

# Heterogenität von Mikroorganismen im Stuhl von Neugeborenen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Friederike Funk

Geburtsdatum / Geburtsort: 02.02.1982 / Leipzig

angefertigt am / in: Institut für Medizinische Mikrobiologie / Magdeburg

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie / Leipzig

Betreuerin: Prof. Dr. B. König

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.07.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Einführung	1
1.2 Die Darmflora des Menschen	2
1.2.1 Die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Erwachsenen	2
1.2.2 Der Darm als Bestandteil des Immunsystems	3
1.2.3 Die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Neugeborenen	4
1.3 Staphylokokken	5
1.3.1 Einleitung	5
1.3.2 Staphylococcus aureus	5
1.3.3 Koagulase negative Staphylokokken	6
1.4 Enterokokken	6
1.5 Escherichia coli	6
1.6 Zielstellung	7
<b>2 Material und Methoden</b>	8
2.1 Patientengut	8
2.2 Entnahme und Transport der Stuhlproben	8
2.3 Materialverarbeitung	8
2.4 Auswertung des Bakterienwachstums	9
2.5 Bakterienidentifizierung und Testung der Bakterienempfindlichkeit	9
2.6 Statistik	11
2.7 Verwendete Geräte und Materialien	11
<b>3 Ergebnisse</b>	12
3.1 Der Geburtsmodus und das Alter der untersuchten Neugeborenen	12
3.2 Untersuchung des ersten Auftretens von Bakterien und deren Art	13
3.3 Untersuchung der Besiedlungsverhältnisse der einzelnen Bakterien	18
3.4 Untersuchung der aufgetretenen Bakterienarten	20
3.5 Betrachtung der Besiedlung über die ersten drei Lebensstage	22
3.6 Untersuchung über die Heterogenität der Besiedlung	23
3.7 Resistenzverhalten bei Staphylokokken	26

3.8 Resistenzverhalten bei Enterokokken	30
<b>4 Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1 Zeitpunkt des ersten Auftretens von Bakterien und dessen Beeinflussung	35
4.2 Die erstbesiedelnden Bakteriengattungen und deren Bedeutung	37
4.3 Einfluss des Geburtsmodus	41
4.4 Die bakterielle Vielfalt	42
4.5 Aufgetretene Staphylokokkenarten und deren Resistenzen	44
4.5.1 Staphylokokkenarten	44
4.5.2 Resistenzen aller Staphylokokken	45
4.5.3 Staphylococcus aureus	45
4.6 Aufgetretene Enterokokkenarten und deren Resistenzen	46
4.6.1 Enterokokkenarten	46
4.6.2 Enterokokkenresistenzen	47
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>7 Anlagen</b>	<b>57</b>
7.1 Danksagung	57
7.2 Selbständigkeitserklärung	58
7.3 Lebenslauf	59

## **Dokumentationsblatt**

### Bibliographische Beschreibung:

Funk, Friederike:

Hetereogenität von Mikroorganismen im Stuhl von Neugeborenen.

Universität Leipzig, Dissertation

64 S., 51 Lit., 30 Abb., 1 Tab., 3 Anlagen

### Kurzreferat:

Die Besiedlung des kindlichen Darms beginnt unmittelbar mit der Geburt. Hier findet der erste Kontakt mit verschiedensten Bakterien statt. Deshalb war die zentrale Fragestellung unserer Untersuchung, wie sich die Bakterienarten bei den Geburtsmodi unterscheiden und wie sich die bakterielle Zusammensetzung im Stuhl von Neugeborenen im Laufe der Jahre verändert hat. Wir untersuchten die Stuhlproben von 42 Neugeborenen, wovon 22 vaginal und 20 per Sectio entbunden wurden, am ersten, zweiten und dritten Lebenstag auf Bakterienwachstum. Es wurden die aufgetretenen Bakteriengattungen mittels Kultur bestimmt und von den aufgetretenen Staphylokokken und Enterokokken die Arten und deren Resistenzen mittels des Phönix-Vollautomaten untersucht. Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu früheren Untersuchungen heutzutage vermehrt Staphylokokken den Darm von Neugeborenen besiedeln. Außerdem fiel auf, dass per Sectio entbundene Kinder eine verminderte Heterogenität in ihrer Stuhlflora haben und erst später besiedelt werden als vaginal entbundene Kinder.

### Schlüsselwörter:

Stuhlflora, Neugeborene, Staphylokokken, Enterokokken, Escherichia coli, Resistenz, Intestinaltrakt, Erstbesiedlung

## Abkürzungsverzeichnis

E.	Enterococcus spp.
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasiver <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogener <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>
GALT	Gut-associated-lymphoid-tissue
GIT	Gastrointestinaltrakt
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
M-Zellen	Microfoldzellen
MALT	Mucosa-associated-lymphoid-tissue
MLSb	Makrolid-, Lincosamid-, Streptogramin B-Resistenz
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
spp.	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche
S.	Staphylococcus spp.
TGF	Transforming Growth Factor
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
UPEC	Uropathogener <i>Escherichia coli</i>
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Die bakterielle Mikroflora des menschlichen Intestinaltraktes ist sehr komplex und vielfältig. Sie beherbergt über 400 verschiedene Spezies, davon hauptsächlich Bakterien. Diese sind überwiegend im distalen Ileum und Kolon lokalisiert. Über 99% der kultivierbaren fäkalen Mikroflora sind durch 30-40 Bakterienspezies repräsentiert (Fanaro et al. 2003). Das Verhältnis von Anaerobiern zu Aerobiern beträgt 1000:1 (Kocourkova et al. 2007). Der Gastrointestinaltrakt von Feten ist steril. Während der Geburt erfolgt der erste Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. Schon nach einigen Stunden erscheinen die ersten Bakterien im Stuhl der Neugeborenen. Da der Darm der Neugeborenen ein positives Oxidations-/Reduktions-Potential besitzt, findet zuerst eine Besiedlung mit Aerobiern bzw. mit fakultativen Anaerobiern statt. Diese reduzieren den vorhandenen Sauerstoff, so dass Anaerobier folgen können (Moore et al. 2011). Mit welchen Bakterien sich die Neugeborenen auseinandersetzen müssen, ist stark vom Geburtsmodus abhängig. Vaginal entbundene Kinder sind der vaginalen und fäkalen Mikroflora der Mutter ausgesetzt, wohingegen per Sectio entbundene Kinder Bakterien aus dem Umfeld ausgesetzt sind. Es resultiert eine langsamere und weniger abwechslungsreiche bakterielle Darmbesiedlung der per Sectio entbundenen Kinder (Salminen et al. 2004). In vielzähligen Studien wird beschrieben, dass es durch die veränderte Mikroflora bei den per Sectio entbundenen Kindern zu weitreichenden Veränderungen im Immunsystem kommt, was sich im vermehrten Auftreten von Atopien äußert (Kero et al. 2001, Davidson et al. 2010, Boutsikon et al. 2011, Björkstén et al. 2001, Kirjavainen et al. 1999, Biasucci et al. 2008, Salminen et al. 2004). Laubereau et al. 2004 zeigten darüber hinaus eine Assoziation zwischen einer Entbindung per Sectio und einem vermehrten Auftreten von Durchfällen bei Kindern während des ersten Lebensjahres. Über die erstbesiedelnden Bakterien und den Zeitpunkt ihres Auftretens gibt es kontroverse Studienergebnisse. So beschrieben Adlerberth et al. 2006, dass erst nach einigen Tagen die ersten Bakterien in Form von *E.coli* und Enterokokken auftraten. Andere Studien zeigten eine Besiedlung mit *E.coli* und Enterokokken (Gewolb et al. 1999) bzw. mit Enterobakterien, Streptokokken und Lactobazillen bereits am ersten Tag (Park et al. 2005). Die Unterschiede der beschriebenen Erstbesiedler könnten durch eine veränderte Zusammensetzung der kindlichen Darmflora in

der heutigen Zeit begründet sein, die durch intensivierete Hygienemaßnahmen beeinflusst ist. So ist auch die vermehrte Besiedlung mit Staphylokokken ein neu aufgetretenes Phänomen (Adlerberth et al. 2005a). Das vermehrte Vorliegen von Übergewicht wird mit der Veränderung der Zusammensetzung der Stuhlflora, im Sinne einer stärkeren Besiedlung mit *S.aureus*, in Zusammenhang gebracht (Kalliomäki et al. 2008). Alle diese Studien zeigen, wie wichtig die erstbesiedelnden Bakterien sind und welche weitreichenden Einflüsse sie auf die Gesundheit der Kinder haben. Aufgrund der doch sehr stark variierenden Ergebnisse über Erstbesiedler, den Zeitpunkt der Erstbesiedlung und die durch heutige veränderte Umweltbedingungen veränderte Zusammensetzung der Stuhlflora bei Neugeborenen sahen wir die Notwendigkeit, eine aktuelle Studie über diese Erstbesiedler durchzuführen. Es fiel auf, dass in vielen Studien nicht die Stuhlflora direkt nach der Geburt untersucht wurde bzw. diese Untersuchungen in sehr großen zeitlichen Abständen durchgeführt wurden (mehrere Tage bis Wochen). Wir untersuchten Stuhlproben von 42 Neugeborenen am ersten, zweiten und dritten Lebenstag auf Vorkommen von aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien mittels Kultur. Es erfolgte eine Unterscheidung der Besiedlung zwischen vaginal und per Sectio entbundenen Kinder sowie eine genauere Spezifizierung und Resistenztestung der aufgetretenen Enterokokken und Staphylokokken, da diese Bakterien für viele Erkrankungen im Neugeborenenalter verantwortlich gemacht werden können.

## **1.2 Die Darmflora des Menschen**

### **1.2.1 Die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Erwachsenen**

Der menschliche Darm besitzt eine Oberfläche von ca.  $200\text{ m}^2$  und stellt damit eine wesentliche Verbindung zur Außenwelt dar. Der proximale Anteil des Dünndarms ist durch die Magensäure meistens steril. Nach distal nimmt die Besiedlung des Dünndarms immer stärker zu, wobei proximal eher grampositive Kokken und distal eher gramnegative Stäbchen vorherrschen. Am distalen Ende gleicht das Milieu dem des Dickdarms mit vielen Anaerobiern und Enterobacteriaceae. Die Dickdarmoberfläche ist mit einem aktiven Biofilm ausgekleidet, welcher der Schleimschicht der Enterozyten aufsitzt und über 400 verschiedene Bakterien und eine Vielzahl von Viren und anderen Organismen beherbergt.

Die meisten dieser Bakterien leben strikt anaerob, nur vereinzelt kommen auch fakultativ anaerobe und aerobe Bakterien vor. Die Bakterienzahlen betragen bis zu  $10^{12}$  Keime/g Stuhl und stellen damit 25-33% des Stuhlgewichts dar. Die Hauptvertreter sind mit 30% Bacteroidaceae, gefolgt von Bifidobakterien, Eubakterien, Clostridien und Lactobazillen. Enterokokken und Koliforme sind in niedrigerer Anzahl zu finden (12, 48).

Die mikrobielle Darmflora leistet einen wichtigen Beitrag zur Ernährung und zum Stoffwechsel. So produzieren Anaerobier im Dickdarm Vitamin K, das für die  $\gamma$ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, sowie für die antikoagulatorisch wirkenden Proteine C und S essentiell ist. Außerdem synthetisieren Bakterien auch Bestandteile des Vitamin-B-Komplexes. Die Enterozyten des Darms sind zur Ernährung auf bakterielle Metabolite angewiesen und würden ohne sie verkümmern (49). Die Bakterien sind in der Lage, Polysaccharide zu hydrolysieren und sie zu einfach für den Darm zu absorbierenden Monosacchariden zu spalten. Außerdem aktivieren sie das Lipoprotein Lipase, welches zur Fettverdauung essentiell ist (20).

### **1.2.2 Der Darm als Bestandteil des Immunsystems**

Der Darm ist das größte Organ des Immunsystems des Menschen und beherbergt eine Vielzahl an Bakterien, mit denen der Mensch eine symbiotische Beziehung eingeht. Diese Mikroorganismen sind essentiell für die postnatale Entwicklung der Darmmukosa, der adaptiven Immunität und des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (gut-associated lymphoid tissue, GALT) (35). Das GALT wird repräsentiert durch die im Dünndarm und Blinddarm liegenden Peyer-Plaques sowie die vereinzelt im Dick- und Mastdarm liegenden Lymphfollikel. Die innerhalb der Darmwand liegenden Peyer-Plaques enthalten große B-Zellfollikel. Diese sind zum Darmlumen hin durch spezielle Enterozyten, die so genannten M-Zellen, denen der sonst charakteristische Bürstensaum fehlt, abgegrenzt. Antigene, die sich im Darmlumen befinden, werden von ihnen transzellulär aufgenommen und zu den Peyer-Plaques transportiert (49). Zwischen den großen B-Zellfollikeln liegen wiederum kleine Herde mit Lymphozyten und Plasmazellen. Die Plasmazellen sind in der Lage, IgA zu sezernieren, welches dann in das Darmlumen abgegeben und an die Schleimschicht des Darmepithels gebunden wird. Befinden sich Darmpathogene oder deren toxische Produkte im Darmlumen, heften sich die Immunglobuline an diese und neutralisieren sie. Die mit der

Nahrung massenhaft aufgenommenen Antigene erzeugen normalerweise keine adaptive Immunantwort. Dies wird als orale Toleranz bezeichnet. Sowohl die Nahrungsantigene als auch Antigene von Mikroorganismen werden von antigenrepräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten) den T-Lymphozyten präsentiert. Für eine tolerante Reaktion reagieren T-Zellen verschieden. Sie können im Rahmen des programmierten Zelltodes zerstört werden oder im Sinne einer Anergie, wenn ihnen ein Peptid ohne zusätzliche ko-stimulierende Signale präsentiert wird, nicht mehr auf dieses Antigen reagieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bildung von regulatorischen T-Zellen. Diese können nach erneutem Antigenkontakt aktiv antigenspezifische Reaktionen unterdrücken. Sie werden als  $T_H3$ -Zellen bezeichnet und bilden nach Stimulation mit einem Antigen IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ . Diese Zytokine hemmen die Entwicklung von  $T_H1$ -Reaktionen und sind mit geringeren Antikörpermengen verbunden, so dass es praktisch keine T-Zell-Reaktion gibt. Antigene von pathogenen Keimen hingegen lösen eine starke  $T_H1$ -Schutzreaktion und Entzündung aus und es entwickelt sich ein Immunschutz (50).

### **1.2.3 Die mikrobielle Besiedlung des Darms bei Neugeborenen**

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass der Darm von Neugeborenen zum Zeitpunkt der Geburt steril ist. Die Besiedlung beginnt allerdings schon einige Stunden nach der Geburt mit aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien. Diese sind zwar potentiell pathogen, spielen aber eine wichtige Rolle, indem sie das Darmmilieu auf die Anaerobier vorbereiten. Sie konsumieren den Sauerstoff und schaffen so anaerobe Gegebenheiten. Die aeroben Bakterien werden dann nach ein bis zwei Wochen durch anaerobe Bakterien ersetzt (35, 36).

Innerhalb der ersten 12 Lebensstunden setzen 70% der Neugeborenen ihren ersten Stuhl ab, das so genannte Mekonium. Dieses ist grünlich-schwarz und besteht aus Zellbestandteilen, Lanugo und eingedickter Galle. Oft ist bereits dieser Stuhl mit ersten Bakterien besiedelt (49, 51).

## 1.3 Staphylokokken

### 1.3.1 Einleitung

Staphylokokken sind unbewegliche, in Haufen oder Trauben angeordnete grampositive, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Bakterien. Sie gehören der Familie der Micrococcaceae an und sind katalase-positiv. Anhand der Koagulasereaktion kann man sie in koagulase-positive (*Staphylococcus aureus*) und koagulase-negative Spezies (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, u.a.) unterteilen (49).

### 1.3.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ubiquitär in der Natur zu finden und besiedelt zu 25-30% asymptomatisch die oberen Atemwege und die Haut des Menschen. Er besitzt eine hohe Umweltresistenz, eine Unempfindlichkeit gegen Austrocknung und kann die saure Magenpassage ungehindert überwinden (48). Eine Pathogenität erreicht er durch eine Reihe von Virulenzfaktoren, wie z.B. die Koagulase und den Clumpingfaktor, welche zu Fibrinverklebungen führen, eine Polysaccharidkapsel und das Protein A, die vor Phagozytose schützen, ein intrazelluläres Adhäsion zur Biofilmbildung, Hämolyse zur Auflösung von Erythrozyten, Exfoliatintoxine, die zur Blasenbildung der Haut führen, Enterotoxine, die Durchfall verursachen und das Toxic shock syndrom toxin (TSST), das zum Bild des toxischen Schocksyndroms führt. Allerdings besitzen nicht alle Staphylokokken diese Faktoren. Außerdem bilden zahlreiche Stämme das Enzym Penicillinase (Betalaktamase), wodurch Benzylpenicillin, Ampicillin und Ureidopenicillin unwirksam werden. Staphylokokken rufen Krankheiten oft nur bei einer Abwehrschwäche des Wirtes hervor oder wenn sie sehr viele Pathogenitätsfaktoren aufweisen. Durch *Staphylococcus aureus* selbst können Abszesse entstehen, wie z.B. bei Furunkeln, sowie Osteomyelitiden und Infektionen der inneren Organe ausgelöst werden, wie z.B. bei der Endokarditis, der Pneumonie und der Sepsis. Toxinbedingt entstehen beispielsweise Lebensmittelvergiftungen, Enteritiden und Enterokolitiden. Daneben gibt es Übergangsformen zwischen invasiven und toxinbedingten Erkrankungen, wie z.B. die

Dermatitis exfoliata und das Toxische Schocksyndrom. Eine spezielle Rolle als nosokomiale Erreger spielen dabei methicillinresistente *S. aureus* (MRSA) (49).

### **1.3.3 Koagulase negative Staphylokokken**

Sie gehören zur normalen Flora der Haut und Schleimhaut des Menschen. Der bekannteste und wichtigste Vertreter ist *Staphylococcus epidermidis*. Er besitzt die Fähigkeit, einen Biofilm zu bilden und dadurch sogenannte „Plastikinfektionen“ z.B. auf Kathetern zu bilden. Außerdem spielt auch er eine Rolle bei nosokomialen Erkrankungen und kann zahlreiche Resistenzen entwickeln (49).

### **1.4 Enterokokken**

Enterokokken sind meist paarweise angeordnete, fakultativ anaerobe, gram-positive Streptokokken und gehören zur Lancefield-Serogruppe D. Die wichtigsten Vertreter sind *Enterococcus faecalis* und *faecium*. Sie sind natürliche Besiedler des Darmes und besitzen nur wenige Virulenzfaktoren. Wenn sie aus dem Darm in andere Gewebe eindringen, können sie allerdings Infektionen hervorrufen (48). Alle Enterokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegen Benzylpenicillin und Cephalosporine, wobei *Enterococcus faecium* resistenter gegen viele Antibiotika ist als andere Enterokokken. Sie spielen eine Rolle bei Harnwegsinfektionen, der Urosepsis, Endokarditis, Peritonitis, Cholecystitis und nekrotisierenden Weichteilinfektionen. Besonders im Rahmen von nosokomialen Infektionen spielen vancomycinresistente Enterokokken (VRE), meist *Enterococcus faecium*, eine Rolle. Zu beachten ist auch, dass *E.gallinarum* und *E.casseliflavus* eine natürliche Resistenz gegen Vancomycin besitzen (48, 49).

