

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

**Diversität des intestinalen Mikrobioms von frühgeborenen
Zwillingen und Drillingen**

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

vorgelegt von
Leonie Sophia Block

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Ulrich von Both

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Simm

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2025

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Abbildungsverzeichnis..... | V |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Frühgeburt..... | 3 |
| 1.1.1 Risiko für Frühgeburtlichkeit..... | 3 |
| 1.1.2 Folgen der Frühgeburtlichkeit..... | 4 |
| 1.1.3 Nekrotisierende Enterokolitis | 7 |
| 1.1.4 Versorgung und Therapie frühgeborener Säuglinge..... | 8 |
| 1.2 Mikrobiom | 10 |
| 1.3 Intestinales Mikrobiom | 13 |
| 1.3.1 Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit..... | 14 |
| 1.3.2 Diversität des intestinalen Mikrobioms | 15 |
| 1.3.3 Entwicklung des intestinalen Mikrobioms | 16 |
| 1.3.4 Intestinales Mikrobiom Frühgeborener | 17 |
| 2 Zielsetzung | 18 |
| 3 Material und Methoden | 19 |
| 3.1 Klinischer Teilbereich..... | 19 |
| 3.1.1 Studiendesign | 19 |
| 3.1.2 Etablierung der NeoMuniCH-Studie..... | 20 |
| 3.1.3 Sammeln der Proben..... | 20 |
| 3.1.4 Erfassung klinischer Verlaufsparameter | 21 |
| 3.2 Experimenteller Teilbereich..... | 22 |
| 3.2.1 Auswahl der zu untersuchenden Proben..... | 22 |
| 3.2.2 DNA-Extraktion..... | 23 |
| 3.2.3 NanoDrop Spectrophotometrie | 24 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.4 | Polymerase-Kettenreaktion | 25 |
| 3.2.5 | DNA-Aufreinigung | 26 |
| 3.2.6 | PicoGreen Quantifizierung | 26 |
| 3.2.7 | Pyrosequencing | 26 |
| 3.3 | Statistische Analyse | 28 |
| 3.3.1 | Alpha-Diversität | 28 |
| 3.3.1.1 | Rarefaction Curve | 28 |
| 3.3.1.2 | Analyse der Alpha-Diversität | 29 |
| 3.3.2 | Beta-Diversität | 30 |
| 3.3.2.1 | Testung auf Normalverteilung, Log10-Transformation | 32 |
| 3.3.2.2 | Analyse der Uni-Frac-Distanz | 32 |
| 3.3.3 | Einfluss von Therapien auf das intestinale Mikrobiom | 33 |
| 4 | Ergebnisse | 34 |
| 4.1 | Patientenkollektiv und klinische Parameter | 34 |
| 4.2 | Zunahme der alpha-Diversität mit steigendem Lebensalter | 37 |
| 4.2.1 | Visuelle Darstellung der alpha-Diversität | 37 |
| 4.2.2 | Statistische Analyse mittels linearer Regression | 40 |
| 4.2.3 | Statistische Analyse mittels Spearman-Korrelation | 40 |
| 4.2.4 | Untersuchung der Alpha-Diversität in getrennten Zeiträumen | 41 |
| 4.3 | Beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen | 43 |
| 4.3.1 | Darstellung der beta-Diversität durch Beobachtung des Verlaufes der OTUs .. | 43 |
| 4.3.2 | UniFrac-Distanz von Geschwistern und Nicht-Geschwistern | 44 |
| 4.4 | Einfluss unterschiedlicher Therapien auf die beta-Diversität | 48 |
| 5 | Diskussion | 50 |
| 5.1 | Diversität des intestinalen Mikrobioms im zeitlichen Verlauf | 50 |
| 5.2 | Parallele Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen | 51 |
| 5.3 | Einfluss unterschiedlicher Therapien auf die beta-Diversität | 52 |
| 5.4 | Nekrotisierende Enterokolitis | 54 |

| | | |
|-------|---|---------|
| 5.5 | Diskussion der angewandten Methoden | 56 |
| 5.5.1 | Patientenkollektiv | 56 |
| 5.5.2 | Experimentelle Untersuchung | 57 |
| 5.6 | Ausblick | 58 |
| 6 | Zusammenfassung | 59 |
| 7 | Summary | 60 |
| 8 | Literaturverzeichnis | LXI |
| | Anhang | LXX |
| | Eidesstattliche Versicherung | LXXX |
| | Übereinstimmungserklärung | LXXXI |
| | Danksagung | LXXXII |
| | Lebenslauf | LXXXIII |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| <i>Abbildung 1</i> Häufige prä- und postnatale Risikofaktoren von Frühgeburtlichkeit abgebildet parallel zu den Entwicklungsschritten der Fetogenese (9, 26) | 5 |
| <i>Abbildung 2</i> Systematik der Taxonomie der Bakterien am Beispiel des Phylum Actinobacteria; Einteilung in Domäne, Phylum, Klasse, Ordnung, Familie und Genus | 11 |
| <i>Abbildung 3</i> Häufigste bakterielle Phyla in den Regionen distaler Ösophagus (64), Magen (61), Darm (62), Haut (63) | 12 |
| <i>Abbildung 4</i> Prozentuale Verteilung des Mikrobioms nach Körperregion (1)..... | 13 |
| <i>Abbildung 5</i> aus der Publikation „Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core“ (71) von Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al.: Aus intestinalem Mikrobiom von 17 gesunden Probanden identifizierte OTUs im Koordinatensystem abgebildet Häufigkeit der DNA-Sequenz einer OTU korreliert mit Größe des Kreises, Prävalenz korreliert mit zunehmend roter Farbe..... | 14 |
| <i>Abbildung 6</i> Rarefaction-curve aller sequenzierten Proben mit > 5000 enthaltenen DNA-Sequenzen..... | 28 |
| <i>Abbildung 7</i> UniFrac-Analyse anhand des phylogenetischen Baumes und drei Populationen der Farben „rot“, „grün“ und „blau“: (i) als Beispiel für hohe beta-Diversität, (ii) beta-Diversität gleich null, (iii) beta-Diversität unterschiedlich (104) | 31 |
| <i>Abbildung 8</i> Grafik zur Veranschaulichung des Patientenkollektivs..... | 34 |
| <i>Abbildung 9</i> Verteilung der Bakterienphyla (L2) mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Abgebildet sind die Mittelwerte der in allen Stuhlproben aller Teilnehmer vorhandenen Bakterien, die zum auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkt Teil der Studie waren. | 38 |
| <i>Abbildung 10</i> Verteilung der Bakteriengenus (L6) mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Abgebildet sind die Mittelwerte der in allen Stuhlproben aller Teilnehmer vorhandenen Bakterien, die zum auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkt Teil der Studie waren. | 39 |
| <i>Abbildung 11</i> Spearman-Korrelation mit Lowess-Linie des Shannon-Indexes über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die x-Achse stellt das Alter in Tagen, die y-Achse den Shannon-Index dar. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Lowess-Linie dar..... | 41 |
| <i>Abbildung 12</i> Spearman-Korrelation mit Lowess-Linie des Simpson-Indexes und der Equitability über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die x-Achse stellt das Alter in Tagen, die y-Achse den Simpson-Index bzw. die Equitability dar. Jeder Punkt entspricht einer | |

| | |
|--|----|
| einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Lowess-Linie dar. | 41 |
| <i>Abbildung 13</i> Lineare Regression des Shannon-Indexes in den Zeiträumen 0-40 (A) bzw. 41-100 Tage (B) mit Angabe der Regressionskoeffizienten R^2 , Spearman-Korrelationskoeffizient r und p-Wert. In den Grafiken stellt die x-Achse das Alter in Tagen, die y-Achse den Shannon-Index dar. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Regressionsgerade dar..... | 42 |
| <i>Abbildung 14</i> Parallele Darstellung der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms der Zwillinge „Siblings 2“ und „Siblings 5“. Jeder Balken stellt eine untersuchte Probe am auf der x-Achse markierten Tag mit den farblich gekennzeichneten Anteilen verschiedener Bakterien dar. Die jeweils links und rechts gruppierten Balken sind jeweils einem der Frühgeborenen zugeordnet. | 44 |
| <i>Abbildung 15</i> Boxplots des Wilcoxon-Tests der log10-transformierten UniFrac-Distanzen der Gruppen „Geschwister“ und „nicht Geschwister“ mit Angabe der Teststatistik W, p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen..... | 45 |
| <i>Abbildung 16</i> Boxplots des Wilcoxon-Tests der log10-transformierten UniFrac-Distanzen der Gruppen „Geschwister“ und „nicht Geschwister“ zu auf der x-Achse beschriebenen Zeitpunkten mit Angabe der Teststatistik W, p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen..... | 46 |
| <i>Abbildung 17</i> Boxplots des Wilcoxon-Tests unterschiedlich (A: Zugang nur eines Kindes, B: Zugang und Beatmung eines Kindes, C: Beatmung eines Kindes) sowie gleich behandelter Geschwister mit Angabe der Teststatistik W, p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen..... | 49 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>Tabelle 1</i> Risiken für Frühgeburtlichkeit aufgeschlüsselt nach Kategorien | 4 |
| <i>Tabelle 2</i> Häufigste kurz- und langfristige Folgen für Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht gegliedert nach Organsystemen (30)..... | 7 |
| <i>Tabelle 3</i> Fünf häufigste bakterielle Phyla des humanen Mikrobioms mit bekannten Bakteriengenus (L6) (62, 65)..... | 12 |
| <i>Tabelle 4</i> Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit..... | 15 |
| <i>Tabelle 5</i> Definition von Alpha-, Beta- und Gamma-Diversität (84)..... | 16 |
| <i>Tabelle 6</i> Einflussfaktoren der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms und deren Auswirkungen..... | 17 |
| <i>Tabelle 7</i> Überwiegende Bakterienspezies im intestinalen Mikrobiom Früh- und Reifgeborener ab dem 10. Lebenstag (94)..... | 17 |
| <i>Tabelle 8</i> Täglich erfasste klinische Verlaufspараметер | 21 |
| <i>Tabelle 9</i> Idealbeispiel für die Auswahl der untersuchten Stuhlproben | 22 |
| <i>Tabelle 10</i> Indices der Alpha-Diversität mit jeweiligen Formeln (102)..... | 30 |
| <i>Tabelle 11</i> Daten zum Patientenkollektiv dieser Arbeit: Detaillierte Informationen zu demographischen und klinischen Parametern, jeweils in absoluter Anzahl, Mittelwert mit Minimum und Maximum und Median mit 1. und 3. Interquartilsabstand | 35 |
| <i>Tabelle 12</i> Regressionskoeffizienten R ² und p-Wert der Indices der alpha-Diversity (Shannon-, Simpson-Index und Equitability) über den gesamten untersuchten Zeitraum..... | 40 |
| <i>Tabelle 13</i> Spearman-Korrelationskoeffizienten und p-Wert der Indices der alpha-Diversity (Shannon-, Simpson-Index und Equitability) über den gesamten untersuchten Zeitraum | 40 |
| <i>Tabelle 14</i> Spearman-Korrelationskoeffizienten der Indices der alpha-Diversität (Shannon-, Simpson-Index, Equitability) mit p-Werten in den zwei untersuchten Zeiträumen | 42 |
| <i>Tabelle 15</i> Anzahl der Geschwister innerhalb einer Kategorie zum Vergleich unterschiedlicher Einflussgrößen..... | 48 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| BMI | Body-Mass Index |
| bspw. | beispielsweise |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| CPAP | Continuous Positive Airway Pressure |
| DOL | Day of Life |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethyldiamintetraessigsäure |
| evtl. | eventuell |
| ggf. | Gegebenenfalls |
| HFNC | High Flow Nasal Cannula, nasales high-flow System |
| i.d.R. | In der Regel |
| IFN-γ | Interferon-gamma |
| insb. | insbesondere |
| IQR | Interquartilsabstand |
| LME | Lysing Matrix E |
| NAK | Nabelarterien-Katheter |
| NVK | Nabelvenen-Katheter |
| OTU | Operational taxonomic unit |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PPS | Protein Precipitation Solution |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RSV | Respiratory-Syncitial-Virus |
| s. | siehe |
| SD | Standardabweichung |
| S _p O ₂ | Sauerstoffsättigung |
| Sog. | sogenannte |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| u.a. | und andere, unter anderem |
| WHO | World Health Organisation |
| ZNS | Zentrales Nerven System |

1 Einleitung

Joshua Lederberg, Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin, hat den Begriff des Mikrobioms entscheidend geprägt. (1, 2) Im Jahr 2000 erkannte er die Relevanz des Forschungsbereiches und beschrieb die Grundzüge mit seiner Aussage: „*wir [müssen] den menschlichen Körper als ein erweitertes Genom betrachten. Seine Einzelteile bestehen aus dem Kern-DNS-Genom (Karyom), einem Chondrium (Mitochondrium) und aus dem, was ich als Mikrobiom bezeichne: die Menagerie der zum Körper gehörigen Mikroben. Wir müssen die Mikroben, die wir in und auf unseren Körpern tragen, als Bestandteil einer geteilten Umwelt untersuchen.*“ (3) In den darauffolgenden Jahren hat das Thema des Mikrobioms deutlich an Interesse gewonnen und die Anzahl an Publikationen pro Jahr ist signifikant gestiegen. Während vor 1995 nie mehr als 30 wissenschaftliche Artikel jährlich zu diesem Thema publiziert wurden, waren es 2020 laut der Datenbank PubMed 21.530. (4) Eines von zahlreichen Kernergebnissen der bisherigen Forschung ist, dass das intestinale Mikrobiom von Frühgeborenen das Auftreten der häufig dramatisch verlaufenden Nekrotisierenden Enterokolitis wesentlich beeinflusst. (5)

Neben dem Thema des Mikrobioms, insbesondere des intestinalen Mikrobioms, beschäftigt sich vorliegende Arbeit mit der Frühgeburtlichkeit. Ziel ist die Untersuchung der Parallelentwicklung des intestinalen Mikrobioms von frühgeborenen Zwillingen und Drilllingen vor dem Hintergrund der unterschiedlichen medizinischen Versorgung. Dabei wird in Anlehnung an die von K. Sim, A.G. Shaw u.a. am Imperial College in London durchgeführte NeoM-Studie der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die Beatmung und invasive Zugänge auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms haben. Die Kenntnisse der das Mikrobiom beeinflussenden Faktoren kann interessante Ansätze für die Therapie von Frühgeborenen und Prävention vor Komplikationen wie der Nekrotisierenden Enterokolitis geben.

In Deutschland steigt die Anzahl der Frühgeburten stetig an. (6) Trotz medizinischer Versorgung auf höchstem Niveau gehen damit oft schwerwiegende Folgen und Komplikationen einher. (7-9)

In den folgenden Abschnitten werden die medizinischen Grundlagen zum besseren Verständnis dieser Arbeit erläutert. Zu Beginn wird das Thema der Frühgeburtlichkeit dargestellt. Kapitel 1.1 gibt einen Überblick über die Problematik der zunehmenden Anzahl an Frühgeborenen sowie über deren Ursachen, mögliche Folgen und Komplikationen. Außerdem werden

Grundzüge der leitliniengerechten Versorgung und Therapie von Frühgeborenen dargestellt. Auf das Thema des intestinalen Mikrobioms wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen. Dabei werden zunächst wichtige Definitionen erläutert, danach wird im Speziellen auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms und dessen Auswirkungen auf die Gesundheit des Individuums eingegangen.

In Kapitel 2 werden die genauen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit und ihre Zielsetzung dargestellt und in diesem Zusammenhang die Wichtigkeit und Relevanz des Themas erklärt.

Thema von Kapitel 3 sind das Material und die Methoden der NeoMuniCH-Studie. Zunächst wird auf das Studiendesign sowie die Teilnehmerauswahl und Datenerfassung eingegangen, danach werden die Methoden des experimentellen Vorgehens erläutert. Die statistische Analyse wird im letzten Abschnitt beschrieben.

Im darauffolgenden Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Studie dargelegt. Anhand von Grafiken werden die Ergebnisse erklärt.

Die Ergebnisse sowie die gesamte NeoMuniCH-Studie werden in Kapitel 5 kritisch hinterfragt und diskutiert. Dabei werden abschnittsweise die dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen beleuchtet und darauffolgend die angewandten Methoden erörtert.

In Kapitel 6 wird die Arbeit abschließend zusammengefasst.

1.1 Frühgeburt

Eine Frühgeburt ist per Definition eine Geburt vor Ende der 37. Schwangerschaftswoche (SSW), bzw. eine Schwangerschaftsdauer von weniger als 259 Tagen. (10, 11)

Um Frühgeborene in Kategorien einzuteilen, wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Definitionen erarbeitet. Diese orientieren sich am Geburtsgewicht, dem direkt nach der Geburt gemessenen Gewicht (11):

- Niedriges Geburtsgewicht: $\leq 2.500\text{g}$
- Sehr niedriges Geburtsgewicht: $\leq 1.500\text{g}$
- Extrem niedriges Geburtsgewicht: $\leq 1.000\text{g}$

Eine weitere Kategorisierung Frühgeborener erfolgt lt. der 10. Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10) nach der Schwangerschaftswoche bzw. dem Gestationsalter:

- Neugeborenes mit extremer Unreife: Geburt vor Beendigung der 28. SSW
- Sonstige vor dem Termin Geborene: Geburt zwischen Beendigung der 28. SSW und vor Beendigung der 37. SSW (6)

In Deutschland ist die Anzahl der Frühgeburten in den vergangenen Jahren deutlich gestiegen. Die Anzahl der Neugeborenen, die vor Beendigung der 37. SSW geboren wurden, betrug im Jahr 2016 59.701 (im Jahr 2000 waren es 35.275). (6, 12) Das Verhältnis von Frühgeborenen an allen Lebendgeburten hat sich von 4,5% im Jahr 2000 auf 7,5% im Jahr 2016 erhöht. (13, 14)

1.1.1 Risiko für Frühgeburtlichkeit

Als Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit wurden bisher eine Reihe einzelner Faktoren identifiziert. (15-20) Die wichtigsten und am häufigsten genannten bisher identifizierten Faktoren werden in *Tabelle 1* Risiken für Frühgeburtlichkeit aufgeschlüsselt nach Kategorien dargestellt. Dazu zählen sozioökonomische Faktoren, anamnestische Daten der Mutter, medizinische sowie geografische Faktoren und individuelle, schwangerschaftsbedingte Gründe:

| | |
|---|--|
| Sozioökonomisch | Unzureichende bzw. fehlende Schwangerschaftsbetreuung (15, 16, 20) Niedriger sozialer Status (18-20) sowie geringes Bildungsniveau (17) Hohes Einkommen (17) |
| Anamnestisch | Erstgebärende (19) Niedriger bzw. sehr hoher BMI der Mutter (19) Geringe Körpergröße der Mutter (19) Bereits stattgefundene Frühgeburt (15) oder vorangegangener Abort (15, 20) Hohes Alter der Mutter (18) bzw. Alter der Mutter über 35 Jahre (17) Tabakrauchexposition in der Schwangerschaft (18) |
| Medizinisch | Präeklampsie (15) Blutung, Schmerzen (15, 20) Harnwegsinfektion (20) Vorzeitiger Blasensprung (20) |
| Geografisch | (insb. Groß-)Städtischer Wohnort (17, 19) Herkunftsland der Eltern: Türkei, Naher Osten, Mittlerer Osten, Nord-Afrika, Asien (19) |
| Individuell, schwangerschaftsbedingt | Zwillingsschwangerschaft (15), Mehrlingsschwangerschaft (19) Männliches Neugeborenes (17) Inanspruchnahme von modernen Reproduktionstechniken (17, 19) |

Tabelle 1 Risiken für Frühgeburtlichkeit aufgeschlüsselt nach Kategorien

1.1.2 Folgen der Frühgeburtlichkeit

Welche Folgen eine Frühgeburt für das Neugeborene haben wird, ist individuell. Reifgeborene (zwischen 37. und 42. SSW geborene Neugeborene) sind i. d. R. gesund und die Entwicklung der verschiedenen Organsysteme ist weitestgehend abgeschlossen. Bei Frühgeborenen ist die Reifung und ggf. die Organogenese noch nicht abgeschlossen. Da die Entwicklung der einzelnen Organsysteme während der Schwangerschaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet, sind je nach Schwangerschaftsdauer andere Symptome des Neugeborenen zu

erwarten. Generell gilt: Je weiter fortgeschritten die Schwangerschaft, desto geringer die gesundheitlichen Folgen für das Neugeborene. (9, 21-23) Die Lungen sind z.B. nach 34-35 SSW meist ausreichend entwickelt, um Frühgeborenen zu diesem Zeitpunkt ein Überleben ohne künstliche Beatmung zu ermöglichen. (7) Hinzu kommt, dass die Entwicklung der Lungen durch die Ende der 1980er Jahre etablierte Steroid-Therapie unterstützt wird und Frühgeborene somit höhere Überlebenschancen haben. (24) Das Gehirn und das Zentrale Nervensystem (ZNS) sind physiologisch jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt vollständig ausgebildet. Sie werden intrauterin gebildet, entwickeln sich aber zu entscheidenden Teilen noch während der Kindheit weiter. (22) Eine Frühgeburt und eine damit einhergehende intensivmedizinische Versorgung beeinflussen diesen normalen Vorgang der ZNS-Entwicklung: Frühgeborene haben ein geringeres ZNS-Volumen, eine schlechtere Diffusion von Nährstoffen ins ZNS und eine höhere T2-Signalintensität. (25) Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der intrauterinen Entwicklung zwischen der 23. und 37. SSW liefert *Abbildung 1*.

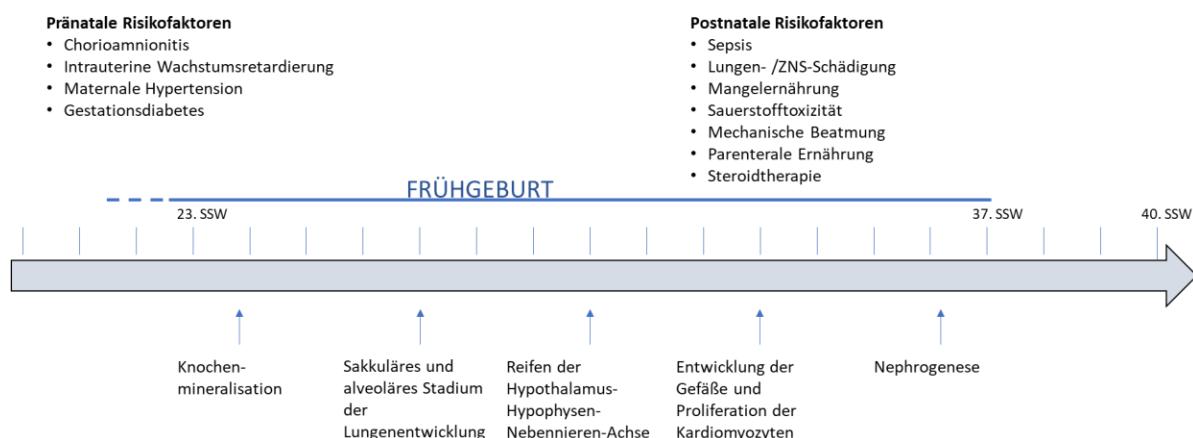


Abbildung 1 Häufige prä- und postnatale Risikofaktoren von Frühgeburtlichkeit abgebildet parallel zu den Entwicklungsschritten der Fetenogenese (9, 26)

Oberhalb der Zeitachse in der Grafik sind einige Risikofaktoren aufgeführt, denen Frühgeborene vor und nach der Geburt häufig ausgesetzt sind: „Sepsis, Gehirn- und Lungenschädigung, Mangelernährung, Sauerstoffschädigung, mechanische Beatmung, parenterale Ernährung und Steroidgabe“. (9)

Diese und weitere Risikofaktoren bedingen die Tatsache, dass Frühgeburtlichkeit die häufigste Todesursache für Neugeborene ohne angeborene Fehlbildungen ist. (27) In Deutschland sterben 0,4% aller Kinder unter fünf Jahren. (28) Die Sterblichkeit bei sehr kleinen Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von $\leq 1500\text{g}$ oder einer Geburt vor 32 vollendeten SSW liegt hingegen bei 4%. (29) Neben der höheren Wahrscheinlichkeit eines Kindstodes bringt die Frühgeburtlichkeit auch andere Folgen und Komplikationen mit sich. Diese können in

kurzfristige und langfristige Folgen eingeteilt werden. Eine nach Organ systemen gegliederte Übersicht über die häufigsten Folgen der Frühgeburt bei Neugeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht ($\leq 1500\text{g}$) liefert *Tabelle 2.* (30)

| Betroffenes Organsystem | Kurzfristige Folgen | Langfristige Folgen |
|--|---|---|
| Lunge | Akutes Atemnotsyndrom Air-Leak-Syndrom Bronchopulmonale Dysplasie Apnoen | Bronchopulmonale Dysplasie Reaktive Atemwegserkrankung Asthma bronchiale |
| Gastrointestinaltrakt und Ernährung | Hyperbilirubinämie Nahrungsmittelintoleranz Nekrotisierende Enterokolitis Wachstumsretardierung | Gedeihstörung Kurzdarmsyndrom Cholestase |
| Immunsystem | Nosokomiale Infektion Immundefizienz-Syndrom Perinatale Infektion | RSV-Infektion Bronchiolitis |
| Zentrales Nervensystem | Intraventrikuläre Blutung Periventrikuläre Leukomalazie Hydrozephalus | Zerebralparese Hydrozephalus Zerebrale Atrophien Neuron. Entwicklungsverzöger. Schwerhörigkeit |
| Auge | Frühgeborenen Retinopathie | Blindheit Netzhautablösung Myopie, Strabismus |
| Herz- /Kreislaufsystem | Hypotension Persistierender Ductus arteriosus Pulmonale Hypertonie | Pulmonale Hypertonie Hypertonus im Erwachsenenalter |
| Niere | Ungleichgewicht des Wasser- und Elektrolythaushaltes | Hypertonus im Erwachsenenalter |

| | | |
|----------------------------------|--|---|
| | Störung des Säure-Basen-Haushaltes | |
| Blut /blutbildende Organe | Iatrogene Anämie Häufiger Transfusionsbedarf Frühgeborenen-Anämie | |
| Endokrines System | Hypoglykämie Vorübergehend niedrige Thyroxin-Spiegel Cortisol-Mangel | Beeinträchtigter Glucose-Stoffwechsel Gesteigerte Insulinresistenz |

Tabelle 2 Häufigste kurz- und langfristige Folgen für Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht gegliedert nach Organsystemen (30)

1.1.3 Nekrotisierende Enterokolitis

Von den möglichen Folgen einer Frühgeburt ist für die NeoMuniCH-Studie die Nekrotisierende Enterokolitis besonders relevant und wird in diesem Abschnitt näher beschrieben.

