

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zellfreie DNA als Biomarker in der Sepsis  
Eine systematische Übersichtsarbeit

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Laura Schoos  
aus Prüm

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der Promotion: 18.06.2025

Widmung

Diese Arbeit widme ich [REDACTED].

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	II
Tabellenverzeichnis .....	III
1 Abstract.....	4
1.1 Hintergrund .....	4
1.2 Ziele .....	4
1.3 Methoden .....	4
1.4 Ergebnisse .....	5
1.5 Zusammenfassung.....	5
2 Einleitung .....	7
3 Literaturdiskussion .....	7
3.1 Sepsis .....	7
3.1.1 Diagnostik der Sepsis .....	10
3.1.2 Differenzierung Sepsis, SIRS und Bakteriämie .....	14
3.1.3 Epidemiologie, Ätiologie und Mortalität der Sepsis.....	15
3.2 Die Rolle der cfDNA-Konzentration in der Sepsis .....	16
3.3 Die cfDNA-Konzentration in anderen medizinischen Bereichen.....	19
3.4 Vergleich der cfDNA mit anderen Biomarkern und Sepsis Scores .....	19
3.5 Ziele .....	20
4 Material und Methoden .....	22
4.1 Fragestellung.....	22
4.2 Suchstrategie .....	22
4.3 Ein- und Ausschlusskriterien .....	24
4.4 Datenauswertung .....	25
5 Ergebnisse .....	26
5.1 Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche .....	26
5.2 Charakteristika der Studien .....	28
5.3 Ergebnisse der Studien .....	39
5.4 Statistische Auswertung .....	52
5.4.1 Varianzanalyse .....	63
5.4.2 Cut-off Wert zur Differenzierung zwischen einem guten und einem schlechten Outcome 73	
5.5 Qualitätsbewertung der Studien mit der Newcastle Ottawa Scale.....	76
6 Diskussion.....	82
6.1 Kritische Bewertung der Methodik .....	82
6.1.1 Fehlerquellen in der Suche .....	82
6.1.2 Fehlerquellen innerhalb der Studien .....	83
6.1.3 Fehlerquellen bei der Auswertung der Daten .....	85
6.2 Allgemeine Probleme bei der Messung der cfDNA-Konzentration .....	86
6.2.1 Einflüsse auf die cfDNA-Konzentration .....	87

6.3	Korrelation der cfDNA-Konzentration mit anderen Parametern.....	88
6.4	Ausblick.....	89
7	Zusammenfassung.....	90
8	Literaturverzeichnis.....	92
9	Danksagung.....	98
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	99

## Abkürzungsverzeichnis

95%-CI	95%-Konfidenzintervall
ADAMTS-13	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APACHE II-Score	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II-Score
awmf	Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bzw	beziehungsweise
cfDNA	cell free DNA
Cit-H3	citrullinierte Histon H3
CRP	C-reaktives Protein
DNA	deoxyribonucleic acid
ICU	intensive care unit (Intensivstation)
IL-6	Interleukin 6
IQR	Interquartilabstand
MPO-DNA	Myeloperoxidase-DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
NETs	neutrophil extracellular traps
NT-proBNP	N-Terminale-brain natriuretic peptide
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCT	Procalcitonin
SD	Standardabweichung
SIRS	Systematisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA-Score	Sequential Organ Failure Assessment-Score
sROC	summary receiver operating characteristic
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	abnormale klinische Variablen je nach Phänotyp, adaptiert von Seymour et al. 2019 .....	9
Abbildung 2	Sepsis Diagnostik, adaptiert von Singer et al. 2016 .....	13
Abbildung 3	Beziehungen zwischen dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrome und Sepsis, adaptiert von Bone et al. 1992 .....	14
Abbildung 4	Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende .....	54
Abbildung 5	Ursachen für Asymmetrie in Funnel-Plots, adaptiert von Egger et al., 1997 .....	56
Abbildung 6	Funnel-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende .....	57
Abbildung 7	Forest-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle.....	58
Abbildung 8	Funnel-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle.....	59
Abbildung 9	Forest-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle, Neugeborene.....	60
Abbildung 10	Funnel-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle, Neugeborene.....	61
Abbildung 11	Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende mit logarithmierten Werten.....	62
Abbildung 12	Shapiro-Wilk Test Messmethode .....	65
Abbildung 13	Histogramm Messmethode .....	65
Abbildung 14	Q-Plot Messmethode .....	65
Abbildung 15	Shapiro-Wilk Test Jahr.....	66
Abbildung 16	Histogramm Jahr .....	67
Abbildung 17	Q-Plot Jahr.....	67
Abbildung 18	Shapiro-Wilk Test Material .....	68
Abbildung 19	Histogramm Material.....	68
Abbildung 20	Q-Plot Material.....	69
Abbildung 21	Levene´s Test Messmethode .....	69
Abbildung 22	Levene´s Test Jahr .....	69
Abbildung 23	Levene´s Test Material .....	70
Abbildung 24	Kruskal-Wallis Test Messmethode .....	70
Abbildung 25	paarweiser Vergleich Messmethode .....	71
Abbildung 26	Kruskal-Wallis Test Jahr.....	71
Abbildung 27	Kruskal-Wallis Test Material .....	71
Abbildung 28	Beispielhafte ROC-Curve für die Bewertung des Akuten Koronarsyndrom nach dem T-MACS Score (Troponin-only Manchester Acute Coronary Syndromes) (Hoo et al. 2017).....	73
Abbildung 29	Sensitivität und Spezifität der Cut-off Werte.....	74
Abbildung 30	sROC curve Cut-off Werte survivor vs. non-survivor .....	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Sepsis-Definitionen .....	12
Tabelle 2 Suchbegriff .....	23
Tabelle 3 Charakteristika der eingeschlossenen Studien .....	33
Tabelle 4 Primary Outcome, Messzeitpunkte und Messmethoden der eingeschlossenen Studien.....	38
Tabelle 5 cfDNA-Konzentrationen der septischen Patienten und der Kontrolle .....	44
Tabelle 6 cfDNA-Konzentrationen der Überlebenden und Verstorbenen .....	48
Tabelle 7 Cut-off Wert.....	51
Tabelle 8 Qualitätsbewertung von Kohortenstudien mit der Newcastle Ottawa Scale .....	80
Tabelle 9 Qualitätsbewertung von Fall-Kontroll Studien mit der Newcastle Ottawa Scale.....	80
Tabelle 10 Qualitätsbewertung von Querschnittsstudien mit der Newcastle Ottawa Scale .....	81

# **1 Abstract**

## **1.1 Hintergrund**

Das Krankheitsbild der Sepsis stellt auch in der modernen Medizin immer noch eine große Herausforderung dar. Ein Grund für die anhaltend hohe Letalität ist ein fehlender sensitiver und spezifischer Biomarker, der es ermöglicht frühzeitig eine Prognose über den Schweregrad der Sepsis zu geben und den Verlauf der Krankheit objektiv darzustellen.

Ein vielversprechender Ansatz für einen solchen Biomarker ist frei im Blut zirkulierende DNA, die sogenannte cfDNA. Diese wird immer dann in das Blut abgegeben, wenn eine Zelle stirbt. Damit korrelieren hohe cfDNA Konzentrationen mit einem vermehrten Zelluntergang, wie beispielsweise bei der Sepsis.

## **1.2 Ziele**

Ziel dieser Metaanalyse ist es eine umfassende Zusammenfassung über all diejenigen Studien zu geben, die sich mit der Messung der freien DNA im Blut (cfDNA) als Biomarker für das Krankheitsbild der Sepsis beschäftigt haben. Diese Arbeit soll einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand dieser Thematik geben, indem die gefundenen Studien vergleichend bewertet und die einzelnen Ergebnisse der Studien zusammenfassend ausgewertet werden. So soll eine Aussage über den Nutzen der cfDNA im klinischen Alltag getroffen werden.

## **1.3 Methoden**

Es wurden die Datenbanken PubMed, Cochrane Central Register of Controlled Trials, Web of Science Core Collection, das deutsche Register klinischer Studien und Google Scholar (bis zum 14.06.2024) nach vorher definierten Suchbegriffen ohne Eingrenzung der Sprache, des Landes oder des Erscheinungsdatums durchsucht. Außerdem wurde anhand der Referenzlisten der bereits gefundenen Arbeiten nach weiteren, noch unveröffentlichten, Studien gesucht. Neben den Primärstudien wurden auch allgemeine und systematische Übersichtsarbeiten gesichtet. Anschließend wurde untersucht, inwiefern die Ein- und Ausschlusskriterien bei den gefundenen Studien, die nach Screening des Abstracts in die engere Auswahl kamen, zutrafen. Die verbliebenen Studien wurden anhand der Newcastle Ottawa Skala hinsichtlich ihrer methodischen Qualität beurteilt. Aus allen geeigneten Studien wurden die zur Erstellung einer Kontingenztafel notwendigen Daten entnommen oder

berechnet. Mithilfe dessen wurde die Sensitivität und Spezifität jeder einzelnen Studie und die Gesamt-Sensitivität und -Spezifität berechnet und graphisch in einer sROC-Kurve dargestellt. Mittels des Heterogenitätsmaßes  $I^2$  wurde der Anteil der Variabilität, der auf der Heterogenität der Daten und nicht auf dem Zufall beruht, bestimmt. Von allen geeigneten Studien wurden als Kern der Arbeit ein Forest-Plot erstellt.

## 1.4 Ergebnisse

In der systematischen Literaturrecherche konnten 11.643 Studien gefunden werden, die sich mit der Thematik der cfDNA als Biomarker in der Sepsis auseinandersetzen. Wenngleich deren Ergebnisse sehr heterogen sind zeigen sie dennoch, dass die Messung der freien DNA im Krankheitsbild der Sepsis von hohem Interesse für die Prognose und Diagnostik sein könnte. Für die Hauptfragestellung, ob die Konzentration der cfDNA zwischen einem guten oder schlechten Outcome der septischen Patienten differenzieren kann, konnten 16 Studien herangezogen werden. Innerhalb dieser Studien ergab der Forest-Plot eine Meta-Effektgröße von 1.42 mit einem 95% CI von 0.90 bis 1.93 und somit konnte die Hauptfragestellung mit einem statistisch signifikanten Ergebnis beantwortet werden. Auch die Nebenfragestellung der Möglichkeit mithilfe der cfDNA-Konzentration eine Sepsis diagnostizieren und von anderen Krankheitsbildern unterscheiden zu können erbrachte im Forest-Plot bei 27 Studien, die dazu ausgewertet wurden, ein signifikantes Ergebnis mit einer Meta-Effektgröße von 1.33 und einem 95% CI von 0.96 bis 1.70. Bei einem  $I^2$  von 93% für die Hauptfragestellung und 93% für die Nebenfragestellung muss jedoch von einer erheblichen Heterogenität und systematischen Unterschieden zwischen den Studien ausgegangen werden. Die Studien, die sich mit Kindern beschäftigt haben, wurden separat ausgewertet. Es konnten jedoch nur drei Studien und nur die Nebenfragestellung untersucht werden. Dabei ergab sich eine Meta- Effektgröße von 1.11 und ein 95% CI von -0.09 bis 2.32 und somit keine Signifikanz der Daten. Durch eine höhere Anzahl an Studien könnte sich dies ändern. Um eine Ursache für die ausgeprägte Heterogenität zwischen den Studien zu ermitteln, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Art der angewendeten Messmethode einen signifikanten Einfluss auf die Heterogenität der Ergebnisse für die cfDNA-Konzentrationen ausübte.

## 1.5 Zusammenfassung

Trotz enormer Fortschritte der Diagnostik und Therapie der Sepsis in den letzten Jahrzehnten ist die Notwendigkeit der Forschung auf diesem Gebiet weiterhin unerlässlich. Als weiteres Puzzleteil einer verbesserten Diagnose des Krankheitsbildes könnte cfDNA als Biomarker

dienen. In dieser Metaanalyse konnte durch eine systematische Auswertung der bisherigen Studien auf diesem Gebiet gezeigt werden, dass cfDNA als Biomarker signifikant zwischen einem positiven und einem negativen Outcome differenzieren und septische von nicht septischen Patienten trennen kann. Dabei sollte die cfDNA jedoch keinesfalls als alleiniger Parameter herangezogen, sondern stets in Kombination mit bisher etablierten Biomarkern und Scores betrachtet werden. Um die freie DNA jedoch in der klinischen Praxis etablieren zu können muss ein einheitliches Messverfahren gefunden werden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Es werden zudem mehr Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden benötigt, um die Ergebnisse zu festigen. Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass die cfDNA ein großes Potenzial auf dem Gebiet der Sepsis-Diagnostik und Therapie bietet.

## 2 Einleitung

Unser Immunsystem schützt unseren Körper mit vielfältigen Abwehrmechanismen vor zahlreichen Pathogenen und bewahrt uns so vor mitunter tödlichen Krankheiten. Dieser Schutzmechanismus kann bei einer Überreaktion aber auch ins Gegenteil schwenken und den Menschen schwer erkranken lassen, wenn nicht sogar zum Tode führen. Wenn eine lokale Entzündung sich durch die überschießende Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Aktivierung immunologischer Zellen in eine generalisierte Entzündung ausweitet kommt es zu einer kaskadenartigen Entwicklung verschiedenster Pathomechanismen, die die Organsysteme schwer schädigen können (1). Die weltweit hohen Todeszahlen verdeutlichen die Bedeutung der Sepsis in der Medizin und die Notwendigkeit weiterhin die Therapie und auch Diagnostik dieser Krankheit zu verbessern (2-4). Denn trotz einiger etablierter Biomarker und Scores - im Nachfolgender genauer erläutert – stellt die exakte Diagnose der Sepsis oft ein Problem dar und kann so zu einer Verzögerung der lebensrettenden Therapie führen. Die schon seit vielen Jahren bekannte cfDNA ist dabei in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus gerückt. Die im Blut frei zirkulierende DNA korreliert unter anderem mit dem Zelluntergang und könnte daher einen Aufschluss über das Vorliegen und den Schweregrad der Sepsis liefern (5). Um einen Überblick über die bisher publizierten Studien zu bekommen, wurden sie in dieser Arbeit zusammengetragen und im Sinne einer Metaanalyse ausgewertet.

## 3 Literaturdiskussion

### 3.1 Sepsis

Wie in der Einleitung erläutert, ist die Sepsis eine, durch verschiedenste Pathogene ausgelöste, überschießende Immunreaktion. Jedes Pathogen trägt sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) auf der Oberfläche. Das sind charakteristische Muster von Molekülen, wie zum Beispiel Zuckermolekülen, die von den Immunzellen mit Hilfe der pattern recognition receptors (PRRs) erkannt werden (6). Bindet nun ein PRR an einen PAMP wird ein proinflammatorischer Prozess ausgelöst. Im Falle einer Sepsis kann dieser von den körpereigenen Zellen noch verstärkt werden. Durch die Ausschüttung nukleärer, mitochondrialer oder zytosolischer Proteine, die als damage-associated molecular patterns (DAMPs) fungieren, werden ebenso die PRRs aktiviert. Diese proinflammatorischen Prozesse führen unter anderem zu einer ausgeprägten Mikrozirkulationsstörung. Diese wird im Wesentlichen durch zwei Faktoren ausgelöst: ein übermäßiges Angebot am vWF und ein Mangel an ADAMTS-13 (7). Der vWF ist ein Glykoprotein, das eine Verbindung zwischen den Thrombozyten und der verletzten Gefäßwand schafft und so die primäre Hämostase initiiert (8). ADAMTS-13 ist eine Protease, die in physiologischer Weise vWF spaltet und somit

antithrombotisch wirkt (9). Die bei der Sepsis vorhandene Dysbalance dieser zwei Faktoren führt zu einer überschießenden Thrombusbildung und gleichzeitig, durch den daraus resultierenden Verbrauch an Thrombozyten, zu einer vermehrten Blutungsneigung. Das führt zu lebensgefährlichen Komplikationen, weshalb auch eine ausgeprägte Thrombozytopenie ein Zeichen einer erhöhten Sterblichkeit bei septischen Patienten ist (10). Ein weiterer, für die Sepsis wesentlicher Pathomechanismus ist die Störung der Gefäßpermeabilität. Diese wird zum großen Teil vom Endothel bestimmt und ist entscheidend für die Hämodynamik. Durch die Sepsis wird in den Endothelzellen die Synthese von vasodilatatorischen Mediatoren, vor allem des Stickstoffmonoxids (NO), gefördert. Dies wird unter anderem von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) realisiert. Die Gefäße öffnen sich und die Gefäßpermeabilität nimmt zu, was im schlimmsten Fall zur Ausbildung eines Schocks führen kann. Es kommt zur Ausbildung von Ödemen und zu einer Umverteilung des Volumens, was eine Minderperfusion der Organe bedingt (11).

Bei der Sepsis spielen aber nicht nur die pro-inflammatorischen Prozesse eine Rolle. Neuere Studien konnten zeigen, dass auch anti-inflammatorische Prozesse wichtig für den Pathomechanismus sind und die Krankheit somit sehr heterogen verläuft (12). Die verschiedenen Vorgänge, die sich bei einer Sepsis im Körper abspielen sind also noch viel komplexer als jahrzehntelang angenommen. Seymour et al. fasste daher in einer groß angelegten Studie im Jahr 2019 die septischen Patienten in vier unterschiedlichen Gruppen zusammen. Er unterschied je nach betroffenen Organsystemen, individuellen Patientendaten und verschiedensten Labor- und Vitalparametern zwischen dem  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  Typ. Er postulierte, dass Sepsis als Krankheitsbild heterogener ist als zuvor angenommen und die Diagnostik und Therapie sich je nach Typ entscheidend verändern kann (13).

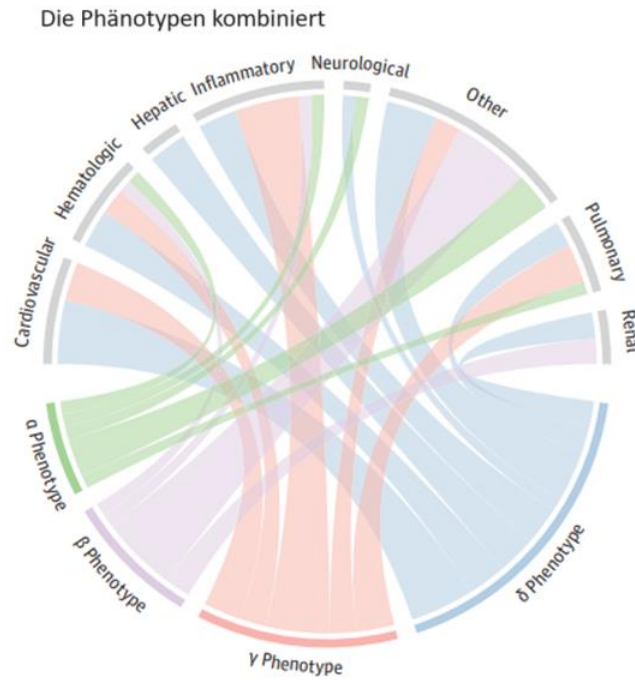


Abbildung 1 abnormale klinische Variablen je nach Phänotyp, adaptiert von Seymour et al. 2019

Was dem einen Patient helfen würde, würde den anderen womöglich umbringen. Das erklärt auch, warum in der Vergangenheit einige, anfangs erfolgsversprechende, Therapiekonzepte in der Praxis gescheitert sind (14). Das Krankheitsbild der Sepsis hat nach wie vor eine sehr hohe Letalität und bedingt immer noch weltweit über 5 Millionen Todesfälle (3, 4). Andere Quellen sprechen sogar von deutlich höheren Zahlen bis zu 19 Millionen (2). Daher ist es ein wichtiges Ziel der Medizin die Diagnostik und Behandlung der Sepsis stetig zu verbessern.

### 3.1.1 Diagnostik der Sepsis

Die 2016 eingeführten Sepsis-3-Definitionen beschreiben die Sepsis als eine „lebensbedrohliche Organfunktionsstörung, die durch eine fehlerhafte Antwort des Körpers auf eine Infektion bedingt ist“ (15). Die genauen Ursachen dieser Infektion und auch die Diagnostik der Sepsis an sich werden dabei nicht genauer definiert. Hier deutet sich schon an, dass sich eine detaillierte Beschreibung des Krankheitsbildes Sepsis aufgrund einer sehr umfassenden Ätiologie und einer, bis heute immer noch recht unspezifischen, Diagnostik sehr schwierig gestaltet.

Bei der Diagnosestellung wird nicht mit einem spezifischen Wert bzw. Parameter gearbeitet, vielmehr versucht man eine Übersicht über mehrere Organsysteme zu bekommen und so den Allgemeinzustand des Patienten zu beurteilen. Dabei arbeitet man auch mit speziellen Ratingsystemen, wie dem SOFA-Score (1). Dieser beurteilt die sechs Parameter Atemsystem, Kreislaufsystem, Leberfunktion, Nierenfunktion, Hämostase und ZNS-Funktion. Für jeden Aspekt werden Punkte vergeben, die steigen, je stärker die Werte des Patienten von den Normwerten abweichen. Sollte der Ausgangswert des Patienten akut um mindestens zwei Punkte steigen ist formal die Diagnose einer Sepsis gestellt, sofern auch eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer Infektion vorliegt (15).

Im nichtinvasiven Setting kann der SOFA-Score auch in der verkürzten Form, die keine maschinelle Diagnostik voraussetzt, als Quick-SOFA-Score (qSOFA) angewendet werden (1). Bei diesem werden für eine Atemfrequenz über 22 /min, ein systolischer Blutdruckwert unter 100mmHg und eine vorliegende Vigilanzminderung jeweils ein Punkt vergeben (1). Ab zwei erreichten Punkten ist eine Organdysfunktion wahrscheinlich. In den aktuellen Surviving Sepsis Campaign Guidelines von 2021 wird dieser aber nicht mehr empfohlen (16). Ob die awmf Leitlinie dieser Empfehlung in der neuen Version folgen wird, bleibt abzuwarten. Nach den aktuellen S3-Leitlinien zur Sepsis wird der qSOFA noch zur Diagnostik bei Verdacht auf eine Sepsis außerhalb der Intensivstation empfohlen (17).

Ein weiterer Score, der zur Beurteilung der Sterblichkeit auf der Intensivmedizin entwickelt wurde, ist der APACHE II Score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II Score). Dieser setzt sich aus drei Kategorien zusammen: zwölf Routine Parameter, dem Alter des Patienten und dem Chronic Health Score, der die Vorgeschichte des Patienten berücksichtigt. Für diese Kategorien werden insgesamt maximal 71 Punkte vergeben, wobei die Überlebenschancen des Patienten mit steigender Punktzahl als immer kleiner bewertet wird (18). Als Goldstandard bei der Sepsis-Diagnostik gilt laut „International Guidelines for Management of Sepsis an Septic Shock“ von 2016 und der aktuellen S3-Leitlinie für Sepsis aber nach wie vor die Blutkultur (19). Diese ist die einzige direkte Nachweismethode

für ein Bakterium, die es gleichzeitig erlaubt Antibiotikaresistenzen zu identifizieren und so die bestmögliche Therapie zu ermitteln (17).

Eine solche Diagnostik bedarf einer Menge Erfahrung und vor allem auch Zeit. Zeit, die die Patienten nicht immer haben. Studien konnten zeigen, dass an einer Sepsis Erkrankte, die mit einer frühen zielgerichteten Therapie innerhalb der ersten sechs Stunden im Krankenhaus behandelt wurden, ein deutlich besserer Outcome hatten als solche, die später behandelt wurden (20). Nach den Auswertungen von Kumar et al. aus dem Jahr 2006 bekommen aber nur etwa die Hälfte aller Patienten mit einem septischen Schock innerhalb der ersten sechs Stunden nach erstmals dokumentierter Hypotension eine antibiotische Therapie (21). In jeder Stunde, die bis zum Start der Therapie vergeht, steigt die Mortalität statistisch um etwa 6-8% an (21, 22). Aber auch das Gegenteil, eine Übertherapie aufgrund einer fälschlicherweise diagnostizierten Sepsis, schadet dem Patienten. Die übermäßige Volumengabe belastet den Kreislauf und die Antibiotikagabe erhöht das Risiko einer pseudomembranösen Kolitis und einer Resistenzentwicklung (23). Zudem verringert eine frühzeitige Deeskalation der antibiotischen Therapie die Mortalität. Laut aktueller S3-Leitlinie ist sogar schon nach 72 Stunden eine Deeskalation auch ohne Erregernachweis empfohlen, vorausgesetzt es trat eine klinische Verbesserung ein (17).

Daher wäre es von großem Vorteil einen spezifischen Biomarker zu haben, der die Diagnose und der Sepsis vereinfacht und mit dem Schweregrad dieser korreliert. Einen prognostischen Biomarker für die Sepsis zu finden, würde dabei helfen, das Outcome der Patienten besser beurteilen zu können, den Therapieerfolg oder auch -misserfolg darstellen zu können und die Schwere der Sepsis gleich zu Beginn einschätzen zu können (24). Da gerade bei der Sepsis die gewählte Antibiotikatherapie alle 48-72h kritisch überprüft werden muss, würde ein zusätzlicher Parameter die Entscheidung für ein Beibehalten oder Wechsel der gegebenen Antibiotika vereinfachen (17).

Ein Biomarker ist nach dem National Institutes of Health (NIH) definiert als „ein Merkmal, das objektiv gemessen und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention bewertet werden kann“ (25). Wichtige Biomarker, die bereits jetzt bei jedem Verdacht auf eine Sepsis erhoben werden sollten, sind jegliche proinflammatorischen Mediatoren, wie die CRP-, die PCT- und, wenn auch im klinischen Alltag, abgesehen von der Pädiatrie, weniger angewendet, die IL-6-Konzentration (26). Die CRP- und IL-6-Konzentrationen helfen bei der Entscheidung, ob es sich um eine akute Infektion handelt, oder ob diese schon länger besteht. Der IL-6 Wert steigt schnell stark an, sinkt aber auch wieder frühzeitig, nach etwa einem Tag, ab. Der CRP-Wert steigt dagegen nur langsam, dafür aber lang anhaltend an (26). Zu beachten ist bei diesen Parametern, dass sie nicht ausschließlich bei einer Infektion ansteigen, sondern

beispielsweise auch bei Verbrennungsoptionen erhöht sind (27). Vor allem auch der PCT-Spiegel hat sich in den letzten Jahren besonders in der Pneumonie induzierten Sepsis als wichtiger Biomarker bewährt. So kann eine Sepsis bei einem PCT-Wert unter 0,5 g/l als sehr unwahrscheinlich angesehen werden (28).

Auch das Abfallen des Quick-Wertes und die steigende Konzentration der Fibrinolyseprodukte, wie die D-Dimere, deuten, ebenso wie ein sinkender pH- und  $p_aO_2$ -Wert, auf eine Sepsis hin (26). Ein weiterer wichtiger Hinweis auf eine Entzündungsreaktion liefert die Anzahl an neutrophilen Granulozyten. Diese sind einer der ersten Zellen des Immunsystems, die einen Erreger erkennen und durch Phagozytose, Degranulation und Bildung von NETs bekämpfen können (29). Die NETs sind Zusammenschlüsse aus Chromatin, mikrobiziden Proteinen und oxidativen Enzymen und helfen dem Immunsystem die Infektion einzudämmen (20). Dabei fangen die neutrophilen Granulozyten die mikrobiellen Erreger mit den NETs regelrecht ein und können ihn so töten (30). Spezifische Marker der NETs, wie die MPO-DNA und das Cit-H3, ermöglichen es die Konzentration der NETs zu bestimmen. Studien konnten zeigen, dass sie mit anderen Entzündungsparametern und auch mit der Konzentration der zellfreien DNA korrelieren (31).

