

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Intestinales Mikrobiom und inflammatorische Biomarker bei Neugeborenen mit
Verdacht auf Early-Onset-Sepsis

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

Vorgelegt von

Niklas Kerwagen
aus Oberndorf bei Salzburg

Mainz, 2024

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

Tag der Promotion: 19. Mai 2025

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	VI
II.	Abbildungsverzeichnis	VII
III.	Tabellenverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
2	Literaturdiskussion	2
2.1	Die Neugeborenenensepsis.....	2
2.1.1	Definition der Neugeborenenensepsis	2
2.1.2	Epidemiologie der Neugeborenenensepsis.....	2
2.1.3	Ätiologie der Neugeborenenensepsis	3
2.1.4	Risikofaktoren und Diagnostik der Neugeborenenensepsis	3
2.1.5	Therapie und Prävention der Neugeborenenensepsis	4
2.2	Das neonatale Mikrobiom	5
2.2.1	Zusammensetzung des Mikrobioms	5
2.2.2	Entwicklung des neonatalen Mikrobioms und seine Einflussfaktoren.....	8
2.2.2.1	Diskussion einer pränatalen Kolonisation	9
2.2.2.2	Einfluss durch Geburtsmodus.....	9
2.2.2.3	Einfluss durch Ernährung	10
2.2.2.4	Einfluss von Antibiotika.....	12
2.2.3	Mikrobiom und neonatale Sepsis	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Studiendesign, Rekrutierung und Studienpopulation.....	15
3.2	Entnahme der Stuhlproben	16
3.3	Entnahme der Blutproben	16
3.4	Analyse der Stuhlproben.....	16
3.4.1	DNA-Extraktion.....	17
3.4.2	Vorbereitung für Sequenzierung	17
3.4.3	Sequenzierung	17
3.4.4	Zuordnung der Gensequenzen	17
3.5	Analyse der Blutproben	17

3.5.1	Probenvorbereitung	18
3.5.2	Messung per Durchflusszytometrie	18
3.6	Gemeinsame Auswertung von Blut- und Stuhlproben	18
3.7	Materialien	18
3.7.1	Geräte	18
3.7.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.8	Statistische Analysen und Datenmanagement	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Studienkollektiv	21
4.2	Allgemeine Parameter und Sepsisscore	21
4.3	Anzahl der Blutproben	22
4.4	Anzahl der Stuhlproben	24
4.5	Verhältnis der septischen und antibiotisch behandelten Patienten	26
4.6	Stuhl- und Blutproben vom gleichen Tag	27
4.7	Ergebnisse der Blutuntersuchungen	28
4.8	Ergebnisse der Stuhluntersuchungen	31
4.8.1	Relative und total abundance sowie Korrelationen auf Phylumbene	32
4.8.2	Relative abundance und Korrelationen auf Genusebene	37
4.8.3	Biologische Diversitätsparameter	42
4.8.4	Vergleich zwischen Kontroll- und Sepsisgruppe	48
4.8.4.1	Phylumbene	48
4.8.4.2	Genusebene	51
4.8.4.3	Diversitätsparameter	53
4.8.5	Vergleich zwischen Spontangeburt und Sectiones	56
4.8.6	Vergleich hinsichtlich antibiotischer Therapie	57
4.9	Zusammenführende Analyse von Blut- und Stuhluntersuchungen	58
5	Diskussion	62
5.1	Zytokine als diagnostischer Marker	62
5.2	Ergebnisse der Stuhluntersuchungen	64
5.2.1	Diskussion der Studienpopulation bzgl. Phylogenetik und α -Diversität	64

5.2.2	Mögliche Rolle von Bacteroidetes und Firmicutes bei der EOS	66
5.2.3	Rolle der antibiotischen Therapie bei der Beurteilung des neonatalen Mikrobioms	69
5.2.4	Einfluss weiterer Faktoren	70
5.3	Limitationen der Arbeit.....	71
6	Zusammenfassung.....	73
7	Literaturverzeichnis	75
8	Anhang	88
8.1	Protokoll AG Gehring PCR-Vorbereitung	88
9	Danksagung.....	94
10	Tabellarischer Lebenslauf	95

I. Abkürzungsverzeichnis

ARG.....	<i>antibiotic resistance genes</i>
CBA.....	<i>cytometric bead array</i>
CRP.....	<i>C-reaktives-Protein</i>
CS.....	<i>Geburt per Kaiserschnitt</i>
dbp.....	<i>Berger-Parker-Dominanzindex</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EOS.....	<i>Early-Onset-Sepsis</i>
FDR.....	<i>false discovery rate</i>
GBS.....	<i>Gruppe-B-Streptokokken</i>
GIT.....	<i>Gastrointestinaltrakt</i>
HMO.....	<i>human milk oligosaccharides</i>
IPA.....	<i>intrapartale Antibiotikaprophylaxe</i>
IQA.....	<i>Interquartilabstand</i>
LOS.....	<i>Late-Onset-Sepsis</i>
MR.....	<i>Mittlerer Rang (in MWU)</i>
MWU.....	<i>Mann-Whitney-U-Test</i>
NGS.....	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
OTU.....	<i>operational taxonomic unit</i>
SCFA.....	<i>short chain fatty acids</i>
SSW.....	<i>Schwangerschaftswoche</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor Alpha</i>