### **1.5 Escherichia coli**

*E.coli* ist ein peritrich begeißeltes, aus diesem Grund bewegliches, gram-negatives, sporenloses, fakultativ anaerobes Stäbchen. Er kommt als natürlicher Besiedler des Darms

vor und ist deshalb ein klassischer Fäkalindikator. Er kann bei immunsupprimierten Personen, bei Säuglingen und bei entsprechender Disposition extraintestinale Infektionen, wie z.B. Harnwegsinfekte, Pyelonephritiden, Urosepsis, Appendizitis, Peritonitis, Cholangitis und Cholezystitis hervorrufen und ist der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen. Dies ist durch P-Fimbrien möglich, mit denen sich der Uropathogene *E.coli* (UPEC) spezifisch an das Epithel der harnableitenden Organe heften kann und eine anschließende toxinbedingte Schädigung des Gewebes hervorruft. Intestinale Infektionen sind durch massive Diarrhöen gekennzeichnet. Dabei sind bis heute vier Subtypen bekannt, die sich durch ihre Pathogenitätsfaktoren unterscheiden. Der enteropathogene *E.coli* Subtyp (EPEC) löst vor allem bei Säuglingen schwere Diarrhöen aus. Dies ist ihm durch seine Möglichkeit zur Adhärenz an die Mukosazellen des Darmes möglich, wodurch es zur Zerstörung der Mikrovilli kommt. Reisediarrhöen werden durch ETEC ausgelöst, welche hitzelabile Enterotoxine produzieren können. EIEC können in die Darmmukosa eindringen, diese zerstören und somit eine bakterielle Ruhr auslösen. Der wohl gefürchtetste Subtyp ist der EHEC, der eine hämorrhagische Kolitis und das HUS auslösen kann. Er ist zur Adhäsion an Epithelzellen befähigt und produziert Verotoxin und Hämolysin (48, 49).

## **1.6 Zielstellung**

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, eine vergleichende Stuhluntersuchung von per Sectio und vaginal entbundenen Neugeborenen durchzuführen. Daraus wurden folgende Fragestellungen abgeleitet:

1. Gibt es einen Unterschied im Zeitpunkt der Erstbesiedlung abhängig vom Geburtsmodus?
2. Gibt es einen Unterschied der Arten der erstbesiedelnden Bakterien abhängig vom Geburtsmodus?
3. Gibt es Unterschiede in der bakteriellen Vielfalt abhängig vom Geburtsmodus?
4. Welche Resistenzen treten auf?
5. Gibt es Unterschiede der aufgetretenen Resistenzen abhängig vom Geburtsmodus?
6. Hat sich die erste bakterielle Besiedlung im Vergleich zu früheren Studien verändert und welche Einflüsse haben die gesteigerten Hygienebedingungen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientengut**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 42 Neugeborenen aus dem Universitätsklinikum Magdeburg Stuhlproben, beginnend mit dem Mekonium, vom ersten, zweiten und dritten Lebenstag untersucht. Davon wurden 20 der Neugeborenen per Sectio und 22 der Neugeborenen vaginal entbunden. Das Gestationsalter betrug zwischen 36 und 42 Wochen. Alle Kinder und Mütter waren gesund und erhielten keine Antibiotika.

### **2.2 Entnahme und Transport der Stuhlproben**

Die Stuhlproben wurden beim Wickeln der Säuglinge durch die jeweils betreuende Krankenschwester entnommen, in dafür bereitgestellte Stuhlröhrchen gefüllt und diese mit Patientennamen, Geburtsdatum, sowie Entnahmedatum und –uhrzeit versehen. Die Aufbewahrung und der Transport der Stuhlröhrchen erfolgte bei Raumtemperatur in einem Zeitfester von maximal 2 Stunden. Anschließend erfolgte die Konservierung bei minus 80°C bis zur weiteren Verarbeitung.

### **2.3 Materialverarbeitung**

Die Stuhlproben wurden aufgetaut, gewogen und mit 0,9 %igem NaCl auf 10% verdünnt. Jeweils 100 µl der gewonnenen Suspension wurden auf Columbia Blood Agar und Mac Conkey Agar, zur Selektierung der gramnegativen Bakterien, aufgebracht und mittels einer Impföse gleichmäßig verteilt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank, um eine Kontamination durch andere Keime zu verhindern. Die Bebrütung erfolgte für 24 Stunden unter aerophilen Bedingungen bei 34,0°C und unter mikroaerophilen Bedingungen bei 34,0 °C und 5,8% CO<sub>2</sub>.

## **2.4 Auswertung des Bakterienwachstums**

Die nach 24 Stunden aus dem Brutschrank entnommenen Kulturschalen wurden auf vorhandenes Bakterienwachstum untersucht. Die jeweiligen Bakteriengattungen sowie deren Wuchsdichte auf den Nährböden wurden protokolliert. Da die mikroaerophilen Kulturschalen die gleichen Kolonien, nur in intensiverer Besiedlungsdichte, wie die aerophilen Kulturen zeigten, wurden nur die mikroaerophilen Kulturen weiter untersucht. Die verschiedenen Kolonien wurden mittels Impfösen im Dreiösenausstrichverfahren vereinzelt, auf Columbia Blood Agar-Nährböden aufgebracht und erneut für 24 Stunden bebrütet. Bei morphologisch identisch erscheinenden Kolonien wurden vier verschiedene Kolonien vereinzelt. Aufgetretene Enterokokken wurden zur weiteren Selektion auf Cocosel-Nährböden bebrütet. Zur ersten Identifizierung wurden die typischen Koloniemorphologien auf den Nährböden herangezogen, in einigen Fällen auch das mikroskopische Erscheinungsbild nach Gram-Färbung und die Katalase-Reaktion. Somit konnte mit ausreichender Genauigkeit die Unterscheidung der Bakteriengattungen erfolgen. Die nach der Vereinzellung gewonnenen Reinkulturen von *E.coli*, Staphylokokken, Enterokokken, Pseudomonas, Proteus, B-Streptokokken und Bazillus wurden nach der Bebrütung für weitere Untersuchungen bei -80 °C kryokonserviert.

## **2.5 Bakterienidentifizierung und Testung der Bakterienempfindlichkeit**

Die durch Vereinzellung und Kultur gewonnenen Enterokokken und Staphylokokken in Reinkultur wurden zur Identifizierung der Bakterienart und zur Testung ihrer Antibiotikaempfindlichkeit mittels des BD Phönix Vollautomaten untersucht. Es wurde je ein Tropfen des AST-Indikators in die AST-Bouillon getropft. Mit einem Tupfer wurden von der zu untersuchenden Bakterienart Kolonien in die ID-Bouillon gebracht, bis ein McFarland-Standard von 0,4-0,5 erreicht wurde. Von dieser Bakteriensuspension wurden 20µl in die AST-Bouillon eingebracht. Die fertige Bouillon wurde auf das jeweilige Panel gegossen. Anschließend erfolgten die Bestimmung der Bakterienart sowie deren Resistenzen durch den BD Phönix Vollautomaten.



Abbildung 1: BD Phönix Vollautomat<sup>1</sup>



Abbildung 2, 3: Phönix Panels mit AST- und ID-Bouillon<sup>1</sup>

Um das bedenkliche Resistenzverhalten einiger Entero kokkenarten gegen Linezolid nochmals zu bestätigen, wurde zusätzlich eine manuelle Testung der Linezolidresistenz mittels Agardiffusionstest durchgeführt. Hierfür wurde Columbia Blood Agar mit den zu untersuchenden Entero kokkenreinkulturen beimpft. Anschließend wurden Stenzen von Linezolid in verschiedener Konzentration auf die Platte aufgebracht, die Kulturen für 24h bei 37°C bebrütet und der Hemmhof um die Stenzen ausgewertet.

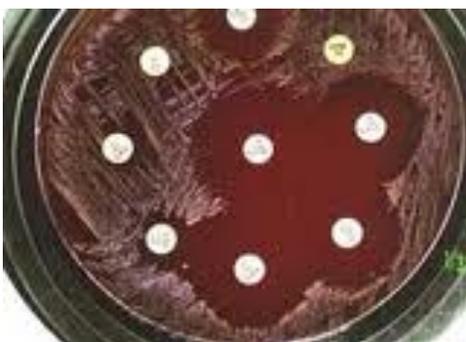


Abbildung 4: Agardiffusionstest zur Resistenzbestimmung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>www.bd.com (mit freundlicher Genehmigung der Firma Becton Dickinson GmbH)

## 2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Chi-Quadrat-Test (exakter Test nach Fisher) verwendet. Als Signifikanzniveau setzten wir  $\alpha=0,05$  ein.

## 2.7 Verwendete Geräte und Materialien

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
Stuhlröhrchen	SARSTEDT
0,9% NaCl	
Mikroliter-Pipetten	EPPENDORF
Pipettenspitzen	SARSTEDT
Columbia Blood Agar	BD
Mac Conkey Agar	OXOID
Coccosel Agar	BIO MERIEUX
Impfösen	SARSTEDT
Cryoröhrchen	MAST
Brutschrank 34,0°C, 5,8% CO <sub>2</sub>	HERAEUS CO <sub>2</sub> -AUTO-ZERO
Phoenix	BD
PMIC/ID-60 Staphylokokken-Panel	BD
PMIC/ID-61 Enterokokken-Panel	BD
AST	BD
ID	BD
AST Indicator	BD
AST Solution	BD
Antibiotikaplättchen mit Linezolid	

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Geburtsmodus und das Alter der untersuchten Neugeborenen

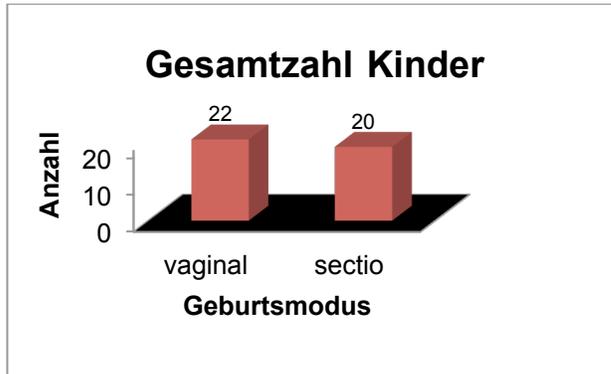


Abbildung 5: Geburtsmodus

Abbildung 5 zeigt die Gesamtanzahl der Kinder und den Geburtsmodus. Wir untersuchten die Stuhlproben von insgesamt 42 Kindern. Davon wurden 20 Kinder per Sectio und 22 Kinder vaginal entbunden.

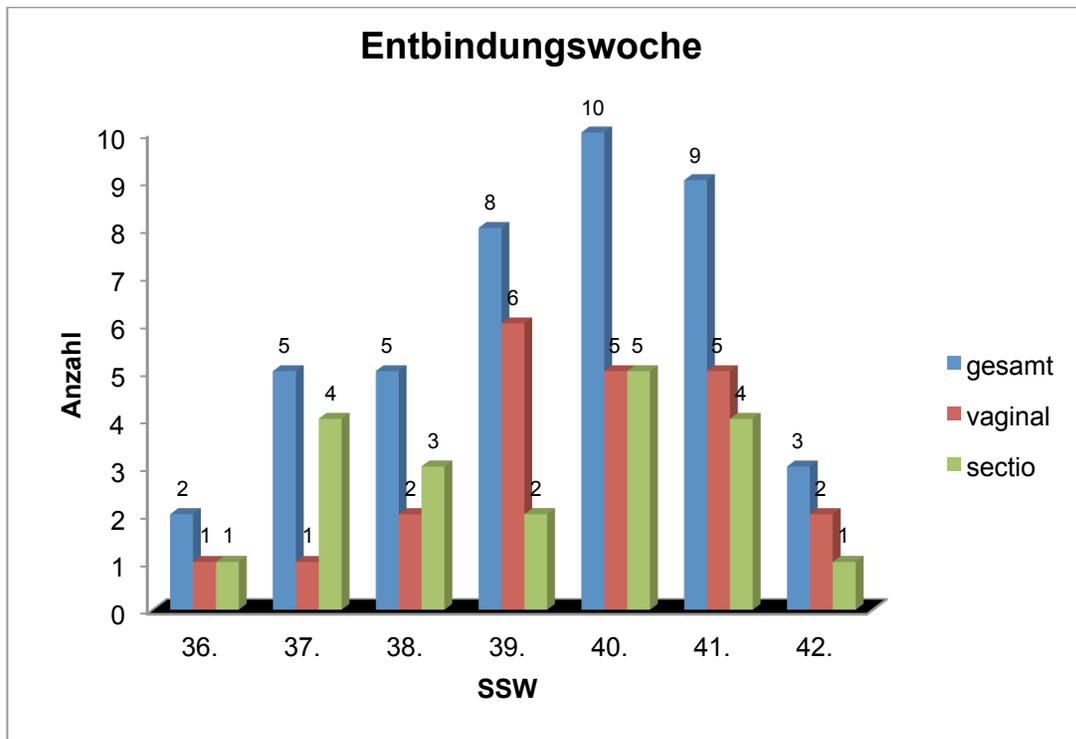


Abbildung 6: Entbindungswoche

Die Anzahl der SSW, nach denen die Kinder entbunden wurden, zeigt Abbildung 6. Die Kinder wurden zwischen der 36. und 42. SSW entbunden. Die meisten kamen zwischen der 39. und 41. SSW zur Welt. Entbindungen vor der 39. SSW erfolgten dabei überwiegend per Sectio, wohingegen nach der 40. SSW die vaginale Entbindung überwog.

### 3.2 Untersuchung des ersten Auftretens von Bakterien und deren Art

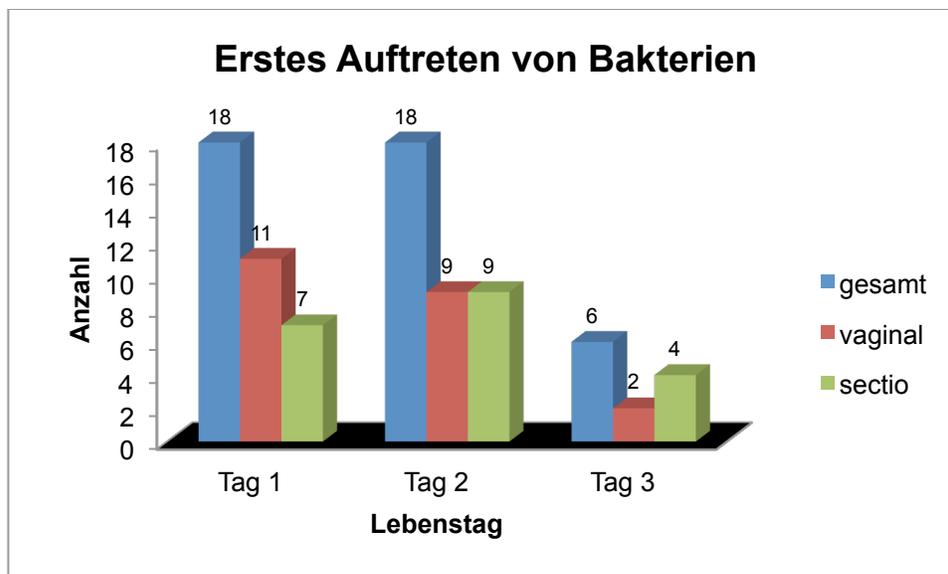


Abbildung 7: Das erste Auftreten von Bakterien

Die Stuhlproben wurden am ersten, zweiten und dritten Lebenstag der Kinder entnommen. Abbildung 7 zeigt, an welchem Tag eine erste bakterielle Besiedlung zu beobachten war. An Tag 1 und 2 war insgesamt die häufigste Erstbesiedlung zu beobachten. Bei einer Differenzierung zwischen den Geburtsmodi fällt aber auf, dass bei vaginaler Entbindung die Besiedlung zeitiger stattfindet, als bei Entbindung per Sectio.

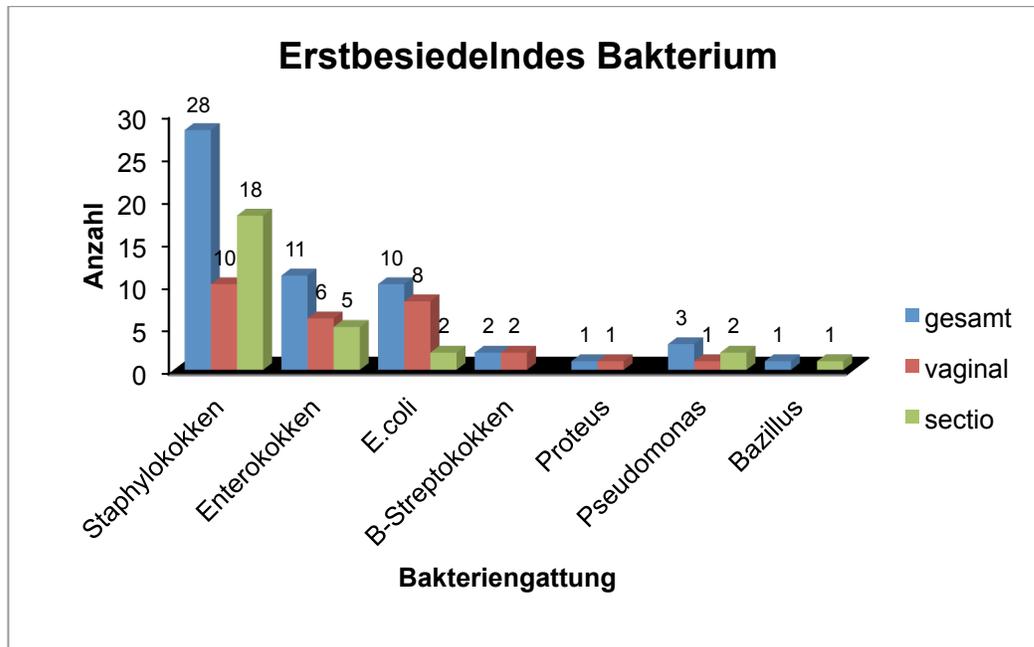


Abbildung 8: Erstbesiedelndes Bakterium

Welches Bakterium die Stuhlproben als erstes besiedelte, veranschaulicht Abbildung 8, wobei hier auch Mehrfachbesiedlungen (mehrere Bakterienarten einer Gattung) eingeschlossen sind. Am häufigsten traten, unabhängig vom Geburtsmodus, Staphylokokken als Erstbesiedler auf. Am Zweithäufigsten Enterokokken, dicht gefolgt von *E.coli*. Bei einer Differenzierung zwischen den Geburtsmodi fällt auf, dass im Verhältnis gesehen bei den per Sectio geborenen Kindern häufiger Staphylokokken als Erstbesiedler auftraten als andere Bakterien, bzw. als Enterokokken und *E.coli*. Bei den vaginal entbundenen Kindern waren ebenfalls Staphylokokken am häufigsten vertreten, allerdings im Vergleich nicht wesentlich mehr als Enterokokken oder *E.coli*. Hier waren die Bakterien in ihrer Anzahl gleichmäßiger verteilt. Andere Erstbesiedler wie B-Streptokokken, Proteus, Pseudomonas oder Bazillus traten nur vereinzelt auf.

