

Aus der  
Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

Analyse der Entwicklung des Mikrobioms von Frühgeborenen (< 32. SSW) im Hinblick auf die Auswirkungen unterschiedlicher empirischer Antibiotikaregime im Rahmen der NeoMuniCH-Studie

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gabriela Eva-Maria Reichard

aus

Neuburg a. d. Donau

2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Ulrich von Both

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Benjamin Misselwitz  
Prof. Dr. Barbara Stecher-Letsch

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Andreas W. Flemmer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2024

---

*Meinen lieben Eltern und meinem lieben Bruder Michael*

## Zusammenfassung

### Hintergrund:

Die medizinische Versorgung von Frühgeborenen verlangt bezüglich Prävention bestimmter Erkrankungen und medizinischer Therapie eine besondere Präzision in der Nutzen-Risiko-Abwägung. Antibiotika gehören zu den am meisten eingesetzten Medikamenten in der Neonatologie. Der empirische Einsatz von Antibiotika in den ersten Lebenswochen bei Frühgeborenen beeinflusst die Entwicklung des Mikrobioms.

Im Rahmen der NeoMuniCH-Studie wurde untersucht, inwieweit sich die beiden Antibiotika-Regime Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam auf die Mikrobiomentwicklung bei Frühgeborenen (< 32. SSW) auswirken. Bei der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe wurde zusätzlich noch untersucht, ob die unterschiedliche Dauer der Wirkstoffgabe Auswirkungen auf das Mikrobiom hat.

### Material und Methoden:

Bei der NeoMuniCH-Studie handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie, die an den beiden Perinatalzentren des LMU Klinikums München von 01/2017 bis 01/2019 durchgeführt wurde. Aufgenommen wurden Frühgeborene, die vor der 32. SSW in einem der beiden Perinatalzentren geboren worden sind und bei denen die Eltern innerhalb von 72h ab Geburt das Einverständnis zur Studienteilnahme gaben. Der Aufbau der Studie gliederte sich in (1) Aufbau einer Stuhlproben-Biobank (2) Aufbau einer Datenbank durch Dokumentation der klinischen Daten (3) Mikrobiomuntersuchung (4) Verarbeitung der Sequenzierdaten und (5) Biostatistische Auswertung.

### Ergebnisse:

Wir konnten zeigen, dass unter Antibiotikatherapie die Abnahme von Shannon und Richness in der 2. Lebenswoche am stärksten ist.

Die PipTaz-Gruppe hatte in den betrachteten Lebenswochen (1/2, 3/4 und 7/8) eine signifikant höhere Richness. Die PipTaz-Gruppe hatte im Beobachtungszeitraum den höheren Shannon-Index mit einem Durchschnittswert von 8.7 im Vergleich zur Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe mit 6.3 ( $p=0.0002$ ).

Bei der Untersuchung der Taxonomie in den beiden Antibiotika-Schemata während des Beobachtungszeitraumes konnten wir eine vergleichbare Dominanz der *Enterobacteriaceae* mit 42.75% (A/C-Gruppe) und 45.60% (P/T-Gruppe) nachweisen. Einen grossen Anteil in beiden Gruppen hatten allerdings auch die *Staphylokokken* und *Enterokokken*. Der Anteil der *Bifidobacteriaceae* war in beiden

Gruppen sehr gering: In der A/C-Gruppe lag der Anteil bei 2.98%, in der P/T-Gruppe bei 1.25%.

Bezüglich Shannon und Richness gab es bezüglich der Antibiotikagabe-Dauer derjenigen Kinder, die ausschliesslich A/C erhielten, im Gesamtbeobachtungszeitraum keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0.05$ ).

Unabhängig von der Dauer der Antibiotika-Gabe in der A/C-Gruppe konnte gezeigt werden, dass in den ersten 4 Lebenswochen *Enterobacteriaceae* und *Staphylococcaceae* die dominanten Gruppen im Mikrobiom waren. Ausschliesslich in Woche 1 zeigte die 3 Tage-Gruppe eine andere Dominanz (*Staphylococcaceae*) als die 4/5 und 6+ Tage-Gruppe (*Enterobacteriaceae*). In den weiteren Wochen war die Dominanz gleich mit *Staphylokokken* in Woche 2 und *Enterobacteriaceae* in Woche 3/4.

Wir konnten herausarbeiten, dass in der Gruppe, die ausschliesslich mit PipTaz behandelt wurde der grössere Anteil der Stuhlproben in der *Proteobacteriaceae*-Dominanzgruppe lag, bei der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe war der Anteil der Stuhlproben in der *Firmicutes*- und *Proteobacteriaceae*-Dominanzgruppe ungefähr gleich gross.

### **Schlussfolgerung:**

In dieser Studie wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Antibiotikaregime Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam auf das Mikrobiom von Frühgeborenen < 32. Schwangerschaftswoche analysiert und mit den aktuellen Forschungsergebnissen verglichen.

Unsere Studie konnte zeigen, dass die P/T-Gruppe eine signifikant höhere Richness und einen höheren Shannon-Index im Vergleich zur A/C-Gruppe aufwies. Wir konnten zeigen, dass unabhängig von den Antibiotika-Regimen potentiell pathogene Bakterien eine Dominanz im Mikrobiom zeigten.

Der Einsatz und die Gabe der Wirkstoffe ist stets unter Nutzen-Risiko-Abwägung täglich neu zu hinterfragen, nach dem Ziel: Beware antibiotics!

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
1.1 Das Frühgeborene.....	12
1.1.1 Definition der Frühgeburt.....	12
1.1.1.1 Definition nach dem Geburtsgewicht .....	12
1.1.1.2 Definition nach dem Gestationsalter .....	12
1.1.1.3 Definition nach dem Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter .....	13
1.2 Frühgeburtenrate in Deutschland .....	13
1.3 Risikofaktoren für eine Frühgeburt .....	16
1.4 Konsequenzen der Frühgeburt.....	17
1.4.1 Konsequenzen für das Kind.....	17
1.4.2 Konsequenzen für das Gesundheitssystem .....	18
1.5 Das Mikrobiom .....	19
1.5.1 Definition im medizinhistorischen Kontext .....	19
1.5.2 Aktueller Stand in der Mikrobiomforschung .....	20
1.5.3 Übersicht der Bakterien .....	21
1.5.3.1 Einteilung nach Bakterienstämmen.....	21
1.5.3.2 Einteilung nach Milieu .....	21
1.5.4 Das gesunde Mikrobiom.....	22
1.5.4.1 Definition und Aufgaben eines gesunden Mikrobioms.....	22
1.5.4.2 Einflussfaktoren auf die Mikrobiomentwicklung ...	23
1.5.4.3 Entwicklungsphasen eines gesunden Mikrobioms24	
1.5.4.3.1 Phase 1: Erste bakterielle Inokulation .....	24
1.5.4.3.2 Phase 2: Bakterielle Ansiedelung und Stabilisierung der Darmflora.....	25
1.5.4.3.3 Phase 3: Veränderung der Bakterien- population.....	26
1.5.4.3.4 Phase 4: Anpassung des Mikrobioms in Richtung Erwachsenenmikrobiom.....	26
1.5.5 Mikrobiomentwicklung beim Frühgeborenen .....	26
1.5.5.1 Mikrobiommuster bei Frühgeborenen .....	27
1.5.5.2 Gründe für diesen Unterschied .....	28
1.5.5.3 Auswirkungen .....	29
1.5.5.3.1 Kurzfristige Folgen .....	29

1.5.5.3.2	Langfristige Folgen.....	30
1.5.6	Mikrobiom bei Frühgeborenen unter empirischer Antibiotika-Therapie.....	32
1.5.6.1	Indikationen für empirische Antibiotika-Therapie bei Frühgeborenen .....	32
1.5.6.2	Häufiges Erregerspektrum bei Frühgeborenen ....	33
1.5.6.3	Häufige Antibiotika-Schemata bei Frühgeborenen .....	33
1.5.6.3.1	Ampicillin + Cefotaxim.....	33
1.5.6.3.2	Piperacillin/Tazobactam .....	34
1.5.6.4	Auswirkungen der empirischen Antibiotika-Therapie auf das Mikrobiom.....	34
1.5.6.4.1	Veränderungen des Mikrobiommusters durch verschiedene Antibiotika .....	34
1.5.6.4.2	Veränderungen des Mikrobiommusters aufgrund der Therapiedauer.....	35
1.5.6.5	Antibiotikaschema am Dr. von Hauner'schen Kinderspital .....	35
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>37</b>
2.1	Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission .....	37
2.2	Studienaufbau .....	37
2.2.1	Studiendesign.....	37
2.2.2	Studienzentrum .....	38
2.2.3	Patientenkollektiv.....	38
2.3	Abnahme der Stuhlproben und Aufbau der Biobank .....	39
2.4	Erhebung und Dokumentation der klinischen Daten .....	40
2.5	Analyse des Mikrobioms.....	42
2.6	Verarbeitung Sequenzierdaten.....	44
2.7	Biostatistische Auswertung.....	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Kohortenbeschreibung .....	49
3.2	Aufteilung der Studienkohorte nach Antibiotika .....	50
3.3	Deskriptive Statistik .....	51
3.3.1	Studienort .....	52
3.3.2	Geburtsgewicht und Gestationsalter.....	52
3.3.3	Dauer der Gabe der einzelnen Antibiotika-Wirkstoffe.....	53
3.3.4	Gesamtdauer der Gabe der betrachteten Antibiotika- Schemata .....	54
3.3.5	Verteilung der vorhandenen Stuhlproben auf die Lebens- wochen .....	55
3.4	Richness und Shannon in Abhängigkeit der Lebenswochen.....	56

3.4.1	Darstellung im Gesamtbeobachtungszeitraum.....	56
3.4.2	Darstellung anhand einzelner Lebenswochen.....	58
3.5	Shannon-Index in Abhängigkeit der Antibiotika-Gruppen.....	61
3.6	Taxonomie der Bakterienstämme in Abhängigkeit von zwei verschiedenen Antibiotika-Schemata .....	62
3.6.1	Taxonomie in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe.....	62
3.6.2	Taxonomie in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe.....	63
3.7	Einzelfallbetrachtungen mit gegenläufigem Trend.....	64
3.8	Auswirkungen der Gesamtdauer der Antibiotikagabe beim Schema Ampicillin/Cefotaxim auf Shannon und Richness .....	68
3.8.1	Shannon Index und Richness im Gesamtbeobachtungs- zeitraum.....	68
3.8.2	Shannon Index und Richness anhand einzelner Lebens- wochen .....	70
3.9	Taxonomie der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe in Abhängigkeit von Lebenswoche und Gesamtdauer der Antibiotika-Gabe .....	72
3.9.1	Lebenswoche 1 .....	73
3.9.1.1	Gruppe 3d.....	73
3.9.1.2	Gruppe 4/5d.....	73
3.9.1.3	Gruppe 6 plus .....	73
3.9.2	Lebenswoche 2 .....	74
3.9.2.1	3d Gruppe.....	74
3.9.2.2	4/5d Gruppe.....	75
3.9.2.3	6plus Gruppe .....	75
3.9.3	Lebenswoche 3 .....	76
3.9.3.1	Gruppe 3d.....	76
3.9.3.2	Gruppe 4/5d.....	76
3.9.3.3	Gruppe 6plus .....	76
3.9.4	Lebenswoche 4 .....	77
3.9.4.1	Gruppe 3d.....	77
3.9.4.2	Gruppe 4/5d.....	77
3.9.4.3	Gruppe 6plus .....	78
3.9.5	Zusammenfassung.....	79
3.10	Der phylogenetische Baum .....	79
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
4.1	Interpretation der Ergebnisse unter Einbindung in die aktuelle Forschung .....	82
4.2	Stärken der Studie.....	86
4.3	Schwächen der Studie.....	87
4.4	Ausblick .....	87
4.5	Ableitung für den Klinikalltag .....	88



---

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
<b>Affidavit.....</b>	<b>103</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>104</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGA	Appropriate for Gestational Age
Ampi/Cefo bzw. Amp/Cef	Ampicillin/Cefotaxim
APGAR	Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe
aPPT	activated partial-thromboplastin time
ART	arteriell
CAP	capillary blood
CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
CPAP	Continuous positive airway pressure
CrP	C-reaktives Protein
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DRG	Diagnosis Related Groups
EBM	Expressed Breast Milk
E.coli	Escherichia coli
EOS	Early-Onset-Sepsis
FFP	Fresh-Frozen-Plasma
(g)DNA	(genomic) deoxyribonucleic acid
GH	Grosshadern
HMO	Humane Milch-Oligosaccharide
HFOV	High Frequency Oscillation Ventilation
IgE	Immunglobuline E
IgG	Immunglobuline G
IMNG	IntegratetMicrobialNextGenerationSequencing
INN	Innenstadt
IVAB	Intravenous antibiotics
KUM	Klinikum der Universität München
LGA	Large for Gestational Age
LL	wurde als „peripherer Zugang“ gewertet
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

---

LOS	Late-Onset-Sepsis
M.Sc.	Master of Science
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NGS	Next-Generation-Sequencing
NGT	Nasogastric Tube (feeding)
NP oxygen	Nasopharyngeal oxygen
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NVD	Normal vaginal delivery
OGT	Orogastric Tube (feeding)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVPP	Poly-Vinylpolypyrrolidon
Pip/Taz	Piperacillin/Tazobactam
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of the mean
SGA	Small for Gestational Age
SP.	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche
SVIA	Spontaneously Ventilating In Air
TPN	Total Parenteral Nutrition
UAC	Umbilical Arterial Catheter
UVC	Umbilical Venous Catheter
VLBW	Very low birth weight infant
VEN	venös
WCC	White Cell Count
(Z)OTU	(Zero Radius) Operational Taxonomic Unit

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Frühgeborene

Das Frühgeborene steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Um den Kontext der durchgeführten Studie in seiner Ganzheit besser fassen zu können, wird die Frühgeburt zu Beginn definiert:

### 1.1.1 Definition der Frühgeburt

In den 1950er Jahren forderte die *Expertengruppe zum Thema Frühgeburt* der Weltgesundheitsorganisation in Genf eine einheitliche Klassifikation der Frühgeborenen, um auf internationaler Ebene eine Frühgeburten-assoziierte Versorgung zu gewährleisten und dadurch die neonatale Mortalität zu senken [1]:

#### 1.1.1.1 Definition nach dem Geburtsgewicht

In Genf wurde die Frühgeburt überwiegend in Assoziation mit dem Geburtsgewicht gebracht: Kinder mit einem Geburtsgewicht  $\leq 2500$  Gramm wurden als Frühgeborene bezeichnet [1]. Basierend auf dieser Definition kam es im Laufe der Zeit zu weiteren gewichtsbezogenen Einteilungen der Frühgeborenen:

Geburtsgewicht in Gramm	Bezeichnung
< 2500g	Kind mit <b>niedrigem</b> Geburtsgewicht
<1500g	Kind mit <b>sehr niedrigem</b> Geburtsgewicht
<1000g	Kind mit <b>extrem niedrigem</b> Geburtsgewicht

Tab. 1: Einteilung der Frühgeborenen nach Geburtsgewicht, in Anlehnung an [2].

#### 1.1.1.2 Definition nach dem Gestationsalter

Bei der Definition nach dem Gestationsalter rückt - ausgedrückt in Schwangerschaftswochen [3] – die Organreifebeurteilung des Kindes in den Vordergrund [2].

Die Weltgesundheitsorganisation greift derzeit auf diese Definitionsart zurück und definiert ein Frühgeborenes als ein Kind, das vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche lebend geboren wird [4]. Im Laufe der Jahre kam es auch bei dieser Definition zu weiteren Subgruppen:

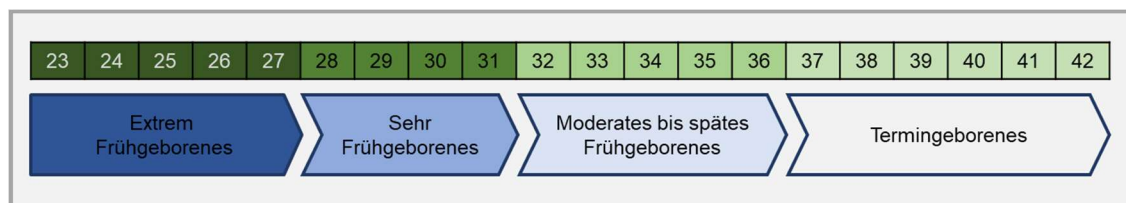


Abb. 1: Einteilung der Frühgeburt nach Gestationsalter, in Anlehnung an [2, 4, 5].

### 1.1.1.3 Definition nach dem Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter

Speer erweitert die oben genannten Definitionen der Frühgeburt und teilt diese anhand des Kriteriums Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter in Form von Perzentilen ein [2]:

Geburtsgewicht auf Perzentile	Bezeichnung
Geburtsgewicht < 10. Perzentile	<b>Hypotrophes</b> Neugeborenes „small for gestational age“ ( <b>SGA</b> )
Geburtsgewicht 10.-90. Perzentile	<b>Eutrophes</b> Neugeborenes „appropriate for gestational age“ ( <b>AGA</b> )
Geburtsgewicht > 90. Perzentile	<b>Hypertrophes</b> Neugeborenes „large for gestational age“ ( <b>LGA</b> )

Tab. 2: Einteilung der Frühgeburt nach Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter, in Anlehnung an [2].

## 1.2 Frühgeburtenrate in Deutschland

Die Frühgeburtenrate in Europa liegt im internationalen Vergleich in der unteren Zone [6]. Dennoch muss betont werden, dass Deutschland europaweit mit 8,5% im oberen Bereich liegt [7, 8], im Sektor Frühgeburten <32. SSW mit 1,3% sogar zu den führenden Ländern zählt [8]:

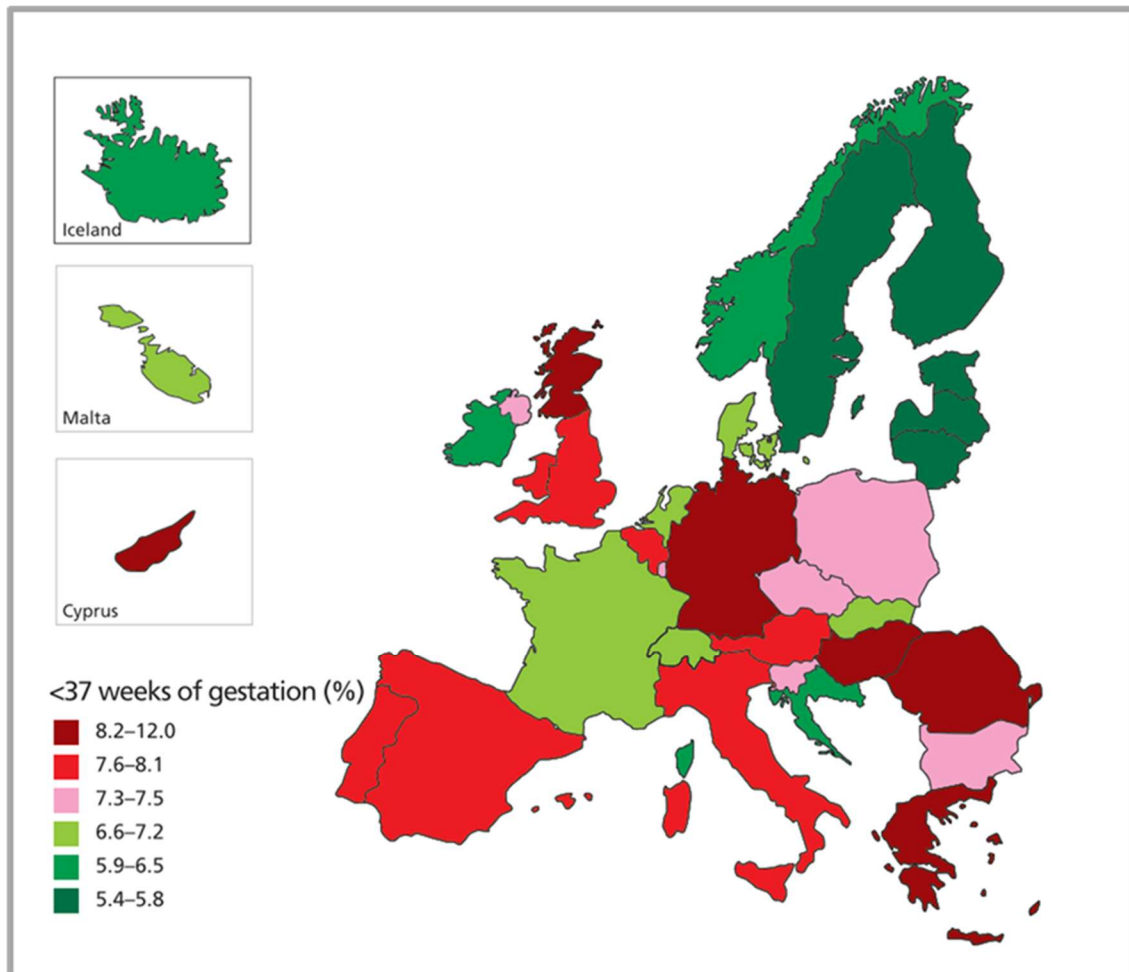


Abb. 2: Geographische Verteilung der Frühgeburten unter Lebendgeborenen in Europa [8]. Mit freundlicher Genehmigung der Verwendung der Grafik durch EuroPersitat.

2018 lag die Geburtenzahl in Deutschland bei 768.458 Kindern (einschließlich der Totgeburten): 64.417 Kinder wurden vor der vollendeten 37. SSW geboren. [9] Das bedeutet, dass fast jedes 12. Kind in Deutschland unter die Rubrik „Frühgeborenes“ fällt.

Die nachfolgende Grafik zeigt, dass in Deutschland 2018 der größte Teil der Frühgeborenen (8.4%) in die Gruppe der *moderaten bis späten Frühgeborenen* (32.-36. SSW) fällt (6.94%). 0,86% der Frühgeborenen werden in der 28.-31. SSW geboren. Obwohl die *extremen Frühgeborenen* (< 28. SSW) den geringsten Anteil in Deutschland mit 0,58% ausmachen, darf diese Zahl nicht vernachlässigt werden. [9]

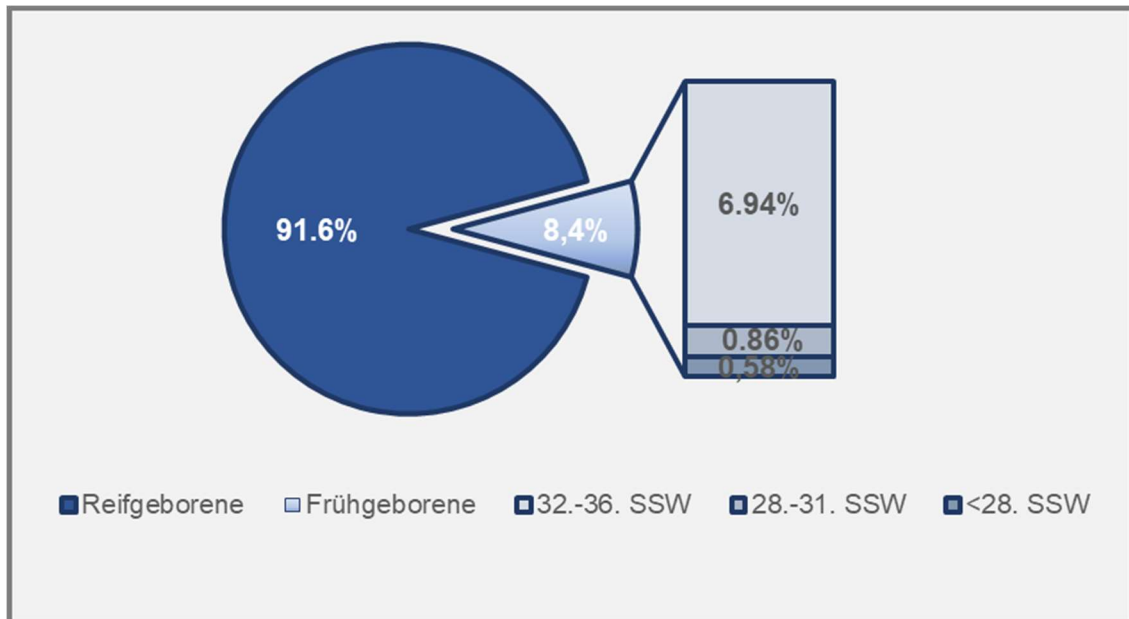


Abb. 3: Anteil der Frühgeburten – definiert nach Gestationsalter – an Geburtenzahl in Deutschland in 2018, in Anlehnung an [9, 10].

Bezieht man sich auf die Verteilung der Frühgeburten anhand des Geburtsgewichtes, so ergeben sich folgende Zahlen:

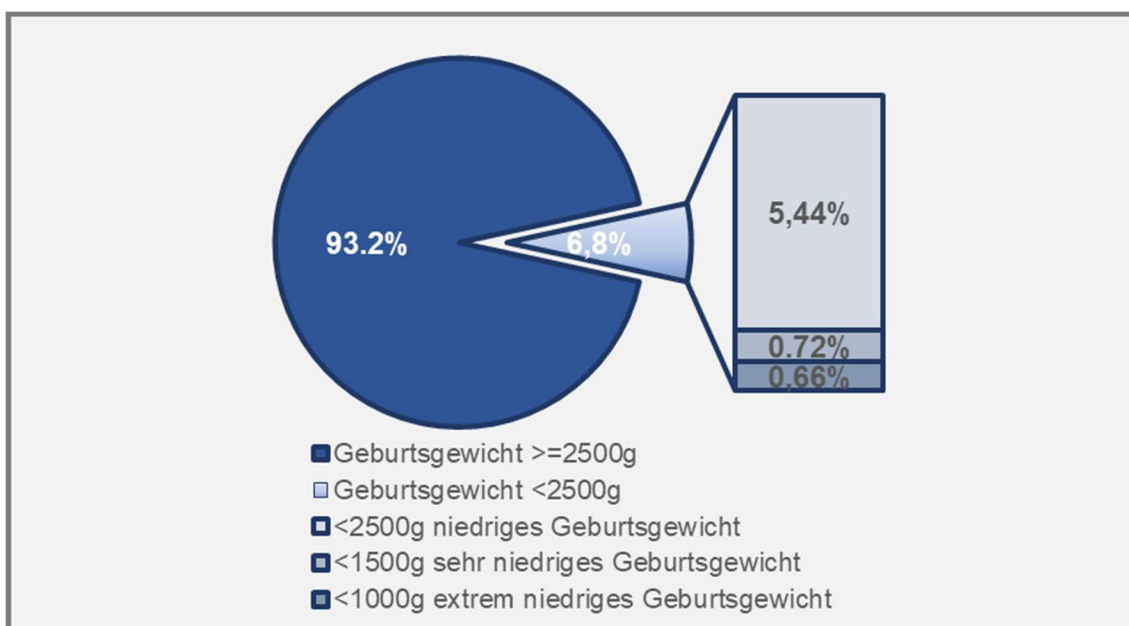


Abb. 4: Anteil der Frühgeburten – definiert nach Geburtsgewicht – an der Gesamt-Geburtenzahl in Deutschland in 2018, in Anlehnung an [9, 11].

Insgesamt sind 6,8% der Kinder im Jahre 2018 in Deutschland mit einem Geburtsgewicht  $< 2500\text{g}$  auf die Welt gekommen. Der größte Anteil fällt in die Gruppe der Kinder mit *niedrigem Geburtsgewicht* ( $< 2500\text{g}$ ) mit 5.44%. Der Anteil der Kinder mit *sehr niedrigem Geburtsgewicht* ( $< 1500\text{g}$ ) bzw. *extrem niedrigem*

*Geburtsgewicht* (< 1000g) Geburtsgewicht unterschieden sich nur gering: 0,72% bzw. 0,66%. [9]

### 1.3 Risikofaktoren für eine Frühgeburt

Xue et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass einer Frühgeburt einer von 3 Hauptgründen zugrunde liegt:

- (1) Medizinische (maternale +/- kindliche) Indikation,
- (2) spontane Wehentätigkeit mit intakter Fruchtblase,
- (3) vorzeitiger Blasensprung.

Mit 49,3% stellte eine vorliegende medizinische Indikation die dominierende Gruppe für eine Frühgeburt dar. [12]

Im Folgenden werden einige Risikofaktoren dargestellt, die dazu beitragen, dass das Auftreten einer der oben genannten Gründe begünstigt wird:

Der Trend – vor allem in den Industrieländern - geht in Richtung *hohes Alter der Mutter bei Geburt* [13, 14]. Das fortgeschrittene Alter der Mutter – definiert als  $\geq 35$  Jahre [14] – ist ein hoher Risikofaktor für eine Frühgeburt: Laopaiboon et al. zeigten, dass bei einigen Müttern mit einem Alter von 35 Jahren das Risiko für eine Frühgeburt im Vergleich zur Altersgruppe der 20-34-jährigen Mütter signifikant erhöht war [14]. Voigt et al. konnten sogar aufzeigen, dass ab einem mütterlichen Alter von 33 Jahren die Frühgeborenenrate kontinuierlich zunahm [15].

Mit zunehmendem Alter der Mutter sinkt auch deren Fertilität: Nach Eijkemans et al. nimmt der Verlust der Fertilität bis zum 40. Lebensjahr einen langsamen Verlauf, danach ist die Abnahme rasant und unaufhaltsam und verzeichnet im 45. Lebensjahr einen 90%igen Verlust [16]. Dieser Aspekt trägt zu einer erhöhten Rate der in Anspruch genommenen *Infertilitätsbehandlungen* bei [17, 18]. Nach Goldenberg et al. liegt in der durch diese Behandlungen provozierten Mehrlingsgeburt ein weiterer Grund für die steigenden Zahlen der Frühgeburten [19].

*Mehrlingsschwangerschaften* tragen signifikant zu einem erhöhten Aufkommen von Frühgeburten bei: 54% der Zwillingsgeburten waren Frühgeburten [20]. Auch hier spielt das Alter der Mutter eine entscheidende Rolle: Mütter über 35 haben per se eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Mehrlingsschwangerschaft [17].



Hatte eine Schwangere bereits *in der Vergangenheit eine Frühgeburt*, besteht ein bis zu 2,5-faches Risiko einer verfrühten Entbindung für die nachfolgende Schwangerschaft [21].

Weitere Risikofaktoren für eine Frühgeburt werden in nachfolgender Abbildung aufgezeigt:

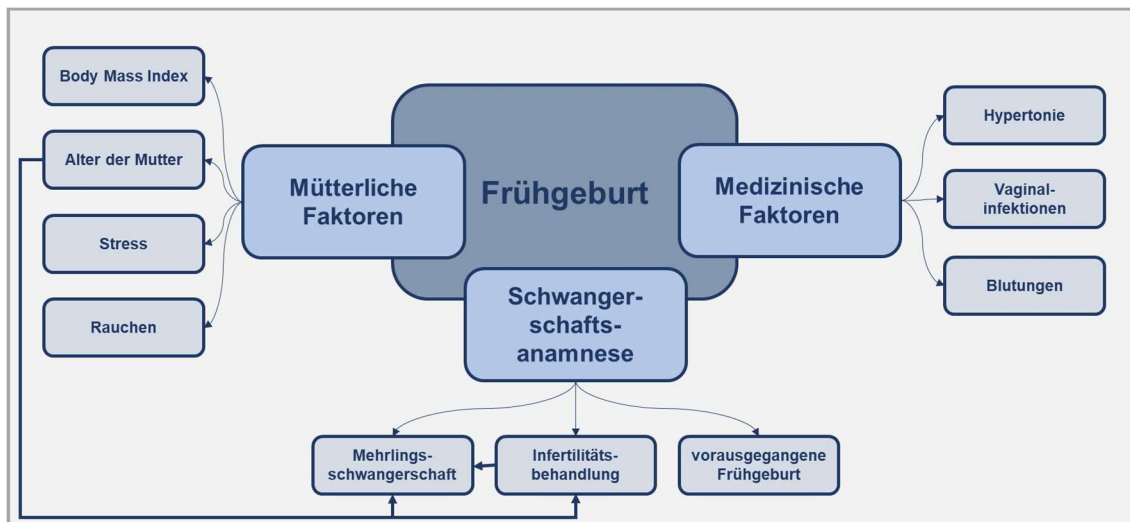


Abb. 5: Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit, in Anlehnung an [22].

## 1.4 Konsequenzen der Frühgeburt

Die Frühgeburt hat sowohl für das Kind als auch für das Gesundheitssystem weitreichende Folgen:

### 1.4.1 Konsequenzen für das Kind

Mit der Geburt ist das Kind auf die Organfunktionen (v. a. Lunge, Magen-Darm-Trakt und Infektabwehr) angewiesen, um extrauterin überleben zu können [23].

Durch die frühzeitige Geburt wird der Prozess der Organreifung unterbrochen, sodass die einzelnen Organsysteme für das extrauterine Überleben nicht vollständig funktionsfähig sind [24]. Dies widerspiegelt sich in dem Auftreten Frühgeburten-assoziiierter Erkrankungen verschiedenster Organsysteme [25].

Die Frühgeburt erhöht jedoch nicht nur die perinatale (Lebenstag 0-27) [26] Mortalität, sondern hat auch einen Einfluss auf die lebenslange Morbidität der Kinder [22]: Goldenberg et al. [19] und Weichert et al. [27] verweisen mit ihrer Aussage, dass Frühgeburten bis zu 75% zur perinatalen Mortalität und mehr als die Hälfte zur Langzeitmorbidität beitragen, auf eine Arbeit von McCormick [26].

Bezogen auf Deutschland liegen nach Angaben des *Instituts für Qualität und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG)* im Jahr 2017 folgende Zahlen für die perinatale Mortalitätsrate vor:

Reifealter in SSW	Perinatale Mortalitätsrate
< 28. SSW	33,43%
28.-31. SSW	8,01%
32.-36. SSW	1,62%
Reifgeborene	0,13%

Tab. 3: Perinatale Mortalitätsrate in Abhängigkeit des Reifealters im Jahr 2017 in Deutschland, in Anlehnung an [9].

### 1.4.2 Konsequenzen für das Gesundheitssystem

Je nach Reifealter des Kindes müssen vermehrt medizinische Unterstützungsmöglichkeiten hinzugezogen werden, um die Unreife der Organe zu kompensieren und das Kind bei den überlebensnotwendigen Organfunktionen zu unterstützen [24, 28]. Der Faktor Frühgeburt hat daher einen großen Stellenwert in der Belastungsrechnung des Gesundheitssystems [6], und wird als „Public-Health-Problem“ bezeichnet [22].

Verlängerte Krankenhausaufenthalte [29] und die damit verbundene intensive Versorgung der zu früh geborenen Kinder belasten das System [30]: Kirschner et al. nennen als groben Schätzwert einen Kostenmehrwert von 10.553 Euro/Fall auf DRG-Basis, wenn man die Leistungen an Frühgeborenen den Leistungen an Reifgeborenen in Niedersachsen vor, während und nach der Geburt (nur 1. und 2. Lebenstag berücksichtigt) gegenüberstellt [31].