Diese Erkrankung betrifft Früh- und Neugeborene, wobei die Inzidenz einer Nekrotisierenden Enterokolitis mit abnehmendem Geburtsgewicht und geringerem Gestationsalter zunimmt. (5, 31) Je nach versorgendem Krankenhaus bzw. Perinatalzentrum erkranken 3-11% der Frühgeborenen an der nekrotisierenden Enterokolitis (32), wovon bis zu 30% versterben. (33) Es handelt sich um eine entzündliche Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, einhergehend mit systemischen Zeichen einer Infektion. (31) Eine Komplikation ist u.a. die Peritonitis. Die klinischen Zeichen können unspezifisch sein und der Krankheitsverlauf ist häufig rasch progredient, was die späte Diagnosestellung und damit den schlechten Therapieerfolg erklärt. (5, 33) Daher wäre ein besseres Verständnis der Pathogenese von größter Bedeutung und die Entwicklung eines Markers zur Früherkennung wünschenswert. Aktuell geht man davon aus, dass es ein multifaktorielles Geschehen ist, welches zur Nekrotisierenden Enterokolitis führt. (33) Ein wichtiger dazu beitragender Faktor ist das mikrobielle Ungleichgewicht (5, 33, 34) bzw. die Besiedelung des Darms von Frühgeborenen durch Pathogene wie Clostridium perfringens und Klebsiellen. (5) Ein weiterer identifizierter Risikofaktor ist die häufig längere andauernde antibiotische Therapie von Frühgeborenen. (35)

1.1.4 Versorgung und Therapie frühgeborener Säuglinge

Frühgeborene bilden durch unterschiedliche Gestationsalter eine heterogene Gruppe, auf deren unterschiedliche Bedürfnisse individuell eingegangen werden muss. (36) Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf der Ernährung der Frühgeborenen liegen. Laut Empfehlungen der WHO sollte jedes gesunde Neugeborene während der ersten sechs Lebensmonate ausschließlich mit Muttermilch ernährt werden. (37) Aufgrund der Unreife des Gastrointestinaltraktes von Frühgeborenen ist dies zu Beginn jedoch häufig nicht möglich und eine parenterale Ernährung erforderlich. (38) Enterale Ernährung hat jedoch die wichtige Funktion, den Gastrointestinaltrakt zur Reifung anzuregen und dadurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Nekrotisierenden Enterokolitis zu senken. (38) Daher sollte neben parenteraler Ernährung schnellstmöglich mit kleinen Mengen enteraler Ernährung begonnen werden. (39) Die Menge der enteralen Ernährung sollte konstant in kleinen Schritten erhöht werden. (40) Für die enterale Ernährung gesunder Frühgeborener ist Muttermilch vorteilhaft, da sie protektive Effekte bzgl. der Nekrotisierenden Enterokolitis zeigt. (41) Entsprechend des Entwicklungsalters sollte Muttermilch durch adäquate Zusätze bestehend aus Proteinen, Fetten, Mineralstoffen und Vitaminen ergänzt werden, um einem Mangel an Mineralstoffen und Spurenelementen wie Calcium, Phosphat oder Zink, einer verzögerten neurokognitiven Entwicklung sowie einer Wachstumsretardierung vorzubeugen. (42)

Frühgeborene leiden darüber hinaus häufiger als Reifgeborene an Lungenfunktionsstörungen, daher ist neben der angepassten ausgewogenen Ernährung auch die Optimierung der Atmung und Beatmung nach der Geburt essenziell. (43) Außerdem leiden viele Frühgeborene an rezidivierenden Apnoen, welche mit niedrigem Gestationsalter vermehrt auftreten. (44) Es gibt verschiedene supportive Maßnahmen, wie die Hochlagerung des Oberkörpers, welche die Atmung erleichtern. (45) Reichen solche Maßnahmen nicht aus, werden Frühgeborene beatmet und bzw. oder mit Sauerstoff therapiert. Dabei wirkt sich eine pulsoxymetrisch gemessene Sauerstoffsättigung (S_pO_2) zwischen 91 und 95% positiv auf die Überlebenswahrscheinlichkeit aus. (46) Meist werden Frühgeborene parallel mit Koffeinzitrat als medikamentöse Maßnahme zur Verhinderung von Apnoen therapiert. (21) Koffeinzitrat reduziert außerdem die Inzidenz der Bronchopulmonalen Dysplasie. (47) Dennoch ist eine invasive Beatmung über einen endotrachealen Tubus nicht immer zu vermeiden. (48) Neben der endotrachealen maschinellen Beatmung stehen u.a. die Versorgung mittels Nasaler High-Flow Therapie (HFNC) oder nasaler Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) Therapie zur Verfügung. (49)

Bei längerem Aufenthalt der Frühgeborenen auf Intensivstationen ist es oft erforderlich, Nabelvenen- und Nabelarterienkatheter sowie andere zentralvenöse Zugänge anzulegen. (50) Häufig werden Nabelvenen- und Nabelarterienkatheter gleichzeitig angelegt, um den Frühgeborenen parenterale Ernährung sowie Medikamente zukommen zu lassen. (51) Sollte über einen längeren Zeitraum ein zentralvenöser Zugang erforderlich sein, kann die Anlage eines Silastik-Katheters erwogen werden. Allerdings stellt das dauerhafte Liegen von zentralen Zugängen, insb. mehrerer Zugänge zur gleichen Zeit, einen Risikofaktor im Hinblick auf die Entwicklung einer Sepsis dar. (52)

Frühgeborene werden mit einer Reihe von Medikamenten versorgt. Dazu gehören neben dem Koffeinzitrat zur Behandlung der Apnoen (21) u.a. Vitamin K zum Schutz vor Vitamin-K-Mangel-Blutungen (53). Fast alle Frühgeborene werden auch mit Antibiotika versorgt: Sobald bei der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt Anzeichen für eine Infektion zu erkennen sind, wozu u.a. ein vorzeitiger Blasensprung, vorzeitige Wehen und erhöhte Temperatur sowie erhöhte Entzündungszeichen zählen, wird mit einer antibiotischen Therapie begonnen. (54) Aber auch andere Frühgeborene werden großzügig antibiotisch therapiert, sofern eine intrauterine Infektion nicht mit Sicherheit auszuschließen ist. (54) Frühgeborene sind zudem einem höheren Risiko für nosokomiale Infektionen ausgesetzt, da sie häufig über einen Zeitraum von mehreren Wochen hospitalisiert sind und viel Zeit auf Intensivstationen verbringen. (55) Diese und andere Infektionen tragen zum häufigen Einsatz von Antibiotika bei Frühgeborenen bei. (54)

1.2 Mikrobiom

Als Mikrobiom ist die Gesamtheit aller auf und in einem Individuum lebenden Mikroben (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten und Viren) und deren Genome und Gene definiert. (56, 57) In dieser Arbeit wird allerdings ausschließlich auf das bakterielle Mikrobiom eingegangen. Um die Forschung zum bakteriellen Mikrobiom zu systematisieren werden Bakterien in verschiedene Kategorien eingeteilt. Diese Einteilung der Bakterien hält sich an die u.a. von Carl Woese etablierte Systematik der phylogenetischen Einteilung von Prokaryonten. (58) Dabei gibt es verschiedene Rangstufen der Gruppierung von Bakterien. Die oberste Rangstufe ist die Domäne der Bakterien, darunter kommen die Stufen Phylum, Klasse, Ordnung, Familie und Genus. Ein Beispiel dafür ist das Phylum „Actinobacteria“, dessen Einteilung und Rangordnungen in *Abbildung 2* exemplarisch dargestellt werden. (59)

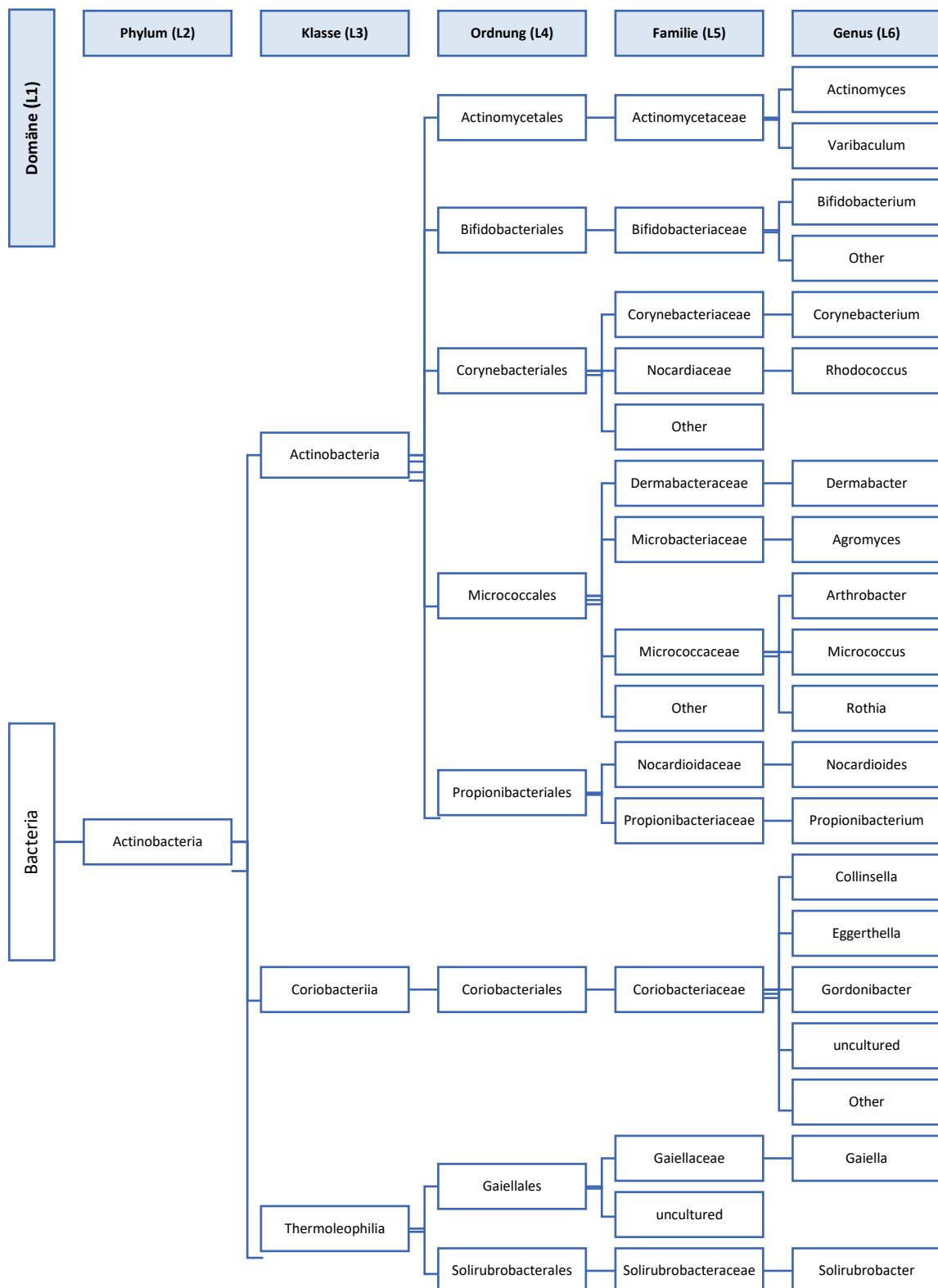


Abbildung 2 Systematik der Taxonomie der Bakterien am Beispiel des Phylum Actinobacteria; Einteilung in Domäne, Phylum, Klasse, Ordnung, Familie und Genus

Es ließ sich feststellen, dass fünf bakterielle Phyla im humanen Mikrobiom überwiegen: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Fusobacteria*. (60-66) Um eine anschauliche Darstellung zu schaffen, sind in *Tabelle 3* bekannte Bakteriengenus (L6) der häufigsten Phyla aufgelistet.

| Firmicutes | Bacteroidetes | Actinobacteria | Proteobacteria | Fusobacteria |
|-------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| Streptococcus | Actinomyces | Neisseria | Porphyromonas | Fusobacterium |
| Gemella | Atopobium | Eikenella | Prevotella | Leptotrichia |
| Eubacterium | Rothia | Campylobacter | Capnocytophaga | |
| Selenomonas | | | | |
| Veillonella | | | | |
| Clostridia | | | | |

Tabelle 3 Fünf häufigste bakterielle Phyla des humanen Mikrobioms mit bekannten Bakteriengenus (L6) (62, 65)

Je nach Körperregionen eines Individuums überwiegen andere mikrobielle Populationen. (60) Die Verteilung der Phyla wird beispielhaft an den Regionen Haut, distaler Ösophagus, Magen und Darm dargestellt (*Abbildung 3*). Diese Bereiche entsprechen individuellen, jedoch kommunizierenden Mikrobiota. Angezeigt wird die Anzahl verschiedener in den jeweiligen Proben identifizierten Bakteriengenus (L6), die den genannten Phyla zugeordnet werden können.

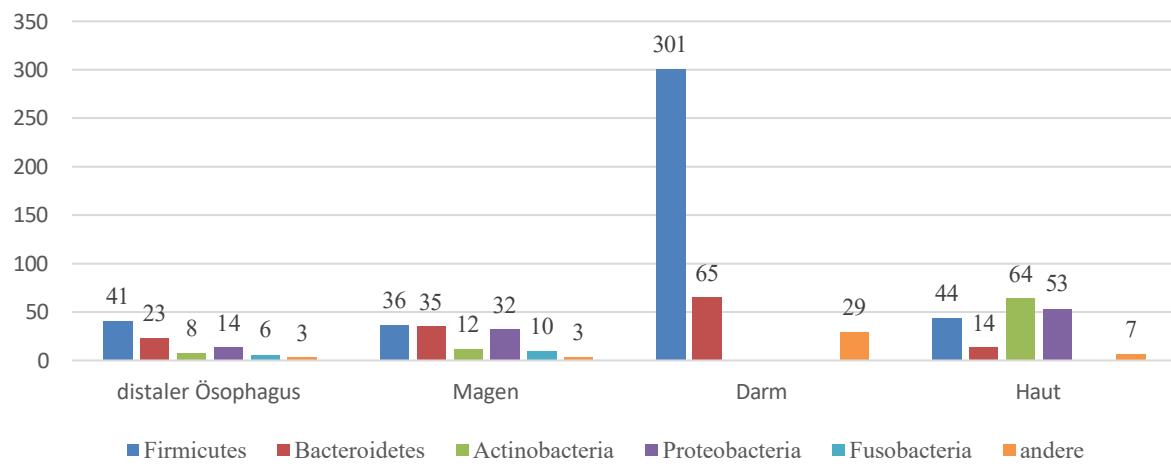


Abbildung 3 Häufigste bakterielle Phyla in den Regionen distaler Ösophagus (64), Magen (61), Darm (62), Haut (63)

1.3 Intestinales Mikrobiom

Das intestinale Mikrobiom ist das Mikrobiom eines Individuums in dessen Gastrointestinaltrakt. (56) Es macht mit 10^{14} Zellen den größten Anteil des Mikrobioms aus. (67) Insgesamt besteht es aus der zehnfachen Anzahl an Zellen als das Individuum selbst (1, 67-69) und umfasst innerhalb des ersten Lebensjahres bereits über 1.000 unterschiedliche Spezies. (70)

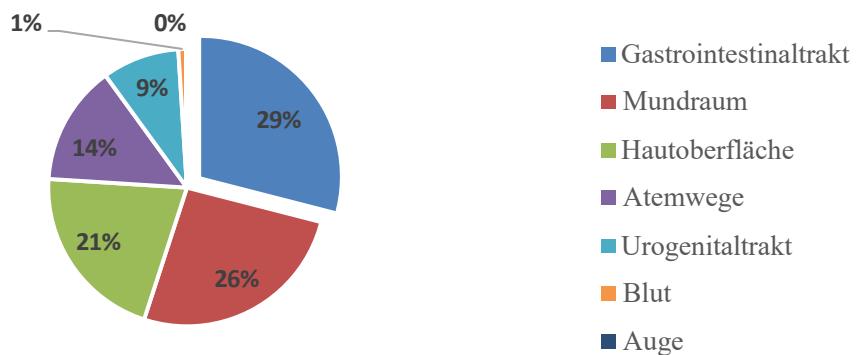


Abbildung 4 Prozentuale Verteilung des Mikrobioms nach Körperregion (1)

Die im intestinalen Mikrobiom vorwiegend vertretenen Phyla sind *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. (62, 71) Für eine detailliertere Darstellung werden sog. „operational taxonomic units“ (OTUs) definiert, die jeweils einem Bakteriengenuss entsprechen. Die OTUs mit der höchsten Prävalenz im adulten intestinalen Mikrobiom sind *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides vulgatus*, *Roseburia intestinalis*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale*, *Coprobacillus* sp. und *Bifidobacterium longum*. (71) Gut zu erkennen ist dies in Abbildung 5, in welcher die Häufigkeit der aus intestinalem Mikrobiom isolierten DNA-Sequenzen einer OTU mit der Größe des Punktes in der Grafik korreliert und die zunehmende Prävalenz einer OTU durch die zunehmend rote Farbe dargestellt ist.

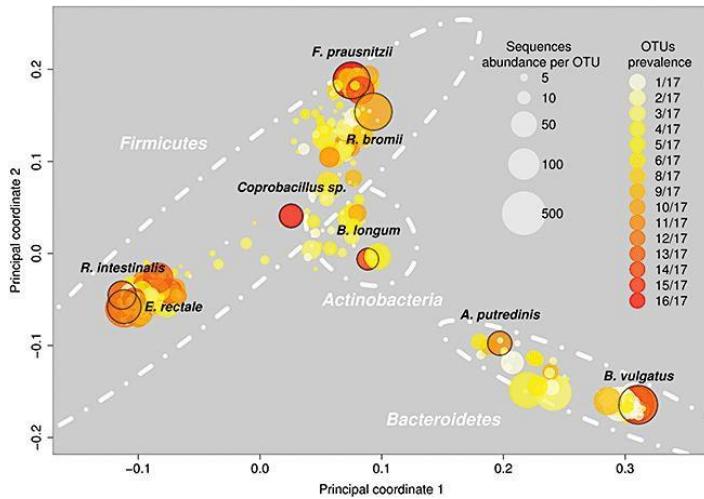


Abbildung 5 aus der Publikation „Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core“ (71) von Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al.: Aus intestinalem Mikrobiom von 17 gesunden Probanden identifizierte OTUs im Koordinatensystem abgebildet Häufigkeit der DNA-Sequenz einer OTU korreliert mit Größe des Kreises, Prävalenz korreliert mit zunehmend roter Farbe.

1.3.1 Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit

Das intestinale Mikrobiom hat vielfältige Effekte auf die Gesundheit und den Körper eines Individuums. Unter anderem kann es zur Entstehung bzw. Prävention atopischer und allergischer Erkrankungen beitragen, das Immunsystem beeinflussen und Auswirkungen auf das Körpergewicht zeigen. (72) Um einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand zum Thema zu geben, werden in *Tabelle 4* die Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit in die Kategorien „Allergien und sonstige atopische Erkrankungen“, „Immunsystem“ sowie „Körpergewicht“ und „entzündliche Erkrankungen“ zusammengefasst.

| | |
|--|---|
| Allergien und sonstige atopische Erkrankungen | Intestinales Mikrobiom von an allergischem Ekzem leidenden Kindern weist u.a. niedrigeren Anteil an <i>Enterobacter</i> und höheren Anteil an <i>Parabacteroides</i> auf (73), Risiko ein allergisches Ekzem zu entwickeln korreliert mit Kolonisation des Gastrointestinaltraktes mit <i>E. coli</i> und <i>C. difficile</i> im Alter von einem Monat (74) |
| | Inzidenz von Nahrungsmittelallergien (insb. gegen Hühnerei) wird durch Kaiserschnittgeburten erhöht (75) |
| | <i>C. difficile</i> im Darm begünstigt eine Sensibilisierung der Atemwege bis hin zu wiederkehrender Atemnot und Asthma (74) |
| | frühe Einnahme von Antibiotika erhöht die Wahrscheinlichkeit an Asthma zu erkranken, insb. bei Kindern, die keine genetische Vorbelastung aufweisen (76) |

| | |
|----------------------------------|---|
| Immunsystem | Antibiotika und damit einhergehend ein verändertes intestinales Mikrobiom begünstigen eine andere CD8 ⁺ T-Zell-Aktivierung und eine verringerte IFN- γ -Produktion (77) |
| | Dysbiose des intestinalen Mikrobioms führt zu einer schwächeren Immunreaktion gegen virale Infektionen (insb. <i>Vaccinia-Virus</i>) (77) |
| Körpergewicht | Anteil an <i>Bacteriodetes</i> ist bei adipösen Menschen geringer, als bei schlanken Menschen, Anteil an <i>Firmicutes</i> hingegen höher (72) |
| Entzündliche Erkrankungen | Auftreten der Nekrotisierende Enterokolitis wird durch bestimmte bakterielle Muster des intestinalen Mikrobioms begünstigt, z.B. durch Besiedelung mit <i>Klebsiella spp.</i> oder <i>Clostridium perfringens</i> (5, 78) |
| | elektiver Kaiserschnitt korreliert mit Zöliakie (79) |

Tabelle 4 Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit

Das Phänomen der Begünstigung allergischer und atopischer Erkrankungen durch Veränderungen des ursprünglichen Mikrobioms wird durch Beobachtungen aus Tierversuchen gestützt: Demnach weisen steril aufwachsende Tiere eine gestörte Immunantwort auf, antibiotische Therapien verstärken die Immunantwort der Typ2-T-Helferzellen und die therapeutische Gabe von Probiotika kann das Auftreten allergischer Atemwegserkrankungen vermindern. (80)

1.3.2 Diversität des intestinalen Mikrobioms

Die oben genannten Effekte des intestinalen Mikrobioms auf die Gesundheit werden vielfach von der sog. Diversität, also der Vielfalt des intestinalen Mikrobioms beeinflusst. (81, 82) Dabei wird eine hohe bakterielle Diversität mit positiven Effekten auf die Gesundheit des Individuums in Verbindung gebracht. (83) Aus diesem Grund ist die bakterielle Diversität ein in der Mikrobiom-Forschung häufig untersuchter Parameter. Sie kann in drei gängige Kategorien eingeteilt werden: die **alpha**-, die **beta**- und die **gamma-Diversität**. Definiert sind diese drei Begriffe wie im Folgenden in *Tabelle 5* beschrieben:

| | |
|-------------------------|--|
| Alpha-Diversität | Richness, also Artenreichtum: Artenvielfalt in einer Probe definierter und standardisierter Größe bzw. Volumen |
|-------------------------|--|

| | |
|-------------------------|---|
| | dynamische Veränderung (z.B. Steigerung) der alpha-Diversität ist anhand verschiedener Indices messbar (s. <i>Tabelle 10</i>) |
| Beta-Diversität | Ausmaß der unterschiedlichen Artenvielfalt mehrerer Lebensräume der gleichen Art (z.B. unterschiedliches intestinales Mikrobiom zweier Frühgeborener) |
| Gamma-Diversität | Diversität in größeren Lebensräumen und Ökosystemen, z.B. Landschaften |

Tabelle 5 Definition von Alpha-, Beta- und Gamma-Diversität (84)

1.3.3 Entwicklung des intestinalen Mikrobioms

Lange wurde angenommen, dass Neugeborene bis zum Zeitpunkt der Geburt steril, also nicht von Mikroben kolonisiert seien. (85) In der Wissenschaft wurde unlängst die konträre Hypothese aufgestellt, dass bereits intrauterin eine Übertragung der mütterlichen Bakterien auf den Fötus stattfinde. (86) Hauptsächlich findet die Kolonisation mit Mikroben und damit die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms dennoch extrauterin in den ersten Tagen, Wochen und Monaten postpartal statt. (77) Es wurden einige Faktoren identifiziert, die diese Entwicklung beeinflussen und ggf. steuern (siehe *Tabelle 6*).

| Einflussfaktor | Auswirkung |
|--|---|
| Vaginale Geburt | Kolonisation überwiegend mit <i>Lactobacillus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Atopobium</i> , oder <i>Sneathia spp</i> (85, 87, 88) |
| Kaiserschnitt | Kolonisation mit typischen Hautkeimen wie <i>Staphylococci</i> (85, 87, 88) |
| Body-Mass-Index (BMI) der Mutter | maternaler BMI vor der Schwangerschaft $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ reduziert Diversität des Mikrobioms deutlich, Anzahl an <i>Bacteroidetes</i> überwiegt (89) |
| maternale perinatale antibiotische Therapie | reduziert absolute Bakterienanzahl des infantilen intestinalen Mikrobioms (77) verringert Vorkommen von <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> und <i>Lactobacillus</i> im intestinalen Mikrobiom (77) |
| Stillen | <i>Bifidobacteria</i> häufiger in großer Anzahl vertreten (90) |
| stationäre Behandlung auf Intensivstationen | Diversität herabgesetzt, intestinales Mikrobiom größtenteils durch Koagulase-negative <i>Staphylococci</i> , <i>Enterococci</i> und |

Enterobacteriaceae kolonisiert, häufiges Auftreten von Hefen
(91)

Tabelle 6 Einflussfaktoren der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms und deren Auswirkungen

Der Prozess der mikrobiellen Kolonisation des Gastrointestinaltraktes ist bei gesunden Neugeborenen im Laufe der ersten Lebensjahre abgeschlossen. (92) Bei Frühgeborenen hingegen dehnt sich der Zeitraum der Kolonisation auf vier bis sechs Jahre aus. (70) Während dieses Zeitraums der noch nicht abgeschlossenen Kolonisation sind Frühgeborene einem höheren Risiko intestinaler und systemischer Infektionen ausgesetzt. (70) Außerdem besteht ein erhöhtes Risiko, dass sich das intestinale Mikrobiom mit einem sich negativ auf die Gesundheit auswirkenden Muster entwickelt. (70)

1.3.4 Intestinales Mikrobiom Frühgeborener

Hinsichtlich der bakteriellen Zusammensetzung des Mikrobioms gibt es Unterschiede zwischen Reifgeborenen und Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht ($\leq 1500\text{g}$): Während der Gastrointestinaltrakt gesunder Reifgeborener überwiegend von Anaerobiern und evtl. im oberen Abschnitt von (fakultativ) aeroben Spezies besiedelt ist, wird der Gastrointestinaltrakt Frühgeborener von deutlich weniger anaeroben Bakterien besiedelt. (93) In *Tabelle 7* wird dargestellt, durch das Vorkommen welcher Bakterienspezies sich das intestinale Mikrobiom Frühgeborener von dem gesunder Reifgeborener unterscheidet bzw. welche Spezies zu einem größeren Anteil im Darm früh- oder reifgeborener Säuglinge zu finden sind. (94)

| Überwiegen bei Frühgeborenen | Überwiegen bei Reifgeborenen |
|---|--|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Bacteroidaceae</i> |
| <i>Micrococcaceae</i> | <i>Bifidobacteriaceae</i> |
| <i>unklassifizierte Gammaproteobacteria</i> | <i>Clostridiaceae</i> |
| | <i>Coriobacteriaceae</i> |
| | <i>Leuconostocaceae</i> |
| | <i>Pasteurellaceae</i> |
| | <i>Porphyromonadaceae</i> |
| | <i>unklassifizierte Actinobacteria</i> |
| | <i>Veillonellaceae</i> |

Tabelle 7 Überwiegende Bakterienspezies im intestinalen Mikrobiom Früh- und Reifgeborener ab dem 10. Lebenstag (94)

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Parallelentwicklung des intestinalen Mikrobioms frühgeborener Zwillinge und Drillinge sowie die Entwicklung der alpha- und beta-Diversität zu untersuchen. Zum Thema intestinales Mikrobiom wurden bereits viele Studien über dessen Auswirkungen auf die Gesundheit und Krankheitsentstehung durchgeführt, allerdings nur wenige zur Entwicklung des Mikrobioms. Insb. bei Frühgeborenen gibt es zu diesem Thema noch Forschungsbedarf. Daher hat das dieser Arbeit zugrunde liegende Thema eine große Bedeutung, um den Wissensstand im Fachgebiet des intestinalen Mikrobioms voranzubringen. Zu hoffen ist, dass eine besser verstandene Entwicklung des intestinalen Mikrobioms eine optimierte Therapie und eine Prävention lebensgefährlicher Erkrankungen, wie z.B. der Nekrotisierenden Enterokolitis ermöglichen wird.