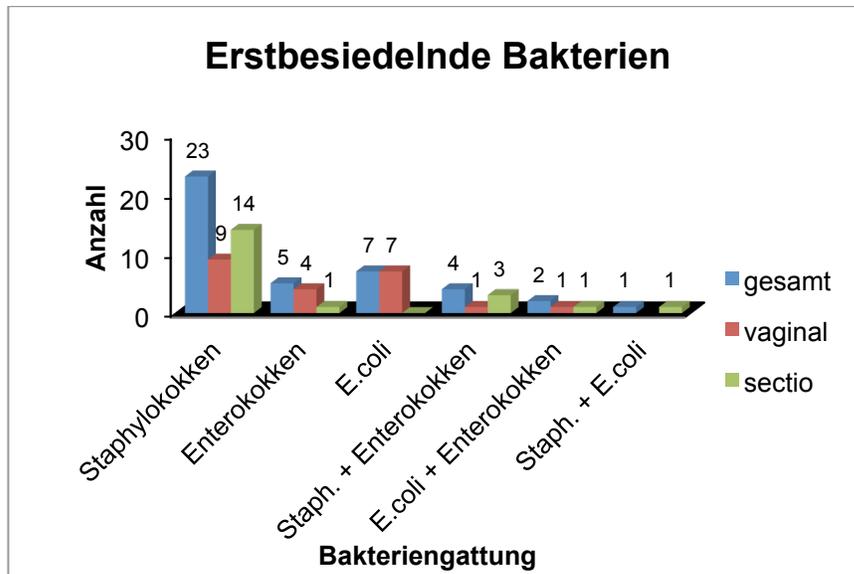


Abbildung 9: Erstbesiedelnde Bakterien mit Mehrfachbesiedlung

Abbildung 9 zeigt ebenso wie Abbildung 8 die erstbesiedelnden Bakterien. Allerdings wurde hierbei noch unterschieden, ob eine oder mehrere Bakteriengattungen gemeinsam als Erstbesiedler auftraten. Dabei zeigt sich deutlich, dass Staphylokokken als alleinige Erstbesiedler am häufigsten auftraten. Bei Betrachtung der Geburtsmodi fällt auf, dass bei einer vaginalen Entbindung am häufigsten eine alleinige Staphylokokken- (wenn auch weniger häufig als bei den per Sectio geborenen Kindern) und *E.coli*-Besiedlung, gefolgt von einer Enterokokkenbesiedlung, auftrat. Bei den Kindern, die per Sectio entbunden wurden, zeigt sich eine überwiegende alleinige Erstbesiedlung durch Staphylokokken. Auffällig ist, dass es in unserer Untersuchung nie eine alleinige *E.coli*-Besiedlung gab und nur eine alleinige Enterokokkenbesiedlung auftrat. Das kombinierte Auftreten von mehreren Bakterien als Erstbesiedler zeigt keine Dominanz eines Geburtsmodus. Eine Kombination von Staphylokokken und Enterokokken war dabei am häufigsten zu beobachten.

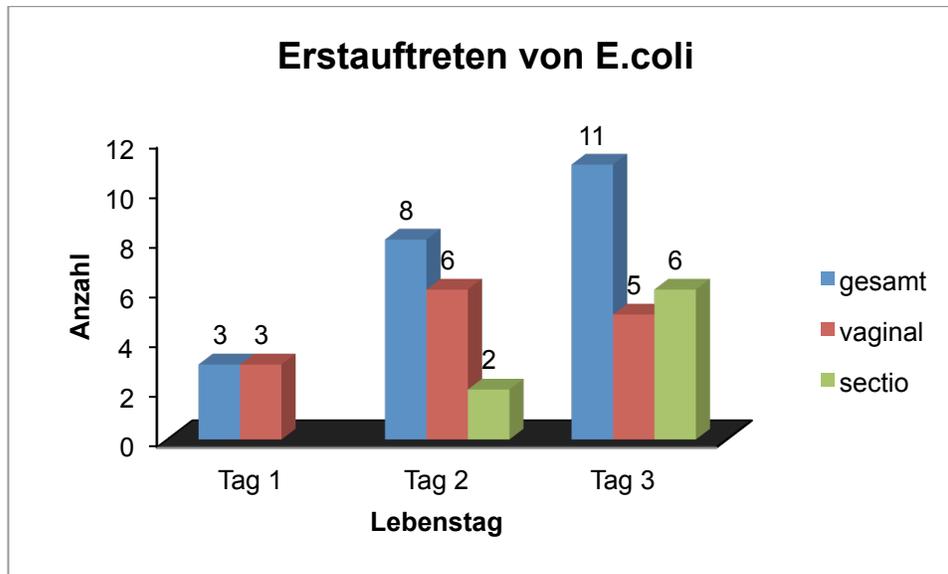


Abbildung 10: erstes Auftreten von

Wenn man, unabhängig von anderen Bakterien, nur das erste Auftreten von *E.coli* betrachtet, fällt auf, dass dies am dritten Lebenstag am häufigsten geschah, am zweiten Lebenstag am zweithäufigsten und am seltensten am ersten Lebenstag. Dies ist in Abbildung 10 ersichtlich. Bei den per Sectio geborenen Kindern trat am ersten Lebenstag in unserer Untersuchung nie *E.coli* auf, dahingegen am dritten Lebenstag häufiger als bei den vaginal entbundenen Kindern. Umgekehrt zeigten die vaginal entbundenen Kinder schon am ersten Lebenstag eine *E.coli*-Besiedlung, am zweiten Lebenstag die meisten *E.coli*-Erstbesiedlungen und am dritten Lebenstag weniger Erstbesiedlungen als bei den per Sectio geborenen Kindern.

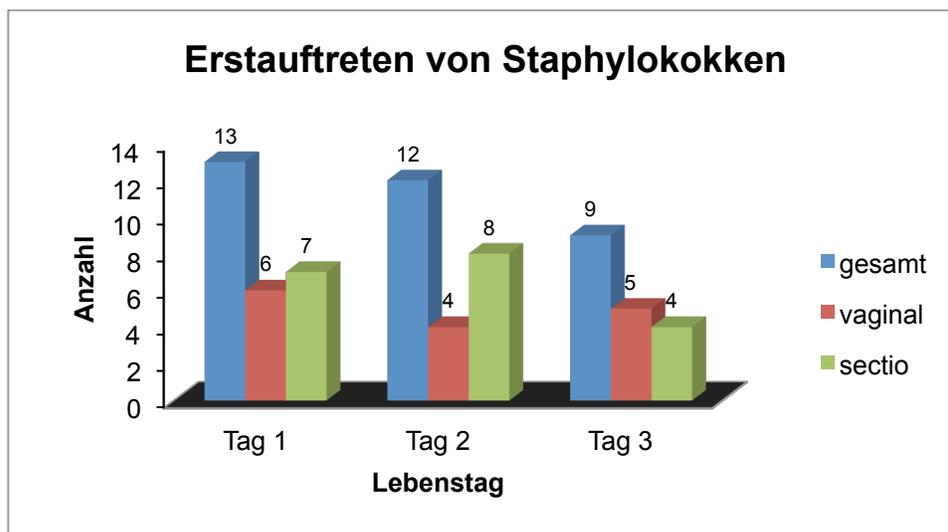


Abbildung 11: erstes Auftreten von Staphylokokken

Das erste Auftreten von Staphylokokken, unabhängig von anderen Bakterienformen, stellt Abbildung 11 dar. Hier zeigt sich, dass Staphylokokken am ersten Lebenstag das häufigste und dann mit absteigender Häufigkeit ein erstes Auftreten hatten. Bei den per Sectio entbundenen Kindern traten Staphylokokken am häufigsten am ersten und zweiten Lebenstag auf. Bei den vaginal entbundenen Kindern lässt sich keine eindeutige Tendenz des ersten Auftretens von Staphylokokken entdecken.

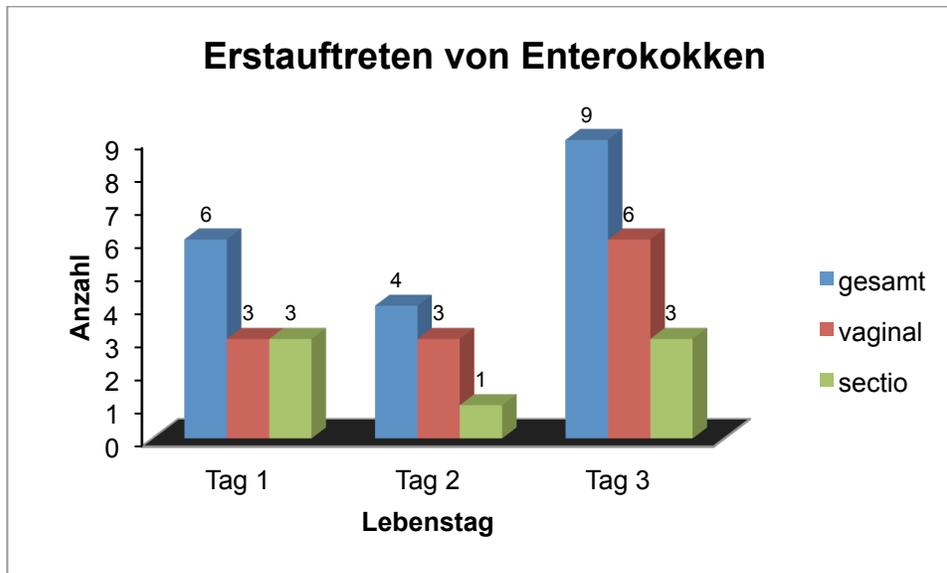


Abbildung 12: erstes Auftreten von Enterokokken

Abbildung 12 veranschaulicht, wann eine erste Besiedlung mit Enterokokken stattgefunden hat. Man sieht, dass dies am häufigsten am dritten Tag erfolgte. Bei den vaginal entbundenen Kindern sah man mit zunehmendem Lebensalter eine häufigere Erstbesiedlung. Bei den per Sectio entbundenen Kindern ist hingegen keine eindeutige Tendenz ersichtlich.

### 3.3 Untersuchung der Besiedlungsverhältnisse der einzelnen Bakterien

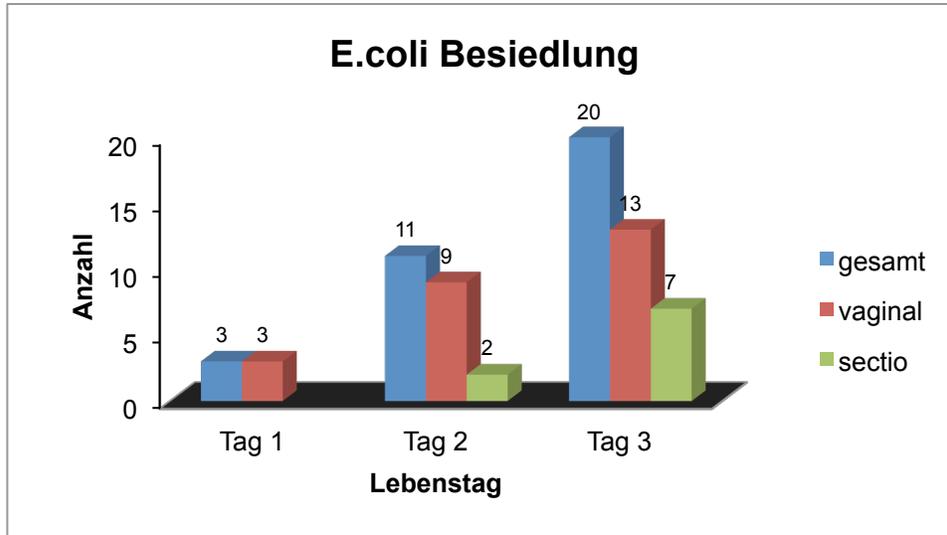


Abbildung 13: Gesamtaufreten von

An welchen Tagen eine Besiedlung mit *E.coli* zu beobachten war (unabhängig vom ersten Auftreten von *E.coli*), ist in Abbildung 13 ersichtlich. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Besiedlung mit zunehmendem Lebenstag. Auffällig ist eine signifikant stärkere Besiedlung bei den vaginal entbundenen Kindern im Gegensatz zu den per Sectio entbundenen Kindern.

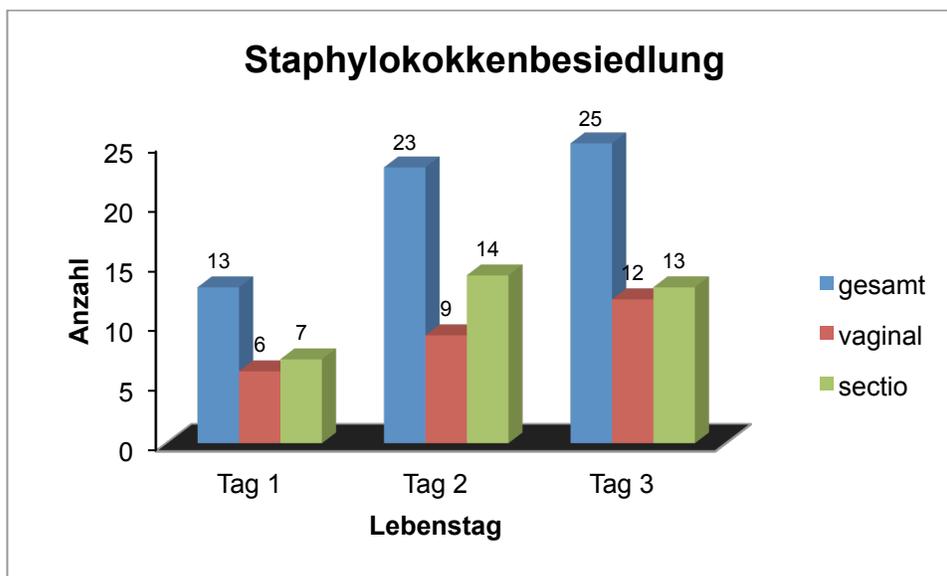


Abbildung 14: Gesamtaufreten von Staphylokokken

Auch bei der Betrachtung der Besiedlung mit Staphylokokken während der ersten drei Lebenstage ist eine Zunahme mit dem Lebensalter ersichtlich, wie in Abbildung 14 zu sehen ist. Allerdings zeigt sich hier eine leichte Dominanz der Staphylokokken bei den per Sectio entbundenen Kindern.

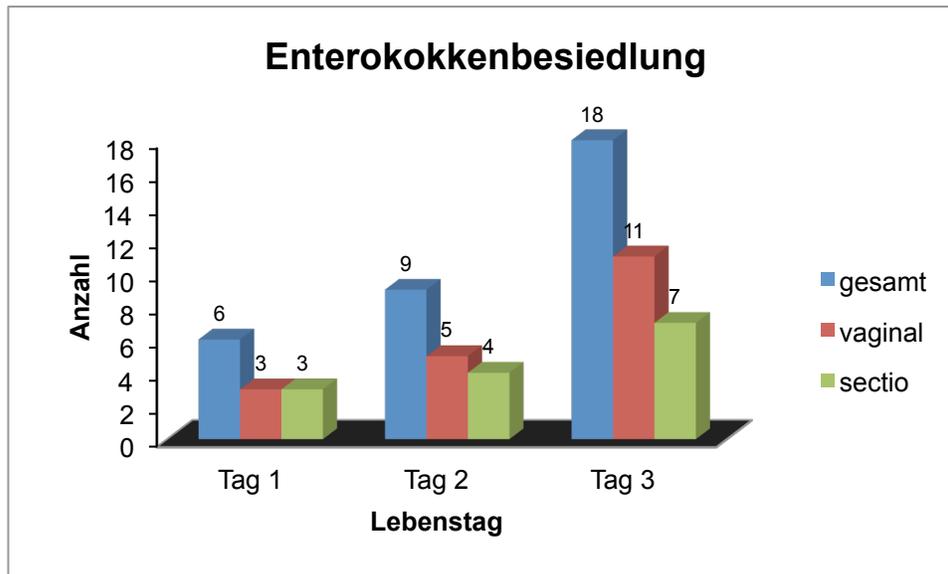


Abbildung 15: Gesamtaufreten von Enterokokken

Abbildung 15 stellt das Besiedlungsverhalten der Enterokokken dar. Auch hier zeigt sich eine Zunahme der Besiedlung mit steigendem Lebensalter. Ähnlich wie bei der Besiedlung mit *E.coli* ist auch bei den vaginal entbundenen Kindern eine stärkere Besiedlung mit Enterokokken zu erkennen.

Zur weiteren Differenzierung der Bakterienarten wurden jeweils vier Reinkolonien einer Bakteriengattung aus einer Stuhlprobe der Kinder identifiziert.

### 3.4 Untersuchung der aufgetretenen Bakterienarten

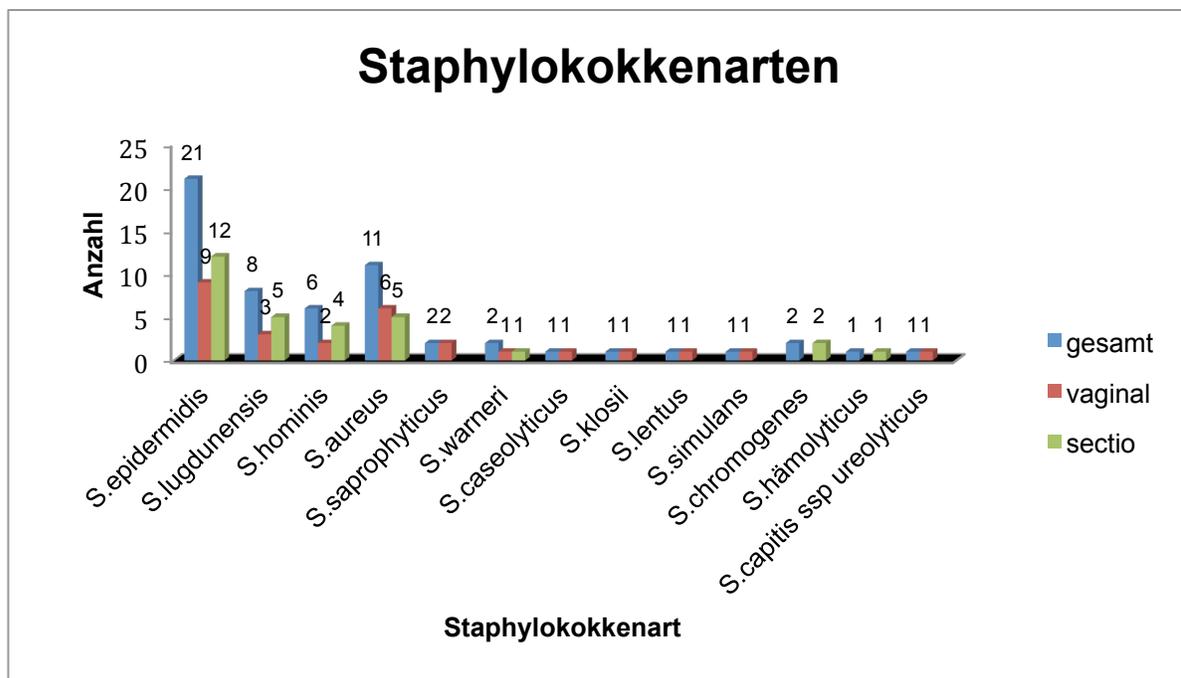


Abbildung 16: aufgetretene Staphylokokkenarten

Welche Staphylokokkenarten in welcher Häufigkeit auftraten wird in Abbildung 16 dargestellt. Die mit Abstand signifikant häufigste Besiedlung erfolgte durch *S. epidermidis*. Als zweithäufigste Art, mit fast nur halb so vielen Fällen, zeigt sich *S. aureus*, gefolgt von *S. lugdunensis* und *S. hominis*. Die übrigen Arten traten nur vereinzelt auf. Bei den vaginal entbundenen Kindern sahen wir *S. aureus* etwas häufiger, als bei den per Sectio entbundenen Kindern. Bei diesen waren wiederum *S. epidermidis*, *S. hominis* und *S. lugdunensis* häufiger nachweisbar als bei den vaginal entbundenen Kindern.