Um die Diagnostik der Sepsis objektiv und einheitlich zu gestalten, wurden bereits 1992 feste Kriterien definiert und in einer „Sepsis-1 Definition“ zusammengefasst. 2003 und 2016 wurde diese Definition noch einmal aktualisiert und ist in der neusten Fassung auch heute noch wegweisend für die Diagnostik der Sepsis (15, 32, 33). In der untenstehenden Tabelle sind die verschiedenen Sepsis Definitionen zusammengefasst.

	Sepsis-1	Sepsis-2	Sepsis-3
Autoren	Bone et al	Levy et al	Singer et al
Erscheinungsjahr	1992	2003	2016
Definition einer Sepsis	2/4 SIRS Kriterien + Infektion	2/4 SIRS Kriterien oder andere definierte Symptome einer Sepsis + Infektion	Lebensbedrohliche Organfunktionsstörung aufgrund einer Infektion, Ein Anstieg des SOFA-Scores um $\geq 2$
Definition einer schweren Sepsis	Sepsis + eine Organfunktionsstörung, Hypoperfusion oder Hypotonie	Sepsis + eine Organfunktionsstörung	-
Definition eines septischen Schocks	Sepsis + Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr	Sepsis + Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr	Sepsis + Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr + Lactat $\geq 2$ mmol/l

**Tabelle 1 Sepsis-Definitionen**

In der neusten Sepsis-3 Definition von 2016 entfällt der Begriff „schwere Sepsis“, da die Organdysfunktion, die zuvor das Kriterium für eine schwere Sepsis war, Teil der allgemeinen Definition der Sepsis geworden ist und daher eine Differenz zwischen „normaler“ und „schwerer“ Sepsis nicht mehr sinnvoll ist. Der septische Schock hingegen ist nach wie vor abzugrenzen. Dieser liegt dann vor, wenn der Patient trotz adäquater Volumengabe Katecholaminpflichtig ist und das Serum Laktat über 2 mmol/l liegt.

Nachfolgend eine Übersicht über die aktuelle Vorgehensweise zur Diagnostik der Sepsis und des septischen Schocks aus der Arbeit von Singer et al.:

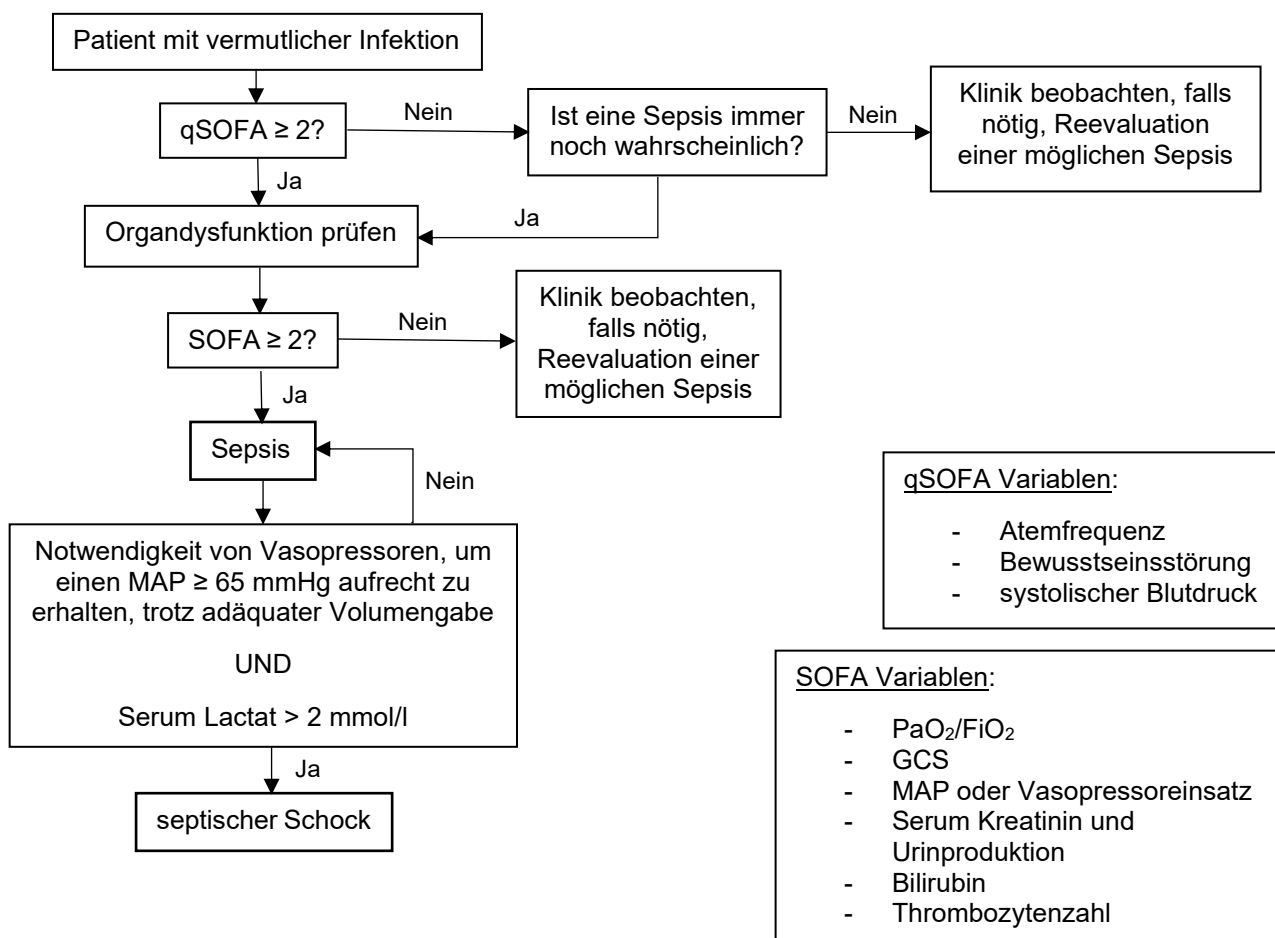


Abbildung 2 Sepsis Diagnostik, adaptiert von Singer et al. 2016

Einen spezifischen Blutmarker, der mit der Schwere der Krankheit korreliert, wie es beispielweise bei der Troponinkonzentration und Myokardinfarkten der Fall ist (34) wurde bisher aber noch nicht gefunden.

### 3.1.2 Differenzierung Sepsis, SIRS und Bakteriämie

Während das Systematische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) früher mit der Sepsis gleichgestellt wurde, ist es heutzutage klar von dieser abzugrenzen. Eine SIRS kann im Gegensatz zu einer Sepsis auch durch nicht-infektiöse Ursachen, wie beispielsweise ein Trauma oder Verbrennungen, hervorgerufen werden. Um eine SIRS diagnostizieren zu können müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien vorliegen (32):

1. Temperatur  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  oder  $\leq 36^{\circ}\text{C}$
2. Tachykardie mit einer Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$
3. Tachypnoe mit einer Frequenz  $\geq 20/\text{min}$  oder Hyperventilation mit  $\text{PaCO}_2 \leq 4.3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$
4. Leukozytose ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) oder  $\geq 10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild

In Kombination mit einer Infektion wurde nach diesen Kriterien bis zum Jahr 2016 auch die Sepsis diagnostiziert. Eine Studie aus dem Jahr 2015 konnte jedoch zeigen, dass man so jeden achten Fall fälschlicherweise nicht als Sepsis diagnostiziert. Daher wurde mit den Sepsis-3-Kriterien die Organdysfunktion in das Zentrum der Definition gestellt (15).

Das folgende Schaubild von Bone et al. (32) aus dem Jahr 1992 verdeutlicht, wenn auch nicht auf dem aktuellen Stand, sehr gut den Zusammenhang zwischen SIRS, Sepsis, einer Infektion und einer Bakteriämie:

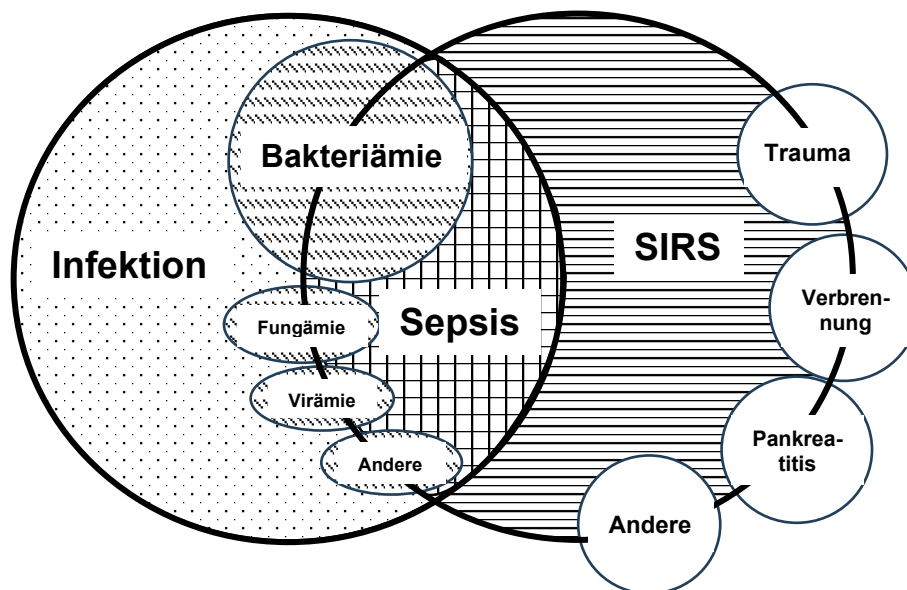


Abbildung 3 Beziehungen zwischen dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom und Sepsis, adaptiert von Bone et al. 1992

Wie das Bild darstellen soll, erfüllt jede Sepsis formal die Kriterien einer SIRS, eine SIRS erfüllt aber andererseits nicht alle Kriterien einer Sepsis. Ebenfalls verdeutlicht wird die Ätiologie. Während eine Sepsis immer auf einer Infektion beruht, kann eine SIRS verschiedenste Auslöser haben.

Auch die, ebenfalls im Schaubild dargestellte, Differenzierung zwischen Sepsis und einer Bakteriämie ist nicht immer eindeutig. Die Bakteriämie ist eine bakterielle Infektion des Blutes. Dieser Begriff allein definiert noch nicht den klinischen Zustand des Betroffenen. Erst wenn eine dysregulierte Antwort des Körpers auf diese Infektion folgt, die zu einer Organfunktionsstörung führt, spricht man nicht mehr von einer Bakteriämie, sondern von einer Sepsis. Diese dysregulierte Antwort spiegelt sich in einer Steigerung des (q)SOFA-Scores wider (35). Somit ist nicht jede Bakteriämie als Sepsis zu verstehen. Bei der Sepsis muss es sich umgekehrt aber auch nicht immer um eine Bakteriämie handeln. Die Sepsis Definition beschreibt nicht, wo der Fokus der Infektion liegt (15).

### 3.1.3 Epidemiologie, Ätiologie und Mortalität der Sepsis

Die epidemiologischen Daten sind aufgrund einer fehlenden Meldepflicht für die Sepsis und regional großen Unterschieden nicht einheitlich. Eine umfassende Metaanalyse, die Studien von 1979 bis 2015 sichtet und sich vor allem mit den Daten der Industrieländer beschäftigte, konnte aber zeigen, dass die Inzidenz in den Jahren 2005 bis 2015 in den einkommensstarken Ländern bei 437/100.000 für die Sepsis und bei 270/100.000 für die schwere Sepsis lag. Es konnte zudem beobachtet werden, dass die absolute Zahl, der an Sepsis erkrankten, stieg. Hochrechnungen aus diesen Daten ergaben etwa 5,3 Millionen an einer Sepsis Verstorbene jährlich. (4)

Um einen besseren Überblick über die tatsächliche Mortalität der Sepsis zu bekommen, untersuchte eine groß angelegte Metaanalyse aus dem Jahr 2021 die Daten von 134 Studien, die die Sterblichkeit von Sepsis und dem septischen Schock in Deutschland, Europa ohne Deutschland und Nordamerika untersuchten. Die in der Gesamtschau der eingeschlossenen Studien ermittelte 30-Tages-Mortalität der Sepsis lag in Deutschland dabei bei 26,5% (95% CI: 19,86–33,15 %), die des septischen Schocks bei 30,48% (95% CI: 29,30–31,67 %). Im Vergleich dazu lag die 30-Tage-Mortalität im Rest Europas bei 23,85% (95% CI: 20,49–27,21 %) bzw. 34,57% (95% CI: 33,51–35,64 %) und in Nordamerika bei 19,58% (95% CI: 14,03–25,14 %) bzw. 33,69% (95 % CI: 31,51–35,86 %). Die Sterblichkeit der Sepsis und des septischen Schocks in Deutschland ist somit im internationalen Vergleich weder signifikant erhöht noch erniedrigt (36). Daten aus Europa lassen zudem darauf schließen, dass die Sterblichkeit in den letzten Jahren insgesamt sinkend ist (37).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die absoluten Zahlen der an Sepsis erkrankten, vermutlich vor allem durch den demographischen Wandel vorangetrieben, steigt. Die Mortalität hingegen ist durch den medizinischen Fortschritt gesunken. Deutschland zeigt im europaweiten Vergleich eine gute, wenn auch nach wie vor sehr hohe, Mortalität. Die Datenlage für die Entwicklungsländer ist leider sehr lückenhaft, weshalb sich hier nur ungenaue Aussagen treffen lassen.

Bezüglich der Ätiologie fasst Angus et al. (2) in seinem Review zusammen, dass bei 62% der septischen Patienten gramnegative Bakterien nachgewiesen werden konnten, bei 47% grampositive Bakterien und bei 19% Pilze (38). In diesen Gruppen wiederum waren bei den gramnegativen Bakterien *Escherichia coli*, *Klebsiella species* und *Pseudomonas aeruginosa* am häufigsten, bei den grampositiven Bakterien führten *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass lediglich ein Drittel aller Blutkulturen tatsächlich positiv ausfallen. Als ursächlicher Infektionsherd ist die Pneumonie mit über der Hälfte aller Fälle führend, gefolgt von Infektionen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (39).

Chronische Krankheiten wie chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, AIDS oder Krebs und die Einnahme von Immunsuppressiva gelten als Risikofaktor für eine Sepsis. Auch genetische Faktoren spielen scheinbar eine Rolle bei der Pathogenese. So konnte gezeigt werden, dass Männer ein höheres Risiko aufweisen als Frauen und die farbige Bevölkerung stärker betroffen ist als die Weiße. Auch das Alter ist ein wichtiger Risikofaktor. So ist die Inzidenz vor allem bei Kindern und älteren Menschen hoch (40).

### **3.2 Die Rolle der cfDNA-Konzentration in der Sepsis**

1948 entdeckten Mandel und Metais erstmals bei einem an Krebs erkrankten Patienten, dass sich in unserem Blut freie DNA befindet (41). Inzwischen hat man den diagnostischen und auch therapeutischen Wert dieser DNA-Bruchstücke erkannt und es werden immer weitere Zweige der Medizin entdeckt, in denen die cfDNA als diagnostischer und/oder prognostischer Biomarker von Nutzen sein könnte.

Um die cfDNA als sinnvolles diagnostisches Kriterium nutzen zu können ist es unerlässlich sich Gedanken zu machen, woher sie kommt und unter welchen Umständen sie in physiologischer Weise oder im Rahmen eines pathologischen Prozesses ansteigt. Wichtig ist dabei, dass die Gesamtmenge an freier DNA, die wir messen, verschiedene Ursprünge hat. So kann man zwischen nukleärer, mitochondrialer, apoptotischer und auch bakterieller DNA unterscheiden (5). Während die nukleäre DNA direkt aus dem Zellkern freigegeben wird, stammt die mitochondriale DNA aus den Mitochondrien, die ihr eigenes Erbgut besitzen (42).

Es gibt zahlreiche Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, dass eine Zelle ihre DNA in den Extrazellularraum abgibt. Gahan, Anker und Stroun et al. beschrieben den Prozess der aktiven DNA-Sezernierung durch eukaryotische Zellen, die die DNA in Form von Nukleoproteinen in einem kontrollierten Mechanismus in den Extrazellularraum entlassen. Ähnlich wie bei Prokaryoten kann diese freie DNA dann von anderen Zellen aufgenommen werden. Dort kann die DNA als Vermittler von Informationen dienen und die Empfängerzelle modifizieren (43-45). Auch Abolhassani et al. bestätigten in ihrer Untersuchung mit Zellen der HL-60 Reihe, dass auch lebende Zellen aktiv in einem regulierten Mechanismus DNA sezernieren (46).

Interessanterweise korreliert die Konzentration der freien DNA dabei auch mit der Konzentration an neutrophilen Granulozyten. Das liegt zum einen daran, dass freie, im Blut zirkulierende DNA die Überlebensfähigkeit der Neutrophilen erhöht (6), zum anderen geben die neutrophilen Zellen bei dem Prozess der NETosis aber auch selbst DNA ab (47). Und auch die mtDNA ist ein potenter Induktor von NETs (48). Neuere Studien zeigten aber, dass die NETs wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Erhöhung der cfDNA in septischen Patienten spielt (49).

Die cfDNA fungiert aber auch als Damage-associated molecular pattern (DAMP) (siehe 3.3) und sorgt dafür, dass die pro-inflammatorische Kaskade weiter angetrieben wird, indem sie bei den Zielzellen an einen intrazellulären Rezeptor (TLR9 Rezeptor) bindet und diese so aktiviert (50). Wenn das aber, wie bei der Sepsis, im überschießenden Maße stattfindet, beschleunigt das auch die Entstehung eines Multiorganversagens, da die Entzündungsreaktion nicht mehr lokal stattfindet, sondern systemisch wird. Damit erschließt sich auch, warum eine sehr hohe Konzentration der freien DNA mit einer erhöhten Mortalität des Patienten korrelieren könnte (51). Diese erhöhte Mortalität könnte auch, wie eine Studie im Jahr 2015 zeigte, damit zusammenhängen, dass hohe cfDNA-Konzentrationen die Fibrinolyse und damit die Auflösung von, für den Patienten lebensgefährlichen, Blutgerinnseln hemmt (52). Daher darf man die cfDNA vielleicht auch nicht nur als diagnostisches Hilfsmittel verstehen, sondern auch als einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie. So wurde im Jahr 2020 versucht, den Krankheitsverlauf der Sepsis positiv zu beeinflussen, indem man die cfDNA komplexierte und diese so nicht mehr als DAMP fungieren konnte (53).

Lange war aber nicht eindeutig geklärt, welche der DNA-Entitäten bei der Sepsis ansteigt, da meist lediglich die gesamte cfDNA Konzentration gemessen wurde. Daher differenzierte eine Arbeitsgruppe im Jahr 2022 die verschiedenen DNA-Typen und bestimmte die Konzentrationen der gesamten cfDNA, sowie der nukleären, der mitochondrialen, der apoptotischen und der bakteriellen DNA im Blut von Patienten mit einer Bakteriämie. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass aber vor allem die apoptotische DNA, die bei

Gesunden gar nicht messbar war, bei Patienten mit einer Bakteriämie stark ansteigt und den Großteil der freien DNA im Blut ausmacht. Analog dazu ist anzunehmen, dass auch bei Sepsis der Großteil der messbaren cfDNA Konzentration apoptotischen Ursprungs ist (5).

Apoptotische DNA wird immer dann ins Blut abgeben, wenn eine Zelle abstirbt (54). Dies kann durch einen kontrollierten Zelltod, der Apoptose, oder durch einen unkontrollierten Zelltod, der Nekrose, erfolgen. Bei verschiedensten Pathologien, wie beispielsweise dem Myokardinfarkt, Kanzerogenen oder auch einem Trauma sterben besonders viele Zellen und der Wert der freien DNA im Blut steigt (55). Auch bei dem Krankheitsbild der Sepsis kann man dies beobachten. Diesen Anstieg kann man messen und so Rückschlüsse auf den Gesamtzustand des Erkrankten ziehen. Mehrere, in dieser Metaanalyse eingeschlossene, Studien konnten zeigen, dass die Konzentration der cfDNA bei den Patienten, die im späteren Verlauf ihrer Krankheit erlagen, höher war als bei denen, die die Sepsis überlebt haben (24, 56, 57). Ein weiterer Grund, warum die Konzentration der freien DNA mit der Überlebenschance korrelieren könnte, ist die Tatsache, dass die frei im Blut zirkulierende DNA bei septischen Patienten durch Multiorganversagen nicht mehr adäquat abgebaut werden kann und im Blut akkumuliert (58). Bei einem gesunden Menschen beträgt die Halbwertszeit der cfDNA etwa 30 Minuten (59). Das führt dazu, dass die Konzentration der freien DNA im gesunden Menschen meist sehr niedrig ist - laut Brodbeck et al. im Bereich von 0,6 bis 3,4 ng/ml (60). Wie bei anderen Biomarkern auch ist die Anzahl der freien DNA-Moleküle in unserem Körper natürlichen Schwankungen ausgesetzt. Diese liegen etwa im Bereich von 0,5 bis 1,4 ng/ml und sind von pathologischen Veränderungen abzugrenzen (60).

Es gilt noch zu untersuchen, ob die cfDNA die, im Folgenden aufgelisteten, Kriterien eines idealen Biomarkers erfüllen kann. Diese sind (61):

- er sollte eine hohe Sensitivität für die zu untersuchende Krankheit aufweisen
- er sollte eine hohe Spezifität für die zu untersuchende Krankheit aufweisen
- die Höhe des Plasmaspiegels sollte mit der Schwere der Krankheit korrelieren
- er sollte schon sehr früh ansteigen, um noch Zeit für therapeutische Maßnahmen zu gewährleisten
- er sollte eine Halbwertszeit aufweisen, die den Parameter klinisch auswertbar macht
- er sollte reproduzierbar sein
- er sollte kostengünstig und einfach in der Handhabung sein

### 3.3 Die cfDNA-Konzentration in anderen medizinischen Bereichen

Neben der Sepsis versucht man die cfDNA auch in anderen Krankheitsbildern als Biomarker zu etablieren. So ist die Messung der freien DNA im Blut einer schwangeren Frau in der Pränataldiagnostik schon seit dem Jahr 2000 als eine Methode beschrieben worden, um chromosomale Veränderungen des Ungeborenen zu detektieren (62). Aber auch in der Tumordiagnostik findet die cfDNA vermehrt Aufmerksamkeit. Sie soll dabei helfen maligne Geschehen schon frühzeitig erkennen und behandeln zu können (63). Dabei versucht man neben der Messung der cfDNA-Konzentration auch dem Krebs zugrunde liegende Mutationen in der freien DNA, die zum Teil auch von den entarteten Zellen stammt, zu finden (63). Ein weiteres Einsatzgebiet der zellfreien DNA ist die Behandlung von Patienten, die ein Trauma erlitten haben. Hierbei soll die Messung der cfDNA-Spiegel vor allem dabei helfen den weiteren Verlauf der Patienten besser einschätzen zu können (64). Auch eine sogenannte Allotransplantatabstoßung bei Patienten mit einem Spenderorgan könnte mit Hilfe der cfDNA frühzeitig erkannt und bekämpft werden (65).

### 3.4 Vergleich der cfDNA mit anderen Biomarkern und Sepsis Scores

Schon jetzt werden in der Praxis viele Biomarker und Scores eingesetzt, die die Diagnose und Prognose der septischen Patienten erleichtern und objektiver gestalten. Bei der Untersuchung der cfDNA in der Sepsis ist es daher auch von Interesse, inwieweit die Konzentration der freien DNA mit der Konzentration anderer Biomarker und einer Erhöhung der Sepsis spezifischen Scores korreliert.

Verschiedene Studien konnten zumindest mit den, im klinischen Alltag häufig eingesetzten, SOFA- und APACHE II Score eine positive Korrelation mit der cfDNA zeigen (66, 67).

Im Vergleich mit den anderen Biomarkern für Sepsis, wie IL-6, das CRP oder PCT, zeigte die cfDNA eine vergleichbare oder sogar bessere Sensitivität und Spezifität (56, 68). Ob der Anstieg der cfDNA jedoch signifikant mit einem Anstieg anderer Biomarker für die Sepsis Diagnostik korreliert, ist in der Literatur jedoch umstritten. Rhodes et al. konnte 2006 keine Korrelation zwischen der cfDNA und dem PCT, CRP und NT-proBNP feststellen (69). Huang et al. stellte 2018 hingegen eine positive Korrelation zwischen der cfDNA und dem PCT fest ( $r= 0.675$ , 95% CI= 0.575-0.766,  $p< 0.001$ ) (70).

Dies ist vor allem deshalb wichtig, weil sich das PCT in der Vergangenheit als sehr bedeutender Biomarker für die Sepsis herauskristallisiert hat, unter anderem da die PCT-Serumkonzentration positiv mit der Schwere der Infektion korreliert (71). Das PCT zeigte in Studien die Eigenschaft, bei verschiedenen Ursachen der Sepsis unterschiedlich stark

anzusteigen. So findet man nur bei bakterieller Genese einen relevanten Anstieg, bei viralen oder anderweitig bedingten Ursachen der Sepsis steigt das PCT kaum an (71). Besonders bei den gramnegativen Bakterien scheint das PCT stark anzusteigen, bei den grampositiven weniger (72). Solch eine Differenzierung fand sich bei der cfDNA bisher nicht (57).

Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Biomarkern dürfen aber nicht als Schwäche aufgefasst werden, sondern bieten vielmehr die Chance, dass sie sich gegenseitig ergänzen und zusammen eine möglichst genaue Vorhersage für den Patienten treffen können. So konnten Studien zeigen, dass beispielsweise PCT zwar ein sehr guter diagnostischer Marker, jedoch nur ein schlechter prognostischer Marker darstellt, wohingegen IL-6 Schwächen bei der Diagnostik aufweist und besser als prognostischer Marker dient. So liegt die Sensitivität bei der Diagnostik der Sepsis und des septischen Schocks bei PCT bei 74,4% und 93,7%, die Spezifität bei 86,7% und 75,2%. Damit ist die PCT-Konzentration gut für die Diagnostik geeignet. Die IL-6-Konzentration hingegen ist als prognostischer Marker wertvoll, da sie bei 86% der Überlebenden am zweiten Tag absinkt (73). Hierbei könnte die cfDNA ergänzende Aussagen liefern und die Genauigkeit der Diagnostik und Prognostik erhöhen. Das zeigt auch die bereits erwähnte Studie aus dem Jahr 2018 von Huang et al.. Nach deren Daten kann die freie DNA im Plasma bei der Prognose der Sepsis eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 81,43% erreichen. Indem man die cfDNA mit dem PCT und dem APACHE II Scoren kombiniert kann man diese Werte aber insgesamt noch erhöhen und erreicht eine Sensitivität von 94,29% und eine Spezifität von 98,57% (70).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die bisherigen Mittel zur Diagnostik einer Sepsis noch keine zufriedenstellende Sensitivität und Spezifität besitzen und ein weiterer Biomarker in der Klinik von Vorteil wäre (74).

### **3.5 Ziele**

Ziel dieser Meta- Analyse ist es, eine Übersicht über alle Studien zu erarbeiten, die Sepsis und cfDNA thematisieren und diese vergleichend zu bewerten. So soll ein Überblick über den momentanen Forschungsstand auf diesem Gebiet gegeben werden. Dabei soll im Detail untersucht werden, inwiefern sich die Messung der cfDNA-Konzentration eignet, um die Prognose des Patienten eingrenzen zu können. Des Weiteren soll dargestellt werden, ob man mit Hilfe des cfDNA-Spiegels im Blut das Krankheitsbild der Sepsis von anderen Krankheitsbildern differenzieren kann. Dabei wird auch versucht mögliche Einfluss- und Störgrößen, die das Ergebnis verzerren können, zu identifizieren.