Insb. wurden mit vorliegender Arbeit folgende Fragen untersucht und beantwortet:

- Nimmt die alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms mit steigendem Lebensalter zu?
- Untersuchung der parallelen Entwicklung von Zwillingen und Drillingen – wie hoch ist die beta-Diversität?
- Haben unterschiedliche Therapien einen Einfluss auf das intestinale Mikrobiom Frühgeborener?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde das intestinale Mikrobiom mithilfe von sequenziell gewonnenen Stuhlproben abgebildet, was ein gängiges Verfahren darstellt. (95) Dazu wurde aus den Stuhlproben bakterielle DNA extrahiert, welche amplifiziert und anschließend sequenziert wurde. Die Ergebnisse liefern Kenntnis über die quantitative Verteilung aller Bakterien des intestinalen Mikrobioms. Anschließend wurden die experimentell gewonnenen Ergebnisse mit klinisch erhobenen Daten in Verbindung gebracht und analysiert.

3 Material und Methoden

Die **NeoMuniCH**-Studie wurde an den Perinatalzentren Innenstadt und Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (Ethikvotum der Ethikkommission der LMU vom 15.02.2016, Projektnummer 663-15). Der Zeitraum für den Einbezug der Daten in die Studie erstreckte sich vom 17.01.2017 am Standort Innenstadt bzw. 26.07.2017 am Standort Großhadern bis zum 16.01.2019.

NeoMuniCH ist angelehnt an die Studie „**NeoM**“, die von Januar 2010 bis Dezember 2012 am Imperial College in London von K. Sim, A.G. Shaw u.a. durchgeführt wurde. In Kooperation mit den an **NeoM** arbeitenden Wissenschaftlern wurde das Konzept von **NeoMuniCH** erarbeitet und durchgeführt. Das Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München erteilt.

Vorliegende Arbeit basiert auf Daten, die im Rahmen der **NeoMuniCH**-Studie bis einschließlich 30.11.2017 erhoben wurden. Daher handelt es sich um eine Interim Analyse, welche vor Abschluss der **NeoMuniCH**-Studie durchgeführt wurde.

3.1 Klinischer Teilbereich

Der klinische Teilbereich der **NeoMuniCH**-Studie wird in diesem Abschnitt näher beschrieben. Dabei wird auf das Studiendesign, die praktische Durchführung und die Dokumentation der klinischen Parameter eingegangen.

3.1.1 Studiendesign

Bei **NeoMuniCH** handelt es sich um eine klinisch-experimentelle nicht-invasive Beobachtungsstudie. Im Rahmen dessen wurden prospektiv klinische Daten erhoben und täglich Proben gesammelt, die anschließend experimentell untersucht wurden.

Das Einschlusskriterium der **NeoMuniCH**-Studie war die Geburt vor 32 vollendeten Schwangerschaftswochen (< 32+0 SSW). Alle Eltern von Neugeborenen, die vor 32+0 SSW im entsprechenden Zeitraum in den Kliniken der LMU geboren sind bzw. unmittelbar postpartal dorthin verlegt wurden, wurden über die Studie informiert. Dazu wurden diese innerhalb der ersten 72 Stunden postpartal durch ein persönliches Gespräch und eine ausführliche schriftliche Studieninformation (s. Anhang) über die Studie aufgeklärt. Sofern eine

Einverständniserklärung vorlag, erstreckte sich der Zeitraum der Datenerhebung sowie des Sammelns der Proben über den gesamten Klinikaufenthalt des Neugeborenen in den Kliniken und Zentren der Ludwig-Maximilians-Universität. 3.1.2 Um die in Kapitel 2 genannten Fragestellungen zu beantworten, wurden für diese Arbeit die Untergruppe der bis zum 30.11.2017 geborenen Zwillinge und Drillinge analysiert.

3.1.2 Etablierung der NeoMuniCH-Studie

Vor Beginn der Datenerhebung und somit des klinischen Teilbereiches der NeoMuniCH-Studie erfolgten diverse Vorbereitungen: Es wurden für jeden zukünftigen Teilnehmer Studien-Sets zum Sammeln der Proben erstellt, für jede Station Gefrierschränke zum Zwischenlagern der Proben angeschafft, Kriterien zur Datenerfassung definiert. Außerdem erfolgten Schulungen des medizinischen Personals mit genauen Informationen und Erklärungen zum Ablauf der Studie. Informations-Broschüren für das medizinische Personal und zur Aushändigung an die Eltern wurden erstellt.

3.1.3 Sammeln der Proben

Von jedem an der Studie teilnehmenden Frühgeborenen wurden Stuhlproben und Abstriche gesammelt. Direkt nach der Geburt bzw. bei Aufnahme auf der entsprechenden Station wurde ein inguinaler Abstrich durchgeführt, welcher durch wöchentlich durchgeführte rektale Abstriche ergänzt wurde. Gleichzeitig wurde täglich von jedem Teilnehmer eine Stuhlprobe aus der Windel entnommen.

Mit dem Sammeln der Proben wurde unmittelbar nach der Geburt begonnen. Bei innerhalb von 72 Stunden postpartal nicht erfolgtem Einverständnis der Eltern wurden die bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten Proben verworfen.

Die gesammelten Proben wurden bei -20°C eingefroren und innerhalb der darauffolgenden Tage zur langfristigen Aufbewahrung in einen -80°C-Gefrierschrank umgelagert.

Das Sammeln der Proben erfolgte mit für NeoMuniCH erstellten Studien-Sets. Jedes Studien-Set enthielt:

- Anleitung zum Sammeln der Proben
- Aktueller Kalender als Erinnerung zum Sammeln der Proben
- 10 2 ml-Eppendorf-Röhrchen (RNase und DNase frei)

- 10 autoklavierte Spatel
- 10 kleine Tüten zur hygienischen Aufbewahrung
- 2 Abstrich-Röhrchen
- Für den Teilnehmer personalisierte und mit Datum beschriftete Etiketten

3.1.4 Erfassung klinischer Verlaufsparameter

Während des Krankenhausaufenthaltes der Studien-Teilnehmer wurden bestimmte Parameter täglich, sowie einige anamnestische Daten zur Geburt und Schwangerschaft bzw. familiären Vorerkrankungen einmalig erfasst. Gespeichert wurden diese anonymisiert in einer wissenschaftlichen Online-Datenbank.

Mithilfe der Daten aus den Patientenakten und –kurven und nach Rücksprache mit dem die Studienteilnehmer versorgendem Klinikpersonal wurde für jeden Teilnehmer täglich ein Bericht erstellt. Dabei wurden gezielt in *Tabelle 8* geschilderte Themen berücksichtigt und detailliert dokumentiert.

| | |
|--|--|
| Umgebung | Station, Inkubator bzw. Bett |
| Medikamente | intravenös, oral oder inhalativ verabreicht |
| Beatmung | HFO-Beatmung, invasive Beatmung, CPAP-Beatmung, Sauerstoffzufuhr, Apnoen mit Stimulationsbedarf |
| Kardiovaskuläre Parameter | Verabreichung von Inotropika oder Flüssigkeitsboli, niedrigster gemessener Blutdruck-Wert, Bradykardien mit Stimulationsbedarf |
| Ernährung | Volumen, Nahrungsmittel, Methode der Nahrungszufuhr |
| Gastrointestinale Manifestationen | Magenrest, Blut im Stuhl, Gewicht, Erbrechen, klinische abdominelle Untersuchungsbefunde |
| Sepsis | höchste gemessene Temperatur, Temperaturinstabilität, aktuell liegende Zugänge (Nabelarterien-/Nabelvenen-Katheter, Silastik) |
| Evtl. neurologische oder radiologische Befunde | |
| Laborbefunde | venöse, arterielle oder kapilläre Blutentnahmen |
| Mikrobiologische Befunde | |
| Evtl. Sepsis- oder Nekrotisierende Enterokolitis-Diagnose | |

Tabelle 8 Täglich erfasste klinische Verlaufsparameter

3.2 Experimenteller Teilbereich

Im Folgenden werden die experimentellen Methoden dargestellt, mithilfe derer die Ergebnisse dieser Arbeit erlangt wurden. Dabei wurden die ersten Schritte wie die Auswahl der Proben, der DNA-Extraktion und der NanoDrop Spectrophotometrie in Laboratorien der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt. Die darauffolgenden Schritte der Polymerase-Kettenreaktion, der Kontrollen vor Kontamination, der PicoGreen DNA-Quantifizierung, der Purifikation und des Pyrosequencing wurden als Teil der oben beschriebenen Kollaboration am Imperial College in London durchgeführt.

3.2.1 Auswahl der zu untersuchenden Proben

Um für das weitere Vorgehen unter allen vor dem 30.11.2017 gesammelten Stuhlproben der Zwillinge und Drillinge eine geeignete Auswahl zu treffen, wurde ein festgelegtes Schema angewandt. Es wurden die Proben untersucht, welche an definierten Lebenstagen gesammelt wurden. *Tabelle 9* zeigt exemplarisch, welche Lebenstage jeweils ausgewählt wurden und welcher Lebenswoche dies entspricht.

| Studienteilnehmer | Lebenstag | Lebenswoche |
|-------------------|-----------|-------------|
| XY | 1 | 1 |
| | 4 | 1 |
| | 7 | 1 |
| | 14 | 2 |
| | 21 | 3 |
| | 28 | 4 |
| | 56 | 8 |
| | 84 | 12 |

Tabelle 9 Idealbeispiel für die Auswahl der untersuchten Stuhlproben

In der ersten Lebenswoche wurden mehrere Proben ausgewählt, danach jeweils in wöchentlichem bzw. vierwöchentlichem Abstand. Falls keine zu dem gesuchten Tag passende Probe vorlag, wurde die dem gesuchten Tag nächste gesammelte Probe verwendet.

Wenige der Neugeborenen hatten am ersten Lebenstag bereits Stuhlgang. Daher wurde standardmäßig die erste gesammelte Stuhlprobe jedes Studienteilnehmers untersucht. Ebenso

wurden die Neugeborenen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. Lebenstagen entlassen. Es wurde jeweils die letzte vor Entlassung gesammelte Probe untersucht.

3.2.2 DNA-Extraktion

Die ausgewählten Stuhlproben wurden mit dem FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) bearbeitet. Dazu wurde aus jeder Probe 200mg Stuhl abgewogen und dieser nach dem Protokoll (s. Anhang) verarbeitet. Hierbei wurde der Stuhl durch mehrere Schritte so aufgereinigt, dass am Ende reine, in TE-Puffer gelöste Desoxyribonukleinsäure (DNA) für den nächsten Schritt der Polymerasse-Kettenreaktion (PCR) vorhanden ist.

Das Abwiegen der Proben erfolgte, wie auch der komplette folgende Ablauf, in einer Laminar Flow. Dort wurden mithilfe der Stuhl-Spatel und einer bis auf zwei Dezimalstellen genauen Waage je Probe 200mg Stuhl in Röhrchen mit Lysing Matrix E abgefüllt. Lysing Matrix E (LME) ist eine Mischung aus 1,4mm großen Kugeln aus Keramik, 0,1mm großen Kugeln aus Kieselsäure und einer 4mm großen Kugel aus Glas. (96) In die LME-Röhrchen wurde den 200mg Stuhl Natrium-Phosphat-Puffer und MT-Puffer zugegeben. Diese Puffer lösen Proteine der bakteriellen Zellwände sowie extrazellulär vorkommende und die Probe kontaminierende Proteine auf.

Mit dem Gerät FastPrep Instrument wurden die LME-Röhrchen durch vertikale Ausscherbewegungen bei 6.0m/s geschüttelt und der Inhalt homogenisiert. Dies führte dazu, dass die Kugeln der LME-Röhrchen die Zellwände der im Stuhl enthaltenen Bakterien mechanisch zerstörten. Dabei wurde DNA freigesetzt. Im Anschluss an das Homogenisieren wurden die Proben für zehn Minuten zentrifugiert. Dadurch entstand eine klare Trennung der unlöslichen zellulären Bestandteile und der Flüssigkeit im Überstand, die die gelöste DNA enthielt.

Durch die Zugabe von Protein Precipitation Solution (PPS) wurden im Überstand vorkommende Proteine ausgefällt und so die Nukleinsäure weiter vor Kontamination geschützt.

Der Überstand wurde nach dem Ausfällen der Proteine mit „Binding Matrix“ in ein neues Röhrchen gefüllt. Binding Matrix ist ein heterogenes Stoffgemisch, das u. a. aus Siliciumdioxid (auch Kieselsäuregel) und chaotropen Salzen besteht. Diese Röhrchen wurden auf einer Drehscheibe mehrmals gedreht, sodass die DNA in Anwesenheit der chaotropen Salze an das Siliciumdioxid band. Diese Verbindung setzte sich am Boden des Röhrchens ab.

Der Rückstand aus Binding Matrix und daran gebundener DNA wurde zusammen mit durch Ethanol verdünntem SEWS-M in sogenannte Spin Filter umgefüllt. Dabei handelt es sich um Röhrchen mit einem Einsatz, der aus einer speziellen Membran besteht, die größere Partikel aus Lösungen isolieren kann. SEWS-M hatte erneut die Funktion, überflüssige Proteine zu entfernen. Das geschah durch mehrmaliges Zentrifugieren. Dabei wurde die DNA durch ihre Bindung an Siliciumdioxid oberhalb der Membran gehalten. Durch Zugabe von Tris-EDTA-Puffer (Tris (10 mM) low-ethylenediaminetetraacetic acid (0.1 mM) Puffer) wurde die DNA von der Binding Matrix gelöst. Somit wurde sie beim Zentrifugieren nicht mehr oberhalb des Filters gehalten und gelang in das zuvor neu aufgesetzte Auffangröhren. Diese in Tris-EDTA gelöste, reine DNA wurde bei -80°C gelagert und konnte dann während der folgenden Schritte weiterverarbeitet werden.

3.2.3 NanoDrop Spectrophotometrie

Mithilfe des Gerätes Thermo Scientific NanoDrop 1000 UV/VIS Spectrophotometer kann die Konzentration von DNA in einer Probe und Reinheit der isolierten DNA überprüft werden. Eine NanoDrop-Untersuchung wurde mit jeder Probe nach abgeschlossener DNA-Extraktion durchgeführt.

Das Gerät wurde mit der Einstellung „Nucleic Acids“, also Nukleinsäuren, genutzt. Dabei wurde ultraviolette Strahlung zur Analyse genutzt. Das Licht wurde durch 1 μ l des Tris-EDTA-Puffers mit gelöster DNA geleitet. Ein Detektor auf der anderen Seite der Probe konnte dann messen, ob und in welcher Konzentration Nukleinsäuren in der Flüssigkeit vorlagen und ob die Probe durch andere Stoffe kontaminiert war. Während des Messvorganges wurden durch die ultraviolette Strahlung in der Probe befindliche Elektronen angeregt und die Intensität der Strahlung dabei verändert. Der Detektor konnte diese Veränderung der Intensität messen und darüber die gesuchten Werte berechnen. Interessant für weitergehende Untersuchungen waren die Konzentration der Probe, welche in ng/ μ l angegeben wurde. Außerdem wurde der 260/280-Quotient besonders beachtet, da er Aufschluss gibt über die Reinheit von Nukleinsäuren. Bei diesem Quotienten handelt es sich um das Verhältnis der Absorption von Strahlungen der Wellenlängen 260nm und 280nm. Die Werte für Proben mit reiner DNA sollten ca. 1,8 betragen, bei niedrigeren Werten ist davon auszugehen, dass die Probe kontaminiert ist. (97)

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat zum Ziel, die V3-V5 Region der gewonnenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) exponentiell zu vervielfältigen. Damit kann die DNA über DNA-Sequenzierung eindeutig einer Bakterienspezies zugeordnet werden.

Die PCR wurde durchgehend in einer Laminar Flow durchgeführt. Vor Beginn wurde das komplette für die PCR benötigte Material für 35 Minuten von UV-Strahlung bestrahlt. Beide Maßnahmen dienen der Verhinderung von Verunreinigung der Proben.

Es wurden in sogenannte Reaktionskammern der genutzten PCR-Platten jeweils 21 μ l von verdünntem Q5 Master Mix gegeben. Dieser besteht aus benötigten Nukleosidtriphosphaten, Mg⁺⁺ und einer Puffer-Substanz. (98) Danach wurden jeweils 1,5 μ l von 5xx und 7xx Primern hinzugefügt, welche der Bildung neuer DNA-Stränge dienen. Anschließend wurden in je vier Reaktionskammern 1 μ l derselben Probe gegeben, um durch das vierfache Vervielfältigen eine fehlerhafte Amplifikation auszuschließen.

Nachdem die Reaktionskammern der PCR-Platten sachgemäß versiegelt waren, wurde der PCR-Block zur thermischen Reaktion mit folgendem Programm gestartet:

1. 95°C für 2 min
2. 95°C für 20 sec
3. 50°C für 20 sec
4. 72°C für 5 min
5. 34 Runden ab Schritt 2 weiterführen
6. 10°C beibehalten

Schritt 1 diente der initialen Denaturierung, also der Trennung der zwei Stränge der doppelsträngigen DNA. Nachdem die zwei Stränge getrennt vorlagen, konnten während Schritt 3 bei 50°C die Primer bei der sogenannten Primerhybridisierung an die DNA Stränge binden. In Schritt 4, der Elongation, wurden mithilfe der DNA-Polymerase die Nukleosidtriphosphate an die DNA gebunden. Es lagen wieder doppelsträngige DNA-Abschnitte vor, welche in Schritt 2 erneut getrennt wurden. Ab der zweiten Runde waren 20 Sekunden zur Denaturierung ausreichend und der Ablauf wird 34 Mal wiederholt.

Zum Ende des Vorganges lagen die amplifizierten V3-V5 Regionen, die Amplicons, in hoher Anzahl vor und konnten sequenziert werden.

3.2.5 DNA-Aufreinigung

Im Verlauf wurden die Amplicons zweimal aufgereinigt. Dabei wurden freie Nukleotide und PCR-Primer aus der Lösung gefiltert, welche die Reaktion des Pyrosequencing stören würden. (99) Das wurde mithilfe des Agentcourt AMPure XP System, eines Sets zur Aufreinigung der Amplicons nach der PCR, durchgeführt. In die Reaktionskammern der PCR-Platten wurde AMPure-Lösung hinzugefügt. Diese enthält spezielle magnetische Bestandteile, die an die Amplicons binden. Durch Abstellen der PCR-Platten auf magnetischem Untergrund wurden die Amplicons durch die gebundenen magnetischen Bestandteile am Boden der Platte gehalten und die restliche Lösung in der Reaktionskammer konnte mit 80% Ethanol aufgereinigt werden. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Während der letzten Runde wurden die Amplicons in 30µl low EDTA TE Puffer komplett resuspendiert und lagen somit in aufgereinigter Form vor.

3.2.6 PicoGreen Quantifizierung

Mithilfe des Quant-iT dsDNA assays wurde die isolierte und aufgereinigte DNA quantifiziert, also die Konzentration der DNA in der Probe bestimmt. Daraus wurde die Menge an DNA-Molekülen in der Probe berechnet. Anschließend wurde ermittelt, welches Volumen der Probe nötig war, um das Pyrosequencing mit der idealen Menge an DNA-Molekülen durchzuführen.

Das Prinzip der PicoGreen Quantifizierung besteht darin, dass die DNA nach Vermischen mit einer PicoGreen-Lösung einen Bestandteil der Lösung dazu anregt zu fluoreszieren. Dabei verhält sich die Intensität des Fluoreszierens linear zur Menge der DNA. (100) Das Fluoreszieren wird von einem geeigneten Gerät, einem Fluorescence Microplate Reader, registriert und darüber die vorliegende DNA-Konzentration und -Menge bestimmt.

3.2.7 Pyrosequencing

Das Pyrosequencing wurde mit dem Gerät 454 Life Sciences GS Junior der Firma Roche durchgeführt. Dabei wurde dem Roche Amplicon Lib-L Protokoll Folge geleistet.

Die Methode des Pyrosequencing ermöglicht eine Abbildung der DNA-Sequenz, welche zu verschiedenen Zwecken genutzt werden kann. (101) Die Technik basiert auf der Freisetzung anorganischen Pyrophosphats während der DNA-Synthese, das durch enzymatische Reaktionen zu sichtbarem Licht umgewandelt und detektierbar wird. (99)

Es wurden die vier Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase zusammen mit den mit Primern versehenen DNA-Abschnitten in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Reaktion startete mit der Zugabe eines bestimmten Nukleotids, welches, sofern es aus der passenden Base bestand, mit der DNA-Polymerase an den neu zu synthetisierenden DNA-Strang gebunden wurde. (99) Dabei wurde Pyrophosphat freigesetzt, das von der ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wurde. (99) Dieses neu gebildete ATP wurde mit der Luciferase zu Licht umgesetzt, welches detektiert wurde und so als Nachweis galt, dass die Base des zugegebenen Nukleotids die nächste in der DNA-Sequenz sei. (99) Wurde nicht die passende Base ausgewählt, baute die Apyrase das Nukleotid ab und der gleiche Prozess wurde mit dem Nukleotid einer anderen Base durchlaufen. (99) Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die isolierten DNA-Sequenzen vollständig wiedergegeben waren.

3.3 Statistische Analyse

3.3.1 Alpha-Diversität

3.3.1.1 Rarefaction Curve

Die als Resultat der Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenzen bildeten die in einer Stuhlprobe enthaltenen Bakterien ab. Jede DNA-Sequenz kodiert für ein eindeutig zuordnbares Bakterium, sog. operational taxonomic units (OTUs). Je nach Fragestellung wurden die statistischen Analysen mit der Einteilung nach Phylum bzw. nach Genus durchgeführt (s. Abbildung 2).

Um Fehlinterpretationen der Messwerte zu vermeiden, wurden alle Proben auf 5500 DNA-Sequenzen genormt. Proben mit weniger als 5500 DNA-Sequenzen wurden nicht berücksichtigt und aus den folgenden Berechnungen ausgeschlossen. Die Grenze der 5500 DNA-Sequenzen wurde mittels einer sog. Rarefaction-Curve bestimmt (s. *Abbildung 6*).

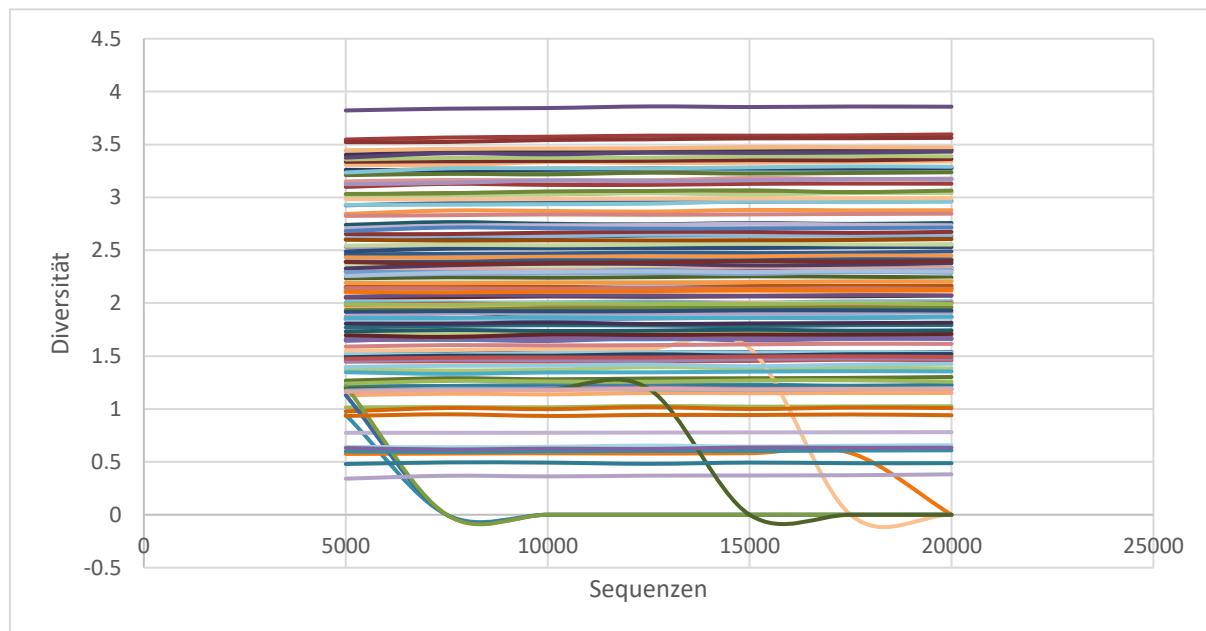


Abbildung 6 Rarefaction-curve aller sequenzierte Proben mit > 5000 enthaltenen DNA-Sequenzen

In der Rarefaction-Curve sind auf der x-Achse die Anzahl der Sequenzen in einer Probe, auf der y-Achse die Diversität abgebildet. Jede farbige Kurve stellt eine einzelne sequenzierte Probe dar. Da ab der Anzahl von 5500 Sequenzen je Probe keine Zunahme der Diversität mehr erkennbar ist und bei wenigen Proben die Diversität sogar abnimmt, wird die Grenze der DNA-Sequenzen für alle folgenden Analysen bei 5500 Sequenzen gesetzt.