Doch der Kostenfaktor endet nicht mit Entlassung des Kindes. Häufige Re-hospitalisierungen, ambulante Versorgungen und Arztbesuche innerhalb des ersten Jahres setzen den erhöhten Kostenaufwand von Frühgeborenen fort [30]. Die Belastungen gehen in vielen Fällen sogar lebenslang weiter.

Die finanzielle Belastung für Gesellschaft durch die Frühgeburten wird in Deutschland auf 735 Millionen Euro pro Jahr geschätzt [31].

Dieses Kapitel zeigt auf, dass Studien, die neue Erkenntnisse bezüglich der medizinischen Versorgung von Frühgeborenen schaffen, insgesamt sowie im deutschsprachigen Raum von großer Bedeutung sind. Es kann nicht nur eine große Patientenpopulation von neuen Erkenntnissen profitieren, auch das Gesundheitssystem kann finanziell entlastet werden. Die NeoMuniCH-Studie leistet daher einen weiteren wichtigen Beitrag, neue Erkenntnisse in Bezug auf die antibiotische Behandlung von Frühgeborenen zu erlangen.

## 1.5 Das Mikrobiom

Aus dem letzten Kapitel wird ersichtlich, dass die Frühgeburt für das Kind und das Gesundheitssystem in Deutschland belastende Konsequenzen bringt. Es ist von entscheidender Bedeutung, die medizinische Versorgung dieser kleinen Patienten in jeglicher Hinsicht kritisch zu prüfen und stets zu verbessern, denn die Pathologie des Frühgeborenen lässt sich als „Wechselspiel von Morphologie der Organunreife und Therapie sowie deren Primär- und Sekundärfolgen“ [24] darstellen.

Mit dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk im Kontext der Aktualität auf das Mikrobiom gelegt. Durch neue Erkenntnisse in diesem jungen Forschungsfeld können möglicherweise neue Ansätze aufgezeigt werden, die die Therapie des Kindes in Richtung besseres Outcome lenken.

### 1.5.1 Definition im medizinhistorischen Kontext

Sucht man in der Literatur nach den Ursprüngen des Begriffs *Mikrobiom*, so findet man diese im Jahre 1988, aufgegriffen von Whipps, Lewis und Cook [32]: Dem Mikrobiom werden hierbei 3 Schlagwörter zugeordnet:

- (1) Charakteristische *mikrobielle Gemeinschaft*,
- (2) welche einen bestimmten *definierten Lebensraum* besetzt und
- (3) *darin aktiv* ist. [33]

Joshua Lederberg, der für seine Arbeit an der genetischen Mutation von Bakterien einen Nobelpreis erhielt [34], ging noch einen Schritt weiter und setzte bei seiner Definition von Mikrobiom die genetische Information der Mikroorganismen in den Mittelpunkt und forderte durch die Integration der Mikrobiota-Gene ins menschliche Genom eine ganzheitliche Betrachtungsweise [35]. Mittlerweile spricht man von einem Verhältnis Genom Mensch zu Genom Mikrobiom von 1:10.000 [36].

Streng genommen muss von der Definition des *Mikrobioms*, welche den genetischen Aspekt betont [37], der Begriff *Mikrobiota* getrennt werden. Hierunter versteht man nur die Gesamtheit aller Mikroorganismen (Bakterien, Archaea, Eukaryonten und Viren), die einen bestimmten Lebensraum beherbergen. [37, 38] Beide Begriffe werden jedoch in der Literatur synonym verwendet [32], so auch in dieser Arbeit. In den Hauptfokus dieser Arbeit rückt die Betrachtung der bakteriellen intestinalen Mikroorganismen.

### 1.5.2 Aktueller Stand in der Mikrobiomforschung

Mit seinem Werk „Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung“ kann der Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911), der ebenfalls am Dr. von Haunerschen Kinderspital wirkte und an der LMU habilitierte, als einer der Pioniere der Mikrobiomforschung bei Säuglingen gesehen werden [32, 39, 40].

Mit dem Ablösen der kulturellen Nachweismethoden bestimmter Mikroorganismen durch die Einführung neuer Analysetechniken in den 1980er Jahren erlebt die Mikrobiomforschung ihren Aufschwung [35]: Die Einführung des Next-Generation-Sequencing als Analysemethode hat es ermöglicht, Einblick in die „Black Box“ der Mikrobiota-Welt zu erhalten und deren Verhalten und Wachstum annähernd zu verstehen [41]. Die Wissenschaft zeigt über die Jahre gesehen wachsendes Interesse, mehr Erkenntnisse in diesem Forschungsbereich zu erlangen. Der nachgewiesene Einfluss eines intakten Mikrobioms auf gesundheitserhaltende Vorgänge im Körper, geben mittlerweile dem Mikrobiom den Begriff des *Superorgans* [35].

Die steigende Anzahl von Publikationen zu dem Thema Mikrobiom widerspiegelt das große Interesse der Forschung [32]. Betrachtet man allerdings die Anzahl der Gesamtpublikationen zum Thema Mikrobiom und Frühgeborene, so kann man erkennen, dass für diese Konstellation weiterhin sehr viel Forschungsbedarf besteht:

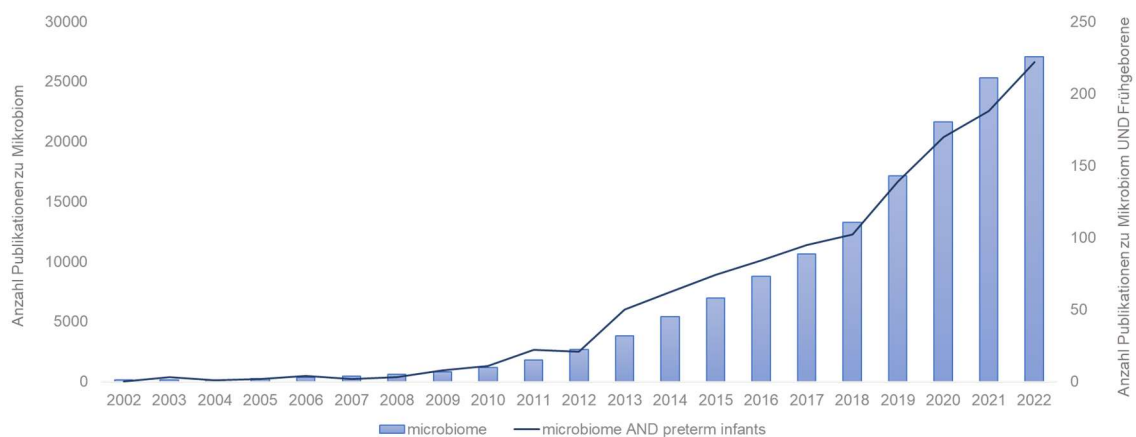


Abb. 6: Gegenüberstellung der Pubmed-Publikationen zu den Begriffen microbiome bzw. microbiome AND preterm infants (2002-2022) , Stand: 11.02.2023, in Anlehnung an [32].

### 1.5.3 Übersicht der Bakterien

#### 1.5.3.1 Einteilung nach Bakterienstämmen

Die folgende Einteilung dient als Übersicht zur besseren Einordnung der in dieser Arbeit dominierenden Bakterien. Es ist zu betonen, dass diese nicht vollständig alle Bakterien abfassen kann, sondern sich lediglich auf die dominierenden und meist genannten beschränkt.

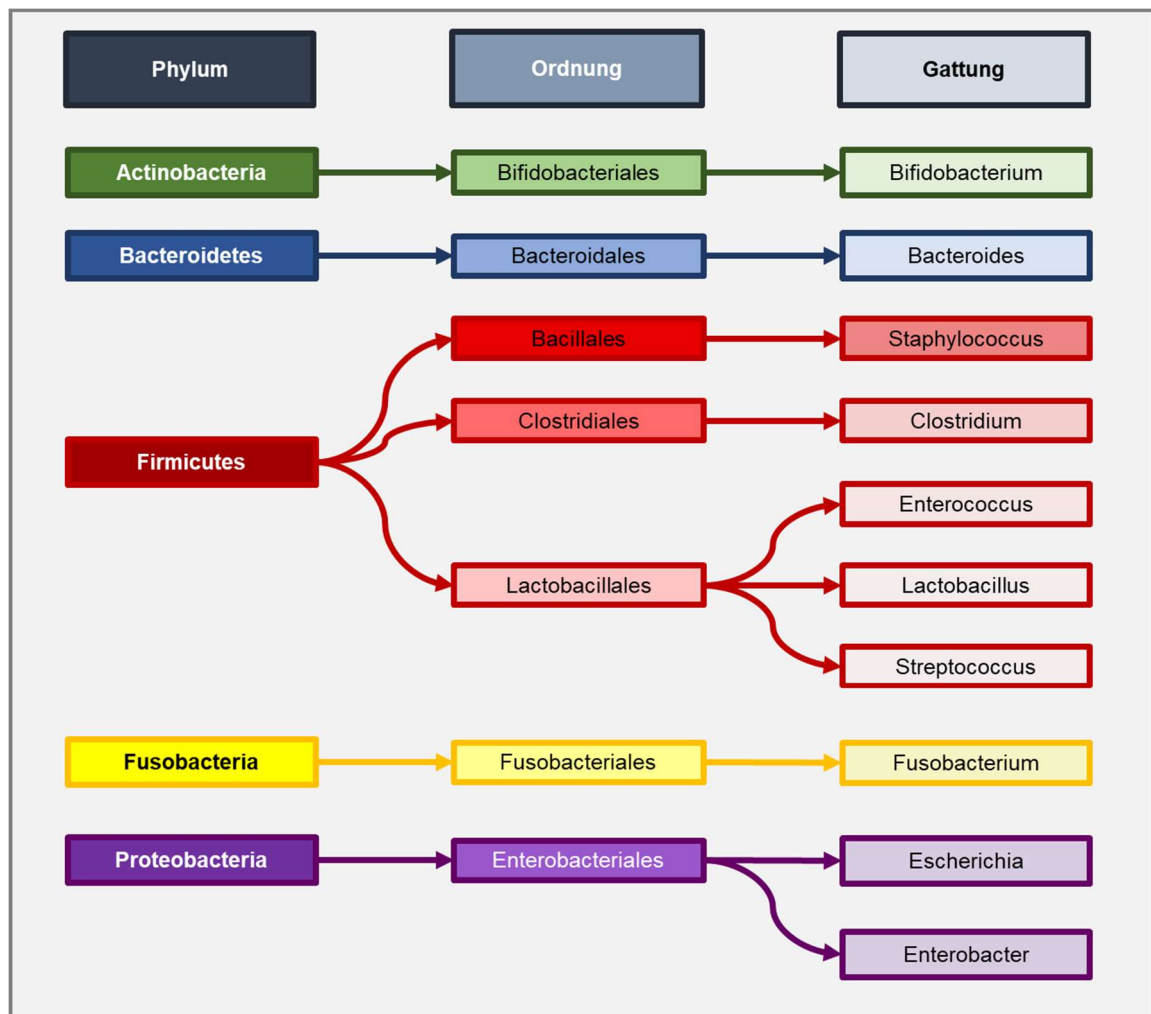


Abb. 7: Mikrobiota-Gattungen im Gastrointestinaltrakt, in Anlehnung an [35, 42].

#### 1.5.3.2 Einteilung nach Milieu

Einige Bakterien sind in ihrem Wachstum bzw. ihrer Überlebensfähigkeit von der An- (aerobe/fakultativ-anaerobe Bakterien) bzw. Abwesenheit (anaerobe Bakterien) von Sauerstoff abhängig:

Anfangsphase: Aerobe/fakultativ-anaerobe Bakterien	Entwicklungsphase: Anaerobe Bakterien
Enterobacteria	Bacteroides
Streptococci/Enterococci	Bifidobacteria
Staphylococci	Clostridia
Lactobacilli [42]	Lactobacilli [43-44]
	Fusobacteria

Tab. 4: Häufige aerobe/fakultativ-anaerobe und anaerobe Bakterienstämme in fetalen Stuhlproben, in Anlehnung an [42-45].

## 1.5.4 Das gesunde Mikrobiom

### 1.5.4.1 Definition und Aufgaben eines gesunden Mikrobioms

In den Mittelpunkt der Forschung rückt derzeit die Frage, was ein gesundes Mikrobiom beim Neugeborenen ausmacht, welche Bakterienmuster ein gesundes Mikrobiom aufzeigt [46-48].

Arboleya et al. weisen einem gesunden Mikrobiom bei Neonaten folgende Eigenschaften zu:

Ein gesundes Mikrobiom setzt sich aus Mikrobiota zusammen, die das Auftreten von Infektionskrankheiten verhindern. Sie initiieren ebenfalls bestimmte Signalkaskaden und sorgen dafür, dass der Aufbau der Barrierefunktion des Darms und die Reifung des Immunsystems gefördert werden. [46] Damit wird dem Mikrobiom eine fundamentale Bedeutung in der Prävention von Krankheiten sowohl in der Neonatalperiode als auch in der zukünftigen Gesundheit des Kindes zugeordnet.

Es gibt Forschergruppen, die bei der Definition eines gesunden Mikrobioms noch weiter gehen und die Mikrobiota als eine Art Wächter sehen, die für das physiologische Gleichgewicht zwischen physiologischen und potentiell pathologischen Darmbakterien sorgen: Das gesunde Mikrobiom trägt dazu bei, dass Keime, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. oder *Clostridiales* bei der Darmbesiedelung nicht die Überhand bekommen. [49]

Die Aufrechterhaltung eines intakten Immunsystems, metabolische Aktivität, Entgiftungsfunktion, Energiegewinnung und Etablierung eines intakten Darmmilieus sind weitere Aufgaben, die den Darmbewohnern zugeordnet werden [35].

Aber welche Bakterienstämme tragen nun zu diesem physiologischen Aufbau des Darmmilieus und zur zukünftigen Gesundheit des Kindes bei?

Das Mikrobiom kann als genetischer Fingerabdruck eines jeden Menschen gesehen werden, da kein Mikrobiom dem anderen gleicht [50, 51], wobei Studien zeigen, dass der interindividuelle Unterschied des Mikrobiommusters mit zunehmendem Alter sinkt [52]. Diese interindividuellen Unterschiede stellen Forscher vor große Herausforderungen, bestimmte Mikrobiommuster zu erkennen, die mit bestimmten physiologischen oder pathologischen Vorgängen assoziiert werden können [50].

Trotz der Schwierigkeit der Vereinheitlichung bestimmter Mikrobiommuster kristallisieren sich beim Vergleich verschiedener Studien bestimmte Bakterienstämme heraus, die mehr oder weniger bei physiologischen Reifungsvorgängen oder pathologischen Vorgängen dominant sind [53].

Mit diesem Wissen wagen es Arboleya et al. das Mikrobiom eines Reifgeborenen, das durch Spontangeburt zur Welt gekommen ist und ausschließlich mit Muttermilch gefüttert wurde, als gesund zu sehen [46].

#### 1.5.4.2 Einflussfaktoren auf die Mikrobiomentwicklung

Mit der nachfolgenden Abbildung sollen einige Einflussfaktoren genannt werden, die zur Individualität des Mikrobioms und letztendlich zur Gesundheit des Kindes beitragen. Jeder Faktor zeigt einen Touch-Point auf, der Einfluss auf die Entwicklung der Darmflora hat. Diese Abbildung fasst sehr gut zusammen, wie schwierig es ist aufgrund dieser verschiedensten Einflussfaktoren ein Standard-Mikrobiom zu definieren, was als gesund gilt.

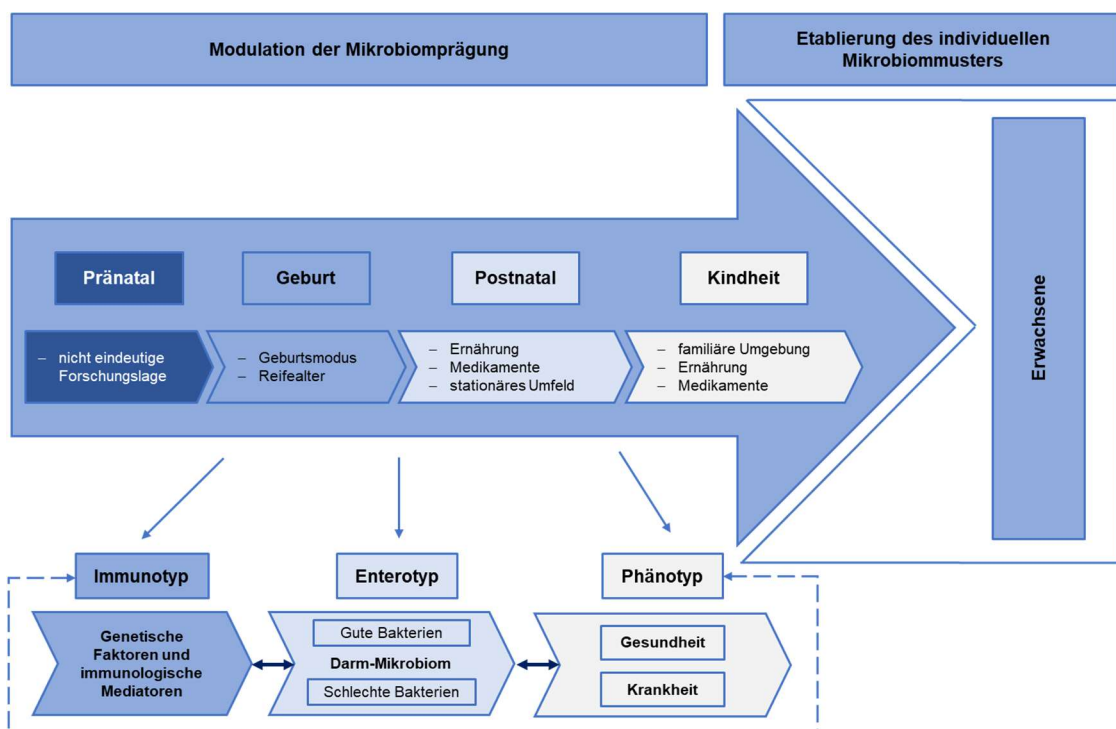


Abb. 8: Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Mikrobiommusters, in Anlehnung an [53-55].



### 1.5.4.3 Entwicklungsphasen eines gesunden Mikrobioms

Die Entwicklung der Darmflora des Säuglings beginnt mit der Geburt [56-58] und kann verschiedenen Phasen zugeordnet werden [59, 60], die aufeinander aufbauen [61]:

Stark et al. konnten zeigen, dass sich das Mikrobiommuster innerhalb des ersten Lebensjahres **nahrungsabhängig** entwickelt [62]. Damit greifen sie auf die Einteilung bereits früher gewonnener Erkenntnisse aus der Forschung zurück [63]:

Phasen	Beschreibung der Phase	Verhalten der Bakterienpopulation in Abhängigkeit von der Ernährung
Phase 1	Erste Lebenswoche	Erste bakterielle Inokulation
Phase 2	Ernährung mit Muttermilch	Bakterielle Ansiedlung unter Einfluss und Stabilisierung der Darmflora
Phase 3	Zufüttern von Beikost zur Muttermilch	Sofortige Reaktion der Darmflora in Form von Veränderung der Bakterienpopulation
Phase 4	Normalkost	Anpassung der Darmbakterien in Richtung erwachsenes Mikrobiommuster

Tab. 5: Nahrungsabhängige Phasen der Mikrobiomentwicklung, in Anlehnung an [62, 63].

Auf der anderen Seite erzeugen die einzelnen Bakterienstämme durch ihren Stoffwechsel ein Darmmilieu, das wiederum das Wachstum diverser Mikrobiota reguliert [58].

Auf Grundlage dieses Wissens wird im folgenden Abschnitt auf die phasentypischen, dominierenden Bakterienstämme eingegangen:

#### 1.5.4.3.1 Phase 1: Erste bakterielle Inokulation

Mit der Geburt und dem damit verbundenen Durchtritt des Kindes durch den Geburtskanal, kommt das Kind mit der vaginalen [58] und fäkalen [55] Flora der Mutter in Berührung. Die mütterliche Bakterienflora und das sich anschließende Umgebungsfeld des Kindes stellen die Basis dar, auf der sich die kindlichen Mikrobiota nahrungsabhängig und auf Grundlage der natürlichen Selektion durch das intestinale Milieu, das durch die dominierenden Bakterienstämme selbst erzeugt wird, weiterentwickeln kann [43, 44].

*Enterobacteriaceae* – darunter vor allem *Escherichia coli* – und *Streptokokken* stellen in den ersten beiden Lebenstagen die dominierenden Bakterienspezies dar [49, 62, 64]. Während die Dominanz dieser beiden Gattungen nach Erreichen des Maximalwertes innerhalb der ersten beiden Lebensstage abnimmt, etablieren sich anaerobe Bakterienstämme [49]: Neben *Bifodobakterien* als dominierender



anaerober Stamm [49], finden sich nur in geringen Zahlen *Bacteroides*, *Clostridien* und *Lactobacillen* [65]. Am Ende der ersten Lebenswoche stehen *Bifidobakterien* zu *Enterobacteriaceae* in einem Verhältnis von 1000:1 [64].

Wie kann man sich diese Entwicklung erklären?

In den ersten Lebenstagen konnten Grütte et al. im Stuhl der Neugeborenen ein positives Oxidations-Reduktionspotential nachweisen: Werte von  $+175 \pm 14\text{mV}$  (SD) [66] lassen auf das Vorhandensein von Darmbakterien zurückschließen, die überwiegend sauerstoff-abhängigen Stoffwechsel betreiben [45] und in diesem Milieu gut wachsen [58].

Durch Stoffwechselfvorgänge der Bakterien wird allerdings Sauerstoff verbraucht [45, 67]. Damit limitieren die Bakterien der Anfangsphase das Sauerstoffangebot und lassen das Oxidations-Redox-Potential sinken [45], was Grütte et al. mit Werten von  $-113 \pm 56\text{mV}$  (SD) nachweisen konnten [66]. Damit sind optimale Wachstumsbedingungen für anaerobe Bakterienstämme geschaffen [45], denn diese verlangen wiederum ein negatives Oxidations-Reduktions-Potential [45, 67]. Diese Tatsache erklärt den Trend, dass in den ersten Lebenstagen keine anaeroben Stämme, wie z.B. *Bifidobakterien*, *Lactobacillen* oder *Bacteroides* im Stuhl auffindbar sind [45, 49].

#### 1.5.4.3.2 Phase 2: Bakterielle Ansiedelung und Stabilisierung der Darmflora

Diese Phase wird als Zeitraum, in dem das Kind ausschließlich Muttermilch erhält, definiert [45, 63].

Das anfängliche Durchsetzen und Anpassen der Bakterienstämme während der ersten Lebensstage ist beendet und das intestinale Milieu zeigt nun im Mikrobiom-muster eine erste Stabilitätsphase auf: Das Mikrobiom wird von der anaeroben Bakterienfamilie der *Bifidobakterien* dominiert. [62, 64]

Da Anaerobiern die Aufgabe zugewiesen wird, das Wachstum pathogener Keime im Darm zu verhindern [68], kann dem Mikrobiom in dieser Phase eine gewisse Schutzfunktion vor der Überbesiedelung des Darms mit pathogenen Keimen, wie z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiellen* oder *Clostridien* zugewiesen werden [49].

Der Grund für die Dominanz der *Bifidobakterien* in der Muttermilch-dominierenden Phase könnte nach aktuellen Forschungsergebnissen darin liegen, dass das Wachstum bestimmter Bifidobakterienstämme durch Oligosaccharide (= komplexe Carbohydrate, mit hoher Nachweismenge in Muttermilch, HMO) [69] gefördert wird [70].

Yu et al. konnten zeigen, dass bestimmte *Bifidobakterien* unter HMO im Gegensatz zu *Escherichia spp.* und *Clostridium perfringens* an Menge im Mikrobiom zunahm [70].

Da HMO's nicht von Enzymen des Pankreassaftes aufgespalten werden können [71], gelangen diese Milchbestandteile unverdaut [72] in das kindliche Colon [69]. Dort haben die HMO's die Aufgabe, bestimmten Bakterienstämmen als Metabolit zu dienen [71]. Daher werden HMO's gerne als „Food for Bugs“ [73], also als Futtermittel für Bakterien bezeichnet.

#### 1.5.4.3.3 Phase 3: Veränderung der Bakterienpopulation

Mit dem Zusatz von Beikost zur Muttermilch endet die Stabilisierungsphase im Mikrobiommuster [74] und ein buntes Bild an Bakterienstämmen kommt zum Vorschein [62]:

Es kommt zu einem raschen Anstieg von Bakterienfamilien, die bereits in Phase 1 aufgetreten sind: *Enterobacteriaceae* und *Enterokokken*. [62]

*Bacteroides*, *Clostridien* und anaerobe *Streptokokken* übernehmen nach und nach den anaeroben Anteil im Mikrobiommuster [62, 63].

#### 1.5.4.3.4 Phase 4: Anpassung des Mikrobioms in Richtung Erwachsenenmikrobiom

In der letzten Phase ist das Kind abgestillt und wird ausschließlich mit fester Nahrung gefüttert [45, 63].

Favier et al. konnten nachweisen, dass am Tag, an dem keine Muttermilch mehr gefüttert wurde, die Gruppe der *Bifidobakterien* im Stuhl der Kinder für eine kurze Zeit nicht mehr nachweisbar waren [74] und sich das Mikrobiommuster der Kinder in Richtung Erwachsenenmikrobiom entwickelte [62]: Das Überwiegen von *Bacteroides* und *Firmicutes* mit einer nur geringen Menge an *Proteobakterien* und aeroben gram-negativen Bakterien [57].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Alpha-Diversität (= Artenvielfalt innerhalb einer Stuhlprobe) [75] auf Kosten der Beta-Diversität (= probenübergreifender Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung) [76] im Laufe der ersten 12 Lebensmonate zunimmt, was wiederum einem weiteren Schritt Richtung Anpassung Erwachsenenmikrobiom entspricht [59, 60, 77].

### 1.5.5 Mikrobiomentwicklung beim Frühgeborenen

Das Mikrobiommuster von Frühgeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht (VLBW) unterscheidet sich vom Muster Reifgeborener deutlich [46, 49, 78].

Frühgeborene zeigen starke interindividuelle Unterschiede im Mikrobiommuster [46]. Dennoch lassen sich aus aktuellem wissenschaftlichem Stand bestimmte Muster erkennen, die überwiegend bei Frühgeborenen zu finden sind. Auf diese Muster wird im Folgenden eingegangen:

#### 1.5.5.1 Mikrobiommuster bei Frühgeborenen

Das Mikrobiom bei Frühgeborenen zeigt in den ersten Lebenstagen eine deutlich reduzierte Vielfalt an Bakterien [79] und eine stärkere Instabilität [55].

Ab dem 1. Lebenstag nehmen die fakultativen Anaerobier, v.a. die *Enterobacteriaceae* und *Enterokokken* eine dominierende Stellung ein [49, 78, 80]. Es lassen sich 2 Hauptunterschiede bei diesen Bakterien im Mikrobiom von Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen darstellen:

Ein Unterschied ist, dass bei Frühgeborenen signifikant höhere Mengen nachgewiesen werden. Stark et al. konnten zeigen, dass am Tag 3 die Gruppe der *Enterobacteriaceae* mit  $9.3 \pm 1.9$  (mean  $\log_{10}$  number of organism/g wet faeces  $\pm$  I.S.D) bei Frühgeborenen signifikant höher war als bei Reifgeborenen mit einer Menge von  $7.8 \pm 2.2$  (mean  $\log_{10}$  number of organism/g wet faeces  $\pm$  I.S.D) [78].

Auffallend ist weiterhin, dass die Dominanz der oben genannten fakultativen Anaerobier nach Erreichen eines Peaks – wie bei Reifgeborenen zu beobachten [64] – nicht abflacht, sondern eine Plateau-artige Stabilität über einen längeren Zeitraum einnimmt [49].

Damit hat man über eine lange Zeitperiode eine große Menge an potentiell pathogenen Keimen [78], denn *E. coli* und *Streptokokken* zählen zu den zwei häufigsten Erregern, die mit systemischen Erkrankungen in der Neonatalperiode in Verbindung gebracht werden [49]. Dieser Pool an pathogenen Keimen wird weiterhin ergänzt durch *Clostridium difficile*: Bei Arboleya et al. zeigten sich nur bei Frühgeborenen Level von *Clostridium difficile* [46], ein Bakterium, das mit der nekrotisierenden Enterokolitis stark in Verbindung gebracht wird [78, 81]. Stark und Lee fanden zwar nahezu gleiche Mengen an *Clostridien* in den Stuhlproben von Früh- und Reifgeborenen. Sie wiesen allerdings darauf hin, dass das Darmmilieu bei Frühgeborenen differiert und womöglich die Toxinproduktion von *Clostridien* verstärkt. [78] Daher kann man auch bei gleichen Levels von einer erhöhten Pathogenität dieser Bakterien bei Frühgeborenen sprechen.

Ein weiterer Unterschied in den Mikrobiommustern zeigt sich im Wachstumsverhalten der *Bifidobakterien*. Diese Anaerobier findet man bei Frühgeborenen deutlich reduziert und verspätet auftretend [46, 49, 78]. Die Kombination aus lange bestehender großer Menge an *Enterobacteriaceae* und dem verspäteten, lang-

samen Anstieg der *Bifidobakterien* sorgt dafür, dass das enterale Milieu in Richtung fakultative Anaerobier verschoben wird [46]. Diese Verschiebung wird durch das verspätete und schwächere Auftreten von *Bacteroides* zusätzlich verstärkt [49]. Die *Bifidobakterien* verdrängen erst verspätet die *Enterobacteriaceae* von ihrer dominanten Position, allerdings nicht in so ausgeprägter Weise wie bei Reifgeborenen [49].

Das geschilderte Wachstumsverhalten der Bakterien bestätigt sich im gemessenen Verhältnis: *Enterobacteriaceae* und *Bifidobakterien* treten bei Frühgeborenen deutlich verspätet und reduziert auf: 10:1 (7. Lebenswoche) verglichen mit 1000:1 (7. Lebenstag) bei Reifgeborenen. [49]

#### 1.5.5.2 Gründe für diesen Unterschied

Die abweichende Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms bei Frühgeborenen lässt sich dadurch erklären, dass der noch unreife Darm [46] einerseits zu früh mit Nahrung belastet wird [82], andererseits mit nur sehr geringen Muttermilch-Mengen: Aufgrund der Unreife des Verdauungssystems können keine großen Mengen an Nahrung verdaut werden [49]. Die in der Muttermilch enthaltenden Oligosaccharide fördern allerdings das Wachstum der *Bifidobakterien* [83]. Sakata et al. zeigten, dass die Entwicklung des Mikrobioms von der Menge an zugeführter Muttermilch abhängig ist: Bei einer Zufuhr von  $69 \pm 29 \text{ ml/kg/d}$  kamen die ersten *Bifidobakterien* in den Stuhlproben der Frühgeborenen zum Vorschein, bei  $118 \pm 23 \text{ ml/kg/d}$  nahmen die Anaerobier die dominante Stellung ein. [49]

Butel et al. sehen nicht die Milchmenge, sondern das Reifealter des Kindes bei Geburt als limitierenden Faktor für die Entwicklung eines gesunden, *Bifidobakterien*-dominierenden Mikrobioms. Sie hatten beobachtet, dass das Auftreten der *Bifidobakterien* bei Frühgeborenen mit einem Reifealter von 32.9 SSW assoziiert ist. [84]

Schwartz et al. setzten den Krankenhausaufenthalt als Umgebungsfaktor für die Entwicklung des Mikrobiommusters bei Frühgeborenen in Korrelation. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Stuhlproben und fand heraus, dass sich das Mikrobiommuster aller Probanden im Laufe der Zeit kaum voneinander unterschied. Alle Frühgeborenen waren mit *E.coli*, *Enterokokken* und *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen besiedelt. [79] Goldmann et al. erweiterten diese Erregerliste mit *Enterobacter* und *Citrobacter*, zwei weiteren gram-negativen Bakterien: 30 Tage nach stationärer Aufnahme waren 91% der Kinder betroffen. [85] Aus diesem Befund ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass der Umgebungsfaktor einen entscheidenden Einfluss auf die Mikrobiomentwicklung bei Frühgeborenen hat [79].

Ein erhöhtes Sauerstoffangebot aufgrund langandauernder Beatmungen erschweren die Etablierung eines *Bifidobakterien*-dominierenden anaeroben Milieus ebenfalls [86]. Auch der häufige Einsatz von Antibiotikatherapien hat Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms [80, 87, 88].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht ein Kriterium allein für die Mikrobiomentwicklung des Frühgeborenen verantwortlich gemacht werden kann. Claud et al. betonen, dass es vielmehr ein Zusammenwirken verschiedenster Faktoren ist, welches die Entwicklung lenkt: Umgebungsfaktoren, das Darmmilieu, die Darmperistaltik, enterale Bakterien, die auf das Wachstum anderer Bakterienstämme fördernden oder hemmenden Einfluss haben und die Art der Nahrung seien hier genannt. [89]

#### 1.5.5.3 Auswirkungen

Die Zusammensetzung des Frühgeborenen-Mikrobioms mit größeren Mengen an potentiell pathogenen Bakterienstämmen und einer deutlich reduzierten Menge an wichtigen Anaerobiern, v. a. der Gruppe der *Bifidobakterien* kann kurz- und langfristige Folgen mit sich bringen:

##### 1.5.5.3.1 Kurzfristige Folgen

Sakata et al. wiesen bei Frühgeborenen eine geringere „Colonisation Resistance“ nach [49]. Unter „Colonisation Resistance“ versteht man die Eigenschaft eines gesunden Mikrobioms, potentiell pathogene Keime in ihrem Wachstum einzudämmen [90]. Diese Eigenschaft wird den Anaerobiern zugesprochen [68, 84]. Durch die geringe Menge an *Bifidobakterien* bei Frühgeborenen werden die pathogenen Keime allerdings nur schwach in ihrem Wachstumsverhalten beeinflusst [49, 68]. Durch diese fehlende physiologische Wachstumskontrolle wird der Pool an pathogenen Keimen im Darmlumen weiter vergrößert.

Das Epithel der Darmschleimhaut und eine Anaerobier-dominierende Darmflora stellen eine schützende Grenze zwischen Darmlumen und Enterozyten dar und limitieren somit den Übertritt von pathogenen Bakterien und ihren schädlichen Stoffwechselprodukten ins umliegende Gewebe [91, 92].

