen unkompliziert und lückenlos möglich waren. Allerdings traten laut Durand et al. postoperative Wundinfektionen nach mikrovaskulären Transplantationen im Kopf-Hals-Bereich noch bis zu 30 Tagen postoperativ auf (18). Dies ist eine Limitation der vorliegenden Studie, da nach der gesetzten Grenze von neun Tagen postoperativ keine Daten mehr in die Studie aufgenommen wurden.

In der hiesigen Studie zeigte sich eine verbesserte Materialentnahme dermalen Abstriche (im Bereich der Donorregion T₀) durch Befeuchten des Abstrichtupfers mittels steriler 0,9%iger Kochsalzlösung. Auch andere Autoren hatten bereits den Einfluss des Befeuchtens von Abstrichtupfern vor Durchführung von Abstrichen untersucht, kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Warnke et al. untersuchten *in vivo* sowie *in vitro*, inwiefern sich die Materialentnahme von MRSA durch Befeuchtung der Abstrichtupfer mittels steriler Kochsalzlösung verbessern ließ, und fanden sowohl im in der Studie genutzten anatomischen Nasenmodell als auch in Patientenproben keine verbesserte Materialentnahme von MRSA nach Befeuchten der Abstrichtupfer (165). Rose et al. fanden dagegen eine verbesserte Materialentnahme von *Bacillus anthracis*-Sporen von Stahlproben durch zuvor befeuchtete Abstrichtupfer mittels phosphatgepufferter Salzlösung (166). Auch Landers et al. zeigten eine verbesserte Materialentnahme durch mittels steriler Kochsalzlösung (0,9%) befeuchteter Tupfer beim Nachweis von *S. aureus* auf kontaminierten Oberflächen. (167)

In der vorliegenden Studie wurden bei 62% der Patienten die Abstriche der Donorregion mit der ursprünglichen (trockenen) Abstrichmethodik durchgeführt, während bei 38% der Patienten zuvor befeuchtete Abstrichtupfer verwendet wurden. Für nur eine einzige der sieben untersuchten Spezies war auf Basis der T₀-Abstriche ein statistisch signifikantes Ergebnis ermittelt worden (früh-postoperativer signifikanter Anstieg von *M. salivarium* auf dem Transplantat verglichen mit der präoperativen Donorregion). Da es allerdings für *M. salivarium*-Nachweise im Bereich der Donorregion keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Abstrichtechniken gab, ist die Änderung der Abstrichmethodik für Nachweise dieses Keims nicht als Limitation anzusehen. Sämtliche weiteren Studienergebnisse mit statistischer Signifikanz wurden nicht auf Basis der T₀-Abstriche, sondern allein auf Basis der pro Studienteilnehmer entnommenen sieben intraoralen Abstriche ermittelt. Da die Abstrichmethodik im Studienverlauf lediglich für dermale und nicht für intraorale Abstriche geändert wurde, gilt somit auch für alle weiteren Ergebnisse keine durch die Abstrichmethodik bedingte Limitation.

4.2.2 Patientencharakteristik

Die Studienpatienten waren zu 51% weiblich und zu 49% männlich. Die annähernd ausgeglichenen Anteile an männlichen und weiblichen Studienteilnehmer waren ungewöhnlich: Laut Literatur sind Männer aufgrund einer höheren Exposition von Risikofaktoren 1,5-fach häufiger und zwei bis drei Jahre früher als Frauen von Krebs im Mundbereich betroffen (45, 168). Im Durchschnitt waren die Studienpatienten 65,3 Jahre alt, was sich mit dem Durchschnittsalter in vergleichbaren Studien deckt (169, 170). Die Patienten wiesen einen BMI von durchschnittlich 25,4 auf, während in vergleichbaren Studien etwas niedrigere BMIs zwischen 21,6 und 24,6 angegeben wurden (28, 37, 169). Der ASA-Score unserer Studienpatienten wurde am häufigsten mit einem Score von I oder II angegeben (63%), während seltener die Scores III oder IV angegeben wurden (37%), wobei ASA IV mit 5% am seltensten angegeben wurde. Dies deckt sich mit ASA-Scores von Patienten vergleichbarer Studien (78, 169). Für Patienten, bei denen eine Tumorexzision die primäre Indikation für die Defektdeckung mit Transplantat darstellte, wurde für geringfügig mehr Patienten ein geringeres Tumorstadium (Stage 1 oder 2) als ein höheres Tumorstadium (Stage 3, 4 oder Rezidiv) angegeben. Dagegen beschrieben Chen et al., dass mikrovaskuläre Transplantate zur Defektdeckung nach Tumorexzision tendenziell eher bei Tumoren mit einem höheren Staging zum Einsatz kamen (56).

Die Literatur lieferte Hinweise, dass sich BMI, ASA-Score und Tumorstadium auf die Transplantatprognose auswirken konnten. Laut Bartella et al. ging ein erhöhter BMI mit einem erhöhten Risiko für postoperative Infektionen nach Operationen im Kopf-Hals-Bereich einher (28). Ein erhöhter ASA-Score erhöhte laut Karakida et al. und Kruse et al. die Infektions-

bzw. Sterberaten von mikrovaskulären Transplantaten im Kopf-Hals-Bereich signifikant (169, 171). Laut Sato et al. und Karakida et al. gab es Hinweise, dass hohe Tumorstadien von 3 oder 4 mit einer signifikant erhöhten Infektionsrate nach Tumorexzision im Kopf-Hals-Bereich einhergingen (36, 169). In der hiesigen Studie war die Probenzahl jedoch nicht ausreichend, um statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem BMI bzw. der ASA-Score bzw. dem Tumorstadium und Transplantatkomplikationen herzustellen.

Als häufigste Defektlokalisation wurde in unserer Studie der Unterkiefer (32%) bzw. Oberkiefer/ Gaumen (19%) angegeben. Laut den Arbeitsgruppen Tahir et al. und Chen et al. zählten zu den häufigsten Tumorlokalisationen im Mundraum die bukkale Schleimhaut (32,4%-35%), die Zunge (10,8-21,6%), der Gaumen (10,8%), die Unterlippe (10,8%) sowie das Vestibulum 8% (56, 172).

Als häufigste Transplantatart wurde in der vorliegenden Studie mit 71% das Radialis-Transplantat genutzt, während bei 26% das Fibula-Transplantat und in einem einzigen Fall das ALT-Transplantat zum Einsatz kam. Nach Pohlenz et al. wurden in Deutschland zwischen 1987 und 2010 zur Defektdeckung im kieferchirurgischen Bereich 28% Latissimus dorsi-Transplantate, 27% Radialistransplantate, 20% Beckenkammtransplantate, 12% Fibulatransplantate, 6% Jejunumtransplantate, 2% ALT-Transplantate und 5% andere Transplantate genutzt (39). Radialis-Transplantate waren somit in der vorliegenden Studie überrepräsentiert, was vermutlich darin zu begründen ist, dass viele verhältnismäßig kleine Defekte mit geringen Tumorstadien miteingeschlossen wurden.

4.2.3 Entzündungsparameter

Weder das bei 38% der Studienpatienten postoperativ festgestellte Fieber noch die in der Studie beobachteten postoperativ hoch signifikanten Anstiege der Leukozytenzahl bzw. der Plasmakonzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP) standen in signifikantem Zusammenhang mit der Keimbesiedlung oder dem Vorliegen klinisch erkennbarer Zeichen einer Infektion. Dies ist mit der gängigen Literaturlage konsistent, wonach Fieber, Leukozytosen und CRP-Erhöhungen in der frühen postoperativen Phase häufig auftraten und unabhängig von infektiösen Geschehnissen eine normale Reaktion des Körpers auf umfangreiche chirurgische Eingriffe darstellten (173–179). Laut Neumaier et al. gingen stark invasive Eingriffe mit ausgeprägteren früh-postoperativen CRP-Erhöhungen einher als wenig invasive Eingriffe (180). Die postoperativen CRP-Verläufe unserer Studienpatienten zeigten ein Bild, welches sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie deckte: Laut Santonocito et al. erreichten die CRP-Werte nicht-infizierter Patienten nach chirurgischen Eingriffen zum zweiten oder dritten postoperativen Tag ein Maximum und sanken daraufhin zum siebten postoperativen Tag wieder signifikant ab, wobei die Ausgangswerte noch nicht erreicht wurden und eine stärkere Streuung der Werte zu beobachten war als präoperativ (178).

4.2.4 Komplikationen

Es trat in der hiesigen Studienkohorte von 37 Patienten lediglich bei einem Patienten eine postoperative Infektion sowie bei einem weiteren Patienten eine Wunddehiszenz im extraoral gelegenen Bereich des Transplantats auf. Diese Wundinfektionsrate bzw. Dehiszenzrate von jeweils 3% liegt deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Werten von 13,3 bis 40,6% für Infektionen (60, 81, 82, 169, 170) bzw. 14 bis 29% für Dehiszenzen (7, 39). Ein möglicher Erklärungsansatz für das seltenere Auftreten von derartigen Komplikationen ist eine zeitliche Überschneidung der Probensammlung von April 2021 bis Januar 2023 mit den zusätzlichen im Rahmen der Covid-19-Pandemie eingeführten Hygieneschutzmaßnahmen. Eine weitere Erklärungsansatz ist der große Anteil von in die Studie eingeschlossenen Patienten mit geringeren Tumorstadien (I oder II). Laut Yang et al. hatten 78% der Patienten mit postoperativen Infektionskomplikationen nach Tumorexzision ein Tumorstadium III oder IV (79). Auch die Nicht-Überlebensrate von Transplantaten war innerhalb unserer Stichprobe sehr gering (3%), wobei übereinstimmend dazu auch in der Literatur komplette Transplantatverluste bei mikrovaskulären Transplantaten selten vorkamen (5 bis 8%) (39, 43, 56).

Da bei nur einem Studienteilnehmer eine postoperative Infektion im Bereich des Transplantats auftrat, war es im Rahmen der Studie nicht möglich, statistisch signifikante Aussagen darüber zu treffen, inwiefern sich postoperative Infektionen auf die intraorale mikrobielle Besiedlung auswirkten. Es war jedoch erkennbar, dass es in vielen Fällen postoperativ zu einem intraoralen Zuwachs infektionsrelevanter Keime wie *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* kam, unabhängig davon, ob klinisch (schon) eine Infektion erkennbar war oder nicht.

4.2.5 Molekulargenetische und kulturelle Nachweise im Vergleich

Für sieben Studienpatienten erfolgten postoperativ (zusätzlich zur im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführten molekulargenetischen Analyse) Nachweise im Kulturverfahren sowie Resistenzbestimmungen, welche durch die Klinik für Mund-, Kiefer und Plastische Gesichtschirurgie zu Diagnostikzwecken in Auftrag gegeben wurden. Folgende Tabelle 17 zeigt die nachgewiesenen Spezies und jeweiligen Resistenzen:

Tabelle 17: Im Kulturverfahren nachgewiesene Spezies und Resistenzen pro Patienten Dargestellt sind außerdem Art, Lokalisation und Zeitpunkt der Probenentnahmen pro Patienten

Patient	Art / Lokalisation der Probenentnahme	Tag (postoperativ)	Kulturnachweise	Resistenzen
1	Abstrich / zervikal	3	<i>K. aerogenes</i> ¹	S
			<i>E. coli</i> ¹	S
5	Abstrich / zervikal	7	<i>P. aeruginosa</i>	S
			<i>E. cloacae</i> ¹	S
11	Gewebe / infraorbital	1	<i>E. coli</i> ¹	Ampicillin-R, Amoxicillin-R, Ampicillin+Sulbactam-R, Piperacillin-R
			<i>P. vulgaris</i>	Ampicillin-R, Amoxicillin-R, Piperacillin-R, Imipenem-R, Moxifloxacin-R
			<i>S. aureus</i>	Penicillin-R
17	Abstrich / zervikal	6	<i>E. coli</i> ¹	S
			<i>E. faecalis</i>	S
23	Abstrich / zervikal	7	<i>K. oxytoca</i> ¹	Ampicillin-R, Amoxicillin-R, Piperacillin-R
28	Abstrich / zervikal	3	<i>E. coli</i> ¹	S
29	Abstrich / zervikal	5	<i>K. oxytoca</i> ¹	Ampicillin-R, Amoxicillin-R, Piperacillin-R

R = resistent; S = sensitiv gegen alle getesteten Antibiosen

¹ Vertreter der *Enterobacteriaceae*

Obwohl die Proben zum kulturellen Nachweis allesamt extraoral entnommen wurden und somit die Lokalisation zu keinem Zeitpunkt den (postoperativ nur intraoral abgenommen) Proben zum molekulargenetischen Nachweis entsprachen, deckten sich die kulturellen Nachweise größtenteils mit den molekulargenetischen. Lediglich die in der Kultur nachgewiesenen *K. oxytoca* und *E. cloacae* wurden in der molekulargenetischen Analyse nicht sicher wiedergegeben (die *Enterobacteriaceae*-TaqMan-PCR lieferte Nachweise unterhalb der sicheren Nachweisgrenze). Eine Begründung kann einerseits die geringe PCR-Sensitivität der *Enterobacteriaceae*-PCR sein. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Lokalisationen der Probenentnahmen zurückzuführen sind. Nichtsdestotrotz deckten sich alle in der Kultur positiven Nachweise

von *K. aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* mit den Ergebnissen der molekulargenetischen Analyse. Positive Nachweise von *Proteus vulgaris* wurden in der molekulargenetischen Analyse nicht miterfasst.