3.3.1.2 Analyse der Alpha-Diversität

Die Berechnungen der alpha-Diversität wurden im Statistikprogramm R (R for Windows 4.4.2 Setup des Herstellers R Core Teams, Version 4.4.2) bzw. R-Studio (RStudio des Herstellers RStudio, Version 2024.12.0+467) durchgeführt. Grafiken und Abbildungen wurden ebenso mit RStudio oder mit MS Excel (Microsoft Excel, Version 16.0) erstellt.

Es wurde zunächst die lineare Regression berechnet, um die alpha-Diversität (im Folgenden auf der y-Achse) im zeitlichen Verlauf (im Folgenden auf der x-Achse) darzustellen. Dies erfolgte gemäß der Formel einer linearen Funktion:

$$f(x) = m * x + b$$

Dabei wird die Regressionsgerade $f(x)$ durch den Regressionskoeffizienten m und den Intercept b definiert. Aufgrund des nichtlinearen Verlaufs der Daten (s. dazu *Abbildung 11* und *Abbildung 12*) wurde zudem auf den Spearman-Korrelationskoeffizienten als nichtparametrischer Koeffizient zurückgegriffen. Die Ergebnisse wurden mithilfe von ggplot2 (RStudio) abgebildet, zur besseren Anschaulichkeit wurde je nach Verlauf der Daten eine Lowess-Kurve oder eine lineare Regressionslinie hinzugefügt. Im Verlauf wurde mit eingeschränkten Zeiträumen erneut eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

Um die alpha-Diversität als Artenvielfalt in einem definierten Volumen (84) zu messen und zu berechnen, wurden verschiedene Indices entwickelt. In dieser Arbeit wurde auf folgende drei Indices zurückgegriffen:

Shannon-Index: Der Shannon-Index (H) ist ein Index, welcher sowohl die Anzahl unterschiedlicher Spezies innerhalb einer definierten Population (s , definiert als Richness) als auch die einer Spezies zugehörigen Individuen (i) der gesamten Population (p_i , entspricht der Abundanz) berücksichtigt.

Berechnet wird er wie folgt: (102)

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Simpson-Index: Der Simpson-Index (D) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb einer Population zufällig zwei Individuen (i) der gleichen Spezies auszuwählen bzw. zu bestimmen. (103) Berechnet werden kann er über die Richness (s) und die Abundanz (p_i) mit folgender Formel:

$$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

Equitability bzw. Äquität: Die Äquität (E_H) kann aus dem Shannon-Index berechnet werden. Sie zeigt auf, wie stark Individuen einer Spezies im Vergleich zu Individuen anderer Spezies innerhalb einer definierten Population vertreten sind. Die Äquität kann Werte zwischen 0 und 1 erlangen, wobei ein Wert von 1 als komplett „evenness“ beschrieben wird. Berechnet werden kann sie mithilfe des maximalen Wertes des Shannon-Indexes: (102)

$$E_H = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln s}$$

Tabelle 10 Indices der Alpha-Diversität mit jeweiligen Formeln (102)

3.3.2 Beta-Diversität

Für die zweite Fragestellung der Parallelität der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms wurde die beta-Diversität analysiert. Diese beschreibt den Gradienten der Artenvielfalt zwischen verschiedenen Lebensräumen. (84) In dieser Arbeit wurde mittels beta-Diversität der Unterschied des intestinalen Mikrobioms verschiedener Individuen untersucht.

Um die beta-Diversität zu berechnen, wurde auf die Abstandsmetrik UniFrac (aus dem Englischen: „unique fraction“) zurückgegriffen. Sie basiert auf dem phylogenetischen Baum (s. *Abbildung 2, Abbildung 7*) und beschreibt anhand dessen den Anteil der Einzigartigkeit einer Spezies bzw. einer Population. Verglichen wird hierbei der Weg bzw. Abschnitt des Weges auf dem phylogenetischen Baum, der nur von der untersuchten Spezies bzw. Population zurückgelegt wird. Um mehrere Populationen voneinander zu unterscheiden, wird der Unterschied der Wege berechnet.

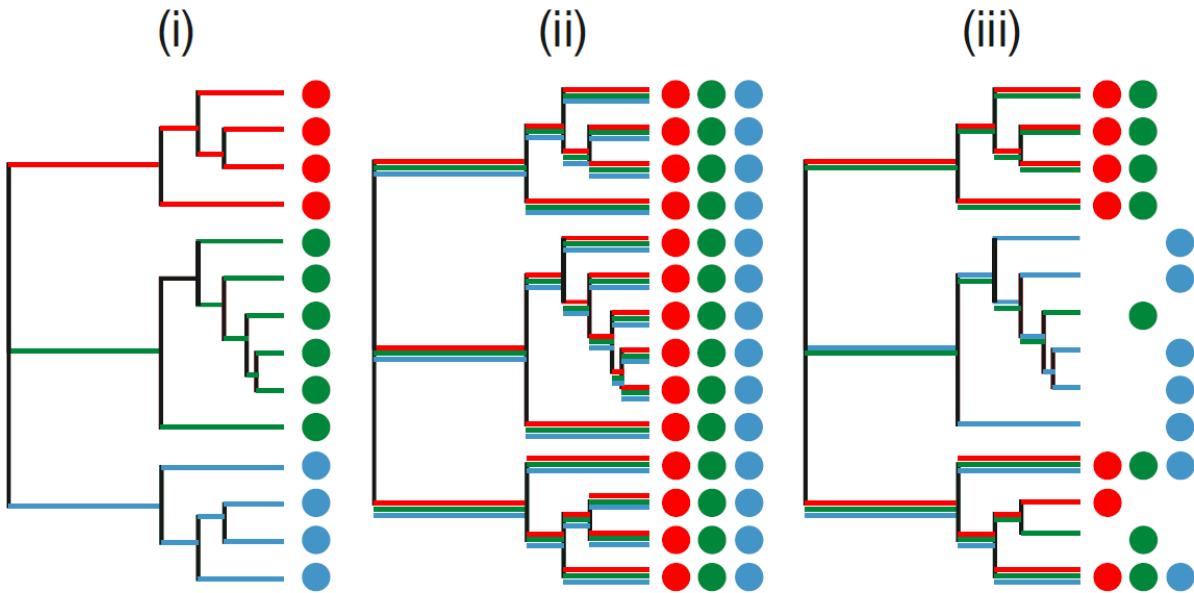


Abbildung 7 UniFrac-Analyse anhand des phylogenetischen Baumes und drei Populationen der Farben „rot“, „grün“ und „blau“: (i) als Beispiel für hohe beta-Diversität, (ii) beta-Diversität gleich null, (iii) beta-Diversität unterschiedlich (104)

Abbildung 7 zeigt das Prinzip der Berechnung der beta-Diversität mittels UniFrac-Maß: Es sind drei zu vergleichende Populationen in den Farben rot, grün und blau abgebildet. Jeder farbige Punkt symbolisiert eine OTU in der Farbe der jeweiligen Population, links der OTUs ist der dorthin führende phylogenetische Baum mit allen Ästen abgebildet. Darauf ist der jeweilige zu einer bestimmten OTU führende Weg in der Farbe der Population markiert. In (i) ist jede der drei Populationen durch „eigene“ OTUs abgebildet. Innerhalb der Populationen gibt es keine Ähnlichkeiten und dementsprechend keine gemeinsamen Wegabschnitte. Der Weg ist damit einzigartig, es besteht also eine sehr hohe beta-Diversität zwischen den Populationen. Bei (ii) weist jede der drei Populationen die gleichen OTUs und damit die gleichen Wege auf. Die Einzigartigkeit des Weges ist in diesem Fall nicht gegeben, die beta-Diversität ist somit gleich null. Im Beispiel (iii) besteht ein gemischtes Bild mit einigen gemeinsamen Wegabschnitten, insb, bei Population „rot“ und „grün“. Population „blau“ kennzeichnet sich allerdings auch durch fünf „einzigartige“ OTUs und Wegabschnitte. Die Uni-Frac-Distanz ist zwischen „rot“ und „grün“ daher geringer ausgeprägt als zu „blau“. (104)

Berechnet werden kann die UniFrac-Distanz d^U zwischen den Proben A und B mittels folgender Formel: (105)

$$d^U = \sum_{i=1}^n \frac{l_i |I(p_i^A > 0) - I(p_i^B > 0)|}{\sum_{i=1}^n l_i}$$

Die Anwesenheit einer Spezies auf dem untersuchten Weg wird hier durch I beschrieben, i zeigt den Weg mit dem Wegabschnitt l_i an. p_i stellt jeweils die relative Abundanz der einzelnen OTU dar.

Bei dieser Formel handelt es sich um die ungewichtete UniFrac-Distanz. Diese hat den Nachteil, dass durch die ausschließliche Betrachtung von Vorhandensein bzw. nicht- Vorhandensein einer Spezies, OTUs geringerer Abundanz überrepräsentiert werden. Die relative Abundanz verschiedener OTUs innerhalb der Proben kann mittels gewichteter UniFrac-Distanz d^W berücksichtigt werden und berechnet sich wie folgt: (105)

$$d^W = \frac{\sum_{i=1}^n l_i |p_i^A - p_i^B|}{\sum_{i=1}^n l_i (p_i^A + p_i^B)}$$

Die gewichtete UniFrac-Distanz wurde paarweise zwischen allen untersuchten Proben dieser Arbeit berechnet. Die Berechnungen wurden mit der Plattform Qiime2 („Quantitative Insights Into Microbial Ecology“, qiime2.org) durchgeführt und tabellarisch abgebildet.

3.3.2.1 Testung auf Normalverteilung, Log10-Transformation

Zunächst erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test die Testung auf Normalverteilung der gesamten UniFrac-Distanzen. Bei lediglich 7 von 116 normalverteilten Variablen ($p \geq 0.05$) führten wir eine Transformation des Datensatzes mittels der Log10-Transformation durch. Anschließend erfolgte eine erneute Testung mit dem Shapiro-Wilk-Test, hier zeigten sich nun 24 von 116 Proben normalverteilt. Aufgrund dessen erfolgten die weiteren statistischen Analysen der log10-transformierten UniFrac-Distanzen mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test.

3.3.2.2 Analyse der UniFrac-Distanz

Um der Frage nachzugehen, ob die beta-Diversität zwischen Geschwistern geringer ist als zu nicht verwandten Studienteilnehmern, wurde die UniFrac-Distanz der Gruppe „Geschwister“ und der Gruppe „Nicht-Geschwister“ verglichen. Dazu wurden die UniFrac-Distanzen in zwei Gruppen eingeteilt: die phylogenetische Distanz zum Geschwisterkind wurde in die Gruppe „Geschwister“ eingesortiert, die phylogenetischen Distanzen zu allen anderen Teilnehmern wurde in die um einiges umfangreichere Gruppe „Nicht Geschwister“ eingesortiert.

Die UniFrac-Distanzen der beiden Gruppen wurden zunächst über den gesamten Zeitraum hinweg verglichen und anschließend zu den jeweils definierten Zeitpunkten (Tag 4, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde wie oben beschrieben aufgrund der nicht gegebenen Normalverteilung mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests überprüft.

Die Berechnungen und Erstellung von Grafiken erfolgten wie die statistische Analyse der alpha-Diversität im Statistikprogramm R for Windows 4.4.2 Setup des Herstellers R Core Teams, Version 4.4.2) bzw. R-Studio (RStudio des Herstellers RStudio, Version 2024.12.0+467).

Durch den Vergleich der Gruppen „Geschwister“ und „Nicht Geschwister“ lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, ob die UniFrac-Distanz zwischen Zwillingen und Drillingen geringer ist als die UniFrac-Distanz zu nicht verwandten Frühgeborenen.

3.3.3 Einfluss von Therapien auf das intestinale Mikrobiom

Unter der Annahme, das intestinale Mikrobiom von Frühgeborenen würde durch unterschiedliche Therapien (Beatmung, zentrale Zugänge und beides) beeinflusst, wurden Zwillinge und Drillinge je nach Behandlung in folgende Kategorien eingeteilt:

- Zentrale Zugänge: Liegen eines Zentralen Zugangs (NAK, NVK, Silastik) über mindestens 24 Stunden
- Beatmung: invasive Beatmung oder CPAP-Beatmung über mindestens 24 Stunden
- Zentrale Zugänge und Beatmung.

Dabei wurde lediglich berücksichtigt, ob die Geschwister unterschiedlich behandelt wurden, nicht wie sie behandelt wurden. Da ansonsten alle demografischen und genetischen Parameter der Geschwister gleichbleibend waren, stellte die Therapie den einzigen Unterschied dar. Untersucht wurde jeweils die UniFrac-Distanz (s. 3.3.2) als Maß für die beta-Diversität. Eine hohe UniFrac-Distanz spricht für eine Ungleichheit der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms sodass bei unterschiedlicher Therapie von einer hohen UniFrac-Distanz dieser Geschwister auszugehen wäre.

Durchgeführt wurden die Berechnung und Erstellung der Grafiken analog zu Fragestellung 2 mit dem Statistikprogramm R for Windows 4.4.2 (Setup des Herstellers R Core Teams, Version 4.4.2) bzw. R-Studio (RStudio des Herstellers RStudio, Version 2024.12.0+467). Der Einfluss der Therapien auf die UniFrac-Distanz wurde aufgrund der oben beschriebenen nicht vorliegenden Normalverteilung mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

Im Folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse dargestellt. Zunächst wird das den Berechnungen zugrunde liegende Patientenkollektiv beschrieben, im Anschluss daran werden die Ergebnisse der drei Fragestellungen erklärt und dargestellt.

4.1 Patientenkollektiv und klinische Parameter

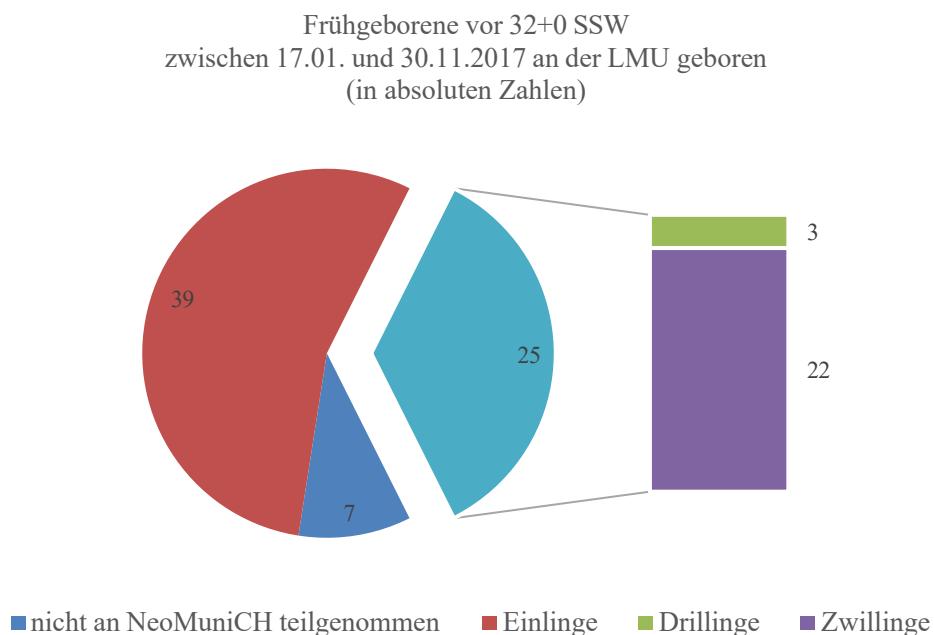


Abbildung 8 Grafik zur Veranschaulichung des Patientenkollektivs

Während des für diese Interim Analyse relevanten Zeitraums vom 17.01. bis 30.11.2017 wurden an den Kliniken der LMU 71 Frühgeborene vor 32+0 SSW geboren bzw. behandelt. Davon wurden 64 Frühgeborene für die NeoMuniCH-Studie rekrutiert. Gründe für ein fehlendes Einverständnis von insgesamt 7 Frühgeborenen in die NeoMuniCH Studie waren bei 5 Frühgeborenen eine Entscheidung der Eltern ohne medizinische Begründung. Ein Frühgeborenes wurde aufgrund einer bestehenden Analatresie nicht in die Studie eingeschlossen, ein anderes aufgrund sehr schlechter Überlebensprognosen und daher mangelndem Einverständnis der Eltern.

Unter den NeoMuniCH-Teilnehmern des oben genannten Zeitraums wurde für diese Arbeit im Sinne einer Interim Analyse die Untergruppe aller Zwillinge und Drillinge berücksichtigt. Im Folgenden und in *Tabelle 11* wird die Kohorte detailliert beschrieben.

Die Größe der Untergruppe beträgt 25 Frühgeborene, welche als 12 Geschwister geboren wurden: einmal Drillinge, ansonsten Zwillinge.

| Parameter | Zwillinge und Drillinge (n = 25) | | |
|---|----------------------------------|------------------------|----------------------|
| | Absolute Anzahl | Mittelwert (min – max) | Median (IQR: Q1, Q3) |
| Demographische Parameter | | | |
| Weiblich | n = 5 | | |
| Geburtsgewicht in g | | 1231 (540 – 1800) | 1235 (980, 1450) |
| Gestationsalter in SSW | | 29+1 (23+3 – 31+6) | 29+1 (28+3, 30+4) |
| Vaginale Geburt | n = 7 | | |
| Dichorial-diamniot | n = 19 | | |
| Klinikaufenthalt am Standort Innenstadt | n = 18 | | |
| Dauer des Klinikaufenthaltes in d | | 50,3 (19 – 117) | 39 (23, 66) |
| Antibiotika | | | |
| Peripartale Antibiotika-Therapie (Dauer in d) | n = 25 | 4,7 (2 – 11) | 4 (3, 6) |
| Mehrfache Zyklen von Antibiotika-Therapien | n = 5 | | |
| Tage mit Antibiotika-Therapie insgesamt in d | | 6,9 (2 – 26) | 4 (3, 6) |
| Beatmung | | | |
| Invasive Beatmung (Dauer in d) | n = 6 | 1,2 (0 – 16) | 0 (0, 0) |
| CPAP-Beatmung mit Sauerstoff (Dauer in d) | n = 17 | 8,8 (0 – 53) | 2 (0, 5) |
| CPAP-Beatmung ohne Sauerstoff (Dauer in d) | n = 23 | 14,9 (0 – 34) | 15 (8, 18) |
| ohne Beatmung (Dauer in d) | n = 20 | 18,7 (0 – 59) | 22 (9, 26) |
| Ernährung | | | |
| Künstliche Säuglingsnahrung (Dauer in d) | n = 19 | 7,2 (0 – 38) | 4 (1, 9) |
| Mit Muttermilch gefüttert (Dauer in d) | n = 25 | 40,1 (9 – 96) | 34 (22, 49) |
| Lebensalter bei erster Muttermilch-Gabe in d | | 3,2 (0 – 19) | 2 (1, 4) |
| Mit Muttermilchspende gefüttert (Dauer in d) | n = 14 | 2,7 (0 – 15) | 2 (0, 4) |
| Zentrale Zugänge (Silastik, NAK, NVK) | | | |
| Zentraler Zugang | n = 13 | 6,0 (0 – 39) | 3 (0, 10) |
| Mehrere Zugänge zur gleichen Zeit | n = 8 | | |
| Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) | n = 0 | | |

Tabelle 11 Daten zum Patientenkollektiv dieser Arbeit: Detaillierte Informationen zu demographischen und klinischen Parametern, jeweils in absoluter Anzahl, Mittelwert mit Minimum und Maximum und Median mit 1. und 3. Interquartilsabstand.

Bei Betrachtung der demographischen Parameter der Untergruppe imponierte eine sehr disproportionale Geschlechterverteilung mit 20 männlichen und 5 weiblichen NeoMuniCH-Teilnehmern. Das mittlere Geburtsgewicht der Frühgeborenen dieser Untergruppe betrug 1231g, das mittlere Gestationsalter 29+1 SSW. Die Geburt erfolgte bei 7 NeoMuniCH-Teilnehmern dieser Untergruppe spontan durch eine vaginale Geburt, die restlichen 18 NeoMuniCH-Teilnehmer dieser Untergruppe wurden durch einen Kaiserschnitt entbunden. Zwei Frühgeborene eines Zwillingspaars wurden auf unterschiedliche Weisen entbunden: das erste Frühgeborene spontan durch eine vaginale Geburt, das Zweite durch einen Kaiserschnitt. 19 der 25 Frühgeborenen der hier untersuchten Untergruppe waren dichorial-diamniote Zwillinge- bzw. Drillinge.

18 der 25 Frühgeborenen dieser Untergruppe wurden am Klinikstandort der LMU Innenstadt versorgt. Die mittlere Dauer des Klinikaufenthaltes betrug 50,3 Tage, die mediane Dauer betrug allerdings nur 39 Tage.

Eine peripartale Antibiotika-Therapie wurde allen Frühgeborenen dieser Untergruppe verabreicht. Die mittlere Dauer dieser peripartalen Antibiotika-Therapie betrug 4,7 Tage. 5 der 25 Frühgeborenen bekamen mehrfache Zyklen antibiotischer Therapie. Dadurch erhöhte sich die mittlere Dauer der Antibiotika-Therapie insgesamt auf 6,9 Tage, der Median blieb jedoch bei 4 Tagen.

6 der 25 Frühgeborenen wurden während des Klinikaufenthaltes invasiv beatmet. 17 der 25 Frühgeborenen wurden durch eine CPAP-Beatmung mit Sauerstoff und 23 durch eine CPAP-Beatmung ohne Sauerstoff therapiert. Ohne jegliche Unterstützung der Beatmung waren 20 der 25 Frühgeborenen während des Klinikaufenthaltes bzw. im untersuchten Zeitraum.

Ernährt wurden 19 der 25 Frühgeborenen u.a. mit künstlicher Säuglingsnahrung. Durchschnittlich bekamen sie 7,2 Tage (Median 4 Tage) lang diese Ernährungsform. Alle 25 Frühgeborenen dieser Untergruppe wurden mit Muttermilch gefüttert, das mittlere Lebensalter bei erster Muttermilchgabe betrug 3,2 Tage (Median 2 Tage). 14 der 25 Frühgeborenen wurde vorübergehend mittels Muttermilchspende ernährt.

13 der 25 Frühgeborenen wurde zeitweise ein zentraler Zugang gelegt, davon hatten 8 Frühgeborene mehrere zentrale Zugänge zur gleichen Zeit (bspw. NAK und NVK).

4.2 Zunahme der alpha-Diversität mit steigendem Lebensalter

Die Hypothese, die alpha-Diversität der Bakterien in den Stuhlproben, also die Anzahl unterschiedlicher Bakterienphyla und Bakteriengenus im Stuhl der Frühgeborenen nähme mit steigendem Lebensalter der Frühgeborenen stetig zu, lässt sich anhand folgender Ergebnisse bedingt bestätigen. Im frühen untersuchten Zeitraum bis Lebenstag 40 der Frühgeborenen zeigt sich eine Zunahme der alpha-Diversität, im darauffolgenden Zeitraum (Tage 41 – 100) zeigt sich jedoch eine Stagnation der alpha-Diversität.

Gezeigt wird dies im Folgenden sowohl anhand von Grafiken als auch mittels statistischer Analysen.

4.2.1 Visuelle Darstellung der alpha-Diversität

Die folgenden Balkendiagramme stellen die Zunahme der alpha-Diversität mit steigendem Alter optisch dar. In der ersten *Abbildung 9* sind die vorhandenen Bakterienphyla (L2), in der zweiten *Abbildung 10* die vorhandenen Bakteriengenus (L6) abgebildet.

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale Verteilung des intestinalen bakteriellen Mikrobioms im Zeitverlauf. Die Zeit wurde auf der x-Achse in wöchentlichen Abständen angegeben. Ein farbiger Balken stellt den Mittelwert aller Stuhlproben dieses Untersuchungszeitraumes dar. Die unterschiedlich gefärbten Abschnitte eines Balkens stellen unterschiedliche Bakterienphyla bzw. Bakteriengenus dar, der prozentuale Anteil ist auf der linken y-Achse abzulesen. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu ermöglichen, wurden die 95% der häufigsten Phyla bzw. Genus in die Darstellungen einbezogen, seltene Spezies wurden ausgeschlossen.

Die in beiden Grafiken die Balken überlagernde Kurve zeigt die auf der rechten y-Achse abzulesende Anzahl der untersuchten Proben je Untersuchungszeitraum an. Es wurde je Studienteilnehmer pro Untersuchungszeitraum max. eine Probe in die Statistik einbezogen.

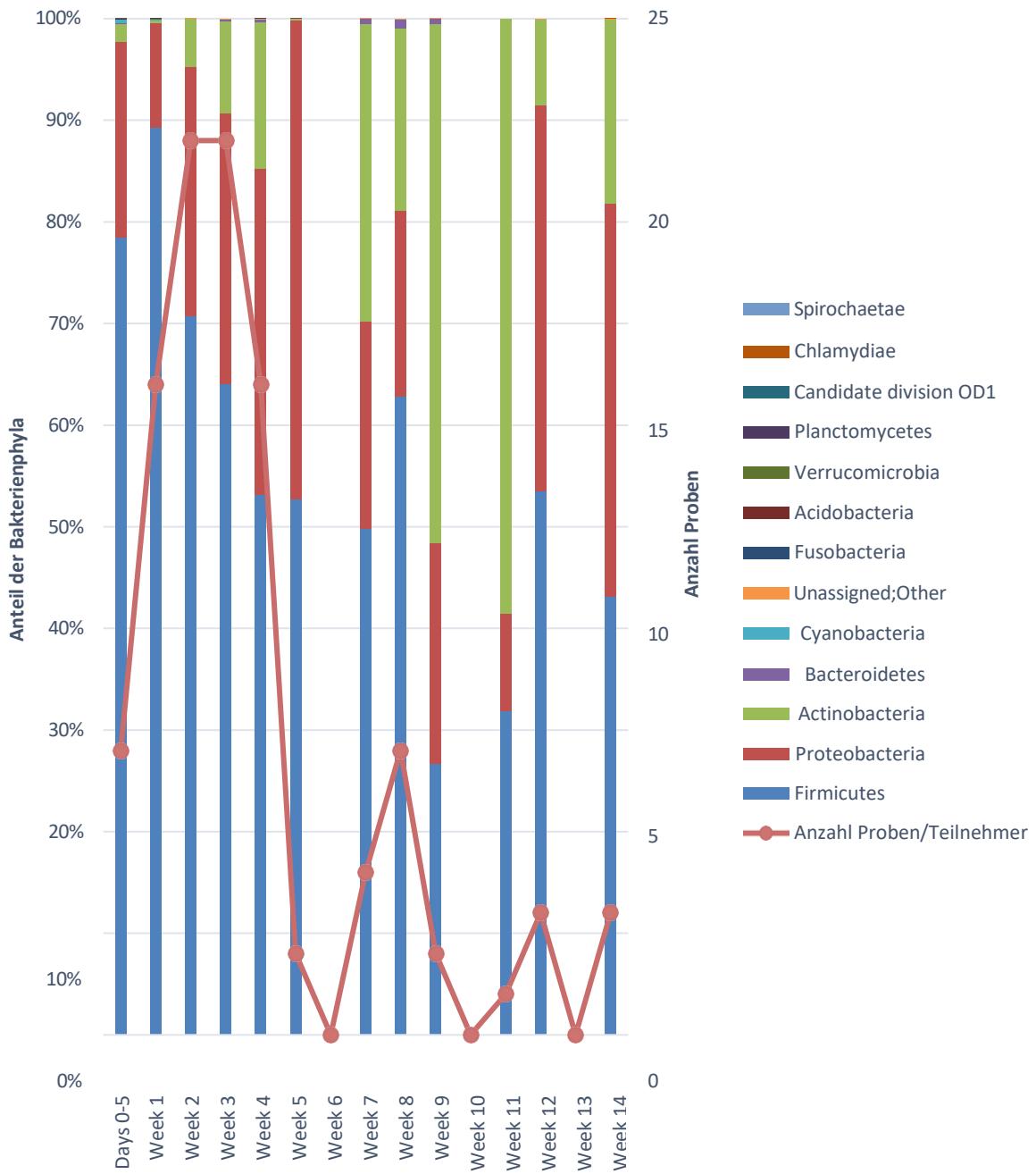


Abbildung 9 Verteilung der Bakterienphyla (L2) mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Abgebildet sind die Mittelwerte der in allen Stuhlproben aller Teilnehmer vorhandenen Bakterien, die zum auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkt Teil der Studie waren.