Die Frühgeburt birgt das Risiko, dass das Epithel der Darmschleimhaut zu schwach in der Barrierefunktion und somit durchlässig für pathogene Keime und deren Toxine ist [91-93]. Damit wird es Bakterien und seinen Stoffwechselprodukten erleichtert, aus dem Darmlumen in die Umgebung überzutreten. Das Epithel kann wie eine physiologische Grenze gesehen werden, die für die Interaktion zwischen Darmbakterien und Immunsystem der Darmschleimhaut verantwortlich ist. Das Erkennen der Darmbakterien als physiologisch bzw. pathogen ist entscheidend für die nachgeschalteten Immunsystemreaktionen Toleranz

bzw. Bekämpfung der Bakterien. [56] Zeigt das Epithel aufgrund des fehlenden Reifungsgrades durch die Frühgeburt in dieser Erkennung Schwachstellen auf, kann dies zu einer Fehlfunktion der nachgeschalteten Immunreaktion führen.

Den *Bifidobakterien* wird aber nicht nur die Aufgabe zugeschrieben, potentiell pathologische Keime in ihrem Wachstum einzudämmen, sie verhindern auch den Übertritt dieser Keime vom Darmlumen über die Epithelschicht der Mucosa in die umgebende Lamina propria mit den Lymphgefäßen, was als „bakterielle Translokation“ bezeichnet wird [91, 94].

Die Kombination aus größerem Pool an potentiell pathogenen Keimen und erleichtertem Übertritt dieser aus dem Darmlumen in die Umgebung erhöht das Risiko, an einer lokalen oder systemischen Neonatalperiode-typischen Infektion zu erkranken: der Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) oder einer Late-Onset-Sepsis (LOS). Diese Behauptung wird im Folgenden belegt:

Unter einer Nekrotisierenden Enterokolitis versteht man „eine entzündliche Erkrankung, die im gesamten Gastrointestinaltrakt disseminiert fleckförmig bis kontinuierlich auftreten kann“ [95]. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um einen gastrointestinalen Notfall, der oft zu einem septischen Schock führt [95]. Die Inzidenz der Nekrotisierenden Enterokolitis liegt bei 15% der Frühgeborenen < 1500g [96] und hatte in den Jahren 2008 bis 2015 eine Mortalitätsrate von 20.5% in Deutschland [97]. Es gibt bisher kein einzelnes Pathogen, welches mit der NEC bei Frühgeborenen in Verbindung gebracht werden kann [80]. Vielmehr spielen die Kombination aus Darmmilieu, pH-Veränderungen, intestinale Peristaltik, das Frühgeburten-assoziierte Mikrobiommuster, die Unreife des Immunsystems, eine frühe enterale Nahrungsaufnahme und die Oxygenierung des Gastrointestinaltraktes aufgrund der bestehenden Schwäche des Epithels eine entscheidende Rolle. [78, 80, 86, 89]

Eine LOS-Sepsis wird definiert als eine systemische Infektion, die mehr als 72h nach Geburt auftritt. Shaw et al. konnten zeigen, dass das Mikrobiom der erkrankten Probanden überwiegend von *Staphylokokken* und *Enterobacteriaceae* dominiert wurde. [86]

Auch bei den Sepsis-Kindern fand man in den Stuhlproben deutlich reduzierte Mengen an *Bifidobakterien* [98].

#### 1.5.5.3.2 Langfristige Folgen

Mittlerweile wird die Hypothese aufgestellt, dass es eine Korrelation zwischen bestimmten Veränderungen im Mikrobiommuster in den ersten Lebenstagen und dem Auftreten chronischer Erkrankungen im späteren Leben der Frühgeborenen

gibt [99]. Tang et al. machen die Dysbiose, also ein nicht ausgeglichenes Verhältnis in der taxonomischen Zusammensetzung der Mikrobiota [100] für die Entstehung bestimmter Krankheiten verantwortlich [101, 102].

Die Zahl an übergewichtigen Kindern hat zugenommen. Für 2010 wurde eine Schätzung von 38% an übergewichtigen Kindern allein in Europa gesetzt [103]. Mit Übergewicht wird das Auftreten weiterer Erkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus, Asthma und kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter in Verbindung gebracht [37, 104]. Die Wahrscheinlichkeit, im Alter an einer Krebserkrankung zu sterben, ist bei Patienten mit hohem Körpergewicht ebenfalls erhöht [105].

Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass eine Dysbiose der Mikrobiota in der Frühphase des Kindes Auswirkungen auf die Entstehung von Übergewicht in der Zukunft hat [77]. Kalliomakie et al. konnten zeigen, dass sich retrospektiv betrachtet das Mikrobiom von 7-jährigen übergewichtigen Kindern bereits im 6. Lebensmonat vom Mikrobiom der normalgewichtigen Kontrollgruppe unterschied [106, 107].

Schaut man sich die Mikrobiota in Stuhlproben von übergewichtigen Probanden an, kann man eine geringere Anzahl an *Bacteroides* und *Bifidobacteria* als bei normalgewichtigen Probanden erkennen [106, 108]. Auch die Bakterienvielfalt ist in Stuhlproben übergewichtiger Patienten signifikant reduziert [109].

Veränderungen im Mikrobiommuster in einem kritischen Zeitfenster können zur Entwicklung von Erkrankungen beitragen, die auf Überempfindlichkeitsreaktionen des Immunsystems beruhen [77]: Asthma, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis, Nahrungsmittelallergien bis hin zum anaphylaktischen Schock [110].

Eine allergische Reaktion beruht auf einer Überproduktion an IgE-Antikörpern [110]. Binden IgE-Antikörper an Rezeptoren von Mastzellen, findet eine sofortige Degranulierung der Zellen mit Histaminfreisetzung statt. Damit werden Prozesse in Gang gesetzt, die zu den Allergie-typischen Symptomen führen: Entzündungsreaktionen, Juckreiz, Husten. [110, 111] Da sich eine große Menge an IgE-produzierenden B-Zellen im Darm des Menschen befindet [110], rückt das Interesse der Forschung immer mehr auf die Frage, ob das Mikrobiommuster auch Auswirkungen auf die Entstehung einer Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems hat.

Forscher stellen die Vermutung auf, dass Veränderungen im Mikrobiommuster in der Frühphase des Lebens, die Prädisposition für eine Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems im weiteren Verlauf des Lebens erhöht [112]:

Cahenzli et al. fanden im Mausmodell heraus, dass die Vielfalt an Mikrobiota in einem bestimmten Zeitfenster entscheidend ist, um die IgE-Produktion in einem Normbereich zu halten [113].

Kalliomaki et al. gingen noch einen Schritt weiter und suchten nach Mikrobiota, die womöglich für die Entwicklung allergischer Überempfindlichkeitsreaktionen verantwortlich gemacht werden können. Sie fanden heraus, dass sich die Zusammensetzung der Stuhlproben derjenigen Kinder, die mit 12 Lebensmonaten Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber bestimmten exogenen Faktoren aufwiesen, von Proben gesunder Kinder bereits im 3. Lebensmonat signifikant unterschieden: Bei den atopischen Kindern fand man deutlich reduzierte Mengen an Bifidobakterien ( $1,8 \times 10^9$  versus  $6,1 \times 10^9$ ), wohingegen die Menge an *Clostridien* deutlich erhöht war ( $9,3 \times 10^7$  versus  $3,3 \times 10^7$ ). [112]

Abschließend ist jedoch zu sagen, dass die Frühgeburt die Entwicklung des Mikrobioms in Richtung Mikrobiommuster eines Erwachsenen im Laufe der Kindesentwicklung nicht zwangsläufig verhindert. Korpela et al. konnten zeigen, dass auch bei Frühgeborenen im Follow-Up nach 30 Wochen das Muster in Richtung *Bifido*-Dominanz sich entwickelte. Dieses Muster steht für ein gesundes Darmmilieu. [98]

### **1.5.6 Mikrobiom bei Frühgeborenen unter empirischer Antibiotika-Therapie**

Unter der empirischen Antibiotika-Behandlung versteht man den Beginn einer antibakteriellen Therapie, basierend allein auf einer vermuteten Infektion bzw. einem vermuteten Infektionsfokus aufgrund der Klinik ohne Nachweis eines Erregers in der Blutkultur [114]. Es gibt oft hausinterne Schemata, die das Haus-typische Erregerspektrum erfassen [115]. Das folgende Kapitel bezieht sich daher auf Behandlungsstrategien, wie sie in der Pädiatrie am Klinikum der LMU München gehandhabt werden.

#### *1.5.6.1 Indikationen für empirische Antibiotika-Therapie bei Frühgeborenen*

Das Immunsystem von Frühgeborenen vor der 32. Schwangerschaft ist sehr unreif. Die zelluläre Immunabwehr, die bereits angelegt ist, ist nicht ausreichend, um bestimmte Erreger abzuwehren. Der humorale Arm des Immunsystems ist hierfür entscheidend. Dieser Arm wird durch IgG-Antikörper der Mutter gespeist, die allerdings erst nach der 32. Schwangerschaftswoche über die Plazenta zum Kind gelangen. [116] Um schweren bakteriellen Infektionen von Frühgeborenen aufgrund der unzureichenden humoralen Abwehr vorzubeugen, ist es mittlerweile Standard, Frühgeborene durch empirische Antibiotikagaben in den ersten Lebenstagen vor pathogenen Keimen zu schützen [88].



### 1.5.6.2 Häufiges Erregerspektrum bei Frühgeborenen

Bei Frühgeborenen ist die Sepsis sehr gefürchtet. Man unterscheidet – je nach Zeitpunkt des Einsetzens der Symptome nach Geburt - die Early-Onset-Sepsis (EOS) und die Late-Onset-Sepsis (LOS). Während die EOS innerhalb der ersten 3 Tage nach Geburt eintritt, spricht man von einer LOS, wenn das Kind 72h postpartal septische Symptome zeigt. Während die Erreger, die eine EOS verursachen ihren Ursprung in der mütterlichen Vaginalflora haben, wird die LOS häufig durch Fremdmaterial in Form von Gefäßkathetern oder Beatmungstuben verursacht.[117] Dies erklärt die Tatsache, dass man bei EOS und LOS mit unterschiedlichen dominierenden Erregern zu tun hat [117] und die antibiotische Behandlung daher stark variiert [115]. Die EOS wird häufig durch gram-negative Erreger verursacht, wohingegen die LOS mit gram-positiven Erregern in Verbindung gebracht wird [118].

Folgende Tabelle widerspiegelt die häufigsten Erreger, die in der Neonatalperiode für die unterschiedlichen Sepsisformen verantwortlich gemacht werden können und antibiotisch abgedeckt werden müssen:

Early-Onset-Sepsis	Late-Onset-Sepsis
E.coli	CoNS
Streptokokken der Gruppe B	Staphylococcus aureus
Hämophilus influenza	Enterococcus sp.
Candida	Klebsiellen
Weitere: CoNS, Staphylococcus aureus, Enterococcus sp.	Weitere: E. coli, Streptokokken der Gruppe B

Tab. 6: Häufige EOS- und LOS-Sepsiserreger, in Anlehnung an [118].

### 1.5.6.3 Häufige Antibiotika-Schemata bei Frühgeborenen

In der Literatur findet man kein klassisches Schema, das zur Therapie einer bakteriellen Infektion standardmäßig bei Frühgeborenen angewendet wird. Es gibt oft hausinterne Schemata, die hier zur Anwendung kommen [119].

Am Klinikum der LMU München finden die Schemata Ampicillin + Cefotaxim versus Piperacillin/Tazobactam als empirische Antibiotika-Therapie Anwendung. Daher wird im Folgenden auf das Wirkspektrum dieser Antibiotika bzw. Wirkstoffkombinationen eingegangen:

#### 1.5.6.3.1 Ampicillin + Cefotaxim

**Ampicillin** gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika [120] und findet in der Neonatologie in der empirischen Antibiotika-Therapie sehr häufig Anwendung

[121]. Es greift unter anderem die in der Neonatalperiode typisch-pathogenen Erregerspektra *Streptokokken der Gruppe B*, *Listeria monocytogenes* und *E.coli* ab [120].

**Cefotaxim** gehört zur Klasse III der Cephalosporine und ergänzt Ampicillin in der Breite des Wirkspektrums der antibakteriellen Therapie. Es wirkt ebenso gegen das Erregerspektrum, das oft bei einer neonatalen Sepsis zu finden ist. Es zeichnet sich durch eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Erregern aus, zeigt allerdings keine Wirksamkeit gegen Enterokokken und *Listeria monocytogenes*. [115] Eine positive Eigenschaft dieser Antibiotikagruppe besteht darin, dass der Großteil der kindlichen Darmflora intakt bleibt und die Gefahr einer Superinfektion des Darmes bei Anwendung sehr gering ist [122].

#### 1.5.6.3.2 *Piperacillin/Tazobactam*

**Piperacillin** ist ein Abkömmling von Ampicillin und diesem im Wirkspektrum daher sehr ähnlich. In der Kombination mit dem  $\beta$ -Lactamase-Inhibitor **Tazobactam** wird es als Breitspektrum-Antibiotikum eingesetzt. [120] Eine Überblicksarbeit hat allerdings ergeben, dass in Deutschland diese Kombination zur empirischen EOS-Therapie sehr zurückhaltend eingesetzt wird [119].

#### 1.5.6.4 *Auswirkungen der empirischen Antibiotika-Therapie auf das Mikrobiom*

Die medizinische Versorgung von Frühgeborenen verlangt bezüglich Prävention bestimmter Erkrankungen und medizinischer Therapie eine besondere Präzision in der Nutzen-Risiko-Abwägung:

##### 1.5.6.4.1 *Veränderungen des Mikrobiommusters durch verschiedene Antibiotika*

Antibiotika gehören zu den am meisten eingesetzten Medikamenten in der Neonatologie [123]. Wie bereits oben ausführlich dargestellt, wird das Frühgeborenen-Mikrobiom an sich bereits von potentiell-pathogenen Bakterienstämmen dominiert. Der empirische Einsatz von Antibiotika in der ersten Lebenswoche bei Frühgeborenen beeinflusst die Entwicklung des Mikrobioms zusätzlich negativ:

Die empirische Antibiotikatherapie mit einem Breitspektrum-Antibiotikum reduziert in den ersten Lebenstagen der Frühgeborenen die Bakterien-Vielfalt signifikant. Tanaka et al. konnten zeigen, dass sich das Mikrobiom bezüglich der Vielfalt innerhalb des 1. Lebensmonates erholt. Allerdings gab es im Vergleich zu nicht-therapierten Kindern keine Zunahme der Vielfalt im darauffolgenden Lebensmonat. [88]

Die Arbeitsgruppe fand ebenfalls heraus, dass während einer empirischen Breitband-Antibiotikatherapie überwiegend *Enterokokken* auf Kosten der *Bifidobakterien* selektiert werden. Posttherapeutisch hatten sich die *Enterobacteriaceae* als dominante Gruppe der Antibiotika-behandelten Kinder gezeigt. [88] Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage, dass eine Bakterienvielfalt in den ersten Lebens Tagen von fundamentaler Bedeutung ist, damit potentiell pathogene Keime nicht die dominierende Stellung im Mikrobiommuster einnehmen können [80].

Ähnliche Ergebnisse liefert auch eine Arbeitsgruppe, die sich mit der empirischen Gabe von Ampicillin- und Gentamicin in der ersten Lebenswoche beschäftigte. Auch hier waren die Vielfalt von Bakterienstämmen in den darauffolgenden Wochen massiv reduziert und überwiegend *Enterobacter*-Stämme herangezüchtet worden [114], welche wiederum mit einem erhöhten Risiko, an einer LOS zu erkranken, assoziiert sind [86].

Kinder, die in der frühen Lebensphase unter ausgedehnter Antibiotikatherapie standen, hatten im Verlauf sogar ein höheres Risiko, an einer Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) oder einer Sepsis zu erkranken. Das Risiko bezüglich der Gesamtmortalität war ebenfalls erhöht. [114, 124]

Wang et al. stellen die allgemeingültige Aussage auf, dass der Einsatz von Breitband-Antibiotika und die damit verbundene Reduktion der Bakterien-Vielfalt für das Hochzüchten potentiell-pathogener Bakterien verantwortlich ist [80].

#### *1.5.6.4.2 Veränderungen des Mikrobiommusters aufgrund der Therapiedauer*

Auch die Dauer der Antibiotikagabe hat Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms: So konnten Kuppala et al. zeigen, dass eine empirische Antibiotika-Therapie, die länger als 5 Tage angesetzt war mit einer erhöhten Rate an LOS, Sepsis und Tod einherging im Vergleich zu Frühgeborenen, die nur 2-4 Tage antibiotisch abgedeckt waren. Kuppala forderte daher, jeden einzelnen Tag einer erneuten Gabe an Antibiotika genauestens abzuwägen. [124]

#### *1.5.6.5 Antibiotikaschema am Dr. von Hauner'schen Kinderspital*

Am Dr. von Hauner'schen Kinderspital wurde im Rahmen des Antibiotic-Stewardship-Programms der Klinik [125] ein hausinternes empirisches antibiotisches Regime bei Verdacht auf neonatale Sepsis/Fieber ohne klaren Fokus beim Neugeborenen festgelegt (Ampicillin + Cefotaxim) [126]. Diese Kombination wird in den meisten Fällen unserer Studie entsprechend angewandt. In einigen Fällen werden jedoch auch andere Breitspektrum-Antibiotika verwendet, wie z.B. Piperacillin/Tazobactam.

Ein im Jahre 2016 erschienenes Review beschreibt, wie das Mikrobiom-Muster durch verschiedene Antibiotika bei Kindern und Erwachsenen verändert wird [127], allerdings ist der Einfluss, den die Auswahl des Therapieregimes auf den Verlauf der Mikrobiom-Entwicklung unserer Populationsgruppe hat, nicht bekannt.

Mit der NeoMuniCH-Studie sollen weitere Erkenntnisse in der Entwicklung des Mikrobioms bei Frühgeborenen erlangt und der aktuelle Wissensstand bezüglich Einflussfaktoren auf das Wachstum bestimmter Bakterienstämme ausgebaut werden. Mit den Ergebnissen der Probenauswertung und dem Vergleich der klinischen Daten im Rahmen der Studie kann vielen Fragestellungen nachgegangen werden, allerdings wird der Hauptfokus in dieser Arbeit auf die Beantwortung folgender Punkte gesetzt:

- Welchen Einfluss hat eine Therapie mit Ampicillin/Cefotaxim versus Piperacillin/Tazobactam auf die mikrobielle Diversität des Mikrobioms?
- Ab welcher Lebenswoche nach Antibiotikastart kann man eine veränderte Diversität im Mikrobiom feststellen?
- Welche Bakterienstämme sind jeweils in den beiden Antibiotika-Gruppen dominant?
- Gibt es Unterschiede in Diversität und Taxonomie bezüglich unterschiedlicher Therapiedauer in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe?
- Kann man einen allgemeinen Trend in der Gesamtübersicht der Population unter den zwei unterschiedlichen Antibiotika-Schemata darstellen?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission**

Nach Überprüfung des Antrages zur klinischen Durchführung der NeoMuniCH-Studie, erteilte die Ethikkommission des Klinikums der Universität München das zustimmende Votum, sodass der Studienbeginn mit Januar 2017 datiert werden konnte. Der Studie wurde die Projektnummer 663-15 zugeordnet. Bei der Studie wurden die Richtlinien von Helsinki von 2004 eingehalten.

### **2.2 Studienaufbau**

Die NeoMuniCH-Studie setzte sich aus folgenden Teilen zusammen:

#### **2.2.1 Studiendesign**

Bei der NeoMuniCH-Studie handelte es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie. Um den in der Einleitung genannten Fragestellungen nachgehen zu können, mussten zu jedem Teilnehmer täglich Stuhlproben gesammelt werden. Die erste Säule der Studie bildete somit die Biobank. Die zweite Säule bildete die korrelierende tägliche Dokumentation klinischer Daten eines jeden Studienteilnehmers. Der klinische Studienaufbau basierte auf diesen beiden Säulen und wurde um weitere Schritte im extra-klinischen Setting zur Interpretation der Ergebnisse ergänzt.

Die Gesamtheit des Studienaufbaus lässt sich in nachfolgendem Schaubild skizzieren:

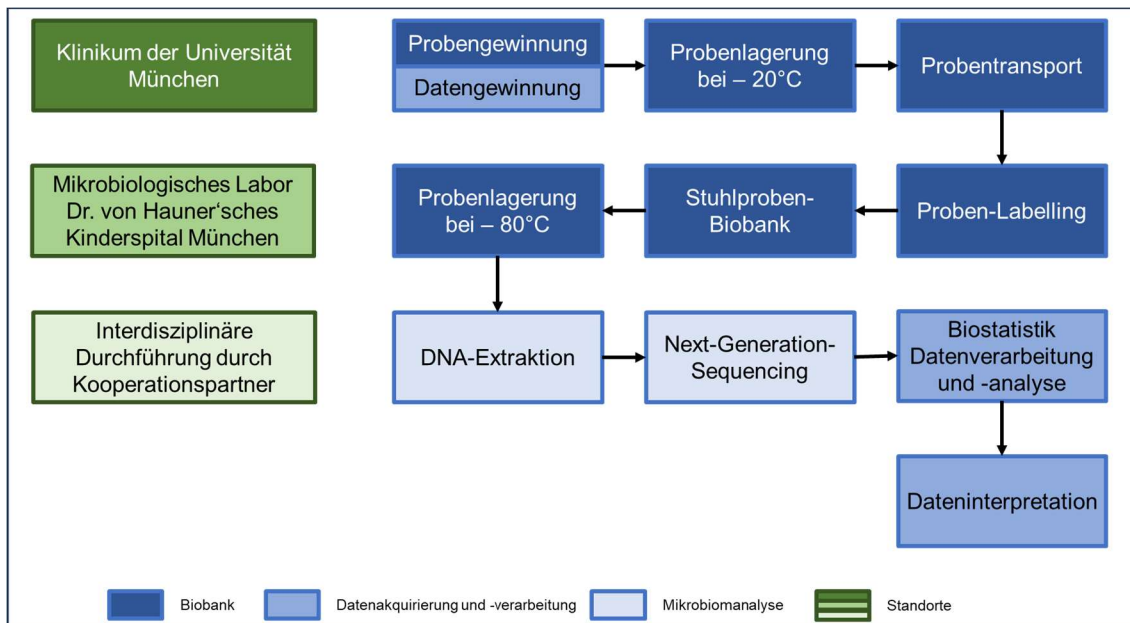


Abb. 9: Schritte der Mikrobiomanalyse im Rahmen der NeoMuniCH-Studie nach [128].

### 2.2.2 Studienzentrum

Für die Rekrutierung der Teilnehmer für die NeoMuniCH-Studie wählte man als Studienorte zwei Perinatal-Zentren des Klinikums der Universität München (KUM) der Ludwig-Maximilians-Universität, mit den Standorten Innenstadt (INN) und Großhadern (GH) aus.

Im Januar 2017 begann die Rekrutierungsphase am Standort Innenstadt, im Juli desselben Jahres wurde Großhadern als zusätzlicher Rekrutierungsstandort in die Studie mitaufgenommen, sodass der Studienzeitraum von Januar 2017 bis Januar 2019 datiert werden konnte.

### 2.2.3 Patientenkollektiv

In die NeoMuniCH-Studie wurden Frühgeborene, die vor der 32. Schwangerschaftswoche (SSW) in einem der oben genannten Perinatalzentren geboren worden sind, eingeschlossen. Das Geburtsgewicht der Studienteilnehmer spielte für das Zusammenstellen der Kohorte keine Rolle.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war – nach Aufklärung – das schriftliche Einverständnis von mindestens einem der beiden Elternteile innerhalb von 72 Stunden nach Geburt.

Den Eltern stand die Option offen, jederzeit und ohne Begründung, die Teilnahme an der Studie zu widerrufen und ihr Kind aus der Studie herauszunehmen. Diese

Rücktritt-Option wurde jedoch von keinem Elternteil der teilnehmenden Kinder angewendet. Im Gegenteil wurde das Studienkonzept durchweg sehr positiv von den teilnehmenden Eltern bewertet.

Vom Tag der Geburt bis zur Entlassung aus einer Einrichtung des KMU der LMU, wurden von jedem Studienkind täglich durch die Pflege eine Stuhlprobe entnommen und durch die Doktoranden die klinischen Daten des Kindes in eine Datenbank übernommen.

Die Studienteilnehmer waren für die gesamte Dauer ihres Klinikaufenthaltes in die Studie eingeschlossen. Mit Entlassung aus der Klinik bzw. bei Verlegung des Kindes in eine andere Klinik endete auch das Probensammeln. Bei hausinternen Verlegungen wurde das Sammeln fortgeführt. Bedingt durch die individuelle Dauer des Klinikaufenthaltes gab es von manchen Studienteilnehmern mehr Proben als von anderen. Kinder, die noch vor ihrer Entlassung in der Klinik verstorben sind, wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen und ihre Proben und Daten vernichtet.

Für die Analyse des kindlichen Mikrobioms wurden aus der Biobank zusammen mit unseren Kooperationspartnern der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Ernährung und Immunologie (Prof. Dr. rer. nat. D. Haller) unter dem Hauptwirken von Nina Heppner (M.Sc.) die Stuhlproben derjenigen Kinder ausgewählt, die eine Stuhlprobe pro Lebenswoche im Beobachtungszeitraum bis zur Entlassung abgeben konnten. Gründe für ein Nicht-Vorliegen von Stuhlproben waren u.a. Vergessen der Abnahme, kein Stuhlgang, Versickern des flüssigen Stuhls in der Windel oder zu geringe Stuhlmenge für die weitere Analyse. 131 Studienteilnehmer wurden somit für die Mikrobiom-Analyse ausgewählt.

Für die Analysen des kindlichen Mikrobioms wurde aus der Biobank von jedem Studienteilnehmer 1 Stuhlprobe pro Lebenswoche im Beobachtungszeitraum verwendet.

### **2.3 Abnahme der Stuhlproben und Aufbau der Biobank**

Das Key-Element zur Beantwortung der Forschungsfragen bildete der Aufbau einer Biobank mit Stuhlproben der Studienteilnehmer. Um die entnommenen Proben mit den erhobenen klinischen Daten korrekt verbinden zu können, wurde

jedem Studienkind bei Geburt eine studieninterne Nummer zugeteilt. Die einzelnen Probenröhrchen eines jeden Kindes wurden mit dieser zugeteilten Nummer und dem Entnahmedatum beschriftet, sodass die Anonymität der Studienteilnehmer gewährleistet war.

Ab dem Tag der Geburt wurde jedem Kind sein eigenes Studien-Set zugewiesen, das durch die Doktoranden regelmässig aufgefüllt wurde. Dieses Set bestand aus einem Kalender zum täglichen Markieren der abgenommenen Stuhlproben als Gedankenstütze für die Schwestern, ob am Tag schon eine Probe abgenommen worden war oder nicht. Sterile Eppendorf Tubes zum Befüllen, sterile Spatel zur Probenentnahme und Etiketten waren weitere Hauptbestandteile des Sets. Die Schwestern entnahmen im Rahmen der Routineversorgung des Kindes täglich mit einem zuvor autoklavierten Spatel eine Stuhlprobe aus der Windel und füllten diese in ein steriles Eppendorf-Röhrchen. Danach wurde das Röhrchen mit dem oben genannten Etikett des Kindes beklebt. Nach Entnahme wurden die Proben umgehend auf Station bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Transport in das Labor gelagert.

Unter Wahrung der Kühlkette wurden die Proben durch die Doktoranden nach maximal 7 Tagen ins Mikrobiologische Labor im Dr. von Hauner'schen Kinderspital München transportiert. Nach Zuteilung einer laborinternen Nummer im Rahmen der Pseudonymisierung wurden die Proben mit der neuen Nummer und dem Entnahmedatum der Stuhlprobe gelabelt und in Boxen sortiert. Die Boxen wurden mit einem Koordinatensystem beschriftet. Durch Dokumentation der einzelnen Positionen der Proben mit Hilfe des Koordinatensystems war ein Finden einer bestimmten Probe für die weiteren Analysen möglich. Danach wurden die Boxen bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

## **2.4 Erhebung und Dokumentation der klinischen Daten**

Gleichzeitig wurden zu jedem Studienkind täglich die vorher bestimmten klinischen Daten aus der Patientenakte in eine Datenbank durch die Doktoranden übertragen. Somit konnte später das Mikrobiom der Proben jedes Kindes Taggenau mit dessen Entwicklung und Behandlung in Verbindung gebracht werden.



Zur Erfassung der klinischen Parameter wurde eine digitale Eingabemaske in Kollaboration mit unserem Kooperationspartner am Imperial College London verwendet. Unser Hauptansprechpartner am Imperial College war Dr Alexander Shaw, Research Associate, Department of Infectious Disease Epidemiology. Die Maske war für dort bereits im Rahmen klinischer Studien verwendet und auf die Bedürfnisse der NeoMuniCH Studie angepasst bzw. erweitert worden [81].

In die Datenmaske wurde ebenfalls die Studien- und laborinterne Nummer eines jeden Kindes übertragen. Nur so konnte später die Probe des Kindes den entsprechenden Daten zugeordnet werden.

Am Geburtstag erhielt jedes Kind ein Admission-Blatt mit folgenden Datenfeldern:

Variable	Beschreibung der Variablen	Art der Datenerhebung
<b>General</b>		
	Study number, Sex, Admission hospital, Date of Birth, Ethnicity	Klinische Akte
<b>Admission</b>		
	Gestational age, Birth weight, Single/multiple birth, Date of discharge, Discharge reason	Klinische Akte
<b>Maternal</b>		
	Date of birth, Gravida, Parity, Number of in utero deaths, Previous premature babies	Klinische Akte
<b>Family</b>		
	In utero deaths, Miscariages, Neonatal deaths, Genetic disorders, Consanguineous, Immunodeficiency, Inflammatory bowel syndrome, Crohn, Ulcerative Colitis, Other relevant diseases	Klinische Akte
<b>Labour Membranes</b>		
	Membranes ruptured (y/n), Induced (y/n/u), Artificial rupture (y/n/u)	Klinische Akte
<b>Maternal medication in labour</b>		
	IVAB given, antenatal steroids	Klinische Akte
<b>Mode of delivery</b>		
	NVD, Forceps, Electie/Emergency C-section ((no) ruptured membranes)	Klinische Akte
<b>Delivery Details</b>		
	APGAR, Weight of Placenta, Blood gas of cord	Klinische Akte
<b>Delivery Procedures and Placental Histology</b>		
	Intubated (just for surfactant), Surfactant given, Chorioamnionitis, Funistis	Klinische Akte

Tab. 7: Übertragene klinische Daten „Admission“. Die Eingabemaske wurde durch unseren Kooperationspartner am Imperial College London zur Verfügung gestellt.

Im weiteren Beobachtungszeitraum wurde die Eingabemaske täglich zu jedem Studienkind mit folgenden Werten bestückt:

Variable	Beschreibung der Variablen	Art der Datenerhebung
Daily summary report		
	Date, Location, Medication	Klinische Akte
Locatin		
	Incubator (y/n)	Klinische Akte
Respiratory		
	Ventilated-HFOV, Ventilated conventional, CPAP-air/oxygen, NP oxygen, SVIA, Apnoes requiring respiratory support	Klinische Akte
Cardiovascular		
	Inotropes, Fluid boluses, Lowest blood pressure, Bradycardies requiring respiratory support	Klinische Akte
Feeds - volume		
	Total volume, IV fluids (no TPN), TPN, Enteral, Donor-EBM, Maternal EBM, Extra, Hours between feeds	Klinische Akte
Route		
	NGT/OGT, Breast, Bottle	Klinische Akte
Gastrointestinal		
	Volume of gastric aspirates, Biliious aspirates, Number of stools in 24h, Occult blood in stool, Daily weight, Vomits/possits	Klinische Akte
Gastrointestinal clinical findings		
	Mildly distended abdomen, Marked abdominal distension, Lack of bowel sounds, Possible abdominal tenderness, Marked tenderness, Peritonitis, Possible abdominal cellulitis, Abdominal discoloration	Klinische Akte
Renal		
	Urine output (ml/kg/h), Passing urine	Klinische Akte
Sepsis		
	Max temperature, Temperature instability, Invasive lines (LL, UAC, UVC)	Klinische Akte
Radiographic criteria		
	intestinal dilation, Ileus, Pneumatosis intestinalis, Ascites, Pneumoperitoneum	Klinische Akte
Haematology		
	Hb, WCC, Neutrophils, Lymphocytes, Platelets, Fibrinogen, aPTT, DIC (requiring FFP/Vit K)	Klinische Akte
U&E		
	Sodium, Potassium, Urea, Creatinine, CrP	Klinische Akte
Blood gas		
	pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , Bicarbonate, BE, Lactate, Sampling method (CAP, VEN, ART)	Klinische Akte
Metabolic		
	Max and min glucose, Bilirubin, Phototherapy (y/n)	Klinische Akte
Microbiology		
	Blood culture, Survace swabs, Faeces, Urine, Other	Klinische Akte
Diagnose Nekrotisierende Enterokolitis		
	Einteilung nach klinischem Bild, radiologischen Kriterien und Infektionsbogen NEC, herausgegeben vom Nationalen Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ)	Klinische Akte
Diagnose Sepsis		
	Einteilung nach klinischem Bild und Infektionsbogen Sepsis, herausgegeben vom Nationalen Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ)	Klinische Akte

Tab. 8: Klinische Daten „Daily Report“. Die Eingabemaske wurde durch unseren Kooperationspartner am Imperial College London zur Verfügung gestellt.

Nach Abschluss der Rekrutierungsphase wurden die Rohdaten aufbereitet, damit die Daten zu Analyse Zwecken verwendet werden konnten. Hierfür war Nina Heppner mit ihrem Team hauptverantwortlich. Lisa Rogers, Bioinformatikerin und Laura Kolberg aus der AG von Both hatten dabei eine unterstützende Funktion. Im Ergebnisteil der Arbeit wird allerdings nur auf Nina Heppner verwiesen.

## 2.5 Analyse des Mikrobioms

Die 16S rRNA-Sequenzierung wurde von unseren Kollegen von der Core Facility Microbiome der Technischen Universität München in Freising durchgeführt. Die

Informationen hierüber wurden durch Nina Heppner (M.Sc.) an uns vermittelt. Folgendes Protokoll zur Methodik der NGS Sequenzierung wurde von der Core Facility zur Verfügung gestellt: [129]

Stuhlproben wurden aufgetaut und in 600 µl DNA Stabilisierungs-Puffer-Lösung resuspendiert (Strattec Biomedical). Die darauffolgende DNA-Extraktion wurde nach dem abgewandelten Protokoll [130] durchgeführt.

250 µl 4M Guanidinthiocyanat und 500 µl 5% (w/v) N-Laurolylsarcosine wurden zu den Proben dazugefügt. Zellen wurden mechanisch aufgelöst (3 x 6.5 m/s für 40 Sekunden): Hierfür wurden 500mg 0.1-mm Glaskugeln (Roth) und ein Bead-Beater, der mit einem Kühladapter versehen wurde, verwendet.