Eine mögliche Einführung der cfDNA Messung in den klinischen Alltag könnte dabei helfen, den Krankheitsverlauf der Patienten objektiver zu beurteilen und frühzeitig eine Aussage über

den Therapieerfolg oder -misserfolg treffen zu können. Eine dadurch möglicherweise frühzeitig eingeleitete Therapieänderung könnte das Outcome der Patienten deutlich verbessern.

Somit lautet die Hauptfragestellung der vorliegenden Arbeit:

- Kann die Messung der cfDNA-Konzentration das Outcome der Patienten und die Mortalität zuverlässig vorhersagen?

Die Nebenfragestellungen lauten:

- Kann die Messung der cfDNA-Konzentration die Diagnose der Sepsis ergänzen?

## 4 Material und Methoden

Orientiert wurde sich bei dieser Metaanalyse an der PRISMA Checkliste (75). Diese wurde auch in der im Teil 4.2 erfolgten Suchstrategie beachtet.

### 4.1 Fragestellung

Die konkrete Forschungsfrage wurde anhand des PICO Schemas erarbeitet.

<b>Patient</b>	Patienten, bei denen anhand der, zu dem Zeitpunkt geltenden, Sepsis Kriterien eine Sepsis diagnostiziert wurde
<b>Intervention</b>	Die Messung der freien DNA im Blut der Studienteilnehmer
<b>Comparison</b>	Als Vergleichsgruppe wurden gesunde Probanden oder Patienten mit einer anderen Krankheit als Sepsis untersucht
<b>Outcome</b>	Ziel der Messung soll es sein die Mortalität der Patienten prognostizieren zu können

Die endgültige Fragestellung lautet somit: „Kann die Messung der cfDNA-Konzentration im Blut das Outcome der Patienten und die Mortalität zuverlässig vorhersagen?“

### 4.2 Suchstrategie

Die Suchstrategie lehnte sich an dem vier Phasen Flussdiagramm des PRISMA Statements an (75). Hierbei erfolgt in der ersten Phase die Literatursuche in den nachfolgend genannten Datenbanken. In der zweiten Phase werden die Überschriften und Abstracts der gefundenen Artikel gescreent. Wenn dabei die Einschlusskriterien (siehe 4.3 Ein- und Ausschlusskriterien) als erfüllt angesehen werden, werden im dritten Schritt auch die Volltexte gelesen. In der vierten Phase werden die Studien noch einmal genau überprüft und, wenn sich auch dann keine Gründe gegen den Einschluss finden, schließlich in die Metaanalyse aufgenommen.

Für die erste Phase der Literatursuche wurden die Datenbanken PubMed, Cochrane Central Register of Controlled Trials, Web of Science Core Collection, das deutsche Register klinischer Studien und Google Scholar (bis zum 14.06.2024) nach vorher definierten Suchbegriffen ohne Eingrenzung der Sprache, des Landes oder des Erscheinungsdatums durchsucht. Auch das Register ClinicalTrials wurde in die Suche einbezogen. Außerdem suchten wir nach dem Schneeballsystem anhand der Referenzlisten der bereits gefundenen Arbeiten nach weiteren, noch unveröffentlichten Studien. Neben den Primärstudien wurden auch allgemeine und systematische Übersichtsarbeiten nach dort zitierten Studien gesichtet.

Der Suchbegriff, der in der Datenbank PubMed verwendet wurde, lautet:

#1	(Systemic Inflammatory Response Syndrome[Title/Abstract] OR Sepsis[Title/Abstract] OR shock septic[Title/Abstract] OR bacteraemia[Title/Abstract] OR sepsis*[Title/Abstract] OR septic[Title/Abstract] OR shock, septic[MeSH Terms] OR Sepsis[MeSH Terms] OR Systemic Inflammatory Response Syndrome[MeSH Terms] OR multiple organ failure[MeSH Terms] OR MODS[Title/Abstract] OR multiple organ failure[MeSH Terms] OR multiple organ dysfunction syndrome[Title/Abstract])	270.504
#2	(Cell-Free Nucleic Acids[Title/Abstract] OR cell free dna[Title/Abstract] OR CNAPS[Title/Abstract] OR cirNAs[Title/Abstract] OR circulating cell free nucleic acids[Title/Abstract] OR circulating nucleic acids[Title/Abstract] OR cf-Nas[Title/Abstract] OR Cell-Free Nucleic Acids[Title/Abstract] OR free circulating dna[Title/Abstract] OR circulating free dna[Title/Abstract] OR exDNA[Title/Abstract] OR ((blood circulation[MeSH Terms] OR blood circulation[All Fields] OR circulation[All Fields] OR circulations[All Fields] OR circulate[All Fields] OR circulated[All Fields] OR circulates[All Fields] OR circulating[All Fields]) AND extracellular dna[Title/Abstract]) OR C-DNA[Title/Abstract] OR circDNA[Title/Abstract] OR cirDNA[Title/Abstract] OR circulating dna[Title/Abstract] OR ccfDNA[Title/Abstract] OR circulating cell free dna[Title/Abstract] OR cfDNA[Title/Abstract] OR cf-DNA[Title/Abstract] OR fcDNA[Title/Abstract] OR cfcDNA[Title/Abstract] OR cell free circulating dna[Title/Abstract] OR blood plasma dna[Title/Abstract] OR Cell-Free Nucleic Acids[MeSH Terms] OR Plasma DNA[Title/Abstract] OR NETosis[Title/Abstract] OR extracellular traps[MeSH Terms] OR neutrophil extracellular traps[Title/Abstract] OR Circulating nucleoproteins[Title/Abstract] OR Circulating nucleosomes[Title/Abstract])	22.161
#3	#1 AND #2	854

Tabelle 2 Suchbegriff

Der oben dargestellte Suchbegriff ist an die Regeln der Datenbank Pubmed angepasst. Für die Suche in den anderen Datenbanken wurde der Begriff entsprechend der Regeln der jeweiligen Datenbank modifiziert verwendet.

### 4.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Da vermieden werden sollte, dass relevante Studien aufgrund zu strenger Ein- und Ausschlusskriterien nicht in die Metaanalyse einbezogen werden, wurde darauf geachtet nur relevante Kriterien auszuwählen. Dennoch musste gewährleistet sein, dass nur passende Studien in die Analyse einbezogen werden. Daher wurden im Vorhinein folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- Es werden nur Studien am Menschen eingeschlossen
- Die aufgenommenen Studien müssen vergleichbar sein und das Thema „die Konzentration der cfDNA als Biomarker für Sepsis“ hinreichend erfüllen
- Es handelt sich um eine Originalstudie
- Alle für die Metaanalyse relevante Daten müssen direkt oder indirekt verfügbar sein oder auf Nachfrage vom Autor zur Verfügung gestellt werden können

Die Ausschlusskriterien sind damit:

- Die Studie verwendet ausschließlich Tiermodelle
- Für die Metaanalyse relevanten Daten können nicht ermittelt werden
- Es handelt sich bei der Arbeit um Editorials und Expertenmeinungen
- Die Studie beschäftigt sich mit der Konzentration der cfDNA bei anderen Krankheitsbildern

## 4.4 Datenauswertung

Nachdem Titel, Abstract und schließlich der gesamte Text der Studien analysiert wurden, wurden tabellarisch die wichtigsten Daten der Studien zusammengefasst. Diese sind:

- der Name des ersten Autors
- das Land, in dem die Studie durchgeführt wurde
- das Erscheinungsjahr
- das Studiendesign
- die Anzahl der untersuchten septischen Patienten
- das Durchschnittsalter Sepsis Gruppe
- die Geschlechterverteilung der Sepsis Gruppe
- die Art und Größe der Kontrollgruppe
- das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe
- die Geschlechterverteilung der Kontrollgruppe
- der primäre Outcome
- die Messzeitpunkte
- die verwendete Messmethode
- die durchschnittliche cfDNA Konzentration und dazugehörige Standardabweichung der Sepsis Gruppe
- die durchschnittliche cfDNA Konzentration und dazugehörige Standardabweichung der Kontrollgruppe
- die Mortalität
- die durchschnittliche cfDNA Konzentration und dazugehörige Standardabweichung der Überlebenden und Verstorbenen in der Sepsis Gruppe
- der p-Wert, der den Unterschied zwischen den Überlebenden und Verstorbenen angibt
- der Cut-off Wert, der den Tod eines Patienten voraussagt und die dazugehörige Sensitivität und Spezifität

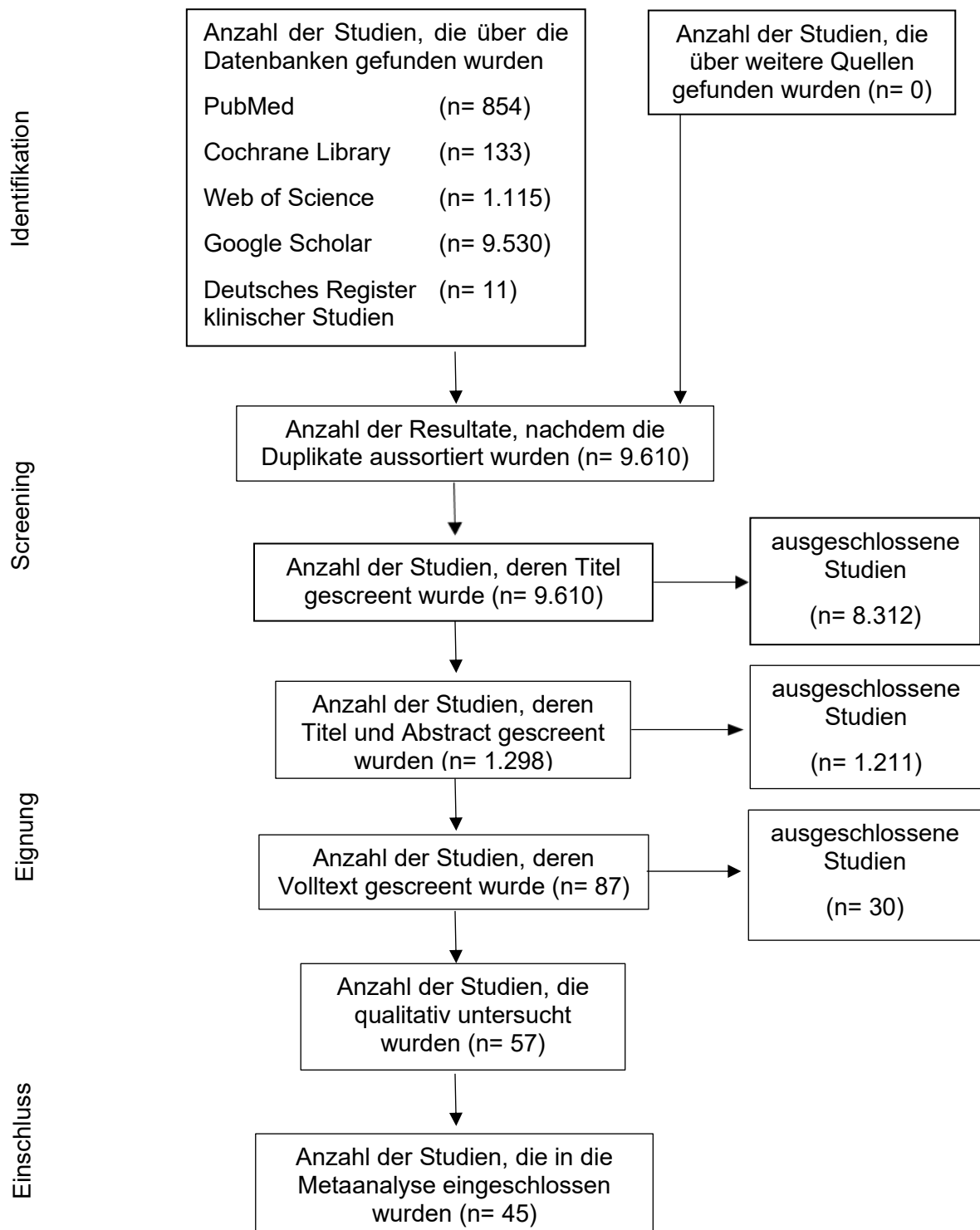
Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden alle Ergebnisse in ng/ml umgerechnet. Bei den Studien, die ihre Ergebnisse in Genome equivalents (GE) pro Milliliter angegeben haben, wurde der Umrechnungsfaktor 6,6pg pro 1GE angewendet, was dem Gewicht der nukleären DNA in einer diploiden Zelle entspricht (76).

Die Qualität der einzelnen Studien wurde anhand der Newcastle Ottawa Scala für nicht-randomisierte Studien beurteilt. Die Skala gibt es in drei Varianten. Für Fall-Kontroll- und für Kohorten-Studien und, in einer modifizierten Form, auch für Querschnittsstudien (77, 78).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche

Die unter 4.2 erläuterte Literaturrecherche erbrachte 11.643 Ergebnisse. Nachfolgend ist das PRISMA Flussdiagramm zur besseren Übersicht der Ergebnisse aufgeführt.



Insgesamt erbrachte die systematische Literaturrecherche 11.643 Ergebnisse. Davon waren 2.033 Arbeiten mehrfach in den Datenbanken vertreten. Von den restlichen 9.610 wurden 8.312 allein anhand des Titels ausgeschlossen. Damit blieben noch 1.298 Ergebnisse, deren Titel und Abstract gesichtet wurden. Davon wurden 1.211 Studien ausgeschlossen, da sie der Fragestellung der vorliegenden Metaanalyse nicht hinreichend entsprachen. Von den übrigen Studien wurden der gesamte Text und die Ergebnisse durchgearbeitet. Davon wiederum konnten weitere 30 Arbeiten aus verschiedensten Gründen nicht in die Berechnungen der Metaanalyse eingeschlossen werden. So konnte beispielweise die Arbeitsgruppe rund um Chen et al. (79) nicht aufgenommen werden, da die Messwerte in arbitrary units angegeben wurden und somit nicht mit den Messwerten der anderen Studien vergleichbar waren. Am Ende der systematischen Literaturrecherche blieben 45 Studien, die eingeschlossen werden konnten.

## 5.2 Charakteristika der Studien

Zur Auswertung wurden die wichtigsten Daten der Studien tabellarisch zusammengefasst. Diese sind:

- Name des Erstautors
- Land, in dem die Studie durchgeführt wurde
- Studiendesign
- Anzahl der septischen Patienten (Ne)
- SOFA-Score
- Durchschnittsalter der septischen Patienten (wenn nicht anders angegeben als Mittelwert in Jahren)
- Anteil der Männer an den septischen Patienten in Prozent
- Anzahl der Probanden der Kontrollgruppe (Nc)
- Durchschnittsalter der Kontrollgruppe (wenn nicht anders angegeben als Mittelwert in Jahren)
- Anteil der Männer an der Kontrollgruppe in Prozent
- Primary Outcome
- Zeitpunkte, an denen die cfDNA-Konzentration gemessen wurde
- Verwendete Messmethode, wenn nicht anders angegeben wurde Plasma verwendet

Autor	Land	Studiendesign	Ne	SOFA-Score	Alter Patienten	Männer (%)	Kontrollgruppe	Nc	Alter Kontrolle	Männer (%)
Abdelaal 2018	Ägypten	prospektiv	30	nd	24 Monate	50	-	-	-	-
Avriel 2014	Israel	prospektiv	108	nd	55,9	65,7	none	0	-	-
Beltran-Garcia 2021	Spanien	prospektiv	Sepsis 10 Schock 17	8	65,74	62,96	Gesunde Nonseptic-ICU	17 9	64,38	66,7
Chornenki 2019	Kanada	prospektiv	49	nd	66,2	65,3	Gesunde Trauma	26 77	32 49,2	57,7 72,7
Clementi 2016	Italien	prospektiv	27	7,5	62	70	schwer Kranke	7	64	71
Czaikoski 2016	Brasilien	Querschnitt	31	12	59	54,9	Gesunde	8	-	-
Dawulieti 2020	China	Querschnitt	15	nd	-	-	Gesunde	16	-	-
Dennhardt 2024	Deutschland	prospektiv	150	9	66	62,7	Gesunde	81	65	63
Duplessis 2018	USA	Fall-Kontroll Studie	179	nd	-	-	SIRS	24	-	-
Dwivedi 2012	Kanada	retrospektiv	80	nd	63,4	68,65	Gesunde	14	-	-
Forsblom 2014	Finnland	prospektiv	27	nd	-	-	Bakteriämie (Non ICU)	391	-	-
Gao 2019	China	prospektiv	36	nd	-	-	Gesunde andere Krankheit	20 20	-	-

Ergebnisse

Garnacho Montero 2014	Spanien	prospektiv	117	8	63	55,6	Gesunde SIRS	10 43	63	62,6
Gould 2015	Kanada	Querschnitt	60	nd	61,33	55	Gesunde	10	-	-
Grumaz 2016	Deutschland	retrospektiv	7	nd	70,5	71,43	Gesunde Post-OP	12 6	26,4 64,2	66,67 66,67
Grumaz 2019	Deutschland	prospektiv	48	11	66	77	Post-OP	17	66	59
Hampson 2017	England	prospektiv	35	11	41	65,7	Gesunde Verbrennung	19 22	41 33	42,1 68,2
Hashiba 2014	Japan	Querschnitt	17	6	65	59	schwer Kranke	18	61	57
Huang 2018	China	prospektiv	Sepsis 50 Severe 55	nd	-	-	Gesunde	50	-	-
Huttunen 2011	Finnland	prospektiv (cfDNA wurde aber erst nachträglich ausgewertet)	132	9 (cfDNA über Cut-off) 2 (cfDNA unter Cut-off)	62	53	none	0	-	-
Jing 2022	China	prospektiv	30	11,5	65	56,67	Gesunde ICU-Patienten	4 16	39 57	50 56,25
Kocsis 2009	Ungarn	Querschnitt	20	nd	57	70	Gesunde schwere Pankreatitis leichte Pan.	20 30 32	- 57 57	- 63 56
Kung 2012	Taiwan	prospektiv	67	5,9	65	66	Gesunde	33	66	67

Ergebnisse

Lee 2018	Australien	Querschnitt	21	nd	65	47,62	Gesunde Thrombose	23 25	44 65	43,48 52
Lenz 2022	Deutschland	prospektiv	EOS 3 LOS 6	nd	2 Tage 44 Tage	66,67 66,67	EMA negativ (European Medical Agency Score)	22	15 Tage	63,64
Margraf 2008	Deutschland	prospektiv	10	-	52	80	Kardiologisch e Chirurgische	57 28	68	85,96
Martins 2006	Brasilien	Querschnitt	11	nd	51	54,55	Gesunde Polytrauma	11 7	-	-
Maruchi 2018	Japan	prospektiv	55	12	68	71	Gesunde	13	60	62
Moreira 2010	Spanien	prospektiv	Sepsis 28 Schock 26	-	-	-	Gesunde Fieber Infektion	125 30 23	-	-
Nguyen 2017	Dänemark	retrospektiv	13	nd	26. SSW	-	Gesunde Enterokolitis	27 13	26. SSW 25. SSW	-
Patel 2018	England	prospektiv	Sepsis 39 Severe 60 Schock 13	3	75 73 71	51,3 68,3 76,9	Gesunde	21	70	61,9
Purhonen 2015	Finnland	prospektiv	21	nd	-	-	Neutro- penisches Fieber	79	-	-
Rannikko 2018	Finnland	prospektiv	481	0,89 (qSOFA)	68 <sup>med</sup>	52,6	none	0	-	-
Rhodes 2006	England	prospektiv	19	5,5 (von allen ICU- Patienten)	62 (von allen ICU- Patienten)	61,54 (von allen ICU- Patienten)	Gesunde ICU-Patienten ohne Sepsis	10 33	-	-

Ergebnisse

Saukkonen 2008	Finnland	prospektiv	255	8	60 <sup>med</sup>	69,02	none	0	-	-
Schneck 2016	Deutschland	prospektiv	15	8	66	53,3	Gesunde Postoperativ	10 10	62 61	50 60
Silva de Miranda 2024	Brasilien	prospektiv	Sepsis 30 Schock 32	6	68,5	62,9	Infektion	32	54,5	35,5
Stiel 2020	Deutschland	prospektiv	15	nd	40. SSW	52,94	Gesunde	17	39. SSW	41,18
Tanaka 2019	Frankreich	prospektiv	20	8	68	85	Nonseptic-ICU	20	70,5	65
Urosevic 2022	Australien	Querschnitt	49	-	65 <sup>med</sup>	53,06	Gesunde Patienten, die innerhalb von 30h keine positive Blutkultur hatten	9 14	50 <sup>med</sup> 66 <sup>med</sup>	66,67 64,29
Wijeratne 2004	England	prospektiv	8	nd	63 <sup>med</sup> (von allen ICU- Patienten)	69 (von allen ICU- Patienten)	Gesunde	22	47 <sup>med</sup>	100
Xia 2016	China	prospektiv	169	-	61	57,99	Gesunde	30	-	-
Xu 2024	China	prospektiv	89	7	-	69,7	-	-	-	-
Yan- Qiang 2016	China	prospektiv	24	nd	58	62,5	Gesunde SIRS	73 43	53 55	61,64 60,47
Yang 2017	China	prospektiv	52	nd	53	60	Gesunde	40	52	61,54

Gesamt	2.961	1.919
--------	-------	-------

Tabelle 3 Charakteristika der eingeschlossenen Studien

med Median

Autor	primary Outcome	Messzeitpunkte	Messmethoden
Abdelaal 2018	Mortalität	Ankunft ICU Tag 5	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (Roche Lightcycler)
Avriel 2014	28-Tage-Mortalität	Innerhalb 12h nach ICU- Ankunft	SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), 96-well Fluorometer (Spectrafluor Plus)
Beltran- Garcia 2021	Sepsis	Innerhalb 24h nach ICU- Ankunft	ELISA, Antinukleoprotein Antikörper wurden von Milzzellen von Mäusen isoliert
Chornenki 2019	Vergleich zu Trauma, Mortalität	täglich	Isolation aus Plasma mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit dem Spectrophotometer
Clementi 2016	Mortalität	Ankunft	Isolation mit dem automatic extractor NorDiag Arrow kit, Konzentrationsbestimmung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (RotorGene 6000)
Czaikoski 2016	Schwere der Sepsis	Innerhalb 24h	Quant-iT™ PicoGreen Kit (Invitrogen), FlexStation 3 Microplate Reader
Dawulieti 2020	therapeutischer Nutzen cfDNA	-	Isolation mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit, Konzentrationsmessung mit dem Quant-iT PicoGreen double-stranded DNA Assay Kit

Dennhardt 2024	28-Tage-Mortalität	Tag 3 Tag 7 Frühe Erholungsphase Monat 6 Monat 12	Isolation aus dem Plasma mit dem QiaAmp DNA kit (Qiagen), quantitative real-time PCR mit dem CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Nutzung des SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad) und PrimePCR™ probe assay n-Rps18
Duplessis 2018	28-Tage-Mortalität	Ankunft 24h	SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), 96-well Fluorometer (Ultra Evolution)
Dwivedi 2012	28-Tage-Mortalität	täglich eine Woche, dann für 50 Patienten wöchentlich	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit dem Spectrophotometer
Forsblom 2014	Mortalität	Tag 3 Tag 5	Quant-iT™ high-sensitivity DNA assay kit, QubitH fluorometer (Invitrogen)
Gao 2019	Mortalität bei Sepsis + Leberversagen	-	Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit
Garnacho Montero 2014	Mortalität, Vergleich zu SIRS	Ankunft 24h	Isolation aus dem Serum mit dem Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (Roche Lightcycler)
Gould 2015	Thrombin Erhöhung	Tag 1	Isolation mit dem QIAMP DNA blood mini Kit, Konzentrationsmessung mit dem BioPhotometer Plus spectrophotometer
Grumaz 2016	Nachweis Bakteriämie in Sepsis	Sepsis: Ankunft Tag 1 Tag 4 Tag 7 Tag 14 Tag 28  Post-OP: Präoperativ	Isolation mit dem Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen), Konzentrationsmessung mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)

Grumaz 2019	Immunantwort auf Pilzinfektion bei septischem Schock	Postoperativ 24h nach OP  Gesunde: einmalig Sepsis: Ankunft Tag 1 Tag 2 Tag 7 Tag 14 Tag 21 Tag 28	Isolation mit dem QIAasymphony Sample Preparation (SP) Instrument (Qiagen) und dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit, Konzentrationsmessung mit dem Qubit dsDNA HS Assay (Kit Life Technologies)
Hampson 2017	Entwicklung einer Sepsis bei Verbrennungsoptern	Post-OP: Präoperativ Postoperativ 24h nach OP  Tag 1 Tag 3 Tag 7 Tag 14 Tag 21 Tag 28 2. Monat 3. Monat 6. Monat 12. Monat	SYTOX Green Dye (Life Technologies), BioTek Synergy 2 fluorometric plate reader (NorthStar Scientific Ltd)
Hashiba 2014	Einfluss von Sepsis auf NETs	Innerhalb 24h nach Ankunft bzw. nach Sepsis-Diagnose	Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kit
Huang 2018	Sepsis	-	Nicht verfügbar
Huttunen 2011	Mortalität	Innerhalb 4d nach Diagnose	Quant-iT™ DNA-Assay-Kit, Qubit Fluorometer (Invitrogen)

Jing 2022	Sepsis, Mortalität	Tag 0 Tag 1 Tag 2-3 Tag 4-7 Nach Ankunft ICU	Isolation mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen), Konzentrationsmessung mit dem Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)
Kocsis 2009	Vergleich Pankreatitis	Innerhalb von 48h nach Beginn der Krankheit	Isolation mit High Pure PCR Template Preparation, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (Lightcycler-FastStart DNA Master SYBR green I mix)
Kung 2012	Mortalität	Ankunft Tag 4 Tag 7	Isolation mit dem QIAamp Blood Kit, Konzentrationsbestimmung mit qPCR für das $\beta$ -globin (Roche Lightcycler)
Lee 2018	Nachweis NETs im Vollblut und Serum	kein genauer Zeitpunkt angegeben	SYTOX green dye, (ThermoFisher Scientific), das Serum wurde untersucht
Lenz 2022	Nachweis NETs bei Sepsis bei Frühgeborenen	Einmalig wurden von der Diagnostik übriggebliebenen Blutproben gesammelt	Sytox Orange Nucleic Acid Stain (Invitrogen)
Margraf 2008	Sepsis	bis Tag 10 täglich	PicoGreen (Molecular Probes), Fluorometer: Fusion (PerkinElmer)
Martins 2006	Nachweis cfDNA in septischen Patienten	-	Amplifikation mittels PCR für das K-ras Gen, anschließend Fluoreszenz, Farbstoff Ethidiumbromid
Maruchi 2018	Mortalität	Tag 1 Tag 3 Tag 7	Quant-iT PicoGreen dsDNA assay, QUBIT® 2.0 Fluorometer (Life Technologies)
Moreira 2010	Sepsis	kein genauer Zeitpunkt angegeben	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (ABI 7000 sequence detectin system)
Nguyen 2017	Zusammenhang cfDNA mit LOS und nekrotisierender	bis 6 Tage vor Diagnose am Tag der Diagnose	Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit

	Enterokolitis in Frühgeborenen		
Patel 2018	Mortalität, Neutrophilen Funktion	Tag 1 Tag 4 Tag 7	SYTOX Green Dye (Life technologies), BioTek Synergy 2 fluorometric plate reader (NorthStar Scientific Ltd)
Purhonen 2015	Sepsis bei neutropenischem Fieber	Tag 0 (Beginn neutr. Fieber) Tag 1 Tag 2 Tag 3	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (Roche Lightcycler 2.0)
Rannikko 2018	Mortalität	Tag 0 (nach pos Blutkulturen) Tag 1 Tag 2 Tag 3 Tag 4	Qubit dsDNA HS Assay Kit, Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
Rhodes 2006	Mortalität	kein genauer Zeitpunkt angegeben	Isolation mit dem High Pure PCR Template Preparation kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (Roche Lightcycler)
Saukkonen 2008	Mortalität	Einschluss 72h	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (ABI 7000 sequence detectin system)
Schneck 2016	Einfluss der cfDNA auf die Koagulation	Einschluss 24h 72h 168h	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (TaqMan)
Silva de Miranda 2024	Differenzierung der Schwere der Sepsis	30min nach Diagnose	Isolation mit der Phenol-Chloroform Methode, Konzentrationsmessung mit dem QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System für das L1PA2 <sub>90</sub>

Stiel 2020	Messung der NET-Marker als Predictor für neonatale Sepsis	Nach der Geburt (Nabelschnurblut)	SYTOX Green, Fluorometer: Fluoroskan (Thermo Fisher Scientific)
Tanaka 2019	Evaluation des HDL-Profils bei septischen Patienten	Tag 1 Tag 2 Tag 7	Quant-it™ Picogreen® ds DNA Reagent (Invitrogen)
Urosevic 2022	Bakteriämie	Innerhalb von 30h nach positiver Blutkultur	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit und einem Qubit 2.0 Fluorometer
Wijeratne 2004	Mortalität	innerhalb 2h nach Ankunft	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen (ABI 7000 sequence detectin system)
Xia 2016	Mortalität	Ankunft ICU 24h 48h	Isolation mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, Konzentrationsmessung mit qPCR für das $\beta$ -globin Gen
Xu 2024	Mortalität	Nach S-AKI Diagnose	Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent, das Serum wurde untersucht
Yan-Qiang 2016	Mortalität, Vergleich zu SIRS	innerhalb 6h nach Ankunft	Perkin Elmer Victor 3 (Perkin Elmer), das Serum wurde untersucht
Yang 2017	Einfluss NETs auf Koagulation	kein genauer Zeitpunkt angegeben	SytoxGreen (Invitrogen), Fluorometer: Fluoroskan (Thermo Fisher Scientific)

Tabelle 4 Primary Outcome, Messzeitpunkte und Messmethoden der eingeschlossenen Studien

### 5.3 Ergebnisse der Studien

Folgend sind die Ergebnisse der eingeschlossenen Studien tabellarisch aufgeführt.