Bei Beobachtung der Bakterienphyla (L2) des intestinalen Mikrobioms Frühgeborener zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine Veränderung der Zusammensetzung: Innerhalb der ersten Lebenstage sind vor allem *Firmicutes* (blau) und *Proteobacteria* (rot) nachzuweisen, wohingegen mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen eine vielfältigere Population mit zunehmend auch *Actinobacteria* (grün) zu erkennen ist. Auffallend ist eine im Verlauf zunehmende Diversifizierung, optisch erkennbar an den zunehmend „bunten“ Balken.

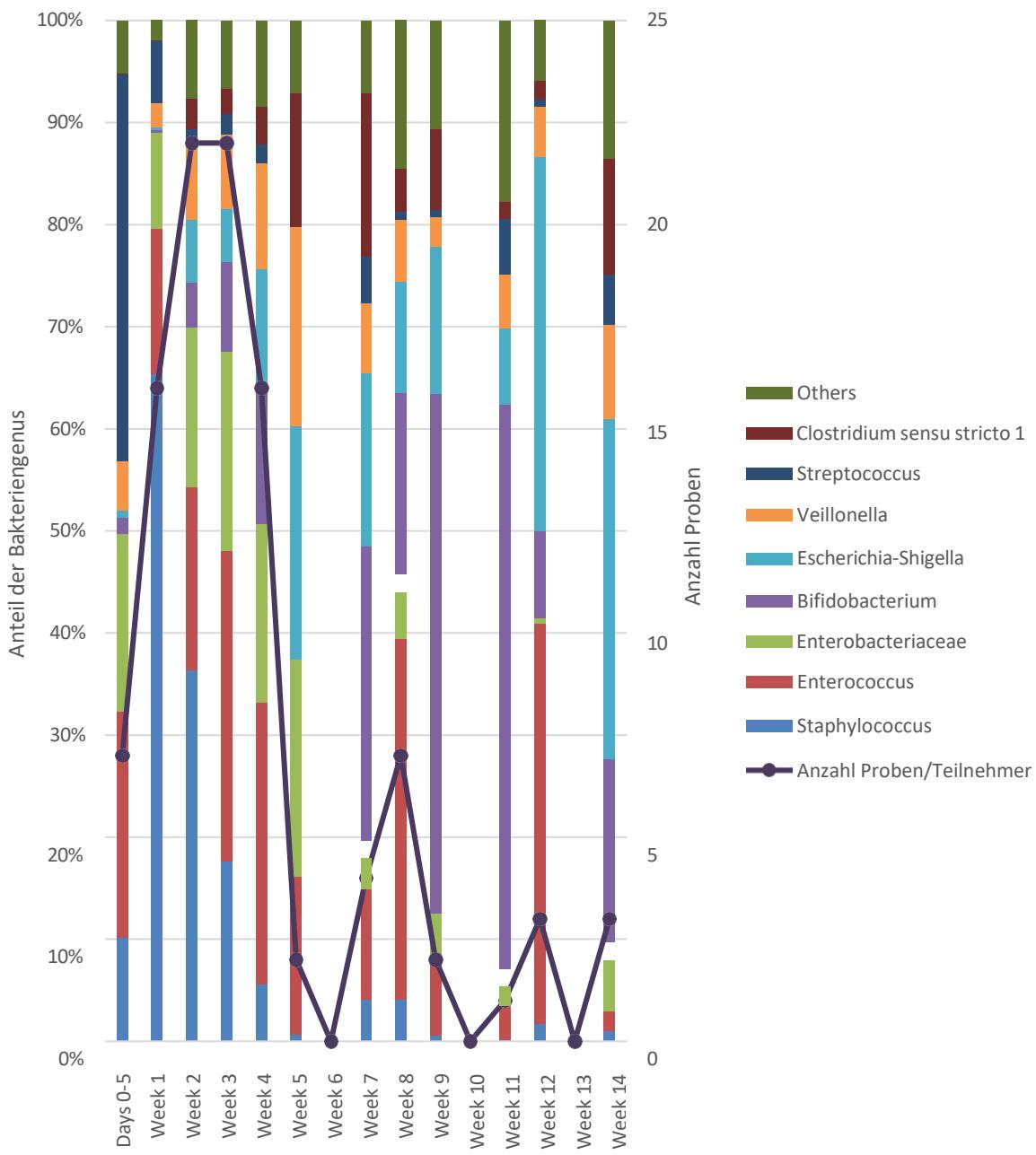


Abbildung 10 Verteilung der Bakteriengenus (L6) mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Abgebildet sind die Mittelwerte der in allen Stuhlproben aller Teilnehmer vorhandenen Bakterien, die zum auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkt Teil der Studie waren.

Bei genauerer Auflösung in Bakteriengenus (L6) zeigt sich ein ähnliches Bild mit anfangs überwiegend *Streptokokken* (dunkelblau), *Staphylokokken* (hellblau), *Enterokokken* (rot) und *Enterobacteriaceae* (grün). Mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen nimmt der Anteil an *Streptokokken* deutlich ab, dafür überwiegen *Bifidobakterien* (violett), *Enterokokken* (rot) und *Escherichia-Shigella* (hellblau). Wie auch bei der Aufteilung in Phyla zeigt sich hier optisch eine zunehmende Diversifizierung. Mit zunehmendem Alter erscheinen die Balken vielfältiger gefärbt, insb. scheinen sich die nachgewiesenen Bakteriengenus gleichmäßig zu verteilen.

4.2.2 Statistische Analyse mittels linearer Regression

Die Regressionskoeffizienten aller drei untersuchter Indices der alpha-Diversität (Shannon-, Simpson-Index und Equitability) zeigten bei Untersuchung des gesamten Zeitraums Werte nahe 0. Damit lässt sich keine lineare Zunahme der alpha-Diversität über den gesamten Zeitverlauf beschreiben.

| | Regressionskoeffizient | p-Wert |
|----------------------|------------------------|-------------|
| Shannon-Index | $R^2 = 0,013$ | $p < 0,001$ |
| Simpson-Index | $R^2 = 0,002$ | $p < 0,005$ |
| Equitability | $R^2 = 0,002$ | $p < 0,001$ |

Tabelle 12 Regressionskoeffizienten R^2 und p-Wert der Indices der alpha-Diversity (Shannon-, Simpson-Index und Equitability) über den gesamten untersuchten Zeitraum.

4.2.3 Statistische Analyse mittels Spearman-Korrelation

Da die lineare Regression nicht geeignet ist, um einen Einfluss des Alters auf die alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms nachzuweisen (s. *Tabelle 12*), wurden erneute statistische Analysen mittels der Spearman-Korrelation durchgeführt. Es ließ sich mit allen untersuchten Diversitäts-Indices eine moderate positive Korrelation über den gesamten untersuchten Zeitraum feststellen (s. *Tabelle 13*).

| | Spearman-Korrelationskoeffizient | p-Wert |
|----------------------|----------------------------------|-------------|
| Shannon-Index | $r = 0,51$ | $p < 0,001$ |
| Simpson-Index | $r = 0,44$ | $p < 0,001$ |
| Equitability | $r = 0,52$ | $p < 0,001$ |

Tabelle 13 Spearman-Korrelationskoeffizienten und p-Wert der Indices der alpha-Diversity (Shannon-, Simpson-Index und Equitability) über den gesamten untersuchten Zeitraum

Der Shannon-Index erwies sich mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,51 und einem $p < 0,001$ als zwar milde, aber signifikant positiv. Damit zeigte sich eine Zunahme der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Dies ließ sich auch grafisch in *Abbildung 11* darstellen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Tagen und auf der y-Achse der Shannon-Index abgebildet. Zur besseren Anschaulichkeit wurde eine Lowess-Linie eingezeichnet, hier lässt sich insbesondere eine Korrelation in den ersten 40 Lebenstagen erkennen.

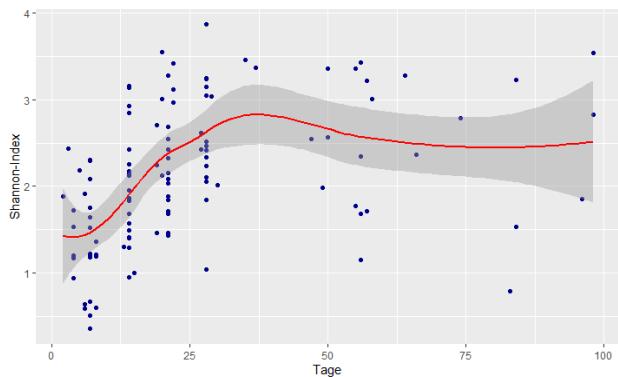


Abbildung 11 Spearman-Korrelation mit Lowess-Linie des Shannon-Indexes über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die x-Achse stellt das Alter in Tagen, die y-Achse den Shannon-Index dar. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Lowess-Linie dar.

Auch der Simpson-Index und die Equitability zeigten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,44 sowie 0,52 und einem $p < 0,001$ eine milde, aber signifikante positive Korrelation. Grafisch dargestellt (s. Abbildung 12) ließen sich ebenso anhand der Lowess-Linien eine Zunahme der alpha-Diversität im Zeitverlauf ablesen.

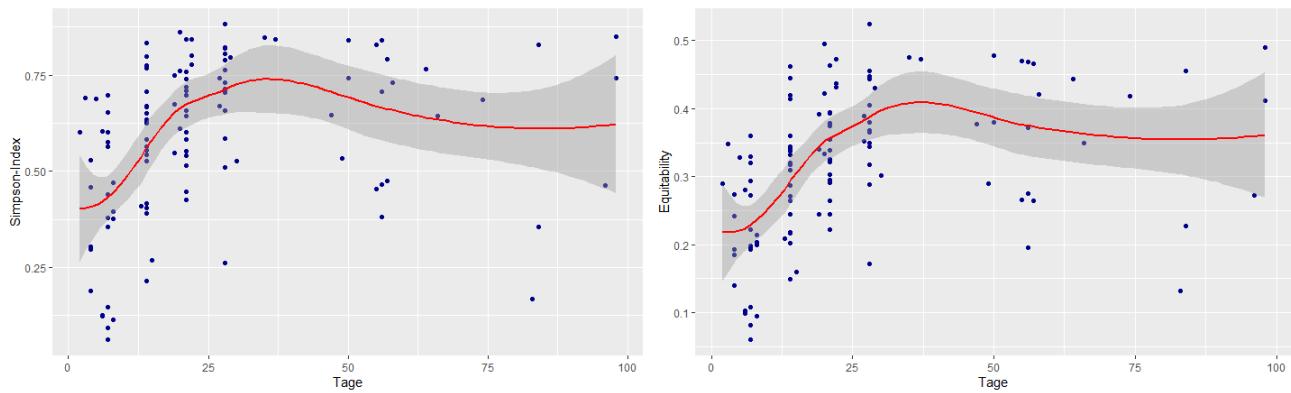


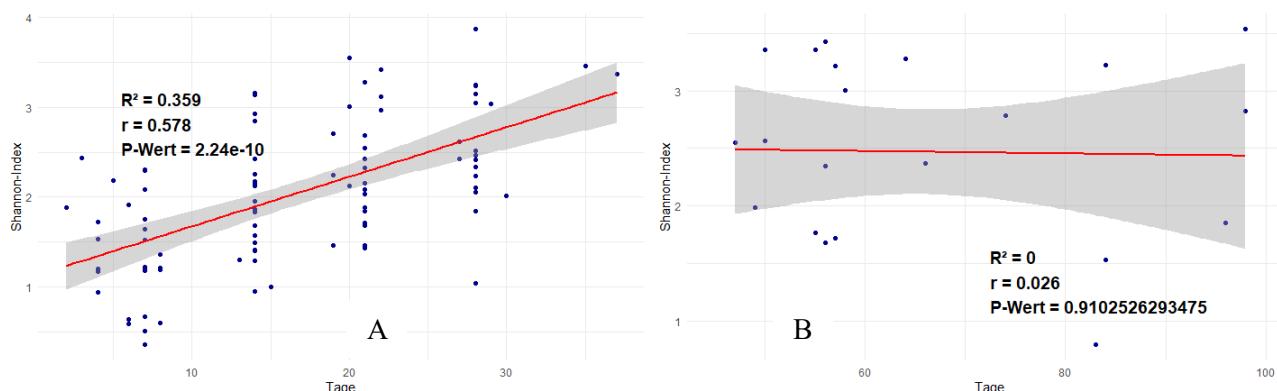
Abbildung 12 Spearman-Korrelation mit Lowess-Linie des Simpson-Indexes und der Equitability über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die x-Achse stellt das Alter in Tagen, die y-Achse den Simpson-Index bzw. die Equitability dar. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Lowess-Linie dar.

4.2.4 Untersuchung der alpha-Diversität in getrennten Zeiträumen

Insbesondere in den ersten 40 Tagen war eine Korrelation zwischen Alter und Zunahme der alpha-Diversität anhand der Lowess-Linie erkennbar. Daher analysierten wir im Folgenden unterschiedliche Zeiträume. Für beide Zeiträume führten wir erneut eine lineare Regression sowie die Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten durch. Zur besseren Übersichtlichkeit fokussierten wir uns im Folgenden auch in der grafischen Abbildung auf den Shannon-Index. Der Simpson-Index sowie die Equitability sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Der Shannon-Index zeigte in den ersten 40 Tagen eine deutliche positive Korrelation mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,58$ bei einem $p < 0,001$. Der Regressionskoeffizient $R^2 = 0,36$ war ebenso positiv.

Damit zeigt sich eine eindeutige Zunahme der alpha-Diversität im Laufe der ersten 40 Lebenstage der Frühgeborenen. S. dazu *Abbildung 13A*.



| | Tag 0 - 40 | Tag 41 - 100 |
|--|---------------|--------------|
| Regressionskoeffizient R^2 | 0,359 | 0 |
| Spearman-Korrelationskoeffizient r | 0,578 | 0,026 |
| p-Wert | $2,24e^{-10}$ | 0,91 |

Abbildung 13 Lineare Regression des Shannon-Indexes in den Zeiträumen 0-40 (A) bzw. 41-100 Tage (B) mit Angabe der Regressionskoeffizienten R^2 , Spearman-Korrelationskoeffizient r und p-Wert. In den Grafiken stellt die x-Achse das Alter in Tagen, die y-Achse den Shannon-Index dar. Jeder Punkt entspricht einer einzelnen Probe. Die rote Linie stellt die Regressionsgerade dar.

Im zweiten Zeitraum ab Tag 41 zeigte der Shannon-Index im Zeitverlauf mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten $r=0,03$ und einem Regressionskoeffizienten $R^2=0$ keine Zunahme der alpha-Diversität (*Abbildung 13B*).

Auch der Simpson-Index und die Equitability zeigten im frühen Zeitraum bis Tag 40 eine signifikante Zunahme der alpha-Diversität (s. *Tabelle 14*). Im Zeitraum ab Tag 41 erwiesen sich alle Spearman-Korrelationskoeffizienten der Diversitäts-Indices als nahezu 0. Damit lässt sich in unserem Patientenkollektiv ab Tag 41 keine Zunahme der alpha-Diversität mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen mehr beobachten.

| | Tag 0 - 40 | | Tag 41 - 100 | |
|---------------|----------------------------------|---------|----------------------------------|--------|
| | Spearman-Korrelationskoeffizient | p-Wert | Spearman-Korrelationskoeffizient | p-Wert |
| Shannon-Index | 0,578 | < 0,001 | 0,026 | 0,910 |
| Simpson-Index | 0,568 | < 0,001 | -0,041 | 0,855 |
| Equitability | 0,609 | < 0,001 | -0,018 | 0,936 |

Tabelle 14 Spearman-Korrelationskoeffizienten der Indices der alpha-Diversität (Shannon-, Simpson-Index, Equitability) mit p-Werten in den zwei untersuchten Zeiträumen

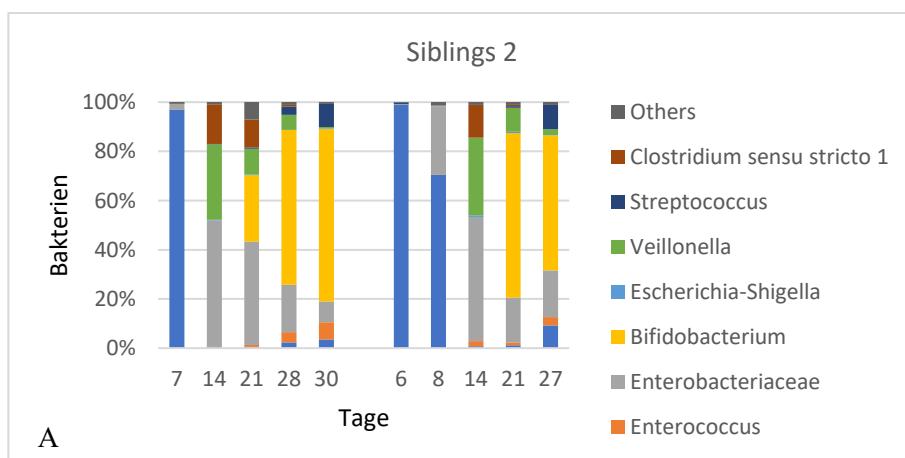
4.3 Beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen

Diese Fragestellung geht dem Ziel nach, die interindividuelle Diversität des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen zu untersuchen. Dies wird anhand der beta-Diversität gezeigt, welche den Unterschied der Artenvielfalt zwischen zwei Populationen beschreibt.

Die Hypothese, wonach das intestinale Mikrobiom von verwandten Frühgeborenen eine geringere beta-Diversität aufweist als das intestinale Mikrobiom nicht verwandter Frühgeborener, ließ sich mit den folgenden Analysen für das untersuchte Patientenkollektiv zu bestimmten Zeitpunkten bestätigen.

4.3.1 Darstellung der beta-Diversität durch Beobachtung des Verlaufes der OTUs

Zunächst lässt sich optisch anhand von Balkendiagrammen ablesen, ob das intestinale bakterielle Mikrobiom Frühgeborener Zwillinge und Drillinge aus den gleichen Bakterienspezies besteht und ob die Verteilung der Spezies kongruent verläuft. Zum direkten Vergleich der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms sind in *Abbildung 14* nebeneinander jeweils Zwillinge mit ihrem individuellen Verlauf abgebildet. Dargestellt wurde jede untersuchte Probe jedes untersuchten Frühgeborenen der beiden Zwillinge. Auf der x-Achse ist das Alter in Tagen und auf der y-Achse der prozentuale Anteil der Bakteriengenus (L6) abgebildet. Jeder farbige Balken zeigt in dieser Grafik die in einer einzelnen Stuhlprobe enthaltenen Bakterien in ihrer anteilmäßigen Verteilung.



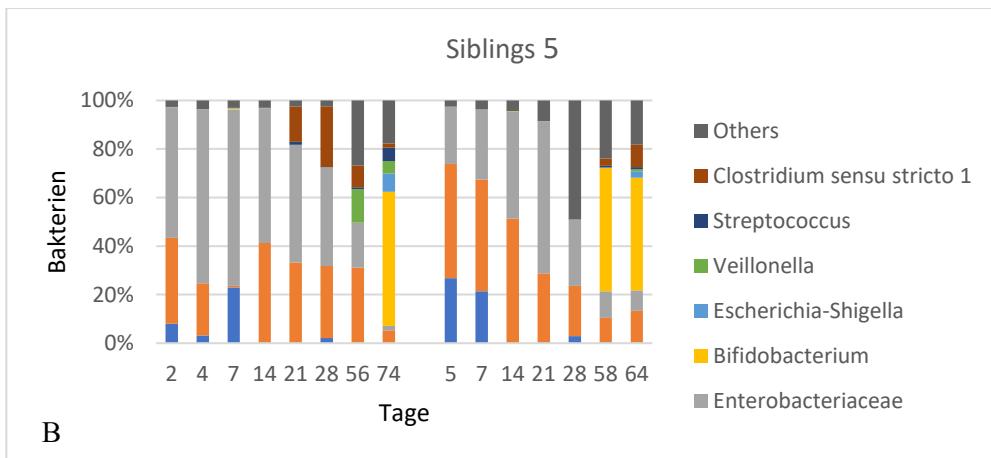


Abbildung 14 Parallele Darstellung der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms der Zwillinge „Siblings 2“ und „Siblings 5“. Jeder Balken stellt eine untersuchte Probe am auf der x-Achse markierten Tag mit den farblich gekennzeichneten Anteilen verschiedener Bakterien dar. Die jeweils links und rechts gruppierten Balken sind jeweils einem der Frühgeborenen zugeordnet.

In *Abbildung 14A* sind die zu bestimmten Zeitpunkten im intestinalen Mikrobiom enthaltenen Bakterien des frühgeborenen Zwillingspaars „Siblings 2“ abgebildet. Mit etwa einer Woche besteht das intestinale Mikrobiom beider Frühgeborener hauptsächlich aus *Staphylococcus*, im Verlauf, ab Tag 21 lassen sich bei beiden zunehmende Anteile *Bifidobacterien* erkennen. Insgesamt fällt das Vorhandensein der gleichen Bakterien in den Proben der beiden Frühgenen, insbesondere auch zu annähernd gleichen Zeitpunkten auf.

Ähnlich sieht man bei „Siblings 5“ in *Abbildung 14B* eine zeitlich parallele Entwicklung der beiden frühgeborenen Zwillinge. Zu Beginn lassen sich vor allem *Enterobacteriaceae* und *Enterococcus* in den Proben des intestinalen Mikrobioms nachweisen. Nach einigen Wochen sind bei beiden vermehrt *Bifidobacterien* und insgesamt eine höhere Anzahl unterschiedlicher Bakterien darstellbar.

Vergleicht man jedoch Proben des intestinalen Mikrobioms der beiden Frühgeborenen „Siblings 2“ mit denen der Frühgeborenen „Siblings 5“ zeigen sich größere Unterschiede. Das intestinale Mikrobiom nicht verwandter Frühgeborene besteht aus unterschiedlichen Bakterien, in unterschiedlicher anteilmäßiger Verteilung und mit Veränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Hier lässt sich eine hohe Ähnlichkeit und geringe phylogenetische Distanz bzw. UniFrac-Distanz zwischen den einzelnen Zwillingen und eine hohe phylogenetische Distanz und damit hohe beta-Diversität gegenüber nicht verwandten Frühgeborenen vermuten.

4.3.2 UniFrac-Distanz von Geschwistern und Nicht-Geschwistern

Um die bereits vermutete geringere UniFrac-Distanz zwischen Geschwistern im Vergleich zu nicht verwandten Frühgeborenen zu untersuchen, wurden die log10-transformierten UniFrac-

Distanzen aufgrund nicht normalverteilter Daten mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests verglichen.

Zunächst erfolgte eine Analyse über den gesamten untersuchten Zeitraum hinweg. In dieser zeigte die Gruppe „Geschwister“ („Siblings“) eine signifikant niedrigere UniFrac-Distanz ($W = 24350$, $p \leq 0,001$), als die Gruppe „Nicht Geschwister“ („Not Siblings“). Die Effektstärke r deutet mit 127,83 auf einen großen Effekt hin. Dies ist *Abbildung 15* in den Boxplots dargestellt. Jeder schwarze Punkt symbolisiert die log10-transformierte UniFrac-Distanz zwischen „Geschwistern“ (rote Box) und „nicht Geschwistern“ (blaue Box). Außerdem sind in der Grafik die jeweiligen Mediane, IQR und der p-Wert abgebildet.