Anschließend wurden 15mg PVPP (Poly-Vinylpolypyrrolidon) dazugefügt, im Vortexer gemischt und anschließend zentrifugiert (3 Minuten für 15.000xg bei 4°C). Danach wurden 500 µl Überstand mit 5 µl Ribonuclease (10 mg/mL) für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Für die endgültige Aufreinigung wurde ein NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die notwendigen Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Konzentrationen und Reinheit wurden mit Hilfe des NanoDrop Systems (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Wurden Proben nicht unverzüglich verarbeitet, wurden diese bei -20°C zwischengelagert.

Für die Amplicon-Bibliothek (V3-V4 Regionen) und die Sequenzierung wurde die PCR-Methode verwendet (15 Zyklen): 12 ng metagenomische DNA wurde mit Bakterien-spezifischen Primern 341F und 785R versehen [131]. Dies wurde mit 15 PCR-Zyklen wiederholt, um eine Amplifikations-Bias zu vermeiden [132].

Nach der Reinigung mit dem AMPure XP System (Beckmann), wurde die Sequenzierung im „Pair-End-Modus“ (PE275) mit 25% (vol:vol) zugesetzten Proben aus der PhiX Standard Bibliothek im MiSeq System (Illumina Inc.) durchgeführt. Diese wurden nach Herstellerangaben vorbereitet [129].

## 2.6 Verarbeitung Sequenzierdaten

Die Verarbeitung und Auswertung der Sequenzierdaten wurden von unserem Kooperationspartner der Technischen Universität, Lehrstuhl für Ernährung und Immunologie (Prof. Dr. rer. nat. D. Haller) unter dem Hauptwirken von Frau Nina Heppner (M.Sc.) durchgeführt. Nachstehende Information zum Prozess der Analyse wurde uns zur Verfügung gestellt.

The platform IMNGS (Integrated Microbial Next Generation Sequencing) developed by members of the Technical University of Munich [133] was used to trim and align raw sequence reads (FASTQ files). An offline IMNGS version provided by Dr. Sandra Reitmeier, Core Facility Microbiome, TUM was used (NGSToolkit v6.0.2-beta.5). The IMNGS platform can be downloaded on github or used as an online version. A 0.25% relative abundance filter was applied in the pipeline. IMNGS is a UPARSE based analysis pipeline (PMID:23955772). No demultiplexing was performed, pairing, quality filtering and OTU clustering (97% identity) was done by USEARCH 8.0 (PMID:20709691). Chimera filtering by UCHIME (PMID:21700674) (with RDP set 15 as a reference database). Removal of non-16S or non-18S sequences was done with SortMeRNA v4.2 with SILVA release 128 as reference (PMID:23071270). Sequence alignment and taxonomic classification was made possible using SINA 1.6.1, using the taxonomy of SILVA release 128 (PMID: 22556368). Tree calculation was done using Fasttree (PMID:20224823). Samples with very low read counts or bad sequencing quality were later manually removed. A final number of 771 samples went in to further analysis with a total of 1096 zOTUs detected.

Further analysis was performed with the platform Rhea which is a freely available set of R-scripts run in a R-studio environment (available on github). Rhea was used in the version Lagkouravdos-Rhea-v1.1.5-22-gbea2174 from October 12, 2020. Normalization and microbiome analysis such as alpha-Diversity and taxonomic binning were performed with Rhea. A normalization cutoff of 10 000 was used as a fixed value and for alpha diversity a normalized cutoff value of 10 000 was applied. More information about the Rhea pipeline can be found at [134]. The phylogenetic tree was generated using an online visualization tool called Evolvew v3 [135].

## 2.7 Biostatistische Auswertung

In diesem Abschnitt wird auf die Klassifizierung und Gruppenbildung im Rahmen der statistischen Auswertung eingegangen:

Zur Analyse und Auswertung der Proben im Zusammenhang mit der Antibiotika-Gruppierung wurden folgende Definitionen festgelegt:

Um den oben genannten Fragestellungen nachzugehen, wurden die Studienkinder verschiedenen, Antibiotika-Wirkstoff-abhängigen Gruppen zugeordnet.

An beiden Standorten erhielten die Frühgeborenen von Geburt an eine empirische Antibiotikagabe. Es waren überwiegend die Schemata Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam etabliert.

In die **Ampicillin/Cefotaxim**-Gruppe fielen alle Kinder, die von Geburt an die Kombination dieser beiden Antibiotika bekommen hatten.

In die **Piperacillin/Tazobactam**-Gruppe fielen Kinder, die von Geburt an die Kombination aus Piperacillin und Tazobactam erhielten. In der Datenbank wurde jeder Wirkstoff einzeln erfasst. Da Tazobactam als Co-Wirkstoff allerdings nicht ohne das Beta-Lactam-Antibiotikum Piperacillin gegeben wird, wurden diese beiden Wirkstoffe zu einem Antibiotikum zusammengefasst. Ampicillin und Cefotaxim wurden als eigenständige Wirkstoffe gesehen.

Einige Kinder fielen in die Gruppe **Others**. Hier bekamen die Kinder gleichzeitig zu den beiden oben genannten Haupt-Schemata von Geburt an noch ein anderes Antibiotikum oder bekamen weder Pip/Taz noch Amp/Cefo sondern ein oder mehrere andere Antibiotika.

Folgende Antibiotika wurden in der Studie über den Beobachtungszeitraum verabreicht:

Ampicillin	Erythromycin
Cefazolin	Fosfomycin
Cefotaxime	Meropenem
Ceftazidime	Metronidazole
Cefuroxime	Moxifloxacin
Chloramphenicol	Ofloxacin
Clarithromycin	Piperacillin/Tazobactam
Clindamycin	Tobramycin
Cotrimoxazole	Vancomycin

Tab. 9: Antibiotika-Wirkstoffe, die im Beobachtungszeitraum an den Studienorten verabreicht wurden.

Die Gruppe „None“ kam in dieser Studie nur einmal vor. Hier wurden diejenigen Studienteilnehmer dazugezählt, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes kein Antibiotikum erhielten.

Neben den Hauptschemata Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam, gab es noch Kinder, die mit diesen Solo-Präparaten starteten und im weiteren Verlauf noch weitere Antibiotika erhielten. Diese Gruppen erkennt man an dem Zusatzwort **Plus**.

Bei der deskriptiven Statistik bezüglich der beiden Antibiotika-Schemata wurden die Plus-Gruppen jeweils mitgezählt.

Die Gruppe **Ampicillin/Cefotaxim Plus** wurde noch weiter eingruppiert in **Later**, **Following** und **Overlap**. Die Overlap-Gruppe wurde von den Kindern gebildet, die überlappend zu Ampicillin/Cefotaxim ein weiteres Antibiotikum erhielten. In die Following Gruppe fielen die Kinder, die nach Ende von Ampicillin/Cefotaxim direkt im Anschluss ohne einen Tag Pause ein weiteres Antibiotikum erhielten. Die letzte Gruppe „Later“ wurde von den Kindern gebildet, die nach Ende von Ampicillin/Cefotaxim mindestens ein Tag Pause hatten, sprich kein Antibiotikum erhielten, bevor ein neuer antimikrobiell aktiver Wirkstoff gegeben wurde.

Auch was die Dauer der Antibiotika-Gabe angeht, wurden allgemeine Zuordnungsregeln aufgestellt: Wurde laut Dokumentation Piperacillin kürzer als Tazobactam gegeben, so wurde die Gesamt-Einnahmedauer auf die Einnahme

von Tazobactam verlängert, da Tazobactam nicht als eigenständiges Antibiotikum gegeben wurde. Erhielt ein Kind Cefotaxim länger als Ampicillin, so wurde die Gesamtdauer der Gabe auf die gemeinsame Gabe von Ampicillin/Cefotaxim reduziert.

In der Ampicillin/Cefotaxim Gruppe wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung je nach Dauer der Antibiotika-Verabreichung gab. Da der Pool an Studienteilnehmern in der Gruppe „Dauer der Gabe > 48 Stunden“ am grössten war, wurde diese Gruppe für die weitere Unterteilung in Gabe für **3 Tage**, 4 und 5 Tage (**4/5 Tage**) und mehr als 5 Tage (**6+Tage**) zur Beantwortung der Fragestellung nach Auswirkungen der Dauer der Antibiotikagabe bestimmt. Kinder, die Ampicillin/Cefotaxim für maximal 48 Stunden erhielten (n=7) wurden bei dieser Betrachtungsweise nicht berücksichtigt.

Zur Beschreibung des Mikrobiom-Verhaltens unter Antibiotika-Therapie wurden die Mikrobiom-Beschreibungs-typischen Parameter „Microbiome Richness“ in Form von zOTUs und „Microbiome Diversity“ durch den sog. Shannon-Index beschrieben. [76]

Als Richness wird die Gesamtanzahl der Bakterien in einer Stuhlprobe bezeichnet. Die OTU (= Operational Taxonomic Unit) ist ein Parameter, mit dem die Gesamtzahl beschrieben werden kann. Organismen, die zu 97% in ihrer DNA ähnlich sind, werden zu einer OTU zusammengefasst.[76]

Der Shannon-Index ist ein Parameter der sogenannten Alpha-Diversität, also der Anzahl der verschiedenen Bakterienarten pro Probe, d.h. er drückt aus, wie viele unterschiedliche Arten in einer Probe sind.[76] Im übertragenen Sinn kann man sagen, der Shannon-Index sagt aus, wie bunt das Bild ist.

Für die statistische Auswertung, die überwiegend durch Nina Heppner (M.Sc.) durchgeführt wurde, wurde das Statistik-Programm Graph Prism 9.5.1. verwendet. Es wurden durch Nina Heppner folgende statistische Tests angewendet: Für die Beschreibung der Studienpopulation wurde eine rein deskriptive Statistik durch Gabriela Reichard verwendet. Für die Erstellung der Richness- und

---

Shannon-Graphen wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Testes geprüft, ob die Daten normalverteilt waren. Für die weiteren Vergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test und der Dunn's Test für mehrfache Vergleiche verwendet.



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Kohortenbeschreibung

Im Beobachtungszeitraum Januar 2017 bis Januar 2019 wurden am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität 202 Frühgeborene (< 32. SSW) geboren, davon 108 am Standort Grosshadern (Rekrutierungsphase 07/2017 bis 01/2019) und 94 am Standort Innenstadt (Rekrutierungsphase 01/2017 bis 01/2019). Von den 202 Frühgeborenen wurden insgesamt 166 Kinder in die Neo-MuniCH-Studie eingeschlossen: 84 Kinder am Standort Grosshadern und 82 Kinder in der Innenstadt. 36 Frühgeborene wurden nicht in die Studie aufgenommen. Gründe für den Ausschluss waren: Kein Vorliegen des Einverständnisses der Eltern innerhalb von 72h nach Geburt, Tod eines Studienteilnehmers im Beobachtungszeitraum, Zeitfenster der Aufklärung innerhalb von 72h nach Geburt konnte durch das Team der NeoMuniCH-Studie nicht eingehalten werden.

Eine kontinuierliche Probenakquise, d.h. die Abgabe von mindestens 1 Stuhlprobe pro Lebenswoche war bei 131 Kindern möglich. Im Folgenden werden diese 131 Kinder als Gesamt-/ Studienpopulation bezeichnet.

Die Gesamtpopulation hatte ein durchschnittliches Gestationsalter von 201.5 (+/- 16.69) Tagen. Die Population bestand zu 64.1% aus Jungen, Mädchen machten einen geringeren Anteil mit 35.9% aus. Das Geburtsgewicht der Studienpopulation lag bei 1171 (+/- 403.5) Gramm, sodass der überwiegende Teil der Studienpopulation unter die Rubrik „sehr niedriges Geburtsgewicht“ (*siehe Tab. 1*) fiel. Die Mehrheit der Studienteilnehmer wurde per Kaiserschnitt geboren (82.4%). Nur 23 Kinder (17.6%) wurden vaginal geboren. Von den 131 Kindern waren 30.5% Mehrlingsgeburten.

Es wurden im Durchschnitt von jedem Kind 5.9 Stuhlproben während des Klinikaufenthaltes gesammelt. Von der Studienpopulation waren 57 Kinder (43.5%) am Standort Grosshadern, 74 Kinder (56.5%) am Standort Innenstadt. Im Schnitt erhielt jedes Kind 2.947 +/- 1.561 verschiedene Antibiotika-Wirkstoffe während des Klinikaufenthaltes, dessen Länge im Mittelwert 62.71 (+/- 32.21) Tage betrug. Die Gesamtdauer der Antibiotikagabe lag im Durchschnitt bei 15.56 (+/- 22.41) Tagen.

	ALL	Ampi/Cefo	PipTaz	Others	None
Gestational Age (Days) <i>Mean +/- SD</i>	<b>201.5 +/- 16.69</b>	204.2 +/- 15.51	198.4 +/- 17.45	195.2 +/- 18.05	217 +/- 0
Number of Antibiotics <i>Mean +/- SD</i>	<b>2.947 +/- 1.561</b>	2.89 +/- 1.267	2.45 +/- 2.114	3.571 +/- 1.687	0 +/- 0
LOCATION					
GH (%)	<b>57 (43.5)</b>	31 (37.8)	18 (90)	8 (28.6)	0 (0)
INN (%)	<b>74 (56.5)</b>	51 (62.2)	2 (10)	20 (71.4)	1 (100)
NUMBER OF CHILDREN					
Single Birth (%)	<b>91 (69.5)</b>	52 (63.4)	16 (80)	22 (78.6)	1 (100)
Multiple Birth (%)	<b>40 (30.5)</b>	30 (36.6)	4 (20)	6 (21.4)	0 (0)
Birth Weight (Gramm) <i>Mean +/- SD</i>	<b>1171 +/- 403.5</b>	1215 +/- 385.9	1110 +/- 487.8	1066 +/- 374.3	1680 +/- 0
SEX					
Male (%)	<b>84 (64.1)</b>	55 (67.1)	11 (55)	18 (64.3)	0 (0)
Female (%)	<b>47 (35.9)</b>	27 (32.9)	9 (45)	10 (35.7)	1 (100)
MODE OF DELIVERY					
C-section (%)	<b>108 (82.4)</b>	68 (82.9)	19 (95)	20 (71.4)	1 (100)
Vaginal (%)	<b>23 (17.6)</b>	14 (17.1)	1 (5)	8 (28.6)	0 (0)
Length Hospital Stay (Days) <i>Mean +/- SD</i>	<b>62.71 +/- 32.21</b>	56.06 +/- 25.65	75.85 +/- 39.68	74 +/- 38.44	29 +/- 0
Stool Samples Per Child <i>Mean</i>	<b>5.9</b>	5.6	6.0	6.8	4.0
Duration Of Antibiotics (Days) <i>Mean +/- SD</i>	<b>15.56 +/- 22.41</b>	11.21 +/- 13.45	24.15 +/- 29.64	22.71 +/- 32.91	0 +/- 0

Tab. 10: Überblick über die Studienkohorte in ihrer Gesamtheit und Aufteilung nach Antibiotika-Schemata Ampicillin/Cefo, PipTaz, Others und None. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik durch Gabriela Reichard.

### 3.2 Aufteilung der Studienkohorte nach Antibiotika

Von den insgesamt 131 Teilnehmern befanden sich 82 Kinder in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe. 48 Kinder erhielten ausschliesslich Ampicillin/Cefotaxim. Bei 34 Studienteilnehmern wurde zusätzlich zu Ampicillin/Cefotaxim mindestens ein weiteres Antibiotikum gegeben. Bei den 48 Kindern, die ausschliesslich Ampicillin und Cefotaxim erhalten haben, wurde noch die Dauer der Antibiotikagabe direkt nach Geburt unterschieden. 7 Kinder erhielten die Kombination maximal 48 Stunden, hingegen 41 Teilnehmer erhielten die Kombination mehr als 48 Stunden.

Auch die Gruppe Ampicillin/Cefotaxim PLUS wurde weiter unterteilt. 17 Studienteilnehmer fielen unter die Gruppe "Overlap", 10 Kinder fielen unter die Rubrik "Following". Die Gruppe "Later" setzte sich aus 7 Kindern zusammen.

Von den 131 Studienteilnehmern erhielten 20 Kinder das Schema Piperacillin/Tazobactam. 11 Kinder erhielten ausschließlich Piperacillin/Tazobactam, hingegen 9 Kinder bekamen neben dem Schema noch mindestens einen weiteren Wirkstoff. In dieser Subgruppe wurde allerdings nicht nach "Overlap", "Following" oder "Later" unterschieden.

28 Studienteilnehmer bildeten die Gruppe Others. Die Verteilung auf die einzelnen Wirkstoffe wurde nicht abgebildet, die verabreichten Wirkstoffe jedoch erwähnt.

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes gab es nur ein Kind, das nicht antibiotisch behandelt wurde. Das Mädchen wurde mit 1680 Gramm und einem Gestationsalter von 217 Tagen per Kaiserschnitt in der Innenstadt geboren. Für die weiteren Analysen und Untersuchungen wurde dieses Kind nicht berücksichtigt.

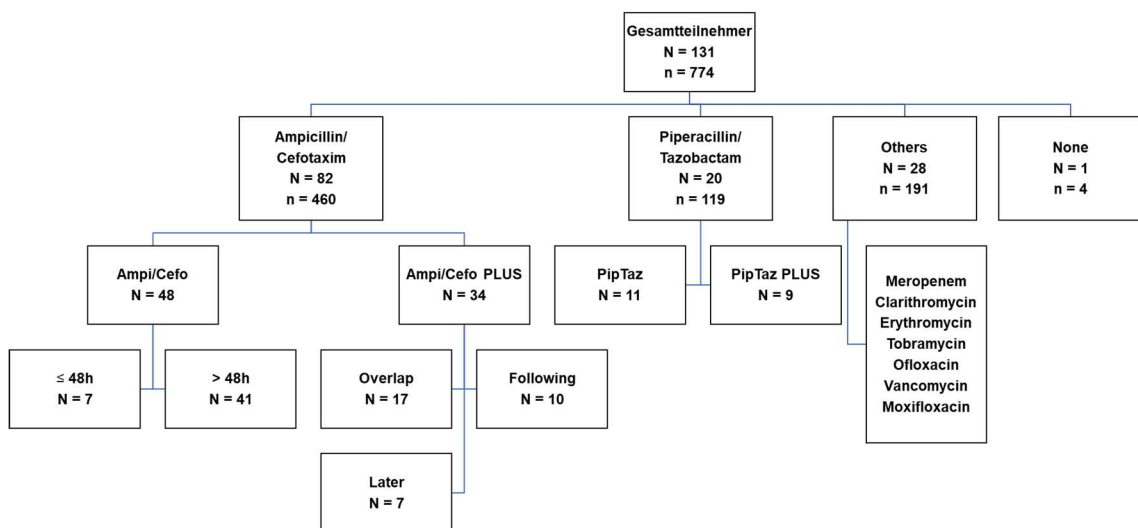


Abb. 10: Überblick über die Anzahl der Studienteilnehmer in den Antibiotika-Gruppen Ampicillin/Cefotaxim, Piperacillin/Tazobactam, Others und None. Weitere Subgruppenbildung in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe und Ampicillin/Cefotaxim Plus-Gruppe. N= Anzahl Studienteilnehmer, n= Anzahl Stuhlproben. Datenaufbereitung durch Nina Heppner, (M.Sc.). Grafik durch Gabriela Reichard.

### 3.3 Deskriptive Statistik

Im Folgenden werden einige Aspekte der Kohortenbeschreibung für die beiden Gruppen Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam näher betrachtet.

Es ist anzumerken, dass bei den Grafiken die Plus-Gruppen jeweils mitgezählt wurden. Die Graphen beziehen sich auf Ampicillin/Cefotaxim N=82 und Piperacillin/Tazobactam N=20.

### 3.3.1 Studienort

Die Kombination Ampicillin/Cefotaxim (N=82) erhielten 31 Kinder (37.8%) in Grosshadern und 51 Kinder (62.2%) in der Innenstadt.

Piperacillin/Tazobactam (N=20) wurde in Grosshadern häufiger verabreicht als in der Innenstadt: In Grosshadern erhielten hiervon 18 Studienteilnehmer Piperacillin/Tazobactam (90%), in der Innenstadt waren es 2 Kinder (10%).

Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Verteilung der Studienteilnehmer innerhalb der Gesamtzahl der Antibiotika-Gruppen (A/C= 82 Kinder und P/T = 20 Kinder) und nicht auf die Gesamtkohortenzahl.

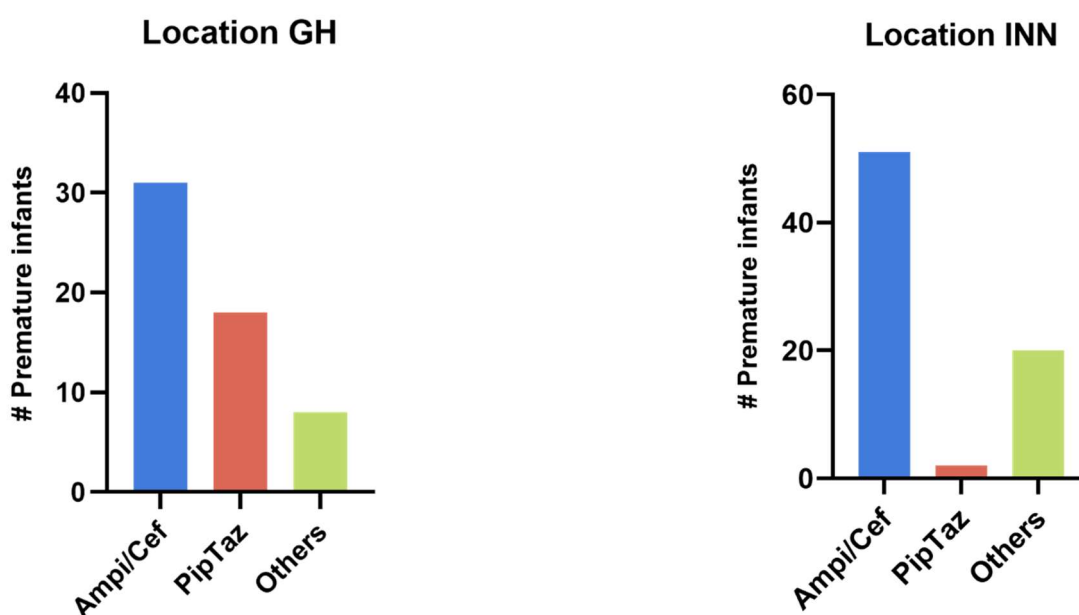


Abb. 11: Anzahl der Studienteilnehmer mit den Subgruppen Ampil/Cef (blau), PipTaz (rot), und Others (grün) am Standort Grosshadern (GH). Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.

Abb. 12: Anzahl der Studienteilnehmer mit den Subgruppen Ampil/Cef (blau), PipTaz (rot), und Others (grün) am Standort Innenstadt (INN). Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.

### 3.3.2 Geburtsgewicht und Gestationsalter

Kinder, die die Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe (N=82) bildeten, hatten im Durchschnitt bei Geburt 1215 (+/-385.9) Gramm, die Kinder der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe (N=20) hatten 1110 (+/- 487.8) Gramm. Das geringste Geburtsgewicht hatten die Kinder der Gruppe "Others" (N=28) mit 1066 (+/- 374.3) Gramm.

Kinder aus der Gruppe Ampicillin/Cefotaxim (N=82) waren bei Geburt im Durchschnitt 204.0 (+/- 15.51) Tage alt, Kinder aus der Pip/Taz Gruppe (N=20) 198.4 (+/- 17.45) Tage. Die Kinder aus der Gruppe "Others" (N=28) waren mit einem Wert von 195.2 (+/- 18.05) Tagen am jüngsten bei der Geburt.

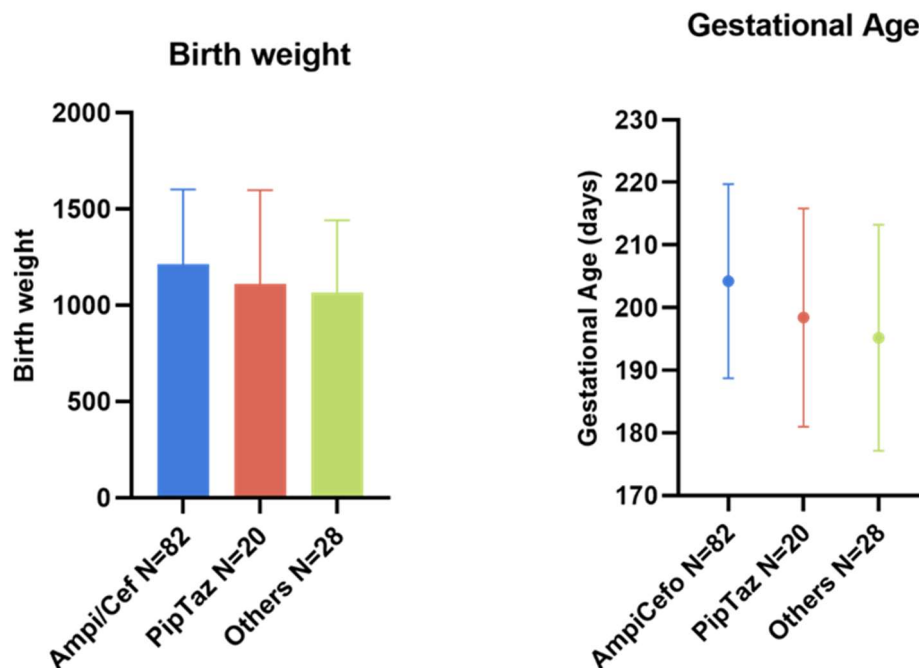


Abb. 13: Geburtsgewicht (in Gramm) der Studienteilnehmer (N= Anzahl der Studienteilnehmer) mit den Subgruppen Ampicillin/Cefotaxim N=82 (blau), Pip/Taz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufarbeitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.

Abb. 14: Gestationsalter (in Tagen) der Studienteilnehmer (N= Anzahl der Studienteilnehmer), mit den Subgruppen Ampicillin/Cefotaxim N=82 (blau), Pip/Taz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufarbeitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.

### 3.3.3 Dauer der Gabe der einzelnen Antibiotika-Wirkstoffe

Listet man alle in der Studie verabreichten Antibiotika auf, so wird ersichtlich, dass Clindamycin das am längsten verabreichte Antibiotikum mit 48 Tagen darstellt (N=1) gefolgt von Meropenem (N=31) mit 20.06 (+/-29.80). Piperacillin/Tazobactam wurde im Durchschnitt 16,95 (+/- 25.24) Tage verabreicht. In diesem Graphen wird ersichtlich, dass in der Gruppe Ampicillin/Cefotaxim die Gabe der einzelnen Wirkstoffe im Gegensatz zur Pip/Taz-Gruppe variiert hat. Ampicillin wurde für 4,07 (+/- 3.154) Tage und Cefotaxim im Schnitt für 6,38 (+/-14.88) Tage gegeben.

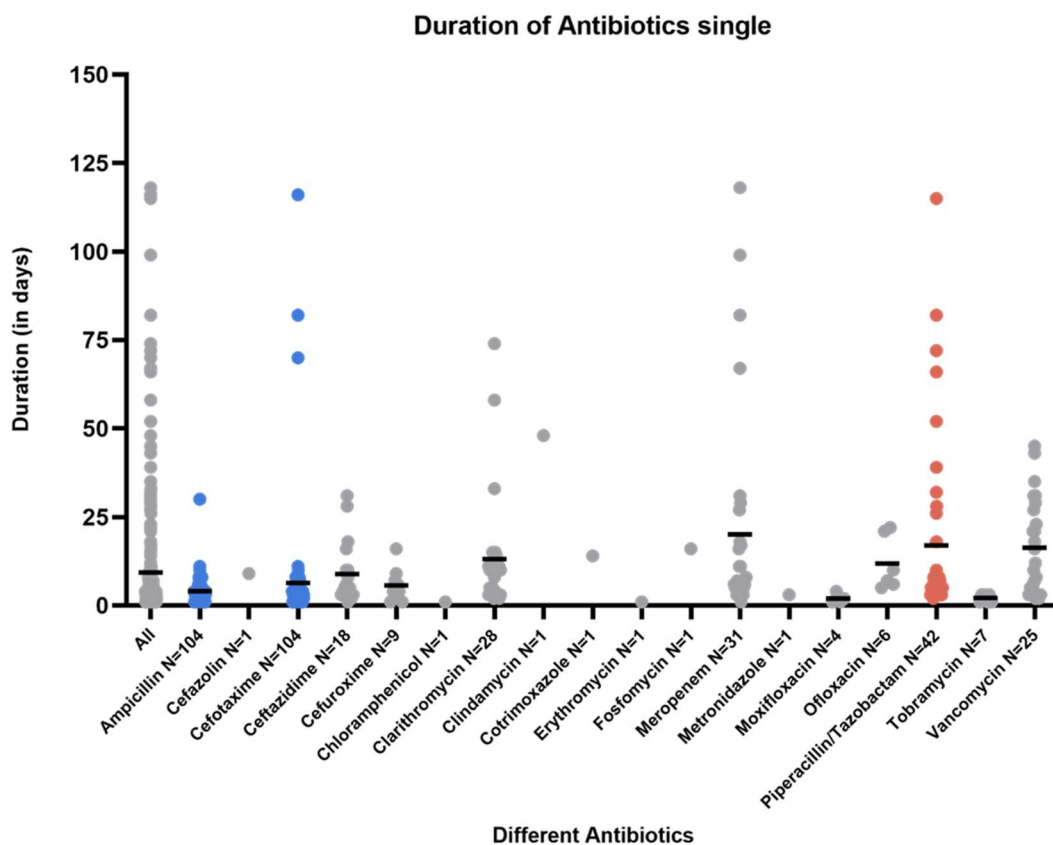


Abb. 15: Dauer der Gabe (in Tagen) der einzelnen Antibiotika-Wirkstoffe. Angabe der Studienteilnehmer (N=Anzahl der Studienteilnehmer), die die jeweiligen Wirkstoffe erhalten haben. Jeder Punkt stellt einen Studienteilnehmer dar, der dieses Antibiotikum erhalten hat. Ampicillin/Cefotaxim (blau), Piperacillin/Tazobactam (rot), Others (grau). Line at mean. Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.3.4 Gesamtdauer der Gabe der betrachteten Antibiotika-Schemata

Kinder, die in der Amp/Cef Gruppe (N=82) waren, wurden im Durchschnitt 11.21 (+/- 13.45) Tage antibiotisch abgedeckt. Kinder in der PipTaz-Gruppe (N=20) erhielten im Durchschnitt 24.15 (+/- 29.64) Tage Antibiotikum. Den Kindern, die in die Others-Gruppe (N=28) fielen, wurde für 22.71 (+/- 32.91) Tage Antibiotikum gegeben.

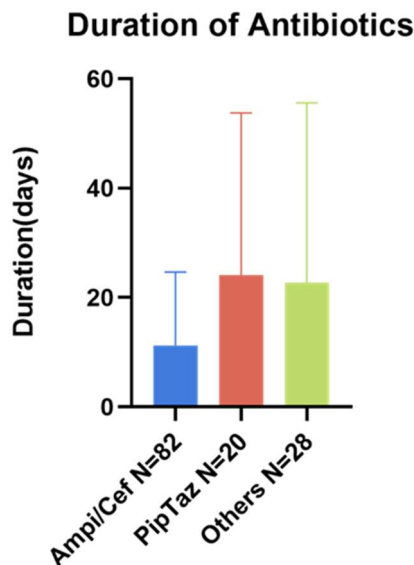
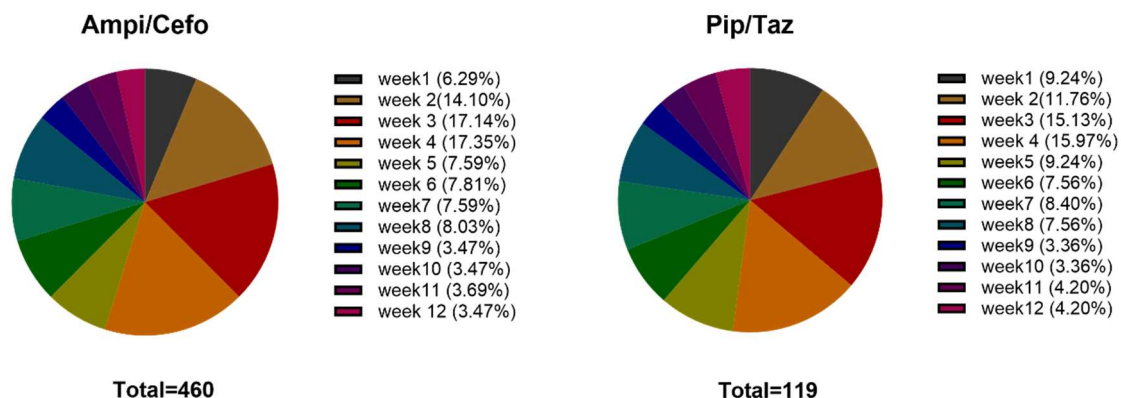


Abb. 16: Gesamtdauer (in Tagen) der Antibiotikagabe, aufgeteilt auf die Antibiotikagruppen Ampic/Cef N=82 (blau), PipTaz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.

### 3.3.5 Verteilung der vorhandenen Stuhlproben auf die Lebenswochen

Es gab einige Studienteilnehmer, die bis zu ihrer 12. Lebenswoche oder länger hospitalisiert waren. Der Beobachtungszeitraum streckt sich für die Mikrobiom-Analyse von der ersten bis zur zwölften Lebenswoche. Bei Abgabe von mindestens einer Stuhlprobe pro Woche konnte gezeigt werden, dass in Woche 4 in allen drei Subgruppen (Ampicillin/Cefotaxim, Piperacillin/Tazobactam, Others) die meisten Proben gesammelt beziehungsweise qualitativ hochwertige Sequenziererergebnisse generiert werden konnten. Die sich nach dieser Woche reduzierende Anzahl der Stuhlproben lässt sich damit erklären, dass sehr viele Kinder nach der vierten Woche vermehrt entlassen werden konnten.



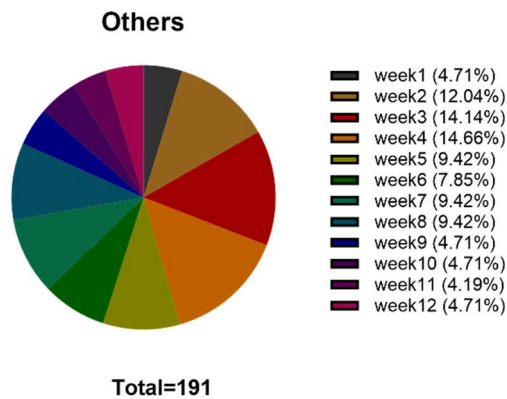


Abb. 17: Verteilung (in %) der vorhandenen Stuhlproben (Total= Gesamtzahl der Stuhlproben) innerhalb der Antibiotikagruppen Amp/Cefo, Pip/Taz und Others innerhalb des Beobachtungszeitraumes (week 1 bis 12). Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.4 Richness und Shannon in Abhängigkeit der Lebenswochen

Der folgende Absatz liefert die Ergebnisse zu der Fragestellung ob und ab welchem Zeitpunkt nach Antibiotika-Start man eine verringerte Diversität feststellen kann und unter welchem Schema eine verringerte Diversität nachweisbar ist.