Berücksichtigt sind:

- die cfDNA-Konzentration der septischen Gruppe mit Standardabweichung ( $[cfDNA]_e$ ,  $SDe$ )
- die cfDNA-Konzentration der Kontrollgruppe mit Standardabweichung ( $[cfDNA]_c$ ,  $SDc$ )
- die Mortalität innerhalb der septischen Gruppe in Prozent
- die absolute Zahl der Verstorbenen und Überlebenden innerhalb der septischen Gruppe ( $Nns$ ,  $Ns$ )
- die cfDNA-Konzentration der Verstorbenen und Überlebenden mit Standardabweichung ( $[cfDNA]_{ns}$ ,  $[cfDNA]_s$ )
- der p-Wert der cfDNA-Konzentration der Verstorbenen im Vergleich zu derer der Überlebenden
- der Cut-off Wert, ab dem von einem negativen Outcome auszugehen ist mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und zugehörigem 95% CI
- die errechnete Anzahl an, durch den Cut-off Wert erkannten, tatsächlich Verstorbenen und Überlebenden (richtig positiv, TP bzw. richtig negativ, TN) und durch den Cut-off Wert nicht erkannten Verstorbenen und Überlebenden (falsch negativ, FN bzw. falsch positiv, FP)

Wenn bei einer Studie mehrere cfDNA-Konzentrationen im Verlauf angegeben wurden, wurde immer diejenige in die Bewertung einbezogen, die als Erstes gemessen wurde (siehe „Messzeitpunkte“ in Kapitel 5.2). Wenn eine Studie zwischen unterschiedlichen Schweregraden der Sepsis unterschieden hat, wurde der gewichtete Mittelwert der jeweiligen cfDNA-Konzentrationen berechnet. Die Standardabweichung wurde in solch einem Fall mit

der Formel  $s = \sqrt{\frac{(n_1-1)*s_1^2 + (n_2-1)*s_2^2}{n_1+n_2-2}}$  geschätzt (80). Bei mehreren Kontrollgruppen in einer Studie wurde, wenn möglich, in der Metaanalyse stets die gesunden Probanden als Kontrolle herangezogen, da von dieser Gruppe bei den meisten Studien Ergebnisse vorliegen.

Manche Autoren veröffentlichten lediglich den Median und nicht den Mittelwert. Diese wurden mit der Bitte nach den vollständigen Daten angeschrieben. Bei fehlender Antwort wurde der Mittelwert mit dem Median gleichgesetzt, in der Annahme, dass die Daten normalverteilt sind, und die Standardabweichung aus dem Interquartilabstand nach der Formel  $SD = IQR/1,35$  von Higgins und Green geschätzt (81).

Autor	Jahr	[cfDNA]e	SDe/IQR	[cfDNA]c	SDc/IQR
Abdelaal	2018	Tag 1: 78,63 <sup>med</sup>	IQR: 33,78-277,50 SD: 180,53	-	-
		Tag 5: 51,63 <sup>med</sup>	IQR: 7,34-87,7 SD: 59,53		
Avriel	2014	3039,57	1751,63	-	-
Beltran-Garcia	2021	Sepsis 111,8	74,5	Gesund: 70,66	42,22
		Schock 152,7	74,93	ICU: 56,97	25,76
		Zusammen: 137,55**	74,78**		
Chornenki	2019	4700 <sup>med*</sup>	-	3800 <sup>med*</sup> 2200 <sup>med*</sup>	-
Clementi	2016	35,19 <sup>med</sup>	IQR: 11,56-196,35 SD: 136,88	1,57 <sup>med</sup>	IQR: 1,37-6,61 SD: 3,88
Czaikoski	2016	1640	980	833 <sup>med**</sup> 800 <sup>mean**</sup>	IQR: 617-900** SD: 209,63
Dawulieti	2020	630**	-	90**	-
Dennhardt	2024	1477 <sup>med</sup>	IQR: 528-4721 SD: 3105	48 <sup>med</sup>	IQR: 0-220 SD: 162,96
Duplessis	2018	4069,27**	4618,25**	3000	1500
Dwivedi	2012	2643**	-	930	760

Forsblom	2014	-	-	-	-
Gao	2019	481,6	-	-	-
Garnacho- Montero	2014	38,08 <sup>med</sup>	26,5	1,87 <sup>med</sup> 27,52 <sup>med</sup>	1,02 22,44
Gould	2015	9367**	-	2450	233
Grumaz	2016	377,30	374,94	55,43 149,33	37,64 181,58
Grumaz	2019	119,1 <sup>med</sup>	-	11,4 <sup>med</sup>	-
Hampson	2017	180	-	160	-
Hashiba	2014	966	198	65	26
Huang	2018	Sepsis 1438	IQR: 1 154- 1 576 SD: 312,59	17	IQR: 13-20,5 SD: 5,56
		Severe 2595	IQR: 2 162- 5 198 SD: 2248,89		
		zusammen: 2044,05**	1642,56**		
Huttunen	2011	1290	IQR: 1130-1690 SD: 414,81	-	-
Jing	2022	805,94	1621,72	1,99 13,87	2,05 16,72

Kocsis	2009	5167	1069	22,16	3,38
				2206	452
				24,28	2,16
Kung	2012	436 <sup>med</sup>	216,114	25 <sup>med</sup>	19,41
Lee	2018	13,2	1,1	8,1	0,2
				22,3	2,9
Lenz	2022	EOS 8925,85	5937,92	3016,71	2203,11
		LOS 5214,59	2381,53		
		Zusammen: 6011,63**	4413,64**		
Margraf	2008	-	-	80,4 160	25,8
Martins	2006	89477**	60373	15600**	-
				49071**	31741
Maruchi	2018	2000 <sup>med*</sup>	IQR: 1280-3700* SD: 1792,59	1000 <sup>med*</sup>	IQR: 630-1570* SD: 696,3
Moreira	2010	13,2 <sup>med</sup>	IQR: 62,04-250,8 SD: 139,82	4,09 <sup>med</sup>	IQR: 2,574-7,26 SD: 3,47
		327,36 <sup>med</sup>	IQR: 145,2-472,56 SD: 242,49	4,62 <sup>med</sup>	2,31-9,24 5,13
		Zusammen: 164,46**	196,01**	50,82 <sup>med</sup>	IQR: 30,36-79,2 SD: 36,18
Nguyen	2017	1505 <sup>med**</sup>	IQR: 1290-1720**	1040 <sup>med**</sup>	IQR: 965-1115**

			SD: 318,52		SD: 111,11
				990 <sup>med**</sup>	IQR: 900-1070** SD: 125,93
Patel	2018	1308 <sup>med</sup>	IQR: 1246-1636 SD: 288,89	68,6 <sup>med</sup>	IQR: 42.1-111.5 SD: 51,41
		1826 <sup>med</sup>	IQR: 1426-2241 SD: 603,70		
		-	-		
		Zusammen: 1621,94**	504,35**		
Purhonen	2015	3,23 <sup>med</sup>	IQR: 1,94-9,11 SD: 5,31	2,52 <sup>med</sup>	IQR: 1,393-4,778 SD: 2,51
Rannikko	2018	1380 <sup>med</sup> 1735 <sup>mean</sup>	IQR: 1200–1770 SD: 422,22	-	-
Rhodes	2006	192 <sup>med</sup>	IQR: 65–362 SD: 220,00	17 <sup>med</sup>	IQR: 14-19 SD: 3,70
				74 <sup>med</sup>	IQR: 46-156 SD: 81,48
Saukkonen	2008	53,26 <sup>med</sup>	IQR: 25,63-124,96 SD: 99,33	-	-
Schneck	2016	68,77 <sup>med</sup>	IQR: 3,17-1450,94 SD: 1072,42	3,17 <sup>med</sup>	IQR: 3,168-7,56 SD: 3,25
				20,99 <sup>med</sup>	IQR: 12,41-71,41 SD: 43,71
Silva de Miranda	2024	1454,88	IQR: 669,38- 3365,68	525,18 <sup>med</sup>	IQR: 185,68-895,58 SD: 525,85

			SD: 2696,30		
		2950,37	IQR: 1240,48- 10784,58 SD: 7069,70		
		Zusammen: 2226,75**	5416,38**		
Stiel	2020	7805,53**	4629,6787	7055,53**	4725,01
Tanaka	2019	980,9 <sup>med</sup>	IQR: 872,4-1323 SD: 333,78	582,1 <sup>med</sup>	IQR: 529,3-694,3 SD: 122,22
Urosevic	2022	370	IQR: 126-525** SD: 295,56	40	IQR: 33-59** SD: 19,30
				75	IQR: 55-129** SD: 54,81
Wijeratne	2004	36,25 <sup>med</sup> (alle ICU-Patienten)	IQR: 5,13-687,27 SD: 505,29	13,00 <sup>med</sup>	IQR: 2,84-28,27 SD: 18,84
Xia	2016	286 <sup>med</sup>	IQR: 87,5-968 SD: 652	16,8 <sup>med</sup>	IQR: 8,44-130 SD: 90,04
Xu	2024	855	IQR: 537-1139 SD: 445,93	-	-
Yan- Qiang	2016	1426,54	863.79	69,66	24.66
				692,02	703.06
Yang	2017	6620	IQR: 4220-8320 SD: 3037,04	900	IQR: 700-1080 SD: 281,48

Tabelle 5 cfDNA-Konzentrationen der septischen Patienten und der Kontrolle

## Ergebnisse

\*Werte wurden an Diagrammen abgelesen

\*\*Werte wurden anhand der Angaben in den Studien berechnet

<sup>med</sup> Median

[cfDNA]e/c/s/ns: cfDNA-Konzentration der Sepsis-Patienten/der Kontrolle/der Überlebenden/der Verstorbenen in ng/ml

Autor	Mortalität (%)	Ns	[cfDNA]s	SDs/IQR	Nns	[cfDNA]ns	SDns/IQR	p-Wert s vs. Ns
Abdelaal	30	21	Tag 1: 89,87 <sup>med</sup>	IQR: 52,94-397,65 SD: 255,34	9	Tag 1: 17,00	IQR: 2,31-164,37 SD: 120,04	0,032 (1)
			Tag 5: 46,25 <sup>med</sup>	IQR: 8,94-72,75 SD: 47,27		Tag 5: 53,92	IQR: 5,36-257,12 SD: 186,48	0,402 (5)
Avriel	32,4	73	1659 <sup>med</sup> 2032 <sup>mean</sup>	IQR: 855.5-2613.5 SD: 1302,22	35	3469 <sup>med</sup> 5142 <sup>mean</sup>	IQR: 1984.0-8833.0 SD: 5073,33	<0.001
Beltran-Garcia	22,22	21	-	-	6	-	-	-
Chornenki	16,9	-	-	-	-	-	-	-
Clementi	40,74	16	12,48 <sup>med</sup>	IQR: 9,88-41,71 SD: 23,58	11	123,27 <sup>med</sup>	IQR: 40,76-1041,13 SD: 741,02	<0.01
Czaikoski	61,29	-	-	-	-	-	-	-
Dawulieti	-	-	-	-	-	-	-	-
Dennhardt	16	134	1294	IQR: 500-4433 SD: 2913,33	24	4123	IQR: 919-12437 SD: 8531,85	0.006
Duplessis	6,4 (von Sepsis und SIRS)	190	3900	4300	13	3900	1400	nicht signifikant
Dwivedi	42,5**	46	1160	130	34	4650	480	<0.001
Forsblom	8,1	91 (alle ICU-Patienten)	1690 <sup>med</sup>	IQR: 1400-2110	8	3940 <sup>med</sup>	IQR: 1910-7220	<0.05

Ergebnisse

	(alle ICU-Patienten)		(nur septische Gruppe)	SD: 525,93	(alle ICU-Patienten)	(nur septische Gruppe)	SD: 3933,33	
Gao	?	-	241,17	-	-	582,36	-	<0.05
Garnacho-Montero	35,04	76	36,23 <sup>med</sup>	24,84	41	43,96 <sup>med</sup>	37,91	0.495
Gould	-	-	-	-	-	-	-	-
Grumaz 2016	-	-	-	-	-	-	-	-
Grumaz 2019	28d: 19 90d: 32	-	-	-	-	-	-	-
Hampson	40	21	-	-	14	-	-	-
Hashiba	-	-	-	-	-	-	-	-
Huang	-	-	-	-	-	-	-	-
Huttunen	30d: 13,6 14d: 9,1	114	1260 <sup>med</sup>	IQR: 1110-1470 SD: 266,67	18	2030 <sup>med</sup>	IQR: 1570-2680 SD: 822,22	<0.001
Jing	28d: 33,33	20	339,75	514,31	10	1738,33	2461,07	-
Kocsis	-	-	-	-	-	-	-	-
Kung	16,42	56	675	904	11	2855	2292	<0.001
Lee	-	-	-	-	-	-	-	-
Lenz	EOS 66,67 LOS 16,67	2 1	-	-	-	-	-	-
Margraf	40**	6	< 2500	-	4	> 2500	-	-
Martins	45,5	6	-	-	5	-	-	-
Maruchi	28d: 32,73	37	2000 <sup>med*</sup>	IQR: 1330-3800** SD: 1829,63	18	2400 <sup>med*</sup>	IQR: 1330-3670** SD: 1733,33	-

Ergebnisse

Moreira	29,63	38	231	-	16	382,8	-	<0.001
Nguyen	-	-	-	-	-	-	-	-
Patel	30d: 20,54 90d: 28,57 360d: 36,61		-	-		-	-	-
Purhonen	14,29	18	-	-	3	-	-	0.053
Rannikko	7d: 9,15 28d: 14,35 90d: 20,17	437	1350 <sup>med</sup>	IQR: 1190–1660 SD: 348,15	44	2020 <sup>med</sup>	IQR: 1510–2920 SD: 1044,44	<0.001
Rhodes	Auf ICU: 25 (bezogen auf alle ICU-Patienten)	39	71 <sup>med</sup>	IQR: 46–113 SD: 49,63	13	321 <sup>med</sup>	IQR: 185–430 SD: 181,48	<0.001
Saukkonen	26,27	188	49,65 <sup>med</sup>	-	67	104,97 <sup>med</sup>	-	<0.001
Schneck	28d: 40	9	50,16 <sup>med*</sup>	IQR: 31,68-100,32* SD: 50,84	6	89,76 <sup>med*</sup>	IQR: 34,32-316,8* SD: 209,24	nicht signifikant
Silva de Miranda	37,1	39	-	-	23	-	-	-
Stiel	-		-	-		-	-	-
Tanaka	25	15			5			
Urosevic								
Wijeratne	34 (bezogen auf alle ICU-Patienten)	62	25,88 <sup>med</sup>	-	32	60,38 <sup>med</sup>	-	<0.001
Xia	47,93	88	120 <sup>med</sup>	IQR: 45,9-312 SD: 197,11	81	802 <sup>med</sup>	IQR: 271-1980 SD: 1265,93	<0,001
Xu	35,96	57	-	-	32	-	-	-
Yan- Qiang	37,5	15	972,46	648.36	9	2183,33	615.26	<0.05

Ergebnisse

Yang	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt		1.936			592			

Tabelle 6 cfDNA-Konzentrationen der Überlebenden und Verstorbenen

\*Werte wurden an Diagrammen abgelesen

\*\*Werte wurden anhand der Angaben in den Studien berechnet

<sup>med</sup> Median

<sup>mean</sup> Mittelwert (nur explizit erwähnt, wenn sowohl Median als auch Mittelwert gegeben)

[cfDNA]e/c/s/ns: cfDNA-Konzentration der Sepsis-Patienten/der Kontrolle/der Überlebenden/der Verstorbenen in ng/ml

Autor	Cut-off value (ng/ml)	Sensitivität Cut-off (%)	Spezifität Cut-off (%)	95% CI	TP	FP	TN	FN
Abdelaal	Tag 1: 48,84	44,4	23,8		4	16	5	5
	Tag 5: 50,82	66,7	52,4		6	10	11	3
Avriel	-	-	-	-				
Beltran-Garcia	-							
Chornenki	-	-	-	-				
Clementi	-	-	-	-				
Czaikoski	-	-	-	-				
Dawulieti	-	-	-	-				
Dennhardt	-	-	-	-				

Ergebnisse

Duplessis	-	-	-	-				
Dwivedi	2350	87.9	93.5	0,93 – 1	30	3	43	4
Forsblom	1990 (alle ICU- Patienten)	67	77	0.57–0.84	5	21	70	3
Gao	266,81	90,9	75					
Garnacho- Montero	39,789	-	-	-				
Gould	-	-	-	-				
Grumaz 2016	-	-	-	-				
Grumaz 2019	-	-	-	-				
Hashiba	-	-	-	-				
Huang	-	-	-	-				
Huttunen	1520	83	79	0,686 – 0,937	15	24	90	3
Jing								
Kocsis	-	-	-	-				
Kung	1012	82	82	0.773 - 0.984	9	10	46	2
Lee	-	-	-	-				
Lenz	-	-	-	-				
Margraf	-	-	-	-				
Martins	-	-	-	-	-	-	-	-

Ergebnisse

Maruchi	-	-	-	-				
Moreira	237,6	75	71	0,58 – 0,83	12	11	27	4
				0,46-0,92 für Sens				
				0,54-0,84 für Spez				
Nguyen	-	-	-	-				
Patel	-	-	-	-				
Purhonen	-	-	-	-				
Rannikko	1690	70.4	76.4	0,65 – 0,82	31	103	334	13
Rhodes	127 (alle ICU- Patienten)	92	80	0,71 – 0,97	12	8	31	1
Saukkonen	79,2	67	67	0,51 – 0,80 für Sens	45	62	126	22
				0,62 – 0,72 für Spez				
Silva de Miranda	-	-	-	-				
Schneck	-	-	-	-				
Stiel	-	-	-	-				
Tanaka								
Urosevic								
Wijeratne	40,32 (alle ICU- Patienten)	85	80	-	27	12	50	5
Xia	635	82,2	68,4		67	28	60	14

## Ergebnisse

---

Xu	-	-	-	-
Yan- Qiang	-	-	-	-
Yang	-	-	-	-

**Tabelle 7 Cut-off Wert**

**TP: True positive**

**FP: False positive**

**TN: True negative**

**FN: False negative**

**Sens: Sensitivität**

**Spez: Spezifität**

## 5.4 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm Review Manager 5.4 (The Cochrane Collaboration, 2011) verwendet. Es wurde ein Forest-Plot erstellt, der die cfDNA-Konzentration von überlebenden septischen Patienten im Vergleich zu den Konzentrationen der durch Sepsis verstorbenen Patienten graphisch darstellt. Ein weiterer Forest-Plot stellt die ermittelten Daten der cfDNA-Konzentrationen der septischen Patienten im Allgemeinen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen da. Da vier der eingeschlossenen Studien (Abdelaal et al. (82), Lenz et al. (83), Nguyen et al. (84) und Stiel et al. (85)) die cfDNA nicht in erwachsenen Probanden, sondern bei Neugeborenen ermittelt haben, wurden sie in einem separaten Forest-Plot zusammengefasst.

Durch den Mittelwert (mean) und die Standardabweichung (standard deviation, SD) der Studien wurde die Standardisierte Mittelwertdifferenz (Standardized Mean Difference, SMD) und das dazugehörige 95% CI berechnet. Die standardisierte Mittelwertdifferenz entspricht der Meta-Effektgröße. Die Studien gehen dabei mit einer unterschiedlichen Gewichtung (Weight) in die Metaanalyse ein. Diese ergibt sich aus der Fallzahl und der Streuung der Ergebnisse der jeweiligen Studie und ist visuell anhand der Größe des Quadrates jeder Studie erkennbar. Beide Faktoren stehen im proportionalen Zusammenhang mit der Wichtung. Je höher die Fallzahl und je höher die Präzision einer Studie, desto höher ist die Wichtung, mit der diese in die Metaanalyse eingeht. Die von dem Programm ermittelte Meta-Effektgröße, die sich aus der Kombination der Effektgrößen der einzelnen Studien ergibt, wird durch eine Raute dargestellt. Die Lage der Raute entspricht der Effektgröße, die Breite der Präzision der Schätzung. Der Forest-Plot gibt auch den  $\text{Chi}^2$  Wert an. Dieser gibt Auskunft über den Zusammenhang von, in diesem Fall, nominalskalierten Variablen (86). Der  $\text{Chi}^2$  Wert hat bei einer geringen Studiengröße aber nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Das ebenfalls dargestellte  $I^2$  beschreibt den Anteil der Variabilität, der auf die Heterogenität und nicht auf den Zufall zurückzuführen ist. Laut dem Cochrane Handbuch muss ab einem  $I^2$  von 75% von einer erheblichen Heterogenität ausgegangen werden (87). Bei einem  $I^2$  von unter 50% wurde das fixed effects model verwendet, andernfalls das random effects model. Ebenfalls im Forest-Plot aufgeführt ist der Z-Test. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die in den Studien gemessenen Ergebnisse auch in der Allgemeinbevölkerung zutreffen.

Wie im nachfolgenden Kapitel 6.1.3 genauer erläutert sind die Ergebnisse der Studien nur bedingt vergleichbar, da die gemessenen cfDNA-Konzentrationen sich teilweise gravierend unterscheiden. Dies liegt unter anderem daran, dass die Arbeitsgruppen unterschiedliche Messmethoden verwendeten. Damit wäre ein direkter Vergleich der Studien innerhalb einer Metaanalyse nicht zielführend und nur wenig aussagekräftig. Daher wurden die Studien je nach verwendeter Messmethode, wenn sinnvoll, im Sinne einer Subgruppenanalyse in vier

Gruppen unterteilt. Die Gruppen wurden getrennt voneinander betrachtet und ausgewertet. Somit ist gewährleistet, dass festgestellte Unterschiede nicht durch unterschiedliche Messmethoden bedingt sind. Die Messmethoden sind:

1. Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, ohne Aufreinigung der DNA
2. Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, nach Aufreinigung der DNA
3. Endpunktmethode mit pre-Amplifikation mittels PCR, dann Quantifikation über Endpunktmessung
4. Quantitative Messungen mittels qPCR oder ddPCR

Die Subgruppenanalyse ist eine Unterform der Metaregression und dient dazu die Ursache einer möglicherweise vorliegenden Heterogenität zu identifizieren. Dabei werden die Studien in einzelne Untergruppen unterteilt, wobei die Einteilung sich nach Kriterien richtet, die im Verdacht stehen für die unterschiedlichen Messwerte verantwortlich zu sein.

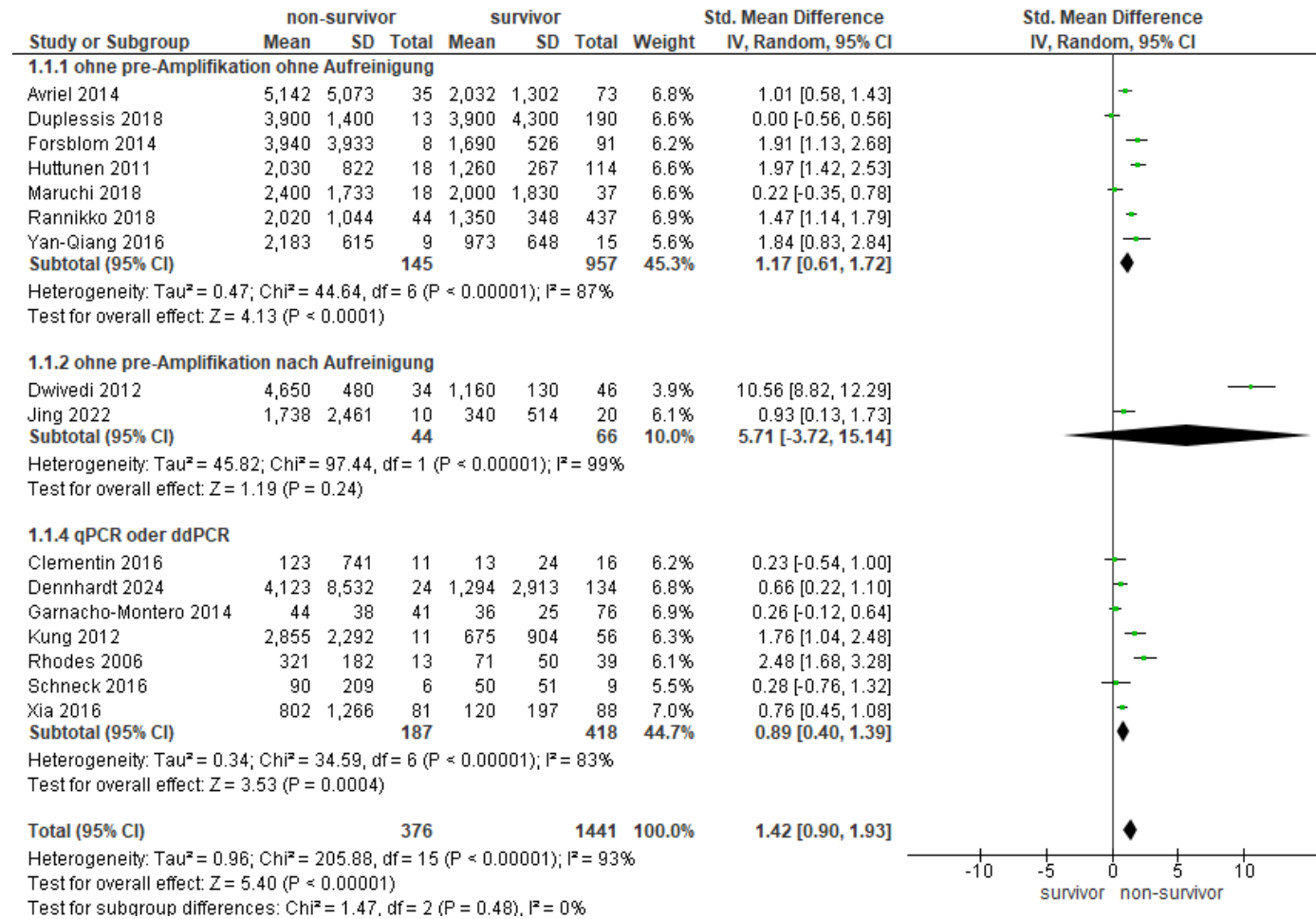


Abbildung 4 Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende

Forest-Plot zur cfDNA-Konzentration von an Sepsis Verstorbenen (non-survivor) und Überlebenden (survivor) mit Mittelwert (Mean) der cfDNA-Konzentration, Standardabweichung (SD), sowie der Anzahl der an Sepsis Verstorbenen und Überlebenden, Wichtung (Weight) und Effektgröße (Std. Mean Difference) mit 95%-CI. Visualisiert sind diese Daten durch ein grünes Dreieck (Effektgröße) und eine horizontale Linie (95%-CI), die x-Achse zeigt die Effektstärke. Die y-Achse stellt die 0-Linie dar, die berührt wird, wenn kein Effekt vorliegt. Am Ende jeder Gruppe stellt eine Raute die Meta-Effektgröße dar. Die Breite der Raute entspricht dem 95%-CI. Die Heterogenität wird durch den Tau<sup>2</sup>-Test, Chi<sup>2</sup>-Test und das I<sup>2</sup> dargestellt. Die Anzahl der Freiheitsgrade wird durch df angegeben. Der Z-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Ergebnisse auch in der Normalbevölkerung zutreffen.