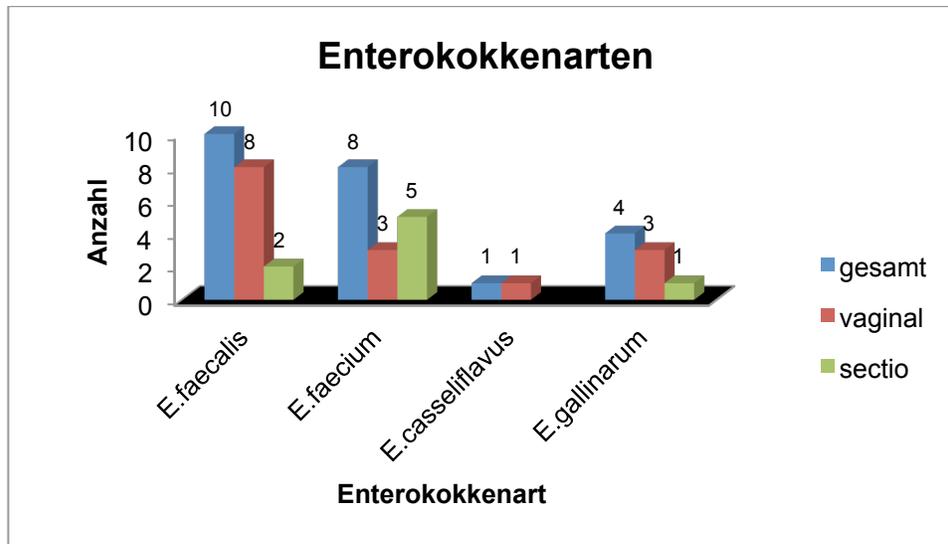


Abbildung 17: aufgetretene Enterokokkenarten

Abbildung 17 zeigt die Enterokokkenarten, die in unserer Untersuchung nachgewiesen wurden. Dabei zeigt sich, dass insgesamt und insbesondere bei den vaginal entbundenen Kindern *E. faecalis* die häufigste Art war. *E. faecium* trat insgesamt am zweithäufigsten auf und bei den per Sectio entbundenen Kindern am häufigsten. *E. gallinarum* war viermal zu beobachten und zeigte eine Dominanz bei den vaginal entbundenen Kindern. *E. casseliflavus* wurde nur einmal bei einem vaginal entbundenen Kind nachgewiesen.

### 3.5 Betrachtung der Besiedlung über die ersten drei Lebenstage

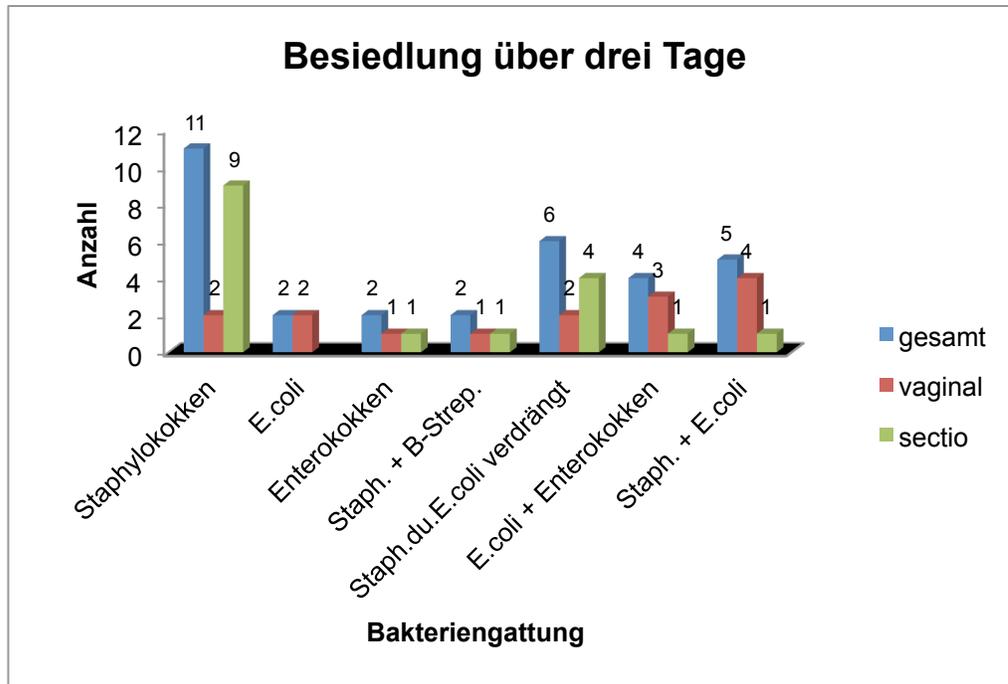


Abbildung 18: dauerhafte Besiedlung, bzw. Verdrängung über alle 3 Lebenstage

Welche Bakterien bei einem Kind an allen drei Lebenstagen durchweg beobachtet wurden und welche Bakterien durch andere verdrängt wurden zeigt Abbildung 18. Eine alleinige Staphylokokkenbesiedlung an allen drei Lebenstagen wurde dabei am häufigsten beobachtet, wobei dies fast ausschließlich per Sectio entbundene Kindern betraf. Eine durchgängige Besiedlung durch *E.coli*, bzw. Enterokokken hingegen trat relativ selten auf. Eine Verdrängung der Staphylokokken durch *E.coli* war sechsmal zu beobachten, wobei dies häufiger bei den per Sectio entbundenen Kindern zu sehen war. Ein kombiniertes Auftreten von *E.coli* und Enterokokken über drei Tage, bzw. *E.coli* und Staphylokokken war seltener nachweisbar, dann aber eher bei den vaginal entbundenen Kindern.

### 3.6 Untersuchung über die Heterogenität der Besiedlung

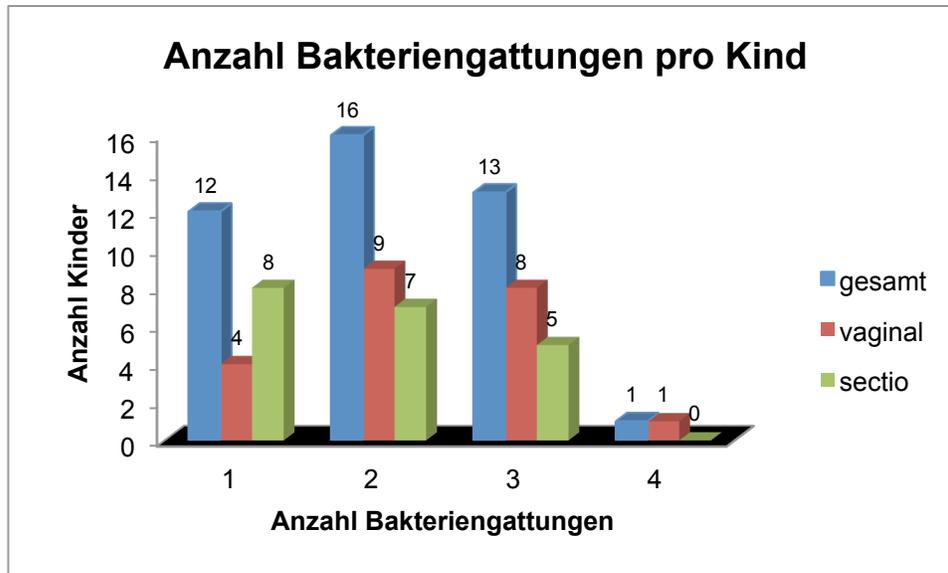


Abbildung 19: Anzahl der Bakteriengattungen pro Kind

Abbildung 19 zeigt, wie häufig die Stuhlproben der einzelnen Kinder mit verschiedenen Bakteriengattungen besiedelt waren. Die meisten Kinder zeigten zwei Bakteriengattungen. Die Besiedlung mit nur einer Gattung war bei per Sectio entbundenen Kindern doppelt so häufig wie bei den vaginal entbundenen Kindern. Eine Besiedlung mit zwei oder mehr Bakteriengattungen trat bei vaginal entbundenen Kindern häufiger auf. Eine Besiedlung mit vier verschiedenen Bakteriengattungen wurde in unserer Untersuchung nur bei einem vaginal entbundenen Kind nachgewiesen. Eine Besiedlung mit mehr als vier verschiedenen Bakteriengattungen konnte nicht beobachtet werden.

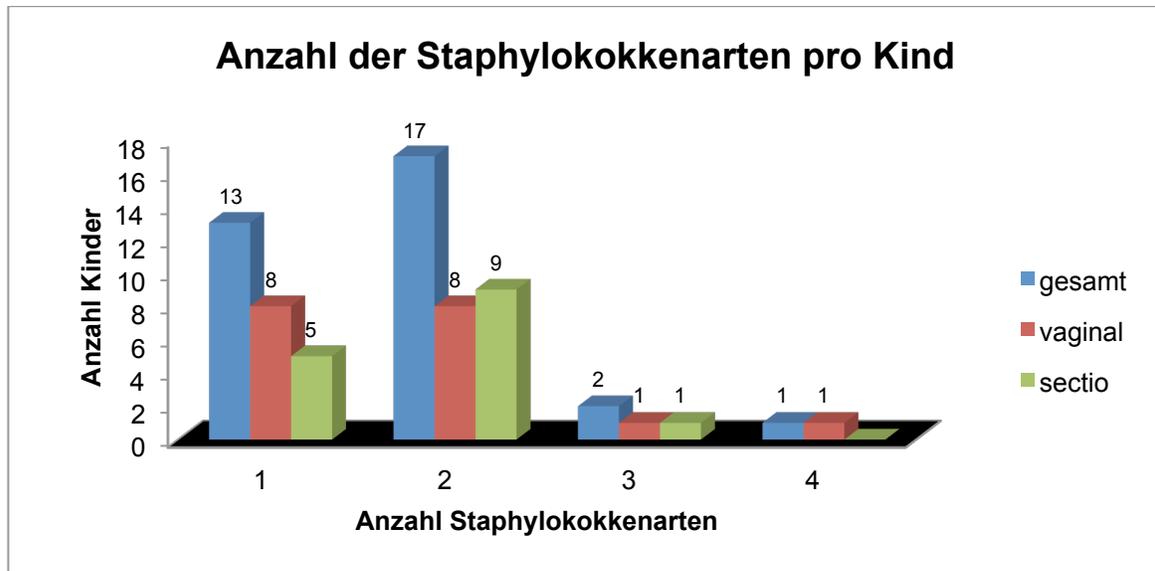


Abbildung 20: Anzahl der Staphylokokkenarten pro Kind

Wie viele verschiedene Staphylokokkenarten jeweils bei einem Kind beobachtet wurden zeigt Abbildung 20. 13 Kinder wurden nur von einer Staphylokokkenart besiedelt, wovon acht vaginal und fünf per Sectio entbunden wurden. Zwei verschiedene Staphylokokkenarten pro Kind wurden am häufigsten nachgewiesen, wobei dies bei per Sectio entbundenen Kindern geringfügig öfter zu sehen war. Eine Besiedlung mit drei oder vier Staphylokokkenarten wurde nur zwei bzw. einmal beobachtet.

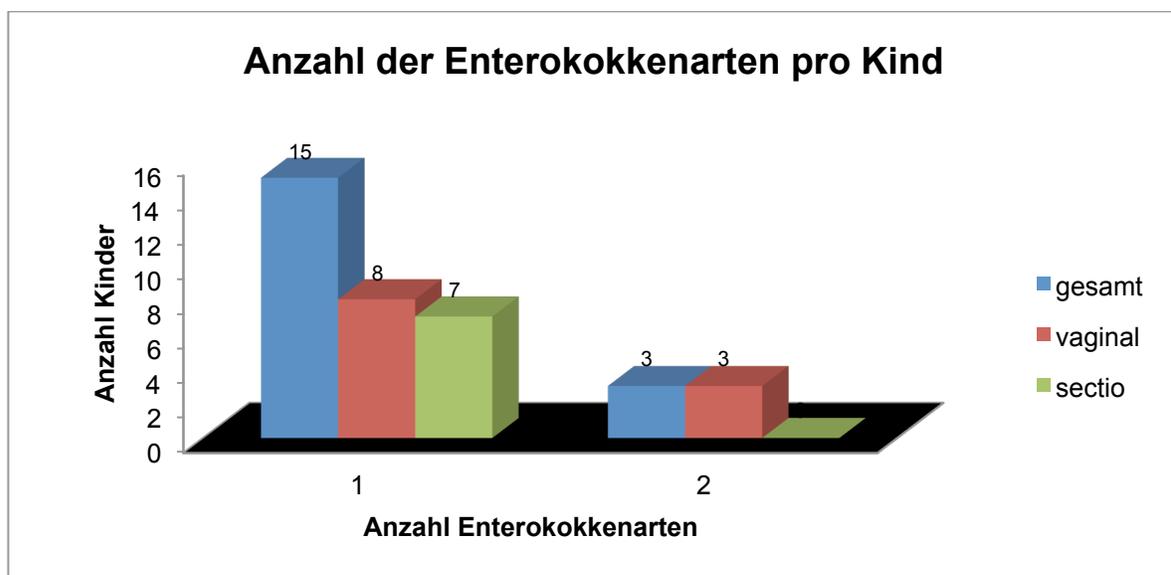


Abbildung 21: Anzahl der Enterokokkenarten pro Kind

Die Anzahl der verschiedenen Enterokokkenarten, die pro Kind auftraten, ist in Abbildung 21 zu sehen. Bei 15 Kindern trat nur eine Enterokokkenart auf und dies bei vaginal entbundenen Kindern einmal mehr. Zwei verschiedene Enterokokkenarten traten nur bei drei vaginal entbundenen Kindern auf. Eine Besiedlung mit mehr als zwei Enterokokkenarten konnte nicht beobachtet werden.

### 3.7 Resistenzverhalten bei Staphylokokken

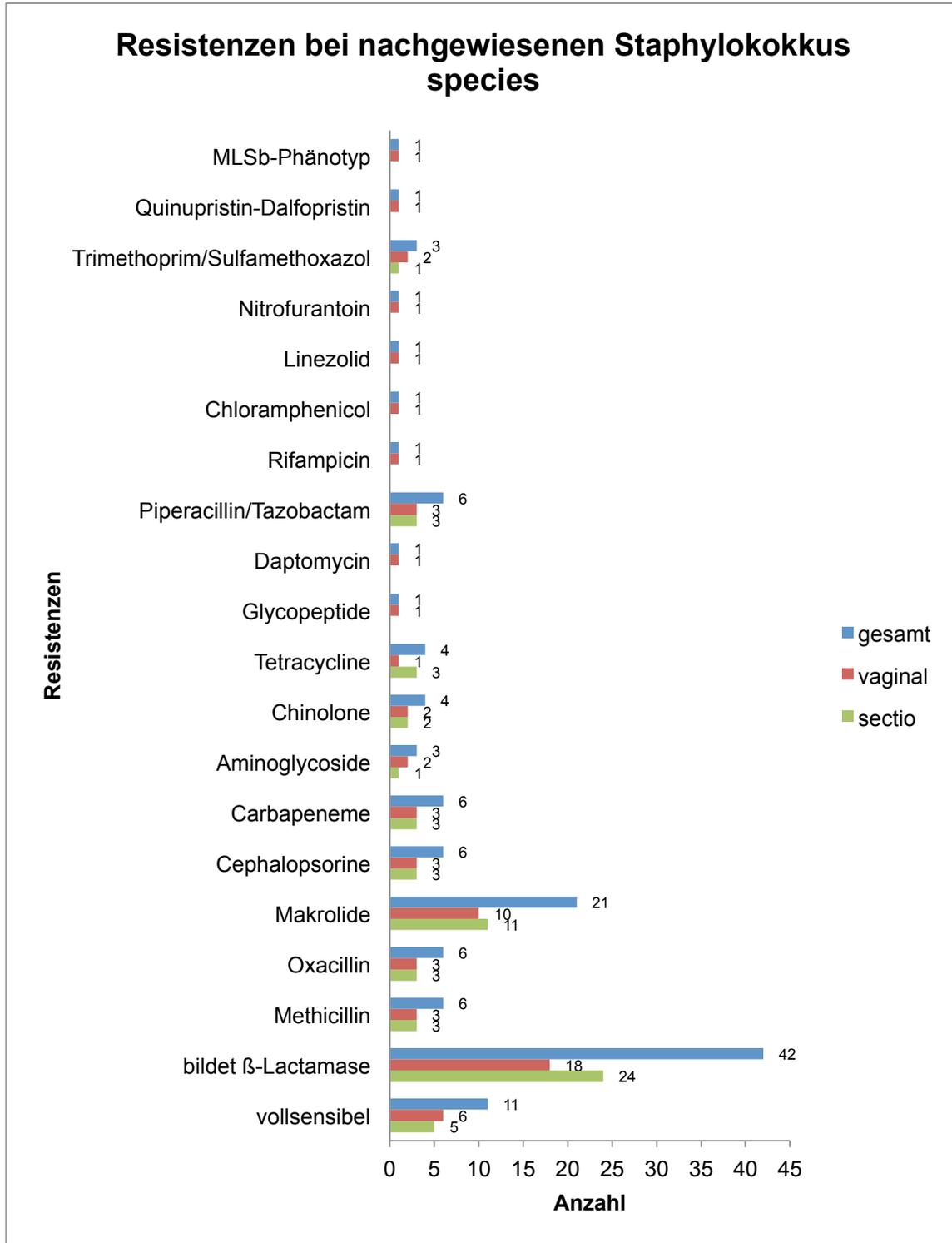


Abbildung 22: Resistenzen bei nachgewiesenen Staphylokokkus species

Abbildung 22 zeigt, welche Resistenzen bei den Staphylokokken, unabhängig von der Art, vorlagen. Eine Vollsensibilität der Bakterien konnte nur 11 Mal beobachtet werden. Staphylokokken traten insgesamt 58 Mal auf, wobei der Großteil davon, nämlich 42,  $\beta$ -Lactamase bildeten. Dies war häufiger bei den per Sectio entbundenen Kindern zu sehen. Am zweithäufigsten traten Resistenzen gegen Makrolide auf, wobei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Entbindungsmodus zu beobachten war. Sechs Mal wurden unabhängig vom Geburtsmodus Methicillin-, bzw. Oxazillinresistenzen nachgewiesen. Ein MLSb-Phänotyp trat einmal bei einer vaginalen Entbindung auf.

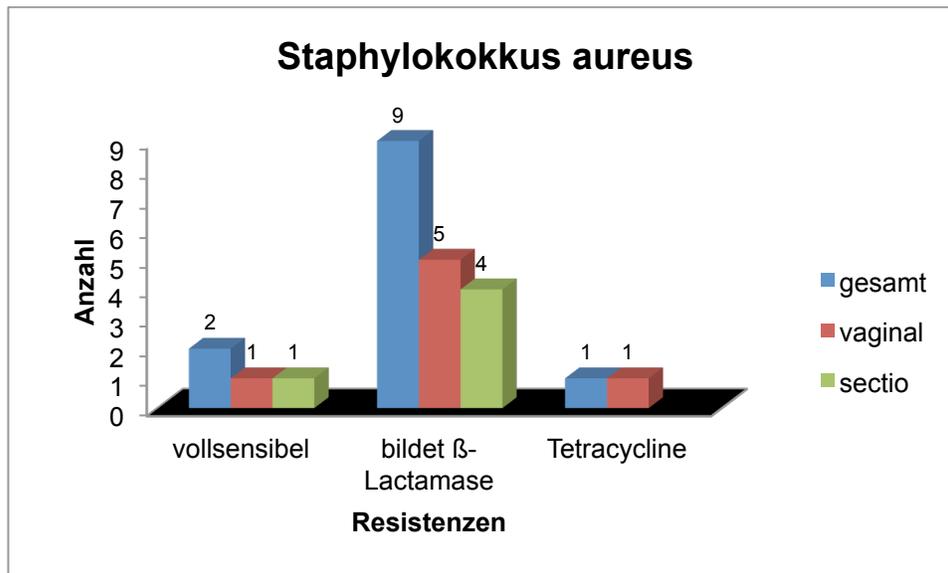


Abbildung 23: Resistenzen bei Staph.aureus

Das Resistenzmuster bei den *S.aureus*-Kolonien ist in Abbildung 23 dargestellt. Es trat kein MRSA auf. Die Mehrzahl der *S.aureus* bildete  $\beta$ -Lactamase. Eine Vollsensibilität trat nur in zwei Fällen auf, sowie einmalig eine Tetracyclinresistenz. Insgesamt zeigten die *S.aureus*-Stämme ein geringes Auftreten von Resistenzen und dabei auch keine signifikanten Unterschiede beim Geburtsmodus.