#### 3.4.1 Darstellung im Gesamtbeobachtungszeitraum

Die PipTaz-Gruppe hat in Woche 1 die höchste Richness mit einem Durchschnittswert von 140.18 (+/- 20.04) zOTUs. Danach nimmt die Gesamtanzahl der Bakterien bis Woche 6 auf einen Durchschnittswert von 55.56 (+/- 9.73) zOTUs ab. Von Woche 7 bis Woche 9 steigt die Richness gering an, erreicht einen Steady State bei durchschnittlich 74.74 zOTUs und nimmt dann im weiteren Beobachtungszeitraum geringgradig weiter ab, sodass in Woche 12 ein Wert von 62.40 (+/- 20.23) zOTUs erreicht wird

Die AmpCefo-Gruppe startet auch mit einer hohen Richness von durchschnittlich 88.59 (+/- 8.85) zOTUs. Diese ist geringer – im Vergleich zur PipTaz-Gruppe – fällt von Woche 1 auf Woche 2 ebenfalls ab und pendelt sich in Woche 7 und 8 auf ein Plateau von durchschnittlich 50.94 zOTUs ein. Ab Woche 10 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes steigt die Richness allerdings wieder etwas an, sodass in Woche 12 ein durchschnittlicher Wert von 67.69 zOTUs (+/- 12.17) (in Vergleich zu 62.40 zOTUs der PipTaz-Gruppe) erreicht wird.



Die AmpicCefo-Gruppe hat den niedrigsten Richness-Durchschnittswert mit 34.49 (+/- 3.16) zOTUs in Woche 5, die PipTaz-Gruppe mit durchschnittlich 53.40 (+/- 7.49) zOTUs in Woche 11.

Die Grafik zeigt, dass die Richness im Beobachtungszeitraum von Woche 1 bis 12 in der PipTaz-Gruppe stärker abnimmt als in der AmpicCefo-Gruppe, im gesamten Zeitraum bis zur Woche 11 jedoch höher liegt als in der AmpicCefo-Gruppe. In Woche 12 ist die Richness in der AmpicCefo-Gruppe mit durchschnittlich 67.69 (+/12.17) zOTUS geringgradig höher (im Vergleich zum 62.40 (+/- 20.23) zOTUS in der Pip/Taz-Gruppe). Auf die Others-Gruppe wird im Detail nicht eingegangen. Es kann allerdings erwähnt werden, dass diese Gruppe – bis auf einige Ausreisser – der AmpicCefo-Gruppe im Trend folgt.

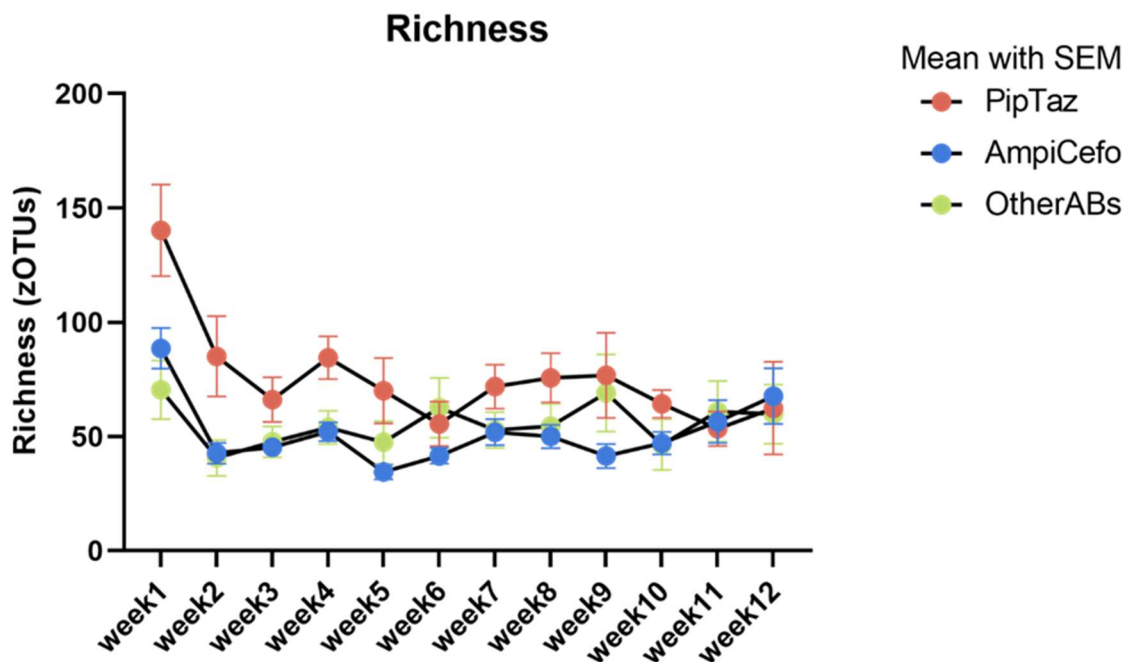


Abb. 18: Richness (in zOTUs), aufgeteilt nach Antibiotikagruppen PipTaz (rot), AmpicCefo (blau) und OtherABs (grün). Betrachtung in Abhängigkeit der Lebenswoche 1 bis 12. Mean (dot) with SEM. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Betrachtet man den Shannon Index, so startet die PipTaz-Gruppe bei einem durchschnittlichen Wert von 36.54 (+/- 10.75) und sinkt in der zweiten Lebenswoche auf durchschnittlich 15.68 (+/- 8.29). Im weiteren Verlauf pendelt sich die Gruppe auf einem durchschnittlichen, relativ niedrigen Plateau von 6.87 ein.

Die AmpicCefo-Gruppe verhält sich ähnlich, jedoch erreicht die Gruppe im Vergleich zur Pip/Taz-Gruppe deutlich geringere Werte. In der ersten Woche wird

ein Wert von 21.99 (+/- 3.75) erreicht. Der Wert fällt ebenfalls in der zweiten Lebenswoche rapide auf 4.60 (+/- 1.05) ab und pendelt sich zwischen Woche 3 und 11 auf einen durchschnittlichen ungefähren Wert von 4.94 ein. Der Shannon Index steigt allerdings am Ende des Beobachtungszeitraumes leicht an und erreicht einen durchschnittlichen Wert von 8.99 (+/-3.54), liegt also in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe leichtgradig höher.

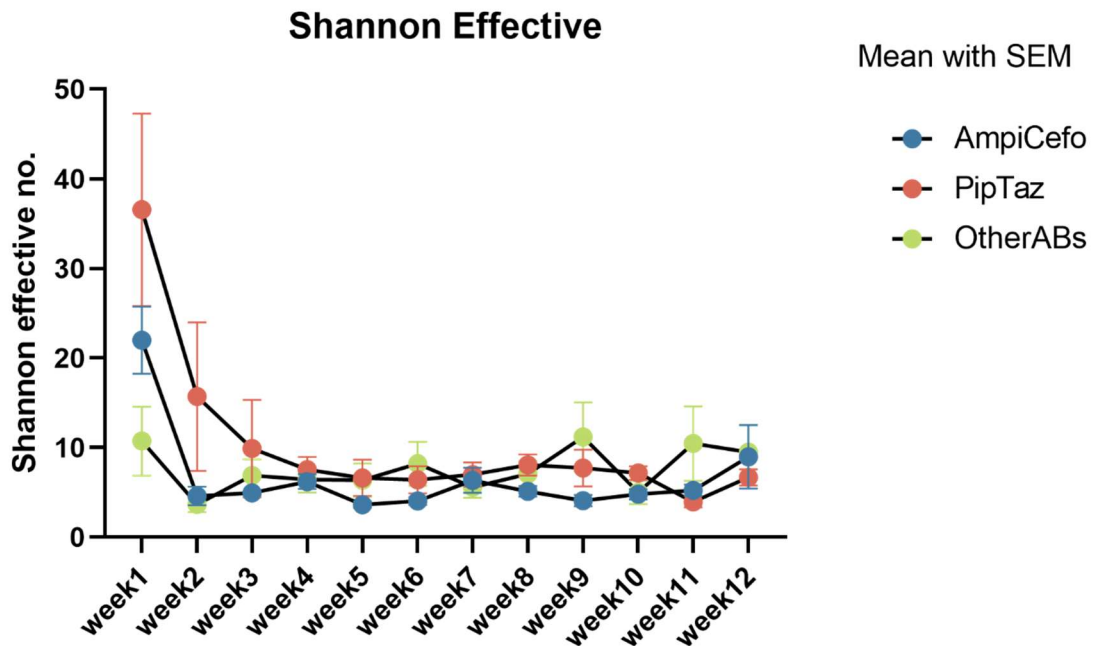


Abb. 19: Shannon-Index (in Shannon effective no.) aufgeteilt nach Antibiotikagruppen PipTaz (rot), AmpicCefo (blau) und Others (grün). Betrachtung in Abhängigkeit der Lebenswoche 1 bis 12. Mean (dot) with SEM. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.4.2 Darstellung anhand einzelner Lebenswochen

Im Folgenden werden die Wochen genauer betrachtet, bei denen der Unterschied von Shannon und Richness bei den beiden Antibiotika-Schemata relativ gross ist.

In den ersten beiden Lebenswochen sieht man einen signifikanten Unterschied bezüglich Gesamtanzahl an Bakterien zwischen der Gruppe Ampicillin/Cefotaxim (Median bei 33 zOTUs) und Piperacillin/Tazobactam (Median bei 128 zOTUs) ( $p= 0.0021$ ) und zwischen Piperacillin/Tazobactam und Others (Median bei 31 zOTUs) ( $p= 0.0010$ ). Die Menge an Bakterien ist in der Pip/Taz- Gruppe mit einem Median von 128 zOTUs am höchsten.

Betrachtet man die Artenvielfalt, ausgedrückt durch den Shannon-Index, so kann man einen signifikanten Unterschied ( $p= 0.0358$ ) zwischen der Piperacillin/Tazobactam und der Others Gruppe erkennen. Piperacillin/Tazobactam hat

mit 24.86 einen deutlich höheren Durchschnittswert als die Others Gruppe mit 5.66. Der Unterschied im Shannon von Ampicillin/Cefotaxim (Mean bei 9.97) und Piperacillin/Tazobactam war nicht signifikant ( $p > 0.05$ ).

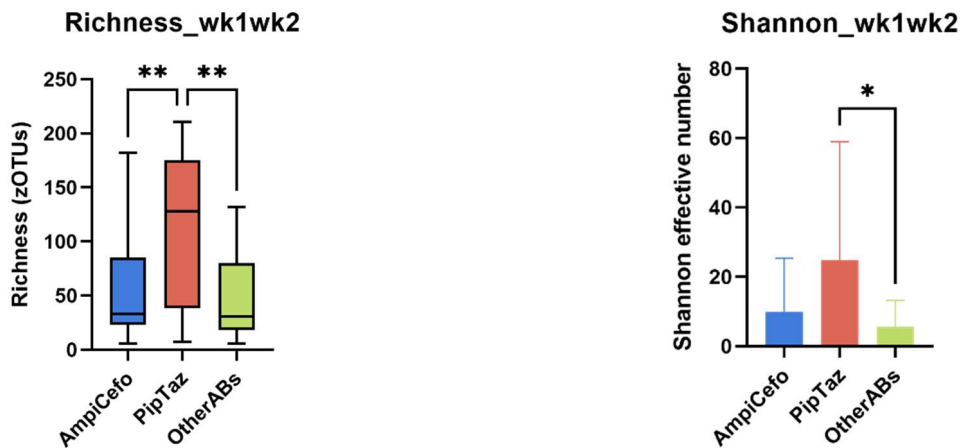


Abb. 20: Richness (in zOTUs) für Woche 1 und 2, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen AmpicCefo, PipTaz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Abb. 21: Shannon-Index (in Shannon effective number) für Woche 1 und 2, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen AmpicCefo, PipTaz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . Mean with SD. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Betrachtet man die Gesamtmenge an Bakterien in den Lebenswochen 3 und 4, so findet man einen signifikanten Unterschied ( $p=0.0001$ ) zwischen Ampicillin/Cefotaxim mit einem Median von 40 zOTUs und Piperacillin/Tazobactam mit einem Median von 62 zOTUs und einen signifikanten Unterschied ( $p=0.0019$ ) zwischen Piperacillin/Tazobactam und Others (Median bei 39 zOTUs). Auch in diesem Zeitraum findet man in den Stuhlproben der „Pip/Taz Kinder“ die meisten Bakterien.

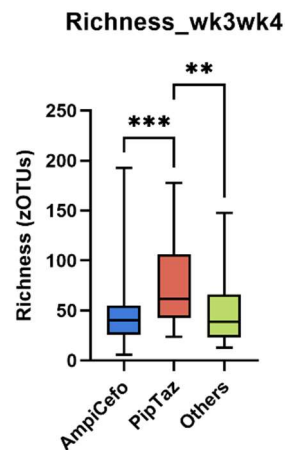


Abb. 22: Richness (in zOTUs) für Woche 3 und 4, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen AmpicCefo, PipTaz und "Others", \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Auch in der siebten und achten Lebenswoche weist die Pip/Taz-Gruppe mit Signifikanz ( $p=0.0139$ ) eine grössere Menge an Bakterien (Median bei 70 zOTUs) auf als die Ampic/Cefo-Gruppe (44 zOTUs).

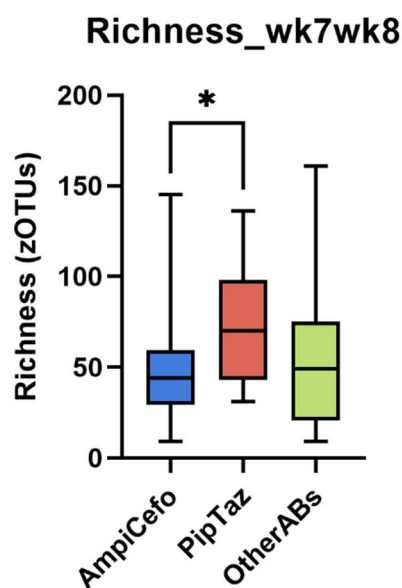


Abb. 23: Richness (in zOTUs) für Woche 7 und 8, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen AmpicCefo, Pip/Taz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

In den übrigen Lebenswochen gab es bei Richness und Shannon-Index keine weiteren signifikanten Unterschiede.

### 3.5 Shannon-Index in Abhängigkeit der Antibiotika-Gruppen

In diesem Kapitel geht man der Fragestellung nach, welches Schema mehr Einfluss im Sinne einer verringerten Diversität hat.

Betrachtet man den Shannon-Index aller Proben, so hat man in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe mit einem Durchschnittswert von 11.17 die höchste Diversität. In dieser Gruppe fällt jedoch auf, dass 3 Proben von einem Studienkind diesen Wert im Sinne eines Ausreißers nach oben treiben (dargestellt durch Dreiecke in der Grafik). Die Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe hat mit einem Durchschnittswert von 6.25 einen fast um die Hälfte reduzierten Shannon-Index im Vergleich zur Piperacillin/Tazobactam-Gruppe. Der Unterschied von Ampicillin/Cefotaxim zu Piperacillin/Tazobactam war signifikant ( $p < 0.0001$ ).

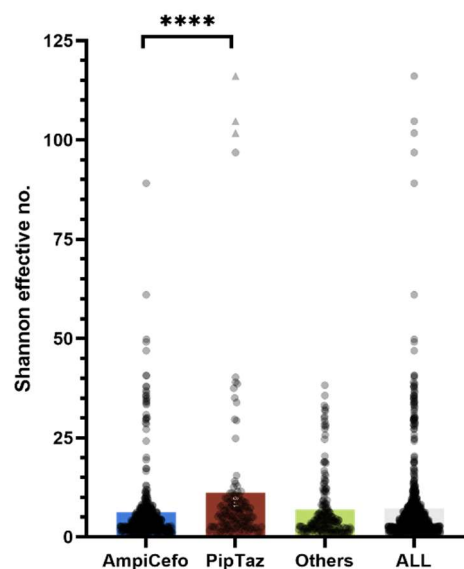


Abb. 24: Shannon-Index (in Shannon effective no.) aller Studienteilnehmer (inkl. Ausreißer ID 150), verteilt auf die Antibiotika-Schemata AmpiCefo (blau), PipTaz (rot), Others (grün) und ALL (schwarz). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Scatter plot mit box=mean. dots=single sample. Triangle=ID 150. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Betrachtet man den Shannon Effective Index ohne Studienteilnehmer 150 (=Ausreißer), so nimmt der Shannon-Index in der Pip/Taz-Gruppe verhältnismäßig ab. Die Pip/Taz Gruppe hat jedoch weiterhin den höchsten Shannon-Index mit einem Durchschnittswert von 8.7, sprich die größte Artenvielfalt in den Stuhlproben (im Vergleich zur Amp/Cefo-Gruppe mit 6.3). Der Unterschied war weiterhin signifikant ( $p = 0.0002$ ).

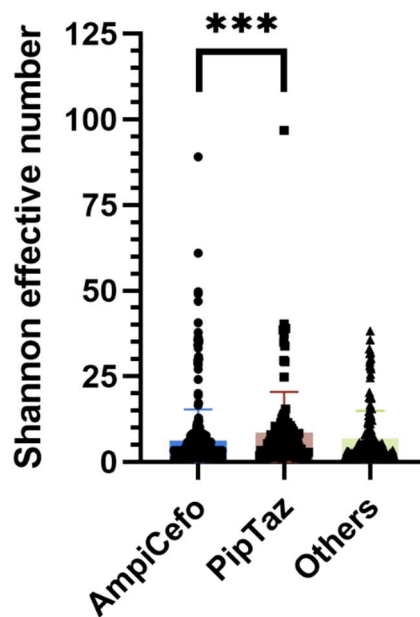


Abb. 25: Shannon-Index (in Shannon effective number) (exkl. Ausreisser ID=150), verteilt auf die Antibiotika-Schemata AmpicCefo (blau), PipTaz (rot) und Others (grün). \*\*\* $p \leq 0.001$ . Scatter plot mit box=mean with SD. Dots=single sample in AmpicCefo-group, square= single sample in PipTaz group, triangle= single sample in Others. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.6 Taxonomie der Bakterienstämme in Abhängigkeit von zwei verschiedenen Antibiotika-Schemata

Aus den Graphen der vorherigen Kapitel wird allerdings nicht ersichtlich, ob es sich in den einzelnen Antibiotika-Gruppen um eine hohe Artenvielfalt von Bakterienstämmen handelt, die zu einem physiologischen Mikrobiom beitragen oder ob es sich um Stämme handelt, die eine gesunde Mikrobiomentwicklung verhindern. Im Folgenden wird auf die Fragestellung eingegangen, welche Bakterienstämme in Abhängigkeit der beiden Antibiotika-Schemata dominant sind.

#### 3.6.1 Taxonomie in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe

Sieht man sich die taxonomische Zusammensetzung in Gesamtheit in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe an, so findet man eine klare Dominanz von *Enterobacteriaceae* mit 42.75%. Es wird hier jedoch weder nach Sample week noch nach unterschiedlicher Länge der Antibiotikagabe unterschieden. Die am zweithäufigsten auftretende Gruppe stellen die *Enterococcaceae* mit 16.29% dar, gefolgt von

den *Staphylococcaceae* mit 15.17%. Die restlichen Stämme sind eher adominant. Zu beachten ist noch der Anteil der *Bifidobacteriaceae* mit 2.98%.

Taxonomy on Family Level: AmpicCefo Average

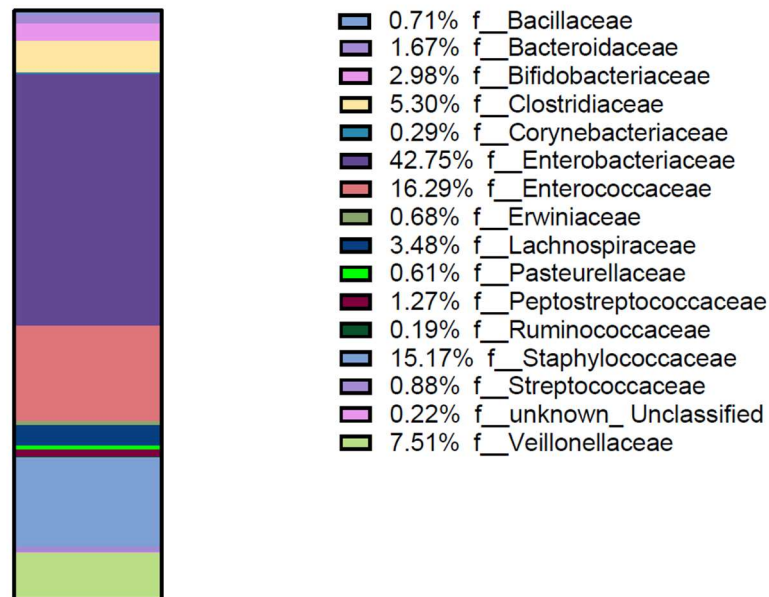


Abb. 26: Darstellung der Taxonomie (in %) auf dem Level Familie der Bakterienstämme in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)

### 3.6.2 Taxonomie in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe

Sieht man sich die taxonomische Zusammensetzung in Gesamtheit in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe an, so findet man eine klare Dominanz von *Enterobacteriaceae* mit 45.60%. Es wird ebenfalls nicht nach Sample week und nach unterschiedlicher Länge der Antibiotikagabe unterschieden. Die am zweithäufigsten auftretende Gruppe stellen die *Staphylokokken* mit 12.51% dar, gefolgt von den *Enterococcaceae* mit 9.90%. Die restlichen Stämme sind eher adominant. Der Anteil der *Bifidobacteriaceae* liegt bei 1.25%

Taxonomy on Family Level: PipTaz Average

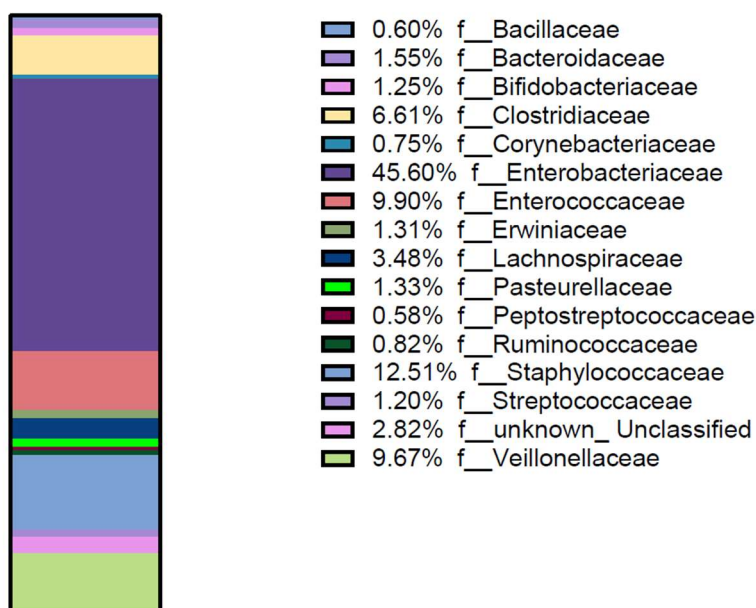


Abb. 27: Darstellung der Taxonomie (in %) auf dem Level Familie der Bakterienstämme in der Pip/Taz-Gruppe. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)

In beiden Antibiotika-Gruppen sind die *Enterobacteriaceae* die dominanten Bakterienstämme. Die Piperacillin/Tazobactam-Gruppe enthält mit 45.60% einen geringen grösseren Anteil als die Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe (42.75%). Die Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe enthält jedoch mehr *Enterococcaceae* (16.19% versus 9.90%) und *Staphylokokken* (15.17% versus 12.51%). Der Anteil an *Bifidobakterien* ist in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe mit 2.98% höher als in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe mit 1.25%.

### 3.7 Einzelfallbetrachtungen mit gegenläufigem Trend

Wie bereits oben erwähnt, gibt es in der Studienpopulation ein Kind in der Pip/Taz- Gruppe, das den Shannon-Index nach oben treibt. Hierbei handelt es sich um ein Kind, das mit einem Geburtsgewicht von 515 Gramm und einem Gestationsalter von 167 Tagen per Kaiserschnitt am Standort Grosshadern geboren wurde. Es erhielt für 56 Tage Antibiotika aus der Gruppe Pip/Taz Plus (insgesamt 6 verschiedene Wirkstoffe). Das Kind wurde für insgesamt 134 Tage stationär behandelt. Es war in Woche 1, 2 und 5 septisch (insgesamt 21 Tage) mit jedoch negativen Blutkulturen. Dabei ist zu beachten, dass von Woche 6 bis 10 aufgrund von mangelhafter Qualität die Stuhlproben nicht ausgewertet werden konnten und daher in der Analyse des Kindes mit der Studiennummer 150 nicht berücksichtigt wurden.



Betrachtet man dieses Kind isoliert, so fällt auf, dass es sich in Richness und Shannon gegenläufig zum Trend der Studienpopulation verhält:

Der Shannon-Index steigt innerhalb der zweiten Lebenswoche auf einen Maximalwert von 116.08 an und sinkt erst in der 4. Lebenswoche auf 13,49 ab und fällt in der kommenden Woche weiter auf 1.92. In Woche 11 zeigt der Shannon weiterhin sehr niedrige Werte von 3.34.

Die Richness startet bei 210 zOTUs, fällt – identisch zum Trend der Studienpopulation – auf 167 zOTUs in der 2. Lebenswoche, pendelt sich bis zur 5. Lebenswoche um die 168 zOTUs ein. Die starke Abnahme der Richness findet erst danach statt, sodass in der Lebenswoche 11 eine Gesamtanzahl von 45 zOTUs zu verzeichnen ist.

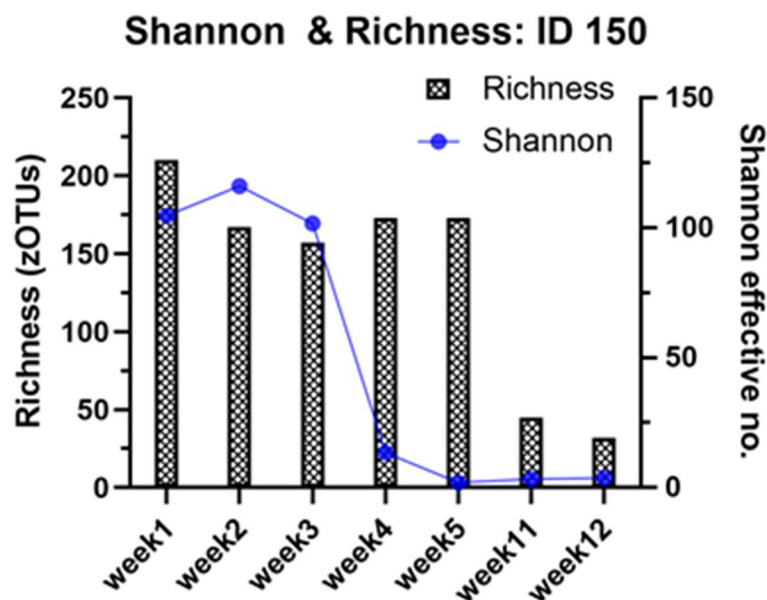


Abb. 28: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index (in Shannon effective no.) des Studienkindes 150, verteilt auf die Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Ein weiteres Beispiel mit einem gegenläufigen Trend stellen die Studienkinder 105 und 106 dar. Sie gehören beide zur Ampicillin/Cefotaxim-PLUS Gruppe. Teilnehmer 106 hat 4 verschiedene Antibiotika-Wirkstoffe erhalten, das Kind mit der ID105 3 hat verschiedene Wirkstoffe erhalten.

Diese Studienteilnehmer sind Zwillinge (beide männlich). 106 entwickelte bereits an Lebenstag 1 für 8 Tage eine Sepsis (eine Sepsisepisode, jedoch zu keinem Zeitpunkt, in dem eine Stuhlprobe entnommen wurde) mit negativen Blutkulturen und 8 Tage Antibiotikatherapie. 105 hingegen hatte keine Sepsis und insgesamt

für 6 Tage eine antibiotische Behandlung. Beide Studienteilnehmer wurden am Standort INN geboren.

Beide Studienteilnehmer hatten ein Gestationsalter von 173 Tagen. 105 hatte ein Geburtsgewicht von 820 Gramm, 106 ein Geburtsgewicht von 700 Gramm. Auch bei Studienkind 106 waren in den ersten beiden Lebenswochen die Stuhlproben von mangelnder Qualität, sodass es hier keine Proben zur Analyse gab.

Während bei 106 der Shannon-Index einen kontinuierlichen Abwärtstrend von Woche 3 (6.6) bis Woche 9 (1.21) aufzeigt, war der Abwärtstrend bei 105 stärker ausgeprägt und bereits in Woche 2 (1.26) (von 34.1 in Woche 1 kommend) deutlich vorhanden. Beide Studienkinder stiegen vom Shannon-Index am Ende des Beobachtungszeitraumes wieder an, auch hier zeigt 106 einen schleichenden Verlauf und 105 einen sprunghaften Anstieg von Lebenswoche 11 (3.04) auf 12 (61.01). 105 hatte am Ende der Beobachtung einen maximalen Shannon von 61.01 und eine maximale Richness von 206 zOTUs. 106 hatte am Ende des Beobachtungszeitraumes einen maximalen Shannon von 11.55 und eine Richness bei 123 zOTUs.

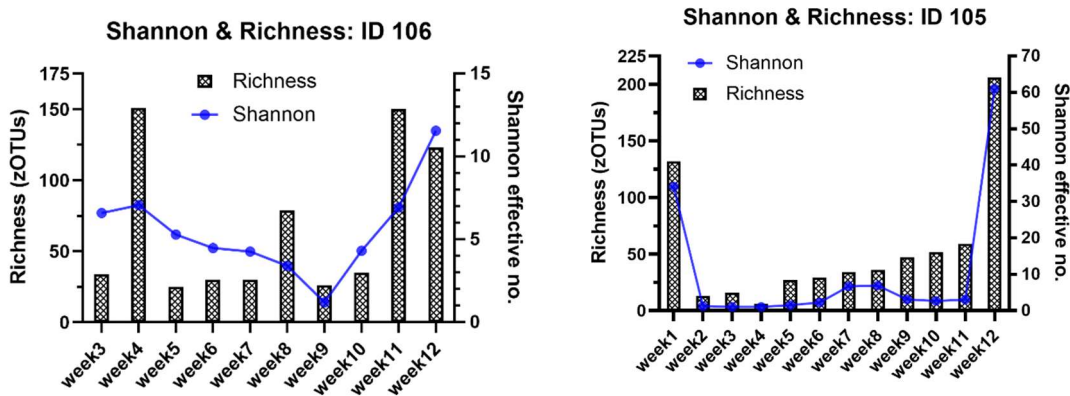


Abb. 29: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index vom Studienkind 105 , verteilt auf die Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Abb. 30: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index vom Studienkind 106 , verteilt auf die Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Um die gegensätzlichen Trends dieser Ausreisser detaillierter dazustellen, wurde die Taxonomie zu ID150, ID 105 und 106 für Lebenswoche 4 und 12 aufgestellt. 105 und 106 sind – wiederholt angemerkt – Zwillinge, unterschieden sich aber deutlich in ihrem Mikrobiom.

Das Kind mit der Studiennummer 106 hat in Woche 4 eine ausserordentlich hohe Menge an *Enterobacteriaceae* (88.88%). Am Ende des Beobachtungszeitraumes war diese Bakterien-Familie weiterhin stark vertreten (94.80%) und verdrängt weitere Familien fast vollständig. Das Studienkind 105 hingegen startet mit einer hohen Menge an *Enterobacteriaceae* in Woche 4 (99.96%). In der Woche 12 sinkt die Menge an *Enterobacteriaceae* auf 10.14%. Weitere Familien, wie beispielsweise *Enterococcaceae* (3.19%) und *Lachnospiraceae* (40.23%) oder *Oscillspiraceae* (10.31%) sind zu finden. Auch die Gruppe der *Bifidobakterien* sind mit einer geringen Menge mit 1.15% vorhanden.

Das Studienkind 150 hat in Woche vier eine niedrige Menge an *Enterobacteriaceae* (2.03%). Hier findet man *Corynebakterien* (31.75%) und *Bacillaceae* (35.03%) als dominante Gruppen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes hat man hier ebenfalls die *Enterobacteriaceae* als dominante Gruppe mit 60.19%. Man findet jedoch auch *Lachnospiraceae* (5.57%) und *Enterokokken* (14.64%) als Co-dominante Gruppen.

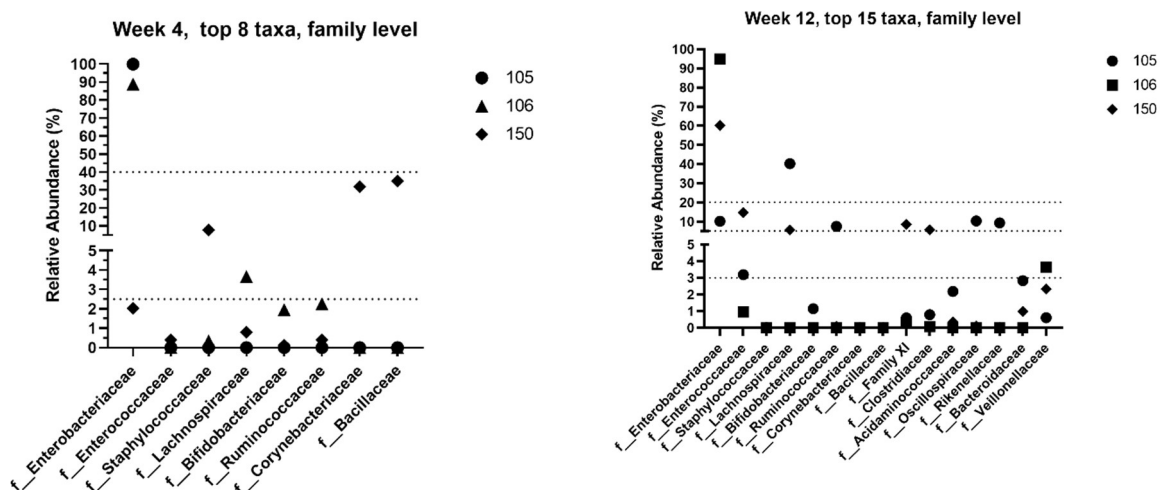


Abb. 31: Gesamtmenge in (%) der acht dominanten Bakterienfamilien in den Stuhlproben der Studienkinder 105 (Kreis), 106 (Dreieck) und 150 (Raute). Darstellung von Woche 4. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)

Abb. 32: Gesamtmenge in (%) der acht dominanten Bakterienfamilien in den Stuhlproben der Studienkinder 105 (Kreis), 106 (Rechteck) und 150 (Raute). Darstellung von Woche 12. Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)

### 3.8 Auswirkungen der Gesamtdauer der Antibiotikagabe beim Schema Ampicillin/Cefotaxim auf Shannon und Richness

Wie bereits erläutert, erhielten 41 Teilnehmer die Kombination Ampicillin/Cefotaxim für mehr als 48 Stunden. Diese Subpopulation wurde genauer betrachtet, um der Fragestellung nachzugehen, ob sich die unterschiedlich lange Gabe von Ampicillin/Cefotaxim auf das Mikrobiom im Sinne einer veränderten Richness bzw. eines veränderten Shannon-Indexes auswirkt.