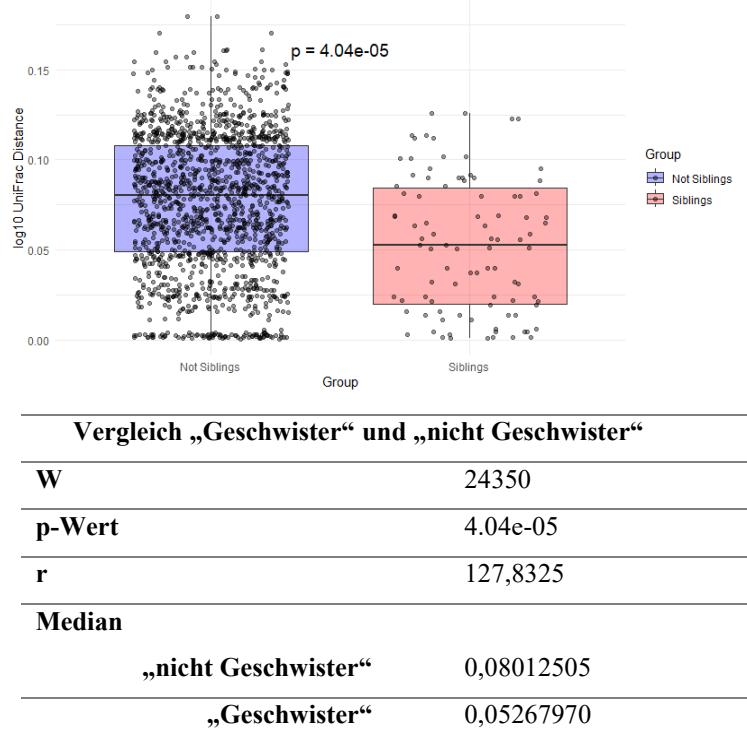
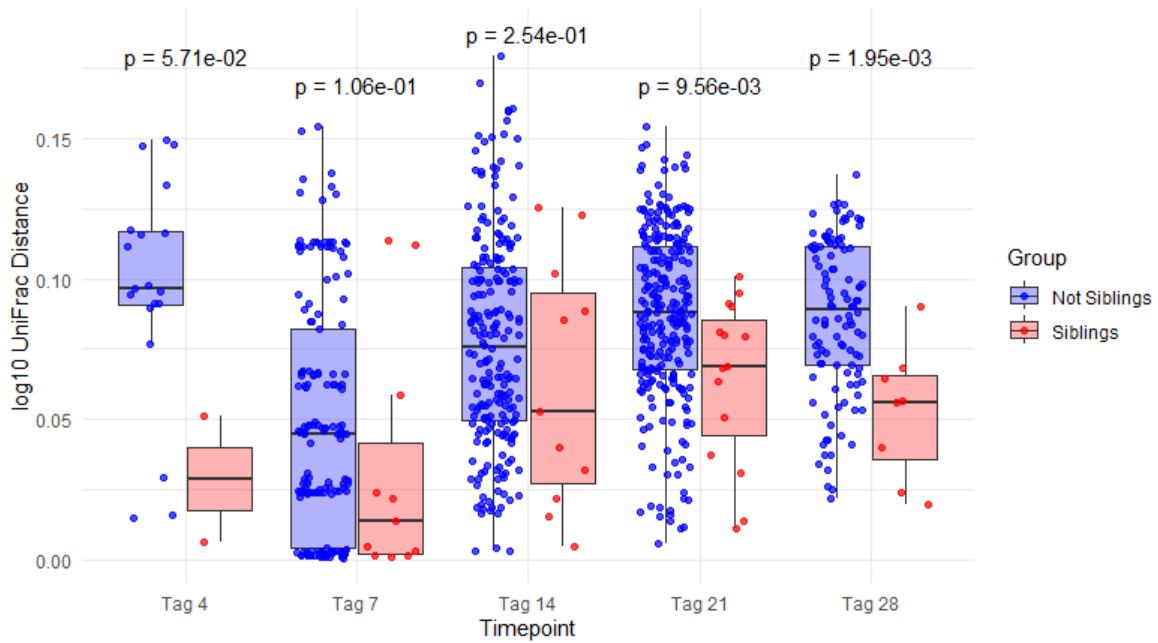


Abbildung 15 Boxplots des Wilcoxon-Tests der log10-transformierten UniFrac-Distanzen der Gruppen „Geschwister“ und „nicht Geschwister“ mit Angabe der Teststatistik W , p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen.

Im Folgenden wurden die UniFrac-Distanzen zwischen „Geschwistern“ und „nicht Geschwistern“ zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (s. *Abbildung 16*). Hier zeigte sich ab „Tag 21“ ebenfalls eine signifikant geringere UniFrac-Distanz zwischen Geschwistern ($W = 2737$, p-Wert = 0,0096) mit einer großen Effektstärke ($r = 43,74$). Auch an Tag 28 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Geschwister“ und „nicht Geschwister“ ($W = 743$, p-Wert = 0,0019).



| | Tag 4 | Tag 7 | Tag 14 |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| W | 35 | 1137 | 1457 |
| P-Wert | 0,05714 | 0,1063 | 0,2544 |
| Effektstärke r | 5,67775 | 27,10217 | 29,61774 |
| Median | | | |
| „nicht Geschwister“ | 0,09670616 | 0,04488931 | 0,07575927 |
| „Geschwister“ | 0,02849922 | 0,01387573 | 0,05267970 |

| | Tag 21 | Tag 28 |
|-----------------------|-----------|------------|
| W | 2737 | 743 |
| P-Wert | 0,009561 | 0,001946 |
| Effektstärke r | 43,74304 | 16,26011 |
| Median | | |
| „nicht Geschwister“ | 0,0878675 | 0,08907754 |
| „Geschwister“ | 0,0687953 | 0,05601547 |

Abbildung 16 Boxplots des Wilcoxon-Tests der log10-transformierten UniFrac-Distanzen der Gruppen „Geschwister“ und „nicht Geschwister“ zu auf der x-Achse beschriebenen Zeitpunkten mit Angabe der Teststatistik W, p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen.

In *Abbildung 16* sind die Gruppen „Geschwister“ und „Nicht Geschwister“ als Boxplots zu den jeweiligen untersuchten Zeitpunkten (4, 7, 14, 21 und 28 Tage) visualisiert. Die blau gefärbten Boxen stellen die Gruppe der „Nicht Geschwister“, die rot gefärbten Boxen die der „Geschwister“ dar. Oberhalb der Boxen ist der über den Wilcoxon-Rangsummen-Test berechnete p-Wert als Maß für die Signifikanz dargestellt.

Ein großer Unterschied der UniFrac-Distanz zwischen den Gruppen „Geschwister“ und „Nicht Geschwister“ bestätigt die Hypothese, dass die beta-Diversität zwischen Geschwistern geringer als zu nicht verwandten Frühgeborenen ist. Jedoch muss man einschränkend feststellen, dass dies erst ab „Tag 21“ statistisch nachweisbar ist.

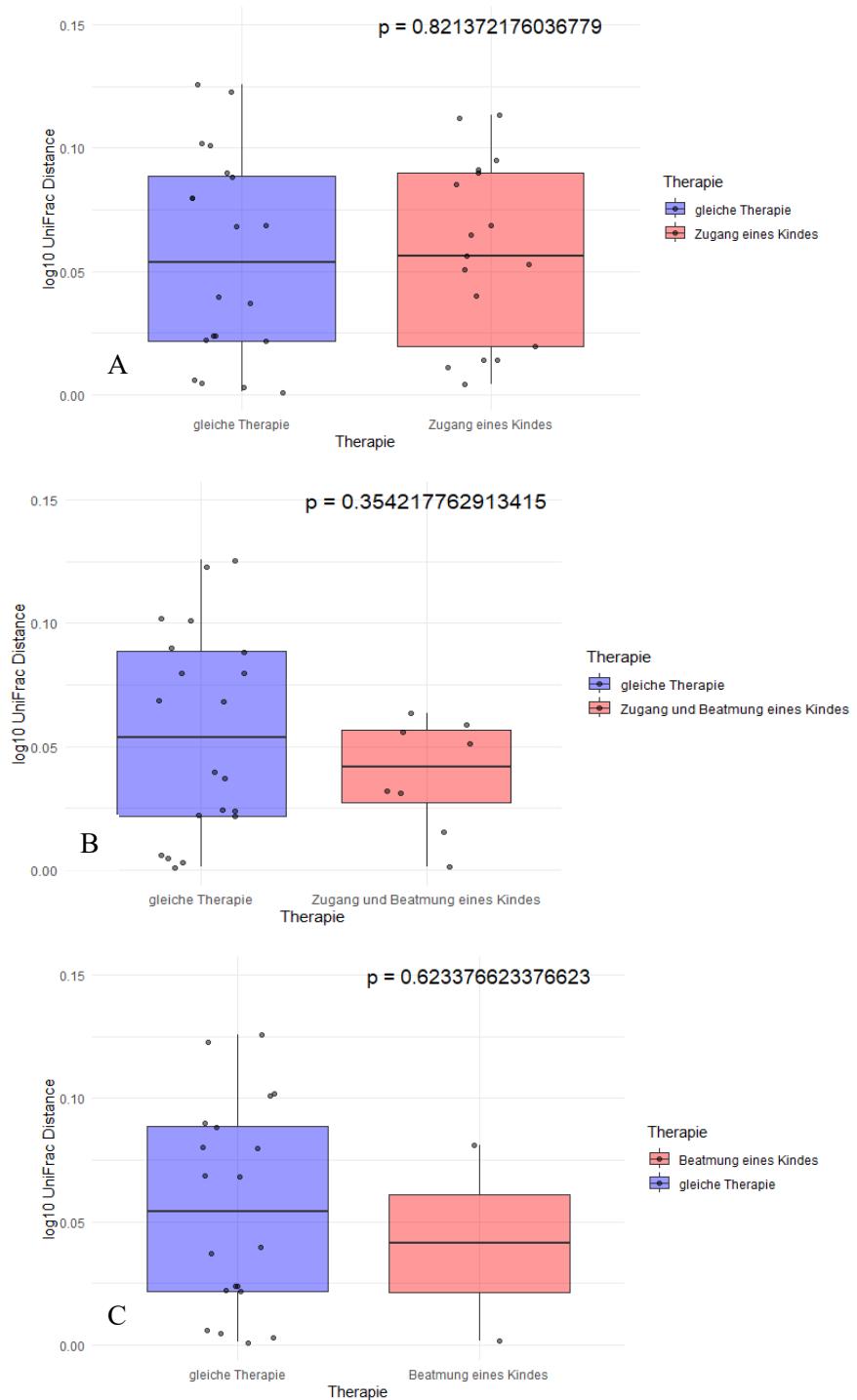
4.4 Einfluss unterschiedlicher Therapien auf die beta-Diversität

Um der Frage nachzugehen, ob und inwiefern unterschiedliche Therapien das intestinale Mikrobiom von Frühgeborenen beeinflussen, wurden die Zwillinge und Drillinge in Kategorien eingeteilt: in keine relevanten Unterschiede der Behandlung, im Folgenden als „gleich“ bezeichnet. In die Kategorie „Zugänge“, welche sich durch eine unterschiedlich lange Dauer der Behandlung mittels zentraler Zugänge (Silastik, NAK, NVK) kennzeichnet. Außerdem in die Kategorien „Beatmung“ und „Beatmung und Zugänge“, welche sich durch unterschiedlich lange Dauer invasiver Beatmung, bzw. unterschiedlich lange Dauer invasiver Beatmung und zentraler Zugänge kennzeichnet. Die Bewertung dieser Fragestellung war bereits *a priori* aufgrund der sehr geringen Fallzahl (s. *Tabelle 15*) in den einzelnen Subgruppen nur sehr eingeschränkt möglich. Die Berechnung der Unterschiede der UniFrac-Distanz oben genannter Kategorien folgt in diesem Abschnitt. Es ließ sich allerdings kein Ergebnis feststellen, wodurch die Hypothese „unterschiedliche Therapie führt zu hoher UniFrac-Distanz“ mit diesem Patientenkollektiv nicht bestätigt werden kann.

| | gleich | Zugänge | Beatmung + Zugänge | Beatmung |
|--------|--------|---------|--------------------|----------|
| Anzahl | N = 5 | N = 4 | N = 2 | N = 1 |

Tabelle 15 Anzahl der Geschwister innerhalb einer Kategorie zum Vergleich unterschiedlicher Einflussgrößen

Aufgrund nicht vorliegender Normalverteilung wurden mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests die log10-transformierten UniFrac-Distanzen zwischen den Geschwistern mit gleicher Therapie und den unterschiedlich behandelten Geschwistern untersucht. Dargestellt sind die nach unterschiedlichen Therapieformen gefilterten Analysen in Boxplots in *Abbildung 17*. Beim Vergleich zwischen gleich behandelten Geschwistern und der Beatmung eines einzelnen Zwilling ließ sich keine signifikante Differenz der UniFrac-Distanz feststellen. Allerdings ist die Populationsgröße mit lediglich einem Zwillingpaar, wovon eines deutlich länger beatmet wurde, auch sehr gering. Auch die anderen Therapieformen (Liegendauer zentraler Zugänge und Liegedauer zentraler Zugänge kombiniert mit invasiver Beatmung) zeigten keine Differenz der UniFrac-Distanz. Somit lässt sich anhand dieser Population keine Zunahme der UniFrac-Distanz infolge unterschiedlicher Therapie nachweisen.



| | Zugänge | Beatmung + Zugänge | Beatmung |
|------------------------|-------------|--------------------|-------------|
| W | 162 | 99 | 15 |
| p-Wert | 0,8214 | 0,3542 | 0,6234 |
| Effektstärke r | 0,05048605 | 0,2071581 | 0,1046966 |
| Median | | | |
| „gleiche Therapie“ | 0,053887262 | 0,053887262 | 0,05388726 |
| „Therapieunterschiede“ | 0,05627440 | 0,04152892 | 0,041253702 |

Abbildung 17 Boxplots des Wilcoxon-Tests unterschiedlich (A: Zugang nur eines Kindes, B: Zugang und Beatmung eines Kindes, C: Beatmung eines Kindes) sowie gleich behandelter Geschwister mit Angabe der Teststatistik W, p-Wert, Effektstärke r und Angabe der Mediane beider Gruppen.

5 Diskussion

Mit der NeoMuniCH-Studie wurde die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Frühgeborenen, welche vor 32+0 SSW entbunden wurden mittels quantitativer DNA-Analyse untersucht. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Entwicklung der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms sowie die parallele Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen, also die beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms und der Einfluss unterschiedlicher Therapien auf das intestinale Mikrobiom analysiert. Dabei basieren die Analysen dieser Arbeit auf einer Untergruppe der NeoMuniCH Kohorte unter Einschluss aller bis zum 30.11.2017 geborenen Zwillinge und Drillinge.

5.1 Diversität des intestinalen Mikrobioms im zeitlichen Verlauf

Mittels DNA-Extraktion, Sequenzierung und statistischen Analysen konnten wir ausgehend von Stuhlproben von Frühgeborenen zeigen, dass die alpha-Diversität des intestinalen bakteriellen Mikrobioms bei Frühgeborenen im ersten untersuchten Zeitraum (Tage 0 - 40) mit zunehmendem Alter ansteigt (s. dazu *Abbildung 13A*). Eine signifikante Zunahme der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms im Laufe der Zeit konnten zahlreiche Studien bestätigen. (106-109)

Im zweiten von uns untersuchten Zeitraum (Tage 41 – 100) beobachteten wir entgegen der gängigen Meinung eine Stagnation der alpha-Diversität (s. dazu *Abbildung 13B*). Patel et al. sahen in den ersten Lebenswochen sogar eine Abnahme des Shannon-Indexes des intestinalen Mikrobioms von Frühgeborenen, wobei ihre Messmethode (Rektalabstriche) die Vergleichbarkeit zu unserer Studie einschränkt. (110) Wir vermuten, dass die Stagnation durch die lange Hospitalisierung mit und aufgrund häufiger Interventionen und durch das über die Zeit kleiner werdende Patientenkollektiv (die meisten Studienteilnehmer waren zu diesem Zeitpunkt bereits entlassen, s. *Abbildungen 9 und 10*) bedingt ist. Passend dazu stellten Gasparrini et al. fest, dass die alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms nahezu Reifgeborener rascher zunehme als das intestinale Mikrobiom Frühgeborener bzw. Frühgeborener mit mehreren Zyklen Antibiotikatherapien. Insbesondere Frühgeborene mit mehrfachen Zyklen Antibiotikatherapien bräuchten nahezu 21 Monate, bis sich ihr intestinales Mikrobiom dem von nahezu Reifgeborenen angleiche. (106, 107)

Neben der Veränderung der alpha-Diversität konnten wir Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung im Laufe der Zeit beobachten. Anfangs dominierten *Streptokokken*,

Staphylokokken, *Enterokokken* und *Enterobakterien*. Im weiteren Verlauf beobachteten wir eine Zunahme von *Bifidobakterien*, *Enterokokken*, *Escherichia-Shigella*. Ähnliche Muster wurden auch in anderen Studien festgestellt (106-108, 110). Insgesamt seien überwiegend *Bacilli*, *Gammaproteobacteria* und *Clostridia* im intestinalen Mikrobiom Frühgeborener vorhanden (111). Ein Wechsel von *Bacilli* zu *Clostridia* im Laufe der Zeit sei signifikant (112). Diese Wechsel der Besiedelung des intestinalen Mikrobioms werden vermutlich durch verschiedene Faktoren beeinflusst: Denkbar sind die enterale Nahrungszufuhr, insbesondere das orale Zuführen von Muttermilch (108, 113, 114), die Genetik (115), das Immunsystem des Frühgeborenen (110), bereits vorhandene Bakterien, welche als Wächter fungieren (116) oder externe Einflüsse wie Antibiotika (106, 108, 114).

Mit dieser Fragestellung konnte die Zunahme der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms von Frühgeborenen bestätigt werden. Äußere Einflüsse, die klinische Relevanz und der weitere Verlauf mit zunehmendem Alter sollten zukünftig analysiert werden.

5.2 Parallele Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drillingen

Durch die parallele Darstellung der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von frühgeborenen Zwillingen und Drillingen konnte die beta-Diversität analysiert werden. Lim et al. hatten bereits eine geringere UniFrac-Distanz zwischen intestinalen Mikrobiota von neugeborenen Zwillingen im Vergleich zu nicht verwandten Neugeborenen festgestellt (109). Wir wollten diese Hypothese einer geringeren beta-Diversität innerhalb von Geschwistergruppen nun an Frühgeborenen überprüfen. Mittels Berechnung des UniFrac-Maßes wurden die phylogenetischen Distanzen zwischen einzelnen Stuhlproben und innerhalb der Geschwistergruppen untersucht. An den Tagen 21 und 28 nach Geburt zeigte sich eine signifikant geringere UniFrac-Distanz zwischen den intestinalen Mikrobiota von Geschwistern im Vergleich zu nicht verwandten Frühgeborenen ($p < 0,05$, Vgl. Abbildung 16).

Interessanterweise zeigte sich in den ersten Wochen keine signifikante Differenz der UniFrac-Distanz. Dies könnte durch mehrere Faktoren erklärt werden. Als mögliche Ursachen sehen wir zum einen die Gabe von Antibiotika, welche alle Frühgeborenen in den ersten Tagen erhalten haben. (94) Antibiotika verringern die Anzahl an Bakterien und verändern die Diversität des intestinalen Mikrobioms signifikant (113). Generell zeigt sich bei frühen und sehr kleinen Frühgeborenen eine geringere und langsamere Besiedelung des Darms mit Bakterien (94). Wenige Tage nach Geburt sei das intestinale Mikrobiom zudem individueller und gleiche sich erst im Laufe der Zeit durch den Einfluss verschiedener Pathogene untereinander an (110).

Ab ca. 3 Wochen nach Geburt der Frühgeborenen zeigte sich in unserer NeoMunICH-Studie eine signifikant geringere UniFrac-Distanz zwischen intestinalem Mikrobiom von Zwillingen im Vergleich zu nicht verwandten Frühgeborenen. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen: Die Geburt von Zwillingen erfolgt meist über denselben Geburtsmodus. Laut Studien beeinflusst der Geburtsmodus die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms, wobei vaginale Geburten andere Besiedlungsmuster als Kaiserschnitte begünstigen. (88, 113) Zwillinge waren zudem vor der Geburt derselben schwangerschaftsbeendenden Komplikation ausgesetzt. Beispielsweise haben Frühgeborene nach Chorioamnionitis der Mutter laut Drell et al. eine signifikant höhere Shannon-Diversität des intestinalen Mikrobioms als andere Frühgeborene (107). Auch die postpartalen Komplikationen (Infektionen, notwendige Interventionen) bei frühgeborenen Zwillingen sind häufig ähnlich und können möglicherweise die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beeinflussen. Insbesondere zeitgleiche Infektionen sind leider auch eine mögliche Folge unzureichender Hygiene-Maßnahmen und Verbreitung von Pathogenen zwischen einzelnen Patienten (88, 117). Zwillinge haben Kontakt zu denselben Eltern und werden häufig von der gleichen Pflegekraft versorgt. Deren Hautmikrobiom kann auch das intestinale Mikrobiom der Frühgeborenen beeinflussen (88). Neben Umweltfaktoren könnte auch die Genetik eine entscheidende Rolle spielen. Bei einer großen Population mit 977 erwachsenen Zwillingen konnten Goodrich et al. die signifikante Ähnlichkeit des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen im Vergleich zu nicht Verwandten Individuen bestätigen. Interessant war die Beobachtung, dass sich vor allem das intestinale Mikrobiom monozygoter Zwillinge ähnlicher ist als das dizygotter Zwillinge (115). Dieser signifikante Unterschied der beta-Diversität zwischen mono- und dizygoten Zwillingen lässt vermuten, dass die Genetik eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms spielt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse eine signifikant geringere beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms zwischen frühgeborenen Zwillingen und Drilllingen im Vergleich zu nicht verwandten Frühgeborenen. Ursächlich dafür sind höchstwahrscheinlich verschiedene Umweltfaktoren und genetische Einflüsse, die in ihrer Wichtigkeit noch weiter untersucht werden sollten.

5.3 Einfluss unterschiedlicher Therapien auf die beta-Diversität

In den vergangenen Abschnitten wurden bereits einige mögliche Einflussfaktoren auf das intestinale Mikrobiom beschrieben. Für den klinischen Alltag ist vor allem die Frage des Einflusses verschiedener Therapien relevant. In dieser Arbeit bestand durch die Beschränkung auf Zwillinge und Drillinge der Vorteil der guten Vergleichbarkeit. Um den Einfluss einzelner

Faktoren zu untersuchen, haben wir nach Unterschieden der Therapien von Zwillingen bzw. Drillingen gesucht und danach selektiert. Dabei ergab sich aufgrund der sehr begrenzten Studienpopulation lediglich die Möglichkeit, den Einfluss von Beatmung sowie den Einfluss zentraler Zugänge auf das intestinale Mikrobiom zu untersuchen. Und auch diese Ergebnisse haben aufgrund der kleinen Fallzahl leider nur eine sehr begrenzte Aussagekraft.

Es zeigte sich in unserer Arbeit kein Unterschied des intestinalen Mikrobioms zwischen Zwillingen, welche ungleich beatmet wurden oder einen Unterschied in der Liegedauer von zentralen Zugängen vorweisen konnten.

Um die Auswirkungen von Beatmung zu untersuchen, versuchten Hutchinson et al, Änderungen des intestinalen Mikrobioms von Frühgeborenen durch das Absetzen von nicht-invasiver, druckkontrollierter Beatmung zu beobachten. Hier konnten sie nach der Beendigung der Beatmung eine leichte Zunahme der alpha-Diversität, sowie die Zunahme von Anaerobiern (*Bifidobacteria*, *Veillonella*) nachweisen (118). Zudem werde mit der häufig genutzten druckkontrollierten Beatmung eine Dysbiose im intestinalen Mikrobiom mit der möglichen Komplikation z.B. einer NEC begünstigt (118). Dieses Ergebnis konnten wir mit unserer Arbeit nicht bestätigen. Wir sollten es mit einer größeren Studienpopulation oder der nicht ausschließlichen Betrachtung der UniFrac-Distanz erneut untersuchen, um möglicherweise ähnliche Ergebnisse zu finden.

Zudem haben wir die Auswirkung von zentralen Zugängen auf das intestinale Mikrobiom untersucht, wo sich in unserer Arbeit kein signifikanter Zusammenhang gezeigt hat. Eine durch *Enterobacteriaceae* verursachte Sepsis sei allerdings u.a. mit dem Liegen mehrerer zentraler Zugänge assoziiert (52). Wang et al. haben gezeigt, dass eine Überrepräsentation von *Enterobacteriaceae* im intestinalen Mikrobiom gehäuft mit einer Katheter-assozierten Sepsis auftrete (119). In einigen Fällen seien in der Blutkultur auch Bakterien nachgewiesen worden, welche ähnliche Muster wie das intestinale Mikrobiom zum Zeitpunkt der Infektion aufwiesen (52). Dies verdeutlicht einen möglichen Zusammenhang zwischen intestinalem Mikrobiom und lebensbedrohlichen Komplikationen. Ein gutes Verständnis der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms ist daher essenziell für eine gute Versorgung von Frühgeborenen.

Wie in unserer Arbeit gibt es auch zahlreiche Hinweise, welche einen weitaus geringeren Effekt klinischer Variablen auf das intestinale Mikrobiom vermuten lassen als bisher angenommen. Vielmehr sei laut La Rosa et al. das postkonzeptionelle Alter entscheidend für die Prävalenz bestimmter Bakterien im intestinalen Mikrobiom (112). Einig sind sich die meisten Studien, dass Antibiotika die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms beeinflussen (111). Eine Therapie mit Antibiotika sei die einzige klinische Therapie, welche signifikant die alpha-

Diversität des intestinalen Mikrobioms beeinflusse (106). Greenwood et al. wiesen eine Abnahme der mikrobiellen Diversität mit der Einnahme von Antibiotika nach. Dieser Effekt sei bei Frühgeborenen, welche weniger als 5 Tage Antibiotika bekamen, jedoch bis zur dritten Woche weitestgehend reversibel (120). Arboleya et al. stellten interessanterweise fest, dass die prophylaktische peripartale Antibiotika-Therapie der Mutter in den ersten Tagen einen höheren Einfluss auf das intestinale Mikrobiom habe als die Antibiotika-Therapie des Kindes postpartal (94). Somit scheint der Effekt von Antibiotika auf das intestinale Mikrobiom zwar messbar zu sein, aber eventuell von geringerer klinischer Relevanz als bisher angenommen.

In unserer Arbeit konnten wir durch die untersuchten klinischen Einflüsse „zentrale Zugänge“ und „Beatmung“ bzw. eine Kombination der beiden keine Auswirkung auf das intestinale Mikrobiom Frühgeborener nachweisen. In zukünftigen Studien sollte die Bedeutung verschiedener klinischer Einflussfaktoren auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms weiter untersucht werden.

5.4 Nekrotisierende Enterokolitis

Glücklicherweise gab es im Patientenkollektiv dieser vorläufigen Analyse keine Fälle von Nekrotisierender Enterokolitis (NEC). Über den direkten Vergleich von betroffenen Zwillingen bzw. Drilllingen hätte man sich einen konkreten Hinweis auf das Entstehen der NEC erhoffen können. Im Vergleich zu den Daten der NeoM-Studie ist das Fehlen von NEC-Fällen in diesem Patientenkollektiv allerdings erstaunlich, denn dort entwickelten 7,5% der Frühgeborenen eine NEC (28 von 369 Frühgeborenen) (5). Bei absoluter Vergleichbarkeit zur NeoM-Studie wäre demnach zu erwarten gewesen, dass ein bis zwei Frühgeborenen dieser vorläufigen Analyse daran erkranken.

Mit der NeoM-Studie wurde die Hypothese bestätigt, wonach eine bakterielle Dysbalance mit Vorkommen bestimmter Spezies (*Klebsiellen*, *Clostridium perfringens*) eine NEC begünstige (5). Denkbar ist daher ein Vorbeugen der bakteriellen Dysbalance des intestinalen Mikrobioms von Frühgeborenen unter anderem durch unterschiedliches medizinisches Handeln wie Verabreichen von Muttermilch via Muttermilchbank anstelle von Säuglingsnahrung (33), restriktivem Einsatz von Antibiotika (35) oder besonders hohe Hygienestandards.