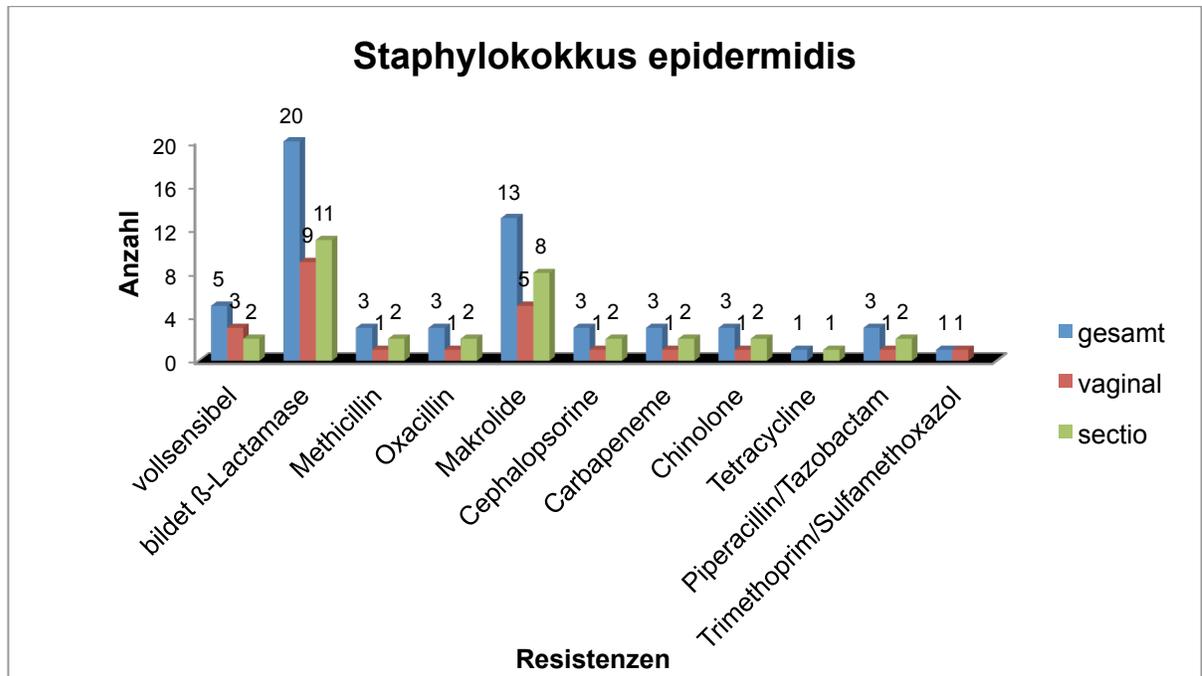


Abbildung 24: Resistenzen bei Staph.epidermidis

Die *S.epidermidis*-Kolonien wiesen ein sehr buntes Resistenzbild auf, wie in Abbildung 24 zu erkennen ist. Eine Vollsensibilität trat nur fünfmal auf. Am häufigsten war eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität zu beobachten, wobei dies bei den per Sectio entbundenen Kindern etwas häufiger auftrat. Eine Resistenz gegen Makrolide beobachteten wir 13-mal, am häufigsten bei den per Sectio entbundenen Kindern. Andere Resistenzen traten nur vereinzelt auf, allerdings auch hier häufiger bei den per Sectio entbundenen Kindern.

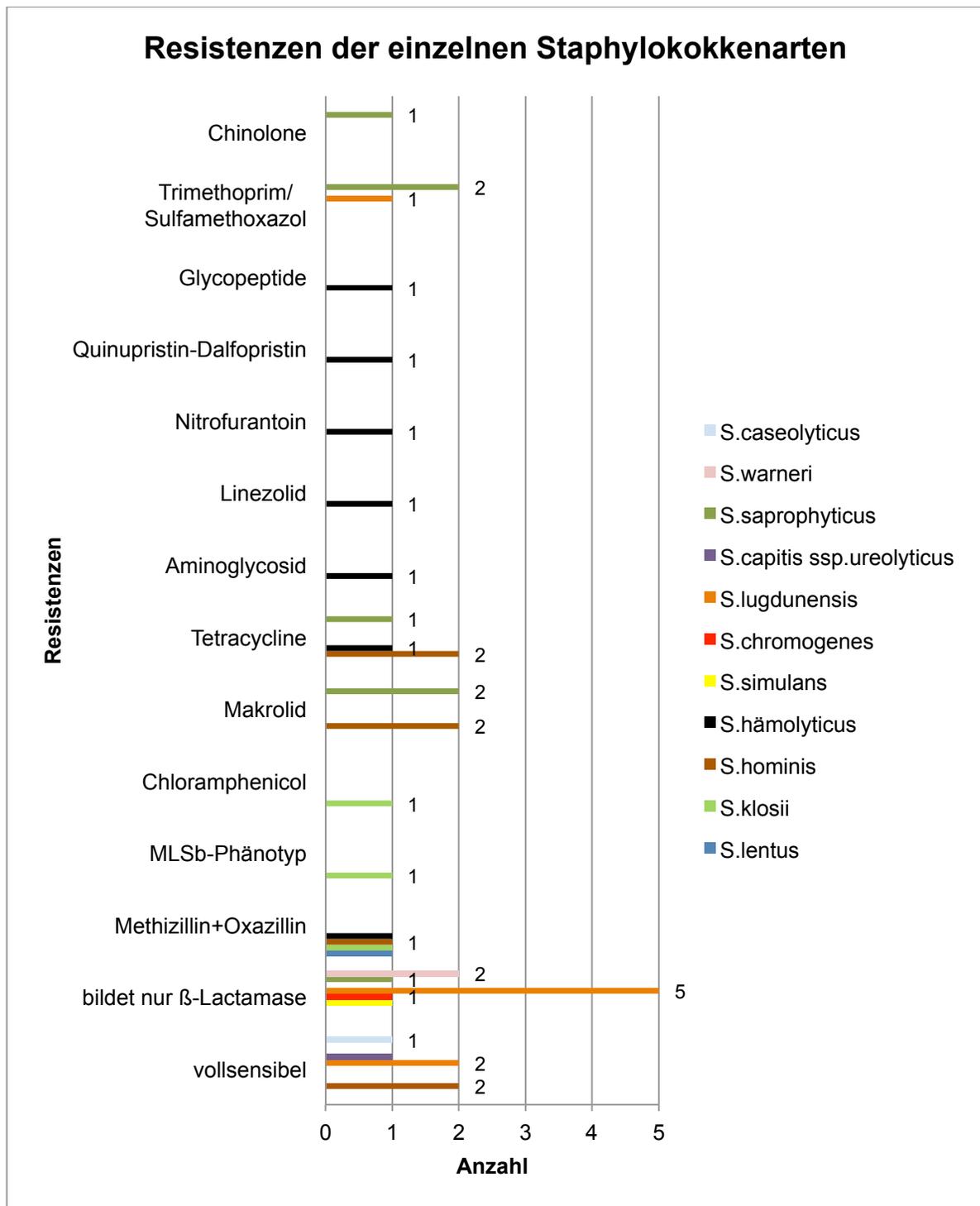


Abbildung 25: Resistenzen der einzelnen Staphylokokkenarten

Abbildung 25 zeigt die Resistenzen der restlichen aufgetretenen Staphylokokkenarten (nicht von *S.aureus* und *S.epidermidis*). Am häufigsten zeigte sich eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität bei *S.lugdunensis*. Ein MSLb-Phänotyp trat einmal bei *S.klosii* auf. Jeweils einmal konnte eine

Methizillin- und Oxazillinresistenz bei *S.hämolyticus*, *S.hominis*, *S.klosii* und *S.lentus* beobachtet werden. *S.caseolyticus* trat nur einmal als vollsensibel auf. *S.warneri*, *S.chromogenes* und *S.simulans* zeigten ausschließlich eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität. Die *S.saprophyticus* Stämme zeigten eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität und Resistenzen gegen Chinolone, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Tetracycline und Makrolide. *S.capitis* ssp.*ureolyticus* entwickelte keine Resistenz. Fünfmalig zeigte *S.lugdunensis* eine  $\beta$ -Lactamase-Aktivität, einmal eine Resistenz gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol und zweimal keinerlei Resistenzen. Die meisten Resistenzen traten bei *S.hämolyticus* auf, und zwar gegen Glycopeptide, Quinupristin-Dalfopristin, Nitrofurantoin, Linezolid, Aminoglycoside, Tetracycline, Methizillin und Oxacillin.

### 3.8 Resistenzverhalten bei Enterokokken

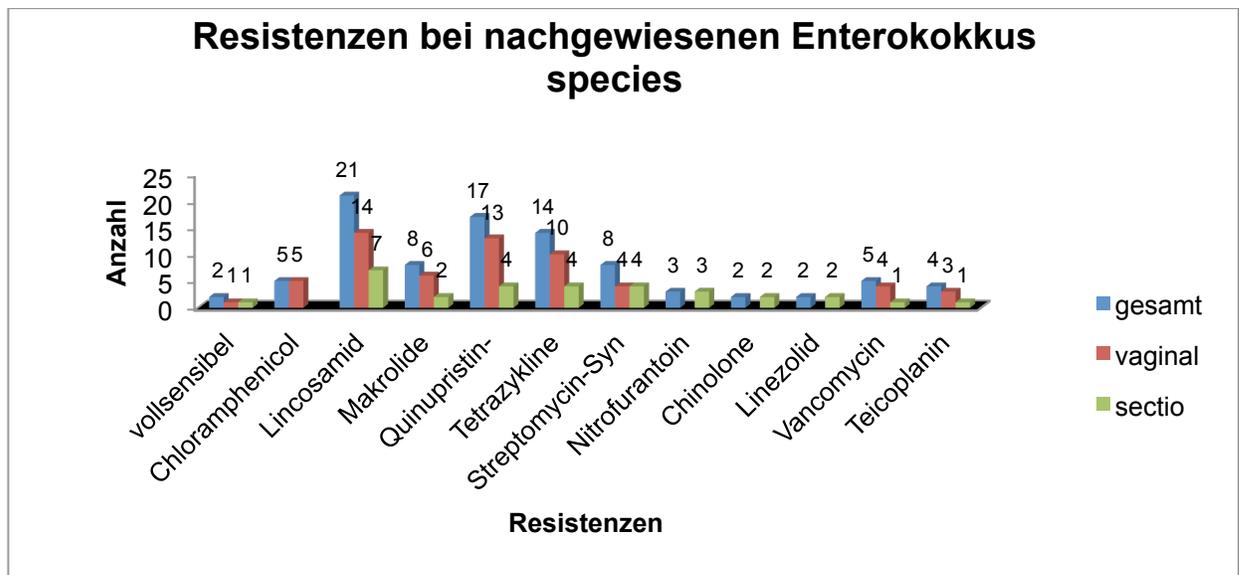


Abbildung 26: Resistenzen bei nachgewiesenen Enterokokkus species

Das Auftreten von Resistenzen bei Enterokokken wird in Abbildung 26 dargestellt. Vollsensibilität lag dabei nur in zwei Fällen vor. Am häufigsten trat eine Resistenz gegen Lincosamid auf, wobei dies bei den vaginal entbundenen Kindern häufiger der Fall war. 17-mal waren Enterokokken gegen Quinupristin-Dalfopristin resistent und 14-mal gegen

Tetrazykline, wobei sich auch hier eine Dominanz bei den vaginal entbundenen Kindern zeigte. Bei den per Sectio entbundenen Kindern wurde zweimalig ein intermediäres Verhalten gegenüber Linezolid nachgewiesen. Gegen die Reserveantibiotika Vancomycin und Teicoplanin trat fünf- bzw. viermal eine Resistenz auf. Auch hier war dies häufiger bei den vaginal entbundenen Kindern der Fall. Resistenzen gegen Nitrofurantoin und Chinolone traten selten und nur bei den per Sectio entbundenen Kindern auf.

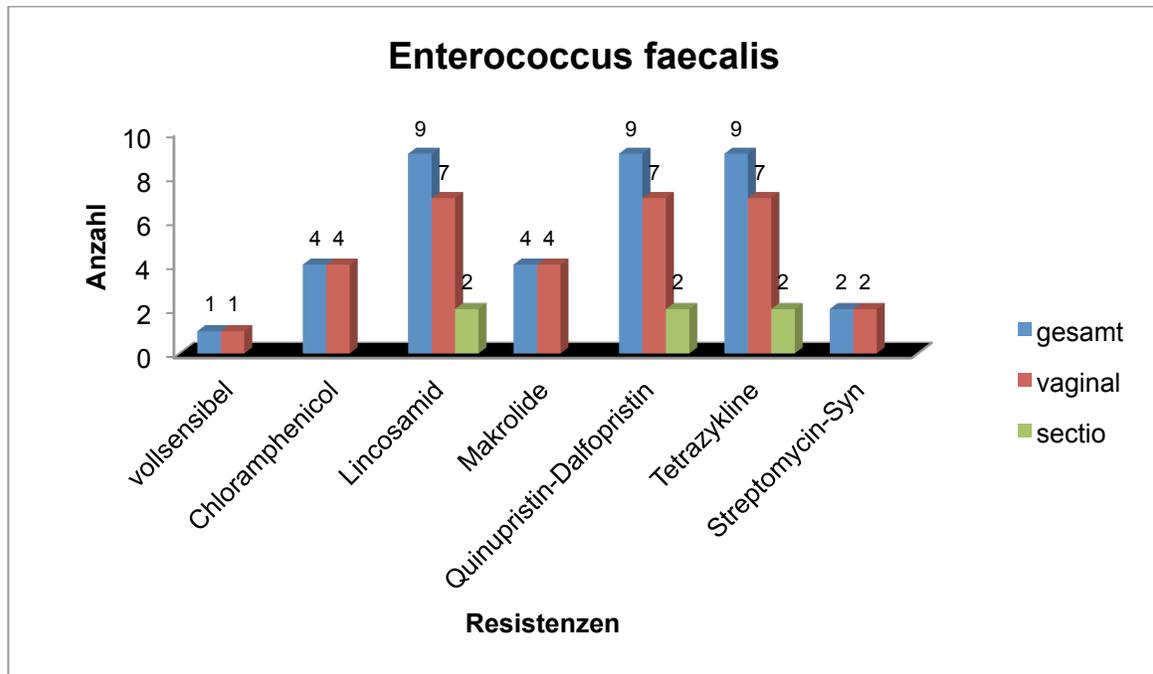


Abbildung 27: Resistenzen bei *E. faecalis*

Die Resistenzlage bei den *E. faecalis*-Stämmen wird in Abbildung 27 gezeigt. Eine Vollsensibilität war nur einmal bei einem vaginal entbundenen Kind zu finden. Bei 10 Stämmen trat eine Resistenz gegenüber Tetrazyklinen, Quinupristin-Dalfopristin und Lincosamiden auf, mit einer deutlichen Dominanz bei den vaginal entbundenen Kindern. Gegen Makrolide fand sich viermal eine Resistenz und gegen Streptomycin-Syn zweimal eine Resistenz bei den vaginal entbundenen Kindern.

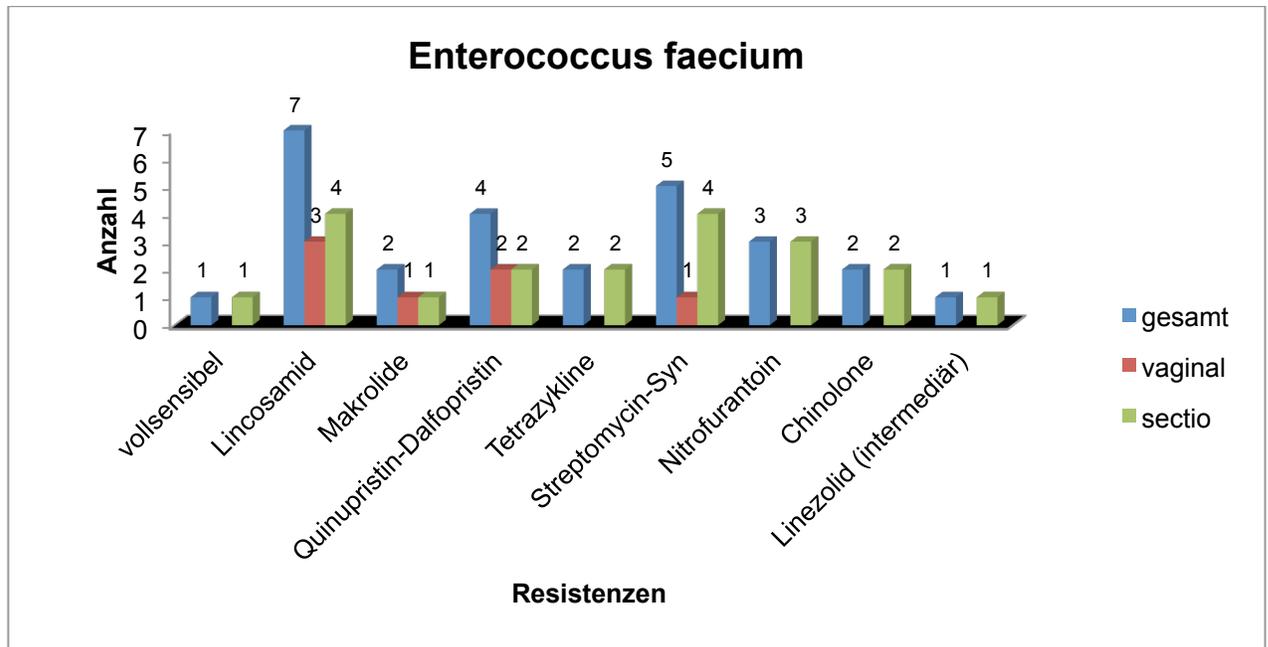


Abbildung 28: Resistenzen bei *E. faecium*

Bei den vaginal entbundenen Kindern trat beim *E. faecium* nur dreimal gegen Lincosamide, zweimal gegen Quinupristin-Dalfopristin und einmal gegen Streptomycin-Syn eine Resistenz auf, wie in Abbildung 28 ersichtlich ist. Bei den per Sectio entbundenen Kindern trat bei *E. faecium* am häufigsten eine Resistenz gegen Lincosamide auf, gefolgt von Streptomycin-Syn und Nitrofurantoin. Eine Vollsensibilität lag nur einmal bei diesen Kindern vor. Zweimalig zeigte sich eine Resistenz gegen Quinupristin-Dalfopristin, Tetrazykline und Chinolone. Einmal fand sich eine Resistenz gegen Makrolide und ein intermediäres Verhalten bei Linezolid.