Bei der Betrachtung der Dauer der ausschließlichen Gabe von Ampicillin/Cefotaxim erhielten 15 Kinder die Antibiotika-Kombi maximal 3 Tage, jedoch länger als 48 Stunden, 16 Kinder erhielten die Kombi für 4 oder 5 Tage und 10 Kinder bekamen Ampicillin/Cefotaxim länger als 5 Tage verabreicht.

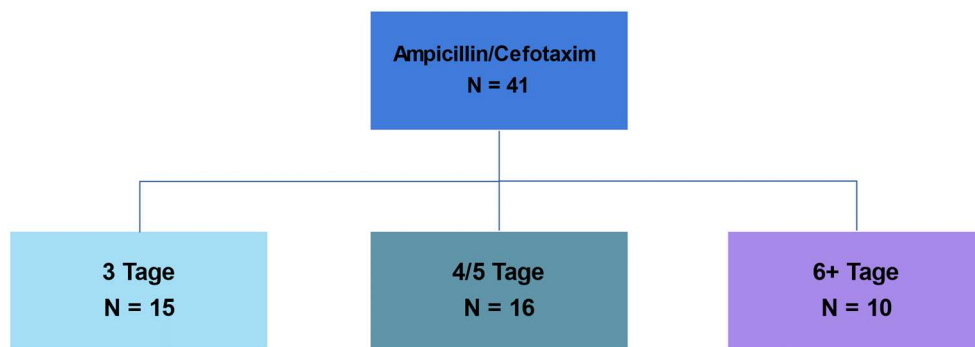


Abb. 33: Anzahl der Studienteilnehmer aus der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe (N = Anzahl der Studienteilnehmer), aufgeteilt nach Dauer der Antibiotikagabe 3, 4/5 und 6+ Tage. Datenaufarbeitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Grafik durch Gabriela Reichard.

#### 3.8.1 Shannon Index und Richness im Gesamtbeobachtungszeitraum

Die meisten Kinder haben gruppenübergreifend einen geringen Shannon Index. Es gibt in allen drei Gruppen nur wenige Ausreißer, sprich Kinder mit einem hohen Shannon Index. Gruppe 3d und 4/5d haben bei nahezu gleicher Gruppengröße einen ähnlichen Medianwert. Der Median liegt in der 3d-Gruppe bei 3.9 und bei der 4/5-Gruppe bei 3.35. Die Gruppe 6+ hat einen geringgradig höheren Medianwert von 5.1. Die Unterschiede beim Shannon-Index der einzelnen Gruppen 3d, 4/5d und 6+ sind allerdings nicht signifikant ( $p > 0.05$ ).

### Shannon\_AmpiCefo\_Subgroups\_AllTimePoints

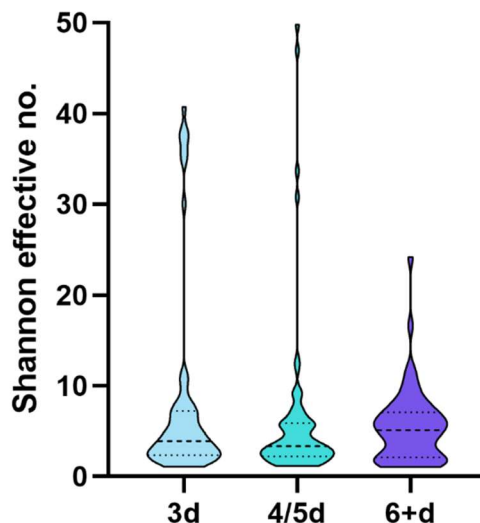


Abb. 34: Shannon-Index (in Shannon effective no.) in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim mit 3d, 4/5 Tage und 6+ Tage. Dotted line 25th/75th percentile, dashed line at median, ns  $p > 0.05$ . Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Betrachtet man den Parameter Richness, so fällt auf, dass es in der 3d-Gruppe einen höheren Anteil an Ausreißern gibt, sodass der Median bei 47 zOTUs liegt. Die beiden anderen Gruppen 4/5 und 6+ Tage haben annähernd die gleiche Richness. Die 4/5d-Gruppe hat einen Median von 38 zOTUs, die 6+-Gruppe hat einen Median von 36 zOTUs. Die Unterschiede in der Richness der einzelnen Gruppen sind auch hier nicht signifikant ( $p > 0.05$ ).

### Richness\_AmpiCefo\_Subgroups\_AllTimepoints

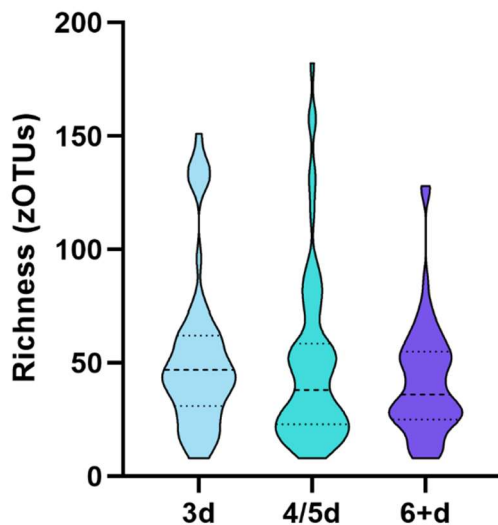


Abb. 35: Richness (in zOTUs) in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim mit 3d, 4/5 Tage und 6+ Tage. Dotted line 25th/75th percentile, dashed line at median, ns  $p > 0.05$ . Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.8.2 Shannon Index und Richness anhand einzelner Lebenswochen

Im Folgenden werden Shannon Index und Richness der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe in Abhängigkeit der Gesamtdauer der Antibiotikagabe wochenweise dargestellt. Die Werte beziehen sich immer auf Durchschnittswerte.

In Woche 1 ist der Shannon-Index der Gruppe 4/5d mit einem Wert von 26.66 ( $\pm 6.98$ ) am höchsten. Dieser Wert sinkt in Woche 2 beträchtlich auf 2.63 ( $\pm 0.45$ ). In den folgenden Wochen pendelt sich in der 4/5-Gruppe der Wert bei 4 ein.

Auch in der Gruppe 3d hat der Shannon seinen maximalen Wert in der ersten Woche bei 18.54 ( $\pm 6.68$ ) und sinkt in Woche 2 beträchtlich auf 5.15 ( $\pm 2.54$ ), jedoch nicht so tief wie in der 4/5d-Gruppe. Einen zweiten Peak hat diese Gruppe in Woche 3 bei 8.31 ( $\pm 2.80$ ), bevor sich der Shannon Index in den weiteren Wochen um 5 herum einpendelt. Über den gesamten Zeitraum betrachtet, hat diese Gruppe den höchsten Shannon Index im Verlauf.

Die Gruppe mit 6+d hat in der ersten Woche den niedrigsten Shannon von allen Gruppen mit 11.89 ( $\pm 5.22$ ), sinkt ebenfalls in Woche 2 auf 3.26 ( $\pm 0.98$ ) und pendelt sich in den nächsten Wochen um 5 ein.

In Woche 5 bis 8 pendelt sich der Shannon ungefähr gleich bei allen Gruppen um den Wert 5 ein. Ein grosser Unterschied in den einzelnen Werten zwischen den drei Gruppen ist hier nicht zu verzeichnen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in allen drei Gruppen der Shannon-Index in der 2. Woche am stärksten fällt. Der Shannon-Index fällt in der 4/5d-Gruppe am stärksten und bleibt im Vergleich zu den anderen Gruppen im Verlauf am niedrigsten.

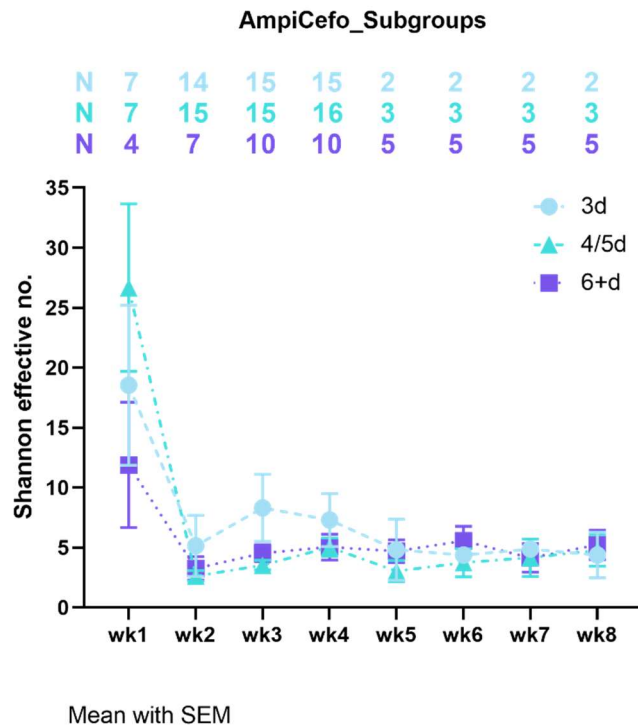


Abb. 36: Shannon-Index (in Shannon effective no.) in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer der Gabe der Wirkstoffe Ampicillin/Cefotaxim mit 3 (hellblauer Kreis), 4/5 (türkises Dreieck) und 6+ (violette Quadrat) Tagen, aufgeteilt nach Lebenswoche. N= Gesamtzahl der ausgewerteten Proben. Mean with SEM. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

Sieht man sich die Dominanz des Parameters Richness in der Gruppe Ampicillin/Cefotaxim an, so hat auch hier in der ersten Woche die Gruppe 4/5d die dominante Stellung mit 103.86 (+/-16.82) zOTUs, allerdings folgt sehr dicht die Gruppe mit der Gabe von 3 Tagen mit 91 (+/-16.76) zOTUs.

Die Gruppe 3d sinkt in Lebenswoche 2 auf 36.71 (+/-8.35) ab und pendelt sich in den nächsten Wochen um 50 ein, bevor die Richness in Woche 8 auf ein Minimum von 28.5 (+/-2.5) sinkt. Diese Gruppe hat im Beobachtungszeitraum die höchste Richness.

Die Gruppe 4/5d hat zu Beginn den höchsten Shannon von allen drei Gruppen mit 103.86 (+/-16.82) und sinkt in Lebenswoche 2 deutlich auf 49.53 (+/-11.46). In den nächsten Wochen pendelt sich auch diese Gruppe ein, bis sie in Woche 8 einen ähnlichen Wert im Shannon von 48.33 (+/-8.69) aufzeigt wie die Gruppe 6+.

Die Gruppe 6+ fängt mit einem niedrigen Shannon von 40.75 (+/-15.75) an. Diese Gruppen hat die geringsten Schwankungen in den nächsten Lebenswochen und deckt sich in Lebenswoche 8 mit dem Shannon der Gruppe 4/5 Tage mit 48.00 (+/-7.95).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in allen drei Gruppen die Richness in der 2. Woche am stärksten fällt. Die Richness fällt in der 4/5d-Gruppe stark und bleibt im Vergleich zu den anderen Gruppen in Woche 3 bis 6 am niedrigsten.

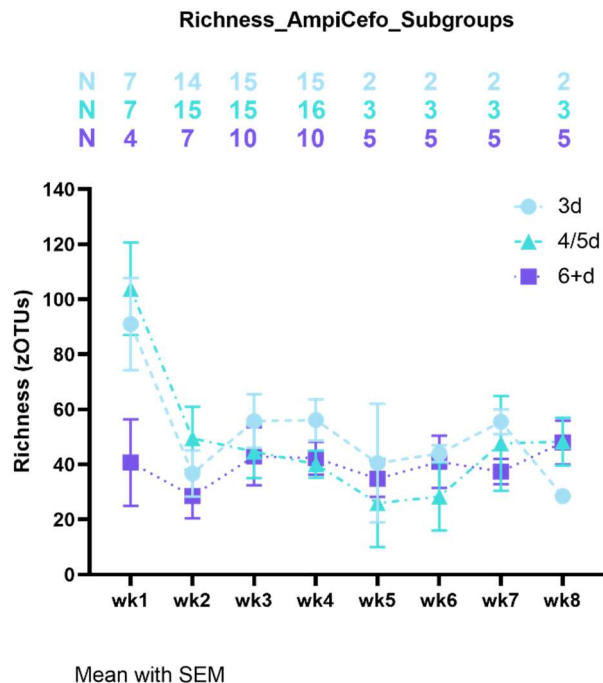


Abb. 37: Richness (in zOTUs; in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer der Gabe der Wirkstoffe Ampicillin/Cefotaxim mit 3 (hellblauer Kreis), 4/5 (türkises Dreieck) und 6+ (violette Quadrat) Tagen, aufgeteilt nach Lebenswochen. N= Gesamtzahl der ausgewerteten Stuhlproben. Mean with SEM. Datenaufarbeitung, deskriptive Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.9 Taxonomie der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe in Abhängigkeit von Lebenswoche und Gesamtdauer der Antibiotika-Gabe

Die folgenden Grafiken stellen die Taxonomie in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe mit ihren Subgruppen Dauer der Antibiotikagabe mit 3 Tagen, 4/5 Tagen und 6+ Tagen dar. Es werden die ersten vier Lebenswochen abgebildet. Die folgenden Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Mean (25./75. Perzentile). Somit kann der Fragestellung nachgegangen werden, ob es Unterschiede in der Taxonomie in Abhängigkeit der Lebenswoche bei unterschiedlicher Therapiedauer in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe gibt.



### 3.9.1 Lebenswoche 1

#### 3.9.1.1 Gruppe 3d

In dieser Gruppe dominieren die *Staphylococcaceae* mit 40.35 [0.23/89.80] %. Die zweit grösste Gruppe machen die *Lachnospiraceae* (15.50 [0/45.30] %) aus. Ebenfalls zu finden sind die *Enterobacteriaceae* (12.56 [0.07/29.32] %) und die *Bacteroidaceae* mit 11.02 [0/32.19] %.

#### 3.9.1.2 Gruppe 4/5d

Die Hauptgruppe wird von den *Enterobacteriaceae* mit 38.04 [8.01/45.75] % gebildet. Einen geringen Anteil machen die *Lachnospiraceae* (6.86 [0/13.51] %), die *Bacteroidaceae* (5.52 [0/12.57] %) und die *Enterococcaceae* (4.58 [0.11/1.16] %) aus. In dieser Gruppe gibt es auch einen geringen Anteil an *Bifidobacteriaceae* (1.40 [0/2.11] %).

#### 3.9.1.3 Gruppe 6 plus

Dominierend sind die *Enterobacteriaceae* mit 45.64 [10.11/86.77] %, gefolgt von den *Enterococcaceae* mit 22.30 [1.32/43.32] %. Auch in dieser Gruppe findet man einen geringen Anteil von *Bifidobacteriaceae* (0.83 [0/2.21] %).

Zusammenfassend kann man über die erste Lebenswoche festhalten, dass in der Gruppe „3 Tage“ die *Staphylococcaceae* die Hauptgruppe bilden. Es gibt drei weitere Stämme (*Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae* und *Bacteroidaceae*), die in geringerer Menge, jedoch zu fast gleich starken Anteilen vertreten sind. In der Gruppe „4/5 Tage“ gibt es eine Hauptgruppe, die *Enterobacteriaceae* und die Gruppe „>6 Tage“ hat die *Enterobacteriaceae* ebenfalls als dominante Gruppe, in geringerem Anteil gefolgt von den *Enterococcaceae*. *Bifidobacteriaceae* findet man zu gleichen geringen Anteilen in der „4/5 Tage“ und in der „6+ Tage“-Gruppe.

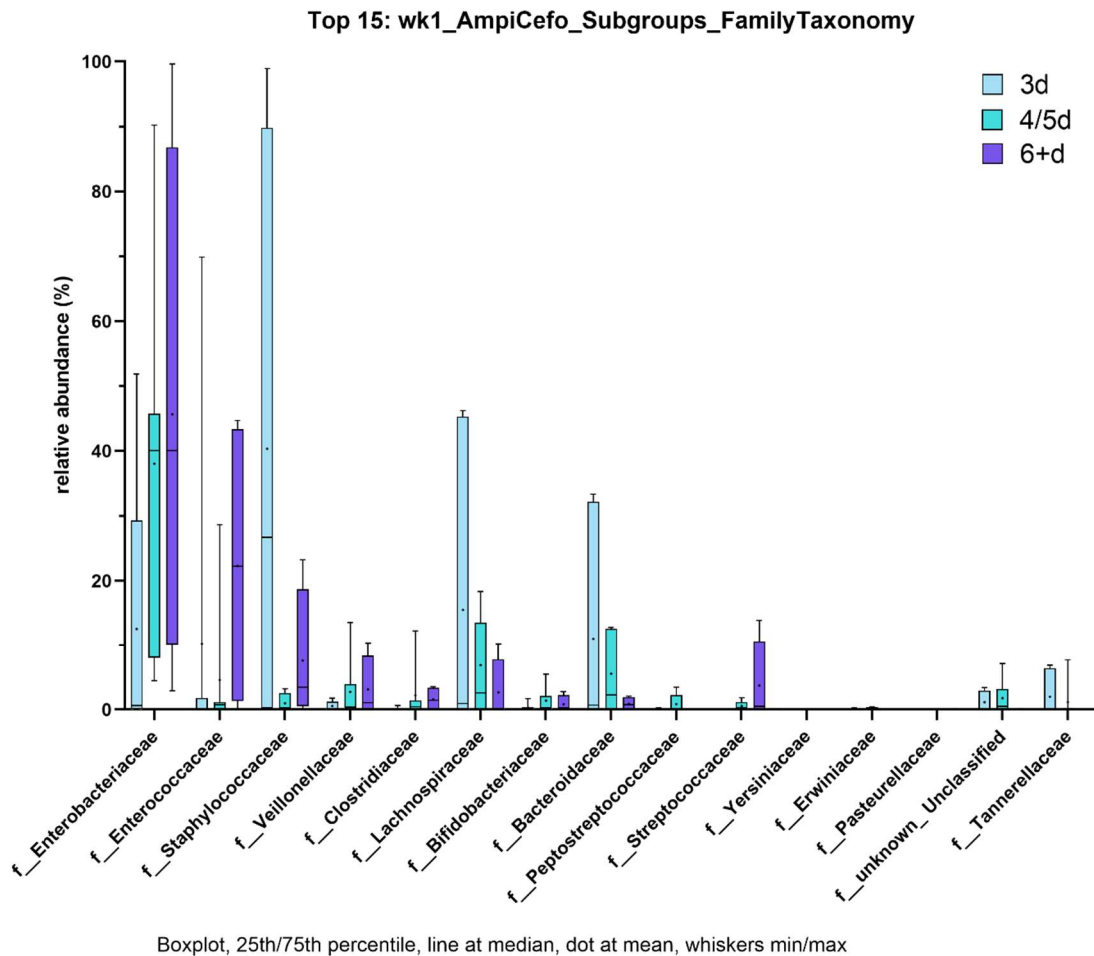


Abb. 38: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ Tage (violett) in Lebenswoche 1. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.9.2 Lebenswoche 2

In Lebenswoche 2 ändert sich das bakterielle Verteilungsmuster. In allen drei Gruppen übernehmen die *Staphylococcaceae* die führende Stellung. Es finden sich noch *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae*. Die anderen taxonomischen Einheiten verschwinden fast vollständig. Das Bild ist nicht mehr so bunt wie in Lebenswoche 1.

#### 3.9.2.1 3d Gruppe

In Lebenswoche 2 sind die *Staphylococcaceae* mit 39.11 [1.82/92.53] % dominierend, dicht gefolgt den *Enterobacteriaceae* (30.38 [0.08/70.64] %). *Enterococcaceae* sind ebenfalls mengenmässig relevant mit 13.97 [0.02/20.28] % vertreten. In dieser Gruppe findet man einen Anteil der *Bifidobacteriaceae* mit 2.63 [0/0.02] %.

### 3.9.2.2 4/5d Gruppe

*Staphylococcaceae* stellen mengenmässig den dominaten Teil dar (72.98 [53.30/98.41] %), gefolgt von *Enterococcaceae* (13.42 [0.01/29.89] %). Weitere Gruppen sind nicht nennenswert vertreten.

### 3.9.2.3 6plus Gruppe

In dieser Gruppe findet man fast ausschliesslich *Staphylococcaceae* mit 60.86 [0.04/99.73]%. Einen kaum messbaren Anteil machen noch die *Enterobacteriaceae* mit 14.75 [0.07/2.09] % aus.

Zusammenfassend kann man für die zweite Lebenswoche festhalten, dass in allen drei Gruppen die *Staphylococcaceae* die dominante Stelle einnehmen. Die Gruppe 4/5d ist dabei der Spitzenreiter. Bemerklich ist der Anteil der *Bifidobacteriaceae* in der 3d Gruppe mit knapp 3%.

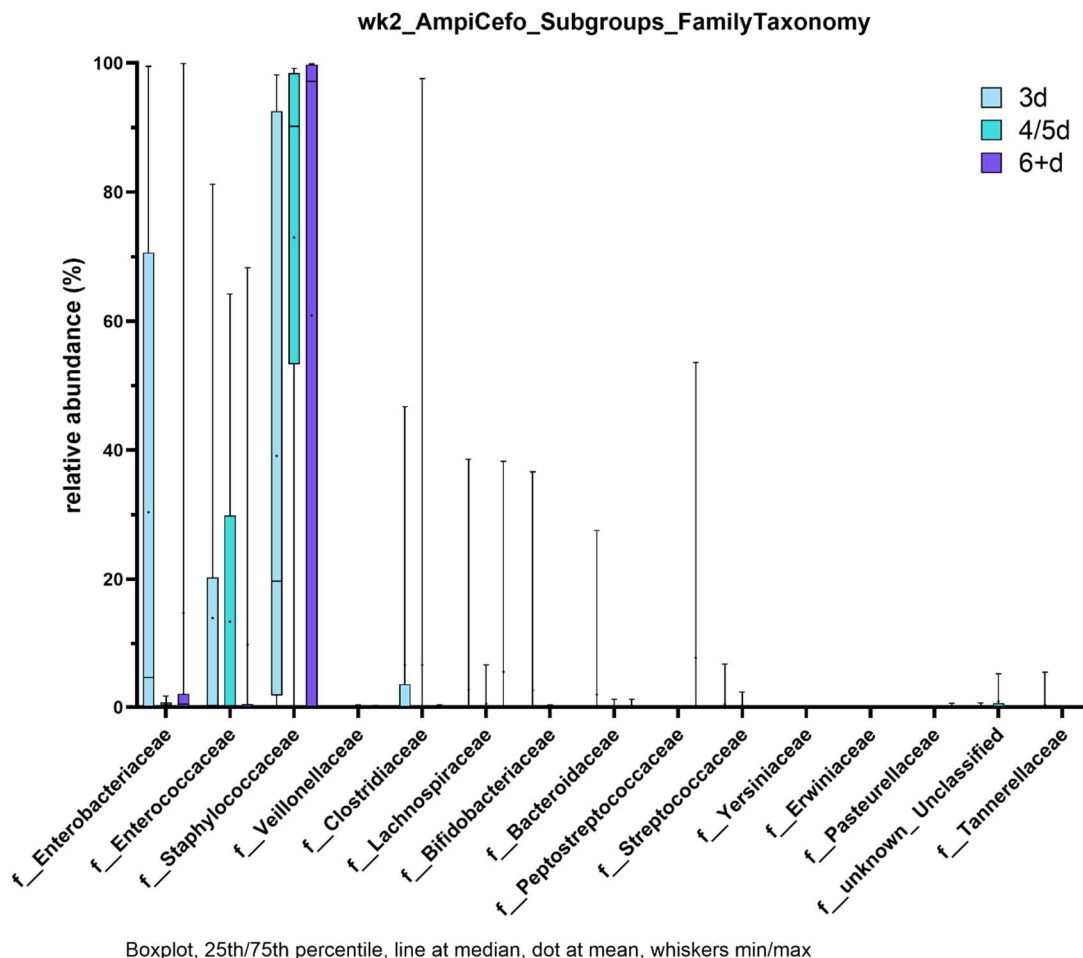


Abb. 39: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 2. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.9.3 Lebenswoche 3

In Woche 3 findet man wieder eine breitere Verteilung in den taxonomischen Einheiten.

#### 3.9.3.1 Gruppe 3d

Die dominante Gruppe stellen die *Enterobacteriaceae* mit 49.84 [0.14/81.77] % dar, gefolgt von den *Enterococcaceae* (12.12 [0.03/16.94] %) und *Veillonellaceae* (13.02 [0/15.69] %). *Staphylococcaceae* findet man kaum mehr (2.56 [0.02/4.67] %). In dieser Gruppe gibt es einen beträchtlichen Anteil von 3.58 [0/0.06] % an *Bifidobacteriaceae*.

#### 3.9.3.2 Gruppe 4/5d

Auch hier macht die Gruppe der *Enterobacteriaceae* den Hauptanteil aus (29.68 [0.15/80.07] %). Hier sind die *Staphylococcaceae* mit 21.94 [0.29/41.00] % die zweitdominanteste Gruppe, gefolgt von den *Enterococcaceae* mit 17.16 [0.05/29.61] %. Man findet einen Anteil von 2.94 [0/0.11] % an *Bifidobacteriaceae*.

#### 3.9.3.3 Gruppe 6plus

Dominant sind auch hier die *Enterobacteriaceae* mit 33.74 [0.44/84.01] %, gefolgt von den *Enterococcaceae* mit 20.67 [0.01/56.95] %. *Veillonellaceae* (14.92 [0/25.64] %) und *Staphylococcaceae* (13.80 [0.07/17.44] %) sind bei knapp 15%. In dieser Gruppe findet man kaum *Bifidobacteriaceae* (0.10 [0.07/17.44] %).

Zusammenfassend kann man für die Woche 3 festhalten, dass in allen drei Gruppen die *Staphylococcaceae* von Woche 2 durch die *Enterobacteriaceae* in Woche 3 abgelöst wurden. Den grössten Anteil der *Enterobacteriaceae* findet man in der Gruppe 3 Tage. In dieser Gruppe findet man ebenfalls den grössten Anteil an *Bifidobacteriaceae*.

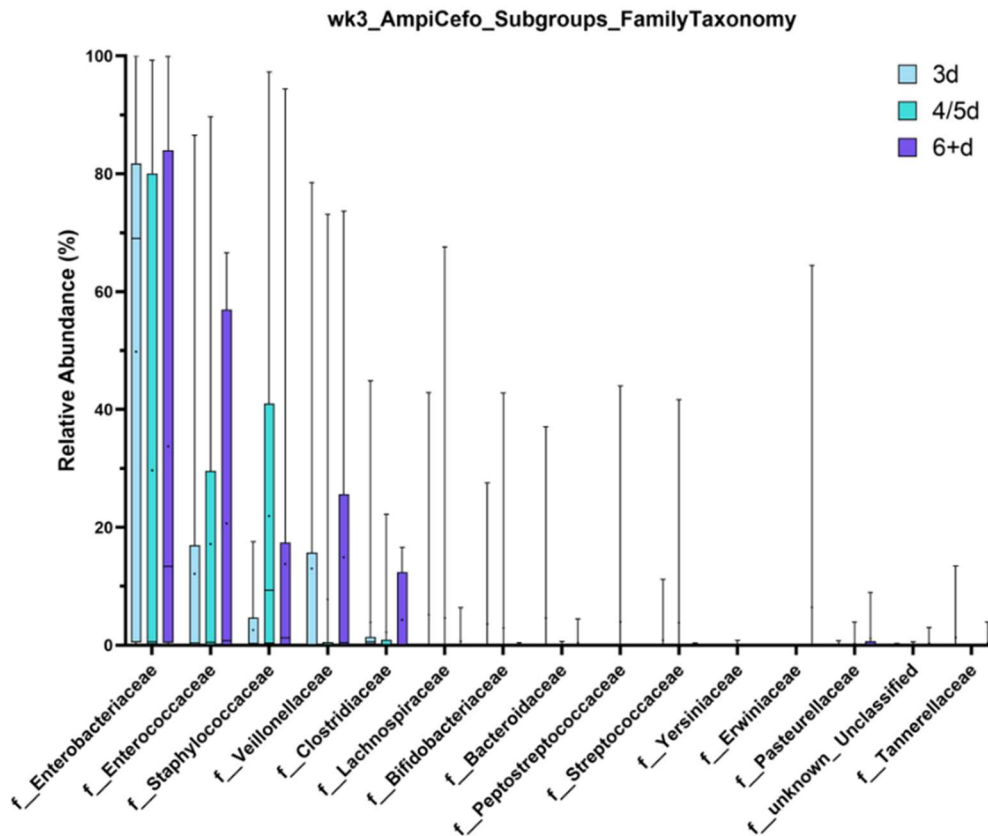


Abb. 40: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 3. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.9.4 Lebenswoche 4

#### 3.9.4.1 Gruppe 3d

Die *Enterobacteriaceae* bleiben in dieser Gruppe auch in Woche 4 mit 61.59 [53.23/84.49] % dominant. Weitere taxonomische Einheiten sind nicht nennenswert. Man findet allerdings *Bifidobacteriaceae* mit 8.53 [0/2.59] %.

#### 3.9.4.2 Gruppe 4/5d

Dominant sind hier auch die *Enterobacteriaceae* mit 45.77 [0.11/82.13] %, gefolgt von den *Veillonellaceae* mit 20.26 [0.02/49.14] %. *Enterococcaceae* 11.37 [0.10/8.99] % und *Clostridiaceae* 10.97 [0/10.51] % machen einen geringen Anteil aus. Die *Bifidobacteriaceae* liegen hier bei 2.29 [0/2.77] %.

### 3.9.4.3 Gruppe 6plus

Auch in dieser Gruppe sind die *Enterobacteriaceae* dominant mit 47.44 [0.11/89.05] %. Weitere Stämme, die in ungefähr gleicher Verteilung auftreten, sind *Enterococcaceae* (8.85 [0/21.78] %), *Veillonellaceae* mit 12.86 [0/23.86] %, *Staphylococcaceae* mit 10.02 [0.03/1.15] % und *Clostridiaceae* mit 14.92 [0.01/15.63] %. *Bifidobacteriaceae* sind in dieser Gruppe nicht zu finden (<0%).

Zusammenfassend kann man für die Woche 4 sagen, dass die *Enterobacteriaceae* in allen drei Gruppen die dominante Gruppe bleiben. Den grössten Anteil findet man in der Gruppe 3 Tage. Hier gibt es auch den grössten Anteil an *Bifidobacteriaceae*.

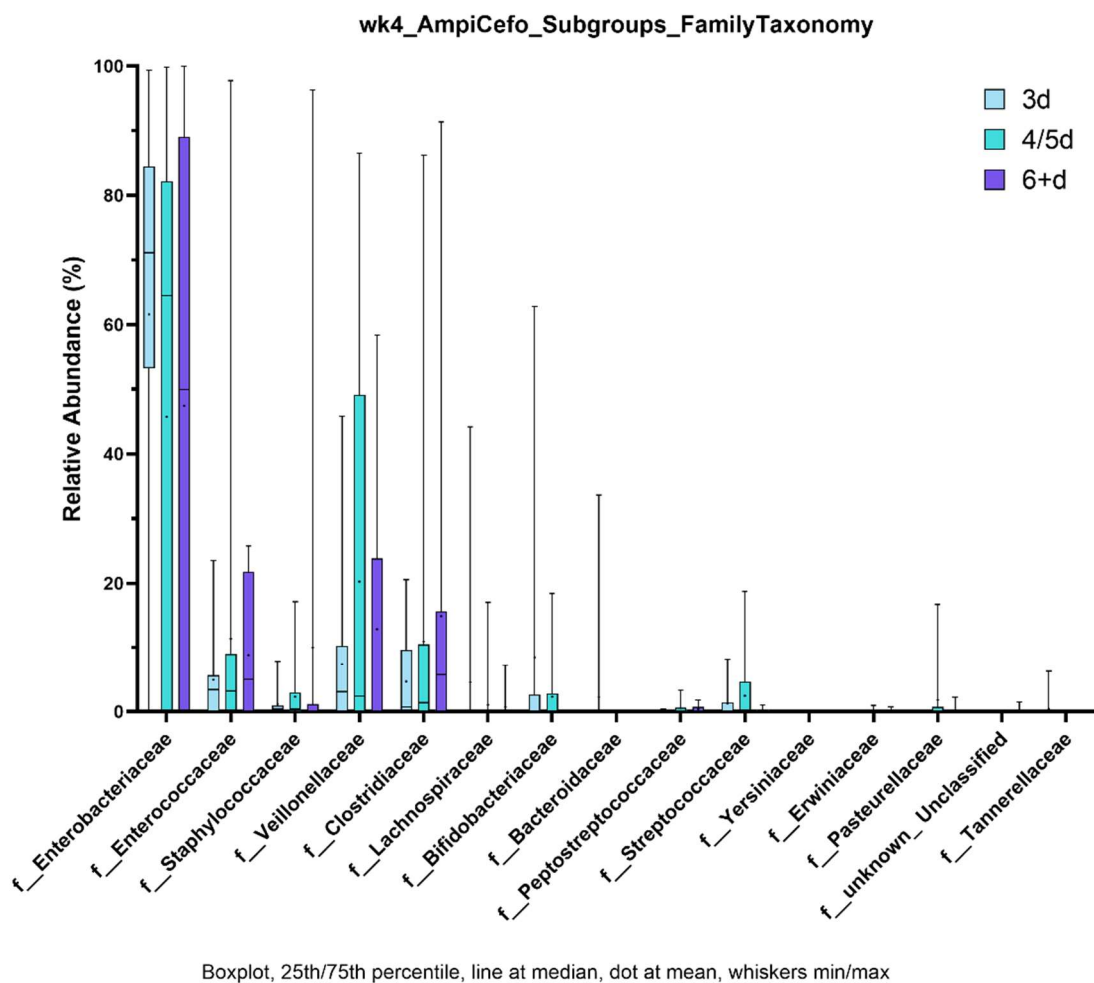


Abb. 41: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 4. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.).

### 3.9.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass erstmal unabhängig von der Dauer der Antibiotika-Gabe in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe in den ersten 4 Lebenswochen ausschliesslich *Enterobacteriaceae* und *Staphylococcaceae* die dominanten Gruppen sind.