In der Auswertung zur Differenzierung der Überlebenden von den Verstorbenen lag die Meta-Effektgröße bei 1.42 mit einem 95% CI von 0.90 bis 1.93 (siehe Abbildung 4 Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende). Damit ist die 0 nicht im Konfidenzintervall enthalten und es ist von einer Signifikanz auszugehen, was die Raute, die nicht die 0-Linie schneidet, bestätigt. Die größte Gewichtung hatten dabei die Studien von Rannikko et al. (88) und Xia et al. (89) mit 6,9% und 7,0%. Bei einem  $I^2$  von 93% muss von einer erheblichen Heterogenität und systematischen Unterschieden zwischen den Studien ausgegangen werden. Bei Betrachtung der Subgruppen, die nach den Messmethoden eingeteilt wurden, fallen deutliche Unterschiede auf. Die erste Gruppe, die die Messungen der cfDNA ohne pre-Amplifikation und ohne vorherige Aufreinigung der DNA vorgenommen hat, hat eine Heterogenität von 87%. Damit liegt auch in dieser Gruppe eine erhebliche Heterogenität vor, die jedoch deutlich unter der Gesamtheterogenität liegt. Auch die dritte Gruppe, die die Messungen der cfDNA mittels qPCR oder ddPCR durchgeführt hat, hat mit 83% eine niedrigere Heterogenität. Die zweite Gruppe, ohne pre-Amplifikation aber mit vorheriger Aufreinigung der DNA, hat mit 99% eine deutlich über dem Gesamtwert liegende Heterogenität. Die Gruppe enthält nur die Studien von Dwivedi et al. (57) und Jing et al. (90). Besonders die Arbeit von Dwivedi weicht mit einer standard mean difference von 10.56 enorm von den anderen Studien ab. Wird diese Studie bei den Berechnungen nicht berücksichtigt, sinkt die Heterogenität insgesamt auf 84% ab. Die Meta-Effektgröße ist in dem Fall nur noch bei 1.03, es würde also von einer weniger starken Aussagekraft der cfDNA ausgegangen werden. Da aber auch in dieser Berechnung die 0 nicht im 95% CI enthalten ist, bleibt die Signifikanz erhalten. Eine Ursache für die Abweichung der von der Arbeitsgruppe von Dwivedi gemessenen Ergebnisse im Vergleich zu den Werten der anderen Studien konnte nicht ermittelt werden. Da auch innerhalb der Subgruppen große Unterschiede zwischen den Studien gefunden wurden kann aber angenommen werden, dass es noch einen anderen Faktor geben muss, der die hohe Heterogenität zwischen den Studien, die die cfDNA-Konzentrationsunterschiede zwischen überlebenden und verstorbenen septischen Patienten untersuchten, bedingt.

Ergänzend zum Forest-Plot wurde auch immer jeweils ein Funnel-Plot erstellt. Dieser zeigt auf der Abszisse die Effektgröße der Studien und auf der Ordinate den Standardfehler der Studien, der die Präzision einer jeden Studie widerspiegelt. Je kleiner der Standardfehler einer Studie, desto „genauer“ ist sie und desto mehr nähert sie sich dem wahren Wert der Effektgröße. Daher sollte sich, wenn man die Werte der Studien in das Diagramm des Funnel Plots einträgt, ein Dreieck ausbilden, dessen Spitze die „wahre“ Effektgröße darstellt. Bei völliger Abwesenheit von Heterogenität zwischen den Studien sollten sich 95% der Werte zwischen den gestrichelten Linien befinden, die das Dreieck begrenzen. Ergibt sich eine asymmetrische Form kann dies nach Egger et al. (91) die in der folgenden Tabelle dargestellten fünf Ursachen haben:

<p><u>Ursachen der Asymmetrie in Funnel-Plots:</u></p> <p>Selection bias</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Publication bias</li><li>- Location bias:<ul style="list-style-type: none"><li>- Sprachbias</li><li>- Zitatbias</li><li>- multiple publication bias</li></ul></li></ul> <p>Wahre Heterogenität</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Ausmaß des Effekts hängt von der Studiengröße ab</li></ul> <p>Datenunregelmäßigkeiten</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Schlechtes Design kleinerer Studien</li><li>- Inadäquate Analyse</li><li>- Betrug</li></ul> <p>Artefakte</p> <p>Chance</p>
--

Abbildung 5 Ursachen für Asymmetrie in Funnel-Plots, adaptiert von Egger et al., 1997

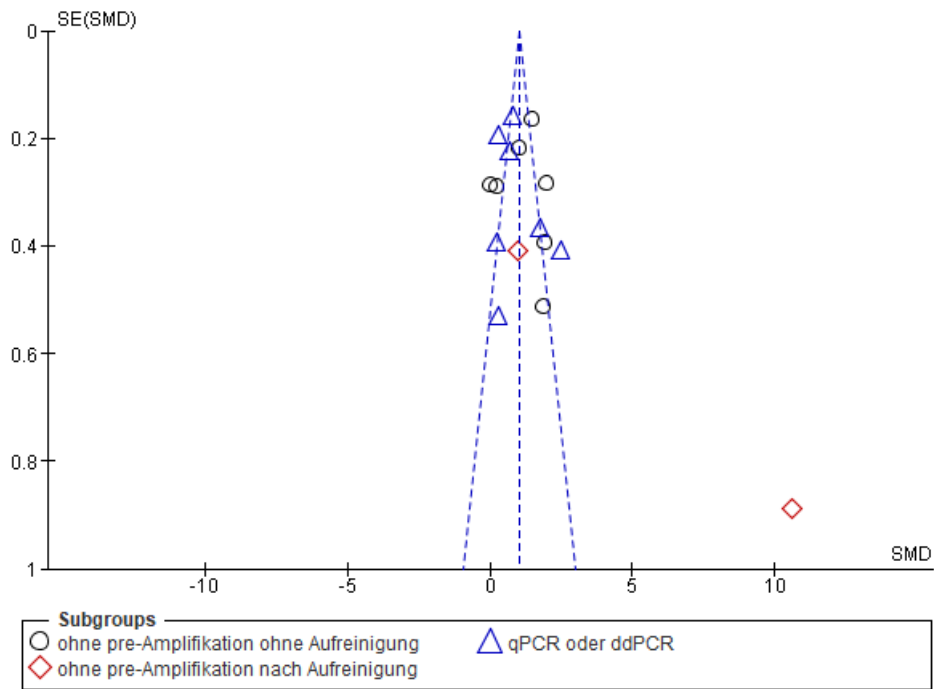


Abbildung 6 Funnel-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende

Dargestellt sind die Präzision als Standardfehler an der y-Achse und die Effektgröße an der x-Achse. Die Studien sind je nach Gruppenzugehörigkeit als Kreis, Dreieck oder Raute im Diagramm aufgetragen. Das resultierende Dreieck stellt den Idealfall dar, in dem alle Studien innerhalb dieser Fläche erscheinen sollten und keine Heterogenität innerhalb der Studien herrscht.

In dem Funnel-Plot, der die Studiendaten zur Frage „kann die Messung der cfDNA-Konzentration das Outcome der Patienten und die Mortalität zuverlässig vorhersagen?“ ist eine Asymmetrie erkennbar. Besonders die Studie rund um Dwivedi et al. (57) fällt mit einer außerordentlich hohen Effektgröße aus dem erwarteten Wertebereich. Aber auch die Studien von Rhodes et al. (69), Huttunen et al. (92), Duplessis et al. (93), Maruchi et al. (94) und Garnacho-Montero et al. (95) liegen außerhalb des Dreiecks. Dennoch ist die Streuung zwischen den Studien, abgesehen von Dwivedi et al., relativ gering.

## Ergebnisse

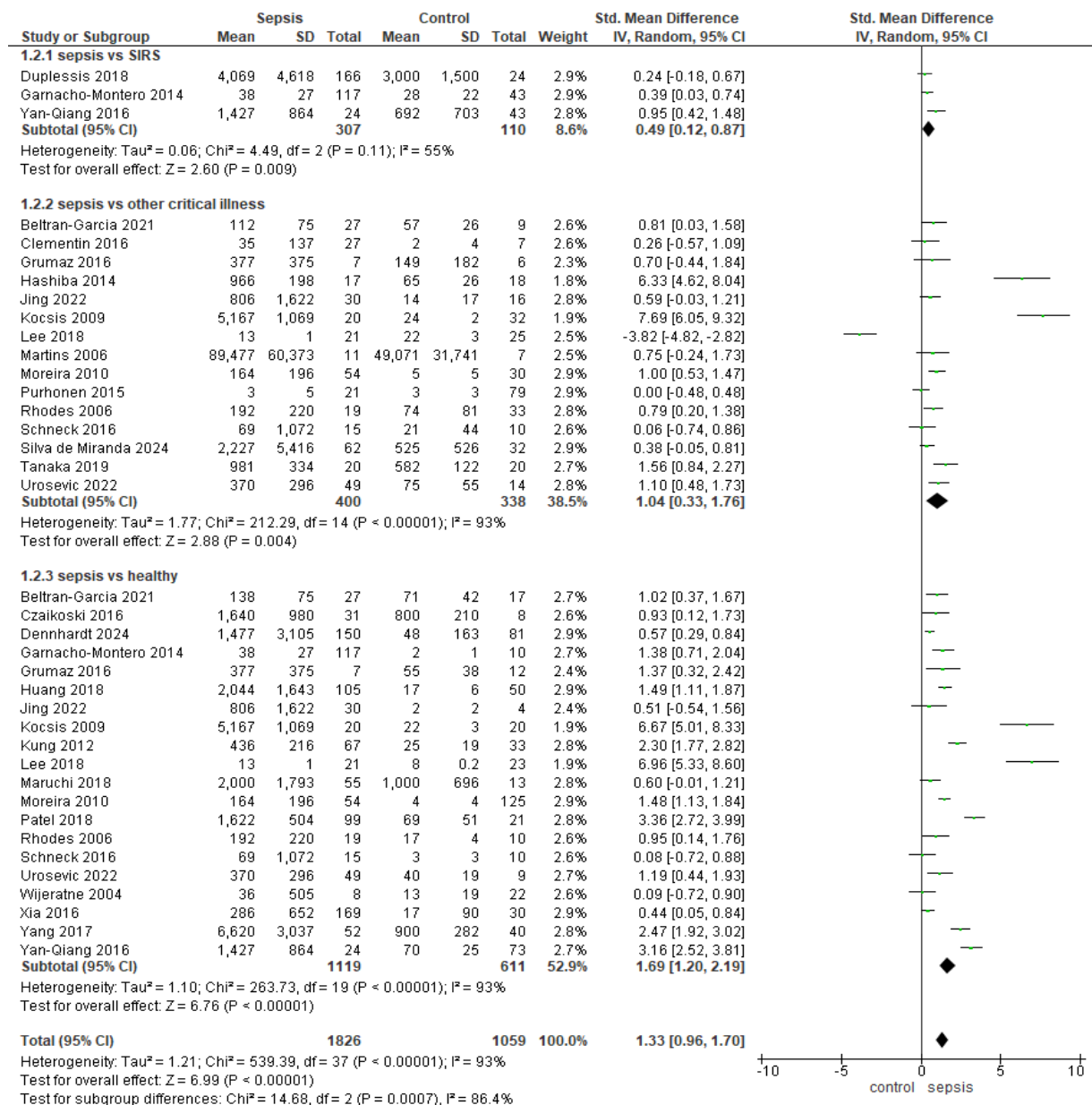


Abbildung 7 Forest-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle

Forest-Plot zur cfDNA-Konzentration von septischen Patienten (Sepsis) und der Kontrollgruppe (Control) mit Mittelwert (Mean) der cfDNA-Konzentration, Standardabweichung (SD), sowie der Anzahl der septischen Patienten und der Kontrollgruppe, Wichtigkeit (Weight) und Effektgröße (Std. Mean Difference) mit 95%-CI. Visualisiert sind diese Daten durch ein grünes Dreieck (Effektgröße) und eine horizontale Linie (95%-CI), die x-Achse zeigt die Effektstärke. Die y-Achse stellt die 0-Linie dar, die berührt wird, wenn kein Effekt vorliegt. Am Ende jeder Gruppe stellt eine Raute die Meta-Effektgröße dar. Die Breite der Raute entspricht dem 95%-CI. Die Heterogenität wird durch den Tau<sup>2</sup>-Test, Chi<sup>2</sup>-Test und das I<sup>2</sup> dargestellt. Die Anzahl der Freiheitsgrade wird durch df angegeben. Der Z-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Ergebnisse auch in der Normalbevölkerung zutreffen.

Der Forest-Plot „cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle“ zeigt ähnlich Ergebnisse wie der vorherige Forest-Plot zur Fragestellung, ob die cfDNA-Konzentration ein negatives von einem positiven Outcome differenzieren kann. Die Messungen ergeben signifikante Ergebnisse mit einer Meta-Effektgröße von 1.33 und einem 95% CI von 0.96 bis 1.70. Aber auch unter den bei dieser Rechnung betrachteten Studien herrscht eine erhebliche

Heterogenität von 93%. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Studien nach der verwendeten Kontrollgruppe in Subgruppen unterteilt. Bis auf die Subgruppe „Sepsis vs SIRS“, die jedoch auch nur 2 Studien enthält, ist die Heterogenität jedoch auch innerhalb der Subgruppen enorm. Da die Studien bei dieser Berechnung schon anhand der verwendeten Kontrolle eingeteilt wurden, wurde zur besseren Übersicht auf die Einteilung weiterer Subgruppen verzichtet.

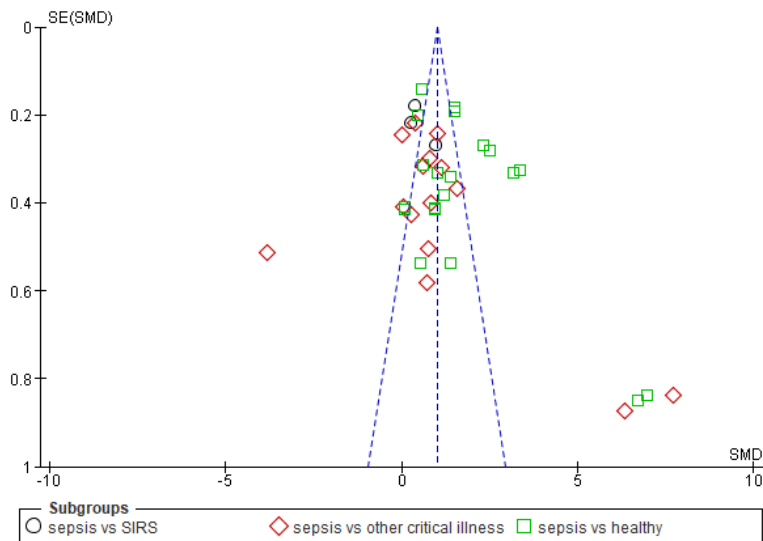


Abbildung 8 Funnel-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle

Dargestellt sind die Präzision als Standardfehler an der y-Achse und die Effektgröße an der x-Achse. Die Studien sind je nach Gruppenzugehörigkeit als Kreis, Dreieck oder Raute im Diagramm aufgetragen. Das resultierende Dreieck stellt den Idealfall dar, in dem alle Studien innerhalb dieser Fläche erscheinen sollten und keine Heterogenität innerhalb der Studien herrscht.

Der Funnel-Plot zur Fragestellung, ob die cfDNA-Konzentration septische von nicht septischen Patienten oder gesunden Probanden differenzieren kann, weist sehr große Streuungen auf. Der Funnel-Plot bestätigt somit die schon im Forest-Plot (siehe Abbildung 7 Forest-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle) errechnete große Heterogenität zwischen den Studien als wahrscheinlichste Ursache der ausgeprägten Asymmetrie.

## Ergebnisse

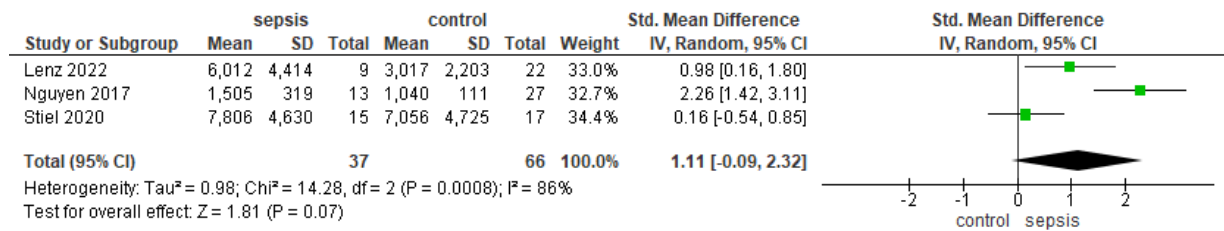
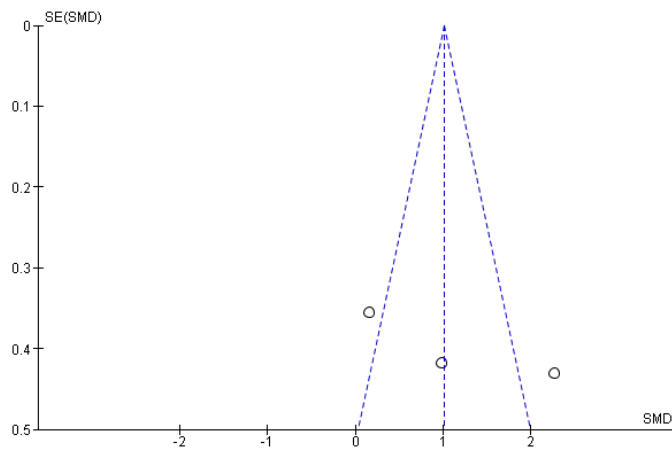


Abbildung 9 Forest-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle, Neugeborene

Forest-Plot zur cfDNA-Konzentration von septischen Neugeborenen (sepsis) und Kontrollen (control) mit Mittelwert (Mean) der cfDNA-Konzentration, Standardabweichung (SD), sowie der Anzahl der septischen Kinder und der Kontrolle, Wichtung (Weight) und Effektgröße (Std. Mean Difference) mit 95%-CI. Visualisiert sind diese Daten durch ein grünes Dreieck (Effektgröße) und eine horizontale Linie (95%-CI), die x-Achse zeigt die Effektstärke. Die y-Achse stellt die 0-Linie dar, die berührt wird, wenn kein Effekt vorliegt. Am Ende jeder Gruppe stellt eine Raute die Meta-Effektgröße dar. Die Breite der Raute entspricht dem 95%-CI. Die Heterogenität wird durch den Tau<sup>2</sup>-Test, Chi<sup>2</sup>-Test und das I<sup>2</sup> dargestellt. Die Anzahl der Freiheitsgrade wird durch df angegeben. Der Z-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Ergebnisse auch in der Normalbevölkerung zutreffen.

Auch bei den aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit separat behandelten Studien von Lenz et al. (83), Nguyen et al. (84) und Stiel et al. (85) zeigt sich im Forest-Plot „cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle, Neugeborene“ eine erhebliche Heterogenität. Diese ist mit einem I<sup>2</sup> von 86% zwar kleiner als bei den vorherigen Metaanalysen, überschreitet aber dennoch die 75% Grenze. Im Gegensatz zu den Daten zu den erwachsenen septischen Patienten zeigt die Metaanalyse dieser Studien mit einer Meta-Effektgröße von 1.11 und einem 95% CI von -0.09 bis 2.32 keine Signifikanz der Daten. Durch eine höhere Anzahl an Studien könnte sich dies ändern.

Da die Arbeitsgruppe rund um Abdelaal et al. (82) keine Kontrollgruppe verwendet hat, ist sie bei Auswertung nicht berücksichtigt. Eine Berechnung zu dem Nutzen der cfDNA als Prädiktor für das Outcome der septischen Patienten konnte nicht durchgeführt werden, da die dafür nötigen Werte nur bei Abdelaal et al. (82) gemessen und angegeben wurden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen interessanterweise, dass die cfDNA-Konzentrationen bei den Neugeborenen mit Sepsis, die verstorben sind, am ersten Tag niedriger waren als bei denen, die überlebt haben. Erst bei der zweiten Messung an Tag 5 stiegen die Werte der später Verstorbenen Kinder an und übertrafen die der Überlebenden. Ob diese Beobachtung, dass die cfDNA Werte erst im Verlauf der Krankheit ansteigen, generell für Neugeborene gilt, müsste durch weitere Studien bestätigt oder widerlegt werden.



**Abbildung 10** Funnel-Plot cfDNA-Konzentration septische Patienten vs. Kontrolle, Neugeborene

Dargestellt sind die Präzision als Standardfehler an der y-Achse und die Effektgröße an der x-Achse. Die Studien sind je nach Gruppenzugehörigkeit als Kreis, Dreieck oder Raute im Diagramm aufgetragen. Das resultierende Dreieck stellt den Idealfall dar, in dem alle Studien innerhalb dieser Fläche erscheinen sollten und keine Heterogenität innerhalb der Studien herrscht.

Im Funnel Plot zu den cfDNA-Konzentrationen bei Neugeborenen zeigt sich wie auch im Forest-Plot eine Asymmetrie. Die Studie von Lenz et al. liegt im erwarteten Wertebereich, die Studien von Nguyen et al. und Stiel et al. liegen außerhalb davon.

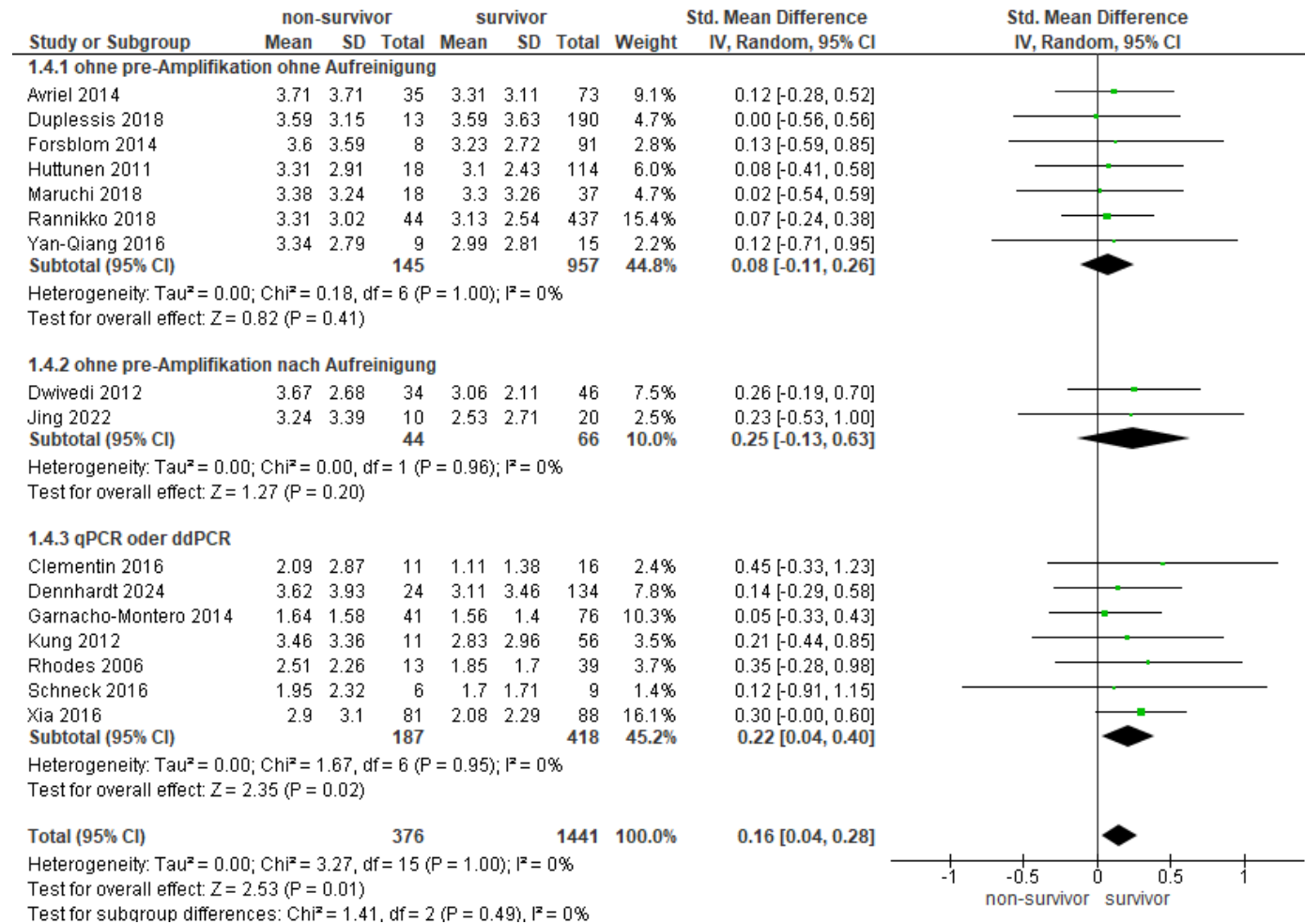


Abbildung 11 Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende mit logarithmierten Werten

Forest-Plot zur logarithmierten cfDNA-Konzentration von an Sepsis Verstorbenen (non-survivor) und Überlebenden (survivor) mit Mittelwert (Mean) der cfDNA-Konzentration, Standardabweichung (SD), sowie der Anzahl der an Sepsis Verstorbenen und Überlebenden, Wichtung (Weight) und Effektgröße (Std. Mean Difference) mit 95%-CI. Visualisiert sind diese Daten durch ein grünes Dreieck (Effektgröße) und eine horizontale Linie (95%-CI), die x-Achse zeigt die Effektstärke. Die y-Achse stellt die 0-Linie dar, die berührt wird, wenn kein Effekt vorliegt. Am Ende jeder Gruppe stellt eine Raute die Meta-Effektgröße dar. Die Breite der Raute entspricht dem 95%-CI. Die Heterogenität wird durch den Tau<sup>2</sup>-Test, Chi<sup>2</sup>-Test und das I<sup>2</sup> dargestellt. Die Anzahl der Freiheitsgrade wird durch df angegeben. Der Z-Test gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Ergebnisse auch in der Normalbevölkerung zutreffen.