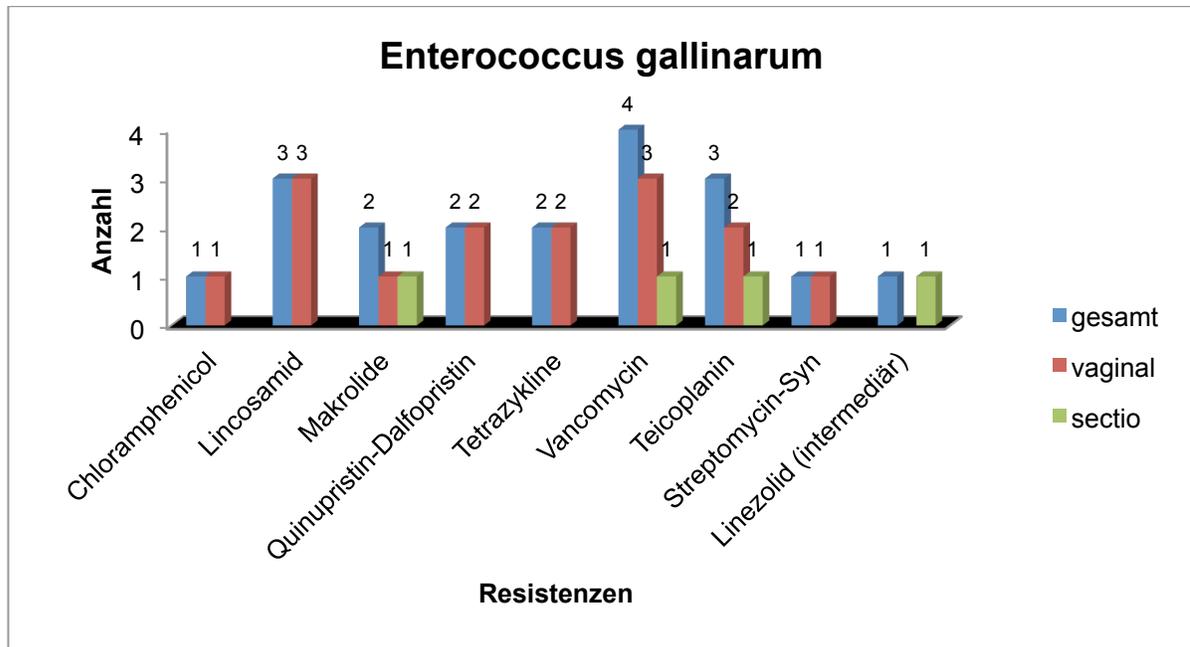


Abbildung 29: Resistenzen bei *E.gallinarum*

Abbildung 29 stellt die Resistenzlage bei den *E.gallinarum*-Kulturen dar. Es zeigte sich keine Vollsensibilität. Alle *E.gallinarum*-Stämme waren gegen Vancomycin resistent. Eine Resistenz gegen Lincosamid trat bei allen vaginal entbundenen Kindern auf, nicht jedoch bei dem Stamm des per Sectio entbundenen Kindes. Bei zwei Stämmen der vaginal entbundenen Kinder lag eine Resistenz gegen Teicoplanin und bei einem Stamm eine Resistenz gegen Chloramphenicol und Streptomycin-Syn. vor. Außerdem fanden wir bei zwei der drei Stämme eine Resistenz gegen Quinupristin-Dalfopristin und Tetrazykline. Der Stamm bei dem per Sectio entbundenen Kind zeigte eine Resistenz gegenüber Makroliden, Vancomycin, Teicoplanin und gegenüber Linezolid ein intermediäres Verhalten.

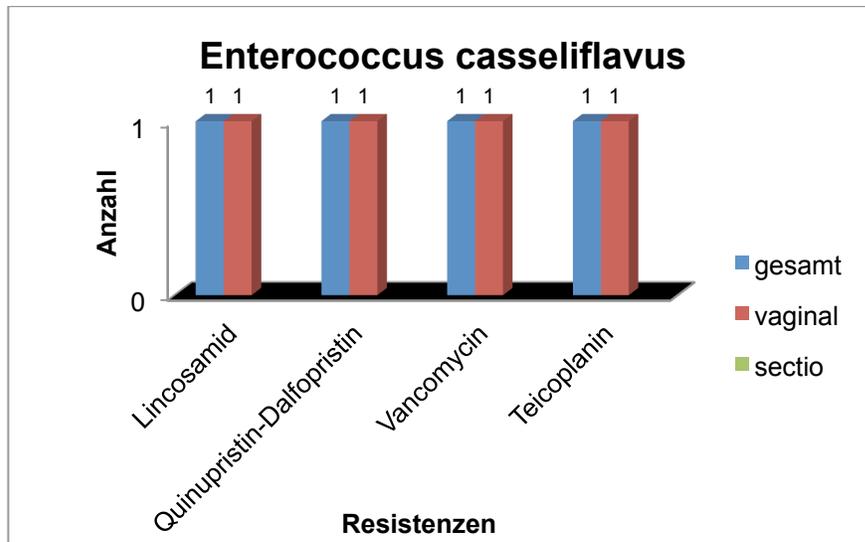


Abbildung 30: Resistenz bei *E.casseliflavus*

Bei den vaginal entbundenen Kindern trat einmal *E.casseliflavus* auf, welcher gegen Lincosamid, Quinupristin-Dalfopristin, Vancomycin und Teicoplanin resistent war. Dies ist in Abbildung 30 ersichtlich.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zeitpunkt des ersten Auftretens von Bakterien und dessen Beeinflussung**

Wir untersuchten das erste Auftreten von Bakterien im Darm von Neugeborenen am ersten, zweiten und dritten Lebenstag in Abhängigkeit vom Geburtsmodus, da die erstauftretenden Bakterien im Darm direkt nach der Geburt in der Literatur bisher kaum beschrieben wurden und die Besiedlung wahrscheinlich weitreichende Bedeutung im weiteren Leben hat. Zwar gibt es reichlich Publikationen über die Darmflora von Neugeborenen, aber keine, in der die ersten drei Lebenstage von gesunden Neugeborenen fortlaufend untersucht wurden. Vergleichende Untersuchungen fanden nur bei per Sectio entbundenen extrem untergewichtigen Frühgeborenen und vaginal entbundenen gesunden Kindern statt. Wir untersuchten die Stuhlproben von 42 gesunden Neugeborenen, von denen 22 vaginal und 20 per Sectio entbunden wurden. Für die mikrobiologischen Untersuchungen der Stuhlproben entschieden wir uns für die Bakterienkultur. Zwar wurden in molekularen Analysen mehr Bakterien gefunden (38), aber uns war es wichtig, nur lebende Bakterien in unsere Studien einzubeziehen, da bei der molekularen Analyse die Möglichkeit besteht, dass bei der PCR auch DNA-Bruchstücke von abgetöteten Bakterien analysiert werden. Die Bebrütung der Bakterienkulturen erfolgte unter aeroben und unter mikroaerophilen Bedingungen, da bei der Geburt der Darm der Säuglinge reich an Sauerstoff ist und dadurch die erste Besiedlung durch Aerobier und fakultative Anaerobier erfolgt (1, 12, 13, 19). Durch den hohen Sauerstoffgehalt im Darm herrscht ein höheres Redoxpotential, wodurch sich nur Bakterien ansiedeln können, die in der Lage sind, oxidativ zu metabolisieren. Erst nachdem der Sauerstoff metabolisiert ist und ein anaerobes Klima herrscht, können Anaerobier folgen und den Darm besiedeln (1, 12, 13, 22, 39).

Das Auftreten von Anaerobiern wurde in Studien frühestens nach einer Woche beobachtet (2, 33, 36).

In unserer Studie wurden 35 Säuglinge termingeboren. Lediglich sieben waren Frühgeburten in der 36. bzw. 37 SSW.

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass der Darm bis zur Geburt mit steriler Amnionflüssigkeit gefüllt ist (1, 4, 12, 37, 39), wobei Moore et al. 2011 eine bakterielle

Besiedlung der Amnionflüssigkeit und des Mekoniums beschrieben. Die ersten Besiedler bei vaginal entbunden Kindern stammen aus der Vaginal- bzw. Darmflora der Mutter (22). Dieser Einfluss fehlt bei den per Sectio entbundenen Kindern.

Bei unseren Untersuchungen waren am ersten Lebenstag bereits 42,86 % der Stuhlproben mit Bakterien besiedelt. Diese Ergebnisse stützen Erkenntnisse aus mehreren anderen Studien, in denen auch am ersten Lebenstag aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien im unteren Gastrointestinaltrakt beschrieben wurden (12, 15, 35, 38, 40), aber ebenso wurde auch ein erstes Auftreten von Bakterien erst nach einigen Tagen beobachtet (2, 32, 36).

Eine Besiedlung am ersten Tag konnte in unseren Untersuchungen bei 26,19 % der vaginal entbundenen Kinder festgestellt werden, im Gegensatz dazu waren die Stuhlproben der per Sectio entbundenen Kinder am ersten Lebenstag um 9,52 % weniger mit Bakterien kolonisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Darm vaginal entbundener Kinder im Verlauf der ersten drei Lebenstage am ersten Tag deutlich häufiger besiedelt war als an Tag zwei und drei, was bei den per Sectio entbundenen Kindern nicht der Fall war.

Auf ein anderes Ergebnis kamen Palmer et al. 2007 in einer Studie. Sie beschrieben, dass kein Effekt des Geburtsmodus auf den Zeitpunkt der Erstbesiedlung bestehe. Ihr Ergebnis ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur zwei der 14 untersuchten Kinder per Sectio entbunden wurden, ihr Beobachtungszeitraum 200 Tage betrug und keine Differenzierung der ersten drei Lebenstage vorgenommen wurde. Unsere Beobachtung, dass der Geburtsmodus einen Einfluss auf den Zeitpunkt der bakteriellen Besiedlung hat, wurde auch in einigen anderen Untersuchungen beschrieben (1, 4, 21, 39, 41). Fryklund et al. 1992 zeigten, dass es eine vertikale Übertragung der Bakterien von 12% bei vaginal entbundenen Kindern gibt und 0% bei per Sectio entbundenen Kindern. Die vaginal entbundenen Kinder wiesen bereits am ersten Lebenstag Bakterien im Stuhl auf (15). Kirjavainen et al. 1999 beobachteten sogar eine Unterdrückung der Kolonisation bei per Sectio entbundenen Kindern für bis zu 10 Tage. Dies ist durch den fehlenden Kontakt zur mütterlichen Vaginal- und Darmflora während der Geburt erklärbar. Der Geburtsmodus hat somit einen signifikanten Effekt auf die intestinale Mikrofloraentwicklung (32).

Per Sectio entbundene Kinder erhalten ihre Darmflora durch die Umwelt. Hauptquelle scheinen dabei die Eltern zu spielen, die ihre Hautflora durch Brustfütterung und Umsorgung der Kinder übertragen (29, 36). Andere Quellen sind der Kontakt zu Geschwistern und

Haustieren (26). Eine Übertragung durch Krankenhauspersonal wurde nur in älteren Studien beschrieben (14) und ist laut aktuelleren Studien kaum noch relevant (26, 29). Dieser Übertragungsweg ist wahrscheinlich durch die heutzutage höheren hygienischen Maßnahmen in Krankenhäusern geringer geworden.

## **4.2 Die erstbesiedelnden Bakteriengattungen und deren Bedeutung**

Wir konnten beobachten, dass Staphylokokken die häufigsten erstbesiedelnden Bakterien waren und zu 54,76 % auch als alleinige Erstbesiedler vorkamen. 13 Kinder waren bereits am ersten Lebenstag mit Staphylokokken besiedelt, was sich kontinuierlich bis zum dritten Lebenstag auf 25 Kinder steigerte.

Als zweithäufigste Erstbesiedler traten bei elf Kindern Enterokokken auf, dicht gefolgt von *E.coli* bei zehn Kindern. Bei der genaueren Unterscheidung, ob diese Bakteriengattung allein oder mit einer anderen Bakteriengattungen zusammen zuerst auftritt, fällt aber auf, dass *E.coli* häufiger als Enterokokken als alleiniger Erstbesiedler zu sehen war. Enterokokken traten nur bei fünf Kindern als alleiniger Erstbesiedler auf und bei sechs anderen Kindern in Begleitung von Staphylokokken oder *E.coli*. Wir konnten feststellen, dass die Enterokokkenanzahl sowohl beim Erstauftreten als auch bei der Betrachtung der gesamten Besiedlung des Darms der Kinder deutlich niedriger war als die der Staphylokokken. Außerdem traten die Enterokokken am häufigsten zuerst erst am dritten Lebenstag auf, was für eine spätere Besiedlung mit diesen typischen Darmkeimen spricht. Diese Beobachtung ist ähnlich einer japanischen Studie, in der *E.faecium* erst am dritten Lebenstag auftrat und dann während des ersten Lebensmonats wieder verschwand (42). Insgesamt konnte dennoch eine Besiedlungszunahme der Enterokokken im Verlauf der ersten drei Lebenstage beobachtet werden.

Die *E.coli*-Besiedlung konnte als alleiniger Erstbesiedler häufiger beobachtet werden als die der Enterokokken. Allerdings traten nur bei drei Kindern bereits am ersten Lebenstag *E.coli* auf. Bei neun Kindern wurde erst am dritten Lebenstag eine Besiedlung durch *E.coli* festgestellt. Insgesamt betrachtet nahm aber die Häufigkeit der Besiedlung bei *E.coli* mit 40,48 % vom ersten zum dritten Lebenstag am stärksten zu. Bei den Enterokokken und Staphylokokken war nur eine Zunahme um jeweils 28,57 % zu beobachten. Trotz dieser

starken Zunahme bei den *E.coli* waren 59,52 % der Kinder am dritten Lebenstag mit Staphylokokken besiedelt, nur 47,62 % mit *E.coli* und 42,86 % mit Enterokokken. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Staphylokokken bereits am ersten Lebenstag wesentlich häufiger als die anderen Bakterien auftraten und die *E.coli* sie trotz ihrer stärkeren Zunahme ihres Auftretens in der Gesamtzahl nicht einholen konnten.

Da Staphylokokken keine traditionellen Besiedler der Darmflora sind, ist dieses Ergebnis sehr auffällig und hat womöglich weitreichende Konsequenzen. Studien aus den Jahren 1970 und 1980 zeigten, dass damals Staphylokokken nur sehr selten in der Darmflora von Kindern zu finden waren und dafür *E.coli* früher und häufiger als heute auftraten (27). In einer Studie von 1981 wurde die bakterielle Flora während der ersten Lebenswoche aus dem Stuhl, dem Nabel und dem Mund bestimmt. Alle Neugeborenen zeigten Enterokokken. Enterobacteriaceae traten bei 82 % der Kinder auf und Streptokokken sowie Staphylokokken nur bei 34 % der Kinder (40). In neueren Studien beschrieben Adlerberth et al. 2005, 2008 und Lindberg et al. 2011, dass bei schwedischen Kindern koagulase-negative Staphylokokken die ersten etablierten Bakterien im Darm waren und diese auch häufiger als *E.coli* vorkamen. Vael et al. 2011 zeigten, dass *S.epidermidis* die vorherrschende intestinale Spezies ist. Die verminderte Anzahl von *E.coli* wurde mit einer verminderten Exposition durch den heutzutage kürzeren Krankenhausaufenthalt nach der Geburt, das Rooming-in und die höheren Hygienestandards begründet. Auch in einer anderen neueren Studie wurden koagulase-negative Staphylokokken als charakteristische Erstbesiedler des Neugeborendarms unabhängig vom Geburtsmodus beschrieben (20). Welche Auswirkungen die verminderte Besiedlung mit *E.coli* auf die weitere kindliche Entwicklung hat, ist noch unklar. Bekannt ist aber, dass die Darmflora das Hauptreservoir für multiresistente Enterobacteriaceae wie *E.coli* ist und die Early-Onset-Sepsis und Meningitis bei Neugeborenen häufig durch diese gram-negativen-Bakterien verursacht wird. Gram-negative Infektionen, durch z.B. *E.coli*, sind der Hauptgrund für die frühkindliche Mortalität (34, 45). Somit könnte man zumindest schlussfolgern, dass durch die verminderte *E.coli*-Zahl im Stuhl von Neugeborenen das Infektionsrisiko von Kindern durch diese Keime sinkt.

*S.aureus* spielt eine zunehmend wichtige Rolle in der Darmbesiedlung von Neugeborenen. Er tritt progredient in großer Anzahl auf. Da weniger als 10% der Mütter *S.aureus* in ihrer

Vaginalflora beherbergen, kann diese hohe Anzahl bei den Neugeborenen nicht durch eine vertikale Übertragung erklärt werden. Im Gegensatz dazu findet sich bei fast 40% der Eltern *S.aureus* auf der Haut und in hohen Zahlen in der Nase. Die Hauptquellen der Staphylokokken sind somit die Haut und die Nasalflora der Eltern sowie das häusliche Umfeld, aber nicht wie früher das Krankenhaus. Durch die höheren Krankenhaushygienestandards werden die Kinder in der Regel weniger Mikroben ausgesetzt, was zu einer verminderten Besiedlung des Darms mit den früher üblichen faekalen Bakterien führt. Durch den entstehenden Mangel an Wettbewerb können sich die Staphylokokken einfacher im Darm der Kinder etablieren, obwohl sie im Darm keine optimalen Bedingungen vorfinden. Erst mit dem späteren Auftreten von Anaerobiern fällt ihre Zahl wieder, da sie mit diesen nicht konkurrieren können (26 – 29, 36).

Lindberg et al. 2000 bewiesen, dass *S.aureus* nicht nur ein transienter Passagier in der kindlichen Darmflora ist, sondern, dass diese Stämme über Monate in der Darmflora persistierten. Diese spezifische Besiedlung mit einem Stamm über längere Zeit ist bedeutender als eine sporadische Infektion für einen kurzen Zeitraum für die weitere Entwicklung (43). Diese im Gegensatz zu früher veränderte Zusammensetzung der Darmflora hat weitreichende Folgen, da die Bakterien für Neugeborene essentiell für die Entwicklung der Darmschleimhaut und des GALT sind. Die normale Mikroflora repräsentiert die erste Linie der Verteidigung gegen verschiedene potentielle Pathogene und hat eine enge Beziehung zum Abwehrsystem des Wirtsorganismus (12). Weil der Darm das größte Organ des Immunsystems ist, haben die Bakterien eine sehr große Bedeutung (4, 7, 35, 41). Es wurde gezeigt, dass ein unterentwickelter mukosaler Immunschutz der Grund für höhere Vulnerabilität für Infektionen und mehr Sensibilisierungen auf Lebensmittelallergene in der frühen Kindheit ist (16).

Biasucci et al. 2008 beschrieben ein häufigeres Auftreten von atopischen Erkrankungen in der späteren Kindheit bei per Sectio entbundenen Kindern. Morelli 2008 zeigte, dass die Zusammensetzung intestinaler Bakterien am ersten Lebenstag mit dem späteren Auftreten von Allergien korreliert, es aber keinen Zusammenhang zwischen einer Nahrungsmittelallergie oder einem atopischen Ekzem im frühen Leben und einer fehlenden bakteriellen Besiedlung gibt. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass eine niedrige Zahl von Enterokokken und eine höhere Zahl von *S.aureus* im Alter von jeweils einer Woche und drei

Monaten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Allergie zu entwickeln assoziiert ist (5). Hong et al. 2010 beschrieben, dass Kinder mit Ekzem eine niedrigere mikrobiologische Vielfalt im Stuhl aufweisen, was häufiger bei per Sectio entbundenen Kindern auftritt.