In der ersten Lebenswoche findet man nur in der Gruppe 3d *Staphylococcaceae* als dominante Familie. Den grössten Anteil der *Enterobacteriaceae* findet man in der 6+ Gruppe.

In Woche 2 hat man in allen drei Gruppen die *Staphylococcaceae* als dominante Gruppe, vor allem in der Gruppe 4/5d. Erstmals treten *Bifidobacteriaceae* in der Gruppe 3d auf.

Die dritte Lebenswoche stellt einen switch dar und die *Enterobacteriaceae* dominieren ab jetzt. In der Gruppe 3d nimmt die Familie den grössten Anteil ein. Ebenso findet man in dieser Gruppe den höchsten Anteil an *Bifidobacteriaceae*.

In Woche 4 findet man ebenfalls in der Gruppe 3d den grössten Anteil an *Enterobacteriaceae* bei gleichzeitig auftretendem grössten Anteil an *Bifidobacteriaceae*.

	3 Tage		4/5 Tage		6+ Tage	
	Dominante Familie	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Dominante Familie	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Dominante Familie	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Woche 1	<i>Staphylococcaceae</i> (40%)	0%	<i>Enterobacteriaceae</i> (38%)	1%	<i>Enterobacteriaceae</i> (45%)	1%
Woche 2	<i>Staphylococcaceae</i> (39%)	3%	<i>Staphylococcaceae</i> (72%)	<0%	<i>Staphylococcaceae</i> (60%)	<0%
Woche 3	<i>Enterobacteriaceae</i> (50%)	4%	<i>Enterobacteriaceae</i> (30%)	3%	<i>Enterobacteriaceae</i> (34%)	<0%
Woche 4	<i>Enterobacteriaceae</i> (61%)	9%	<i>Enterobacteriaceae</i> (46%)	2%	<i>Enterobacteriaceae</i> (47%)	<0%

Tab. 11: Zusammenfassende Übersicht der dominanten Bakterienfamilien (in %) in Abhängigkeit der Lebenswochen 1-4 und der Dauer der Antibiotikagaben 3 Tage, 4/5 Tage und 6+ Tage und unter Berücksichtigung der gerundet prozentualen Anteile der Bifidobakterien. Datenaufbereitung durch Nina Heppner, Zusammenstellen der Tabelle durch Gabriela Reichard

## 3.10 Der phylogenetische Baum

Als Abschluss und Zusammenfassung der Ergebnisse lässt sich die Gesamtheit der Biobank anhand jeder einzelnen Stuhlprobe grafisch darstellen. Mit dieser Übersicht wird die Frage beantwortet, ob man in unserer Studienpopulation einen allgemeinen Trend im Mikrobiom durch Betrachtung aller 774 Stuhlproben erkennen kann.

Im breitesten Ring wird die bakterielle Zusammensetzung jeder einzelnen Stuhlprobe dargestellt. Eine Säule entspricht hierbei einer analysierten Stuhlprobe. Bei 774 analysierten Stuhlproben sind hiermit 774 Säulen dargestellt. Bei unserer

Population konnten überwiegend die Phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* und *Bacteroidota* nachgewiesen werden.

Die Verbindungslinien zentral geben Auskunft über die Ähnlichkeit der Bakterienstämme. Im Rahmen dieser Arbeit wird allerdings nicht näher darauf eingegangen.

Die äusseren Ringe bringen zu jeder analysierten Stuhlprobe noch Zusatzinformationen bezüglich der Punkte „Sample Week“, „ABGroup“ und Aussagen bezüglich Dauer der Antibiotikungabe von Ampicillin/Cefotaxim. Mit dieser Darstellung kann also herausgearbeitet werden, ob sich ein Trend in diesen Variablen in der Zusammensetzung der bakteriellen Zusammensetzung der Stuhlproben erkennen lässt.

Insgesamt lassen sich in dem Baum 8 verschiedene Verteilungsmuster erkennen:

- *Proteobacteria*
- *Proteobacteria* und *Firmicutes*
- *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Actinobacteriota*
- *Firmicutes*
- ***Firmicutes***, *Proteobacteria* und ***Bacteroidota***
- *Firmicutes* und *Actinobacteriota*
- ***Firmicutes***, *Proteobacteria* und ***Actinobacteriota***
- *Firmicutes* und *Proteobacteria*

Der abgebildete phylogenetische Baum zeigt die Verteilung bzw. Dominanz der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen. Auffallend ist, dass zwei Gruppen dominierend sind: *Proteobacteria* und *Firmicutes*. Es gibt eine fast gleichmässige Aufteilung der Dominanzen bei ca. der Hälfte der Stuhlproben. Die Gruppe der *Actinobacteriota* ist ausschliesslich in einer geringen Gruppe an Stuhlproben dominierend. Falls *Actinobacteriota* zu finden sind, dann eher in der *Firmicutes*-dominierenden Gruppe.

Aus dem Diagramm kann man erkennen, dass bei der *Proteobacteria*-Dominanz der Anteil der ausschliesslich mit Pip/Taz-behandelten Kinder grösser ist als bei der *Firmicutes*-dominierenden Gruppe. Bei den Kindern, die ausschliesslich mit Pip/Taz behandelt wurden, war der Hauptteil der Stuhlproben in der *Proteobacteria*-Dominanz-Gruppe und ein geringerer Anteil in der *Firmicutes*-Dominanz-Gruppe. Bei den Kindern, die ausschliesslich mit Ampicillin/Cefotaxim behandelt wurden, war die Verteilung der Stuhlproben auf die Dominanzen *Proteobacteria* und *Firmicutes* ungefähr gleich.



Die Gruppe der *Bacteroidota* kommen begleitend nur bei der *Firmicutes* Gruppe vor.

Bezüglich Unterscheidung der phylogenetischen Zusammensetzung der Stuhlproben bei unterschiedlich langer Gabe der unterschiedlichen antibiotischen Substanzen wurden genaue Erkenntnisse in den Vorkapiteln dargestellt. Auf Grundlage des Baumes wird daher nicht weiter eingegangen, da dieser nur einen Überblick aufzeigen kann.

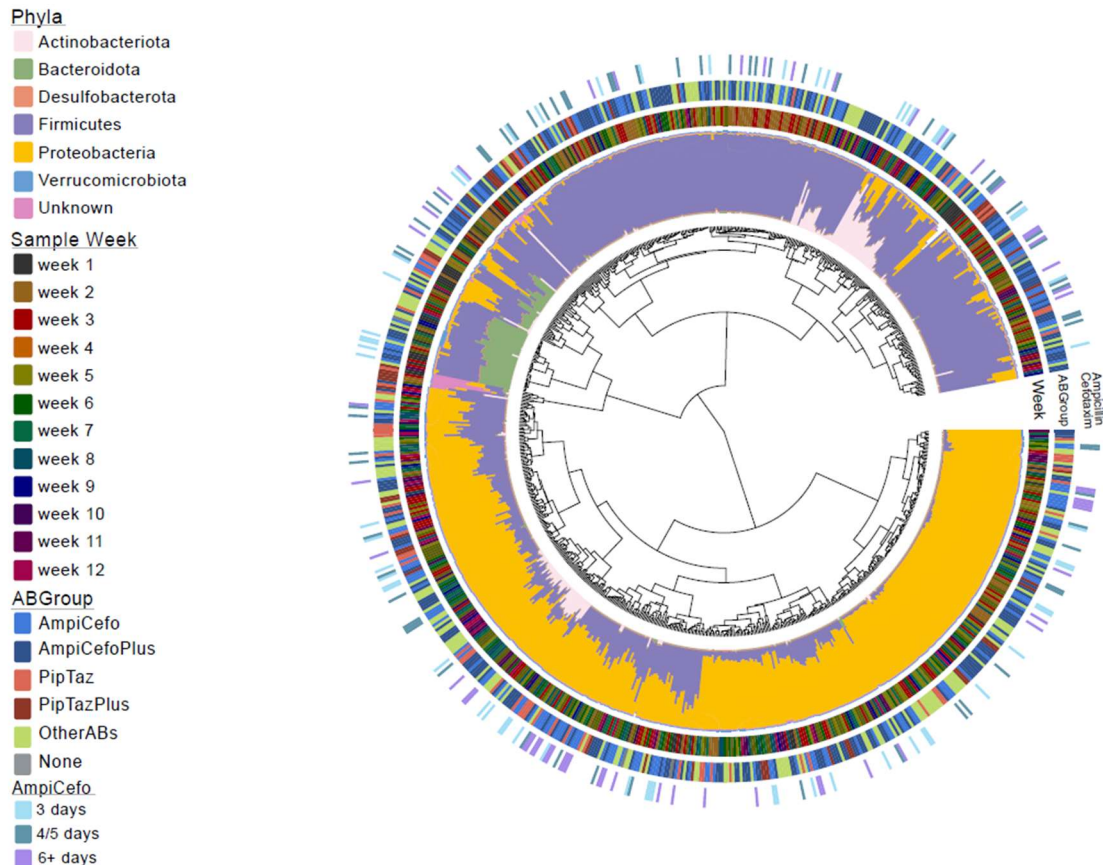


Abb. 42: Phylogenetischer Baum. Der innerste Ring stellt die Phyla dar. Im zweiten inneren Ring sind die Lebenswochen/Sammelwochen der Studienteilnehmer dargestellt. Der dritte Ring stellt die Zuordnung der Stuhlproben zu den unterschiedlichen Antibiotikaschemata Ampic/Cefo, AmpicCefoPlus, Pip/Taz, PipTazPlus, Other ABs und None dar. Der äusserste Ring enthält die unterschiedlichen Länge der Antibiotikagaben 3 days, 4/5 days und 6+ days. Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.). Erstellung mittels Evolvview v3.

## 4. Diskussion

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse unter Einbindung in die aktuelle Forschung

Antibiotika gehören zu den am meisten eingesetzten Medikamenten in der Neonatologie [123]. Allerdings weiss man immer noch nicht genau, welchen Einfluss der Einsatz dieser Medikamentengruppe auf die Entwicklung des Mikrobioms bei Frühgeborenen hat. Es ist auch noch nicht ausreichend untersucht, ob die unterschiedliche Dauer der Antibiotikagabe in den ersten Lebenstagen des Frühgeborenen Auswirkungen auf das Mikrobiommuster hat. Im Rahmen der im Dr. von Haunerschen Kinderspitals (Klinikum der Universität München) durchgeführten NeoMuniCH-Studie ist unsere Gruppe diesen Fragestellungen nachgegangen. Dies ist unseres Wissens die erste Studie, die bei der Untersuchung der Mikrobiomentwicklung die beiden Schemata Ampicillin/Cefotaxim und Piperacillin/Tazobactam gegenüberstellt.

Unsere Studienpopulation zeigt einen überwiegenden Anteil an *Firmicutes* und *Proteobacteria*, einen kaum messbaren Anteil an *Bifidobacteriaceae* und eine geringe Diversität. Dies deckt sich mit den aktuellen Forschungsergebnissen bei Neonaten- bzw. Antibiotika-assoziierten Mikrobiomuntersuchungen:

Die geringe Diversität ist typisch für das neonatale Mikrobiom. Wang et al. sehen diese geringe Bakterienvielfalt als eine der Ursachen für die nekrotisierende Enterokolitis. [80] Greenwood et al. konnten zeigen, dass die Anwendung von Antibiotika die Diversität nach unten reguliert [114]. Auch Yassour et al. konnten bei mit Antibiotika-behandelten Kindern mit einem Lebensalter von 2-36 Monaten eine verminderte Diversität nachweisen [87], sodass die Antibiotikagabe als Reduzierer der Diversität an sich gesehen werden kann. Auch wir konnten diesen Trend in unseren Analysen sehen und interpretieren die geringe Diversität einerseits durch die Unreife der Frühgeborenen und die Verstärkung der geringen Diversität durch eine zusätzliche Antibiotikagabe.

Unsere Studienpopulation zeigt zwei dominante Phyla: Die *Firmicutes* und die *Proteobacteria*. Auffallend im phylogenetischen Baum ist, dass ca. die eine Hälfte der Studienpopulation von *Proteobacteria* auf Kosten der *Firmicutes* geprägt ist und die andere Hälfte von *Firmicutes* auf Kosten der *Proteobacteria* geprägt ist. Wang et al. beschreiben Frühgeborene mit einem *Proteobacteria*-reichen/dominierenden Mikrobiom als anfällig für eine nekrotisierende Enterokolitis und sehen diese Phyla als potentiell pathogen an [80].

Betrachtet man die Taxonomie der PipTaz- und der Amp/Cefo-Gruppe, so konnten wir zeigen, dass in der Pip/Taz-Gruppe die *Enterobacteriaceae* und die *Staphylococcaceae* den dominanten Anteil ausmachten, hingegen bei der Amp/Cefo-Gruppe zusätzlich die *Enterococcaceae* mengenmässig stark vertreten waren. Die *Bifidobacteriaceae* waren kaum vertreten. Das Mikrobiommuster der Amp/Cefo-Gruppe, also die Dominanz von *Enterobacteriaceae* und *Enterococcaceae* mit einer kaum vertretbaren Menge an Anaerobiern wird auch schon von Arboleya et al. beschrieben, die dieses Mikrobiom als Frühgeborenen-Mikrobiom im Vergleich zu einem Reifgeborenen-Mikrobiom interpretieren [46]. Der grosse Anteil an *Enterobacteriaceae* steht für ein verzögertes Reifestadium des Darmmikrobioms [46, 81].

Korpela et al. konnten nachweisen, dass das Frühgeborenen-Mikrobiom sich in vier Phasen entwickelt, abhängig vom Reifealter. Vor allem in der 24. bis 30. Schwangerschaftswoche nehmen die *Staphylococcaceae* die dominante Stellung ein, gefolgt von den *Enterococcaceae* in der 30 bis 35. Schwangerschaftswoche. Die *Enterobacteriaceae* sind vor allem in der 35. Schwangerschaftswoche als stärkste Gruppe vertreten. Die *Bifidobacteriaceae* sind die Gruppe, die als Schlusslicht das Mikrobiom bei Frühgeborenen dominieren. [98]

Diese Erkenntnisse und diese strikte Phasenbildung lassen sich bei unseren Daten nicht finden. Die Taxonomien unserer Vergleichsgruppen zeigen zwar auch die ersten drei genannten Gruppen als stark vertretene Familien an, vor allem bei der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe, allerdings zeigen sich die *Enterobacteriaceae* als Hauptgruppe. Beachtet man den Hinweis, dass in unserer Studie in Lebenswoche 4 die meisten Stuhlproben ausgewertet werden konnten, so kann man sagen, dass die *Enterobacteriaceae* in einer späteren Lebensphase der Kinder weiterhin dominant sind. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei uns das Gestationsalter bei 201.5 (+/-16.69) Tagen lag. Diese späte *Enterobacteriaceae*-Dominanz konnten wir vor allem bei der Aufschlüsselung der Bakterienfamilien in Abhängigkeit der Dauer der Antibiotikagaben in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe darstellen. Auch unsere Gruppe zeigte zu Beginn die Dominanz der *Staphylococcaceae*. Diese Dominanz ging allerdings gleich in die Dominanz der *Enterobacteriaceae* über. Eine Dominanz der *Bifidobacteriaceae* konnte bei uns während des Beobachtungszeitraumes nie erreicht werden. Aus diesen Erkenntnissen schliessen wir – gegen die Erkenntnisse von Korpela et al. [98], dass die Antibiotikagabe auch noch in der 4. Lebenswoche eine deutliche Verzögerung bei der Etablierung eines physiologischen anaeroben Mikrobiommusters zeigt [46].

Wie in den vorherigen Kapiteln deutlich dargestellt wurde, ist ein gesundes Mikrobiom *Bifidobacteriaceae*-reich, denn Anaerobiern wird als „Health Promotern“

die Aufgaben zugewiesen, dass sie eine gewisse Schutzfunktion im Darm übernehmen und das Wachstum pathogener Keime im Darm verhindern [68, 136]. Aus diesem Grund ist es von enormer Bedeutung, im Rahmen der durchgeführten NeoMuniCH-Studie auch zu berücksichtigen, unter welchem Schema der prozentuale Anteil der *Bifidobacteriaceae* höher ist. Moubareck et al. konnten nachweisen, dass alle untersuchten *Bifidobakterien*-Stämme sensibel auf u.a. Amoxicillin und Piperacillin reagiert haben [136]. Dies erklärt und deckt sich mit unseren erzielten Ergebnissen, nämlich einerseits mit dem geringen Anteil der *Bifidobacteriaceae* im dargestellten phylogenetischen Baum bei der Betrachtung aller untersuchten Stuhlproben und in den Taxonomien auf dem Level der Bakterienstämmen beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Antibiotika-Schemata.

In beiden Schemata war der Anteil der *Bifidobacteriaceae* sehr gering. Wir konnten zeigen, dass der Anteil der *Bifidobacteriaceae* in der Ampicillin/Cefotaxim (2.98%) dennoch fast doppelt so hoch war als in der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe (1.25%). Beim Vergleich des Outcomes bezüglich der Dauer der Antibiotika-Gabe in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe war der Anteil der *Bifidobacteriaceae* in der 3-Tage-Gruppe in Woche 4 am höchsten (8.53%). Daher können wir die Schlussfolgerung ziehen, dass bei der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim über drei Tage der Anteil der *Bifidobacteriaceae* im Verlauf am höchsten ist.

Butel et al. rechtfertigen die geringen *Bifidobacteriaceae*-Mengen bei Frühgeborenen mit dem Gestationsalter und weniger mit der Gabe von Antibiotika: Diese Arbeitsgruppe sieht ausschliesslich das Reifealter von 32.9 Schwangerschaftswochen bei Geburt als entscheidende Determinante für die Entwicklung eines *Bifidobacteriaceae*-reichen Mikrobiommusters. Sie wiesen nach, dass die Gabe von Antibiotika keinen Einfluss auf die Kolonisierung des Darms mit *Bifidobacteriaceae* hatten. [84]

Tanaka et al. konnten zeigen, dass der Shannon-Index bei Antibiotika-behandelten Kindern im Vergleich zu nicht behandelten Kindern in den ersten Lebenstagen deutlich abnahm und erst nach 1 Monat anstieg [88]. Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen dies. Unabhängig der verglichenen Schemata nimmt die Diversität der mit Antibiotika behandelten Kinder nach der ersten Lebenswoche stark ab und pendelt sich auf einem niedrigen Niveau im Lauf der weiteren Lebenswochen ein. Ein Anstieg im Sinne einer Erholung des Mikrobioms ist allerdings bei unserer Studienpopulation kaum zu erkennen. Es ist anzumerken, dass trotz längerer Gabe von Piperacillin/Tazobactam der Shannon-Index in den ersten Lebenswochen höher als in der Ampicillin/Cefotaxim ist. Wir kommen daher zu der

Schlussfolgerung, dass es bei beiden Schemata eine gewisse antibiotische Selektion - ausgedrückt durch die Abnahme des Shannon Index - gibt [88], diese allerdings unter Piperacillin/Tazobactam geringer ausgeprägt ist.

Anhand des phylogenetischen Baumes konnten wir zeigen, dass bei der *Proteobacteria*-Dominanz der Anteil der ausschliesslich mit Pip/Taz-behandelten Kinder grösser war als bei der *Firmicutes*-dominierenden Gruppe. Die Gruppe der *Bacteroidota* kamen begleitend nur bei der *Firmicutes*-Gruppe vor. Der Baum zeigt, dass unter den Kindern, die Pip/Taz erhalten haben die Stuhlproben mehr *Proteobacteria*-Dominanzen aufwiesen, als *Firmicutes* bei kaum auftretenden *Bacteroides* und *Actinobacteria*. Diese Bakterienstämme sind allerdings enorm wichtig für die u. a. metabolische Funktion [137]. Wir erklären uns dies dadurch, dass die *Proteobacteria* andere Bakterienstämme in ihrem Wachstum unterbinden, mehr als die *Firmicutes*-Familie.

Ob man allein aus dem Baum die Schlussfolgerung ziehen kann, dass unter Pip/Taz eher *Proteobacteria* wachsen und unter Ampicillin/Cefotaxim eher *Firmicutes* bleibt dennoch fraglich, da berücksichtigt werden muss, dass die Kinder in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe schwerer (1215 (+/-385.9) Gramm) und älter (204.0 (+/-15.51) Tage) waren als in der Pip/Taz-Gruppe (198.4 (+/-17.45) Tage und 1110 (+/-487.8) Gramm) und Pip/Taz länger gegeben wurde (16.95 (+/-25.24 Tage)) als Ampicillin/Cefotaxim (4.07 (+/-3.154 Tage)) und dass insgesamt mehr Kinder Ampicillin/Cefotaxim (N=48) während des Beobachtungszeitraumes erhielten als Piperacillin/Tazobactam (N=11).

Wir konnten in unserer Studienpopulation drei Ausreisser erkennen, die sich in Shannon, Richness und teilweise der Mikrobiomzusammensetzung gegen die Erwartungen verhalten. Diese Varianz und das Abweichen vom sowieso schon anormalen Entwicklung des Mikrobioms lässt uns die Annahme bestätigen, dass kein Mikrobiommuster einem anderen gleicht [50, 51, 137] – auch nicht bei Zwillingen, wie wir herausarbeiten konnten. Wir sind der Meinung, dass viele Einflussfaktoren das Mikrobiommuster prägen. Die Gesamtpunkte, die auf den Wirt wirken, u.a. eine Gabe von Antibiotika in der Frühphase, der Geburtsmodus, die Ernährung [138] machen das Mikrobiom aus und entscheiden letztendlich darüber, ob ein potentiell pathogen geprägtes Mikrobiommuster sich klinisch präsentiert. Bei dem Studienteilnehmer 150 könnte die immer wiederkehrende Sepsis, der lange Klinikaufenthalt und die Anzahl der antibiotischen Therapie zu diesen ungewöhnlichen Diversitätsentwicklungen beigetragen haben.

Die oben beschriebenen Sachverhalte müssen allerdings in folgenden Zusammenhang, der von Kim et al. aufgegriffen wurde, gebracht werden:

Das Vorkommen, der oben genannten dominanten Phyla an sich ist nicht pathogen. Die meisten Darmbakterien, die den Darm natürlicherweise besiedeln gehören zu den vier dominanten Phyla: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria und Proteobacteria. Vielen Bakterien wird eine positive Wirkung zugeschrieben. [137, 139] Allerdings gibt es einzelne Subgruppen [137, 140], die für den Wirt gefährlich werden können. Und drittens gibt es pathogene Bakterien, die physiologisch in geringer Menge im Darm vorkommen, jedoch das Potenzial zur Überwucherung des Darms während der Dysbiose zeigen [137, 141, 142].

## 4.2 Stärken der Studie

Bei der Auswertung der Stuhlproben ist zu beachten, dass sich die Mikroben im Labor schwer kultivieren lassen. Dies hat einen Einfluss bezüglich der Auflistung der Bakterienstämme/-familien und die dadurch korrekte Darstellung des Milieus, die für die weitere Entwicklung des Mikrobioms von fundamentaler Bedeutung ist. Allerdings lassen sich Mikroben im Labor häufig nur schwer kultivieren, was die Katalogisierung der Mitglieder und das Verständnis der Funktionsweise von Gemeinschaften erschweren kann.[143]

Wie Abbildung 6 auf Seite 20 darstellt, haben die Publikationen zum Thema Mikrobiom und Frühgeborene in den letzten Jahren zugenommen. Dies liegt unter anderem an den Fortschritten der Next-Generation-Sequencing Technologien, die Zugang zur „Black Box“ der Komplexität des Mikrobioms ermöglicht haben [41]. Seit Einführung dieses neuen Verfahrens im Jahre 2005 kann paralleles Sequenzieren von Millionen DNA-Fragmenten und somit Erbinformationen mehrerer Bakterien gleichzeitig in kürzester Zeit gewonnen werden [144]. Unsere Studie wurde beim Sequenzieren der Daten nach den aktuellen Empfehlungen und Standards durchgeführt, um eine starke Aussagekraft der Analysen zu erreichen. Durch dieses nicht-Kultur-basierte Sequenzierverfahren konnten wir auch Bakterienstämme in kürzester Zeit darstellen, die womöglich bei der Kultur-basierten Analyse durch die „grossen“ Bakterienstämme überlagert und dadurch nicht oder nicht genau im Verhältnis dargestellt hätten werden können. Vor allem in Anbetracht der geringen, jedoch wichtigen Menge an Bifidobakterien ist das exakte Verteilungsmuster zur Interpretation der Mikrobiomentwicklung beispielsweise von enormer Bedeutung. Zugleich muss im Rahmen der neuen Sequenzierverfahren das Milieu (anaerobes/aerobes) Wachstum nicht berücksichtigt werden.

Im Rahmen der NeoMuniCH-Studie konnte mit der Auswertung von 774 Stuhlproben eine aussagekräftige Biobank erstellt werden. Durch die Orientierung an den Vorgaben bezüglich der wichtigsten Schritte von der Probenentnahme bis

zur Verarbeitung der Proben unter ständiger Wahrung der Kühlkette konnten Proben gesammelt werden, die die Voraussetzungen für eine aussagekräftige Analyse schaffen [128].

### 4.3 Schwächen der Studie

Aufgrund einer zu geringen Stuhlprobenanzahl bei Betrachtung der Ampicillin/Cefotaxim bzw. Piperacillin/Tazobactam-Gruppe, mussten die Untersuchungen teilweise auf die „Plus“-Gruppen ergänzt werden. Inwieweit der Zusatz weiterer Wirkstoffe sich auf das Mikrobiom auswirken, können wir in dieser Studie nicht beurteilen.

Wir konnten aufzeigen, dass die meisten Stuhlproben in Lebenswoche 4 analysiert werden konnten. Das heisst, die grösste Aussagekraft liegt in dieser Woche. Zieht man unsere Studie heran, um Aussagen bezüglich der Entstehung einer EOS ableiten zu können, decken sich die Zeitintervalle nicht. In Woche 4 ist die kritischste Phase bezüglich Mortalität im Rahmen einer NEC oder EOS überwiegend vorbei. Arbeitet man in Zukunft daran, das Mikrobiom als eine Art Biomarker zu sehen, welches aufgrund einer bestimmten Mikrobiomentwicklung Erkrankungen wie eine Nekrotisierende Enterokolitis oder eine EOS /LOS „vorhersagt“, so muss das Hauptaugenmerk der Stuhlanalysen auf die ersten Lebensstage/-wochen gesetzt werden, um ein Ausgangsmikrobiom als „Standardmikrobiom“ festsetzen zu können.

### 4.4 Ausblick

Da sehr viele Einflussfaktoren die Entstehung des Darmmilieus und somit das Mikrobiomwachstum beeinflussen, sind weitere Studien notwendig, um die Studienpopulationen mit gleichen Kriterien zu vergleichen. Vor allem CPAP, Antibiotikagabe der Mutter, Geburtsmodus, Gabe von Muttermilch/Spendermilch oder Industrienahrung, externe Zugänge, Dauer des Krankenaufenthaltes sind wichtige Kriterien, die bei der Mikrobiomentwicklung beachtet werden müssen. Schafft man eine homogene Gruppe in den jeweiligen Wirkstoffgruppen, können genauere Aussagen bezüglich der Mikrobiomentwicklung getroffen werden, da weitere Einflussfaktoren dadurch ausgeklammert werden können.

Wir konnten zeigen, dass die unterschiedliche Dauer der Ampicillin/Cefotaxim-Gabe überwiegend keinen Unterschied der dominanten Familien zur Folge hatten. Die *Staphylococaceae* waren in Woche 2 in allen Gruppen die Hauptvertreter und wurden in Woche 3 und 4 ubiquitär durch die *Enterobacteriaceae* abgelöst. Der einzige Unterschied lag in dem prozentualen Anteil. Allerdings muss beach-

tet werden, dass die Dauer der Antibiotikagabe insofern nicht vernachlässigt werden darf, dass in den letzten Jahren die Resistenzentwicklung der Bakterien unter Antibiotikatherapie immer mehr in den Fokus geraten ist. Aus diesem Grund muss der Einsatz der Antibiotika genau überlegt werden. [36] Jernberg et al. konnten zeigen, dass durch den Einsatz von Clindamycin über 7 Tage ausschliesslich in der exponierten Gruppe resistente *Bacteroides*-Klone angezüchtet werden konnten, die bis zu 2 Jahre nach Antibiotikagabe noch nachweisbar waren. Resistente Klone übernahmen im Beobachtungszeitraum zeitweise die dominante alleinige Stellung unter den *Bacteroides*, andere resistente *Bacteroides*-Klone verschwanden für einige Monate, traten jedoch nach beispielsweise 1 Jahr wieder auf. [145]

Unter diesem Gesichtspunkt wäre es interessant, durch weitere Analysen unserer Stuhlproben festzustellen, ob unter den unterschiedlichen Regimen und der unterschiedlichen Dauer der Gaben resistenten Erreger selektiert wurden.

Es bleibt die Frage, welche Mikrobiommuster der Antibiotikatherapie und welche Muster der Frühgeburt an sich geschuldet sind. Es ist daher wichtig, in weiteren Studien das Mikrobiom von Reifgeborenen und Frühgeborenen zu untersuchen, die nach Geburt mit denselben Antibiotikawirkstoffen behandelt worden sind.

Abschliessend ist zu sagen, dass unabhängig von den verwendeten Wirkstoffen die Dauer der Gabe stets zu überdenken ist, einerseits – wie bereits oben beschrieben - aufgrund der Entwicklung von Resistenzen und andererseits aufgrund der langfristigen Auswirkung einer Antibiotikagabe auf das Mikrobiom [145]. Um einen tieferen Einblick in die Auswirkungen von Antibiotika bei Frühgeborenen zu bekommen, macht es Sinn in nachfolgenden Studien bei gleicher Gruppengrösse auch Frühgeborene ohne empirische Antibiotika aufzunehmen und bezüglich langfristiger Folgen in einem 2-Jahres-Follow-up zu vergleichen. Sinn und Zweck dieses jungen Forschungsthemas soll es meiner Ansicht sein, ein Mikrobiommuster wie eine Art Biomarker für die Entwicklung einer NEC oder Sepsis zu generieren, die die Notwendigkeit einer Antibiotikatherapie rechtfertigen.

## 4.5 Ableitung für den Klinikalltag

Wir können aus der Studie folgende Rückschlüsse ziehen:

Unabhängig vom Wirkstoff und der Dauer der Antibiotikagabe ist der Einsatz und die Gabe dieser Wirkstoffe stets unter einer strengen Nutzen-Risiko-Abwägung täglich zu hinterfragen. Auch am Dr. von Haunerschen Kinderspital gibt es Antibiotic Stewardship-Programme, die das Ziel verfolgen: Beware antibiotics!



Der Anteil der *Bifidobacteriaceae* ist bei der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe bei Gabe 3 Tage am höchsten.

Der Shannon-Index ist in der Piperacillin/Tazobactam Gruppe in den entscheidenden ersten Lebenswochen höher. Damit ist die antibiotische Selektion etwas geringer als in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe. Dies ist besonders wichtig bei Selektion potentiell pathogener Keime. Zieht man die Interpretation von Wang et al. heran, der in seinen Ergebnissen zeigen konnte, dass NEC-Fälle eine geringere Diversität als Nicht-erkrankte Fälle aufweisen [80], so ist bezüglich der Diversität das Piperacillin/Tazobactam-Schema zu favorisieren.

Bezieht man sich auf die Studienergebnisse von Wang et al., die zeigen konnten, dass NEC-assoziierte Fälle über 90% *Proteobacteria* in den analysierten Stuhlproben enthielten [80], so schliessen wir daraus, dass es zwischen den beiden Schemata zwar kaum einen Unterschied im Anteil der *Enterobacteriaceae* gibt, unter der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe der Gesamtanteil jedoch etwas geringer ausfällt, und in Zusammenschau mit der etwas grösseren Menge an *Bifidobacteriaceae* im Hinblick auf die Vermeidung eines NEC-assoziierten Mikrobioms besser geeignet ist.

Wir konnten zeigen, dass unter der Piperacillin/Tazobactam-Gruppe der Anteil der *Proteobacteria* verhältnismässig höher war. Begleitend hierzu gab es bei dieser Gruppe weniger *Bacteroides* und weniger *Actinobacteria*. Bezüglich der daraus resultierenden veränderten Begleit-Familien und der potentiell pathogenen Keime präferieren wir unter diesem Gesichtspunkt die Ampicillin/Cefotaxim-Gabe.

Wir konnten zeigen, dass das Mikrobiommuster über lange Zeit eine *Enterobacteriaceae*-Dominanz aufweist. Der Einsatz und die Dauer der Antibioitkagabe ist daher – unabhängig von den Wirkstoffen – stets zu überdenken und so kurz wie möglich zu halten.

Die NeoMuniCH-Studie hat uns einen wichtigen Einblick in die Entwicklung des Mikrobioms von Frühgeborenen in unserer Klinik gegeben, speziell im Hinblick auf die Veränderungen der bakteriellen Vielfalt vor dem Hintergrund antibiotischer Therapie-Regime in der Neonatologie. Die Ergebnisse unserer Studie sollen im Hinblick der „Kollateralschäden“ einer breiten antibiotischen Therapie die behandelnden Kollegen im Einsatz von Antibiotika sensibilisieren und ggf. die Empfehlungen bzgl. Auswahl empirischer antibiotischer Therapien bei Früh- und Neugeborenen beeinflussen. Die Erkenntnisse dieser Studie leisten somit einen Beitrag zum Antibiotic-Stewardship-Programm am Dr. von Hauner'schen Kinderhospital und können ggf. in den Alltag integriert werden.

## Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, *Expert group on prematurity. Final Report.*, in *World Health Organization Technical Report Series No. 27*. 1950: Geneva. p. 1-11.
2. Speer, C.P., *Neonatologie*, in *Pädiatrie*, C.P. Speer, M. Gahr, and J. Dötsch, Editors. 2019, Springer Verlag: Würzburg, Dresden, Köln. p. 77-133.
3. Spätling, L., *Zur präzisen Bezeichnung des Gestationsalters*. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*, 2008. **212**(5): p. 197-198.
4. World Health Organization. *Preterm birth*. 2018 [cited 2020 May 12]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.
5. Tucker, J. and W. McGuire, *Abc of preterm birth: Epidemiology of preterm birth*. *British Medical Journal*, 2004. **329**(7467): p. 675-678.
6. Chawanpaiboon, S., et al., *Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis*. *The Lancet Global Health*, 2019. **7**(1): p. e37-e46.
7. Trotter, A., et al., *Frühgeburtenrate in 6 Perinatalzentren in Baden-Württemberg – Potential zur Reduktion der Frühgeborenenzahl*. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*, 2018. **222**: p. 197-206.
8. Euro-Peristat-Project, *European Perinatal Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015*. November 2018. p. 1-180.
9. IQTIG Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, *Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2017: Geburtshilfe*. 2018. p. 1-101.
10. Bundesverband "Das frühgeborene Kind" e.V. *Zahlen und Fakten: Reifgeborene vs Frühgeborene*. o.J. [cited 2020 May 21]; Available from: <http://welt-fruehgeborenen-tag.de/fruehgeborene-nach-ssw/>.
11. Bundesverband "Das frühgeborene Kind" e.V. *Zahlen und Fakten: Frühgeborene nach SSW und Gewichtsklassen*. o.J. [cited 2020 May 21]; Available from: <http://welt-fruehgeborenen-tag.de/reifgeborene-vs-fruehgeborene/>.
12. Xue, Q., et al., *An analysis of the medical indications for preterm birth in an obstetrics and gynaecology teaching hospital in Shanghai, China*. *Midwifery*, 2016. **35**: p. 17-21.
13. Montan, S., *Increased risk in the elderly parturient*. *Current Opinion Obstetrics and Gynecology*, 2007. **19**(2): p. 110-112.
14. Laopaiboon, M., et al., *Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment*. *BJOG*, 2014. **121 Supplement 1**: p. 49-56.
15. Voigt, M., et al., *Evaluation of maternal parameters as risk factors for premature birth (individual and combined effects)*. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*, 2009. **213**(4): p. 138-146.
16. Eijkemans, M.J., et al., *Too old to have children? Lessons from natural fertility populations*. *Human Reproduction*, 2014. **29**(6): p. 1304-1312.
17. Ananth, C.V. and S.P. Chauhan, *Epidemiology of twinning in developed countries*. *Seminars in Perinatology*, 2012. **36**(3): p. 156-161.
18. Sauer, M.V., *Reproduction at an advanced maternal age and maternal health*. *Fertility and Sterility*, 2015. **103**(5): p. 1136-1143.
19. Goldenberg, R.L., et al., *Epidemiology and causes of preterm birth*. *The Lancet*, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
20. Gardner, M.O., et al., *The origin and outcome of preterm twin pregnancies*. *Obstetrics and Gynecology*, 1995. **85**(4): p. 553-557.
21. Mercer, B.M., et al., *The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome*. *National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1999. **181**(5 ): p. 1216-1221.
22. Friese, K. and W. Kirschner, *Das BabyCare-Projekt*. *Gynäkologe*, 2003. **36**(5): p. 403-412.

23. Hentschel, R., *Die Bedeutung des Geburtsgewichts und der Schwangerschaftsdauer in der modernen Neonatologie*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2005. **65**(3): p. 272-278.
24. Amann, G., *Bildgebung in der Neonatologie*. Der Pathologe, 2000. **21**(5): p. 339-348.
25. Vogel, J.P., et al., *The global epidemiology of preterm birth*. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2018. **52**: p. 3-12.
26. McCormick, M.C., *The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity*. The New England Journal of Medicine, 1985. **312**(2): p. 82-90.
27. Weichert, A., et al., *Factors for Preterm Births in Germany - An Analysis of Representative German Data (KiGGS)*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2015. **75**(8): p. 819-826.
28. Glass, H.C., et al., *Outcomes for extremely premature infants*. Anesthesia and Analgesia, 2015. **120**(6): p. 1337-1351.
29. Purisch, S.E. and C. Gyamfi-Bannerman, *Epidemiology of preterm birth*. Seminars in Perinatology, 2017. **41**(7): p. 387-391.
30. Thanh, N.X., et al., *Health Service Use and Costs Associated with Low Birth Weight--A Population Level Analysis*. The Journal of Pediatrics, 2015. **167**(3): p. 551-556.e1-3.
31. Kirschner, W., H. Halle, and M.-A. Pogonke, *Kosten der Früh- und Nichtfrühgeburten und die Effektivität und Effizienz von Präventionsprogrammen am Beispiel von BabyCare*. Prävention und Gesundheitsförderung, 2009. **4**(1): p. 41-50.
32. Bauer, J., *Die unbekannte Welt der Mikrobiome. Einführung in das Rundgespräch, in Rundgespräche Forum Ökologie Band 47 - Die unbekannte Welt der Mikrobiome*, Bayerische Akademie der Wissenschaften, Editor. 2019, Verlag Dr. Friedrich Pfeil: München. p. 11-15.
33. Whipps, J.M., K. Lewis, and R.C. Cooke, *Mycoparasitism and plant disease control, in Fungi in biological control systems*, M.N. Burge, Editor. 1988, Manchester University Press: Manchester and New York. p. 161-187.
34. Lederberg, J., *Of Men and Microbes*. New Perspectives Quarterly, 2004. **21**(4): p. 92-96.
35. Schulze, J., *Humanes Mikrobiom - Wie Mensch und Mikrobe zusammenwirken*. Deutsche Heilpraktiker Zeitschrift, 2014. **9**: p. 4-11.
36. Stallmach, A. and M.J.G.T. Vehreschild, *Einleitung, in Mikrobiom. Wissensstand und Perspektive.*, A. Stallmach and M.J.G.T. Vehreschild, Editors., Walter de Gruyter GmbH: Berlin/Boston. p. 1-5.
37. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-249.
38. Marchesi, J.R. and J. Ravel, *The vocabulary of microbiome research: a proposal*. Microbiome, 2015. **3**:31.
39. Flamm, H., *The Austrian pediatrician Theodor Escherich as bacteriologist and social hygienist: The 100th anniversary of his death on February 15th, 1911*. Wiener klinische Wochenschrift, 2011. **123**(5-6): p. 157-171.
40. von Both, U., D. Adam, and J. Hübner, *Walter Marget and a brief history of paediatric infectious diseases in Munich, Germany*. Infection, 2023. **51**(3): p. 561-565.
41. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1268-1273.
42. Blaut, M., *Ecology and physiology of the intestinal tract*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2013. **358**: p. 247-272.
43. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1999. **69**(5): p. 1035s-1045s.
44. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, *The development of the bacterial flora in normal neonates*. Journal of Medical Microbiology, 1981. **14**(1): p. 51-62.

45. Orrhage, K. and C.E. Nord, *Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants*. Acta Paediatrica Supplement, 1999. **88**(430): p. 47-57.
46. Arboleya, S., et al., *Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates*. FEMS Microbiology Ecology, 2012. **79**(3): p. 763-772.
47. Karlsson, C.L., et al., *The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term—a pilot study*. Pediatric Research, 2011. **70**(3): p. 282-286.
48. Echarri, P.P., et al., *Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations*. Early Human Development, 2011. **87**(7): p. 511-513.
49. Sakata, H., H. Yoshioka, and K. Fujita, *Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns*. European Journal of Pediatrics, 1985. **144**(2): p. 186-190.
50. Dave, M., et al., *The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions*. Translational Research, 2012. **160**(4): p. 246-257.
51. Martinez, I., et al., *Experimental evaluation of the importance of colonization history in early-life gut microbiota assembly*. eLIFE, 2018. **7**:e36521.
52. Yatsunenkov, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-227.
53. Milani, C., et al., *The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota*. Microbiology and Molecular Biology Review, 2017. **81**(4): p. e00036-17.
54. Rodriguez, J.M., et al., *The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life*. Microbiol Ecology in Health and Disease, 2015. **26**:26050.
55. Berrington, J.E., et al., *Gut microbiota in preterm infants: assessment and relevance to health and disease*. Archives of Disease in Childhood Fetal Neonatal Edition, 2013. **98**(4): p. F286-290.
56. Conroy, M.E., H.N. Shi, and W.A. Walker, *The long-term health effects of neonatal microbial flora*. Current Opinion of Allergy and Clinical Immunology, 2009. **9**(3): p. 197-201.
57. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biology, 2007. **5**(7): p. e177.
58. Adlerberth, I., *Establishment of a normal intestinal microflora in the newborn infant, in Nestlé Nutrition Workshop Series Volume 42: Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora*, L.A. Hanson and R.H. Yolken, Editors. 1999, Vevey/Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 63-78.
59. Backhed, F., et al., *Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(5): p. 690-703.
60. Backhed, F., et al., *Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(6): p. 852.
61. Fanaro, S., et al., *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatrica Supplement, 2003. **91**(441): p. 48-55.
62. Stark, P.L. and A. Lee, *The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life*. Journal of Medical Microbiology, 1982. **15**(2): p. 189-203.
63. Cooperstock, M.S. and A.J. Zedd, *Intestinal Flora of Infants*, in *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, D.J. Hentges, Editor. 1983, Academic Press, : New York. p. 79-99.
64. Yoshioka, H., K. Iseki, and K. Fujita, *Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants*. Pediatrics, 1983. **72**(3): p. 317-321.
65. Benno, Y., K. Sawada, and T. Mitsuoka, *The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants*. Microbiology and Immunology, 1984. **28**(9): p. 975-986.

66. Grütte, F.-K., R. Horn, and H. Haenel, *Ernährung und biochemisch-mikroökologische Vorgänge im Enddarm von Säuglingen*. Zeitschrift für Kinderheilkunde, 1965. **93**(1): p. 28-39.
67. Carola, D., et al., *Utility of Early-Onset Sepsis Risk Calculator for Neonates Born to Mothers with Chorioamnionitis*. The Journal of Pediatrics, 2018. **195**: p. 48-52.e1.
68. van der Waaij, D., J.M. Berghuis-de Vries, and L.-v. Lekkerkerk, *Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice*. Journal of Hygiene, 1971. **69**(3): p. 405-411.
69. Thomson, P., D.A. Medina, and D. Garrido, *Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization*. Food Microbiology, 2018. **75**: p. 37-46.
70. Yu, Z.T., et al., *The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota*. Glycobiology, 2013. **23**(2): p. 169-177.
71. Engfer, M.B., et al., *Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract*. American Journal of Clinical Nutrition, 2000. **71**(6): p. 1589-1596.
72. Le Doare, K., et al., *Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity*. Frontiers Immunology, 2018. **9**:361.
73. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama*. Glycobiology, 2012. **22**(9): p. 1147-1162.
74. Favier, C.F., et al., *Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(1): p. 219-226.
75. Beule, A.G., *The Microbiome - The Unscheduled Parameter for Future Therapies*. Laryngorhinootologie, 2018. **97**(S 01): p. S279-S311.
76. McDonnell, L., et al., *Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis*. Gut Microbes, 2021. **13**(1): p. 1-18.
77. Arrieta, M.C., et al., *The intestinal microbiome in early life: health and disease*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**:427.
78. Stark, P.L. and A. Lee, *The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates*. Journal of Hygiene, 1982. **89**(1): p. 59-67.
79. Schwiertz, A., et al., *Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants*. Pediatric Research, 2003. **54**(3): p. 393-399.
80. Wang, Y., et al., *16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis*. ISME Journal, 2009. **3**(8): p. 944-954.
81. Sim, K., et al., *Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants*. Clinical Infectious Diseases, 2015. **60**(3): p. 389-397.
82. Denning, N.L. and J.M. Prince, *Neonatal intestinal dysbiosis in necrotizing enterocolitis*. Molecular Medicine, 2018. **24**(1): p. 1-10.
83. Petherick, A., *Development: Mother's milk: A rich opportunity*. Nature, 2010. **468**(7327): p. S5-7.
84. Butel, M.J., et al., *Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2007. **44**(5): p. 577-582.
85. Goldmann, D.A., J. Leclair, and A. Macone, *Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment*. The Journal of Pediatrics, 1978. **93**(2): p. 288-293.
86. Shaw, A.G., et al., *Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132923.
87. Yassour, M., et al., *Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability*. Science Translational Medicine, 2016. **8**(343): p. 343ra81.

88. Tanaka, S., et al., *Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2009. **56**(1): p. 80-87.
89. Claud, E.C. and W.A. Walker, *Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis*. The FASEB Journal, 2001. **15**(8): p. 1398-1403.
90. Sorbara, M.T. and E.G. Pamer, *Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them*. Mucosal Immunology, 2019. **12**(1): p. 1-9.
91. Duffy, L.C., *Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine*. The Journal of Nutrition, 2000. **130**(2S Supplement): p. 432s-436s.
92. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen, *Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996. **70**(2-4): p. 347-358.
93. Weaver, L.T., M.F. Laker, and R. Nelson, *Intestinal permeability in the newborn*. Archives of Disease in Childhood, 1984. **59**(3): p. 236-241.
94. Berg, R.D. and A.W. Garlington, *Translocation of Certain Indigenous Bacteria from the Gastrointestinal Tract to the Mesenteric Lymph Nodes and Other Organs in a Gnotobiotic Mouse Model*. Infection and Immunity, 1979. **23**(2): p. 403-411.
95. Genzel-Boroviczeny, O., *Leitlinie zur nekrotisierenden Enterokolitis (NEK)*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2011. **159**: p. 968-976.
96. Schnabl, K.L., et al., *Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure*. World Journal of Gastroenterology, 2008. **14**(14): p. 2142-2161.
97. Jeschke, E., et al., *Mortality and Major Morbidity of Very-Low-Birth-Weight Infants in Germany 2008-2012: A Report Based on Administrative Data*. Frontiers in Pediatrics, 2016. **4**: p. 23.
98. Korpela, K., et al., *Antibiotics in early life associate with specific gut microbiota signatures in a prospective longitudinal infant cohort*. Pediatric Research, 2020. **88**(3): p. 438-443.
99. Guarino, A. and R.B. Canani, *Probiotics in Childhood Diseases: From Basic Science to Guidelines in 20 Years of Research and Development*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2016. **63** (Supplement 1): p. S1-2.
100. Isolauri, E., S. Salminen, and S. Rautava, *Early Microbe Contact and Obesity Risk: Evidence Of Causality?* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2016. **63**(Supplement 1): p. S3-S5.
101. Tang, W.H. and S.L. Hazen, *The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease*. Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(10): p. 4204-4211.
102. Sanchez-Alcoholado, L., et al., *Role of Gut Microbiota on Cardio-Metabolic Parameters and Immunity in Coronary Artery Disease Patients with and without Type-2 Diabetes Mellitus*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**:1936.
103. Han, J.C., D.A. Lawlor, and S.Y. Kimm, *Childhood obesity*. The Lancet, 2010. **375**(9727): p. 1737-1748.
104. Ford, E.S., *The epidemiology of obesity and asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005. **115**(5): p. 897-909.
105. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. The New England Journal of Medicine, 2003. **348**(17): p. 1625-1638.
106. Kalliomaki, M., et al., *Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight*. American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **87**(3): p. 534-538.
107. Sim, K., et al., *The neonatal gastrointestinal microbiota: the foundation of future health?* Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, 2013. **98**(4): p. F362-364.

108. Zuo, H.J., et al., *Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism*. World Journal of Gastroenterology, 2011. **17**(8): p. 1076-1081.
109. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-1031.
110. Sutton, B.J. and H.J. Gould, *The human IgE network*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 421-428.
111. Galli, S.J., J.R. Gordon, and B.K. Wershil, *Cytokine production by mast cells and basophils*. Current Opinion Immunology, 1991. **3**(6): p. 865-872.
112. Kalliomaki, M., et al., *Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001. **107**(1): p. 129-134.
113. Cahenzli, J., et al., *Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels*. Cell Host & Microbe, 2013. **14**(5): p. 559-570.
114. Greenwood, C., et al., *Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter*. The Journal of Pediatrics, 2014. **165**(1): p. 23-29.
115. Odio, C.M., *Cefotaxime for treatment of neonatal sepsis and meningitis*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1995. **22**(1-2): p. 111-117.
116. Obladen, M., *Infektionen*, in *Neugeborenenintensivmedizin*, M. Obladen and R.F. Maier, Editors., Springer: Heidelberg. p. 517-545.
117. Zemlin, M., et al., *Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. Leitlinie der GNPI, DGPI, DGKJ und DGGG. (S2k-Level, AWMF-Leitlinien-Register-Nr. 024/008, April 2018)*. Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie, 2019. **223**(3): p. 130-144.
118. Hornik, C.P., et al., *Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units*. Early Human Development, 2012. **88**(Suppl 2): p. 69-74.
119. Litz, J.E., et al., *Management of early- and late-onset sepsis: results from a survey in 80 German NICUs*. Infection, 2019. **47**(4): p. 557-564.
120. Rivera-Chaparro, N.D., M. Cohen-Wolkowicz, and R.G. Greenberg, *Dosing antibiotics in neonates: review of the pharmacokinetic data*. Future Microbiology, 2017. **12**(11): p. 1001-1016.
121. Hsieh, E.M., et al., *Medication use in the neonatal intensive care unit*. American Journal of Perinatology, 2014. **31**(9): p. 811-821.
122. Lambert-Zechovsky, N., et al., *Impact of cefotaxime on the fecal flora in children*. Infection, 1985. **13** (Supplement 1): p. S140-S144.
123. Clark, R.H., et al., *Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set*. Pediatrics, 2006. **117**(6): p. 1979-1987.
124. Kuppala, V.S., et al., *Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants*. The Journal of Pediatrics, 2011. **159**(5): p. 720-725.
125. Simon, A., et al., *Antibiotic stewardship in paediatrics*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2018. **166**(1): p. 48-56.
126. von Both, U., et al., *Antibiotic Stewardship im stationären Bereich der Pädiatrie*. Kinder- und Jugendarzt, 2016. **47**(4): p. 212-220.
127. Langdon, A., N. Crook, and G. Dantas, *The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation*. Genome Medicine, 2016. **8**:39.
128. Peter, S., *Mikrobiom und Metagenom - Präanalytik, DNA-Extraktion und Next-Generation-Sequencing aus Stuhlproben*, in *Mikrobiom. Wissensstand und Perspektiven*, A. Stallmach and M.J.G.T. Vehreschild, Editors. 2016, Walter de Gruyter GmbH: Berlin/Boston. p. 7-20.

129. Bazanella, M., et al., *Randomized controlled trial on the impact of early-life intervention with bifidobacteria on the healthy infant fecal microbiota and metabolome*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2017. **106**(5): p. 1274-1286.
130. Godon, J.J., et al., *Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(7): p. 2802-2813.
131. Klindworth, A., et al., *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(1): p. e1.
132. Berry, D., et al., *Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(21): p. 7846-7849.
133. Lagkouvardos, I., et al., *IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 33721.
134. Lagkouvardos, I., et al., *Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons*. PeerJ, 2017. **5**: p. e2836.
135. Subramanian, B., et al., *Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees*. Nucleic Acids Research, 2019. **47**(W1): p. W270-w275.
136. Moubareck, C., et al., *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **55**(1): p. 38-44.
137. Kim, S., A. Covington, and E.G. Pamer, *The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens*. Immunological Reviews, 2017. **279**(1): p. 90-105.
138. Bokulich, N.A., et al., *Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life*. Science Translational Medicine, 2016. **8**(343): p. 343ra82.
139. Lopetuso, L.R., et al., *Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis*. Gut Pathogogenes, 2013. **5**(1): p. 23.
140. Collins, M.D., et al., *The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994. **44**(4): p. 812-826.
141. Taur, Y. and E.G. Pamer, *The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients*. Current Opinion in Infectious Diseases, 2013. **26**(4): p. 332-337.
142. Taur, Y., et al., *Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Clinical Infectious Diseases, 2012. **55**(7): p. 905-914.
143. Quince, C., et al., *Shotgun metagenomics, from sampling to analysis*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(9): p. 833-844.
144. Thürmer, A., *Next Generation Sequencing in der mikrobiellen (Meta)Genomforschung: Genomsequenzierung*. BIOSpektrum, 2014. **20**(2): p. 168-171.
145. Jernberg, C., et al., *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. The ISME Journal, 2007. **1**(1): p. 56-66.



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Frühgeburt nach Gestationsalter, in Anlehnung an [2, 4, 5].	13
Abb. 2: Geographische Verteilung der Frühgeburten unter Lebendgeborenen in Europa [8]. Mit freundlicher Genehmigung der Verwendung der Grafik durch EuroPersitat.	14
Abb. 3: Anteil der Frühgeburten – definiert nach Gestationsalter – an Geburtenzahl in Deutschland in 2018, in Anlehnung an [9, 10].	15
Abb. 4: Anteil der Frühgeburten – definiert nach Geburtsgewicht – an der Gesamt-Geburtenzahl in Deutschland in 2018, in Anlehnung an [9, 11].	15
Abb. 5: Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit, in Anlehnung an [22].	17
Abb. 6: Gegenüberstellung der Pubmed-Publikationen zu den Begriffen microbiome bzw. microbiome AND preterm infants (2002-2022) , Stand: 11.02.2023, in Anlehnung an [32].	20
Abb. 7: Mikrobiota-Gattungen im Gastrointestinaltrakt, in Anlehnung an [35, 42].	21
Abb. 8: Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Mikrobiommusters, in Anlehnung an [53-55].	23
Abb. 9: Schritte der Mikrobiomanalyse im Rahmen der NeoMuniCH-Studie nach [128].	38
Abb. 10: Überblick über die Anzahl der Studienteilnehmer in den Antibiotika-Gruppen Ampicillin/Cefotaxim, Piperacillin/Tazobactam, Others und None. Weitere Subgruppenbildung in der Amp/Cefo-Gruppe und Amp/Cefo Plus-Gruppe. N= Anzahl Studienteilnehmer, n= Anzahl Stuhlproben. Datenaufbereitung durch Nina Heppner, (M.Sc.). Grafik durch Gabriela Reichard.	51
Abb. 11: Anzahl der Studienteilnehmer mit den Subgruppen Amp/Cef (blau), PipTaz (rot), und Others (grün) am Standort Grosshadern (GH). Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.	52
Abb. 12: Anzahl der Studienteilnehmer mit den Subgruppen Amp/Cef (blau), PipTaz (rot), und Others (grün) am Standort Innenstadt (INN). Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.	52
Abb. 13: Geburtsgewicht (in Gramm) der Studienteilnehmer (N= Anzahl der Studienteilnehmer) mit den Subgruppen Amp/Cef N=82 (blau), PipTaz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.	53
Abb. 14: Gestationsalter (in Tagen) der Studienteilnehmer (N= Anzahl der Studienteilnehmer), mit den Subgruppen Amp/Cefo N=82 (blau), PipTaz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard.	53

- Abb. 15: Dauer der Gabe (in Tagen) der einzelnen Antibiotika-Wirkstoffe. Angabe der Studienteilnehmer (N=Anzahl der Studienteilnehmer), die die jeweiligen Wirkstoffe erhalten haben. Jeder Punkt stellt einen Studienteilnehmer dar, der dieses Antibiotikum erhalten hat. Ampicillin/Cefotaxim (blau), Piperacillin/Tazobactam (rot), Others (grau). Line at mean. Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 54
- Abb. 16: Gesamtdauer (in Tagen) der Antibiotikagabe, aufgeteilt auf die Antibiotikagruppen Amp/Cef N=82 (blau), PipTaz N=20 (rot) und Others N=28 (grün). Mean with SD. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik und Grafik durch Gabriela Reichard..... 55
- Abb. 17: Verteilung (in %) der vorhandenen Stuhlproben (Total= Gesamtzahl der Stuhlproben) innerhalb der Antibiotikagruppen Amp/Cefo, Pip/Taz und Others innerhalb des Beobachtungszeitraumes (week 1 bis 12). Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 56
- Abb. 18: Richness (in zOTUs), aufgeteilt nach Antibiotikagruppen PipTaz (rot), Amp/Cefo (blau) und OtherABs (grün). Betrachtung in Abhängigkeit der Lebenswoche 1 bis 12. Mean (dot) with SEM. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 57
- Abb. 19: Shannon-Index (in Shannon effective no.) aufgeteilt nach Antibiotikagruppen PipTaz (rot), Amp/Cefo (blau) und Others (grün). Betrachtung in Abhängigkeit der Lebenswoche 1 bis 12. Mean (dot) with SEM. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 58
- Abb. 20: Richness (in zOTUs) für Woche 1 und 2, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen Amp/Cefo, PipTaz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 59
- Abb. 21: Shannon-Index (in Shannon effective number) für Woche 1 und 2, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen Amp/Cefo, PipTaz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . Mean with SD. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 59
- Abb. 22: Richness (in zOTUs) für Woche 3 und 4, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen Amp/Cefo, PipTaz und "Others", \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 60
- Abb. 23: Richness (in zOTUs) für Woche 7 und 8, aufgeteilt nach Antibiotikagruppen Amp/Cefo, Pip/Taz und "Others". ns  $p > 0.05$ , \*  $p \leq 0.05$ . 25/75th percentile, line at median, whiskers min/max. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 60
- Abb. 24: Shannon-Index (in Shannon effective no.) aller Studienteilnehmer (inkl. Ausreisser ID 150), verteilt auf die Antibiotika-Schemata

- AmpiCefo (blau), PipTaz (rot), Others (grün) und ALL (schwarz).  
\*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Scatter plot mit box=mean. dots=single sample.  
Triangle=ID 150. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch  
Nina Heppner (M.Sc.)..... 61
- Abb. 25: Shannon-Index (in Shannon effective number) (exkl. Ausreisser  
ID=150), verteilt auf die Antibiotika-Schemata AmpiCefo (blau),  
PipTaz (rot) und Others (grün). \*\*\* $p \leq 0.001$ . Scatter plot mit  
box=mean with SD. Dots=single sample in AmpiCefo-group,  
square= single sample in PipTaz group, triangle= single sample in  
Others. Datenaufbereitung, Statistik und Grafik durch Nina  
Heppner (M.Sc.)..... 62
- Abb. 26: Darstellung der Taxonomie (in %) auf dem Level Familie der  
Bakterienstämme in der Ampicillin/Cefotaxim-Gruppe.  
Datenaufbereitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 63
- Abb. 27: Darstellung der Taxonomie (in %) auf dem Level Familie der  
Bakterienstämme in der Pip/Taz-Gruppe. Datenaufbereitung und  
Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.) ..... 64
- Abb. 28: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index (in Shannon effective  
no.) des Studienkindes 150, verteilt auf die  
Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und Grafik durch  
Nina Heppner (M.Sc.)..... 65
- Abb. 29: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index vom Studienkind 105 ,  
verteilt auf die Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und  
Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.) ..... 66
- Abb. 30: Richness (in zOTUs) und Shannon-Index vom Studienkind 106 ,  
verteilt auf die Beobachtungszeiträume. Datenaufbereitung und  
Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.) ..... 66
- Abb. 31: Gesamtmenge in (%) der acht dominanten Bakterienfamilien in  
den Stuhlproben der Studienkinder 105 (Kreis), 106 (Dreieck) und  
150 (Raute). Darstellung von Woche 4. Datenaufbereitung und  
Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.) ..... 67
- Abb. 32: Gesamtmenge in (%) der acht dominanten Bakterienfamilien in  
den Stuhlproben der Studienkinder 105 (Kreis), 106 (Rechteck)  
und 150 (Raute). Darstellung von Woche 12. Datenaufbereitung  
und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.) ..... 67
- Abb. 33: Anzahl der Studienteilnehmer aus der Ampicillin/Cefotaxim-  
Gruppe (N = Anzahl der Studienteilnehmer), aufgeteilt nach Dauer  
der Antibiotikagabe 3, 4/5 und 6+ Tage. Datenaufarbeitung durch  
Nina Heppner (M.Sc.). Grafik durch Gabriela Reichard. .... 68
- Abb. 34: Shannon-Index (in Shannon effective no.) in Abhängigkeit der  
unterschiedlichen Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim mit  
3d, 4/5 Tage und 6+ Tage. Dotted line 25th/75th percentile, dashed  
line at median, ns  $p > 0.05$ . Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik  
durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 69
- Abb. 35: Richness (in zOTUs) in Abhängigkeit von der unterschiedlichen  
Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim mit 3d, 4/5 Tage und 6+  
Tage. Dotted line 25th/75th percentile, dashed line at median, ns  $p$   
 $> 0.05$ . Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina  
Heppner (M.Sc.)..... 70

- Abb. 36: Shannon-Index (in Shannon effective no.) in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer der Gabe der Wirkstoffe Ampicillin/Cefotaxim mit 3 (hellblauer Kreis), 4/5 (türkisches Dreieck) und 6+ (violettes Quadrat) Tagen, aufgeteilt nach Lebenswoche. N= Gesamtzahl der ausgewerteten Proben. Mean with SEM. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 71
- Abb. 37: Richness (in zOTUs; in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer der Gabe der Wirkstoffe Ampicillin/Cefotaxim mit 3 (hellblauer Kreis), 4/5 (türkisches Dreieck) und 6+ (violettes Quadrat) Tagen, aufgeteilt nach Lebenswochen. N= Gesamtzahl der ausgewerteten Stuhlproben. Mean with SEM. Datenaufarbeitung, deskriptive Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 72
- Abb. 38: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ Tage (violett) in Lebenswoche 1. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 74
- Abb. 39: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 2. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 75
- Abb. 40: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 3. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 77
- Abb. 41: Menge der Bakterien (Top 15) (in %) in Abhängigkeit der Dauer der Gabe von Ampicillin/Cefotaxim von 3d (hellblau), 4/5d (türkis) und 6+ (violett) Tage in Lebenswoche 4. 25th/75th percentile, line at median, dot at mean, whiskers min/max. Datenaufarbeitung, Statistik und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.)..... 78
- Abb. 42: Phylogenetischer Baum. Der innerste Ring stellt die Phyla dar. Im zweiten inneren Ring sind die Lebenswochen/Sammelwochen der Studienteilnehmer dargestellt. Der dritte Ring stellt die Zuordnung der Stuhlproben zu den unterschiedlichen Antibioitikaschemata Ampi/Cefo, AmpiCefoPlus, Pip/Taz, PipTazPlus, Other ABs und None dar. Der äusserste Ring enthält die unterschiedlichen Länge der Antibiotikagaben 3 days, 4/5 days und 6+ days. Datenaufarbeitung und Grafik durch Nina Heppner (M.Sc.). Erstellung mittels Evolvew v3. .... 81

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Frühgeborenen nach Geburtsgewicht, in Anlehnung an [2]. .....	12
Tab. 2: Einteilung der Frühgeburt nach Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter, in Anlehnung an [2]. .....	13
Tab. 3: Perinatale Mortalitätsrate in Abhängigkeit des Reifealters im Jahr 2017 in Deutschland, in Anlehnung an [9]. .....	18
Tab. 4: Häufige aerobe/fakultativ-anaerobe und anaerobe Bakterienstämme in fetalen Stuhlproben, in Anlehnung an [42-45]. .....	22
Tab. 5: Nahrungsabhängige Phasen der Mikrobiomentwicklung, in Anlehnung an [62, 63]. .....	24
Tab. 6: Häufige EOS- und LOS-Sepsiserreger, in Anlehnung an [118]. .....	33
Tab. 7: Übertragene klinische Daten „Admission“. Die Eingabemaske wurde durch unseren Kooperationspartner am Imperial College London zur Verfügung gestellt. ....	41
Tab. 8: Klinische Daten „Daily Report“. Die Eingabemaske wurde durch unseren Kooperations-partner am Imperial College London zur Verfügung gestellt. ....	42
Tab. 9: Antibiotika-Wirkstoffe, die im Beobachtungszeitraum an den Studienorten verabreicht wurden. ....	46
Tab. 10: Überblick über die Studienkohorte in ihrer Gesamtheit und Aufteilung nach Antibiotika-Schemata Ampi/Cefo, PipTaz, Others und None. Datenaufbereitung durch Nina Heppner (M.Sc.). Deskriptive Statistik durch Gabriela Reichard. ....	50
Tab. 11: Zusammenfassende Übersicht der dominanten Bakterienfamilien (in %) in Abhängigkeit der Lebenswochen 1-4 und der Dauer der Antibiotikagaben 3 Tage, 4/5 Tage und 6+ Tage und unter Berücksichtigung der gerundet prozentualen Anteile der Bifidobakterien. Datenaufbereitung durch Nina Heppner, Zusammenstellen der Tabelle durch Gabriela Reichard .....	79

## Danksagung

Danke an meinen Doktorvater PD Dr. med. Ulrich von Both, der mir dieses Thema im stetigen Vertrauen überlassen und die nötigen Rahmenbedingungen geschaffen hat, damit die Studie durchgeführt werden konnte. Herzlichen Dank für die Betreuung und die konstruktiven Anregungen bei dieser Arbeit.

Danke an Herrn Prof. Dr. Andreas W. Flemmer, der durch Zustimmung der Etablierung der Studie am Standort Grosshadern die Durchführbarkeit unserer Idee ermöglicht hat.

Herzlichen Dank an das Schwestern- und Ärzte-Team der Neonatologie an den Standorten Innenstadt und Grosshadern für die Motivation und die sorgfältige Arbeit über den gesamten Studienzeitraum. Ohne deren Gewissenhaftigkeit und motiviertes Mitarbeiten wäre die Biobank, das Herzstück der Studie nicht entstanden.

Herzlichen Dank an Frau Sybille Auer für das Heraussuchen der archivierten Patientenakten.

Ein grosses Dankeschön gilt den Eltern der kleinen Studienteilnehmer, die ohne Zögern der Teilnahme der Kleinen an der Studie zugestimmt haben.

Danke an unsere Kooperationspartner in London vom Imperial College, der durch das Team von Prof. Dr. Haller (Leiter des Lehrstuhls für Ernährung und Immunologie an der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München) für die Mikrobiomanalysen abgelöst wurden, in diesem Zusammenhang insbesondere an Nina Heppner, die sämtliche Daten und Materialien wissenschaftlich und statistisch aufbereitet und die Grundlage geschaffen hat, dass ich Ergebnisse für die NeoMuniCH-Studie interpretierend einarbeiten konnte.

Herzlichen Dank an das Laborteam von PD Dr. med. Ulrich von Both, insbesondere an Judith Buschbeck und Laura Kolberg.

Danke auch an meine Mitdoktoranten Leonie Schaumann und Maria Hüneburg für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein grösster Dank gilt meinen lieben Eltern, die mich auf meinem langen beruflichen Werdegang bedingungslos unterstützt haben, sodass ich meinen Weg gehen konnte.

Ein herzliches Dankeschön an meinen lieben Bruder Micha. Du hast mich als mein grosses Vorbild auf meinem Weg unterstützend begleitet und ich habe von dir so viel lernen dürfen. Ich widme euch, meiner Familie in Liebe diese Arbeit!

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Reichard, Gabriela Eva-Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Analyse der Entwicklung des Mikrobioms von Frühgeborenen (< 32. SSW) im Hinblick auf die Auswirkungen unterschiedlicher empirischer Antibiotikaregime im Rahmen der NeoMuniCH-Studie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.10.2024

Gabriela Eva-Maria Reichard

## **Lebenslauf**





## Publikationsliste

**Reichard G**, Mayer J.M., Holzbach T. *Our experience in the use of Novosorb® BTM for large-area excision of squamous cell carcinoma at the capillitium*

Postervorstellung im Rahmen des 58th Annual Meeting Swiss Plastic Surgery, Bern, Schweiz, 23. bis 24. September 2022.

Loucas R, Loucas M, Leitsch S, Danuser K, **Reichard G**, Haroon O, Mayer J.M., Koban K, Holzbach T. *Intraoperative Volumetric Assessment of Breast Volume using Vectra H2 Handheld Device: A Feasibility and Validity Study.*

Journal of Personalized Medicine, 2023. 13(8):1262.