4.3 Präoperative Kontrollabstriche (W₀ und T₀)

Die präoperativen Abstriche der Donorregion (T₀) und der oralen Wangenschleimhaut (W₀) dienten in dieser Arbeit als Kontrollabstriche, um postoperative Veränderungen der Keimbildung zu bewerten und den Einfluss der transplantierten äußeren Haut auf die orale Keimbildung zu untersuchen. Im Folgenden werden die präoperativen Nachweise diskutiert:

S. aureus wurde in dieser Studie im Bereich der Donorregion bei 23% der Patienten nachgewiesen, was mit der Literaturlage übereinstimmt, wonach *S. aureus* bei 20-50% der Bevölkerung auf der äußeren Haut vorkommt (75, 93, 181). In Übereinstimmung mit unseren Daten wurden in einer Studie auch sehr geringe Quantitäten von *Staphylococcus spp.* auf dem Unterarm bzw. Unterschenkel gefunden (182). Die orale Prävalenz von *S. aureus* bei Gesunden wurde von McCormack et al. mit 18% (183) und von Campos et al. mit 23,8% (184) angegeben. Lam et al. gaben Prävalenzen in oralen Biofilmproben gesunder Patienten von 0 bis 7% an, während Parodontalerkrankungen die Prävalenz auf bis zu 50% steigern konnten. Die von mir nachgewiesene präoperative orale Prävalenz von *S. aureus* ist mit 3% verhältnismäßig gering und entspricht somit den Daten der Arbeitsgruppe Lam. Die geringe Prävalenz mag daran liegen, dass nicht die bukkale Wangenschleimhaut sondern eher der nasopharyngeale Bereich als typische Besiedlungsstelle für *S. aureus* gilt (93). Es sei anzumerken, dass das in dieser Studie genutzte Nachweisverfahren für *S. aureus* nicht zwischen MSSA und MRSA differenzierte. Mit den genutzten Primern und Sonden wurden beide gleichermaßen erfasst (185, 186).

E. faecalis wurde in dieser Studie im Bereich der Donorregion bei 19% der Studienpatienten nachgewiesen. Es ist bekannt, dass *E. faecalis* die äußere Haut besiedeln und nosokomial zu Schmierinfektionen führen kann (187, 188), allerdings liefert die Literatur nach meinen Recherchen kaum Daten zur dermalen Prävalenz des Keims bei Gesunden. In unserer Studie betrug die Prävalenz im Bereich der bukkalen Wangenschleimhaut 14%, was sich mit Angaben der Literatur deckt: Die angegebene orale Prävalenz bei Gesunden variierte in der Literatur zwischen 3,5% und 20% (189–191), wobei Faktoren wie parodontale Erkrankungen oder endodontologischer Behandlungsbedarf die Häufigkeit der Nachweise erhöhten (21, 192, 193). Yang et al. beschrieben, dass eine bereits präoperativ vorliegende orale Kolonisation mit *E. faecalis*, das Risiko erhöhte, nach mikrovaskulärer Transplantation eine Infektion durch eben diesen Keim zu erleiden. (79)

P. aeruginosa wurde in der vorliegenden Studie präoperativ nur in Einzelfällen nachgewiesen, wobei die Prävalenz sowohl dermal als auch oral 3% betrug. Dieses Ergebnis ist mit der Literatur übereinstimmend: Laut Staudinger et al. kann der Keim zwar als transienter Bewohner die äußere Haut besiedeln, allerdings wurden Vertreter der *Gamma*proteobacteria, zu denen auch *P. aeruginosa* gezählt wird, in Unterarmabstrichen gesunder Probanden nur sehr selten nachgewiesen (194). Die orale Prävalenz des Keims wurde laut Kenneth et al. bei Gesunden mit 2 bis 10% beschrieben, wobei im nosokomialen Umfeld höhere Prävalenzen vorliegen können (100).

Nachweise von ***A. baumannii*** auf der äußeren Haut sind eher selten (109, 194, 195). Eine Studie beschrieb die dermalen Prävalenz des Keims unter obdachlosen Studienteilnehmern mit 4 bis 5% (195). Zwar lag die in der hiesigen Studie ermittelte dermale Prävalenz von 31% deutlich höher, jedoch lagen alle Nachweise des Keims unterhalb der sicheren Nachweisgrenze und sind daher eher fraglich. Andererseits ist auch denkbar, dass, wie von Ryan et al., Schleicher et al. und Moubareck et al. beschrieben, der Zustand der Hospitalisierung zu erhöhten Prävalenzen niedrigtitriger Nachweise auf der Haut führte (100, 108, 109). Oropharyngeale Nachweise von *A. baumannii* wurden hingegen regelmäßig beschrieben (20, 109, 196). In unserer Studie wurde der Keim in den oralen Kontrollabstrichen bei 19% der Patienten nachgewiesen, was sich mit der laut Duman et al. beschriebenen oralen Prävalenz von 22% bei hospitalisierten Patienten deckt (197).

In der hiesigen Studie waren 89% der Hautabstriche (T_0) und 95% der intraoralen Wangenabstriche (W_0) in der ***Enterobacteriaceae***-PCR schwach positiv (d.h. die Quantität aller Nachweise lag unterhalb der sicheren Nachweisgrenze der PCR, aber oberhalb der Negativkontrolle). Staudinger et al. beschrieben dagegen die dermale Prävalenz von *Gamma*proteobacteria, unter die die *Enterobacteriaceae* fallen, als gering (194) und die oralen Prävalenzen für *Enterobacteriaceae* variierten je nach Literaturangabe sehr stark. Gramnegative Mikroorganismen kolonisierten laut Durman et al. die Mundhöhle unter 10% bei Gesunden, jedoch bis zu 75% bei Intensivpatienten (197). Eine Übersichtsarbeit von Sedgley et al. fasste die Ergebnisse mehrerer Studien zusammen und gab bei gesunden Erwachsenen orale Prävalenzen an *Enterobacteriaceae* von 0 bis 41% an. Die Autoren gaben allerdings zu bedenken, dass bei gesundheitlicher Beeinträchtigung die Prävalenzen deutlich höher ausfallen könnten, da der allgemeine und intraorale Gesundheitszustand eine große Rolle für die Kolonisation mit *Enterobacteriaceae* spiele. Erhöhte Keimtiter bzw. Prävalenzen seien im Zusammenhang mit Xerostomie, Radiotherapie, Chemotherapie, Hospitalisierung, HIV und Parodontitis nachgewiesen worden (105). Es ist somit möglich, dass in unserer Stichprobe aufgrund von schwerer Krankheit, eventuellen Vorbehandlungen und Hospitalisierung höhere Prävalenzen als bei Gesunden auftraten. Aufgrund der geringen PCR-Sen-

sitivität der *Enterobacteriaceae*-PCR ist es wichtig, jegliche Nachweise der Keimfamilie unterhalb der sicheren Nachweisgrenze kritisch zu hinterfragen.

Dermale Nachweise von ***S. mitis*** waren in dieser Studie bei 78% der Studienpatienten möglich und sind auch in der Literatur hinreichend bekannt (75, 181, 198). Gao et al. wiesen mittels *Streptococcus spp.* vom Unterarm bzw. Unterschenkel in Quantitäten von 1,00E+02 bzw. 9,33E+01 Kopien/ μ l nach. (182). Die an den entsprechenden Stellen in unserer Studie nachgewiesenen Quantitäten von *S. mitis* waren somit mit 4,81E+02 bzw. 1,21E+04 Kopien/PCR vergleichsweise hoch. In den oralen Kontrollabstrichen wurde bei ausnahmslos jedem Patienten *S. mitis* nachgewiesen. Dass der Keim regelmäßig auf der Wangenschleimhaut anzutreffen ist und bei nahezu allen Gesunden oral nachweisbar ist, wurde bereits in der Literatur beschrieben (199–201). Laut Decsi et al. nahm *S. mitis* auf gesunder Mucosa mit 32,7% einen sehr relevanten Anteil an der Gesamtbakterienzahl ein und machte über die Hälfte der oralen Nachweise an *Streptococcus spp.* aus (89).

Laut Literatur konnten Tumorerkrankungen bzw. Tumorstufen im Mundraum zwar die orale Prävalenz von *S. mitis* beeinflussen, allerdings scheinen diese Auswirkungen sich nur auf den direkten Bereich der Läsion zu beschränken, während die umliegende gesunde Schleimhaut nicht betroffen ist: Decsi et al. zeigten, dass die relativen Anteile von *S. mitis* auf der Oberfläche von oralen Tumorstufen (engl. *Oral potentially malignant disorders*) im Vergleich zur ipsilateralen gesunden Mucosa signifikant reduziert waren (89). Auch Amer et al. zeigten signifikant geringere relative Anteile von *S. mitis* auf der Oberfläche oraler Leukoplakien im Vergleich zur kontralateralen gesunden Mucosa (90). Andere Autoren zeigten, dass die Last an *Streptococcus spp.* auf der Tumoroberfläche signifikant reduziert war im Vergleich zur gesunden Schleimhaut (30, 202). Da in der vorliegenden Studie die dem Defekt kontralateral gelegene bukkale Schleimhaut als präoperativen oralen Kontrollabstrich gewählt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die *S. mitis*-Last in dieser Region wenig durch mögliche Tumorerkrankungen beeinflusst wurde.

M. salivarium wurde in dieser Studie vor Intervention auf der Haut (T_0) bei 14% der Patienten in sehr geringer bzw. selten in moderater Last nachgewiesen und in den oralen Kontrollabstrichen (W_0) bei 70% der Patienten detektiert. Obwohl die Literatur nach meinen Recherchen keine Studien zur Besiedlung der äußeren Haut durch *M. salivarium* enthält, decken sich die oralen Befunde mit der Literaturlage: *Mycoplasma spp.* wurden laut Watanabe et al. bei 97% der Gesunden im Speichel nachgewiesen, wobei *M. salivarium* und *M. orale* dabei als häufigste Vertreter genannt wurden. *M. salivarium* ist somit Teil der gesunden Mundflora und gilt als Kommensale (114, 115). Eine Studie aus dem eigenen Hause legte nahe, dass *M. salivarium* möglicherweise ideale Bedingungen im Bereich tumoröser Läsionen im Mundraum findet, da eine signifikant erhöhte Last an *M. salivarium*

auf Fanconi-Anämie-assoziierten oralen Plattenepithelkarzinomen gefunden wurde, während gesunde Mundareale der Tumorpatienten vornehmlich durch *P. aeruginosa* besiedelt waren (118).

4.4 Postoperative Störung der Keimbesiedlung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass sowohl die untersuchten Kommensalen der Mundflora als auch einige potenzielle Infektionserreger im postoperativen Verlauf in ihrer Prävalenz und Quantität beeinflusst bzw. gestört wurden.

Als Vertreter der gesunden Mundflora war die Spezies *S. mitis* ausgewählt worden, da sie laut Literatur stark mit oraler Gesundheit assoziiert ist. Einige der Mundgesundheit zuträglichen Effekte wie der Schutz des Parodonts vor Gewebeschädigung und die Hemmung von Pathogenen wurden beschrieben (71, 85–88). Zudem zeigten mehrere Autoren, dass die orale Besiedlung des Keims in dysbiotischen Zuständen und im Zusammenhang mit Erkrankungen reduziert ist (siehe Kap. 1.4.1), weshalb er ggf. als Indikatorkeim für orale Dysbiosen dienen kann (88–91). Eine orale Dysbiose ist als eine Störung der Zusammensetzung des oralen Mikrobioms definiert, die mit Verschiebung hin zu einem höheren Anteil an pathogenen Keimen sowie einem Verlust der Diversität einhergeht (88). Zwar kann aufgrund der limitierten Anzahl an ausgewählten Keimen in dieser Studie eine postoperativ vorliegende Dysbiose nicht sicher belegt werden, allerdings geben die postoperativ signifikant verringerten Nachweise des gesunden Mundkeims *S. mitis* bei gleichzeitigen Zunahmen der Infektionserreger *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Enterobacteriaceae* sowie des als selten infektionsrelevant beschriebenen Kommensalen der Mundflora *M. salivarium* starke Hinweise auf eine postoperative Dysbiose. Dieser Hypothese könnte in weiterführenden Mikrobiomanalysen nachgegangen werden, die zwar kostenintensiver wären, jedoch tiefergehende Erkenntnisse über mikrobielle Veränderungen und Kompositionsverschiebungen liefern würden.

4.4.1 Selektion durch Antibiosen

Es ist bekannt, dass Antibiotika sogenannte chemisch induzierte Dysbiosen fördern können. Durch die bakteriostatische oder bakterizide Wirkung eines Antibiotikums werden sensible Spezies eingedämmt, während resistente Spezies Selektionsvorteile erhalten, was deren Vermehrung fördern kann (203–206). Da die vorliegende Studie zeigt, dass es nach oralen mikrovaskulären Transplantationen zur Entstehung von postoperativen oralen Dysbiosen kommen kann, muss die Frage gestellt werden, welche Rolle Antibiotika in dem Zusammenhang spielten. Die Abb. 24 zeigt die in der Literatur angegebenen Suszeptibilitäten der Antibiosen auf die untersuchten Keime (207–209).

	<i>S. aureus</i> MSSA	Viridans-Streptokokken	<i>E. faecalis</i>	Enterobacteriaceae	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>M. salivarium</i>
Ampicillin/ Sulbactam	+	±	+	+/-	-	±	-
Piperazillin/ Tazobactam	+	±	+	+/-	+	±	-
Clindamycin	+	±	-	-	-	-	±

	<i>C. freundii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i> (S)	<i>Klebsiella spp.</i> (S)	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>
Ampicillin/ Sulbactam	-	-	-	+	+	-	+
Piperazillin/ Tazobactam	-	+	-	+	+	-	+
Clindamycin	-	-	-	-	-	-	-

+	Sehr gute Wirksamkeit
±	Gute bis mäßig gute Wirksamkeit
+/-	Wirksamkeit variiert innerhalb der Gruppe
-	Keine oder schlechte Wirksamkeit

Basierend auf Angaben von Sanford Guide inkl. infektiöStandard, Leitfaden Antinfektiva und Infektionserkrankungen UKD und © Karow/Lang „Pharmakologie & Toxikologie“ in Kooperation mit AMBOSS

Abb. 24: **Suszeptibilitäten der verabreichten Antibiotika**

Dargestellt werden die Wirksamkeiten der in der hiesigen Studie regelmäßig verabreichten Antibiotika auf die untersuchten Keime (A) bzw. auf exemplarisch ausgewählte Vertreter der Enterobacteriaceae (B); S = sensitiv

Die Analyse prozentualer Anteile der untersuchten Keime an der Gesamtbakterienzahl hatte gezeigt (siehe Abb. 19), dass der gesunde Mundkeim *S. mitis* im präoperativen Wangenabstrich noch vielfach vertreten war, während er im postoperativen Verlauf der Kolonisation durch andere Keime weichen musste. Längerfristige Ampicillin/Sulbactam-Gaben von mindestens drei Tagen führten zu starken Eindämmungen des Keims und drastischen Reduzierungen dessen Anteils an der Gesamtbakterienzahl. Auch kurzfristige Antibiosen von Ampicillin/Sulbactam gingen mit signifikanten Reduzierungen der *S. mitis*-Last einher. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Singh et al. überein, die 2022 in ihrer groß angelegten Übersichtsarbeit die Suszeptibilitätsraten von *S. mitis* über den Zeitraum von 2010 bis 2020 gegenüber Ampicillin mit 81,0% angaben (210).