Um die Vergleichbarkeit der Studien zu ermöglichen, wurden die Daten zur Hauptfragestellung im dekadischen Logarithmus umgerechnet und mit den erhaltenen Werten ebenfalls ein Forest-Plot erstellt (siehe Abbildung 11 Forest-Plot cfDNA-Konzentration Verstorbene vs. Überlebende mit logarithmierten Werten). Dabei bleibt das Verhältnis zwischen den Zahlen vergleichbar, während große Streuungen ausgeglichen werden. Erwartungsgemäß ergibt sich hierbei ein  $I^2$  von 0% und damit keine Heterogenität. Die Meta-Effektgröße bleibt aber mit 0.16 und einem 95%-CI von 0.04-0.28 signifikant.

#### 5.4.1 Varianzanalyse

Um zu untersuchen, ob es Faktoren gibt, die die cfDNA-Konzentration beeinflussen, bietet sich eine Varianzanalyse an. Hierbei wird untersucht, ob eine oder mehrere nicht metrisch-skalierte unabhängige Variablen einen signifikanten Einfluss auf eine abhängige metrisch-skalierte Variable hat (96). Getestet wurden dabei das Jahr der Erscheinung, die verwendete Messmethode der Arbeitsgruppe und das verwendete Material. Dafür wurden alle Studien herangezogen, die eine cfDNA-Konzentration und eine Standardabweichung für die septischen Patienten angegeben haben bzw. ausreichend Daten, um diese Angaben ausrechnen zu können.

Bei dem Jahr der Erscheinung wurde das Jahr 2016 als Cut-off gesetzt. In diesem Jahr erschien die neue Sepsis-3-Leitlinie und die Kriterien für die Diagnose einer Sepsis wurden verändert. Außerdem haben sich die medizinischen und labortechnischen Instrumente stetig weiterentwickelt und vermutlich die Diagnostik sensibilisiert. Auch die Messung der cfDNA hat sich vermutlich durch die Verbesserung der Messgeräte verfeinert. Daher wurde das Kriterium „Jahr“ mit in die Varianzanalyse aufgenommen. Für das zweite Kriterium „Messmethode“ wurden die Studien je nach verwendeter Messmethode zur Ermittlung der Konzentration der cfDNA in vier Gruppen eingeteilt. Die vier Messmethoden sind:

1. Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, ohne Aufreinigung der DNA
2. Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, nach Aufreinigung der DNA
3. Endpunktmethoden mit pre-Amplifikation mittels PCR, dann Quantifikation über Endpunktmessung
4. Quantitative Messungen mittels qPCR oder ddPCR

Da jedoch nur eine Studie die Messmethode 3 anwendete, konnte diese Methode nicht als Gruppe berücksichtigt werden. Somit blieben drei Gruppen. Die erste Gruppe verwendete Messmethode Nummer 1, die zweite Gruppe Messmethode Nummer 2 und die dritte Gruppe Messmethode Nummer 4. Bei dem dritten Kriterium „Material“ wurde zwischen Plasma oder

Serum entschieden. Die meisten Studien verwendeten Plasma, lediglich drei Studien haben die cfDNA im Serum untersucht.

Um solch eine klassische Varianzanalyse nach Fisher durchführen zu können müssen im Wesentlichen zwei Bedingungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Daten innerhalb einer Gruppe normalverteilt sein, zum anderen muss eine Homogenität der Varianzen vorliegen (97).

Die Normalverteilung innerhalb der Gruppen kann mithilfe des Shapiro-Wilk Tests überprüft werden.

Deskriptivstatistik

	Messmethode	cfDNAe
N	1	18
	2	3
	3	13
Fehlend	1	0
	2	0
	3	0
Mittelwert	1	2379
	2	518
	3	772
Median	1	1472
	2	377
	3	68.8
Standardabweichung	1	2261
	2	250
	3	1484
Minimum	1	13.2
	2	370
	3	3.23
Maximum	1	7806
	2	806
	3	5167
Shapiro-Wilk W	1	0.798
	2	0.763
	3	0.592
Shapiro-Wilk p	1	0.001
	2	0.028

Deskriptivstatistik

	Messmethode	cfDNAe
	3	< .001

Abbildung 12 Shapiro-Wilk Test Messmethode

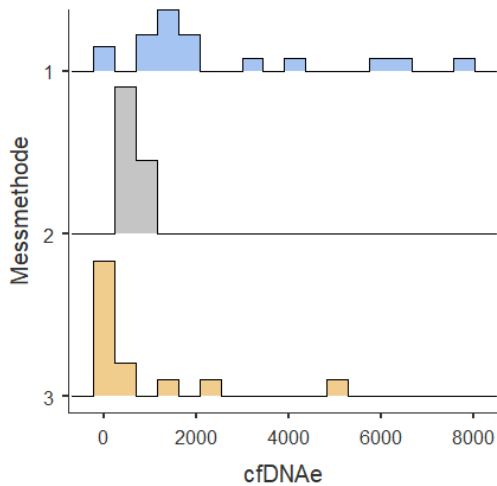


Abbildung 13 Histogramm Messmethode

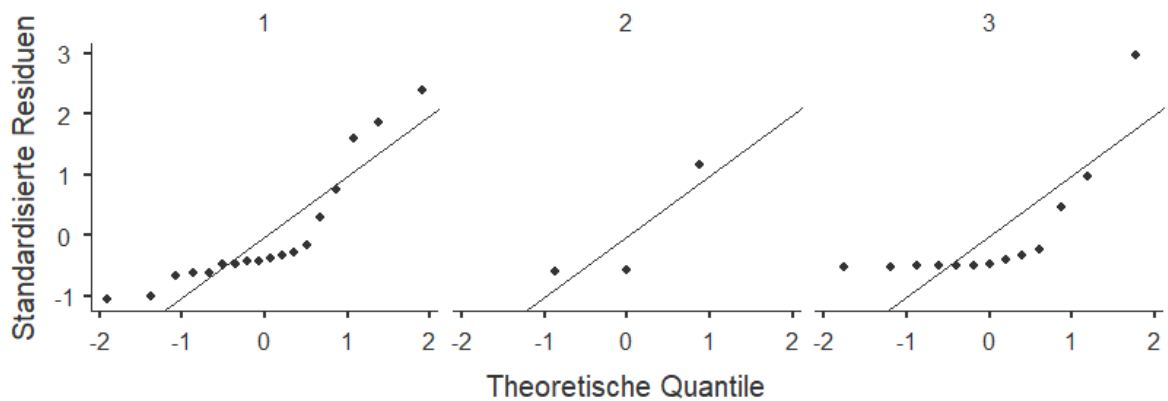


Abbildung 14 Q-Plot Messmethode

Dafür wurden die cfDNA-Konzentrationen der septischen Patienten je nach Messmethode, die die Arbeitsgruppe verwendet hat, in unterschiedliche Gruppen eingeteilt und mit dem Programm Jamovi nach dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung untersucht (98). Anhand der p-Werte, die am Ende der Tabelle für die einzelnen Messmethode angegeben sind, kann man erkennen, dass keine der Messmethoden einen p-Wert > 0,05 erreicht und damit die

Nullhypothese, dass die Werte nicht normalverteilt sind, angenommen werden muss. Daher kann im Falle der zu untersuchenden unabhängigen Variable „Messmethode“ keine Normalverteilung angenommen werden. Zur Bestätigung wurde zudem ein Histogramm angefertigt. Dies visualisiert, dass die Werte nicht normalverteilt sind. Auch der Q-Plot bestätigt dies. Bei einer Normalverteilung sollten alle Punkte auf oder nahe bei der eingezeichneten Diagonale liegen, was hier nicht der Fall ist.

Deskriptivstatistik

	Jahr	cfDNAe
N	1	11
	2	23
Fehlend	1	0
	2	0
Mittelwert	1	1021
	2	1877
Median	1	192
	2	1427
Standardabweichung	1	1652
	2	2175
Minimum	1	3.23
	2	13.2
Maximum	1	5167
	2	7806
Shapiro-Wilk W	1	0.690
	2	0.756
Shapiro-Wilk p	1	< .001
	2	< .001

Abbildung 15 Shapiro-Wilk Test Jahr

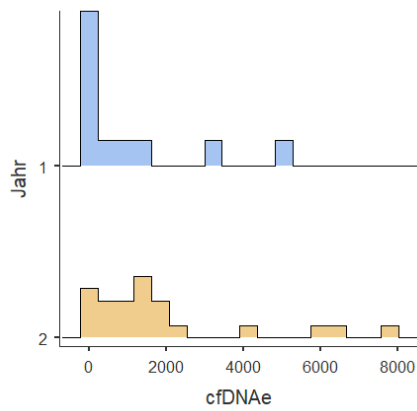


Abbildung 16 Histogramm Jahr

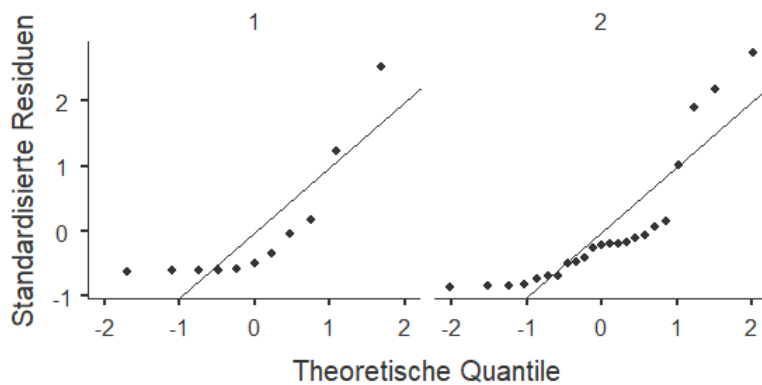


Abbildung 17 Q-Plot Jahr

Ebenso verhält es sich mit der Variable „Jahr“. Auch hierbei ist der p-Wert für beide Gruppen, die Studien vor und nach 2016, unter 0.05, womit die Nullhypothese gültig ist. Dies wird durch das Histogramm, das keine Normalverteilung zeigt, und durch den Q-Plot, der eine starke Streuung der Punkte zeigt, bestätigt.

Deskriptivstatistik

	Material	cfDNAe
N	1	31
	2	3
Fehlend	1	0
	2	0
Mittelwert	1	1681

## Ergebnisse

---

### Deskriptivstatistik

	Material	cfDNAe
	2	765
Median	1	981
	2	855
Standardabweichung	1	2110
	2	711
Minimum	1	3.23
	2	13.2
Maximum	1	7806
	2	1427
Shapiro-Wilk W	1	0.764
	2	0.988
Shapiro-Wilk p	1	< .001
	2	0.790

---

Abbildung 18 Shapiro-Wilk Test Material

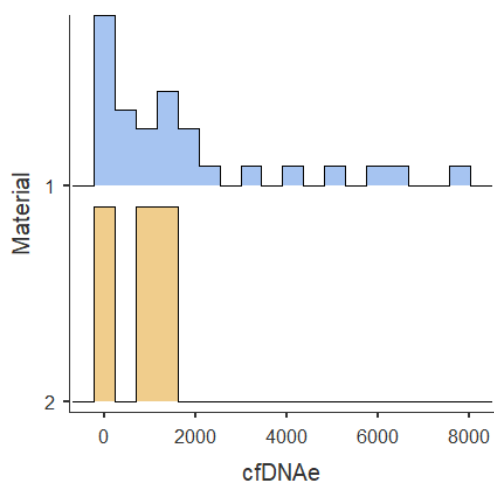


Abbildung 19 Histogramm Material

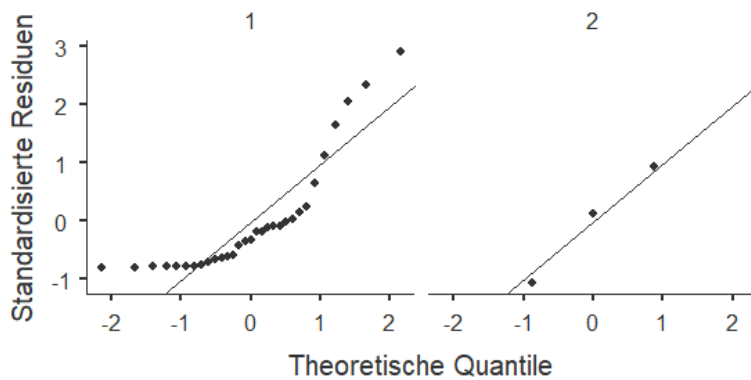


Abbildung 20 Q-Plot Material

Die dritte untersuchte Variable „Material“ weist bei der Verteilung der Daten der Gruppen, die Serum verwendet haben eine Normalverteilung auf, bei den Gruppen, die das Plasma verwendet haben, jedoch keine. Zudem ist zu bedenken, dass nur drei Studien das Serum untersucht haben. Dementsprechend ist die hier gemessene Normalverteilung als sehr kritisch zu sehen.

Das zweite Kriterium, die Varianzhomogenität, wurde mithilfe des Levene`s Test untersucht. Hierbei lautet die Nullhypothese „es liegt keine Varianzhomogenität vor“.

Levene's Test auf Varianzhomogenität

	F	df1	df2	p
cfDNAe	2.80	2	31	0.077

Abbildung 21 Levene`s Test Messmethode

Im Falle des untersuchten Kriteriums „Messmethode“ konnte keine Signifikanz mit  $p < 0.05$  festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Nullhypothese verworfen werden kann und eine Varianzhomogenität angenommen werden kann.

Levene's Test auf Varianzhomogenität

	F	df1	df2	p
cfDNAe	0.461	1	32	0.502

Abbildung 22 Levene`s Test Jahr

Auch bei dem Kriterium „Jahr“ ergab der Levene´s Test keine Signifikanz. Somit ist auch hier von einer Varianzhomogenität auszugehen.

Levene's Test auf Varianzhomogenität

	<b>F</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>p</b>
cfDNAe	1.46	1	32	0.236

**Abbildung 23 Levene´s Test Material**

Ebenso konnte bei der dritten untersuchten Variable „Material“ keine Signifikanz gezeigt werden. Auch hier ist damit eine Varianzhomogenität anzunehmen.

Die Tests konnten also zeigen, dass von den drei Variablen, Normalverteilung, Varianzhomogenität und Material, die gegeben sein müssen, um eine klassische Fisher´s ANOVA durchzuführen, lediglich das Kriterium Varianzhomogenität zutrifft. Daher musste ein robusterer Test gewählt werden, der auch mit nicht normalverteilten Daten umgehen kann. Dieser Test ist der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test.

Kruskal-Wallis

	$\chi^2$	<b>df</b>	<b>p</b>	$\epsilon^2$
cfDNAe	9.61	2	0.008	0.291

**Abbildung 24 Kruskal-Wallis Test Messmethode**

Der Kruskal-Wallis Test zeigt mit einem  $p < 0.05$  einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an. Um zu differenzieren, zwischen welchen der Gruppen ein signifikanter Unterschied vorliegt, wurde zusätzlich ein paarweiser Vergleich nach Dwass-Steel-Critchlow-Fligner durchgeführt.

Paarweise Vergleiche - cfDNAe

	<b>W</b>	<b>p</b>
1 2	-2.98	0.088
1 3	-3.88	0.017
2 3	-1.62	0.488

## Ergebnisse

---

Paarweise Vergleiche - cfDNAe

	<b>W</b>	<b>p</b>
--	----------	----------

**Abbildung 25** paarweiser Vergleich Messmethode

Dieser Test zeigt, dass nur zwischen der Gruppe 1, die eine Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, ohne Aufreinigung der DNA verwendet haben und Gruppe 3, die eine quantitative Messung der cfDNA mittels qPCR oder ddPCR vorgenommen haben, ein signifikanter Unterschied vorliegt. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass lediglich drei Studien in die zweite Gruppe, die eine Endpunktmethode ohne pre-Amplifikation, nach Aufreinigung der DNA verwendet haben, aufgenommen werden konnten. Die geringe Gruppengröße könnte für die nicht vorhandene Signifikanz zwischen dieser und den beiden anderen Gruppen ursächlich sein.

Kruskal-Wallis

	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b><math>\epsilon^2</math></b>
cfDNAe	3.53	1	0.060	0.107

**Abbildung 26** Kruskal-Wallis Test Jahr

Der Kruskal-Wallis Test zu der Variable „Jahr“ ergab keine Signifikanz. Ein paarweiser Vergleich ist in diesem Fall nicht sinnvoll, da es nur zwei Gruppen gibt.

Kruskal-Wallis

	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b><math>\epsilon^2</math></b>
cfDNAe	0.623	1	0.430	0.0189

**Abbildung 27** Kruskal-Wallis Test Material

Die Variable „Material“ konnte im Kruskal-Wallis Test auch keine Signifikanz erreichen. Aufgrund der geringen Anzahl an Studien, die das Serum untersuchten, ist das Ergebnis jedoch kritisch zu hinterfragen.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die verwendete Messmethode, im Gegensatz zum Jahr, in dem die Studie erschien, und zu dem Material, das verwendet wurde,

nach der Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der cfDNA-Konzentration hat.

5.4.2 Cut-off Wert zur Differenzierung zwischen einem guten und einem schlechten Outcome

Innerhalb der Studien wurden auch, falls vorhanden, die angegebenen Cut-off Werte verglichen. Dieser Wert bezeichnet die Grenze, ab der man von einem bestimmten Ereignis ausgeht. Im Falle der vorliegenden Studien war das entweder die Grenze, ab der man von einem negativen Outcome für den Patienten ausgehen kann oder die Grenze, ab der man eine Sepsis überhaupt erst diagnostizieren kann. Dabei darf der Cut-off Wert nicht zu hoch gewählt werden, da man sonst viele Patienten, die eigentlich ein negatives Outcome zu erwarten haben beziehungsweise eine Sepsis haben, als positives Outcome beziehungsweise nicht an einer Sepsis erkrankt, einstufen und die Therapie eventuell nicht radikal genug wählen würde. Der Wert darf aber nicht zu niedrig gewählt werden, da man das Outcome sonst in vielen Fällen als zu schlecht bewerten würde beziehungsweise oft fälschlicherweise eine Sepsis diagnostizieren würde. Es ist also wichtig eine Grenze festzulegen, die bei hoher Sensitivität gleichzeitig möglichst spezifisch ist. Die Sensitivität und Spezifität der Cut-off-Werte lässt sich auf einer Receiver operating characteristic curve (ROC-curve) abgelesen.

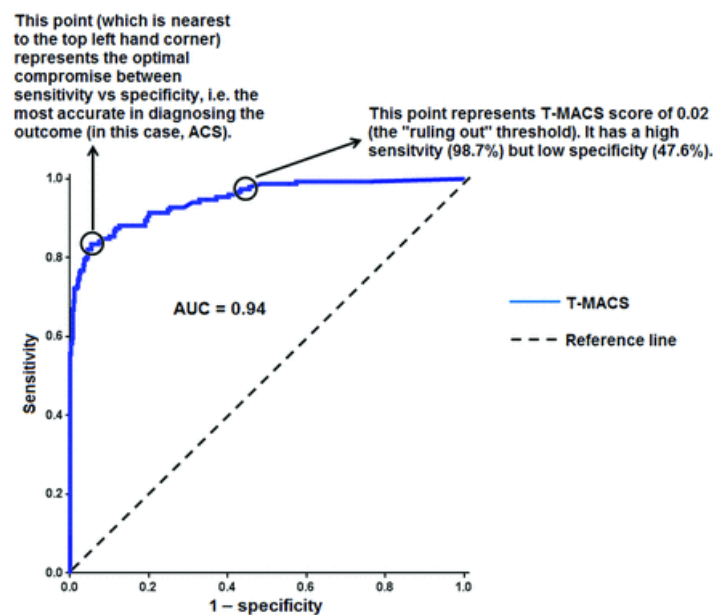


Abbildung 28 Beispielhafte ROC-Curve für die Bewertung des Akuten Koronarsyndrom nach dem T-MACS Score (Troponin-only Manchester Acute Coronary Syndromes) (Hoo et al. 2017)

Der Cut-off Wert, der die höchste Sensitivität und Spezifität aufweist, ist der, der in der Kurve am weitesten in der linken oberen Ecke liegt (siehe Grafik). Der Test ist dabei generell umso besser, je mehr sich die Kurve der Form eines Rechtecks nähert (99). Solch ein Cut-off-Wert ist besonders vor der Einführung in die Klinik von Bedeutung, da er eine klare Entscheidungsgrenze vorgibt und den Test so objektiver gestaltet.

Da die Hauptfragestellung der Arbeit sich mit dem Nutzen der cfDNA als Prädiktor für ein positives oder negatives Outcome der septischen Patienten befasst, wurden lediglich die

Studien, die einen Cut-off Wert für diese Fragestellung ermittelt haben, in diesem Kapitel genauer untersucht. Um die einzelnen Werte der Studien zusammenfassen zu können wurde mit Hilfe des Programms RevMan5 eine sROC curve erstellt. Dabei wird aus den einzelnen Cut-off Werten und den dazugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten der entsprechenden Studien eine gemeinsame Kurve berechnet, die bei jeder Sensitivität die zugehörige Spezifität anzeigt. Dabei ergibt sich, wie auch bei der ROC-Curve ein Punkt, an dem Sensitivität und Spezifität das beste Verhältnis zueinander haben.

Folgende Studien haben einen Cut-off Wert ermittelt, ab dem ein negatives Outcome der Patienten angenommen werden kann:

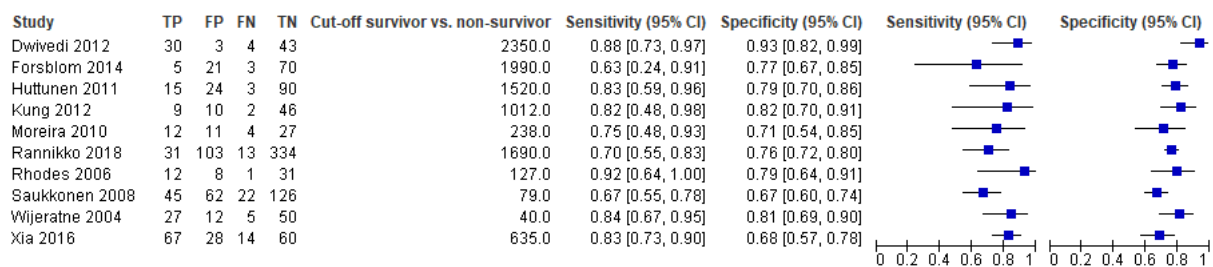


Abbildung 29 Sensitivität und Spezifität der Cut-off Werte

Außerdem zeigt die Auflistung die Sensitivität und Spezifität der, von den Studienergebnissen ermittelten, Cut-off Werte und die daraus berechnete Anzahl an Richtig Positiven (True Positive, TP), Falsch Positiven (False Positive, FP), Falsch Negativen (False Negative, FN) und Richtig Negativen (True Negative, TN) Probanden.

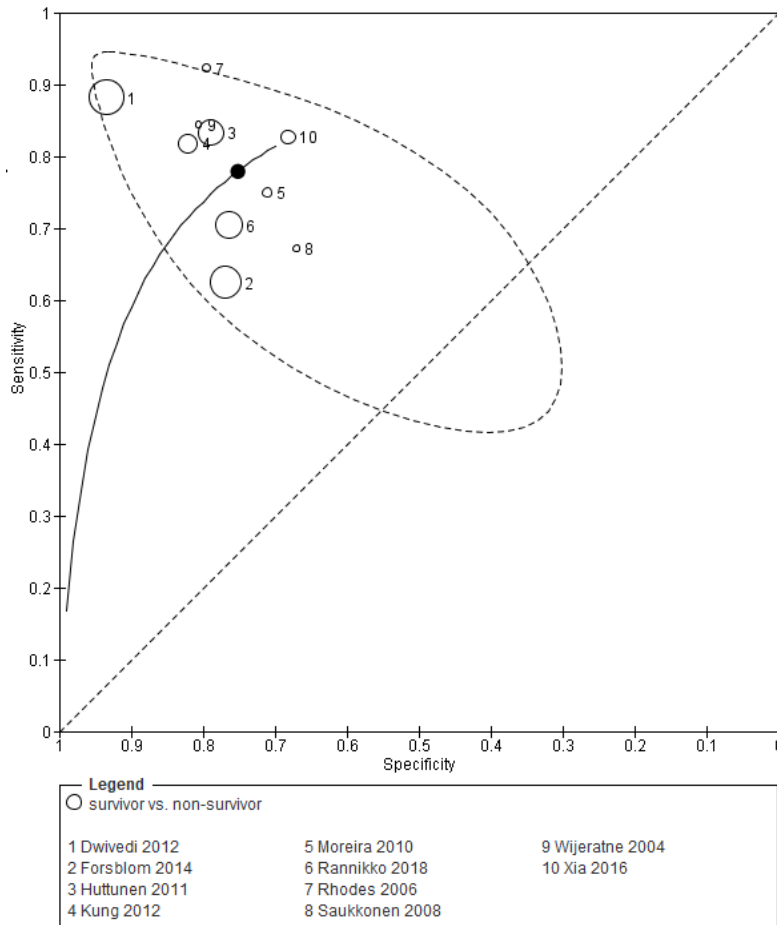


Abbildung 30 sROC curve Cut-off Werte survivor vs. non-survivor

Die Abbildung zeigt die ermittelte sROC curve aus den Cut-off Werten der Studien, ab dem von einem negativen Outcome ausgegangen werden kann. Der gemittelte Cut-off Wert hat eine Sensitivität von 78% und einer Spezifität von 75%

## 5.5 Qualitätsbewertung der Studien mit der Newcastle Ottawa Scale

Die Qualität der Studien wurde anhand der Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale (NOS) beurteilt. Diese wurde von Wells et al. (77) entwickelt und kann als Checkliste oder, wie in dieser Metaanalyse, als Bewertungsskala dienen. Die NOS gibt es in zwei Varianten, für Kohortenstudien und für Fall-Kontroll Studien. Die Skala besteht aus acht Items, die in drei Oberkategorien eingeteilt sind. Diese sind Selection, Comparability und, je nach Studientyp, Outcome (Kohortenstudie) oder Exposition (Fall-Kontroll-Studie). Für jedes Item kann ein Punkt vergeben werden, außer für das zu Comparability zählende Item, hier können zwei Punkte vergeben werden. Somit kann jede Studie mindestens null und maximal neun Punkte erreichen. Eine gute Qualität hat die Studie, wenn ihr maximal ein Punkt pro Kategorie fehlt. Eine mittlere Qualität erreicht die Studie bei zwei Punkten in der Selection Kategorie, ein bis zwei Punkten in der Comparability Kategorie und zwei bis drei Punkten in dem Outcome bzw. Exposition Kategorie. Eine schlechte Qualität liegt vor, wenn entweder maximal ein Punkt in der Selection oder Outcome bzw. Exposition Kategorie vergeben wird oder null Punkte in der Comparability Kategorie erreicht werden. Für Querschnittsstudien wurde eine modifizierte Version der NOS von Patra et al. verwendet (78). Diese besteht aus sechs Items, die ebenfalls in die drei Kategorien Selection, Comparability und Outcome eingeteilt werden. Auch bei dieser Variante kann für jedes Item ein Punkt vergeben werden, außer für das zu Comparability zählende, hier können zwei Punkte vergeben werden. Für eine Beurteilung als gute Studie muss die volle Punktzahl erreicht werden. Ist das nicht der Fall, wird die Qualität der Studie als mittel bis schlecht eingestuft. Für die einzelnen Items wurden im Vorhinein klare Definitionen erstellt.