Die Bedeutung des Auftretens bestimmter Bakterien und die Reaktion des Immunsystems wurden von Hesse et al. 2000 verdeutlicht. Sie beschrieben, dass gram-negative Bakterien im Darm, wie z.B. *E.coli*, in hohem Maß IL-10 induzieren, während gram-positive Bakterien, wie z.B. Staphylokokken eher IL-12 induzieren. Monozyten werden durch die Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien stimuliert, IL-10 zu bilden. Das durch die gram-positiven Bakterien induzierte IL-12 aktiviert T-Zellen und regt Natürliche Killerzellen zur Proliferation, zur Produktion von IFN  $\gamma$  und zur Lyse von Zielzellen an. IL-10 reguliert diese Funktion herunter, stimuliert aber die B-Zellreifung. Außerdem induzieren gram-positive Bakterien mehr TNF  $\alpha$ . Diese Zytokine (IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  und IL-12) steigern die Kapazität von Makrophagen, Bakterien zu töten und zu phagozitieren. Durch IFN  $\gamma$  wird die Lysozymproduktion in Makrophagen gesteigert und TNF  $\alpha$  synergisiert mit IFN  $\gamma$  bei der Förderung der Tötung von intrazellulären Bakterien.

Auch Lundell et al. 2007 untersuchten den Zusammenhang der frühen mikrobiellen Besiedlung und deren Auswirkung auf das kindliche Immunsystem. Allerdings fanden sie heraus, dass Kinder im Alter von 4 Monaten, die perinatal mit *S.aureus* besiedelt wurden, signifikant höhere Level von löslichem CD14 in ihrem Plasma aufwiesen. Andererseits zeigten Kinder, die im Alter von 18 Monaten eine Nahrungsmittelallergie hatten, niedrigere Level von löslichem CD14 im Plasma als gesunde Kinder. Das lösliche Plasmaprotein CD14 hat eine immunregulatorische Funktion, indem es die T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zytokinproduktion von T-Zellen und die IgE-Produktion von B-Zellen hemmt. Ein Ansteigen von löslichem CD14 wird normalerweise durch eine Entzündung hervorgerufen. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass eine zeitige Kolonisierung mit *S.aureus* das Immunsystem im Sinne einer Toleranz positiv beeinflusst und weniger Intoleranzen entstehen.

Bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen ist ein Zusammenhang mit der intestinalen Mikroflora bekannt, wie z.B. beim Magenkarzinom, dem MALT-Lymphom, entzündlichen Darmerkrankungen und der nekrotisierenden Enterokolitis (37).

Die Mikroflora des Darms hat eine wichtige metabolische Funktion, indem sie unverdauliche Fasern fermentiert, Vitamin K produziert und Energie in Form von kurzkettigen Fettsäuren zur Verfügung stellt (3, 10, 11, 39). Dadurch gewinnt die bakterielle Besiedlung im frühen Leben Einfluss auf das spätere Auftreten von Übergewicht (24). Es wurde einerseits gezeigt, dass niedrigere Anzahlen von Staphylokokken im Stuhl von Kindern mit einem höheren Risiko für Übergewicht assoziiert sind (3, 8, 44) und andererseits, dass hohe Anzahlen von *S.aureus* mit Übergewicht assoziiert sind (20). Dieses widersprüchliche Ergebnis ist womöglich damit zu erklären, dass bei der einen Studie nur die Assoziation zwischen dem Auftreten von *S.aureus* und Übergewicht betrachtet wurde, bei der anderen Studie aber alle Staphylokokkenarten einbezogen wurden.

### **4.3 Einfluss des Geburtsmodus**

Unsere Untersuchungen zeigten, dass bei vaginal entbundenen Kindern die bakterielle Besiedlung des Darms eher stattfindet als bei per Sectio entbundenen Kindern. 26,19% der vaginal entbundenen Kinder wiesen bereits am ersten Lebenstag eine bakterielle Besiedlung des Darms auf, wohingegen nur 16,67% der per Sectio entbundenen Kinder besiedelt waren. Eine Erstbesiedlung am dritten Tag konnte bei vier der per Sectio entbundenen Kindern beobachtet werden, aber nur bei zwei der vaginal entbundenen Kinder.

Zwar wurden alle Kinder unabhängig vom Geburtsmodus am häufigsten von Staphylokokken besiedelt, dennoch war die Erstbesiedlung durch Staphylokokken bei den per Sectio entbundenen Kindern um 19,05% höher als bei den vaginal entbundenen Kindern.

Ein umgekehrtes Verhältnis zeigte sich bei der Erstbesiedlung mit *E.coli*, hier waren 19,05% der vaginal entbundenen Kinder zuerst von *E.coli* besiedelt und nur 4,76% der per Sectio entbundenen Kinder. Keines der per Sectio entbundenen Kinder wies in unserer Untersuchung am ersten Lebenstag *E.coli* auf und nur 2 Kinder am zweiten Lebenstag. Die vaginal entbundenen Kinder zeigten dagegen in den ersten zwei Lebenstagen häufiger eine erste Besiedlung mit *E.coli*.

Das Erstauftreten von Enterokokken war in unserer Studie am ersten Lebenstag unabhängig vom Geburtsmodus, aber am dritten Lebenstag bei vaginal entbundenen Kindern doppelt so häufig, wie bei per Sectio entbundenen Kindern.

Auch Adlerberth et al. 2006 beschrieben wie wir ein vermindertes Auftreten von *E.coli* bei per Sectio entbundenen Kindern. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieben sie aber ein zeitigeres Auftreten von Enterokokken bei per Sectio entbundenen Kindern und begründeten dies mit deren höherer Resistenz gegen Hygienemaßnahmen im Krankenhaus.

Dies zeigt, dass der Geburtsmodus nicht nur Einfluss auf den Zeitpunkt der Erstbesiedlung nimmt, sondern auch auf die Art des erstbesiedelnden Bakteriums. Während einer vaginalen Geburt entsteht der Kontakt zur vaginalen und intestinalen Flora der Mutter. Dieser Einfluss fehlt bei per Sectio entbundenen Kindern, wodurch sie eine reduzierte Bakterienzahl in ihrem Stuhl zeigen (36). Hierbei spielt die Umwelt eine wichtige Rolle (4, 35, 39).

85% der Bakterien der kindlichen Darmflora bei vaginal entbundenen Kindern sind der mütterlichen Flora ähnlich. Sie dringen einige Minuten nach der Geburt in den Mund des Neugeborenen ein. Der Mageninhalt reflektiert zu diesem Zeitpunkt die zervikale Flora der Mutter, auch wenn sie sich nicht im oberen GIT ansiedeln. Je nach Studienlage beherbergen 1/3 bzw. 2/3 der Neugeborenen den gleichen *E.coli*-Stamm wie die Mutter (12).

#### **4.4 Die bakterielle Vielfalt**

Bei der Betrachtung aller aufgetretenen Bakteriengattungen in Bezug zu ihrem Auftreten bei den einzelnen Kindern fällt auf, dass eine Besiedlung der Kinder mit nur einer Bakteriengattung bei per Sectio entbundenen Kinder mit 19,05% doppelt so häufig auftrat wie bei vaginal entbundenen Kindern. Umgekehrt zeigte sich eine Besiedlung mit zwei oder mehr verschiedenen Bakteriengattungen pro Kind stets häufiger bei vaginal entbundenen Kindern. So beobachteten wir bei 21,43% der vaginal entbundenen Kinder, aber nur bei 16,67% der per Sectio entbundenen Kinder eine Besiedlung mit zwei verschiedenen Bakteriengattungen. Mit drei Bakteriengattungen waren vaginal entbundene Kinder um 7,15% mehr besiedelt als per Sectio entbundene Kinder und vier Bakteriengattungen zeigten sich ausschließlich bei einem vaginal entbundenem Kind.

Bei einer einzelnen Betrachtung der verschiedenen Staphylokokkenarten pro Kind zeigte sich die gleiche Tendenz wie in der Gesamtbetrachtung. Per Sectio geborene Kinder waren häufiger als vaginal entbundene Kinder mit nur einer Art besiedelt und eine Besiedlung mit zwei oder mehr Staphylokokkenarten war von den vaginal entbundenen Kindern dominiert.

Die Anzahlen der verschiedenen Enterokokkenarten pro Kind zeigten keinen relevanten Unterschied im Geburtsmodus, was wahrscheinlich daran liegt, dass die Kinder erst spät mit ihnen besiedelt wurden und eine mögliche Vielfalt und die damit verbundenen Geburtsmodusauswirkungen erst nach drei Tagen beobachtet werden können.

Dies zeigt, dass per Sectio entbundene Kinder in den ersten drei Lebenstagen häufiger mit nur einer Bakteriengattung besiedelt sind, die Vielfalt an bakterieller Besiedlung hinter der vaginal entbundenen Kinder zurückliegt und sie eine veränderte Darmflora haben. Edwards et al. 2002 beschrieb, dass gerade die ersten Tage nach der Geburt kritisch für die Kolonisation des Darms sind. Eine Angleichung an die Darmflora von vaginal entbundenen Kindern findet bei per Sectio entbundenen Kindern erst in einem Alter von drei Monaten und zehn Tagen statt (12). Da die Mikroflora im Darm die Entwicklung des Immunsystems aktiviert und stimuliert und insbesondere eine Steigerung der zirkulierenden spezifischen Antikörper bewirkt, hat dies weitreichende Konsequenzen (7). So wurde eine verminderte mikrobielle Vielfalt bei Kindern mit Ekzem beobachtet (18). Gewolb et al. 1999 zeigten bei Untersuchung der Stuhlflora von Kindern mit extrem niedrigem Geburtsgewicht, dass eine Besiedlung mit weniger als drei Bakterienarten bis zum zehnten Lebenstag zu einer Überwucherung mit pathogenen Keimen führt. Inwieweit sich die verminderte Besiedlung bei termingeborenen und per Sectio entbundenen Kindern hinzieht, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Die zeitigere und reichlichere Besiedlung mit aeroben Bakterien im kindlichen Darm induziert eine starke Stimulation von Immunzellen und durch gram-positive Bakterien eine stärkere Stimulation von IL-12. Diese Unterschiede treten noch vor der Manifestation von Atopien auf (5).

Boutsikon et al. 2011 beschrieben, dass Mikroben im Darm das Immunsystem in Richtung einer nichtallergischen  $T_H1$ -Antwort und einer Herunterregulation der IgE-Synthese stimulieren können. Aus der veränderten Darmflora bei per Sectio entbundenen Kindern resultiert ein gehäuftes Auftreten von allergischen Erkrankungen, wie Asthma (9), weniger Toleranz für Nahrungsmittelallergene, ein Risikoanstieg von 20% für einen Typ-I-Diabetes

(24), ein Risikoanstieg für maligne Erkrankungen und ein gehäuftes Auftreten von Durchfällen (25). Es traten erhöhte Level von IL-13 und IFN  $\gamma$  auf, welche mit Atopien assoziiert sind.

Speziell das vermehrte Auftreten von Staphylokokken ist mit entzündlichen Erkrankungen assoziiert (8). Das Fehlen von intestinaler Mikroflora führt zu einer anhaltenden T<sub>H</sub>2-Typ Antwort, welche die B-Zell induzierte IgE-Produktion unterstützt. Per Sectio entbundene Kinder wiesen öfter eine IgE-Erhöhung im Blut auf und sind positiv assoziiert mit einer atopischen Sensibilisierung für Nahrungsmittelallergene (25). Eine Entbindung per Sectio unterdrückt die normale Flora und entzieht damit dem Neugeborenen die Immunstimulation an einem kritischen Punkt im Leben, an dem das Immunsystem und die Darmbarriere reifen. Der daraus resultierende Mangel an IL-10 und TGF  $\beta$  verändert grundlegend den T<sub>H</sub>2-Phänotyp (21, 22). Daraus ergibt sich, dass die intestinale Neugeborenenflora einen Einfluss auf die Entwicklung des lokalen und systemischen Immunsystems hat (23).

## **4.5 Aufgetretene Staphylokokkenarten und deren Resistenzen**

### **4.5.1 Staphylokokkenarten**

Wir untersuchten aus jeder Stuhlprobe vier verschiedene Kolonien einer Gattung hinsichtlich der Bakterienart und deren Resistenzen. Dabei fiel auf, dass bis auf wenige Ausnahmen immer die gleiche Staphylokokkenart bei einem Kind vorkam und sich diese auch meist über die ersten drei Lebensstage nicht veränderte. Diese Beobachtung wird durch die Studie von Lindberg et al. 2004 gestützt. Es gibt einen Staphylokokkentransfer von den Eltern auf die Kinder und die meisten Familien hatten einen eigenen Stamm, der dann lange Zeit in der Darmflora der Kinder persistierte. Bei unseren Untersuchungen war die vorherrschende Staphylokokkenart mit 50% *S.epidermidis*. Dies wurde auch von Vael et al. 2011 als vorherrschende intestinale Spezies beschrieben und Adlerberth et al. 2008 beschrieben koagulase-negative Staphylokokken als erste etablierte Bakterien im Darm. Die per Sectio entbundenen Kinder zeigten mit 28,57% eine um 7,14% höhere Besiedlung mit *S.epidermidis* als die vaginal entbundenen Kinder. Die hohen Zahlen von *S.epidermidis* sind dahingehend bedenklich, als dass sie eine Sepsis bei Neugeborenen auslösen können. Kinder

mit einer Sepsis durch diese Staphylokokken hatten diese auch in ihrer Stuhlflora (29). In unseren Untersuchungen trat als die zweithäufigste Art *S.aureus* mit 26,19% auf. Hier zeigte sich kein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit vom Geburtsmodus. Da Staphylokokken eine Ursache für Sepsis und Weichteilinfektionen sind (28), ist deren vermehrtes Auftreten nicht unbedenklich. Bei acht Kindern trat *S.lugdunensis* auf, bei sechs Kindern *S.hominis*. Bei beiden Arten waren die per Sectio entbundenen Kinder häufiger betroffen. Andere Staphylokokkenarten traten nur vereinzelt auf.

#### **4.5.2 Resistenzen aller Staphylokokken**

Wir konnten zeigen, dass eine Vollsensibilität der Staphylokokken bei 11 Kindern vorlag, was 18,97% der aufgetretenen Staphylokokkenarten entspricht. Es war kein deutlicher Unterschied in Abhängigkeit vom Geburtsmodus zu erkennen. Ebenso verhielt es sich bei der Methicillinresistenz, die bei sechs Staphylokokkenarten bestand und bei der Makrolidresistenz, die bei 36,21% der Staphylokokken auftrat. 72,41% der Staphylokokken bildeten  $\beta$ -Lactamase, wobei dieser Wert bei per Sectio entbundenen Kindern um 10,35% höher lag.

#### **4.5.3 Staphylococcus aureus**

*S.aureus* zeigte hier keine bedenklichen Resistenzmuster. Es trat keine Resistenz gegen Methicillin auf. Neun *S.aureus* bildeten  $\beta$ -Lactamase, was 75% entspricht, einer war gegen Tetracycline resistent und zwei waren vellsensibel.

Die hohe  $\beta$ -Lactamaseaktivität bei *S.aureus* wurde auch schon von Lindberg et al. 2004 beschrieben. Sie fanden bei schwedischen Kindern eine 78%ige Resistenz von *S.aureus* gegen Penicillin G, was einer  $\beta$ -Lactamasebildung entspricht. Einen MRSA konnten auch sie nicht nachweisen.

Das gesteigerte Vorkommen von *S.aureus* bei westlichen Kindern hat medizinische Konsequenzen. Staphylokokken sind in der Lage, verschiedene Toxine zu bilden. So können Enterotoxine Erbrechen mit und ohne Durchfall hervorrufen. Enterotoxine und TSST 1 funktionieren als Superantigene. *S.aureus*, die Superantigene produzieren, können das

lebensgefährliche Toxic shock syndrom verursachen, dessen Vorkommen zuerst bei Kindern beobachtet wurde, bevor es bei Frauen durch den Gebrauch von Tampons nachgewiesen wurde. Des Weiteren sind diese Superantigene auch bei atopischer Dermatitis, plötzlichem Kindstod und der Kawasaki disease beteiligt und stehen im Zusammenhang mit der steigenden Anzahl von Allergien in westlichen Ländern (29). Lindberg et al. 2000 wiesen nach, dass die Hälfte der bei Kindern nachgewiesenen *S.aureus* die Enterotoxine A, B, C, D und TSST-1 produzierten. Trotzdem konnten bei den Kindern nicht mehr gesundheitliche Probleme als bei anderen Kindern beobachtet werden, was vermutlich an dem niedrigen Sauerstoffgehalt im Darm liegt, der für die Toxinsynthese nicht ausreicht, oder an Antikörpern aus der Muttermilch, die diese Toxine neutralisieren.

Gegensätzlich dazu wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass Kinder, die während der ersten zwei Lebensmonate mit Toxin produzierenden *S.aureus* im Darm besiedelt waren, im Alter von 4 Monaten höhere IgA-Level im Blut hatten. Der erhöhte IgA-Level im Alter von 4 Monaten ist wiederum negativ korreliert mit dem Risiko einer Ekzementwicklung und erhöhten Eosinophilen im Blut im Alter von 18 Monaten. Somit ist ein hoher Plasma IgA-Level im Alter von 4 Monaten assoziiert mit einer höheren Chance für Gesundheit und geringerer Ekzementwicklung in den ersten 18 Lebensmonaten (31). Ursächlich für diese Diskrepanz ist womöglich, dass hier die IgA- und nicht die IgE-Level untersucht wurden. Dies bedarf einer weiteren Klärung in weiterführenden Studien. Auch scheint das vermehrte Auftreten von *S.aureus* mit Übergewicht assoziiert zu sein (20, 44).

## **4.6 Aufgetretene Enterokokkenarten und deren Resistenzen**

### **4.6.1 Enterokokkenarten**

Auch hier untersuchten wir bei jeder Stuhlprobe vier der aufgetretenen gleichen Enterokokkengattungen und stellten ebenso wie bei den Staphylokokken fest, dass es sich fast ausschließlich um identische Arten handelte, was auch für eine durchgehende Besiedlung mit einer Art spricht.

Die häufigste Art mit 43,48% war *E.faecalis*, gefolgt von *E.faecium* mit 34,78%. Vaginal entbundene Kinder zeigten eine um 26,08% höhere Besiedlung mit *Enterococcus faecalis* als

per Sectio entbundene Kinder. Umgekehrt zeigte sich die Besiedlung mit *E.faecium*, hier waren die per Sectio entbundenen Kinder um 8,70% stärker besiedelt. Dies lässt sich womöglich damit erklären, dass *E.faecium* ein typischer Hospitalkeim ist und per Sectio entbundene Kinder mit ihm eher in Kontakt kommen, auch wenn durch die heutigen hohen Hygienemaßnahmen die Übertragungsrate wahrscheinlich niedriger als früher ist.

Das Auftreten von *E.faecalis* und *E.faecium* in den ersten Lebenswochen wurde auch von Adlerberth et al. 2008 beschrieben. Rotimi et al. 1981 zeigten, dass am dritten Lebenstag alle Kinder mit Enterokokken besiedelt waren und *E.faecalis* die häufigste fakultative Spezies war. In einer weiteren Studie wurde *E.faecalis* mit 80-90% auch als dominierende Spezies, gefolgt von *E.faecium* mit 5-15% beschrieben (46). *E.faecalis* ist mit 80 – 90% der häufigste Erreger kindlicher Enterokokkeninfektionen und kann bei Neugeborenen u.a. eine Meningitis hervorrufen (47).