Dagegen nahm in unserer Studie bei Ampicillin/Sulbactam-Medikationen von mindestens drei Tagen die Kolonisation von *M. salivarium* drastisch zu, sodass teilweise sehr hohe Anteile von über 80% an der gesamtbakteriellen Last erreicht wurden. Somit können *S. mitis* und *M. salivarium* nach längerfristiger Ampicillin/Sulbactam-Gabe als Gegenspieler betrachtet werden. Dass *M. salivarium* nach Medikation mit Ampicillin/Sulbactam starke Zunahmen zeigte, erscheint naheliegend, da der Keim als zellwandloses Bakterium nicht auf das zellwandwirksame Beta-Laktam-Antibiotikum anspricht (211–213). Somit kann eine Vermehrung des Keims durch einen Selektionsvorteil gegenüber den sensiblen Bakterien

(wie Streptokokken) erklärt werden. Tetrazykline, Fluorchinolone, Lincosamide und Macrolide wurden als effektivste Antibiotika gegen *Mycoplasma spp.* angegeben (213, 214). Chernova et al. berichteten allerdings auch über eine schnelle Resistenzbildung der Gattung, welche vermutlich auf horizontalen Gentransfer von Plasmiden und mobilen genetischen Elementen zurückzuführen ist (213). Die Literatur lieferte bislang nur wenige Hinweise auf die Antibiotika-Suszeptibilität von *M. salivarium*. Xiao et al. zeigten 2022, dass Clindamycin *in vitro* die effektivste Wirkung gegen *M. salivarium* zeigte, gefolgt von Tetrazyklinen und Levofloxacin, während Erythromycin eine schlechte Wirksamkeit aufwies (129). Die beschriebene gute Suszeptibilität auf Clindamycin deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie: Die orale Präsenz von *M. salivarium* zeigte sich bei Patienten mit Clindamycin-Medikation innerhalb der letzten 24 h tendenziell reduziert gegenüber jener von Patienten ohne Antibiose innerhalb 24h. Nach über dreitägiger Medikation mit Clindamycin waren praktisch keine relevanten Anteile des Keims an der Gesamtbakterienzahl erkennbar.

Sowohl *A. baumannii* als auch *S. aureus* wurden in der vorliegenden Studie nur selten bzw. in sehr geringen Quantitäten nachgewiesen, sodass keine Aussagen zum Einfluss der verabreichten Antibiosen auf die perioperative Kolonisation getroffen werden können.

Gegenüber der gesamten Familie der *Enterobacteriaceae* ist Clindamycin schlecht wirksam, während auch Ampicillin/Sulbactam bzw. Piperazillin/Tazobactam gegenüber vielen Vertretern der Bakterienfamilie keine gute Wirksamkeit aufweist. Auch *P. aeruginosa* wird weder durch Clindamycin noch durch Ampicillin/Sulbactam wirksam gehemmt (207–209). Dies begründet, warum in der vorliegenden Studie erhöhte Nachweise von *Enterobacteriaceae* oder *P. aeruginosa* unabhängig von der Wahl bzw. Dauer der Antibiose auftraten. Es kann überdies gemutmaßt werden, dass durch die verabreichten Antibiosen postoperative Anstiege von *P. aeruginosa* und Vertretern der *Enterobacteriaceae* durch Selektionsvorteile gegenüber sensitiven Spezies begünstigt wurden.

Dagegen ist eine gute Wirksamkeit von Ampicillin/Sulbactam gegenüber *E. faecalis* bekannt. Dazu übereinstimmend schien in der vorliegenden Studie eine prolongierte Ampicillin/Sulbactam-Gabe vor postoperativen Anstiegen des Keims zu schützen. Dies ist jedoch lediglich als Tendenz zu werten, da keine statistische Signifikanz vorlag. Es sind Untersuchungen in größerer Stichprobenzahl notwendig, um eindeutige Aussagen über die infektiionsprophylaktische Wirkung einer kurzfristigen oder prolongierten Antibiotikagabe gegenüber postoperativen *E. faecalis*-Vermehrungen zu untersuchen.

Es kann festgehalten werden, dass die Wahl bzw. Dauer einer verabreichten Antibiose für keinen der untersuchten typischen Infektionserreger postoperativer Infektionen einen signifikanten Effekt hatte. Demgegenüber steht, dass die in dieser Studie beobachteten, dysbi-

otischen Reduzierungen des gesunden Mundkeims *S. mitis* in signifikantem Maße von postoperativen Antibiotikagaben (insbesondere von Ampicillin/Sulbactam) mitbestimmt wurden. Auch für die in der Studie beobachteten postoperativen Anstiege von *M. salivarium* ist anzunehmen, dass diese in bedeutendem Umfang durch (insbesondere prolongierte) Medikationen mit Ampicillin/Sulbactam begünstigt wurden. Daher sollte sich kritisch mit standardmäßigen Antibiosen nach mikrovaskulären Transplantationen im Mundraum auseinandergesetzt werden. Obwohl Antibiotikaprophylaxen bei chirurgischen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich bereits in zahlreichen Studien untersucht wurden, gibt es nach wie vor kontroverse Ansichten bezüglich der Wahl und Länge der Antibiose. Laut Literatur werden 30-80% von tumorchirurgischen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich antibiotisch abgedeckt, wobei eine Antibiotikaprophylaxe das Risiko einer postoperativen Infektion drastisch senken kann (77, 215). Laut Durand et al. hat dabei allerdings die Wahl der Antibiose zur Infektionsprophylaxe starke Auswirkungen auf die Entstehung von postoperativen Infektionen nach mikrovaskulären Transplantationen im Kopf-Hals-Bereich: Laut den Autoren war das Risiko, eine postoperative Wundinfektion zu erleiden, bei Medikation mit Clindamycin mehr als verdoppelt im Vergleich zu Ampicillin/ Sulbactam, Cefazolin und anderen Antibiotika. Grund hierfür war unter anderem die hohe Inzidenz von gramnegativen Stäbchen nach Clindamycin-Medikation. Die Autoren gingen so weit, Clindamycin als Risikofaktor für die Entstehung einer postoperativen Infektion zu benennen (81). Auch andere Studien berichteten über ein erhöhtes Risiko einer postoperativen Wundinfektion nach Antibiotikaprophylaxe mit Clindamycin (216, 217). Da in der hiesigen Studie nur sehr geringe Komplikationsraten auftraten, können keine Aussagen darüber getroffen werden, inwiefern die Wahl oder Dauer einer Antibiose die Entstehung von postoperativen Wundinfektionen beeinflusste bzw. wie viele postoperative Wundinfektionen beim Patientenkollektiv durch die verabreichten Antibiosen wirksam verhindert werden konnten. Allerdings zeigt die vorliegende Studie, dass insbesondere längerfristige Antibiotikagaben von über drei Tagen Dysbiosen zu fördern schienen. Somit gilt es, insbesondere die Notwendigkeit einer prolongierten postoperativen Antibiotikagabe hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen und Resistenzbildungen kritisch zu hinterfragen. Laut Bartella et al. schien die Dauer der Antibiose keinen Einfluss auf die Entstehung von postoperativen Wundinfektionen nach kieferchirurgischen Eingriffen zu haben. Eine prolongierte postoperative Antibiotikagabe als Infektionsprophylaxe schien keinen Vorteil gegenüber einer rein perioperativ verabreichten *Single-Shot*-Antibiose zu bringen (28). Auch Vila et al. beschrieben in ihrer Metaanalyse mit 340 Patienten, dass eine fünftägige postoperative Antibiotikaprophylaxe keinen Vorteil zur Infektionsprophylaxe gegenüber einer eintägigen postoperativen Prophylaxe brachte (215). Dies wird gestützt durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie: Dass die orale Kolonisation der untersuchten In-

fektionserreger durch eine prolongierte Antibiose nicht signifikant gegenüber einer kurzzeitigen Antibiose eingedämmt wurde, lässt darauf schließen, dass eine prolongierte postoperative Antibiose dem Patienten keinen Vorteil zur Infektionsprophylaxe bringt. Demgegenüber steht der nachteilige Effekt einer Förderung von Dysbiosen durch eine prolongierte Antibiotikagabe, insbesondere durch Ampicillin/Sulbactam. Es sollte daher prinzipiell zurückhaltend mit standardmäßig verabreichten prolongierten Antibiosen nach mikrovaskulären postoperativen Transplantationen umgegangen werden, um der Entstehung von Dysbiosen und der Selektion nicht sensitiver und potenziell infektionsrelevanter Spezies vorzubeugen.

4.4.2 Selektion durch Chlorhexidin

Aufgrund der postoperativ eingeschränkten Mundhygienefähigkeit durch Schmerzen, Schwellungen oder eingeschränkter Mundöffnung, wurden die in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten angehalten, im gesamten postoperativen Untersuchungszeitraum dreimal täglich mit 0,2%iger Chlorhexidin-(CHX)-Mundspüllösung zu spülen. Eine Limitation der Studie ist die fehlende Nachprüfbarkeit, ob der Empfehlung auch tatsächlich lückenlos von Seiten der Patienten nachgekommen wurde.

Mundspüllösungen mit Chlorhexidin-Zusatz gehören zu den am häufigsten genutzten antimikrobiellen Agentien im zahnmedizinischen Bereich (218). Die antibakterielle Wirkungsweise von Biguaniden wie dem Chlorhexidin beruht auf der Interaktion mit bakteriellen Zellmembranen: Als kationisches Agens ist CHX in der Lage, negativ geladene Zellbestandteile zu binden. Durch die Bindung wird die Permeabilität der Membran beeinträchtigt und so deren Funktion gestört. CHX weist ein breites bakterielles Wirkspektrum auf. Es gilt als hochaktiv gegenüber den meisten grampositiven und gramnegativen Erregern, allerdings ist es nur begrenzt viruzid, sporozid, mycobacteriozid und fungizid (219, 220). Gramnegative Bakterien sind im Allgemeinen gegen Antiseptika und Desinfektionsmittel resistenter als (nichtsporenbildenden, nicht-mykobakterielle) grampositive Bakterien (221). Eine regelmäßige Anwendung von CHX-Mundspüllösungen kann das orale Mikrobiom verändern. So wird insgesamt die orale bakterielle Diversität und Keimlast reduziert, während dagegen die Ausbreitung von gramnegativen Erregern gefördert wird. Die Verschiebung des mikrobiellen Gleichgewichts kann auch Pilzspezies einen Selektionsvorteil verschaffen und zu Pilzinfektionen führen (218).

Laut Literatur weisen die in der vorliegenden Studie untersuchten Keime unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber CHX auf: Staphylokokken, wie *S. aureus*, und Streptokokken, wie *S. mitis*, gelten als sehr sensibel gegenüber CHX. Innerhalb der *Streptococcus spp.* gibt es Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeiten. So ließen sich beispielsweise *S. mutans* und *S. salivarius* noch besser als *S. mitis* durch CHX hemmen (220, 222). Dennoch

ist anzunehmen, dass die in der vorliegenden Studie beobachtete postoperative Abnahme der oralen *S. mitis*-Last neben postoperativen Antibiotikagaben auch durch die Anwendung von CHX-Mundspüllösungen begünstigt wurde.

Auch zur Eindämmung des gramnegativen *A. baumannii* hat sich CHX im klinischen und intensivmedizinischen Umfeld bewährt (223, 224). Dies steht im Einklang mit der in der Studie tendenziell beobachteten postoperativen Abnahme von *A. baumannii*.

Chlorhexidin gilt in der Literatur ebenfalls als hoch effektiv gegen die zellwandlosen *Mycoplasma spp* (219, 225). Dies steht den in der vorliegenden Studie beobachteten signifikanten postoperativen Anstiegen von *M. salivarium* auf Wange, Transplantat und Naht entgegen. Scheinbar schienen andere Faktoren wie die Selektion durch verabreichte Antibiotika die hemmende Wirkung des CHX auf *M. salivarium* zu überlagern. Rouse et al. zeigten übereinstimmend dazu, dass vaginale intrapartale CHX-Spülungen nicht zu signifikanten Reduzierungen von *Mycoplasma spp.* führten (226).

E. faecalis ist *in vitro* zwar prinzipiell sensibel gegenüber CHX, allerdings zeigten klinische Studien, dass die Wirkung *in vivo* limitiert ist. So fiel die desinfizierende Wirkung des CHX von mit *E. faecalis* infizierten Wurzelkanälen eher gering aus (220, 227). Innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* variieren die Empfindlichkeiten gegenüber CHX stark. *E. coli* reagiert ähnlich sensibel wie grampositive Keime, während andere *Enterobacteriaceae*-Genera wie *Salmonella*, *Enterobacter* und *Klebsiella* als deutlich resistenter gelten (221, 224, 228). Auch *P. aeruginosa* als weiterer Vertreter der gramnegativen Erreger gilt als kaum sensitiv gegenüber CHX (219, 221, 224, 228). Die in der Studie beobachtete Tendenz der postoperativen Zunahmen an *E. faecalis* und *P. aeruginosa* sowie bestimmten Vertretern der *Enterobacteriaceae*, können somit neben der bereits beschriebenen Selektion durch Antibiotika auch durch eine selektierende Wirkung des CHX begünstigt worden sein.