Bei Kohortenstudien waren diese wie folgt:

Für das erste Item „Representativeness of the exposed cohort“ wurde ein Punkt vergeben, wenn die demografischen Daten der aufgenommenen septischen Patienten zur Verfügung standen und die Studienteilnehmer nicht nach einem bestimmten Kriterium wie „Geschlecht“ oder „Altersgruppe“ eingeschlossen wurden. Eine Ausnahme bildet der Ausschluss von unter 18-Jährigen und Schwangeren, dies wurde nicht als „nicht mehr repräsentativ“ gewertet. Das zweite Item „Selection of the non exposed cohort“ bekam einen Punkt, wenn die Kontrollgruppe aus derselben Bevölkerung stammte, wie die Sepsis Gruppe und nicht beispielsweise von einer anderen Studie übernommen wurde oder die Rekrutierung an einem anderen Ort erfolgte. Für das Item „Ascertainment of exposure“ bekamen die Studien einen Punkt, wenn sie zur Messung der cfDNA eine valide Messmethode verwendeten. Bei „Demonstration that outcome of interest was not present at start of study“ bekam die Studie einen Punkt, wenn deutlich war, dass der primäre Outcome zu Beginn der Studie noch nicht vorlag. Da das in vielen Fällen „Mortalität“ war, ist dieses Item für diese Studien als nur bedingt sinnvoll anzusehen, wurde aber aufgrund der Vollständigkeit beibehalten. Für das Item „Comparability

of cohorts on the basis of the design or analysis“ bekamen die Studien einen Punkt, wenn die Sepsis Gruppe und die Kontrolle Gruppe hinsichtlich des Alters und des Geschlechts übereinstimmten (+/- 10 Jahre in der Alterverteilung bzw. +/- 10% in der Geschlechterverteilung). Einen weiteren Punkt konnten die Studien bekommen, wenn die Probensammlung in allen Gruppen identisch verlief und dasselbe Material zur Messung verwendet wurde. Bei „Assessment of outcome“ wurde ein Punkt vergeben, wenn für die Diagnose der Sepsis allgemein gültige Standards, wie die Sepsis Definitionen verwendet wurden. Dabei war es irrelevant, ob die Autoren der Studien die Sepsis-1,-2 oder -3 Definitionen angewandt haben, da viele Studien vor Einführung der neusten Version dieser Definitionen publiziert wurden. Bei den Studien, bei denen das primäre Outcome „Mortalität“ war, ist dieses Item wieder nur bedingt sinnvoll. Für „Was follow up long enough for outcomes to occur“ bekam die Studie einen Punkt, wenn sie die Probanden 28 Tage oder länger nachverfolgte. Das letzte Item „Adequacy of followup of cohorts“ wurde als positiv bewertet, wenn nur 10% oder weniger Probanden der Kohorte nicht mehr nachverfolgt werden konnte.

### Fall-Kontroll Studien:

Für das Item „Is the case definition adequate?“ bekam die Studie einen Punkt, wenn die Sepsis nach korrekten Standards diagnostiziert wurde, siehe oben. Die Items „Representativeness of the cases“ und „Selection of Controls“ wurde äquivalent zu den ersten Items der Kohortenstudien bewertet. Bei dem Item „Definition of Controls“ wurde ein Punkt vergeben, wenn die Kontrollen keine Sepsis Erkrankung in ihrer Vorgeschichte aufwiesen. Die Kategorie „Comparability“ wurde wieder äquivalent zu den Kohortenstudien bewertet, ebenso wie das Item „Ascertainment of exposure“. Für das Item „Same method of ascertainment for cases and controls“ wurde ein weiterer Punkt vergeben, wenn die Messmethode für alle Gruppen gleich war. Das Item „Non-Response rate“ wurde als erfüllt angesehen, wenn die Rate derer, die nicht mehr verfolgt werden konnten in allen Gruppen gleich war.

### Querschnittsstudien:

„Representativeness of the sample“ wurde äquivalent zu den anderen Studiendesigns bewertet. Bei „Non-respondents“ bekam die Studie einen Punkt, wenn 10% oder weniger der Probanden in den einzelnen Gruppen nicht mehr nachverfolgt werden konnten. „Ascertainment of exposure“, „Comparability“ und „Assessment of the outcome“ wurden wie bereits erläutert bewertet. Das Item „Statistical test“ wurde als erfüllt angesehen, wenn beschrieben wurde, welche statistischen Methoden zur Auswertung herangezogen wurden und wenn diese als zuverlässig angesehen wurde.

Study	Selection				Comparability Comparability of cohorts on the basis of the design or analysis	Outcome			total	Qualität
	Representativeness of the exposed cohort	Selection of the non-exposed cohort	Ascertainment of exposure	Demonstration that outcome of interest was not present at start of study		Assessment of outcome	Was followup long enough for outcomes to occur	Adequacy of follow up of cohorts		
Abdelaal 2018	*	-	*	*	-	1			4	schlecht
						-	-	*		
Avriel 2014	*	-	*	*	-	3			6	schlecht
						*	*	*		
Beltran-Garcia 2021	*	*	*	*	**	2			8	gut
						*	-	*		
Chornenki 2019	*	*	*	*	-	3			6	schlecht
						*	*	*		
Clementi 2016	*	*	*	*	**	3			9	gut
						*	*	*		
Dennhardt 2024	*	*	*	*	**	3			9	gut
						*	*	*		
Forsblom 2014	*	*	*	*	*	3			8	gut
						*	*	*		
Gao 2019	-	*	*	*	*	3			7	gut
						*	*	*		
Garnacho-Montero 2014	*	*	*	*	**	3			9	gut
						*	*	*		
Grumaz 2019	*	*	*	*	-	3			7	schlecht
						*	*	*		
Hampson 2017	*	*	*	*	**	2			8	gut
						-	*	*		
Huang 2018	*	*	-	*	-	1			4	schlecht
						-	-	*		
Huttunen 2011	*	-	*	*	-	3			6	schlecht
						*	*	*		

Ergebnisse

Jing 2022	*	*	*	*	-	3	7	schlecht
						* * *		
Kung 2012	*	*	*	*	**	3	9	gut
						* * *		
Lenz 2022	*	*	*	*	**	2	8	gut
						* - *		
Margraf 2008	*	*	*	*	*	2	7	gut
						* - *		
Maruchi 2018	*	*	*	*	**	3	9	gut
						* * *		
Moreira 2010	*	*	*	*	*	2	7	gut
						* - *		
Patel 2018	*	*	*	*	**	2	8	gut
						* * -		
Purhonen 2015	-	*	*	*	-	2	5	schlecht
						* - *		
Rannikko 2018	*	-	*	*	-	3	6	schlecht
						* * *		
Rhodes 2006	*	*	*	*	*	3	8	gut
						* * *		
Saukkonen 2008	*	-	*	*	-	3	6	schlecht
						* * *		
Schneck 2016	*	*	*	*	**	3	9	gut
						* * *		
Silva de Miranda 2024	*	*	*	*	*	3	8	gut
						* * *		
Stiel 2020	*	*	*	*	*	2	7	gut
						* - *		
Tanaka 2019	*	*	*	*	*	3	8	gut
						* * *		
Wijeratne 2004	*	*	*	*	*	3	8	gut
						* * *		
Xia 2016	*	*	*	*	*	2	7	gut
						* * -		
Xu 2024	-	-	*	*	-	3	5	schlecht
						* * *		

Ergebnisse

Yan- Qiang 2016	*	*	*	*	**	2			8	gut
						*	-	*		

Tabelle 8 Qualitätsbewertung von Kohortenstudien mit der Newcastle Ottawa Scale

Study	Selection				Comparability	Outcome			total	Qualität
	Is the case definition adequate?	Representativeness of the cases	Selection of Controls	Definition of Controls		Comparability of cohorts on the basis of the design or analysis	Ascertainment of exposure	Same method of ascertainment for cases and controls		
Duplessis 2018	*	-	-	*	*	3			6	mittel
					*	*	*			
Dwivedi 2012	*	*	*	*	*	2			7	gut
					*	*	-			
Grumaz 2016	*	*	*	*	*	3			8	gut
					*	*	*			
Nguyen 2017	*	-	-	*	*	3			6	mittel
					*	*	*			

Tabelle 9 Qualitätsbewertung von Fall-Kontroll Studien mit der Newcastle Ottawa Scale

Study	Selection			Comparability	Outcome		total	Qualität
	Representativeness of the sample	Non-Response rate	Ascertainment of exposure		Assessment of outcome	Statistical test		
Czaikoski 2016	-	*	-	*	2		4	mittel
					*	*		
Dawulieti 2020	-	-	*	*	2		4	mittel
					*	*		
Gould 2015	*	*	-	*	2		5	gut
					*	*		

Hashiba 2014	*	*	*	**	2	6	gut
	*				*		
Kocsis 2009	*	*	*	*	2	6	gut
	*				*		
Lee 2018	*	-	*	**	2	6	gut
	*				*		
Martins 2006	*	*	*	*	2	6	gut
	*				*		
Urosevic 2022	*	*	*	*	2	6	gut
	*				*		
Yang 2017	*	*	*	**	2	7	gut
	*				*		

Tabelle 10 Qualitätsbewertung von Querschnittsstudien mit der Newcastle Ottawa Scale

Insgesamt erreichten bei der Bewertung durch die Newcastle Ottawa Scale 30 Studien eine gute Qualität, vier Studien eine mittlere Qualität und elf Studien eine schlechte Qualität. Der häufigste Grund für einen Punktabzug war eine fehlende Vergleichbarkeit der Probanden mit der Kontrollgruppe aufgrund eines zu großen Altersunterschiedes. Auch Studien, die gar keine Kontrollgruppe verwendet haben, bekamen in dieser Kategorie keinen Punkt.

## 6 Diskussion

Sepsis ist eine der führenden Todesursachen auf der Intensivstation weltweit (100). Es gibt unzählige Pathogene, die das Krankheitsbild der Sepsis verursachen können und der Krankheitsverlauf ist von Patient zu Patient äußerst heterogen (13). Dementsprechend gestaltet sich die Diagnose mitunter sehr schwierig. Der rechtzeitige Start einer adäquaten Therapie kann jedoch entscheidend für das Überleben des Patienten sein (20). Daher ist es von enormer Bedeutung neben den bisher etablierten Biomarker und Scores weitere Kriterien zu finden, die die Diagnose der Sepsis vereinfachen und objektivieren können. Denn die Sensitivität und Spezifität der bisherigen Diagnostik ist nach wie vor nicht zufriedenstellend. Ein im Jahr 2010 publiziertes Review untersuchte bei 178 verschiedenen Biomarker mit welcher Sensitivität und Spezifität sie eine Sepsis diagnostizieren können und ob sie als prognostischer Marker dienen können. Keiner der untersuchten Biomarker konnte mit einer Sensitivität oder Spezifität über 90% die Prognose des Patienten abschätzen. Und auch die Diagnose ist selbst bei dem PCT, das in dieser Studie am besten abschnitt, mit einer Sensitivität von unter 90% relativ gering. Lediglich der negativ prädiktive Wert war mit 99% sehr gut (74). Um dennoch möglichst viele Patienten richtig diagnostizieren zu können und eine gute Prognose über das Outcome geben zu können ist es daher wichtig die bisherigen, etablierten Biomarker zu kombinieren und nach weiteren, mit der Krankheitsaktivität der Sepsis korrelierenden, Markern zu suchen.

### 6.1 Kritische Bewertung der Methodik

Die vorliegende systematische Übersichtsarbeit wurde auf Grundlage der PRISMA Leitlinien verfasst (75). Es wurde versucht alle Punkte der PRISMA 2020 Checklist zu beachten. Dennoch haben sich Probleme aufgetan, die zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen können. Diese Probleme sollen im folgenden Abschnitt erläutert und genauer beleuchtet werden.

#### 6.1.1 Fehlerquellen in der Suche

Trotz großen Bemühungen ist es nicht auszuschließen, dass manche Studien, die sich ebenfalls mit dem Thema "cfDNA in Sepsis" beschäftigt haben, nicht gefunden worden. Der Suchbegriff wurde mehrmals überarbeitet und es wurde versucht, ihn so vollständig wie möglich zu gestalten. Dennoch ist es denkbar, dass er nicht alle relevanten Studien einschließt und somit wichtige Arbeiten nicht identifiziert. Das liegt unter anderem auch daran, dass es bisher noch keine einheitliche Bezeichnung für freie zirkulierende DNA im Blut gibt und die Studien daher unterschiedliche Begriffe verwenden. Zudem gibt es je nach Suchmaschine

andere formelle Vorgaben bezüglich des Suchbegriffs. Es wurde versucht diese zu berücksichtigen, insgesamt orientierten wir uns jedoch überwiegend an PubMed. Es ist somit möglich, dass bei anderen Suchmaschinen nicht die größtmögliche Trefferanzahl erzielt wurde. Außerdem wurden nur Studien eingeschlossen, die auf englischer oder deutscher Sprache verfügbar waren. Andere Sprachen wurden nicht berücksichtigt. Eine weitere Fehlerquelle stellte die zum Teil sehr große Trefferanzahl dar. Um möglichst sensitiv zu suchen war die Spezifität nicht sehr hoch, was zur Folge hatte, dass auch viele unpassende Studien angezeigt worden. Vor allem bei Google Scholar war die Anzahl an Studien mit 9.530 Treffern sehr hoch. Dadurch war es unvermeidbar zum Teil nur nach Überschriften zu selektieren, da es nicht möglich war, von allen Studien den Abstract zu lesen. So erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit eine passende Studie zu übersehen. Ein weiteres Problem, dass sich bei jeder Metaanalyse ergibt, ist der Publikationsbias. Es werden bevorzugt Studien veröffentlicht, die positive Ergebnisse vorzuzeigen haben (101). Somit könnte es sein, dass Studien, die keine signifikante Erhöhung der cfDNA-Konzentration in septischen Patienten festgestellt haben, nicht veröffentlicht wurden und nicht in die Analyse einbezogen wurden. Das würde dazu führen, dass die cfDNA als Biomarker besser eingeschätzt wird, als sie ist.

### 6.1.2 Fehlerquellen innerhalb der Studien

Wie unter dem Punkt Ergebnisse der Studien 5.3 bereits erläutert, waren manche Studien nicht vollständig verfügbar. Dies könnte die Ergebnisse der Metaanalyse verfälschen. Bei vielen Studien konnten trotz Nachfrage bei den Autoren nicht alle relevanten Daten ermittelt werden. Somit mussten manche Zahlen aus gegebenen Werten berechnet oder an Diagrammen abgelesen werden. Das führt zu Ungenauigkeiten, die sich im Gesamtergebnis widerspiegeln könnten. Auch der Wandel der Definition der Sepsis über die Jahre hinweg stellt ein Problem dar. Vor 2016 wurde die Sepsis noch anders definiert und dementsprechend ist es möglich, dass damals Patienten als septisch eingestuft wurden, die nach 2016 nicht mehr unter den Begriff Sepsis fallen würden. Wenn man diese Studien heute noch einmal durchführen würde, würden sich somit eventuell andere Werte ergeben.

Ein weiteres großes Problem bei dem Vergleich der Studien sind die zum Teil gravierend unterschiedlichen Vorgehensweisen und Messmethoden, die von den Forschungsgruppen verwendet worden. Während einige der Studien den Patienten direkt nach Ankunft das Blut abnahmen, wartete beispielsweise die Arbeitsgruppe um Forsblom et al. (102) drei Tage bis zur Blutentnahme ab. Diese Unterschiede des Abnahmezeitpunktes können die Konzentration der cfDNA entscheidend beeinflussen. Ein weiteres Problem des Abnahmezeitpunktes ist aber auch, dass es bei dem Krankheitsbild der Sepsis anders als beispielsweise bei einem Schädel-Hirn-Trauma keinen klaren Startpunkt gibt. Damit ist es unklar wie lange die cfDNA eventuell

schon erhöht ist und ob sie vielleicht schon wieder abgefallen ist. Zudem wurden bei drei der eingeschlossenen Studien (68, 103, 104) das Serum untersucht, wohingegen die anderen Gruppen das Plasma untersuchten. Auch dadurch könnte die Konzentration der cfDNA Unterschiede aufweisen. Hampson et al. zeigten beispielsweise, dass bei Messungen der cfDNA im Serum mehr als doppelt so hohe Konzentrationen als bei Messungen im Plasma nachgewiesen werden können (105). Die Varianzanalyse basierend auf den in dieser Arbeit gesammelten Daten (siehe 5.4.1) konnte dagegen keinen Unterschied feststellen. Da jedoch auch nur drei Studien Serum und nicht Plasma verwendeten kann auch die geringe Gruppengröße ursächlich für dieses Ergebnis sein.

Die Vergleichbarkeit der Studien wird zusätzlich stark eingeschränkt durch zum Teil fehlerhafte Messmethoden. Sieben Arbeitsgruppen verwendeten den Assay nach Lo et al. (76). Dieser sollte aber mit einer Sonde benutzt werden und nicht, wie von einigen Arbeitsgruppen angewendet, mit SYBR Green bzw. Gold. Außerdem wäre es notwendig, dass jede Arbeitsgruppe eine eigene Standardkurve erstellt, anhand derer die Werte ermittelt werden. Auch das war nicht immer der Fall und führt zu gravierenden Messfehlern. Eine weitere Problematik mit dem Assay von Lo et al. ergibt sich daraus, dass er auf die asiatische Bevölkerung angepasst ist. Genetische Unterschiede zur kaukasischen Bevölkerung könnten dazu führen, dass bei der gleichen Messmethode relevante Konzentrationsunterschiede auftreten. Das liegt daran, dass Lo et al. einen Primer verwendete, der an einem Genlocus im  $\beta$ -Globin Gen ansetzt. In diesem Genlocus weist die asiatische Bevölkerung mehr Single Nucleotide Polymorphism (SNP) auf als die kaukasische. Diese unterschiedliche SNP-Konstellation könnte eine Ursache für die enorme Abweichung der Ergebnisse bei der Verwendung desselben Assays sein. Dass einige Studien einfach auf die Arbeitsgruppe um Lo et al. verweisen, statt die verwendete Messmethode auf die gegebenen Umstände anzupassen und die Amplifikationseffizienz unter den jeweiligen Versuchsbedingungen zu etablieren ist somit als großer Fehler zu betrachten. Als Konsequenz daraus ergibt sich, dass die Ergebnisse der Studien vermutlich nicht vergleichbar sind. Dies wurde auch durch die vorgenommene Varianzanalyse (siehe Kapitel 5.4.1) bestätigt. Innerhalb einer Studie sind die Werte aber dennoch aussagekräftig.

Eine Studie aus dem Jahr 2013 von Urosevic et al. untersuchte welche Messmethode für Konzentrationsbestimmung der cfDNA die geeignetste ist. Die Arbeitsgruppe kam zum Schluss, dass die  $\beta$ -Globin qPCR die sensitivste Methode ist, während ein Qubit Assay die beste Methode für eine schnelle Messung hoher Konzentrationen ist (106). Aufgrund einiger Neuerungen auf diesem Gebiet müsste solch eine Studie jedoch erneut mit den neusten Geräten und Messmethoden durchgeführt werden.

### 6.1.3 Fehlerquellen bei der Auswertung der Daten

Auch die Auswertung der Daten und die eigentliche Metaanalyse birgt Probleme, die zu Ungenauigkeiten und Verzerrungen der Ergebnisse führen können. Vor allem die oftmals nicht vollständig in den Studien angegebenen Werte der cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Probanden erschweren die Analyse. So haben einige Studien lediglich den Median angegeben, während andere Studien den Mittelwert bestimmt haben. Entsprechend ist bei manchen Arbeitsgruppen der Interquartilabstand ermittelt worden, während andere Arbeitsgruppen die Standardabweichung berechnet haben. Die Autoren der Studien, bei denen fehlende Werte nicht anhand gegebener Daten ausgerechnet werden konnten, wurden angeschrieben mit der Bitte um vollständige Datensätze. War dies erfolglos musste aus dem Interquartilabstand die Standardabweichung mit Hilfe der Formel  $SD = IQR/1,35$  abgeschätzt werden, um die Studien dennoch vergleichen zu können (81). Diese Formel ist jedoch nur bei annähernd normalverteilten Daten gültig. Ob das bei den entsprechenden Studien jedoch der Fall war, ist fraglich, da sich dann die Frage stellt, warum bei normalverteilten Werten nicht der Mittelwert und die Standardabweichung gegeben waren. Um die Ergebnisse der Studien dennoch in der Metaanalyse berücksichtigen zu können wurde diese Ungenauigkeit jedoch hingenommen.

Ein weiteres Problem ist die nicht immer exakt gleiche Fragestellung der Studien. So haben manche Studien alle Schweregrade der Sepsis berücksichtigt, während andere Studien nur Patienten mit einem septischen Schock oder, wie vor 2016 noch möglich, Patienten mit einer schweren Sepsis eingeschlossen haben (57, 67). In solchen Studien ist die erwartete cfDNA-Konzentration höher als in den anderen Studien. Bei der Betrachtung der Mortalität gleichen sich dies aber wieder aus, da die Letalität des septischen Schocks auch entsprechend höher ist als die Letalität einer Sepsis ohne Schock. Daher müssten höhere cfDNA-Konzentrationen dann auch mit einer höheren Mortalität einhergehen. Problematischer ist die Tatsache, dass die Fragestellung in manchen Studien weiter gefasst wurde als in anderen. So haben beispielweise Rhodes et al. (69) oder Forsblom et al. (102) zwar die cfDNA-Konzentration bei septischen Patienten im Speziellen untersucht, bei der Angabe des cfDNA-Levels bei Verstorbenen im Vergleich zu Überlebenden aber Intensivstation-Patienten im Allgemeinen betrachtet. Die erwartete cfDNA-Konzentration ist in den Fällen somit vermutlich niedriger als bei Studien, die auch bei dieser Fragestellung nur die septischen Patienten betrachtet haben. Da das Verhältnis der Konzentrationen von Verstorbenen zu Überlebenden aber dennoch ungefähr gleich sein sollte und die Patienten mit einer Sepsis in der Gruppe der Intensivstation-Patienten enthalten ist, wurden diese Studien trotzdem berücksichtigt. Die Arbeitsgruppe um Wijeratne et al. (107) hat ebenfalls bei der Angabe der cfDNA-Konzentrationen nicht die septische Gruppe isoliert betrachtet, sondern auch andere Patienten der Intensivstation mit einbezogen. Das macht diese Studie bei der Fragestellung, ob die cfDNA eine Sepsis von

anderen Krankheiten differenzieren kann, unbrauchbar. Bei der Frage, ob die cfDNA-Konzentration aber die Aussage über das Outcome septischer Patienten vereinfachen kann, können die Daten der Studie aber dennoch wertvolle Hinweise liefern, da hier, wie auch bei oben genannten Studien, die septischen Patienten in der Gesamtgruppe der Intensivmedizinischen Patienten enthalten sind. Dennoch ist diese Ungenauigkeit bei der Auswertung der Daten zu berücksichtigen.

## 6.2 Allgemeine Probleme bei der Messung der cfDNA-Konzentration

Bei der Konzentrationsbestimmung der cfDNA können, wie bei jeder anderen Detektion eines klinischen Markers auch, Fehler auftreten, die das Messergebnis mehr oder weniger beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise die verwendeten Geräte, die je nach Hersteller und Alter etwas andere Ergebnisse angeben, die Menge und Bearbeitungsdauer des abgenommenen Blutes, die Temperatur, bei der das Blut abgenommen und verarbeitet wurde und natürlich auch Fehler bzw. unterschiedliche Arbeitsweisen des Personals (108).

Auch die in 2.2 beschriebene natürlicherweise sehr niedrige Konzentration und natürlichen Schwankungen der freien DNA erschweren die Diagnostik enorm. Zusätzlich waren die bisherigen Methoden zur Aufbereitung und Messung der cfDNA sehr zeitintensiv (109). Die in neuerer Zeit eingesetzten mikrofluidischen Systeme hingegen können in deutlich kürzerer Zeit und mit einer kleineren Probenmenge exakte Ergebnisse liefern (109). Dabei arbeitet man unter anderem damit polymeren Materialien elektrostatisch zu koppeln, um die freie DNA gezielt aus der Probe zu extrahieren. Zur anschließenden Quantifizierung verwendet man üblicherweise eine PCR, bei der die cfDNA zusätzlich durch ein Fluoreszenzfarbstoff markiert sein kann. Ein Problem dabei ist jedoch die mitunter starke Fragmentierung der freien DNA, die dazu führen kann, dass bei einer PCR die Konzentration unterschätzt wird, weshalb vermehrt auch an Nicht-PCR Methoden gearbeitet wird (109).

Zu beachten ist auch, dass die cfDNA zum Teil renal eliminiert wird. Dadurch sind Patienten mit einem Nierenversagen nicht mehr mit Patienten mit einer normalen Nierenfunktion vergleichbar (110). In einer Studie aus dem Jahr 2017 zeigten septische Patienten, die einen Kreatinin-Wert über 1,2 mg/dl hatten eine fast drei Mal so hohe cfDNA Konzentration, wie septische Patienten, die unter dieser Grenze lagen (66). Eine weitere Problematik bei dem Vergleich der Messwerte verschiedener Arbeitsgruppen ergibt sich dadurch, dass die Menge des abgenommenen Blutes für die Messung der cfDNA-Konzentration nicht genormt ist und auch die Zeit zwischen der Blutentnahme und der Auswertung der Probe innerhalb der Probanden und vor allem der Arbeitsgruppen unterschiedlich gewesen sein wird. Das größte Problem ist dabei weniger die Degradation der cfDNA durch Enzyme im Blut - diese läuft in

der Monovette nur langsam ab – sondern vielmehr der Untergang der kernhaltigen Zellen im Vollblut. Durch diesen Untergang wird enorm viel nicht fragmentierte und damit super amplifizierbare DNA frei, die das Ergebnis massiv verändert würde. Daher ist es wichtig, dass das Material innerhalb von zwei Stunden zentrifugiert und anschließend gekühlt wird (111). Falls eine Monovette mit Stabilisator verwendet wird sollte die Verarbeitung entsprechend den Vorgaben des Herstellers erfolgen (112).

### 6.2.1 Einflüsse auf die cfDNA-Konzentration

Eins der größten Probleme bei fast allen Biomarkern ist die oftmals zu geringe Spezifität. Ein auffälliger Wert geht nicht automatisch mit der vermuteten Krankheit einher. Dieses Problem ist auch bei der Messung der cfDNA zu berücksichtigen. Wie im einleitenden Abschnitt erläutert, steigt die Konzentration der freien DNA mit Zunahme des Zellerfalls. Das ist bei der Sepsis der Fall, aber auch bei vielen anderen Erkrankungen und physiologischen Vorgängen. Daher ist es von großer Bedeutung vor Etablierung eines neuen Biomarkers die verschiedenen Einflüsse auf diesen herauszuarbeiten und zu bewerten. Ein gutes Beispiel bietet der D-Dimer Wert. Er steigt zuverlässig bei einer vorliegenden Lungenembolie an und hat sich als wichtiges diagnostisches Kriterium bei der Lungenembolie etabliert (113). Es gibt aber auch zahlreiche andere Erkrankungen, wie beispielsweise eine Phlebothrombose, oder auch physiologische Zustände, wie eine Schwangerschaft, die zu einer Veränderung des D-Dimer Wertes führen (114, 115). Diese sollten vom behandelnden Arzt unbedingt bedacht werden, um eine fehlerhafte Behandlung zu vermeiden. Bei der Erhöhung der Konzentration der zellfreien DNA gibt es ebenfalls wichtige Differenzialdiagnosen (116). So zeigen sich auch bei malignen Erkrankungen signifikante Anstiege des Markers (63). Auch bei Patienten, die ein Trauma erlitten haben, sind Erhöhungen der cfDNA Konzentration nachweisbar (64). Ebenso finden sich bei Transplantatabstoßungen gesteigerte Werte (65). Bei einem Schlaganfall und Herzinfarkt zeigen sich ebenfalls erhöhte Konzentrationen (117, 118). Auch bei Entzündungen steigen die Werte der zellfreien DNA an. In mehreren Studien konnte eine positive Korrelation zwischen cfDNA und proinflammatorischen Faktoren gezeigt werden (119). Hierbei zeigte sich jedoch ein geringerer Anstieg als bei Infektionen. Schon in den 1970ern konnte zudem ein Anstieg in Patienten mit systemischen Lupus erythematodes festgestellt werden. Ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität zeigte sich jedoch nicht (120).