Ihre Quelle scheint nicht die mütterliche Fäkalflora zu sein, da sie unabhängig vom Geburtsmodus sehr zeitig auftraten (1). Unsere Beobachtung, dass sie in niedrigerer Anzahl, als die übrigen aufgetretenen Bakterien erscheinen, teilt auch Fanaro et al. 2003. Ihr Auftreten in niedriger Anzahl während der ersten Lebenswoche und mit einem Monat war bei Kindern, die eine Allergie entwickelten, assoziiert (5). Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren Studie beschrieben, dass ein Überfluss an Bifidobakterien, Enterokokken und Enterobacteriaceae mit dem Auftreten von Ekzemen bei per Sectio entbundenen Kindern assoziiert ist (18). Diese widersprüchlichen Angaben sind vermutlich damit zu erklären, dass in der zweiten Studie mehrere Bakterien einbezogen wurden und dieser Zusammenhang nicht nur auf die Enterokokken zurückzuführen ist.

#### **4.6.2 Enterokokkenresistenzen**

Nur zwei Stämme waren vollsensibel, die restlichen 21 Enterokokkenarten erwartungsgemäß gegen Lincosamide resistent (47). Bei *E.faecalis*, der hauptsächlich bei vaginal entbundenen Kindern auftrat, waren keine ungewöhnlichen Resistenzen zu beobachten. Anders verhielt es sich bei *E.faecium*. Hier waren 50%, unabhängig vom Geburtsmodus, gegen Quinupristin-Dalfopristin resistent, obwohl eigentlich eine Sensibilität zu erwarten gewesen wäre.

Besorgniserregend war auch, dass bei einem Bakterienstamm eines per Sectio entbundenen Kindes ein intermediäres Verhalten gegenüber dem Reserveantibiotikum Linezolid auftrat.

*E.gallinarum* und *E.casseliflavus* haben eine natürliche Resistenz gegen Vancomycin (47), sodass es nicht verwunderlich ist, dass alle vier aufgetretenen Bakterienstämme von *E.gallinarum* und ein Bakterienstamm von *E.casseliflavus* eine Resistenz gegen Vancomycin zeigten. Sie haben normalerweise aber keine Resistenz gegen Teicoplanin oder Linezolid. In unseren Proben zeigten allerdings zwei Stämme der *E.gallinarum* von vaginal entbundenen Kindern und ein Stamm von einem per Sectio entbundenen Kind eine Resistenz gegen Teicoplanin. Zusätzlich wies der Stamm des per Sectio entbundenen Kindes auch noch ein intermediäres Verhalten gegenüber von Linezolid auf, was ihn zu einem sehr gefährlichem Bakterium macht, da es auch gegen die Reserveantibiotika nicht empfindlich ist. Eine Resistenz gegen Teicoplanin fanden wir auch bei *E.casseliflavus*, der bei einem vaginal entbundenen Kind auftrat.

Vancomycin resistente Enterokokken sind ein Grund für nosokomiale Epidemien. In einer türkischen Studie über Neugeborene auf einer Intensivstation wurden 7,3% vancomycinresistente Enterokokken beobachtet, wovon 63% *E.faecalis*, 25% *E.faecium* und 12% *E.gallinarum* zugeordnet werden konnten. Ein Auftreten dieser VRE konnte nicht auf Normalstationen beobachtet werden (46). Verwunderlich an dieser Studie ist allerdings, dass *E.gallinarum* mit in dieser Rechnung aufgeführt wird, da dieser ja, wie oben bereits beschrieben, eine natürliche Resistenz gegen Vancomycin besitzt und dies kein ungewöhnliches Ergebnis darstellt.

## **5 Zusammenfassung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr.med.

### **Heterogenität von Mikroorganismen im Stuhl von Neugeborenen**

Eingereicht von: Friederike Funk

angefertigt am / in: Institut für Mikrobiologie / Leipzig

betreut von: Prof. Dr. B. König

Dezember 2013

Die erste bakterielle Besiedlung des Darms von Neugeborenen hat weitreichende Einflüsse auf die spätere Entwicklung der Kinder. Unsere Untersuchungen der Stuhlproben von Neugeborenen in den ersten drei Lebenstagen zeigte Unterschiede in der Besiedlung bei vaginal und per Sectio entbundenen Kindern und eine Wandlung in der Heterogenität der Stuhlflora im Vergleich zu älteren Untersuchungen. Wir konnten zeigen, dass heute Staphylokokken, unabhängig vom Geburtsmodus, die häufigsten Erstbesiedler des Neugeborendarms sind. Sie sind somit die ersten etablierten Bakterien im Intestinaltrakt der Neugeborenen. Bei der Differenzierung nach Geburtsmodus zeigte sich, dass per Sectio entbundene Kinder später besiedelt werden und eine verminderte Heterogenität in ihrer

Stuhlflora aufweisen als vaginal entbundene Kinder. Eine Besiedlung mit typischen Darmkeimen wie *E.coli* und Enterokokken war bei vaginal entbundenen Kindern häufiger zu finden. Per Sectio entbundene Kinder beherbergten dafür vermehrt Staphylokokken. Die häufigste Staphylokokkenart war, unabhängig vom Geburtsmodus, *S.epidermidis*. Andererseits zeigte sich bei den Enterokokkenarten ein Unterschied im Geburtsmodus. Hier waren vaginal entbundene Kinder am häufigsten mit *E.faecalis* besiedelt, die per Sectio entbundenen Kinder hingegen mit *E.faecium*. Der Geburtsmodus scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Resistenzentwicklung zu haben. Hier konnten wir keinen wesentlichen Unterschied zu Bakterien einer gesunden Stuhlflora feststellen. Die im Vergleich zu früheren Studien veränderte Zusammensetzung der Stuhlflora hat insbesondere Auswirkungen auf das Immunsystem der Kinder. Die niedrigere bakterielle intestinale Vielfalt bei per Sectio entbundenen Kindern scheint mit einem erhöhtem Risiko für Atopien einherzugehen. Andererseits sind die typischen Darmbesiedler wie *E.coli* und Enterokokken auch Auslöser schwerwiegender Infektionen in der Neugeborenenperiode. Ob ihr Rückgang in der Stuhlflora auch mit einem Rückgang von frühkindlichen Infektionen assoziiert ist, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Auch die Rolle der Staphylokokken ist noch nicht ausreichend geklärt und muss weiter erforscht werden. Hohe Zahlen von *S.aureus* scheinen mit Übergewicht assoziiert zu sein, andererseits stimulieren sie das Immunsystem wahrscheinlich in Richtung einer Toleranz gegenüber Allergenen. Insbesondere die Rolle der *S.epidermidis* muss weiter untersucht werden, da sie heutzutage die häufigsten Besiedler des Neugeborendarms sind und es hierzu kaum Erkenntnisse über die Auswirkungen gibt. Eindeutig ist, dass Atopien stark zugenommen haben, dies insbesondere bei per Sectio geborenen Kindern. Die erste bakterielle Besiedlung des Darms spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Entwicklung des Immunsystems. Man muss kritisch hinterfragen, ob der hohe hygienische Standard auf Neugeborenenstationen nicht auch negative Auswirkungen auf die bakterielle Vielfalt des kindlichen Darms hat und ob das „Rooming-in“ die Kinder zu hohen Mengen mütterlicher Staphylokokken aussetzt. Auch die Indikation zur Sectio sollte kritischer gestellt werden. Andererseits wäre es möglich, die Babynahrung mit bestimmten Bakterien anzureichern oder auch Teile der mütterlichen Darmflora auf den kindlichen Darm zu übertragen. Da aber noch nicht klar ist, welche Bakterien die entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems spielen und

welche Auswirkungen damit verknüpft sind, sind weiterführende Untersuchungen dringend erforderlich. Die nachfolgende Tabelle verdeutlicht noch einmal unsere Ergebnisse.

	vaginal	per Sectio
Häufigstes Erstauftreten von Bakterien	1. Lebenstag	2. Lebenstag
Häufigstes erstbesiedelndes Bakterium	Staphylokokken (10 Kinder)	Staphylokokken (18 Kinder)
Häufigstes Erstauftreten von <i>E.coli</i>	2. Lebenstag (6 Kinder)	3. Lebenstag (6 Kinder)
Häufigstes Erstauftreten von Staphylokokken	1. Lebenstag (6 Kinder)	2. Lebenstag (8 Kinder)
Häufigstes Erstauftreten von Enterokokken	3. Lebenstag (6 Kinder)	1. und 3. Lebenstag (jeweils 3 Kinder)
Häufigste <i>E.coli</i> -Besiedlung	3. Lebenstag (13 Kinder)	3. Lebenstag (7 Kinder)
Häufigste Staphylokokkenbesiedlung	3. Lebenstag (12 Kinder)	2. Lebenstag (14 Kinder)
Häufigste Enterokokkenbesiedlung	3. Lebenstag (11 Kinder)	3. Lebenstag (7 Kinder)
Häufigste Staphylokokkenart	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Häufigste Enterokokkenart	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Häufigste Anzahl von Bakteriengattungen	Zwei Bakteriengattungen (9 Kinder)	Eine Bakteriengattung (8 Kinder)

Tabelle 1: Ergebnisse in der Gegenüberstellung

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adlerberth I: Factors Influencing the Establishment of the Intestinal Microbiota in Infancy. Nestlé Nutr Workshop Ser Pediatr Program; 62: 13-33 (2008)
2. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Wold AE: Reduced Enterobacterial and Increased Staphylococcal Colonization of the Infantile Bowl: An Effect of Hygienic Lifestyle?. Pediatric Research; 59(1): 96-101 (2006)
3. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A; 101: 15718-23 (2004)
4. Biasucci G, Benenati B, Lorenzo M, Bessi E, Boehm G: Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria. The Journal of Nutrition; 138: 1796S-1800S (2008)
5. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M: Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol.; 108(4): 516-20 (2001)
6. Boutsikou T, Malamitsu-Puchner A: Caesarean section: impact on mother and child. Acta Paediatrica; 100: pp. 1518-1522 (2011)
7. Cebra JJ: Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am J Clin Nutr.; 69(suppl.): 1046S-51S (1999)
8. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S: Effect of Mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. Am. J. Clin. Nutr.; 92: 1023-1030 (2010)
9. Davidson R, Roberts SE, Wotton CJ, Goldacre MJ: Influence of maternal and perinatal factors on the subsequent hospitalization for asthma in children: Evidence from Oxford record linkage study. BMC Pulmonary Medicine; 10: art. No. 14 (2010)
10. Dubos R, Savage D, Schaedler R: Biological Freudianism. Lasting effects of early environmental influences. Pediatrics; 38: 789-800 (1966)
11. Edwards CA, Parrett AM: Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. British Journal of Nutrition; 88(1): S11-S18 (2002)

12. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V: Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr.; Suppl.* 441: 48-55 (2003)
13. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkerman ADL: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*; 68: 219-226 (2002)
14. Fryklund B, Tullus K, Berglund B, Burman LG: Importance of the Environment and the Faecal Flora of Infants, Nursing Staff and Parents as Sources of Gram-Negative Bacteria Colonizing Newborns in Three Neonatal Wards. *Infection* 20; 5: 253-257 (1992)
15. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P: Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 80: F167-F173 (1999)
16. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E: Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 83: F186-F192 (2000)
17. Hessle C, Andersson B, Wold AE: Gram-Positive Bacteria Are Potent Inducers of Monocytic IL-12 while Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infection and Immunity*; 68(6): 3581-3586 (2000)
18. Hong PY, Lee BW, Aw M, Shek LPC, YapnGC, et al.: Comparative Analysis of Fecal Microbiota in Infants with and without Eczema. *PLoS ONE*; 5(4): e9964. Doi:10.1371/journal.pone.0009964 (2010)
19. Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrie E, Fite A, Macfarlane S: Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. *FEMS Microbiology Ecology*; 54: 77-85 (2005)
20. Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E: Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*; 87: 534-8 (2008)
21. Kero J, Gissler M, Gronlund MM, et al.: Mode of delivery and asthma – Is there a connection?. *Pediatr Res*; 52: 6-11 (2002)

22. Kirjavainen PV, Gibson GR: Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *The Finnish Medical Society Duodecim, Ann Med*; 31: 288-292 (1999)
23. Kocourkova I, Zadnikova R, Zizka J, Rosova V: Effect of Oral Application of a Probiotic *E. coli* Strain on the Intestinal Microflora of Children of Allergic Mothers during the First Year of Life. *Folia Microbiol.*; 52(2): 189-193 (2007)
24. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE: Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *PNAS*; 108(suppl.1): 4578-4585 (2011)
25. Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von Berg A, Grübl A, Reinhardt D, Wichmann HE, Koletzko S: GINI Study Group. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child*; 89: 993-7 (2004)
26. Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE: High Rate of Transfer of *Staphylococcus aureus* from Parental Skin to Infant Gut Flora. *Journal of Clinical Microbiology*; 42(2): p.530-534 (2004)
27. Lindberg E, Adlerberth I, Matricardi P, Bonanno C, Tripodi S, Panetta V, Hesselmar B, Saalman R, Aberg N, Wold AE: Effect of lifestyle factors on *Staphylococcus aureus* gut colonization in Swedish and Italian infants. *Clinical Microbiology and Infection*; 17: 1209-1215 (2011)
28. Lindberg E, Adlerberth I, Wold AE: Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* colonizing the intestines of Swedish infants. *Clinical Microbiology and Infection*; 10(10): 890-894 (2004)
29. Lindberg E, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE: Long-time persistence of superantigen-producing *Staphylococcus aureus* strains in the intestinal microflora of healthy infants. *Pediatr Res*; 48: 741-7 (2000)
30. Lundell AC, Adlerberg I, Lindberg E, Karlsson H, Ekberg S, Aberg N, Saalman R, Hock B, Steinkasserer A, Hesselmar B, Wold AE, Rudin A: Increased levels of circulating soluble CD 14 but not CD 83 in infants are associated with early intestinal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clinical & Experimental Allergy*; 37: 62-71 (2007)

31. Lundell AC, Hesselmar B, Nordström I, Saalman R, Karlsson H, Lindberg E, Aberg N, Adlerberg I, Wold AE, Rudin A: High circulating immunoglobulin A levels in infants are associated with intestinal toxigenic *Staphylococcus aureus* and a lower frequency of eczema. *Clinical & Experimental Allergy*; 39: 662-670 (2009)
32. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR: Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*; 69(suppl): 1035S-1045S (1999)
33. Magne F, Suau A, Pochart P, Desjeux JF: Fecal Microbial Community in Preterm Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 41: 386-392 (2005)
34. Millar M, Philpott A, Wilks M, Whiley A, Warwick S, Hennessy E, Coen P, Kempley S, Stacey F, Costeloe K: Colonization and Persistence of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae Strains in Infants Nursed in Two Neonatal Intensive Care Units in East London. *Journal of Clinical Microbiology*; 46(2): p.560-567 (2008)
35. Moore TA, Hanson CK, Anderson-Berry A: Colonization of the Gastrointestinal Tract in Neonates: A Review. *Infant, Child, & Adolescent Nutrition*; 3: 291-295 (2011)
36. Morelli L: Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. *The Journal of Nutrition*; 138: 1791S-1795S (2008)
37. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO: Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*; 5(7): e177. Doi:10.1371/journal.pbio.0050177 (2007)
38. Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, Kang BC, Kim CM: Molecular Analysis of Colonized Bacteria in a Human Newborn Infant Gut. *The Journal of Microbiology*; 43(4): 345-353 (2005)
39. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Brandt PA, Stobberingh EE: Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*; 118: 511-521, DOI: 10.1542/peds.2005-2824 (2006)
40. Rotimi VO, Duerden BI: The Development of the Bacterial Flora in Normal Neonates. *J. Med. Microbiol.*; 14(1): 51-62 (1981)
41. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E: Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven years old children. *Gut*; 53: 1388-9 (2004)

42. Songjinda P, Nakayama J, Kuroki Y, Tanaka S, Fukuda S, Kiyohara C, Yamamoto T, Izuchi K, Shirakawa T, Sonomoto K: Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants. *Biosci Biotechnol Biochem.*; 69: 683-41 (2005)
  
43. Tannock GW: Commentary: Remembrance of microbes past. *Int J Epidemiol*; 34: 13-15 (2005)
  
44. Vael C, Verhulst SL, Nelen V, Goossens H, Desager KN: Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. *Gut Pathog.*; 3(1): 8 (2011)
  
45. Watt S, Lanotte P, Mereghetti L, Moulin-Schouleur M, Picard B, Quentin R: Escherichia coli Strains from Pregnant Woman and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors. *J.Clin.Microbiol.*; 41(5): 1929-1935 (2003)
  
46. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yulug N: Vancomycin-resistant Enterococci in Neonates. *Scand J Infect Dis*; 33: 803-805 (2001)
  
47. *Darai G, Handermann M, Sonntag HG, Zöller L: Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. 4. Auflage, Springer 2012 Berlin*
  
48. *Groß U: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. pp. 74-75, 2. Auflage, Thieme 2009 Stuttgart*
  
49. *Hof H, Dörries R: Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. pp. 9, 59-60, 75-81, 103-105, 297-306, 319-320, 387-390, 3. Auflage, Thieme 2005 Stuttgart*
  
50. *Janewy CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie. pp. 432-442, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin*
  
51. *Speer CP, Gahr M: Pädiatrie. pp. 159, 626-627, Springer 2001 Berlin*

## **7 Anlagen**

### **7.1 Danksagung**

Ich möchte mich hiermit herzlich bei Frau Prof. Dr. Brigitte König bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen, mir mit ihrem fachlichen Wissen immer zur Seite stand und viele freie Abende für mich geopfert hat. Besonders möchte ich mich bedanken, dass sie mir auch die Weiterbetreuung nach ihrem Universitätswechsel weiterhin ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Eva-Maria Cebulski, Mitarbeiterin der Medizinischen Mikrobiologie in Magdeburg, die mir bei meinen unzähligen Fragen während der mikrobiologischen Untersuchungen immer mit praktischen Tipps und Hilfsbereitschaft zu zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern und meinem Freund für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung und Motivation, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich Julia Zimmermann für ihre Ausdauer beim Korrekturlesen danken.

## 7.2 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 01.12.2013

Friederike Funk

### 7.3 Lebenslauf

#### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Friederike Funk  
Anschrift: Weberstraße 12  
39112 Magdeburg  
Geburtsdatum: 02. Februar 1982  
Geburtsort: Leipzig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### STUDIUM/AUSBILDUNG

---

10/06-11/12 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Magdeburg  
09/00-08/03 Berufsausbildung zur Arzthelferin  
bei Dipl.med. E.Funk  
10/98-07/99 Berufsausbildung zur Werbekauffrau

#### SCHULBILDUNG

---

2003-2006 Fachgymnasium Dessau  
1999-2000 Fachoberschule Gestaltung Köthen  
1997-1998 Sekundarschule W.-Gölsau  
1994-1997 Ludwigsgymnasium Köthen  
1992-1994 Fr.-Schiller-Gymnasium Leipzig  
1988-1992 Grundschule Leipzig

#### AUSBILDUNGSABSCHLUSS

---

2012 Approbation  
2006 Allgemeine Hochschulreife  
2003 Arzthelferin

#### BERUFSPRAXIS

---

Ab 12/12 Assistenzärztin für Kardiologie Universitätsklinik  
Magdeburg  
10/10-02/11 Teilnahme am Rufbereitschaftsdienst der  
Universitätsklinik für Unfallchirurgie  
07/08-06/09 Studentenjob Blutspende  
10/06-06/08 Studentenjob Arztpraxis Funk