4.4.3 Dentaler Biofilm und biofilmassoziierte Erkrankungen

Die Frage, ob der dentale Biofilm bzw. parodontale Taschen als Reservoir für potenzielle Pathogene dient, die nicht typischerweise Teil der Mundflora sind, ist Gegenstand der Forschung (20–22). Es wurde durch Thurnheer et al. gezeigt, dass die Infektionserreger *E. coli*, *S. aureus* und *E. faecalis* *in vitro* sehr effektiv das in der Studie genutzte supragingivale Biofilm-Modell kolonisieren und darin wachsen konnten. *E. faecalis* und *E. coli* waren dabei sogar in der Lage, das Wachstum der bereits zuvor im Biofilmmodell vorhandenen Keime *S. mutans* und *Actinomyces oris* zu hemmen (190). Klinische Studien zeigten, dass Pathogene, die nicht typischerweise Teil der normalen Mundflora sind, in hohen Prävalenzen und Anzahlen bei Gingivitis- oder Parodontitispatienten vorkamen. So zeigten verschiedene Studien, dass Plaqueproben und Speichelproben von Parodontitispatienten signifikant häufigere Prävalenzen bzw. höhere Quantitäten von *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*,

S. aureus und verschiedenen Vertretern der *Enterobacteriaceae* wie *E. coli* und *K. pneumoniae* aufwiesen als die Proben der gesunden Kontrollgruppe (21, 150, 229). Es wurden zudem Zusammenhänge zwischen der Präsenz von *E. faecalis* und Gingivitis gefunden (20, 191).

In der Literatur gibt es außerdem Hinweise, dass die Zusammensetzung der dentalen Plaque und Präsenz nicht-typischerweise oraler Keime in der Mundhöhle von den individuellen Lebensumständen und medizinischen Interventionen beeinflusst werden. Eine Studie zeigte, dass in supragingivalen Plaqueproben von Senioren in stationären Pflegeeinrichtungen signifikant häufiger *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und MRSA nachgewiesen wurden als bei Senioren, die im häuslichen Umfeld lebten (230). Weiterhin führte mechanische Ventilation zu einer mikrobiellen Verschiebung in der dentalen Plaque mit Vermehrung von *S. aureus* und *P. aeruginosa* (231). Auch perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG)-Sonden waren mit einer signifikant erhöhten Prävalenz an *P. aeruginosa* in supragingivalen Plaqueproben assoziiert (230). In der vorliegenden Studie wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der perioperativen Besiedlung von Infektionserregern im OP-Gebiet und der Plaqueakkumulation bzw. dem Vorliegen einer Gingivitis oder Parodontitis registriert. Daher kann auf Basis unserer Daten nicht geschlussfolgert werden, dass präoperative zahnärztliche Interventionen wie Zahnreinigungen oder Behandlungen parodontaler Erkrankungen der Infektionsprävention vor mikrovaskulären Transplantationen dient. Dagegen zeigten die Arbeitsgruppen Sato et al. und Usubuchi et al., dass Zahnreinigungen bzw. Behandlungen tiefer kariöser Läsionen und schwerer Parodontitis vor oralen Tumorexzisionen bzw. vor mikrovaskulären Transplantationen, das Risiko signifikant reduzierten, eine postoperative Wundinfektion zu erleiden (36, 37). Eine Limitation der hiesigen Studie hinsichtlich der Fragestellung, inwiefern dentale Plaque eine Rolle als Depot für Infektionserreger spielt, ist, dass nur die Menge der Plaqueakkumulation beurteilt wurde. Eine qualitative Analyse der Zusammensetzung des supra- bzw. subgingivalen Biofilms ist dagegen nicht erfolgt. Es ist weiterführende Forschung in größerer Stichprobenzahl notwendig, um eine abschließende Empfehlung bezüglich einer Infektionsprophylaxe durch präoperative zahnärztliche Interventionen zu geben.

4.4.4 Xerostomie

Wie sich eine langfristige oder dauerhafte Xerostomie (Mundtrockenheit), wie sie durch Bestrahlungen oder Schädigungen von Nerven und Speicheldrüsen (232, 233) bedingt sein kann, auf die orale Keimbesiedlung auswirkt, wurden in der Literatur bereits hinreichend untersucht. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Hyposalivation mit einer geringeren Pufferkapazität des Speichels und somit mit erhöhten Quantitäten an azidogenen und azidoresistenten Erregern wie Laktobazillen und *S. mutans* einherging. Zudem schien

Candida spp. das trockene Umfeld bei Hyposalivation zu bevorzugen (16, 234, 235). Der Fokus unserer Untersuchung lag dagegen auf kurzfristigen und vorübergehenden Xerostomien, welche in der Literatur in der frühen postoperativen Phase beschrieben wurden (236). Auch in unserem Patientenkollektiv war eine früh-postoperative signifikante Zunahme an Fällen der Mundtrockenheit zu beobachten, die sich im weiteren postoperativen Verlauf wieder zu erholen schien. Postoperative Xerostomien sind jedoch nicht nur bei Operationen im Mundbereich beschrieben. Laut Madsen et al. trat eine postoperative Mundtrockenheit bei 92% der Patienten auf, wobei Patienten nach orthopädischen, neurochirurgischen, urologischen, gynäkologischen, vaskulären und allgemein chirurgischen Eingriffen in die Untersuchung miteinbezogen wurden (237). Hüppe et al. werteten die Daten von 1688 Patienten aus, die eine Herzklappen- und/ oder koronarchirurgische Operation erhalten hatten, wobei eine postoperative Mundtrockenheit mit 85,1% noch vor Wundschmerzen das mit Abstand häufigste postoperative Symptom war (238). Als Gründe für die vorübergehende Xerostomie nach Operationen wurden in der Literatur vielseitige Ursachen genannt: Medikamente wie Opioide, Glykopyrrolate und Anticholinergika, die im Zusammenhang mit der Anästhesie stehen, wurden oftmals mit einer vorübergehenden Mundtrockenheit in Zusammenhang gebracht (236, 239). Auch die maschinelle Beatmung, eine postoperative perkutane Ernährung (240), intraoperative Flüssigkeitsverluste (239) sowie das präoperative Nüchternheitsgebot (239, 241) wurden als mögliche Ursachen für eine postoperative Xerostomie genannt. Denkbar sind auch während des Heilungsprozesses auftretende Schwellungen, die einen vollständigen oder schmerzfreien Mundschluss einschränken, was zu einer Austrocknung der Schleimhäute führen könnte. Bestand innerhalb unserer Kohorte postoperativ die Gefahr einer Schädigung oder Stauchung des Transplantats durch Zubiss des Patienten, so wurden individuelle Beißkeile angefertigt. Das Tragen solcher Beißkeile zur Nacht bzw. im Schlaf ermöglichte eine Entlastung des Transplantats, wobei ggf. der vollständige Mundschluss leicht eingeschränkt wurde. Da allerdings im Rahmen der vorliegenden Studie alle Abstrichnahmen tagsüber erfolgten, wurde unmittelbar vor dem Zeitpunkt der Abstrichentnahmen von keinem der Studienpatienten ein individueller Beißkeil getragen. Es gibt in der Literatur kaum Studien, die die Auswirkungen einer kurzfristigen postoperativen Xerostomie auf die orale Keimbildung untersuchten. In der vorliegenden Studie wurde zwar eine signifikante postoperative Zunahme an Xerostomien beobachtet, allerdings wurde die Kolonisation der untersuchten Keime in der Mundhöhle hierdurch nicht signifikant beeinflusst.

4.4.5 Nosokomiale Keime

Auffällig ist, dass es starke Überschneidungen zwischen in der Literatur regelmäßig genannten Erregern oraler postoperativer Infektionen und typischen nosokomialen Keimen gibt. Auch Autoren, die sich nicht nur (wie die hiesige Studie) auf Nachweise ausgewählter Infektionserreger beschränkten, sondern die mittels kulturellen Nachweisen ein breiteres Spektrum der Infektionserreger postoperativer Infektionen im Kopf-Hals-Bereich untersuchten (18, 26, 79), wiesen gehäuft typische nosokomiale Erreger wie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. baumannii*, *Enterococcus spp.* und Vertreter der *Enterobacteriaceae* wie beispielsweise *Klebsiella pneumoniae* nach (23, 24, 242, 243). Nosokomiale Infektionen stellen eine Gefahr für hospitalisierte Patienten dar, da sie mit einer verlängerten Hospitalisierungsdauer, multiplen Organschädigungen und einer erhöhten Mortalität assoziiert sind (244). Neben Pneumonien, Harnwegsinfektionen und Bakteriämien wurden auch Wundinfektionen oftmals mit nosokomialen Keimen in Verbindung gebracht (245).

Die Länge des Krankenhausaufenthalts reflektiert die Zeitspanne, in der Patienten mit potenziellen Quellen nosokomialer Keime in Berührung kommen. Somit erscheint es naheliegend, dass eine längere Hospitalisierung auch das Risiko einer nosokomialen Infektion erhöht. Eine Studie berichtete, dass das Risiko, eine nosokomiale Infektionen zu erleiden, bei einem Klinikaufenthalt von bis zu sieben Tagen 2% betrug, während es bei einem Klinikaufenthalt von über 63 Tagen 70% betrug (246). Tranberg et al. zeigten, dass ein längerfristiger Klinikaufenthalt mit einer signifikanten Störung des oralen Mikrobioms einherging, welche insbesondere durch das Auftreten normalerweise ortsfremder Darmbakterien wie *Enterococcus spp.* oder Vertretern der *Enterobacteriaceae* gekennzeichnet war (13). Dagegen fanden Kirby et al. 2017 keinen Zusammenhang zwischen der Hospitalisierungsdauer und der Kolonisation von *Enterobacteriaceae* auf der äußeren Haut (247). Auch in der hiesigen Studie wurde kein Zusammenhang zwischen der präoperativen Liegedauer und präoperativen Nachweisen von nosokomialen Keimen gefunden. Ein möglicher Grund hierfür könnte die zeitliche Überschneidung der Probensammlung von April 2021 bis Januar 2023 mit dem erweiterten Hygienekonzept sein, welches im Rahmen der Covid-19-Pandemie eingeführt wurde. Da insbesondere über die Hände des Krankenhauspersonals 20-40% der typischen pathogenen Erreger wie *Enterococcus spp.*, *S. aureus* und *Acinetobacter spp.* übertragen werden (248, 249), ist es denkbar, dass das besondere Augenmerk auf Infektionsprävention während der Pandemie einen Rückgang nosokomialer Infektionen bewirkte.

Anstiege nosokomialer Keime waren zwar präoperativ unabhängig von der Dauer des Klinikaufenthaltes nicht zu beobachten, postoperativ kam es allerdings sehr wohl zu Anstiegen typischer nosokomialer Keime, wie *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* und *E. faecalis*. Die

wahrscheinlichste Ursache für die postoperativen Anstiege der genannten Erreger liegt in der Tatsache, dass nicht allein die Hospitalisierungsdauer einen Risikofaktor für die Entstehung nosokomialer Infektionen darstellt: Die oropharyngeale Besiedlung von normalerweise ortsfremden Pathogenen im klinischen Umfeld ist zusätzlich abhängig von Faktoren wie hohem Patientenalter, schweren Vorerkrankungen, Immunsuppression, langfristigen Antibiotikagaben, antimikrobiellen Agentien, invasiven Eingriffen, intensivmedizinischer Hospitalisierung und Intubation (23, 105, 197, 246, 250).

Die in dieser Studie gezeigten postoperativen Anstiege der Leukozytenzahlen und CRP-Werte traten in den meisten Fällen ohne Anzeichen einer Infektion auf. Es erscheint plausibel, dass diese Immunreaktion dazu diente, Krankheitserreger des nosokomialen Umfelds abzuwehren, sodass eine Infektion verhindert werden könnte, bevor sie sich überhaupt erst entwickelte.

Obwohl in der Literatur bekannt ist, dass auch *A. baumannii* und *S. aureus* im klinischen Umfeld gehäuft nachgewiesen wurden (23, 24, 100, 108, 109, 242, 243), wurde in der vorliegenden Studie keine postoperative Zunahme der beiden Keime beobachtet. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Faktoren wie postoperativ verabreichte Antibiosen oder antimikrobielle Agentien wie CHX die perioperativen Nachweise der beiden Keime beeinflusst hatten.

4.4.6 Bezahnung: Eine Voraussetzung für *M. salivarium*

Innerhalb unserer Stichprobe waren sieben Patienten bereits vor Beginn des Untersuchungszeitraums ohne Restzahnbestand. In keinem der jeweils acht Abstriche, die von diesen Patienten genommen wurden, fanden sich Nachweise von *M. salivarium*.

Das orale Mikrobiom bezahnter und unbezahnter Patienten unterscheidet sich deutlich voneinander. Laut Gazdeck et al. war die bakterielle Diversität bei unbezahnten Patienten reduziert gegenüber Patienten mit Zahnbestand. Für alle 31 in der Studie untersuchten Spezies (darunter Keime der physiologischen Mundflora sowie typische Parodontalkeime) waren in der unbezahnten Gruppe geringere Keimzahlen als in der bezahnten Gruppe erkennbar (251).

Die Literatur liefert kaum aktuelle Erkenntnisse über die orale Besiedlung von *M. salivarium* bei zahnlosen Patienten. Razin et al. untersuchten 1964 die orale Besiedlung von *M. salivarium* bei bezahnten und zahnlosen Patienten im Kulturverfahren. Die Ergebnisse der Studie sprachen sehr eindeutig gegen eine Besiedlung von *M. salivarium* in der zahnlosen Mundhöhle. Bei keinem der 71 zahnlosen Patienten war ein Nachweis von *M. salivarium* erfolgt, während bei 80,5% der 67 bezahnten Patienten *M. salivarium* nachgewiesen wurde. Die Autoren diskutierten, dass vermutlich bestimmte Faktoren im Zahnbereich (wie die mikroaerophile Atmosphäre sowie Symbiosen mit anderen Keimen im gingivalen Sulkus oder bestimmte Nährstoffe im Zahnbereich) die Besiedlung von *M. salivarium* ermöglichen

(252). Watanabe et al. zeigten 1986, dass Zahnverluste ungünstige Bedingungen für die Kolonisation von *M. salivarium* schafft. Die Autoren fanden im Kulturverfahren signifikant höhere Keimlasten von *M. salivarium* bei Patienten mit zehn oder mehr Restzähnen als bei Patienten mit bis zu neun Restzähnen. Dagegen wurden bei vier der sechs vollständig zahnlosen Patienten *Mycoplasma spp.* nachgewiesen, darunter bei zwei Patienten *M. salivarium*. Laut den Autoren legen die Ergebnisse nahe, dass die Besiedlung von *M. salivarium* nicht zwingend von dessen präferierter Besiedlungsstelle im gingivalen Sulkus abhängig sei. Stattdessen sei der Keim in der Lage noch weitere alternative Regionen wie den Zungenrücken oder den Pharynx zu besiedeln. Es gilt allerdings anzumerken, dass in der Studie nicht zwischen erst kürzlich erfolgten und längerfristig zurückliegenden Zahnverlusten unterschieden wurde (114). Die Ergebnisse der hiesigen Studie legen nahe, dass bei Patienten, die erst wenige Tage vor Probenentnahme ihre letzten Restzähne verloren hatten, *M. salivarium* in ähnlich hoher Last nachweisbar war wie bei Patienten mit großem Restzahnbestand. Entgegen den Ergebnissen von Watanabe et al. unterschieden sich in der vorliegenden Studie die oralen Nachweise von *M. salivarium* von Patienten mit geringem Restzahnbestand nicht signifikant von jenen mit großem Restzahnbestand.