Neben den Differenzialdiagnosen ist es auch wichtig die individuellen Einflussfaktoren eines jeden Patienten zu berücksichtigen. Oft unterscheiden sich die Konzentrationen der Biomarker zwischen den Geschlechtern oder den Altersgruppen. Dies scheint bei der cfDNA aber nicht der Fall zu sein und bedarf somit hinsichtlich dieser Faktoren keine Anpassung (67, 107, 121). Neben den Pathologien, die eine cfDNA-Erhöhung zur Folge haben können, gibt es aber auch

physiologische Zustände, die eine Veränderung der Konzentration der freien DNA bedingen können. So kann nach körperlicher Aktivität eine gesteigerte Konzentration nachweisbar sein (122). Diese korreliert mit Intensität der ausgeführten Sportart und der körperlichen Verfassung des Sporttreibenden (122). Und auch während einer Schwangerschaft lassen sich gestiegenen cfDNA-Konzentrationen nachweisen. Eine Studie von Cushen et al. (123) konnte zudem zeigen, dass die Konzentration im Verlauf der Schwangerschaft immer weiter steigt und interessanterweise von dem Geschlecht des Ungeborenen beeinflusst wird.

### 6.3 Korrelation der cfDNA-Konzentration mit anderen Parametern

Neben der Hauptfragestellung „Kann die Messung der cfDNA-Konzentration das Outcome der Patienten und die Mortalität zuverlässig vorhersagen?“ und der Nebenfragestellung „Kann die Messung der cfDNA-Konzentration die Diagnose der Sepsis ergänzen?“ wurden in den Studien weitere Parameter untersucht, die mit der cfDNA-Konzentration korrelieren könnten. So wurde überprüft, ob die gemessene Konzentration mit der Länge des Aufenthaltes der Intensivstation korreliert. Wijeratne et al. konnte dahingehend keinen Zusammenhang feststellen (107). Rhodes et al. hingegen stellten eine signifikante Korrelation zwischen dem Plasma-DNA-Level und der Länge des Intensivstation Aufenthaltes der Überlebenden fest ( $r^2=0.12$ ,  $p=0.03$ ) (69).

Auch die Frage, ob der cfDNA-Spiegel im Blut eine Sepsis von einer SIRS differenzieren kann, ist im klinischen Alltag von entscheidender Bedeutung. Wie bereits beschrieben war die Definition der Sepsis vor 2016 eng mit der Definition der SIRS verbunden. Ab der Sepsis-3-Leitlinie sind diese Krankheitsbilder aber klar voneinander abzugrenzen. Daher ist es wichtig einen Biomarker zu haben, der zwischen diesen Krankheiten unterscheiden kann. Die Arbeitsgruppe um Yan Qiang konnte einen signifikanten Unterschied der cfDNA-Konzentrationen zwischen septischen Patienten und Patienten mit einem SIRS feststellen (68). Während bei Patienten mit einer Sepsis eine durchschnittliche Konzentration von 1427 ng/ml gemessen wurde, lag der Durchschnitt bei Patienten mit einem SIRS bei lediglich 692 ng/ml. Die Arbeitsgruppe empfiehlt ab einem Cut-off Wert von 493 ng/ml von einer Sepsis, statt von einem SIRS auszugehen. Bei diesem Wert kann die cfDNA-Konzentration nach den Daten von Yan Qiang et al. mit einer Sensitivität von 94,1% und einer Spezifität von 70,6% zwischen den beiden Krankheitsbildern differenzieren. Bestätigt werden diese Ergebnisse von Duplessis et al. (93). Auch die Messungen dieser Studie zeigen mit einem p von 0,009 einen signifikanten Unterschied zwischen Sepsis und dem SIRS. Dahingegen empfiehlt Garnacho-Montero et al. in seiner Studie nicht die cfDNA-Konzentration zur Differenzierung zwischen Sepsis und einer SIRS zu verwenden (95). Die Daten konnten in der Auswertung trotz durchschnittlich höheren Konzentrationen in der septischen Gruppe im Vergleich zur Gruppe

der SIRS-Patienten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen beider Patientengruppen feststellen.

## 6.4 Ausblick

Zum jetzigen Zeitpunkt lässt die Datenlage noch keine endgültige Aussage über das Potenzial der cfDNA als Biomarker zu. Die veröffentlichten Studien weisen zwar überwiegend signifikante Ergebnisse auf, den klinischen Nutzen gilt es aber noch zu ermitteln. Die Messung der cfDNA dauert immer noch zu lange und ist sehr kostenintensiv. Das könnte viele Kliniken dazu bewegen die cfDNA auch dann nicht als Biomarker zu etablieren, wenn sie sich in Studien als gewinnbringend herausgestellt hat. Außerdem ist das Messverfahren nicht standardisiert. Das führt zum einen zu dem Problem, dass die publizierten Studien nur schwer miteinander vergleichbar sind, sorgt aber auch dafür, dass die Werte für einen Patient von Labor zu Labor vermutlich sehr unterschiedlich ausfallen würden und somit eine Verlaufsbeurteilung bei einem Krankenhauswechsel sehr schwierig wäre. Zudem ist zu berücksichtigen, dass auch bei einer Etablierung der cfDNA und anderer Biomarker in der Diagnostik der Sepsis nicht auf die Blutkultur verzichtet werden kann. Als bestätigende Diagnostik und vor allem auch zur Resistenzprüfung der Bakterien wird die Blutkultur im Management der Sepsis nicht durch Biomarker zu ersetzen sein. Ohne die Resistenzprüfung kann eine kalkulierte Antibiotikatherapie nicht spezifiziert werden, was in der Behandlung einer schwerwiegenden Infektion und im Besonderen einer Sepsis unbedingt notwendig ist.

## 7 Zusammenfassung

Die Therapie der Sepsis hat sich in den letzten Jahrzehnten entscheidend verbessert. Dennoch geht die Krankheit auch heute noch mit einer hohen Letalität einher. Daher ist es unbedingt erforderlich weiterhin die diagnostischen und therapeutischen Standards zu überprüfen und zu verbessern. Als ein vielversprechender Ansatz hat sich hierbei die Messung der Konzentration der zellfreien DNA herausgestellt. Die cfDNA hat das Potenzial sich als Biomarker zu etablieren und in der klinischen Praxis die Diagnostik zu unterstützen, die Risikoeinschätzung der Patienten zu verbessern und den Therapieerfolg zu überwachen. Das könnte zu einer frühzeitigen Therapiemodifizierung führen, wodurch das Outcome der Patienten verbessert werden kann.

In den letzten Jahren ist die Zahl der Studien, die sich mit der cfDNA im Krankheitsbild der Sepsis beschäftigen kontinuierlich gestiegen. Ziel dieser systematischen Übersichtsarbeit ist es, diese Studien zu identifizieren, deren Ergebnisse zusammenzutragen und anschließend auszuwerten. Die Hauptfragestellung der Arbeit „Kann die Messung der cfDNA-Konzentration das Outcome der Patienten und die Mortalität zuverlässig vorhersagen?“ wurde ebenso wie die Nebenfragestellung „Kann die Messung der cfDNA-Konzentration die Diagnose der Sepsis ergänzen?“ in einer Metaanalyse untersucht.

Die Literaturrecherche erbrachte 45 Studien, die sich mit dem Thema der cfDNA als Biomarker in der Sepsis beschäftigten und die im Vorhinein gestellten Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten. Davon konnten 16 Studien für die Hauptfragestellung und 27 Studien für die Nebenfragestellung herangezogen werden. Dabei kann die cfDNA nach den Ergebnissen der eingeschlossenen Studien sowohl die Identifizierung septischer Patienten erleichtern als auch eine Prognose über das Outcome der Patienten treffen.

Der in der Metaanalyse ermittelte Effektschätzer aller Studien ergab einen Wert von 1.33 mit einem 95% CI von 0.96 bis 1.70 für die diagnostische und einen Wert von 1.42 mit einem 95% CI von 0.90 bis 1.93 für die prognostische Aussagekraft der cfDNA in der Sepsis. Die Zusammenschau des bisherigen Forschungsstandes zeigt somit einen signifikanten Vorteil in der Nutzung der cfDNA-Konzentration bei dem Management der Sepsis.

Um eine Ursache für die ausgeprägte Heterogenität zwischen den Studien zu ermitteln, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Diese ergab keinen Einfluss für das Jahr, in dem die Studie durchgeführt wurde und konnte auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messungen der cfDNA-Konzentration im Serum oder Plasma feststellen. Die verwendete Messmethode zeigte dahingegen einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Konzentration zellfreien DNA.

In dieser Metaanalyse konnte durch eine systematische Auswertung der bisherigen Studien auf diesem Gebiet gezeigt werden, dass die freie DNA als Biomarker signifikant zwischen einem positiven und einem negativen Outcome differenzieren und septische von nicht septischen Patienten trennen kann. Dabei sollte die cfDNA jedoch keinesfalls als alleiniger Parameter herangezogen, sondern stets in Kombination mit bisher etablierten Biomarkern und Scores betrachtet werden. Um die freie DNA jedoch in der klinischen Praxis etablieren zu können muss ein einheitliches Messverfahren gefunden werden, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Es werden zudem mehr Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden benötigt, um die Ergebnisse zu festigen und einen allgemein gültigen Cut-off Wert für die Diagnose und Prognose der Sepsis festzulegen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Striebel HW. Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin : für Studium und Ausbildung: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 2020.
2. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(9):840-51.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165-228.
4. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(3):259-72.
5. Urosevic N, Merritt AJ, Inglis TJJ. Plasma cfDNA predictors of established bacteraemic infection. *Access Microbiol.* 2022;4(6):acmi000373.
6. Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:2536.
7. Levi M, Scully M, Singer M. The role of ADAMTS-13 in the coagulopathy of sepsis. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):646-51.
8. Gogia S, Neelamegham S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology.* 2015;52(5-6):319-35.
9. Zheng XL. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1(0 1):11-23.
10. Giustozzi M, Ehrlicher H, Bongiovanni D, Borovac JA, Guerreiro RA, Gąsecka A, et al. Coagulopathy and sepsis: Pathophysiology, clinical manifestations and treatment. *Blood Rev.* 2021;50:100864.
11. Henrich M, Groß M, Weigand MA. Hämodynamische Veränderungen in der Sepsis *Anästh Intensivmedizin* 2012:19-32.
12. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):862-74.
13. Seymour CW, Kennedy JN, Wang S, Chang CH, Elliott CF, Xu Z, et al. Derivation, Validation, and Potential Treatment Implications of Novel Clinical Phenotypes for Sepsis. *Jama.* 2019;321(20):2003-17.
14. Volbeda M, Wetterslev J, Gluud C, Zijlstra JG, van der Horst IC, Keus F. Glucocorticosteroids for sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med.* 2015;41(7):1220-34.
15. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama.* 2016;315(8):801-10.
16. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med.* 2021;49(11):e1063-e143.
17. S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge [Internet]. AWMF. 2018 [cited 17.08.2022].
18. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13(10):818-29.
19. Rhodes A, Evans L, Alhazzani A, Levy M, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* .2017; URL: <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>.
20. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1368-77. doi: 10.1056/NEJMoa010307.
21. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589-96.
22. Soong J, Soni N. Sepsis: recognition and treatment. *Clin Med (Lond).* 2012;12(3):276-80.

23. Marik PE, Farkas JD, Spiegel R, Weingart S. POINT: Should the Surviving Sepsis Campaign Guidelines Be Retired? Yes. *Chest*. 2019;155(1):12-4.
24. Clementi A, Virzì GM, Brocca A, Pastori S, de Cal M, Marcante S, et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif*. 2016;41(1-3):34-40.
25. Group BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001; <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
26. Striebel HW. *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin*. Stuttgart: Thieme; 2020.
27. Barati M, Alinejad F, Bahar MA, Tabrisi MS, Shamshiri AR, Bodouhi NO, et al. Comparison of WBC, ESR, CRP and PCT serum levels in septic and non-septic burn cases. *Burns*. 2008; <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.01.014>.
28. Renz H. *Praktische Labordiagnostik*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2014.
29. Bystrzycka W, Sieczkowska S, Manda-Handzlik A, Rogulska J, Moskalik A, Demkow U, et al. Influence of Different Bacteria Strains Isolated from Septic Children on Release and Degradation of Extracellular Traps by Neutrophils from Healthy Adults. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1108:1-12.
30. Shigeto H, Yukihiro A, Norihisa Y, Masafumi S, Kouji Y, Kazunori O, et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm*. 2015; doi: 10.1155/2015/614518.
31. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison J, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Jci Insight*. 2020; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>.
32. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.
33. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530-8.
34. Kehl D, Iqbal N, Fard A, Kipper B, De La Parra Landa A, Maisel A. Biomarkers in acute myocardial injury. *Transl Res*. 2011; 159(4):252-64. doi: 10.1016/j.trsl.2011.11.002.
35. Marik PE, Taeb AM. SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *J Thorac Dis*. 2017;9(4):943-5.
36. Bauer M, Groesdonk HV, Preissing F, Dickmann P, Vogelmann T, Gerlach H. [Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis]. *Anaesthesist*. 2021;70(8):673-80.
37. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(12):919-24.
38. Vincent JL, 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.
39. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012;366(22):2055-64.
40. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29(7):1303-10.
41. Nagy B. Cell-Free Nucleic Acids. *Int J Mol Sci*. 2019. 20(22):5645. doi: 10.3390/ijms20225645.
42. Sharma P, Sampath H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*. 2019;8(2).
43. Stroun M, Anker P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem J*. 1972;128(3):100p-1p.
44. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:7-17.
45. Gahan PB, Stroun M. The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(7):529-38.

46. Abolhassani M, Tillotson J, Chiao J. Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line hl-60. *Int J Oncol*. 1994;4(2):417-21.
47. van der Meer J, Kroeze A, Hoogendijk A, Ait Soussan A, van der Schoot C, Willemin W, et al. Systematic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv*. 2019; 724-728, URL: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018018895>.
48. Itagaki K, Kaczmarek E, Lee YT, Tang IT, Isal B, Adibnia Y, et al. Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120549.
49. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K, et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:614518.
50. Denning N-L, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol*. 2019;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536. eCollection 2019.
51. Zhenxing C, Simon T A, Julien T, Susan SW, Zhi W, Qian Y, et al. The Critical Roles and Mechanisms of Immune Cell Death in Sepsis. . *Front Immunol*. 2020; 11:1918. doi: 10.3389/fimmu.2020.01918. eCollection 2020.
52. Travis J. G, Trang T. V, Alan R. S, Dhruva J. D, Paul Y. K, Alison E. F-R, et al. Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35:2544–2553, doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306035.
53. Dawulieti J, Madi S, Yawei Z, Dan S, Huize Y, Yeh-Hsing L, et al. Treatment of severe sepsis with nanoparticulate cell-free DNA scavengers. *Science Advance*. 2020; Vol. 6, no. 22, eaay7148 [cited deutsches ärzteblatt].
54. Moss J, Magenheim J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun*. 2018;9(1):5068.
55. Rhodes A, Wort SJ, Helen T, P. C, Bennett ED. [Studie]. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients [Internet]. 2006 [zitiert am 06.06.2021]. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101030> [cited PMC].
56. Avriel A, Paryente Wiessman M, Almog Y, Perl Y, Novack V, Galante O, et al. Admission cell free DNA levels predict 28-day mortality in patients with severe sepsis in intensive care. *PLoS One*. 2014;9(6):e100514.
57. Dwivedi DJ, Tolti LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw KL, Weitz JI, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2012;16(4):R151.
58. Kung C, Hsiao S, T, TC. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. . *J Transl Med* 10, 130. 2012; <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-130>.
59. Vanessa García M, Tamara dICM, Emilio Gago G, Belén Prieto G, Francisco V Alvarez M. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR. . *Clin Chem Lab Med*. 2006; <https://doi.org/10.1515/cclm.2006.252>.
60. Brodbeck K, Schick S, Bayer B, Anslinger K, Krüger K, Mayer Z, et al. Biological variability of cell-free DNA in healthy females at rest within a short time course. 2020. 134(3):911-919. doi: 10.1007/s00414-019-02240-9. Epub.
61. Rhodes A, M C. Cell-free DNA and outcome in sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(6):170. doi: 10.1186/cc11508.
62. Scotchman E, Shaw J, Paternoster B, Chandler N, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and screening for monogenic disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2020. 253:320-327. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.08.001.
63. Ymke vdP, Florent M. Toward the Early Detection of Cancer by Decoding the Epigenetic and Environmental Fingerprints of Cell-Free DNA. *Cancer Cell*. 2019. 36(4):350-368. doi: 10.1016/j.ccell.2019.09.003.
64. Biqiong R, Fengwei L, Fei X, Junyu H, Haowen Z, Guoying Z. Is plasma cell-free DNA really a useful marker for diagnosis and treatment of trauma patients? *Clin Chim Acta*. 2013. 424:109-13. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.015. Epub 2013 Jun 2.

65. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, et al. Donor-derived cell-free DNA is a novel universal biomarker for allograft rejection in solid organ transplantation. *Transplant. Proc.* 2015; 47, 2400–2403. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.08.035.
66. Schneck E, Samara O, Koch C, Hecker A, Padberg W, Lichtenstern C, et al. Plasma DNA and RNA differentially impact coagulation during abdominal sepsis-an explorative study. *J Surg Res.* 2017;210:231-43.
67. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, Varpula M, Karlsson S, Ruokonen E, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem.* 2008;54(6):1000-7.
68. Hou YQ, Liang DY, Lou XL, Zhang M, Zhang ZH, Zhang LR. Branched DNA-based Alu quantitative assay for cell-free plasma DNA levels in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *J Crit Care.* 2016;31(1):90-5.
69. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10(2):R60.
70. Huang T, Yang Z, Chen S, Chen J. [Predictive value of plasma cell-free DNA for prognosis of sepsis]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2018;30(10):925-8.
71. Prkno A, Wacker C, Brunkhorst FM, Schlattmann P. Procalcitonin-guided therapy in intensive care unit patients with severe sepsis and septic shock--a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2013;17(6):R291.
72. Brodská H, Malíčková K, Adámková V, Benáková H, Šťastná MM, Zima T. Significantly higher procalcitonin levels could differentiate Gram-negative sepsis from Gram-positive and fungal sepsis. *Clin Exp Med.* 2013;13(3):165-70.
73. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(4):342-7.
74. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
75. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *Bmj.* 2021;372:n160.
76. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-75.
77. GA Wells BS, D O'Connell, J Peterson, V Welch, M Losos, P Tugwell. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses: The Ottawa Hospital Research Institute; [Available from: [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp).
78. Patra J, Bhatia M, Suraweera W, Morris SK, Patra C, Gupta PC, et al. Exposure to second-hand smoke and the risk of tuberculosis in children and adults: a systematic review and meta-analysis of 18 observational studies. *PLoS Med.* 2015;12(6):e1001835; discussion e.
79. Chen Q, Ye L, Jin Y, Zhang N, Lou T, Qiu Z, et al. Circulating nucleosomes as a predictor of sepsis and organ dysfunction in critically ill patients. *Int J Infect Dis.* 2012;16(7):e558-64.
80. Hartung J, Knapp G, Sinha BK. *Statistical Meta-Analysis with Application.* Wiley, New Jersey 2008.
81. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Cochrane Book Series.*2008.
82. Abdelaal AA, Elghobary HAF, Ibrahiem SK, Sleem HM. Cell free DNA concentration and serum leptin level as predictors of mortality in a sample of septic Egyptian children. *J Crit Care.* 2018;44:124-7.
83. Lenz M, Maiberger T, Armbrust L, Kiwit A, Von der Wense A, Reinshagen K, et al. cfDNA and DNases: New Biomarkers of Sepsis in Preterm Neonates-A Pilot Study. *Cells.* 2022;11(2).
84. Nguyen DN, Stensballe A, Lai JC, Jiang P, Brunse A, Li Y, et al. Elevated levels of circulating cell-free DNA and neutrophil proteins are associated with neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis in immature mice, pigs and infants. *Innate Immun.* 2017;23(6):524-36.

85. Stiel CU, Ebenebe CU, Trochimiuk M, Pagarols Raluy L, Vincent D, Singer D, et al. Markers of NETosis Do Not Predict Neonatal Early Onset Sepsis: A Pilot Study. *Front Pediatr*. 2019;7:555.
86. McHugh ML. The chi-square test of independence. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23(2):143-9.
87. Higgins J, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page M, et al. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 2022* [6.3:Available from: [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook)].
88. Rannikko J, Seiskari T, Huttunen R, Tarkiainen I, Jylhävä J, Hurme M, et al. Plasma cell-free DNA and qSOFA score predict 7-day mortality in 481 emergency department bacteraemia patients. *J Intern Med*. 2018;284(4):418-26.
89. Xia DL, Zhang H, Luo QL, Zhang AF, Zhu LX. Cell-free DNA increase over first 48 hours in emergency intensive care unit predicts fatal outcome in patients with shock. *J Int Med Res*. 2016;44(5):1002-12.
90. Jing Q, Leung CHC, Wu AR. Cell-Free DNA as Biomarker for Sepsis by Integration of Microbial and Host Information. *Clin Chem*. 2022;68(9):1184-95.
91. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Bmj*. 1997;315(7109):629-34.
92. Huttunen R, Kuparinen T, Jylhävä J, Aittoniemi J, Vuento R, Huhtala H, et al. Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2011;6(7):e21700.
93. Duplessis C, Gregory M, Frey K, Bell M, Truong L, Schully K, et al. Evaluating the discriminating capacity of cell death (apoptotic) biomarkers in sepsis. *J Intensive Care*. 2018;6:72.
94. Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, Takenaka N, Gocho T, Huq MA, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care*. 2018;22(1):176.
95. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutiérrez-Pizarra A, López I, Márquez-Vácaro JA, Macher H, et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care*. 2014;18(3):R116.
96. GmbH M. Kovarianzanalyse/ANCOVA 2024 [Available from: <https://www.statistik-nachhilfe.de/ratgeber/statistik/induktive-statistik/statistische-modellbildung-und-weitere-methoden/varianzanalysen/kovarianzanalyse-ancova>].
97. Keller D. Voraussetzungen der Varianzanalyse (ANOVA) <https://statistik-und-beratung.de/2017/05/voraussetzungen-der-anova/2017/> [
98. jamovi. jamovi. (Version 2.4). <https://www.jamovi.org.2023>.
99. Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emerg Med J*. 2017;34(6):357-9.
100. Rump K, Adamzik M. Function of aquaporins in sepsis: a systematic review. *Cell Biosci*. 2018;8:10.
101. Song F, Parekh S, Hooper L, Loke YK, Ryder J, Sutton AJ, et al. Dissemination and publication of research findings: an updated review of related biases. *Health Technol Assess*. 2010;14(8):iii, ix-xi, 1-193.
102. Forsblom E, Aittoniemi J, Ruotsalainen E, Helmijoki V, Huttunen R, Jylhävä J, et al. High cell-free DNA predicts fatal outcome among *Staphylococcus aureus* bacteraemia patients with intensive care unit treatment. *PLoS One*. 2014;9(2):e87741.
103. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, et al. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(4):392-9.
104. Xu F, Tan X, Wang J, Lu S, Ding H, Xue M, et al. Cell-free DNA predicts all-cause mortality of sepsis-induced acute kidney injury. *Ren Fail*. 2024;46(1):2273422.
105. Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, Bamford AL, Bishop JRB, Hazeldine J, et al. Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Ann Surg*. 2017;265(6):1241-9.

106. Urosevic N IT, Grasko J, Lim EM. Evaluation of Clinical Laboratory Methods for Plasma Cell-Free DNA

Analysis in Suspected Septicaemia. *J Med Diagn Meth* 2: 123. 2013.

107. Wijeratne S, Butt A, Burns S, Sherwood K, Boyd O, Swaminathan R. Cell-free plasma DNA as a prognostic marker in intensive treatment unit patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:232-8.

108. Inga Medina D, Annette N, Daniel H. M, Johannes F, Frank D, Frank H. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *plos.org*. 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0166354.

109. Xu Z, Qiao Y, Tu J. Microfluidic Technologies for cfDNA Isolation and Analysis. *Micromachines*. 2019. 10(10), 672; doi: 10.3390/mi10100672.

110. Su YH, Wang M, Block TM, Landt O, Botezatu I, Serdyuk O, et al. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:81-9.

111. Emeraud C, Yilmaz S, Fortineau N, Cuzon G, Dortet L. Quality indicators for blood culture: 1 year of monitoring with BacT/Alert Virtuo at a French hospital. *J Med Microbiol*. 2021;70(3).

112. Das S-Monovette System [Available from: <https://molecular-workflow.sarstedt.com/molecular-biologic-monovette/>].

113. Kearon C, de Wit K, Parpia S, Schulman S, Afilalo M, Hirsch A, et al. Diagnosis of Pulmonary Embolism with d-Dimer Adjusted to Clinical Probability. *N Engl J Med*. 2019;381(22):2125-34.

114. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, et al. Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 2003;349(13):1227-35.

115. Gutiérrez García I, Pérez Cañadas P, Martínez Uriarte J, García Izquierdo O, Angeles Jódar Pérez M, García de Guadiana Romualdo L. D-dimer during pregnancy: establishing trimester-specific reference intervals. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018;78(6):439-42.

116. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods Mol Biol*. 2019;1909:3-12.

117. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem*. 2003;49(4):562-9.

118. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 2003;327(1-2):95-101.

119. Frank MO. Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. *Biol Res Nurs*. 2016;18(5):477-88.

120. Truszevska A, Foroniewicz B, Paćzek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35(2):330-6.

121. Purhonen AK, Juutilainen A, Vänskä M, Lehtikangas M, Lakkisto P, Hämäläinen S, et al. Human plasma cell-free DNA as a predictor of infectious complications of neutropenic fever in hematological patients. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47(4):255-9.

122. Vittori LN, Tarozzi A, Latessa PM. Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities. *Methods Mol Biol*. 2019;1909:183-97.

123. Cushen SC, Sprouse ML, Blessing A, Sun J, Jarvis SS, Okada Y, et al. Cell-free mitochondrial DNA increases in maternal circulation during healthy pregnancy: a prospective, longitudinal study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(2):R445-r52.

## 9 Danksagung

Ich möchte meiner Familie, im Besonderen meinem [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] für die große Unterstützung danken, die sie mir während meines gesamten Studiums waren. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen diese Arbeit studienbegleitend fertig zu stellen. Sie haben mir immer geholfen und mich wissen lassen, dass ich in jeder Angelegenheit zu Ihnen kommen kann. Ein besonderer Dank richtet sich auch an meine Freunde, die mir immer zur Seite stehen, vor allem auch [REDACTED].

Natürlich möchte ich auch meinem Doktorvater [REDACTED] und meinem Betreuer [REDACTED] danken, die mir mit Ihrem Wissen weitergeholfen haben und die Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Ich konnte immer auf eine schnelle Antwort auf meine Fragen zählen und weiß es sehr zu schätzen, dass sie mit mir die Arbeit fertiggestellt haben.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf

The image shows a tabular resume template with 10 rows of redacted content. Each row consists of a short black bar on the left, followed by a longer black bar on the right. The bars are staggered horizontally, creating a stepped effect. The first row has the shortest left bar and the longest right bar. The second row has a slightly longer left bar and a slightly shorter right bar. This pattern continues for the remaining rows, with the left bars increasing in length and the right bars decreasing in length from top to bottom. The overall structure is that of a table with two columns, where the content of both columns is completely obscured by black redaction boxes.