Die bakterielle Dysbalance kann auch durch weniger beeinflussbare Unterschiede des Patientenkollektivs wie geographische, ethnische und genetische Faktoren begünstigt bzw. vermieden werden. In dieser Arbeit haben wir unter anderem den genetischen Aspekt untersucht:

Die beta-Diversität innerhalb von Geschwistern war in unserem Patientenkollektiv geringer (s. Kapitel 4.3) als zu nicht-verwandten Frühgeborenen. Interessant wäre hier der Vergleich der Bakterienspezies des intestinalen Mikrobioms in den Kohorten der NeoM- und NeoMuniCH-Studienteilnehmer. Hiermit ließen sich Rückschlüsse auf den Einfluss geographischer und ethnischer Faktoren sowie auf das intestinale Mikrobiom unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen ziehen. Eine verminderte Prävalenz pathogener Spezies innerhalb der deutschen Bevölkerung wäre plausibel als Ursache für eine seltene Kontamination von Frühgeborenen in Kliniken der LMU und damit für eine geringere Inzidenz der NEC.

Aus einem besseren Verständnis der Pathogenese der NEC durch einerseits beeinflussbare Faktoren der medizinischen Behandlung (Ernährung, Medikation, Hygiene), als auch durch nicht-beeinflussbare Faktoren (Genetik, ethnischer und geographischer Hintergrund) ließe sich für jedes Frühgeborene ein individuelles Risikoprofil erstellen. Es wäre wünschenswert, davon betroffene Frühgeborene frühzeitiger zu erkennen und so schnellstmöglich einer Therapie zuzuführen, um den sonst häufig fulminanten Verlauf (33) der Erkrankung abzufangen.

5.5 Diskussion der angewandten Methoden

5.5.1 Patientenkollektiv

Die NeoMuniCH-Studie beschränkt sich auf vor 32 + 0 SSW geborene Frühgeborene. Dies hat den Vorteil einer vereinfachten Studiendurchführung. Im Vergleich zu Reifgeborenen weisen sie eine höhere Krankenhausverweildauer auf, bei unserer Studienpopulation betrug sie durchschnittlich 50,3 Tage. Durch diesen breiten Untersuchungszeitraum kann eine sehr umfangreiche Beobachtung der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms im zeitlichen Verlauf ermöglicht werden. Das Sammeln, Lagern und Untersuchen der Proben sowie das Erheben der klinischen Parameter kann während dieser Zeit durchgehend von geschultem Personal unter standardisierten Bedingungen erfolgen, sodass auf die Eltern keine zusätzliche Belastung hinzukommt und eine höhere Teilnehmerquote erzielt werden kann.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass insb. Frühgeborene mit zusätzlicher Grunderkrankung eine längere Krankenhausverweildauer haben als gesunde Frühgeborene und in unserer Studie damit überrepräsentiert sind. Zudem zeigen Frühgeborene eine weniger reife Entwicklung des intestinalen Mikrobioms und generell eine niedrigere Diversität (106). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Reifgeborene wird durch Ergebnisse wie von Lim et al, welche anhand von 8 gesunden Neugeborenen u.a. eine Zunahme der alpha-Diversität im Zeitraum der ersten zwei Jahre beobachten konnten, gestützt (109).

Durch die 13-fach höhere Wahrscheinlichkeit einer Frühgeburt bei Mehrlingsschwangerschaften im Vergleich zu Einlingsschwangerschaften, gibt es einen hohen Anteil von Mehrlingen unter Frühgeborenen. (19) Das ermöglicht die Durchführung von Studien mit Zwillingen und Drillingen und vereinfacht viele Studiendesigns, da damit direkte Kontrollpersonen vorhanden sind. In der dritten Fragestellung dieser Arbeit haben wir diesen Vorteil genutzt und Zwillinge bzw. Drillinge verglichen, bei welchen sich die Dauer der Beatmung, des Liegens von zentralen Venenkathetern oder beides unterschied.

Die Gruppe von 25 Teilnehmern ist jedoch eine sehr kleine Population, um aus diesen Ergebnissen allgemeingültige Rückschlüsse ziehen zu können. Vor allem muss berücksichtigt werden, dass das intestinale Mikrobiom der untersuchten Teilnehmer durch zahlreiche Einflussfaktoren (Medikamente, Beatmung, spezielle Ernährung) beeinflusst und verändert wurde und somit die Ergebnisse durch einzelne Störfaktoren wie bspw. eine nur bei einem Zwilling durchgeführte Antibiotika-Therapie verfälscht sein können. Es wäre sinnvoll, die

zweite Fragestellung dieser Arbeit nach den Auswirkungen unterschiedlicher Therapien anhand einer größeren Population erneut zu bearbeiten.

5.5.2 Experimentelle Untersuchung

Wir bildeten das intestinale Mikrobiom annäherungsweise über die Auswertung von Stuhlproben ab. Von Shaw et al. wurden unterschiedliche Methoden zur Darstellung des intestinalen Mikrobioms verglichen. Die exakte Methode wäre die Untersuchung von Biopsien oder Inhalten des Darmlumens. Als nicht-invasive Methode geht die Analyse von Stuhlproben mit Veränderungen der Abundanz verschiedener Bakterien einher, insgesamt ist die UniFrac-Distanz zur direkten interventionellen Abbildung des intestinalen Mikrobioms im Vergleich zu weiteren Methoden ausreichend gering. Dies bedeutet, dass eine ausreichende Ähnlichkeit zwischen den Proben besteht, so dass damit valide Ergebnisse erzielt werden können. (121) In unserem Fall stellte das Sammeln von Stuhlproben neben dem Sammeln von Abstrichen die einzigen aus ethischer Sicht vertretbaren Methoden dar.

Die gesammelten Stuhlproben wurden bei -80°C eingefroren und bis zur DNA-Extraktion gelagert. Nach weiteren Untersuchungen von Shaw et al ist dies auch über zwei Jahre mit nur geringen Veränderungen der Ergebnisse zum intestinalen Mikrobiom möglich (122).

Das experimentelle Vorgehen erfolgte über DNA-Extraktion und anschließende DNA-Sequenzierung. Dies ermöglicht im Vergleich zur früher verwendeten kulturellen Bestimmung von Bakterien die genaue Bestimmung der Diversität (123). Außerdem wurden durch die Methode der DNA-Sequenzierung zahlreiche neue, bis dahin unkultivierte Bakterien gefunden, was große Auswirkungen auf die Genauigkeit der Forschung hatte (62). Daher stellt die DNA-Sequenzierung die beste aktuell bekannte Methode dar, um bakterielle Kulturen abzubilden.

Die Entscheidung für das experimentelle Vorgehen mittels des FastDNA SPIN Kit for Soil fiel, da die NeoMuniCH-Studie in Anlehnung an die NeoM-Studie geplant wurde und eine gute Vergleichbarkeit der beiden Studienergebnisse hergestellt werden sollte. Auch wenn von Shaw et al festgestellt wurde, dass jegliche Veränderung durch bspw. eine andere die Extraktion durchführende Person mit Veränderungen der Ergebnisse, insb. der beta-Diversität einhergeht, ist durch die einheitliche Durchführung und Arbeit eine Vergleichbarkeit gewährleistet (122).

5.6 Ausblick

Um diese Ergebnisse zu validieren und im klinischen Alltag eine Relevanz zu finden, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei wäre es wünschenswert, ähnliche Studien an deutlich umfangreicheren Populationen durchzuführen. Denkbar wäre insb. bei Frühgeborenen die Beobachtung der alpha-Diversität vor und nach der Diagnose einer NEC um Rückschlüsse auf deren Entstehen und ggf. Prävention (5) zu gewinnen. Auch in Anlehnung an die zweite Fragestellung dieser Arbeit lassen sich interessante Aspekte weiterverfolgen, z.B. zu der Rolle der Genetik und familiären Prägung in der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms. In einer größeren Population könnte in Anlehnung an die dritte Fragestellung dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss bspw. unterschiedliche Antibiotika oder die Ernährung mittels Muttermilch bzw. Frauenmilchspende auf die alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms haben. (94) Eine Kombination der zweiten und dritten Fragestellung dieser Arbeit nach den äußeren Einflüssen und der Genetik auf die beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms würde einen entscheidenden Beitrag zum tiefergehenden Verständnis der Prägung und Entwicklung des intestinalen Mikrobioms liefern.

Denkbar wäre vor dem Hintergrund der bereits ausführlich dokumentierten ersten Wochen der Frühgeborenen auch eine Fortführung der Studie über die ersten Lebensjahre. Dabei wäre eine genaue Dokumentation der Ernährung, der Medikamente und sonstiger Einflussfaktoren essenziell. Das Sammeln von Proben zur Untersuchung könnte in gewissen Abständen, z.B. monatlich im Rahmen von klinischen Kontrollen beim niedergelassenen Kinderarzt erfolgen. Auch spätere Untersuchungen, im Abstand von einigen Jahren, könnten bei einer zeitgleichen Analyse klinischer Parameter interessante Hinweise auf langfristige Auswirkungen der Frühgeburtlichkeit und der damit verbundenen intensivmedizinischen Therapien auf das Mikrobiom liefern, insbesondere bei einem Vergleich zu gesunden, ehemals reifgeborenen Kindern.

Mit einer großen Population gesunder reifgeborener Säuglinge würden insb. langfristig angelegte Studien einen großen Erkenntnisgewinn liefern. Besondere Bedeutung für das Verständnis der Entstehung und Prävention verschiedener Volkskrankheiten wie Allergien, der Veranlagung zu Übergewicht und der Entwicklung von Asthma sowie chronischer Atemwegserkrankungen hätte eine Untersuchung der alpha- und beta-Diversität des intestinalen Mikrobioms gesunder reifgeborener Säuglinge (74, 89, 124, 125).

6 Zusammenfassung

Es ist erwiesen, dass das intestinale Mikrobiom eine entscheidende Rolle in der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen spielt. Es besteht außerdem der Verdacht, dass die für Frühgeborene sehr gefährliche Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) durch das intestinale Mikrobiom in ihrer Entstehung beeinflusst aber auch vorhergesagt werden kann. Um unter anderem diesem Zusammenhang nachzugehen und vor allem um die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms und der Diversität des intestinalen Mikrobioms tiefergehend zu verstehen, wurde diese Arbeit durchgeführt.

Das intestinale Mikrobiom konnten wir detailliert abbilden, indem wir Stuhlproben von Frühgeborenen mittels DNA-Sequenzierung untersuchten. Parallel dazu erhoben wir klinische Parameter der Frühgeborenen, welche im Nachhinein mit den Ergebnissen der Sequenzierung in Verbindung gebracht werden konnten. Um weiterführende Studien zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl klinischer Parameter wie die Ernährung, die medikamentöse Therapie, Beatmung und den klinischen Zustand der Frühgeborenen betreffend, dokumentiert.

Wir beobachteten keinen Fall einer NEC in dem genannten Untersuchungszeitraum. Es zeigte sich in den ersten Lebenswochen eine eindeutige Zunahme der alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms mit zunehmendem Alter der Frühgeborenen. Ebenso ließ sich eine Parallelität der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms von Zwillingen und Drilllingen beobachten. Geschwister zeigten untereinander eine signifikant geringere phylogenetische Distanz des intestinalen Mikrobioms. Klinische Einflüsse, wie z.B. Unterschiede in der invasiven Beatmung oder Dauer von Therapien mittels zentraler Zugänge ließen in unseren Untersuchungen keine Veränderungen des intestinalen Mikrobioms erkennen.

Da in anderen Untersuchungen Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung des intestinalen Mikrobioms durch ähnliche Einflussfaktoren erlangt wurden, wäre eine erneute Durchführung unserer Studie mit einer größeren Population wünschenswert. Interessant wäre im Hinblick auf die deutlich reduzierte Inzidenz der NEC in München im Vergleich zur NeoM-Studie am Imperial College in London auch der Vergleich der Bakterienspezies des intestinalen Mikrobioms der NeoM- und NeoMuniCH-Kohorten und die Korrelation mit unterschiedlichen sozioökonomischen, ethnischen und geographischen Faktoren. Damit ließe sich ein besseres Verständnis individueller protektiver Faktoren und Risikofaktoren erlangen, welche eine risikoadaptierte, auf die einzelnen Frühgeborenen zugeschnittene medizinische Behandlung erleichtern würden.

7 Summary

The intestinal microbiome plays an important role in pathogenesis of various diseases. Additionally, there are indications that necrotizing enterocolitis (NEC), which is often fatal for premature babies, may be influenced and predicted by the intestinal microbiome. This thesis aims to further understand the correlation of the microbiome and NEC with a special focus on the development and diversity of the intestinal microbiome.

We mapped the intestinal microbiome in a detailed manner through DNA-sequencing of stool-samples of premature babies. At the same time, we collected clinical parameters that can be related with the data of the sequencing. To enable further studies, further clinical parameters such as nutrition, drug therapy, ventilation, and clinical condition of the premature babies were documented.

We did not observe any cases of NEC during the data-collection for this paper. During the first weeks of life, we could see an increase in alpha-diversity of the intestinal microbiome. At the same time, we observed a parallel development of the intestinal microbiome in twins and triplets. Siblings had a significant lower phylogenetic distance of the intestinal microbiome. Therapies such as invasive ventilation or central lines did not lead to any statistical differences in the intestinal microbiome.

Due to indications from other studies that clinical factors may influence the intestinal microbiome, a following study with a greater population would hence be desirable. Looking at the discrepancy of NEC-Incidence in Munich compared to NeoM-Study at Imperial College in London, a comparison of bacterial species and a correlation with socio-economic, ethnic and geographic factors would be interesting. This would yield a better understanding of individual protective and risk factors which would allow for more risk-adapted and personalized medical treatments.

8 Literaturverzeichnis

1. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23.
2. Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist.* 2001;15:8.
3. Lederberg J. Das World Wide Web der Mikrobiologie: Project Syndicate; 2000 [02.09.2021]. Available from: <https://www.project-syndicate.org/commentary/microbiology-s-world-wide-web/german>.
4. PubMed. Results by year 2018 [03.07.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=microbiome>.
5. Sim K, Shaw AG, Randell P, Cox MJ, McClure ZE, Li MS, Haddad M, Langford PR, Cookson WO, Moffatt MF, Kroll JS. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clinical Infectious Diseases.* 2015;60(3):389-97.
6. Krollner B, Krollner D. ICD-Code 2018 [03.07.2019]. Available from: <http://www.icd-code.de/icd/code/P07.-.html>.
7. Raju TNK, Buist AS, Blaisdell CJ, Moxey-Mims M, Saigal S. Adults born preterm: a review of general health and system-specific outcomes. *Acta Paediatrica.* 2017;106(9):1409-37.
8. Nilsson PM, Ignell C. Health consequences of premature birth revisited - what have we learned? *Acta Paediatr.* 2017;106(9):1378-9.
9. Luu TM, Katz SL, Leeson P, Thébaud B, Nuyt A-M. Preterm birth: risk factor for early-onset chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal.* 2016.
10. Genzel-Boroviczény O, Roos R. Checkliste Neonatologie: Thieme; 2015.
11. WHO. ICD-10-WHO Version 2013 2013 [cited 2018]. Available from: <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-who/kodesuche/onlinefassungen/htmlamtl2013/zusatz-definitionen.html>.
12. StatistischesBundesamt, (Destatis). Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 Gesundheitsberichterstattung des Bundes2017 [12.02.18]. Available from: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_10/4/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_38/D.946/13397.
13. StatistischesBundesamt, (Destatis). Mehr Geburten und weniger Sterbefälle im Jahr 2016 2017 [12.02.2018]. Available from: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/11/PD17_408_126.html;jsessionid=E24F4FDC80FCD9E4F7D44C7B148CD80B.InternetLive1.
14. StatistischesBundesamt, (Destatis). Bevölkerung 2018 [Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Indikatoren/LangeReihen/Bevoelkerung/lrbev04.html>]

15. Ahumada-Barrios ME, Alvarado GF. Risk Factors for premature birth in a hospital. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2016;24.
16. Leneuve-Dorilas M, Favre A, Carles G, Louis A, Nacher M. Risk factors for premature birth in French Guiana: the importance of reducing health inequalities. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Socie*. 2017;1-9.
17. Xu H, Dai Q, Xu Y, Gong Z, Dai G, Ding M, Duggan C, Hu Z, Hu FB. Time trends and risk factor associated with premature birth and infants deaths due to prematurity in Hubei Province, China from 2001 to 2012. *BMC pregnancy and childbirth*. 2015;15:329.
18. Lampert T, Hagen C, Heizmann B. *Gesundheitliche Ungleichheit bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. Robert Koch Institut. 2010.
19. Weichert A, Weichert TM, Bergmann RL, Henrich W, Kalache KD, Richter R, Neymeyer J, Bergmann KE. Factors for Preterm Births in Germany - An Analysis of Representative German Data (KiGGS). *Geburtshilfe Frauenheilkunde*. 2015;75(8):819-26.
20. Ouattara A, Ouedraogo CM, Ouedraogo A, Lankoande J. Factors associated with preterm birth in an urban African environment: A case-control study at the University Teaching Hospital of Ouagadougou and Saint Camille Medical Center. *Medecine Et Sante Tropicales*. 2015;25(3):296-9.
21. Poets C, Bohnhorst B, Roth B. *Therapie idiopathischer Apnoen, Bradykardien und Hypoxämien bei Frühgeborenen*. AWMF Leitlinien-Register. 2014.
22. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*. 2013;106-107:1-16.
23. Bührer C, Felderhoff-Müser U, Kribs A, Roll C, Völkner A, Gembruch U, Hecher K, Kainer F, Maier RF, Vetter K, Krones T, Lipp V, Steppat S, Wirthl H-J. *Frühgeborene an der Grenze der Lebensfähigkeit*. AWMF online. 2014.
24. Doyle LW, Kitchen WH, Ford GW, Rickards AL, Kelly EA. Antenatal steroid therapy and 5-year outcome of extremely low birth weight infants. *Obstetrics & Gynecology*. 1989;73(5 Pt 1):743-6.
25. Ball G, Aljabar P, Nongena P, Kennea N, Gonzalez-Cinca N, Falconer S, Chew ATM, Harper N, Wurie J, Rutherford MA, Counsell SJ, Edwards AD. Multimodal image analysis of clinical influences on preterm brain development. *Annals of Neurology*. 2017;82(2):233-46.
26. Koletzko B. *Kinderheilkunde und Jugendmedizin* 2004.
27. Morrison J. Twin gestation and premature birth. *Journal of Perinatology*. 2005;25(1):1-3.
28. Bundesamt S. *Statistisches Jahrbuch - Internationales*. Statistisches Jahrbuch. 2017.
29. AQUA. *NEO – Neonatologie Qualitätsindikatoren*. Bundesauswertung zum

Erfassungsjahr 2014. 2015.

30. Eichenwald EC, Stark AR. Management and Outcomes of Very Low Birth Weight. *The New England Journal of Medicine*. 2008;358(16):1700-11.
31. Pohlandt F, Genzel-Boroviczény O, Heger A, Schweinitz Dv, Mihatsch W, Roll C, Schmittenbecher P, Ure B, Urlesberger B, K. Waag, Zimmer KP. Nekrotisierende Enterokolitis (NEK). *Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin - AWMF Leitlinien Register*. 2011.
32. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2007;196(2):147 e1-8.
33. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364(3):255-64.
34. Vongbhatit K, Underwood MA. Prevention of Necrotizing Enterocolitis Through Manipulation of the Intestinal Microbiota of the Premature Infant. *Clinical Therapeutics*. 2016;38(4):716-32.
35. Alexander VN, Northrup V, Bizzarro MJ. Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics*. 2011;159(3):392-7.
36. Kalhan SC, Wilson-Costello D. Prematurity and programming: contribution of neonatal Intensive Care Unit interventions. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2013;4(2):121-33.
37. WHO. Infant and young child nutrition. Provisional agenda item 1310. 2002;A55/15.
38. Ziegler EE. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;58 Suppl 1:8-18.
39. Corpeleijn WE, Vermeulen MJ, Akker CHvd, Goudoever JBv. Feeding very-low-birth-weight infants: our aspirations versus the reality in practice. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;58 Suppl 1:20-9.
40. Meyer S, Schondorf D, Butté M. Feeding regimens in VLBW infants. *Early human development*. 2014;90(8):407-8.
41. Sisk PM, Lovelady CA, Gruber KJ, Dillard RG, O'Shea TM. Human milk consumption and full enteral feeding among infants who weigh \leq 1250 grams. *Pediatrics*. 2008;121(6):e1528-33.
42. Haschke F, Haiden N, Detzel P, Yarnoff B, Allaire B, Haschke-Becher E. Feeding patterns during the first 2 years and health outcome. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2013;62 Suppl 3:16-25.
43. Bentsen MH, Markestad T, Øymar K, Halvorsen T. Lung function at term in extremely preterm-born infants: a regional prospective cohort study. *British medical journal*. 2017;7.

44. Henderson-Smart DJ. The effect of gestational age on the incidence and duration of recurrent apnoea in newborn babies. *Australian paediatric journal*. 1981;17(4):273-6.
45. Jenni OG, von Siebenthal K, Wolf M, Keel M, Duc G, Bucher HU. Effect of Nursing in the Head Elevated Tilt Position (15°) on the Incidence of Bradycardic and Hypoxemic Episodes in Preterm Infants. *Pediatrics*. 1997;100(622).
46. Stenson BJ, Tarnow-Mordi WO, Darlow BA, Simes J, Juszczak E, Askie L, Battin M, Bowler U, Broadbent R, Cairns P, Davis PG, Deshpande S, Donoghoe M, Doyle L, Fleck BW, Ghadge A, Hague W, Halliday HL, Hewson M, King A, Kirby A, Marlow N, Meyer M, Morley C, Simmer K, Tin W, Wardle SP, Brocklehurst P. Oxygen saturation and outcomes in preterm infants. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2094-104.
47. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W. Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity. *The New England Journal of Medicine*. 2006.
48. Gortner L, Möller J, Reiss I. Akutes, nicht obstruktives Lungenversagen (ARDS/ALI) im Kindesalter. *AWMF online*. 2011.
49. Roberts CT, Owen LS, Manley BJ, Froisland DH, Donath SM, Dalziel KM, Pritchard MA, Cartwright DW, Collins CL, Malhotra A, Davis PG. Nasal High-Flow Therapy for Primary Respiratory Support in Preterm Infants. *The New England Journal of Medicine*. 2016;375(12):1142-51.
50. Tiffany KF, Burke BL, Collins-Odoms C, Oelberg DG. Current Practice Regarding the Enteral Feeding of High-Risk Newborns With Umbilical Catheters In Situ. *Pediatrics*. 2002;112.
51. Branum AM, Schoendorf KC. Changing patterns of low birthweight and preterm birth in the United States, 1981-98. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2002;16(1):8-15.
52. Shaw AG, Sim K, Randell P, Cox MJ, McClure ZE, Li MS, Donaldson H, Langford PR, Cookson WO, Moffatt MF, Kroll JS. Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132923.
53. Warren M, Miller A, Traylor J, Sidonio R, Morad A, Goodman A, Christensen D, Grant A, Odom E, Okoroh E, Clayton J, Maenner M, Marcewicz L. Late Vitamin K Deficiency Bleeding in Infants Whose Parents Declined Vitamin K Prophylaxis. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2013;62
54. Roos R, Bartmann P, Franz A, Groneck P, Handrick W, Küster H, Pohlandt F, Weiß M. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. *AWMF Leitlinien Register* 2006.
55. Rozanska A, Wojkowska-Mach J, Adamski P, Borszewska-Kornacka M, Gulczynska E, Nowiczewski M, Helwich E, Kordek A, Pawlik D, Bulanda M. Infections and risk-adjusted length of stay and hospital mortality in Polish Neonatology Intensive Care Units. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;35:87-92.
56. Gordon JI. Honor Thy Gut Symbionts Redux. *Science*. 2012;336:1251-3.

57. Sokolowska M, Frei R, Lunjani N, Akdis CA, O'Mahony L. Microbiome and asthma. *Asthma Res Pract.* 2018;4:1.
58. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(11):5088-90.
59. Tindall BJ, Kampfer P, Euzeby JP, Oren A. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(Pt 11):2715-20.
60. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature.* 2007;449(7164):811-8.
61. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;103(3):732-7.
62. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 2005;308:1635-8.
63. Gao Z, Tseng C-h, Pei Z, Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;104(8):2927-32.
64. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(12):4250-5.
65. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
66. Denner DR, Sangwan N, Becker JB, Hogarth DK, Oldham J, Castillo J, Sperling AI, Solway J, Naureckas ET, Gilbert JA, White SR. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1398-405 e3.
67. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1972;25(12):1292-4.
68. Ray K. Married to our gut microbiota. *Gastroenterology & Hepatology.* 2012 9:555.
69. Savage DC. Microbial ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review Microbiology.* 1977(31):107-33.
70. Weng M, Walker WA. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* 2013;4(3):203-14.
71. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Munoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M. Towards the human intestinal microbiota

- phylogenetic core. *Environ Microbiol*. 2009;11(10):2574-84.
72. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(21/28):1022-3.
73. Wopereis H, Sim K, Shaw A, Warner JO, Knol J, Kroll JS. Intestinal microbiota in infants at high risk for allergy: Effects of prebiotics and role in eczema development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017.
74. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*. 2007;56(5):661-7.
75. Eggelbø M, Botten G, Stigum H, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;112(2):420-6.
76. Risnes KR, Belanger K, Murk W, Bracken MB. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *American Journal of Epidemiology*. 2011;173(3):310-8.
77. Gonzalez-Perez G, Hicks AL, Tekieli TM, Radens CM, Williams BL, Lamousé-Smith ESN. Maternal Antibiotic Treatment Impacts Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Antiviral Immunity. *The Journal of Immunology*. 2016;196(9):3768-79.
78. Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, Theriaque D, Li N, Sharma R, Hudak M, Neu J. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20647.
79. Mårlild K, Stephansson O, Montgomery S, Murray JA, Ludvigsson JF. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: A nationwide case-control study. *Gastroenterology*. 2012;142(1): 39-45.e3.
80. Huffnagle GB. The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathogens* 2010;6(5):e1000549.
81. Gould AL, Zhang V, Lamberti L, Jones EW, Obadia B, Korasidis N, Gavryushkin A, Carlson JM, Beerenwinkel N, Ludington WB. Microbiome interactions shape host fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):E11951-E60.
82. Ihekweazu FD, Versalovic J. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *Am J Med Sci*. 2018;356(5):413-23.
83. Galloway-Pena JR, Smith DP, Sahasrabhojane P, Ajami NJ, Wadsworth WD, Daver NG, Chemaly RF, Marsh L, Ghantoli SS, Pemmaraju N, Garcia-Manero G, Rezvani K, Alousi AM, Wargo JA, Shpall EJ, Futreal PA, Guindani M, Petrosino JF, Kontoyiannis DP, Shelburne SA. The role of the gastrointestinal microbiome in infectious complications during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2016;122(14):2186-96.
84. Whittaker RH. Evolution and Measurement of species Diversity. *TAXON*. 1972;21(2/3):213-51.