4.4.7 Transfer von extraoralem Gewebe in den Mund

Da sich das Mikrobiom der äußeren Haut grundlegend vom oralen Mikrobiom unterscheidet (253), war eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie, inwiefern der unterschiedliche histologische Aufbau äußerer Haut und oraler Schleimhaut die Keimbesiedlung auf der Transplantatoberfläche beeinflussen würde. Die Interaktionen von Bakterien und Körperoberflächen beruht auf der hochspezifischen Bindung von speziesspezifischen Adhäsionsmolekülen der anhaftenden Keime und bestimmten Rezeptoren auf der Zelloberfläche (33). Somit stellte sich die Frage, ob sich auf der postoperativen Transplantatoberfläche eine ähnliche Keimbesiedlung wie im Wangenbereich einstellen würde, oder ob sich die Keimbesiedlung auf dem Transplantat grundlegend von der restlichen Mundhöhle unterscheiden würde (38).

In der vorliegenden Studie gab es kaum Unterschiede zwischen der postoperativen Besiedlung der untersuchten Keime auf Wange, Naht und Transplantat. Auf allen drei Lokalisationen stellten sich postoperativ trotz unterschiedlicher Epithelien bzw. Oberflächenbeschaffenheiten sehr ähnliche Besiedlungsmuster ein. Insbesondere die Nachweise von *M. salivarium* auf der Transplantatoberfläche sind in diesem Zusammenhang nennenswert. Es konnte gezeigt werden, dass *M. salivarium* nach dem Transfer der extraoralen Hautoberfläche in den Mund dazu in der Lage war, sich in ähnlich hohem Maße auf dem keratinisierten Plattenepithel wie auf der Wangenschleimhaut anzusiedeln. Wichtig zu beachten ist,

dass sich die postoperative Keimbesiedlung auf dem Transplantat an die der Wangenschleimhaut anglich. Die Kolonisation des Transplantats wurde somit postoperativ stark von der umliegenden oralen Mundflora beeinflusst, aber umgekehrt hatte der Transfer von dermalen Haut in den Mund keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchte orale Besiedlung der untersuchten Keime. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis fanden Kageyama et al. keine Unterschiede der oralen mikrobiellen Zusammensetzung bei Patienten, die ein orales mikrovaskuläres Transplantat erhalten hatten im Vergleich zu Patienten, bei denen Defekte primär verschlossen wurden. Obwohl die Stichprobe in der Studie sehr klein war, gaben die Autoren erste Hinweise darauf, dass die Oberfläche des Transplantats für die mikrobielle Besiedlung der Mundhöhle keinen so großen Einfluss hat, wie vielleicht anzunehmen gewesen wäre (38). Es gilt zu beachten, dass im Zuge des präoperativen Desinfektionsprotokolls sowohl die Haut der Donorregion, als auch die intraorale Empfängerregion mittels antimikrobiellen Substanzen dekontaminiert wurden. Dermal erfolgte die Desinfektion mittels Betaisodona® Lösung (Povidon-Iod) sowie kodan® Tinktur forte farblos (2-Propanol, 1-Propanol, Biphenyl-2-ol). Laut Herstellerangaben umfasst das Wirkspektrum von Povidon-Iod ein breites Spektrum humanpathogener Mikroorganismen, wobei *in vitro* *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* innerhalb von 30 Sekunden um mehr als 99,9 % reduziert wurden (254). kodan® Tinktur forte farblos ist laut Herstellerangaben unter anderem bakterizid, mykobakterizid und gegen MRSA wirksam (255). Intraoral erfolgte die Desinfektion ebenfalls mittels Betaisodona® Lösung. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unmittelbar präoperativ die Keimbelastung im gesamten OP-Gebiet gering war. Da allerdings die orale Empfängerregion des Transplantats laut Hachenberg et al. durch die Verletzung der Schleimhaut des Respirationstraktes per se ein kontaminiertes Operationsfeld ist, kann angenommen werden, dass die Dekontamination im Bereich der Donorregion effektiver verlief als intraoral (59). Dies kann ein möglicher Erklärungsansatz sein, warum der Hauttransfer kaum Einfluss auf die orale mikrobielle Besiedlung hatte.

Eine mögliche Erklärung für die postoperativ ähnlichen Besiedlungsmuster der untersuchten Keime auf den verschiedenen untersuchten Lokalisationen ist die Funktion des Speichels als Fingerabdruck des Mikrobioms (256–258). Obwohl die mikrobielle Zusammensetzung des Speichels laut Li et al. nicht absolut repräsentativ für das komplette orale Mikrobiom ist, so enthält Speichel doch Mikroorganismen aus verschiedenen oralen Nischen (259). Es wäre somit denkbar, dass der die Transplantatoberfläche benetzende Speichel, Keime aus anderen oralen Nischen wie der bukkalen Wangenschleimhaut auf das Transplantat überträgt.

Es kann geschlussfolgert werden, dass sich die Komposition der analysierten Spezies auf

dem dermalen Transplantat nach dem Transfer nach intraoral an die der Wangenschleimhaut anglich. Dies ist hinsichtlich der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Mundschleimhaut bzw. der äußeren Haut beachtlich. Die Transplantation dermalen Hautoberfläche in die Mundhöhle scheint einen eher geringfügigen Einfluss auf die Entstehung postoperativer Dysbiosen nach mikrovaskulären Transplantation zu haben.

4.5 Schlussfolgerung

In der hiesigen Studie konnte gezeigt werden, dass sich das Kolonisierungsmuster der untersuchten Keime auf der Transplantatoberfläche postoperativ der intraoralen Kolonisierung anpasste und die Gewebsunterschiede von Derma und Mukosa einen relativ geringen Einfluss auf die Entwicklung einer postoperativen Dysbiose nach mikrochirurgischer Transplantation hatten. Es wurde postoperativ eine tendenzielle Vermehrung potenzieller Infektionserreger wie *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis* und *P. aeruginosa* beobachtet. Die signifikante postoperative dysbiotische Reduktion des Vertreters der gesunden Mundflora *S. mitis* sowie der signifikante Anstieg von *M. salivarium* wurde durch postoperative Antibiotika wie Ampicillin/Sulbactam gefördert. Als klinische Konsequenz wird aufgrund der hier erhobenen Daten empfohlen, Vorsicht bei der langfristigen Anwendung von Standardantibiotika nach mikrochirurgischer Transplantation walten zu lassen und diese kritisch zu überprüfen. Dieser Ansatz zielt darauf ab, Dysbiosen zu verhindern und die Selektion von resistenten, potenziell infektionsrelevanten Spezies zu vermeiden.

5 Literatur

1. Moellmann HL, Kommer K, Karnatz N, Pfeffer K, Henrich B, Rana M. Molecular Genetic Analysis of Perioperative Colonization by Infection-Related Microorganisms in Patients Receiving Intraoral Microvascular Grafts. *J Clin Med* 2024; 13(14). doi: 10.3390/jcm13144103.
2. Karakida K, Aoki T, Ota Y, Yamazaki H, Otsuru M, Takahashi M et al. Analysis of risk factors for surgical-site infections in 276 oral cancer surgeries with microvascular free-flap reconstructions at a single university hospital. *J Infect Chemother* 2010; 16(5):334–9. doi: 10.1007/s10156-010-0108-y.
3. Novakovic D, Patel RS, Goldstein DP, Gullane PJ. Salvage of failed free flaps used in head and neck reconstruction. *Head Neck Oncol* 2009; 1:33. doi: 10.1186/1758-3284-1-33.
4. Wong C-H, Wei F-C. Microsurgical free flap in head and neck reconstruction. *Head & neck* 2010; 32(9):1236–45. doi: 10.1002/hed.21284.
5. Patel SY, Kim DD, Ghali GE. Maxillofacial Reconstruction Using Vascularized Fibula Free Flaps and Endosseous Implants. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2019; 31(2):259–84. doi: 10.1016/j.coms.2018.12.005.
6. Mahieu R, Colletti G, Bonomo P, Parrinello G, Iavarone A, Dolivet G et al. Ricostruzioni del distretto testa collo con lembi peduncolati nell'era dei lembi liberi. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2016; 36(6):459–68. doi: 10.14639/0392-100X-1153.
7. Bianchi B, Copelli C, Ferrari S, Ferri A, Sesenna E. Free flaps: Outcomes and complications in head and neck reconstructions. *J Craniomaxillofac Surg* 2009; 37(8):438–42. doi: 10.1016/j.jcms.2009.05.003.
8. Pohlenz P, Klatt J, Schön G, Blessmann M, Li L, Schmelzle R. Microvascular free flaps in head and neck surgery: complications and outcome of 1000 flaps. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 41(6):739–43. doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.012.
9. Suh JD, Sercarz JA, Abemayor E, Calcaterra TC, Rawnsley JD, Alam D et al. Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(8):962–6. doi: 10.1001/archotol.130.8.962.
10. Meyer-Lückel H, Hrsg. *Karies: Wissenschaft und klinische Praxis*. Stuttgart: Thieme; 2012. (ZMK Praxis).

11. Xinyi Li, Yanmei Liu, Xingyou Yang, Chengwen Li, Zhangyong Song. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol* 2022 Apr.
12. Kilian M. The oral microbiome - friend or foe? *Eur J Oral Sci* 2018; 126 Suppl 1:5–12. doi: 10.1111/eos.12527.
13. Tranberg A, Samuelsson C, Klarin B. Disturbance in the oropharyngeal microbiota in relation to antibiotic and proton pump inhibitor medication and length of hospital stay. *APMIS* 2021; 129(1):14–22. doi: 10.1111/apm.13087.
14. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ et al. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent* 2021; 113:103768. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103768.
15. Ferrer M, Méndez-García C, Rojo D, Barbas C, Moya A. Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol* 2017; 134:114–26. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.007.
16. Hayashi Y, Saito T, Ohshima T, Nakagawa Y, Maeda N. Alterations of the oral microbiota and oral clinical findings in dry mouth. *Journal of Oral Biosciences* 2015; 57(4):171–4. doi: 10.1016/j.job.2015.07.001.
17. Wertz PW, Szalay S de. Innate Antimicrobial Defense of Skin and Oral Mucosa. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(4). doi: 10.3390/antibiotics9040159.
18. Durand ML, Yarlagadda BB, Rich DL, Lin DT, Emerick KS, Rocco JW et al. The time course and microbiology of surgical site infections after head and neck free flap surgery. *The Laryngoscope* 2015; 125(5):1084–9. doi: 10.1002/lary.25038.
19. Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J. Weichteilinfektionen in der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie. *Keimspektren und Antibiotika. Mund Kiefer Gesichtschir* 2005; 9(6):389–95. doi: 10.1007/s10006-005-0645-1.
20. Da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo APV. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2011; 56(9):899–906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009.
21. Souto R, Andrade AFB de, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz. J. Microbiol.* 2006; 37(3):208–15. doi: 10.1590/S1517-83822006000300002.
22. Reddy MS. Reaching a better understanding of non-oral disease and the implication of periodontal infections. *Periodontol 2000* 2007; 44:9–14. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00213.x.

23. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274(8):639–44.
24. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302(21):2323–9. doi: 10.1001/jama.2009.1754.
25. Vincent J-L, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* 2020; 323(15):1478–87. doi: 10.1001/jama.2020.2717.
26. Belusic-Gobic M, Car M, Juretic M, Cerovic R, Gobic D, Golubovic V. Risk factors for wound infection after oral cancer surgery. *Oral Oncology* 2007; 43(1):77–81. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.01.006.
27. Kamizono K, Sakuraba M, Nagamatsu S, Miyamoto S, Hayashi R. Statistical analysis of surgical site infection after head and neck reconstructive surgery. *Annals of Surgical Oncology* 2014; 21(5):1700–5. doi: 10.1245/s10434-014-3498-8.
28. Bartella AK, Lemmen S, Burnic A, Kloss-Brandstätter A, Kamal M, Breisach T et al. Influence of a strictly perioperative antibiotic prophylaxis vs a prolonged postoperative prophylaxis on surgical site infections in maxillofacial surgery. *Infection* 2018; 46(2):225–30. doi: 10.1007/s15010-017-1110-4.
29. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med* 1969; 281(21):1137–40. doi: 10.1056/NEJM196911202812101.
30. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, Huey B, Corby PM, Queiroz ELS et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLOS ONE* 2014; 9(6):e98741. doi: 10.1371/journal.pone.0098741.
31. Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, Rodríguez-Hilario A, González H, Bondy J et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. *Oncotarget* 2016; 7(32):51320–34. doi: 10.18632/oncotarget.9710.
32. Bolz J, Dosá E, Schubert J, Eckert AW. Bacterial colonization of microbial biofilms in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations* 2014; 18(2):409–14. doi: 10.1007/s00784-013-1007-2.

33. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med* 2005; 3:27. doi: 10.1186/1479-5876-3-27.
34. Metgud R, Gupta K, Gupta J. Exploring bacterial flora in oral squamous cell carcinoma: a microbiological study. *Biotech Histochem* 2014; 89(2):153–9. doi: 10.3109/10520295.2013.831120.
35. Chan JYK, Ng CWK, Lan L, Fung S, Li J-W, Cai L et al. Restoration of the Oral Microbiota After Surgery for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Associated With Patient Outcomes. *Front Oncol* 2021; 11:737843. doi: 10.3389/fonc.2021.737843.
36. Sato J, Goto J, Harahashi A, Murata T, Hata H, Yamazaki Y et al. Oral health care reduces the risk of postoperative surgical site infection in inpatients with oral squamous cell carcinoma. *Support Care Cancer* 2011; 19(3):409–16. doi: 10.1007/s00520-010-0853-6.
37. Usubuchi M, Matsuura K, Goto T, Asada Y, Imai T, Ogawa T et al. Professional Oral Health Care at General Dental Clinic Reduces Postoperative Complications of Head and Neck Free-Flap Reconstruction Surgery. *J Cancer* 2019; 10(1):205–10. doi: 10.7150/jca.26298.
38. Kageyama S, Nagao Y, Ma J, Asakawa M, Yoshida R, Takeshita T et al. Compositional Shift of Oral Microbiota Following Surgical Resection of Tongue Cancer. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10:600884. doi: 10.3389/fcimb.2020.600884.
39. Pohlenz P, Klatt J, Schön G, Blessmann M, Li L, Schmelzle R. Microvascular free flaps in head and neck surgery: Complications and outcome of 1000 flaps. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 41(6):739–43. doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.012.
40. F. Bootz. Mikrovaskuläre fasziokutane Transplantate im Kopf-Hals-Bereich. *Laryngo-Rhino-Otol* 2001; 80: 630–631.
41. Thome JCM. Das mikrovaskuläre Fibulatransplantat in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; 2008; 10.4126/38m-000000012.
42. Roasa FV, Castañeda SS, Mendoza DJC. Pediatric free flap reconstruction for head and neck defects. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2018; 26(5):334–9. doi: 10.1097/MOO.0000000000000473.

43. Gabr EM, Kobayashi MR, Salibian AH, Armstrong WB, Sundine M, Calvert JW et al. Oromandibular reconstruction with vascularized free flaps: a review of 50 cases. *Microsurgery* 2004; 24(5):374–7. doi: 10.1002/micr.20057.
44. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(24). doi: 10.3390/ijerph17249160.
45. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021, ISBN 978-3-89606-309-0, DOI 10.25646/8353.
46. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncology* 2009; 45(4-5):454–60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.023.
47. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 1988; 48(11):3282–7.
48. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45(4-5):309–16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.
49. Wienecke A, Kraywinkel K. Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologie* 2019; 25(3):190–200. doi: 10.1007/s00761-019-0534-0.
50. Schwenzler N, Ehrenfeld M, Hrsg. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.
51. Hausamen J-E. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: Operationslehre und -atlas*. 4., vollständig überarbeitete Aufl. Berlin: Springer; 2012.
52. SEIDENBERG B, ROSENAK SS, HURWITT ES, SOM ML. Immediate reconstruction of the cervical esophagus by a revascularized isolated jejunal segment. *Ann Surg* 1959; 149(2):162–71. doi: 10.1097/00000658-195902000-00002.
53. Choi S, Schwartz DL, Farwell DG, Austin-Seymour M, Futran N. Radiation therapy does not impact local complication rates after free flap reconstruction for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(11):1308–12. doi: 10.1001/archotol.130.11.1308.
54. Yadav SK, Shrestha S. Microvascular Free Flaps in Oral and Maxillofacial Reconstruction following Cancer Ablation. *J Nepal Health Res Counc* 2017; 15(2):88–95. doi: 10.3126/jnhrc.v15i2.18157.

55. Amin JD, Amin N, Hatten KM. The lateral arm free flap for head and neck reconstruction. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2020; 28(5):365–9. doi: 10.1097/MOO.0000000000000644.
56. Chen C-M, Lin G-T, Fu Y-C, Shieh T-Y, Huang I-Y, Shen Y-S et al. Complications of free radial forearm flap transfers for head and neck reconstruction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(6):671–6. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.10.010.
57. Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1996; 98(7):1230–3. doi: 10.1097/00006534-199612000-00017.
58. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20(4):250-78; quiz 279-80. doi: 10.1086/501620.
59. Hachenberg T, Sentürk M, Jannasch O, Lippert H. Postoperative Wundinfektionen. Pathophysiologie, Risikofaktoren und präventive Konzepte. *Anaesthesist* 2010; 59(9):851-66; quiz 867-8. doi: 10.1007/s00101-010-1789-4.
60. Tsai Y-W, Liu Y-H, Su H-H. Bacteriology of peritonsillar abscess: The changing trend and predisposing factors. *Braz J Otorhinolaryngol* 2018; 84(5):532–9. doi: 10.1016/j.bjorl.2017.06.007.
61. Kamizono K, Sakuraba M, Nagamatsu S, Miyamoto S, Hayashi R. Statistical analysis of surgical site infection after head and neck reconstructive surgery. *Annals of Surgical Oncology* 2014; 21(5):1700–5. doi: 10.1245/s10434-014-3498-8.
62. Makiguchi T, Yokoo S, Kanno Y, Kurihara J, Suzuki K. Risk Factors for Surgical Site Infection in Patients Undergoing Free and Pedicled Myocutaneous Flap Reconstruction After Oral Cancer Resection. *J Oral Maxillofac Surg* 2019; 77(5):1075–81. doi: 10.1016/j.joms.2018.12.028.
63. O. Jannasch, P. Büschel, J. Tautenhahn, H. Lippert. Störungen der Wundheilung. *HARTMANN WundForum* 2012; 19(Heft 1):11.
64. Matsha TE, Prince Y, Davids S, Chikte U, Erasmus RT, Kengne AP et al. Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *J Dent Res* 2020; 99(6):658–65. doi: 10.1177/0022034520913818.

65. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5721–32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
66. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. *Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2004.
67. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2013.
68. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; 30(7):644–54. doi: 10.1034/j.1600-051x.2003.00376.x.
69. Jäsberg H, Söderling E, Endo A, Beighton D, Haukioja A. Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro bio-film model. *Eur J Oral Sci* 2016; 124(3):251–8. doi: 10.1111/eos.12266.
70. Miyoshi T, Oge S, Nakata S, Ueno Y, Ukita H, Kousaka R et al. *Gemella haemolysans* inhibits the growth of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep* 2021; 11(1):11742. doi: 10.1038/s41598-021-91267-3.
71. Engen SA, Rørvik GH, Schreurs O, Blix IJ, Schenck K. The oral commensal *Streptococcus mitis* activates the aryl hydrocarbon receptor in human oral epithelial cells. *International Journal of Oral Science* 2017; 9(3):145–50. doi: 10.1038/ijos.2017.17.
72. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 2018; 200(4):525–40. doi: 10.1007/s00203-018-1505-3.
73. Hadaway LC. Skin flora: unwanted dead or alive. *Nursing* 2005; 35(7):20. doi: 10.1097/00152193-200507000-00017.
74. Christensen GJM, Brüggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes* 2014; 5(2):201–15. doi: 10.3920/BM2012.0062.
75. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* 2008; 158(3):442–55. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.
76. Al-Nawas B, Grötz A, Brahm R, Maeurer M, Wagner W. Infektionen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich: Was hat sich in den letzten 25 Jahren geändert? *Dtsch Zahnärztl Z* 55 765 - 769 2000.
77. Penel N, Fournier C, Lefebvre D, Lefebvre J-L. Multivariate analysis of risk factors for wound infection in head and neck squamous cell carcinoma surgery with opening of

- mucosa. Study of 260 surgical procedures. *Oral Oncology Extra* 2005; 41(3):35–44. doi: 10.1016/j.ooe.2004.08.003.
78. Belusic-Gobic M, Zubovic A, Predrijevac A, Harmicar D, Cerovic R, Udovic Gobic S et al. Microbiology of wound infection after oral cancer surgery. *J Craniomaxillofac Surg* 2020; 48(7):700–5. doi: 10.1016/j.jcms.2020.05.011.
 79. Yang C-H, Chew K-Y, Solomkin JS, Lin P-Y, Chiang Y-C, Kuo Y-R. Surgical site infections among high-risk patients in clean-contaminated head and neck reconstructive surgery: Concordance with preoperative oral flora. *Annals of Plastic Surgery* 2013; 71 Suppl 1:S55-60. doi: 10.1097/SAP.000000000000046.
 80. Rodrigo JP, Suárez C, Bernaldez R, Collado D. Efficacy of piperacillin-tazobactam in the treatment of surgical wound infection after clean-contaminated head and neck oncologic surgery. *Head & neck* 2004; 26(9):823–8. doi: 10.1002/hed.20027.
 81. Durand ML, Yarlagadda BB, Rich DL, Lin DT, Emerick KS, Rocco JW et al. The time course and microbiology of surgical site infections after head and neck free flap surgery. *Laryngoscope* 2015; 125(5):1084–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25425457/>.
 82. Kamizono K, Sakuraba M, Nagamatsu S, Miyamoto S, Hayashi R. Statistical analysis of surgical site infection after head and neck reconstructive surgery. *Annals of Surgical Oncology* 2014; 21(5):1700–5. doi: 10.1245/s10434-014-3498-8.
 83. Kayser FH. Taschenlehrbuch medizinische Mikrobiologie: Medizinische Mikrobiologie. 13., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014.
 84. Basaranoglu ST, Ozsurekci Y, Aykac K, Aycan AE, Bıçakcigil A, Altun B et al. Streptococcus mitis/oralis Causing Blood Stream Infections in Pediatric Patients. *Jpn J Infect Dis* 2019; 72(1):1–6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.074.
 85. Eberhard J, Pietschmann R, Falk W, Jepsen S, Dommisch H. The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(4):325–30. doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00518.x.
 86. Teughels W, Kinder Haake S, Sliepen I, Pauwels M, van Eldere J, Cassiman J-J et al. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J Dent Res* 2007; 86(7):611–7. doi: 10.1177/154405910708600706.
 87. Sliepen I, van Damme J, van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res* 2009; 88(11):1026–30. doi: 10.1177/0022034509347296.

88. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11):4121–8. doi: 10.1128/JCM.01232-10.
89. Decsi G, Soki J, Pap B, Dobra G, Harmati M, Kormondi S et al. Chicken or the Egg: Microbial Alterations in Biopsy Samples of Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Pathol Oncol Res* 2019; 25(3):1023–33. doi: 10.1007/s12253-018-0457-x.
90. Amer A, Galvin S, Healy CM, Moran GP. The Microbiome of Potentially Malignant Oral Leukoplakia Exhibits Enrichment for *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, and *Rothia* Species. *Front Microbiol* 2017; 8:2391. doi: 10.3389/fmicb.2017.02391.
91. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* 2012; 61(4):582–8. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300784.
92. Miksits K, Hahn H. *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999.
93. Parlet CP, Brown MM, Horswill AR. Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends in Microbiology* 2019; 27(6):497–507. doi: 10.1016/j.tim.2019.01.008.
94. Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase Activity by *Staphylococcus aureus*: A Potential Target for Therapy? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2015; 41(4):433–44. doi: 10.1055/s-0035-1549849.
95. Gatermann S. Enterokokken und weitere katalasenegative grampositive Kokken. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. S. 281–4.
96. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10):4538–45. doi: 10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001.
97. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US; 2006.
98. Korten, V., & Murray, B. E. (1993). The nosocomial transmission of enterococci. *Current Opinion in Infectious Diseases*.: 6(4), 498-505.

99. Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Boudreau DK et al. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55(Pt 5):2013–25. doi: 10.1099/ijs.0.63539-0.
100. Kenneth J. Ryan, C. George Ray, Hrsg. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease*. 4th Edition: McGraw-Hill; 2004.
101. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* 2010; 49(2):97–107. doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.002.
102. Firdich E, Whitfield C. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res* 2005; 11(3):133–44. doi: 10.1179/096805105X46592.
103. Buttenschoen K, Schneider ME, Utz K, Kornmann M, Beger HG, Carli Buttenschoen D. Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2009; 394(2):293–302. doi: 10.1007/s00423-008-0357-8.
104. Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G. Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(7):509–19. doi: 10.1038/nrmicro1443.
105. Sedgley CM, Samaranayake LP. Oral and oropharyngeal prevalence of Enterobacteriaceae in humans: a review. *J Oral Pathol Med* 1994; 23(3):104–13. doi: 10.1111/j.1600-0714.1994.tb01096.x.
106. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 2016; 352:h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.
107. Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* 2019; 79(14):1529–41. doi: 10.1007/s40265-019-01180-3.
108. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(3). doi: 10.3390/antibiotics9030119.
109. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(8):737–42. doi: 10.1111/1469-0691.12026.

110. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2012; 55(10):1311–54. doi: 10.1007/s00103-012-1549-5.
111. Kornspan JD, Ginsburg I, Rottem S. The oxidant scavenging capacity of the oral *Mycoplasma salivarium*. Arch Oral Biol 2013; 58(10):1378–84. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.05.001.
112. Baracaldo R, Foltzer M, Patel R, Bourbeau P. Empyema caused by *Mycoplasma salivarium*. J Clin Microbiol 2012; 50(5):1805–6. doi: 10.1128/JCM.06839-11.
113. Grisold AJ, Hoenigl M, Leitner E, Jakse K, Feierl G, Raggam RB et al. Submasseteric abscess caused by *Mycoplasma salivarium* infection. J Clin Microbiol 2008; 46(11):3860–2. doi: 10.1128/JCM.00807-08.
114. Watanabe T, Matsuura M, Seto K. Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). J Clin Microbiol 1986; 23(6):1034–8. doi: 10.1128/jcm.23.6.1034-1038.1986.
115. Engel LD, Kenny GE. *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci. J Periodontal Res 1970; 5(3):163–71. doi: 10.1111/j.1600-0765.1970.tb00711.x.
116. So AK, Furr PM, Taylor-Robinson D, Webster AD. Arthritis caused by *Mycoplasma salivarium* in hypogammaglobulinaemia. Br Med J (Clin Res Ed) 1983; 286(6367):762–3. doi: 10.1136/bmj.286.6367.762.
117. Ørsted I, Gertsen JB, Schønheyder HC, Jensen JS, Nielsen H. *Mycoplasma salivarium* isolated from brain abscesses. Clin Microbiol Infect 2011; 17(7):1047–9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03462.x.
118. Henrich B, Rumming M, Sczyrba A, Velleuer E, Dietrich R, Gerlach W et al. *Mycoplasma salivarium* as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma. PLOS ONE 2014; 9(3):e92297. doi: 10.1371/journal.pone.0092297.
119. Mizuki H, Abe R, Kogi S, Mikami T. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma salivarium* in oral lichen planus tissue. J Oral Pathol Med 2017; 46(8):649–56. doi: 10.1111/jop.12568.
120. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 2001; 183(12):3770–83. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001.

121. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192(19):5002–17. doi: 10.1128/JB.00542-10.
122. Wilson MJ, Weightman AJ, Wade WG. Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. *Reviews in Medical Microbiology* 1997; 8(2):91–102. doi: 10.1097/00013542-199704000-00005.
123. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1):85–94. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00353-6.
124. The Nobel Prize in Chemistry 1993. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2024. Fri. 23 Feb 2024. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>>.
125. Müller H-J. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. Verfügbar unter: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4213053>.
126. Schild, T. A., Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. Weiterstadt, Germany: PE Applied Biosystems, 1996.
127. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6):1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
128. Bruhn HD, Hrsg. LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik ; mit 71 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2008.
129. Xiao L, Totten AH, Crabb DM, Atkinson TP and Waites KB. Antimicrobial susceptibilities and mechanisms of resistance of commensal and invasive *Mycoplasma salivarium* isolates. *Front. Microbiol.* 13:914464 2022.
130. Henrich B, Hermann I, Di Giulio M, Köhrer K, Deenen R, Sivalingam S et al. Reexamination In Vitro and In Situ of an Antibacterially Modified Experimental Dental Resin Composite with Molecular Methods: A Pilot Study. *Advances in Materials Science and Engineering* 2016; 2016:1–12. doi: 10.1155/2016/6367234.
131. Hopfe M, Henrich B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiol* 2008; 8:55. doi: 10.1186/1471-2180-8-55.
132. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent* 2015; 1(1):9. doi: 10.1186/s40729-015-0010-6.

133. Naserpour Farivar T, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Jahani Hashemi H et al. Development and evaluation of a Quadruplex Taq Man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and their vanA and vanB genotypes. *Iran J Microbiol* 2014; 6(5):335–40.
134. Simon M-C. Probiotics as a novel approach to modulate incretins, insulin secretion and risk factors of type 2 diabetes and complications. - Bonn, 2014. - Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Online-Ausgabe in bonndoc: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5n-34643>.
135. Golpayegani A, Nodehi RN, Rezaei F, Alimohammadi M, Douraghi M. Real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and virulence evaluation of the environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Mol Biol Rep* 2019; 46(4):4049–61. doi: 10.1007/s11033-019-04855-y.
136. Gregorio E de, Roscetto E, Iula VD, Martinucci M, Zarrilli R, Di Nocera PP et al. Development of a real-time PCR assay for the rapid detection of *Acinetobacter baumannii* from whole blood samples. *New Microbiol* 2015; 38(2):251–7.
137. Løe H, Silness J. Periodontal Disease in Pregnancy I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* 1963; 21(6):533–51. doi: 10.3109/00016356309011240.
138. Saxer UP, Mühlemann HR. Motivation und Aufklärung [Motivation and education]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*. 1975 Sep;85(9):905-19. German. PMID: 1059253.
139. © Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e. V. (DG PARO) 5. überarbeitete Auflage Oktober 2022. Der Parodontale Screening Index.
140. American Society of Anesthesiologists. ASA Physical Status Classification System; 13. December 2020 (abgerufen am 10.01.24).
141. Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLOS ONE* 2013; 8(2):e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923.
142. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21(3):389–95. doi: 10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
143. Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples) [Accessed 18 Oct. 2023.]. *Biometrika* 1965; (vol. 52, no. 3/4):591–611. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2307/2333709>.

144. Wilcoxon F. Individual Comparisons by Ranking Methods [Accessed 18 Oct. 2023.]. *Biometrics Bulletin* 1945; (vol. 1, no. 6.):pp. 80–83. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2307/3001968>.
145. Friedman M. A Correction. *Journal of the American Statistical Association* 1939; 34(205):109. doi: 10.1080/01621459.1939.10502372.
146. *Dtsch Arztebl Int* 2010, 107(19): 343–8.
147. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 1952; 47(260):583–621. doi: 10.1080/01621459.1952.10483441.
148. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55(4):611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
149. M. Tevfik Dorak, Hrsg. *Real-time PCR*. New York, NY: Taylor & Francis; 2006. (Advanced methods). Verfügbar unter: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0829/2006003427-d.html>.
150. Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo APV. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz J Microbiol* 2014; 45(2):495–501. doi: 10.1590/s1517-83822014000200017.
151. Schmidt TM, Pace B, Pace NR. Detection of DNA contamination in Taq polymerase. *Biotechniques* 1991; 11(2):176–7.
152. Böttger EC. Frequent contamination of Taq polymerase with DNA. *Clinical Chemistry* 1990; 36(6):1258–9. doi: 10.1093/clinchem/36.6.1258b.
153. Rand KH, Houck H. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Mol Cell Probes* 1990; 4(6):445–50. doi: 10.1016/0890-8508(90)90003-i.
154. Hughes MS, Beck LA, Skuce RA. Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8):2007–8. doi: 10.1128/jcm.32.8.2007-2008.1994.
155. Spangler R, Goddard NL, Thaler DS. Optimizing Taq polymerase concentration for improved signal-to-noise in the broad range detection of low abundance bacteria. *PLOS ONE* 2009; 4(9):e7010. doi: 10.1371/journal.pone.0007010.

156. Silkie SS, Tolcher MP, Nelson KL. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J Microbiol Methods* 2008; 72(3):275–82. doi: 10.1016/j.mimet.2007.12.011.
157. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12):4423–7. doi: 10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002.
158. Frahm E, Obst U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 2003; 52(1):123–31. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00150-1.
159. Lebuhn M, Effenberger M, Gronauer A, Wilderer PA, Wuertz S. Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Sci Technol* 2003; 48(4):97–103.
160. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* 1989; 264(11):6427–37.
161. Sela S, Yogeve D, Razin S, Bercovier H. Duplication of the *tuf* gene: a new insight into the phylogeny of eubacteria. *J Bacteriol* 1989; 171(1):581–4. doi: 10.1128/jb.171.1.581-584.1989.
162. Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(1):181–4. doi: 10.1093/nar/29.1.181.
163. Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BRK, Schmidt TM. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(Database issue):D593-8. doi: 10.1093/nar/gku1201.
164. Kawano T, Shigeishi H, Fukada E, Yanagisawa T, Kuroda N, Takemoto T et al. Changes in bacterial number at different sites of oral cavity during perioperative oral care management in gastrointestinal cancer patients: Preliminary study. *J Appl Oral Sci* 2018; 26:e20170516. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0516.
165. Warnke P, Devide A, Weise M, Frickmann H, Schwarz NG, Schäffler H et al. Utilizing Moist or Dry Swabs for the Sampling of Nasal MRSA Carriers? An In Vivo and In Vitro Study. *PLOS ONE* 2016; 11(9):e0163073. doi: 10.1371/journal.pone.0163073.

166. Rose L, Jensen B, Peterson A, Banerjee SN, Srduino MJ. Swab materials and *Bacillus anthracis* spore recovery from nonporous surfaces. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6):1023–9. doi: 10.3201/eid1006.030716.
167. Landers TF, Hoet A, Wittum TE. Swab type, moistening, and preenrichment for *Staphylococcus aureus* on environmental surfaces. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6):2235–6. doi: 10.1128/JCM.01958-09.
168. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45(4-5):309–16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.
169. Karakida K, Aoki T, Ota Y, Yamazaki H, Otsuru M, Takahashi M et al. Analysis of risk factors for surgical-site infections in 276 oral cancer surgeries with microvascular free-flap reconstructions at a single university hospital. *J Infect Chemother* 2010; 16(5):334–9. doi: 10.1007/s10156-010-0108-y.
170. Makiguchi T, Yokoo S, Kanno Y, Kurihara J, Suzuki K. Risk Factors for Surgical Site Infection in Patients Undergoing Free and Pedicled Myocutaneous Flap Reconstruction After Oral Cancer Resection. *J Oral Maxillofac Surg* 2019; 77(5):1075–81. doi: 10.1016/j.joms.2018.12.028.
171. Kruse ALD, Luebbers HT, Grätz KW, Obwegeser JA. Factors influencing survival of free-flap in reconstruction for cancer of the head and neck: a literature review. *Microsurgery* 2010; 30(3):242–8. doi: 10.1002/micr.20758.
172. Tahir A, Nagi AH, Ullah E, Janjua OS. The role of mast cells and angiogenesis in well-differentiated oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2013; 9(3):387–91. doi: 10.4103/0973-1482.119311.
173. Shaw JA, Chung R. Febrile response after knee and hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1999; (367):181–9.
174. Ward DT, Hansen EN, Takemoto SK, Bozic KJ. Cost and effectiveness of postoperative fever diagnostic evaluation in total joint arthroplasty patients. *The Journal of Arthroplasty* 2010; 25(6 Suppl):43–8. doi: 10.1016/j.arth.2010.03.016.
175. Deirmengian GK, Zmistowski B, Jacovides C, O’Neil J, Parvizi J. Leukocytosis Is Common After Total Hip and Knee Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2011; 469(11):3031–6. doi: 10.1007/s11999-011-1887-x.
176. Jung GH, Hwang HK, Lee WJ, Kang CM. Extremely high white blood cell counts on postoperative day 1 do not predict severe complications following distal pancreatectomy. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg* 2019; 23(4):377–84. doi: 10.14701/ahbps.2019.23.4.377.

177. Shetty S, Ethiraj P, Shanthappa AH. C-reactive Protein Is a Diagnostic Tool for Postoperative Infection in Orthopaedics. *Cureus* 2022. doi: 10.7759/cureus.22270.
178. Santonocito C, Loecker I de, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesth Analg* 2014; 119(3):624–9. doi: 10.1213/ANE.0000000000000263.
179. Kim TW, Kim DH, Oh WS, Sim JA, Lee YS, Lee BK. Analysis of the Causes of Elevated C-Reactive Protein Level in the Early Postoperative Period After Primary Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 2016; 31(9):1990–6. doi: 10.1016/j.arth.2016.02.037.
180. Neumaier, M., Scherer, M.A., Busch, R. et al. 1999. Das C-reaktive Protein als Routineparameter für Komplikationen nach unfallchirurgischen Operationen. *Unfallchirurgie* 25, 247–253 (1999).
181. Gao Z, Tseng C, Pei Z, Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(8):2927–32. doi: 10.1073/pnas.0607077104.
182. Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10):3575–81. doi: 10.1128/JCM.00597-10.
183. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? *American Journal of Infection Control* 2015; 43(1):35–7. doi: 10.1016/j.ajic.2014.09.015.
184. Campos J, Pires MF, Sousa M, Campos C, Da Costa CFFA, Sampaio-Maia B. Unveiling the Relevance of the Oral Cavity as a *Staphylococcus aureus* Colonization Site and Potential Source of Antimicrobial Resistance. *Pathogens* 2023; 12(6). doi: 10.3390/pathogens12060765.
185. Luo Y, McAuley DF, Fulton CR, Sá Pessoa J, McMullan R, Lundy FT. Targeting *Candida albicans* in dual-species biofilms with antifungal treatment reduces *Staphylococcus aureus* and MRSA in vitro. *PLOS ONE* 2021; 16(4):e0249547. doi: 10.1371/journal.pone.0249547.
186. Galia L, Ligozzi M, Bertoncetti A, Mazzariol A. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples. *AIMS Microbiol* 2019; 5(2):138–46. doi: 10.3934/microbiol.2019.2.138.

187. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen : Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2018; 61(10):1310–61. doi: 10.1007/s00103-018-2811-2.
188. Beezhold DW, Slaughter S, Hayden MK, Matushek M, Nathan C, Trenholme GM et al. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. Clin Infect Dis 1997; 24(4):704–6. doi: 10.1093/clind/24.4.704.
189. Kao PHN, Kline KA. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. J Mol Biol 2019; 431(16):2932–45. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.030.
190. Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. Virulence 2015; 6(3):258–64. doi: 10.4161/21505594.2014.967608.
191. Souto R, Colombo APV. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. Arch Oral Biol 2008; 53(2):155–60. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.08.004.
192. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. Arch Oral Biol 2005; 50(6):575–83. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.10.017.
193. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. J Endod 2006; 32(2):104–9. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.022.
194. Staudinger T, Pipal A, Redl B. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. J Appl Microbiol 2011; 110(6):1381–9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04991.x.
195. Ly TDA, Kerbaj J, Edouard S, van Hoang T, Louni M, Dao TL et al. The Presence of *Acinetobacter baumannii* DNA on the Skin of Homeless People and Its Relationship With Body Lice Infestation. Preliminary Results. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9:86. doi: 10.3389/fcimb.2019.00086.
196. Kohlenberg A, Brümmer S, Higgins PG, Sohr D, Piening BC, Grahl C de et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 11):1499–507. doi: 10.1099/jmm.0.012302-0.

197. Duman Y, Ersoy Y, Tanriverdi ES, Otlu B, Toplu SA, Gözükara Bağ HG et al. Oral colonization of *Acinetobacter baumannii* in intensive care units: Risk factors, incidence, molecular epidemiology, association with the occur of pneumonia and sepsis, and infection control measures. *Iran J Basic Med Sci* 2022; 25(2):239–44. doi: 10.22038/IJBMS.2022.59713.13243.
198. Shang L, Deng D, Roffel S, Gibbs S. Differential influence of *Streptococcus mitis* on host response to metals in reconstructed human skin and oral mucosa. *Contact Dermatitis* 2020; 83(5):347–60. doi: 10.1111/cod.13668.
199. Frandsen EV, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6(3):129–33. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00466.x.
200. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3827–30. doi: 10.1128/JCM.42.8.3827-3830.2004.
201. Hohwy J, Kilian M. Clonal diversity of the *Streptococcus mitis* biovar 1 population in the human oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10(1):19–25. doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00113.x.
202. Chen Z, Wong PY, Ng CWK, Lan L, Fung S, Li JW et al. The Intersection between Oral Microbiota, Host Gene Methylation and Patient Outcomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020; 12(11). doi: 10.3390/cancers12113425.
203. Rebelo MB, Oliveira CS, Tavaría FK. Novel Strategies for Preventing Dysbiosis in the Oral Cavity. *Front Biosci (Elite Ed)* 2023; 15(4):23. doi: 10.31083/j.fbe1504023.
204. Cugini C, Ramasubbu N, Tsiagbe VK, Fine DH. Dysbiosis From a Microbial and Host Perspective Relative to Oral Health and Disease. *Front Microbiol* 2021; 12:617485. doi: 10.3389/fmicb.2021.617485.
205. Adler N, Balzer F, Bondzik K, Straff W. Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt: Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. *Umweltbundesamt* Oktober 2018.
206. Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(6):1160–7. doi: 10.1093/jac/dkl420.
207. Sanford Guide All Access. Antimicrobial Therapy, Inc.: Sperryville, VA; 2023.

208. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Universitätsklinikum Düsseldorf, Hrsg. Leitfaden Antiinfektiva und Infektionserkrankungen: Praktische Hinweise zur antimikrobiellen Therapie. 2. Aufl.
209. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis : 2023/24. 31. Auflage. Köln: Thomas Karow; 2022.
210. Singh N, Poggensee L, Huang Y, Evans CT, Suda KJ, Bulman ZP. Antibiotic susceptibility patterns of viridans group streptococci isolates in the United States from 2010 to 2020. *JAC Antimicrob Resist* 2022; 4(3):dlac049. doi: 10.1093/jac-amr/dlac049.
211. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(4):1094–156. doi: 10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998.
212. Bébéar CM, Pereyre S. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2005; 5(3):263–71. doi: 10.2174/1568005054880109.
213. Chernova OA, Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Baranova NB, Chernov VM. Mycoplasmas and Their Antibiotic Resistance: The Problems and Prospects in Controlling Infections. *Acta Naturae* 2016; 8(2):24–34.
214. Waites KB, Crabb DM, Liu Y, Duffy LB. In Vitro Activities of Omadacycline (PTK 0796) and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(12):7502–4. doi: 10.1128/AAC.01734-16.
215. Vila PM, Zenga J, Jackson RS. Antibiotic Prophylaxis in Clean-Contaminated Head and Neck Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2017; 157(4):580–8. doi: 10.1177/0194599817712215.
216. Pool C, Kass J, Spivack J, Nahumi N, Khan M, Babus L et al. Increased Surgical Site Infection Rates following Clindamycin Use in Head and Neck Free Tissue Transfer. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2016; 154(2):272–8. doi: 10.1177/0194599815617129.

217. Langerman A, Thisted R, Hohmann S, Howell M. Antibiotic and Duration of Perioperative Prophylaxis Predicts Surgical Site Infection in Head and Neck Surgery. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 2016; 154(6):1054–63. doi: 10.1177/0194599816634303.
218. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ et al. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent* 2021; 113:103768. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103768.
219. Glenda Dvorak. Disinfection 101: The Center for Food Security & Public Health, Iowa State University, College of Veterinary Medicine February 2005.
220. Kneist S. Plaquekontrolle mit Chlorhexidin - Spüllösungen, Gele, Lacke, Chips. *ZWR* 2011; 120(04):156–67. doi: 10.1055/s-0031-1278698.
221. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1):147–79. doi: 10.1128/CMR.12.1.147.
222. So Yeon L, Si Young L. Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride. *Biocontrol Sci* 2019; 24(1):13–21. doi: 10.4265/bio.24.13.
223. Biswas D, Tiwari M, Tiwari V. Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE* 2019; 14(10):e0224107. doi: 10.1371/journal.pone.0224107.
224. Martinez-Resendez MF, Cruz-López F, Gaona-Chávez N, Camacho-Ortiz A, Mercado-Longoria R, Flores-Treviño S et al. The effect of chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* in intensive care units. *Iran J Microbiol* 2022; 14(1):15–23. doi: 10.18502/ijm.v14i1.8796.
225. Justice-Allen A, Trujillo J, Corbett R, Harding R, Goodell G, Wilson D. Survival and replication of *Mycoplasma* species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah. *J Dairy Sci* 2010; 93(1):192–202. doi: 10.3168/jds.2009-2474.
226. Rouse DJ, Lincoln T, Cliver S, Lyon MD, Andrews WW, Hauth JC. Intrapartum chlorhexidine vaginal irrigation and chorioamnion and placental microbial colonization. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 83(2):165–9. doi: 10.1016/s0020-7292(03)00272-8.
227. Estrela C, Silva JA, Alencar AHG de, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*--a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2008; 16(6):364–8. doi: 10.1590/s1678-77572008000600002.
228. Russell AD, Gould GW. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1988; 17:167S-195S.

229. Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, Di Micheli G, Rodrigues PH, Simionato MRL. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol* 2013; 62(Pt 10):1592–600. doi: 10.1099/jmm.0.055830-0.
230. A Tada, H Senpuku, Y Motozawa, A Yoshihara, N Hanada, H Tanzawa. Association between commensal bacteria and opportunistic pathogens in the dental plaque of elderly individuals. *Clin Microbiol Infect* 2006.
231. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *Journal of Critical Care* 2017; 37:30–7. doi: 10.1016/j.jcrc.2016.07.019.
232. Springborg LK, Møller MN. Submandibular gland excision: long-term clinical outcome in 139 patients operated in a single institution. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270(4):1441–6. doi: 10.1007/s00405-012-2175-4.
233. Talha B, Swarnkar SA. Xerostomia. [Updated 2023 Mar 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545287/>.
234. Almståhl A, Wikström M. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. *J Dent Res* 1999; 78(8):1410–6. doi: 10.1177/00220345990780080601.
235. Almståhl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B. Microflora in oral ecosystems in subjects with radiation-induced hyposalivation. *Oral Diseases* 2008; 14(6):541–9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01416.x.
236. Oztas M, Oztas B. Effect of Spray Use on Mouth Dryness and Thirst of Patients Undergoing Major Abdominal Surgery: A Randomized Controlled Study. *J Perianesth Nurs* 2022; 37(2):214–20. doi: 10.1016/j.jopan.2021.04.018.
237. Madsen M, Brosnan J, Nagy VT. Perioperative thirst: a patient perspective. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* 1998; 13(4):225–8. doi: 10.1016/s1089-9472(98)80018-x.
238. Hüppe M, Zöllner M, Alms A, Bremerich D, Dietrich W, Lüth J-U et al. Der Anästhesiologische Nachbefragungsbogen für Patienten in der Herzanästhesie. *Anaesthetist* 2005; 54(7):655–66. doi: 10.1007/s00101-005-0853-y.
239. Lee C-W, Liu S-T, Cheng Y-J, Chiu C-T, Hsu Y-F, Chao A. Prevalence, risk factors, and optimized management of moderate-to-severe thirst in the post-anesthesia care unit. *Sci Rep* 2020; 10(1):16183. doi: 10.1038/s41598-020-73235-5.

240. VonStein M, Buchko BL, Millen C, Lampo D, Bell T, Woods AB. Effect of a Scheduled Nurse Intervention on Thirst and Dry Mouth in Intensive Care Patients. *Am J Crit Care* 2019; 28(1):41–6. doi: 10.4037/ajcc2019400.
241. Conchon MF, Nascimento LAd, Fonseca LF, Aroni P. Perioperative thirst: an analysis from the perspective of the Symptom Management Theory. *Rev Esc Enferm USP* 2015; 49(1):122–8. doi: 10.1590/S0080-623420150000100016.
242. Vincent J-L, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA* 2020; 323(15):1478–87. doi: 10.1001/jama.2020.2717.
243. Antonelli G, Cappelli L, Cinelli P, Cuffaro R, Manca B, Nicchi S et al. Strategies to Tackle Antimicrobial Resistance: The Example of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9). doi: 10.3390/ijms22094943.
244. Kollef MH, Sharpless L, Vlasnik J, Pasque C, Murphy D, Fraser VJ. The impact of nosocomial infections on patient outcomes following cardiac surgery. *Chest* 1997; 112(3):666–75. doi: 10.1378/chest.112.3.666.
245. Kollef MH, Torres A, Shorr AF, Martin-Loeches I, Micek ST. Nosocomial Infection. *Crit Care Med* 2021; 49(2):169–87. doi: 10.1097/CCM.0000000000004783.
246. Delgado-Rodríguez M, Bueno-Cavanillas A, López-Gigosos R, Dios Luna-Castillo J de, Guillén-Solvas J, Moreno-Abril O et al. Hospital stay length as an effect modifier of other risk factors for nosocomial infection. *European Journal of Epidemiology* 1990; 6(1):34–9. doi: 10.1007/BF00155546.
247. Kirby A, Berry C, West R. Antibiotic consumption and Enterobacteriaceae skin colonization in hospitalized adults. *J Hosp Infect* 2017; 95(1):65–8. doi: 10.1016/j.jhin.2016.09.012.
248. Tajeddin E, Rashidan M, Razaghi M, Javadi SSS, Sherafat SJ, Alebouyeh M et al. The role of the intensive care unit environment and health-care workers in the transmission of bacteria associated with hospital acquired infections. *J Infect Public Health* 2016; 9(1):13–23. doi: 10.1016/j.jiph.2015.05.010.
249. Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control* 2010; 38(5 Suppl 1):S25-33. doi: 10.1016/j.ajic.2010.04.196.
250. World Health Organization 2019. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance: CAESAR Manual, Version 3, 2019.

251. Gazdeck RK, Fruscione SR, Adami GR, Zhou Y, Cooper LF, Schwartz JL. Diversity of the oral microbiome between dentate and edentulous individuals. *Oral Diseases* 2019; 25(3):911–8. doi: 10.1111/odi.13039.
252. Razin S, MICHMANN J, SHIMSHONI Z. THE OCCURRENCE OF MYCOPLASMA (PLEUROPNEUMONIA-LIKE ORGANISMS, PPLO) IN THE ORAL CAVITY OF DENTULOUS AND EDENTULOUS SUBJECTS. *J Dent Res* 1964; 43:402–5. doi: 10.1177/00220345640430031101.
253. Wertz PW, Szalay S de. *Innate Antimicrobial Defense of Skin and Oral Mucosa. Antibiotics (Basel)* 2020; 9(4). doi: 10.3390/antibiotics9040159.
254. BETAISODONA® LÖSUNG; 2024. Verfügbar unter: <https://betaisodona.de/de/de/product-category/product/wundversorgung/betaisodona-loesung>.
255. kodan® Tinktur forte farblos: Gebrauchsfertiges Hautantiseptikum mit mindestens 24 Stunden Langzeitwirkung; 2024. Verfügbar unter: <https://www.schuelke.com/de/de/produkte/kodan-Tinktur-forte-farblos.php>.
256. Simon-Soro A, Ren Z, Krom BP, Hoogenkamp MA, Cabello-Yeves PJ, Daniel SG et al. Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. *mBio* 2022; 13(1):e0013122. doi: 10.1128/mbio.00131-22.
257. Ren W, Zhang Q, Liu X, Zheng S, Ma L, Chen F et al. Exploring the oral microflora of preschool children. *J Microbiol* 2017; 55(7):531–7. doi: 10.1007/s12275-017-6474-8.
258. Shi W, Tian J, Xu H, Zhou Q, Qin M. Distinctions and associations between the microbiota of saliva and supragingival plaque of permanent and deciduous teeth. *PLOS ONE* 2018; 13(7):e0200337. doi: 10.1371/journal.pone.0200337.
259. Li Y. The Oral Microbiota:: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol* 2022; 13:895537. doi: 10.3389/fmicb.2022.895537.

6 Danksagung

Ein Projekt wie dieses steht und fällt mit der Betreuung und meine Betreuung war hervorragend. Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Birgit Henrich bedanken. Ohne dich und dein unerschütterliches Engagement, liebe Birgit, wäre diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen. Vielen Dank für die tolle fachliche Unterstützung und die zahlreichen Informationen, Tipps und Vorschläge für diese Arbeit. Vielen Dank auch für deine Geduld und die vielen Stunden, die du in die Betreuung dieser Arbeit investiert hast.

Ein großer Dank geht auch an Prof. Dr. Dr. Majeed Rana für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die regelmäßigen Gespräche und den konstruktiven Input von Seiten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie. Vielen Dank auch an Dr. Dr. Nadia Karnatz und Dr. Dr. Henriette Möllmann, die dieses Projekt in seinen Anfängen überhaupt erst in die Wege geleitet haben und mir stets mit Rat und Tat bei der Verwirklichung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben. Danke dir, Henriette, für die tolle Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung unseres gemeinsamen Papers und für deine stets schnelle Hilfe bei aufkommenden Fragen. Vielen Dank auch an Dr. Karin Berr für den Verleih und die Einweisung der aus dem Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie genutzten Geräte und Materialien.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, der mir die Möglichkeit geboten hat, die molekulargenetischen Analysen in seiner Abteilung durchzuführen.

Ein besonderer Dank gebührt Dana Bäcker, die mich in die Laborarbeit eingeführt hat und mich bei der Durchführung meiner praktischen Arbeiten fantastisch betreut hat. Danke, liebe Dana, für deine unerschütterliche Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen und dass du mich stets unterstützt hast, wo du nur konntest.

Bedanken möchte ich mich überdies bei Robert Langner aus dem statistischen Beratungsbüro des Instituts für Systemische Neurowissenschaften der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Vielen Dank, Herr Langner, für Ihre stets schnelle Hilfe und die überaus freundliche Beratung zu den statistischen Berechnungen für diese Arbeit.

Vielen Dank auch dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene. Ihr habt mich immer bei Laune gehalten und ohne euch wäre es nur halb so unterhaltsam gewesen.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir immer unterstützend zur Seite stand und ohne die ich niemals bis hier hin gekommen wäre. Ein besonderer Dank geht an meinen Mann Fabian, der mich bereits im Studium, im darauffolgenden Berufsalltag

sowie auch in der aktuellen Babypause mit seiner optimistischen Art immer bestens unterstützt und motiviert hat. Vielen Dank, dass du mein Ruhepol bist, egal in welcher Lebenslage.