85. Sim K, Powell E, Shaw AG, McClure Z, Bangham M, Kroll JS. The neonatal gastrointestinal microbiota: the foundation of future health? *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2013;98(4):F362-4.
86. Perez-Munoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017;5(1):48.
87. Cunningham AJ, Sim K, Deierl A, Kroll S, Brannigan E, Darby J. "Vaginal seeding" of infants born by caesarean section. *British medical journal*. 2016;352:i227.
88. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magda Magris M, Glida Hidalgo G, Noah Fierer N, Rob Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):11971–5.
89. Mueller NT, Shin H, Pizoni A, Werlang IC, Matte U, Goldani MZ, Goldani HA, Dominguez-Bello MG. Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. *Scientific Reports*. 2016;6:23133.
90. Russell ARB, Murch SH. Could peripartum antibiotics have delayed health consequences for the infant? *International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2006;113(7):758-65.
91. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica*. 2009;98(2):229-38.
92. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(7): e177.
93. Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome*. 2014;2(38).
94. Arboleya S, Sanchez B, Milani C, Duranti S, Solis G, Fernandez N, Reyes-Gavilan CGdl, Ventura M, Margolles A, Gueimonde M. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *Journal of Pediatrics*. 2015;166(3):538-44.
95. Nan Zhang N, Li TZ, Zheng K, Mou DL, Liang LC, Zhang T, He QS. Use of Rectal Swab Samples for Analysis of the Intestinal Microbiome in Children. *Chinese Medical Journal* 2018;131.
96. MP. Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. 2016.
97. Scientific TF. 260/280 and 260/230 Ratios. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers. 2009;302-479-7707.
98. BioLabs. Q5 High-Fidelity 2X Master Mix®. Certificate of Analysis. 2014.
99. Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*. 2001;11: 3-11.
100. Scientific TF. Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Certificate of Analysis. 2015;Q33120.

101. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research*. 2005;15(12):1767-76.
102. Beals M, Gross L, Harrell S. Diversity Indices: Shannon's H and E 2019 [03.07.2019]. Available from: <https://qubeshub.org/publications/1059/1>.
103. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*. 1949.
104. Gordon JI, Knight R, Heimesaat M. Das menschliche Mikrobiom. *Harrisons Innere Medizin*. 2016;86e-1-12.
105. Stallmach A, Vehreschild MJGT. *Mikrobiom*: De Gruyter; 2016. 342 p.
106. Gasparrini AJ, Bin Wang; Xiaoqing Sun; Kennedy, Elizabeth A.; Hernandez-Leyva, Ariel; Malick Ndao, Tarr, Phillip I.; Warner, Barbara B.; Gautam Dantas. Metagenomic signatures of early life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome persist long after discharge. *Nature Microbiology*. 2019;4(12):2285-97.
107. Drell TL, Irja; Štšepetova, Jelena; Parm, Ülle; Metsvaht, Tuuli; Ilmoja, Mari-Liis; Simm, Jaak; and Sepp, Epp. The development of gut microbiota in critically ill extremely low birth weight infants assessed with 16S rRNA gene based sequencing. *Gut Microbes*. 2014;5(3):304-12.
108. Yee ALM, Elizabeth; Dishaw, Larry J.; Gordon, Jessica M.; Ji, Ming; Dutra, Samia; Ho, Thao T. B. ; Gilbert, Jack A.;Groer, Maureen Longitudinal Microbiome Composition and Stability Correlate with Increased Weight and Length of Very-Low-Birth-Weight Infants. *mSystems*. 2019;4(1).
109. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, Warner BB, Tarr PI, Wang D, Holtz LR. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med*. 2015;21(10):1228-34.
110. Patel AL, Mutlu EA, Sun Y, Koenig L, Green S, Jakubowicz A, Mryan J, Engen P, Fogg L, Chen AL, Pombar X, Meier PP, Keshavarzian A. Longitudinal Survey of Microbiota in Hospitalized Preterm Very-Low-Birth-Weight Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(2):292-303.
111. Thao T. B. Ho TTBG, Maureen W.; Bradley Kane, Bradley; Yee, Alyson L.; Torres, Benjamin A.; Gilbert, Jack A.; and Maheshwari, Akhil Dichotomous development of the gut microbiome in preterm infants. *Microbiome*. 2018;6(157).
112. La Rosa PSW, Barbara B.; Zhouc, Yanjiao; Weinstock, George M.; Sodergren, Erica; Carla M. Hall-Moore HJS, William E. Bennett, Jr, Nurmohammad Shaikhb, Laura A. Linneman,, Julie A. Hoffmannb AHb, 7 , Elena Deych a , Berkley A. Shandsa , William D. Shannona,8, aPIT. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *PNAS*. 2014;111(34):12522-7.
113. Butcher JU, Sharon; Li, Jennifer; Bando, Nicole; Romain, Guillaume; Francis, Jane; Mottawea, Walid; Mack, David; Stintzi, Alain; and O'Connor, Deborah L Independent of Birth Mode or Gestational Age, Very-Low-Birth-Weight Infants Fed Their Mothers' Milk Rapidly Develop Personalized Microbiotas Low in Bifidobacterium. *Journal of Nutrition*. 2018.

114. Gewolb IHS, Richard S; Taciak, Vicki L; Harrison, Tracy S; Panigrahi, Pinaki Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999;80.
115. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell.* 2014;159(4):789-99.
116. Jost T LC, Braegger CP, Chassard C. . New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. . *PLoS One* 2012;7.
117. Brooks B FB, Miller CS, Sharon I, Thomas BC, Baker R, Morowitz MJ, Banfield JF. Download .n. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. . *Microbiome.* 2014 2(1).
118. Hutchinson R, Wade W, Millar M, Ansbro K, Stacey F, Costeloe K, Fleming P. Changes in the intestinal microbiome of the preterm baby associated with stopping non-invasive pressure support: a prospective cohort study. *BMJ paediatrics open.* 2024;8(1).
119. Wang P, Wang Y, Lu L, Yan W, Tao Y, Zhou K, Jia J, Cai W. Alterations in intestinal microbiota relate to intestinal failure-associated liver disease and central line infections. *J Pediatr Surg.* 2017;52(8):1318-26.
120. Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ, Altaye M, Taft DH, Yu Z, Newburg DS, Ward DV, Schibler KR. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter. *J Pediatr.* 2014;165(1):23-9.
121. Shaw AG, Black N, Rushd A, Sim K, Randell P, Kroll JS, Epstein J. Assessing the Colonic Microbiota in Children: Effects of Sample Site and Bowel Preparation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2017;64(2):230-7.
122. Shaw AG, Sim K, Powell E, Cornwell E, Cramer T, McClure ZE, Li MS, Kroll JS. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room? *Microbiome.* 2016;4(1):40.
123. Versalovic J, Gibbs RA, Luna RA, Highlander S, Petrosino JF. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry.* 2009;55(5):856-66.
124. Prehn-Kristensen A, Zimmermann A, Tittmann L, Lieb W, Schreiber S, Baving L, Fischer A. Reduced microbiome alpha diversity in young patients with ADHD. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200728.
125. Rose G, Shaw AG, Sim K, Wooldridge DJ, Li MS, Gharbia S, Misra R, Kroll JS. Antibiotic resistance potential of the healthy preterm infant gut microbiome. *PeerJ.* 2017;5:e2928.

Anhang



Studien-Leiter: Dr. Ulrich von Both

Pädiatrische Infektiologie
Klinikum der Universität München, Kinderklinik und
Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital,
Lindwurmstr. 4, 80337 München

München, 13.02.2016

Patienten-Informationsschrift und Einverständniserklärung

Studie:

"NeoMuniCH"

Neonatal Microbiota study at Munich Children's Hospital

Untersuchung der Entwicklung des Mikrobioms in frühgeborenen Säuglingen und der auf diese Entwicklung einwirkenden Faktoren

Studienleiter:

Dr Ulrich von Both

Studien Team:

Dr K. Sim, Dr A. Shaw, Prof S. Kroll, Dr S. Schmidt,
Dr R Mata, Frau L. Schaumann, G. Reichard, H. Mais

Liebe Eltern,

Wir möchten Sie und Ihr Neugeborenes dazu einladen, an einer Studie teilzunehmen.

Bevor Sie sich entscheiden, ist es wichtig, dass Sie verstehen weshalb diese Studie durchgeführt wird und was sie beinhaltet. Bitte lesen Sie die folgenden Informationen in Ruhe durch und reden Sie, falls Sie möchten, mit anderen Personen darüber. Diese Broschüre fasst die Studie kurz zusammen. Falls Sie mehr zu dem Thema wissen möchten oder Fragen diesbezüglich haben, stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Weshalb wurde mein Kind (bzw. ich als Mutter) gefragt, an der Studie teilzunehmen?

Wir würden Ihr Neugeborenes gerne in die Studie mit einbeziehen, da sie/er vor der 32.

Schwangerschaftswoche geboren ist. In diese Studie möchten wir über einen Zeitraum von 2 Jahren gerne alle Kinder aufnehmen, die vor der 32. Schwangerschaftswoche auf die Welt kommen.

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik:
öffentl. Verkehr:

Prof. Dr. C. Klein
U3, U6, Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

Was ist das Ziel der Studie?

Diese Studie untersucht die Entwicklung und Veränderung der Bakterien im Darm während des Heranwachsens frühgeborener Babys.

Was untersuchen wir und weshalb?

Es wird vermutet, dass der Darminhalt von Ungeborenen steril, d.h. keimfrei ist. Nach der Geburt wird der gesunde Darm von Bakterien der Mutter und der Umwelt Schritt für Schritt besiedelt. Diese Bakterien sind wichtig für die Verdauung und die Immunabwehr.

Es ist wenig bekannt über die Besiedelung durch Bakterien im Darm eines Frühgeborenen.

Es gibt Unterschiede zwischen zu früh und normal geborenen Babys, die dies beeinflussen könnten. Zum Beispiel könnten die Umgebung der Neugeborenen, der Aufenthalt auf Intensiv-Pflege-Stationen und die unterschiedliche Nahrungszufuhr wichtige Faktoren sein.

Wir möchten das Verständnis für die Entwicklung der Bakterien-Besiedelung und die eventuell vorhandenen Unterschiede bei Frühgeborenen verbessern, da dies Einfluss auf die zukünftige Gesundheit aller Frühgeborenen Babys haben könnte.

Was bedeutet das für mein Kind?

Ihr Neugeborenes wird ab dem Tag der Geburt bis zur Entlassung von der Neugeborenen-Station an der Studie teilnehmen. Tägliche Stuhlproben sowie Daten zur körperlichen Gesundheit Ihres Kindes werden gesammelt. Da die Stuhl-Proben während des üblichen Wickelns durch das Pflegepersonal gesammelt werden, wird die Studie Ihrem Neugeborenen in keiner Art und Weise schaden. Ebenso wird ein Oberflächlicher Haut-Abstrich kurz nach der Geburt gemacht sowie im Verlauf wöchentlich. Dies ist entspricht ohnehin dem Standard Vorgehen bei allen Kindern auf der Intensiv-Pflege-Station.

Falls Ihr Kind in einem Inkubator liegen sollte, werden wöchentliche Abstriche der Inkubator-Wand gesammelt.

Muss mein Kind an dieser Studie teilnehmen?

Sie können entscheiden, ob Ihr Kind an der Studie teilnimmt. Wenn Sie sich dazu entscheiden, dass Ihr Kind daran teilnehmen darf, werden wir Ihnen diese Informations-Broschüre mitgeben und Sie werden gebeten, eine Einverständniserklärung zu unterschreiben. Sie können jederzeit die Teilnahme Ihres Neugeborenen an der Studie beenden, ohne einen Grund dafür nennen zu müssen. Die Entscheidung, nicht daran teilzunehmen oder aus der Studie auszuscheiden wird die Versorgung Ihres Kindes nicht beeinflussen.

Wie wird mein Kind behandelt, falls sie/er nicht an der Studie teilnimmt?

Ihr Kind wird nicht anders behandelt, falls sie/er nicht an der Studie teilnehmen sollte. Der Versorgungs-Standard wird davon nicht beeinflusst. Die Studienteilnahme macht also keinen Unterschied. Lediglich die Stuhl-Proben, die sonst im Rahmen der Studie gesammelt würden, werden im Falle einer Nichtteilnahme mit dem restlichen Windelinhalt verworfen.

Was sind die Vorteile einer Teilnahme an der Studie?

Ihr Neugeborenes wird keine direkten Vorteile durch die Teilnahme an der Studie haben.

Aber die Informationen, die wir durch diese Studie erlangen, werden dazu beitragen, die Darm-Entwicklung Frühgeborener besser zu verstehen. Somit kann Frühgeborenen in der Zukunft besser geholfen werden.

Was sind mögliche Risiken oder Nachteile einer Teilnahme an der Studie?

Es bestehen keine Risiken oder Nachteile durch die Teilnahme, da die Stuhlproben aus den Windeln entnommen werden, die andernfalls entsorgt würden.

Was geschieht, wenn ich entscheide, dass mein Kind nicht mehr an der Studie teilnehmen soll?

Falls Sie entscheiden, dass Ihr Kind aus der Studie herausgenommen werden soll, werden wir keine weiteren Proben und Daten mehr sammeln. Mit Ihrem Einverständnis würden wir ggf., falls Sie zustimmen, trotzdem gerne die bereits gesammelten Proben und Daten in irreversibel anonymisierter Form für unsere Auswertung verwenden. Falls Sie damit jedoch nicht einverstanden sein sollten, werden alle bislang erhobenen Proben und Daten vernichtet.

Wird die Teilnahme meines Kindes anonym sein?

Alle Informationen, die während der Studie erhoben werden, werden pseudonymisiert und somit unkenntlich verändert erhoben und aufbewahrt.

Was geschieht mit den gesammelten Proben meines Kindes?

Alle gesammelten Proben werden in einem speziell dafür eingerichteten Gefrierschrank gelagert und anschließend im Labor auf die darin enthaltenen Bakterien analysiert. Wenn Sie einverstanden sind, würden wir bestimmte Proben für zukünftige Studien aufheben.

Was geschieht mit den Daten meines Kindes und den Ergebnissen der Studie?

Die Ergebnisse der Studie werden für wissenschaftliche Zwecke veröffentlicht, wobei alle Patienten Daten pseudonymisiert und unkenntlich dargestellt werden. Falls Sie eine Version der Veröffentlichung möchten, lassen Sie uns dies doch bitte wissen.

Datenschutz-Vereinbarung:

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Ihr Kind erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Name noch die Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten vernichtet. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Dr Ulrich von Both (Studienleiter) und Dr Susanne Schmidt und Dr Rachel Mata-Fernandez (Stv. Studienleiter). Die Unterlagen werden in der Dr. von Haunerschen Kinderklinik für insgesamt 10 Jahre aufbewahrt. Eine

Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es die Sicherheit Ihres Kindes erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Was ist, wenn ich Fragen habe?

Sie können uns während der regulären Arbeitszeiten gerne unter der unten angegebenen Telefonnummer anrufen. Wir freuen uns, Ihre Fragen zu beantworten.

Und jetzt?

Wenn Sie für Ihr Kind entscheiden, an der Studie teilzunehmen, werden Sie gebeten, eine Einverständniserklärung (diesem Informationsschreiben angefügt) über das Sammeln der Stuhl-Proben und Hautabstriche sowie der klinischen Daten Ihres Neugeborenen zu unterschreiben.

Eine Kopie dieser Broschüre und der von Ihnen unterschriebenen Einverständniserklärung werden Sie erhalten.

Vielen Dank, dass Sie sich die Zeit genommen haben diese Broschüre zu lesen!

Ihr NeoMuniCH Studien Team.

Dr med. Ulrich von Both
(Studienleiter)

Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

"NeoMuniCH"

Neonatal Microbiota study at Munich Children's Hospital

Untersuchung der Entwicklung des Mikrobioms in frühgeborenen Säuglingen und der auf diese Entwicklung einwirkenden Faktoren

Ich habe die Informationsschrift gelesen und wurde darüber aufgeklärt, dass es sich bei dieser Studie um eine reine Beobachtungsstudie zur Sammlung von mikrobiologischen und klinischen Daten handelt, die keinerlei invasiven Eingriffe bei meinem Kind erfordert.

Ich bin daher mit der Erhebung und Verwendung der Daten und Proben meines Kindes nach Maßgabe der Informationsschrift und der oben angegebenen Erklärung zum Datenschutz einverstanden.

Name des Kindes:

_____ (Name), _____ (Vorname)

geboren am _____

(Aufklärende(r) Arzt/Ärztin) (Erziehungsberechtigter) (Erziehungsberechtigte)

Datum _____

| N o | Protocol | Comments | * Safety <i>Please indicate where there is a Workplace Exposure Limit (WEL)</i> |
|--------|---|--|--|
| 1 | Add 978 μ l of sodium phosphate buffer to sample in LME tube. | <i>Contains ultra-pure water, sodium phosphate and proprietary product</i> | Wear PPE and undertake this procedure in a microbiology safety cabinet <u>Sodium phosphate buffer</u> Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses. |
| 2 | Add 122 μ l of MT buffer. | <i>Contains ultra-pure water, Ethylenediamine Tetraacetic Acid, Disodium Salt Dihydrate, PVP-40, Sodium Dodecyl Sulfate and ingredients A, B and C</i> | <u>MT buffer</u> Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses. |
| 3 | Add 200mg of faeces to LME tube. | | Potential biological hazard – wear PPE and whole procedure is undertaken in a microbiology safety cabinet |
| 4 | Homogenize in the FastPrep Instrument for 40 seconds at 6.0. P/M | | Users of homogenizers must wear gloves, a closed lab coat and safety glasses. |
| 5 | Place on ice for 30 seconds and repeat step 4. | | Users of homogenizers must wear gloves, a closed lab coat and safety glasses. |
| 6 | Centrifuge at 14,000 xg for 10 minutes to pellet debris. | | Wear PPE (gloves, a closed lab coat) |
| 7 | Add 250 μ l PPS to clean 2.0ml tubes. Transfer supernatant to the 2.0ml tube and mix by | | <u>PPS</u> Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses |

- shaking tube by hand 10 times.
- ↓
- 8 Centrifuge at 14,000 xg for 5 minutes to pellet precipitate.
- ↓
- 9 Resuspend binding maxtrix suspension and add 1.0ml to clean 15ml tubes. Add the supernatant from **step 8** to the 15ml tube.
- Binding matrix contains guanidine thiocyanate, silver bond 30, ultra-pure water and sodium citrate tribasic dehydrate
- ↓
- 10 Place on rotator for 2 minutes to allow binding of DNA. Place tube in rack for 3 minutes to allow settling of silica matrix
- ↓
- 11 Remove and discard 1ml supernatant being careful to avoid settled binding matrix.
- ↓
- 12 Transfer the rest into a 2ml tube
- ↓
- 13 Centrifuge for 2 minutes at 14,000 xg
- ↓
- 14 Remove supernatant
- ↓
- Resuspend binding matrix in 500µl SEWS-M & transfer to column
- Binding matrix
Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses
- Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses
- Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses
- Wear gloves, a closed lab coat and safety glasses
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat)
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat)
- SEWS-M requires dilution in 100% ethanol. Concentrated SEWS-M contains ultra-pure water, Tris hydrochloride and Tris base
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat)

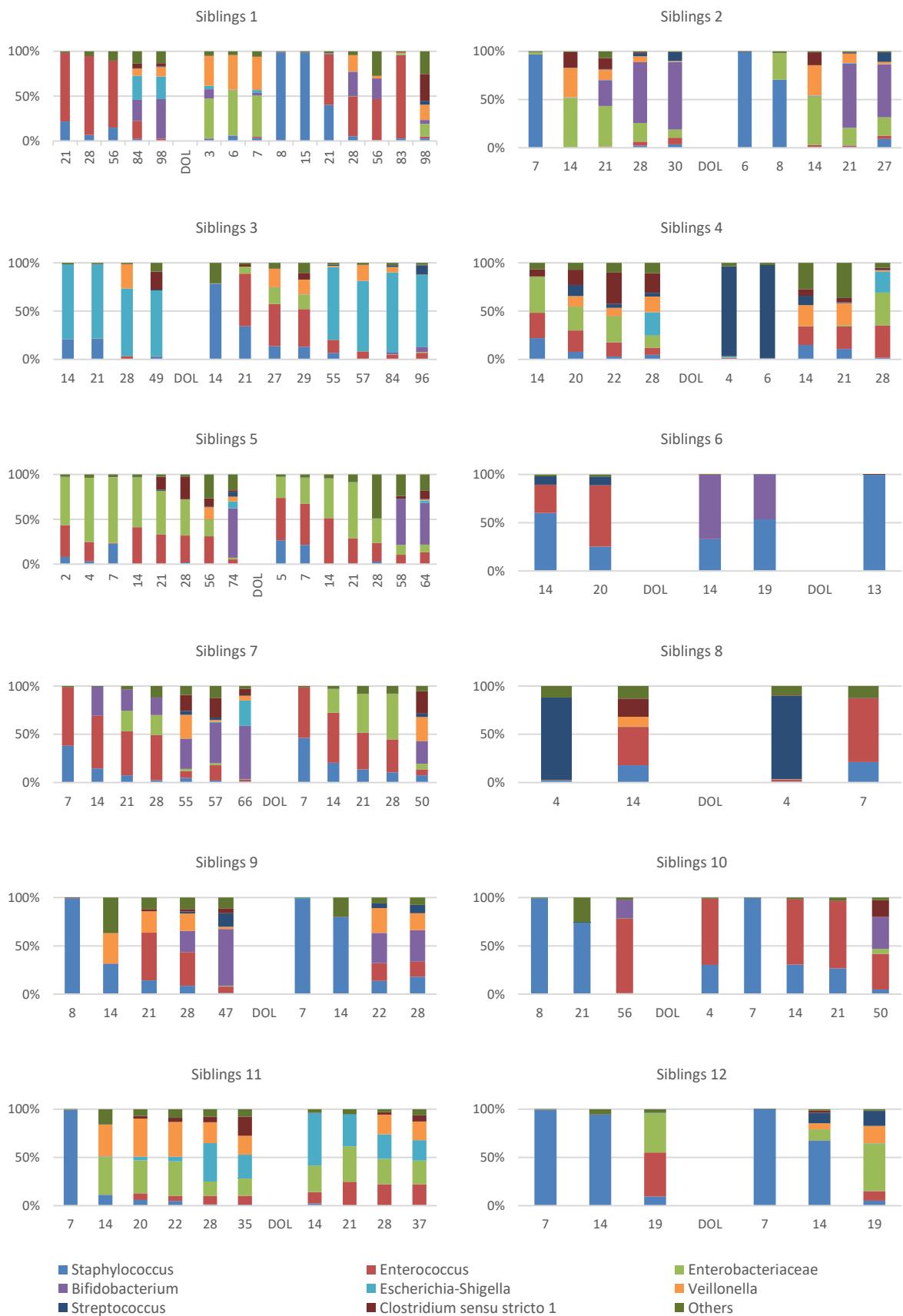
- ↓
- 15 Without any addition of liquid, centrifuge a second time at 14,000 xg for 2 minutes to 'dry' the matrix of residual wash solution. Discard catch tube and replace with a new, clean catch tube.
- ↓
- 16 Air dry the SPIN filter for 5 minutes at room temperature.
- ↓
- 17 Without any addition of liquid, centrifuge a second time at 14,000 xg for 2 minutes to 'dry' the matrix of residual wash solution. Discard catch tube and replace with a new, clean catch tube.
- ↓
- 18 Air dry the SPIN filter for 5 minutes at room temperature.
- ↓
- 19 Gently resuspend the binding matrix (above the SPIN filter) in 100µl of Tris-low EDTA.
Tris-low EDTA contains 10mM Tris-Cl + 0.1mM EDTA.
- ↓
- 20 Centrifuge at 14,000 xg for 1 minute to bring eluted DNA into the clean catch tube.
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat)
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat and safety glasses)
- Wear PPE (gloves, a closed lab coat)

↓
21 Centrifuge at 14,000 xg for 1 minute to bring eluted DNA into the clean catch tube.

Wear PPE (gloves, a closed lab coat)

↓
22 Transfer DNA into screw-cap tube and store at -80°C.

Comments: *The contents of each product and safety information are based on the MSDS provided by MP Bio for the kit 'MP Bio Fast DNA spin kit for soil'.*



Prozentuale Verteilung der Bakteriengenus (L6) des intestinalen Mikrobioms nebeneinander abgebildeter Zwillinge und Drillinge im zeitlichen Verlauf. y-Achse: prozentuale Verteilung der Bakteriengenus, x-Achse: jeweiliger Lebenstag (DOL = Day of Life in Tagen). Jeder Balken bildet das intestinale Mikrobiom eines einzelnen Frühgeborenen zum definierten Zeitpunkt ab.



Eidesstattliche Versicherung

Block, Leonie Sophia

Name, Vorname

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

Diversität des intestinalen Mikrobioms von frühgeborenen Zwillingen und Drillingen

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.

Ohlstadt, 19.11.2025

Leonie Block

Ort, Datum

Unterschrift Leonie Sophia Block



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Block, Leonie Sophia

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Diversität des intestinalen Mikrobioms von frühgeborenen Zwillingen und Drillingen

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Ohlstadt, 19.11.2025

Leonie Block

Ort, Datum

Unterschrift Leonie Sophia Block

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne die mir die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit nicht gelungen wäre.

Ganz voran bei meinem Betreuer PD Dr. med. Ulrich von Both für die Überlassung des spannenden Themas und langjährige Begleitung auf dem Weg der Bearbeitung. Gebührender Dank gilt auch meiner Doktormutter Prof. Genzel-Boroviczény für ihre kritischen und hilfreichen Einwände bei den Fragestellungen und das Ermöglichen der klinischen Durchführung.

An dieser Stelle natürlich auch ein riesiges Dankeschön an alle Eltern, die sich bereit erklärt haben mit ihren Kindern an der Studie teilzunehmen und vor allem an das überaus fleißige und zuverlässige Pflegepersonal, welche einen Großteil des täglichen Arbeitsaufwandes zu tragen hatten!

Für die technische und praktische Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Alex Shaw, Dr. Judith Havemann sowie Dr. Martin Köppel und allen anderen Mitgliedern unseres Teams bedanken, die mich bei Fragen jederzeit großzügig unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Christopher, meinen Eltern und meinem Bruder Felix bedanken, die mich über den ganzen Zeitraum der Bearbeitung hinweg motiviert haben oder mir beratend zur Seite gestanden sind.

Lebenslauf