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bakterienverteilung im GIT	6
Abbildung 2: Dominanz der Genera in den 3 Enterotypen	7
Abbildung 3: β -Diversität mittels multidimensionaler Skalierung der UniFrac-Distanz zw. drei Populationen aus Malawi, Venezuela und den USA	8
Abbildung 4: Anteile der Phyla an den Sequenzen	12
Abbildung 5: Wechselwirkungen zw. Infektionsgeschehen bei Sepsis und Mikrobiom	14
Abbildung 6: Verteilung der Scorepunkte unter den Probanden.....	21
Abbildung 7: Tagesverteilung der gemessenen Blutproben	23
Abbildung 8: Tagesverteilung der statistisch getesteten Blutproben.....	23
Abbildung 9: Verteilung der Scorepunkte unter den getesteten Blutproben.....	24
Abbildung 10: Tagesverteilung der Stuhlproben.....	25
Abbildung 11: Verteilung der statistisch getesteten Stuhlproben.....	25
Abbildung 12: Verteilung der Scorepunkte unter den getesteten Stuhlproben.....	26
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung der Laborparameter IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 mittels Boxplot.	29
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Verteilung der Laborparameter IL-12p70, IL-13, IP-10 und MCP-10 mittels Boxplot.....	30
Abbildung 15: relative abundance aller Proben	32
Abbildung 16: total abundance aller Proben.....	33
Abbildung 17: relative abundance aller Proben auf Genusebene	37
Abbildung 18: Boxplots zu den Diversitätsparametern	42
Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Mediane von Shannon, dbp und Simpson	43
Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf des Medians von Chao1	43
Abbildung 21: Boxplot zur relativen Häufigkeit der Phyla bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 0-2.	49
Abbildung 22: Boxplot zur relativen Häufigkeit der Phyla bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 3-5.	49
Abbildung 23: Boxplot zur relativen Häufigkeit der häufigsten Genera bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 0-2.....	51
Abbildung 24: Boxplot zur relativen Häufigkeit der häufigsten Genera bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 3-5.....	52
Abbildung 25: Boxplots zu Shannon aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis	53
Abbildung 26: Boxplots zu Chao 1 aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis.....	54
Abbildung 27: Boxplots zur Dominanz aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis	54
Abbildung 28: Boxplots zu Simpson aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis	54
Abbildung 29: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und der relative abundance von Firmicutes	60

Abbildung 30: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und Shannon	60
Abbildung 31: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und Simpson	60

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz pro 1.000 Lebendgeburten der EOS nach Gestationsalter aufgeschlüsselt in den USA während der Jahre 2015-2017	2
Tabelle 2: Geräte für die Analyse der Blutproben.....	18
Tabelle 3: Geräte für die Analyse der Stuhlproben.....	19
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Blutproben	19
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Stuhlproben	19
Tabelle 6: Klinische Parameter des Studienkollektivs.	22
Tabelle 7: Vergleich ordinaler bzw. metrischer Parameter mittels MWU-Test	22
Tabelle 8: Anzahl der Blutproben	23
Tabelle 9: Verteilung der getesteten Blutproben	24
Tabelle 10: Anzahl der Stuhlproben	24
Tabelle 11: Kreuztabelle zu Sepsis und Antibiose für alle statistisch ausgewerteten Probanden	26
Tabelle 12: Werte der gemessenen Zytokine. Mediane sowie in Klammern 25. und 75. Perzentile der gemessenen Laborparameter.	28
Tabelle 13: Verteilungsparameter der relative abundance der gemessenen Phyla.	34
Tabelle 14: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 2.....	35
Tabelle 15: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 3.....	35
Tabelle 16: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 4.....	36
Tabelle 17: Verteilungsparameter der relative abundance der häufigsten Genera.	38
Tabelle 18: Spearman-Korrelation der häufigsten Genera an Tag 2	39
Tabelle 19: Spearman-Korrelation der häufigsten Genera an Tag 3	40
Tabelle 20: Spearman -Korrelation der häufigsten Genera an Tag 4	41
Tabelle 21: Häufigkeitsparameter der Diversitätsparameter über alle Proben hinweg.....	42
Tabelle 22: Mediane der Diversitätsparameter an den ersten acht Lebenstagen, bzw. Wert der einzelnen Probe.....	43
Tabelle 23: Spearman -Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 2	44
Tabelle 24: Spearman-Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 3.	44
Tabelle 25: Spearman-Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 4.	44
Tabelle 26: Spearman-Korr- zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 2	45
Tabelle 27: Spearman-Korr. zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 3.....	46
Tabelle 28: Spearman-Korr. zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 4.....	47
Tabelle 29: Mediane der relative abundance der Phyla in den jeweiligen Gruppen.....	48
Tabelle 30: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 0-2	50
Tabelle 31: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 3-5	50
Tabelle 32: Mediane der relative abundance der Genera in den jeweiligen Gruppen.	51
Tabelle 33: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 0-2 .	52

Tabelle 34: MWU-Test bzgl Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 3-5 .	53
Tabelle 35: Mediane der 4 Parameter in den jeweiligen Gruppen.	53
Tabelle 36: MWU-Test der Parameter zw. Kontroll- und Sepsisgruppe in den Tag 0-2	55
Tabelle 37: MWU-Test der Parameter zw. Kontroll- und Sepsisgruppe in den Tag 3-5	55
Tabelle 38: MWU-Test der Phyla bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 0-2.....	56
Tabelle 39: MWU-Test der Phyla bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 3-5.....	56
Tabelle 40: MWU-Test der Genera bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 0-2.....	56
Tabelle 41: MWU-Test der Genera bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 3-5.....	57
Tabelle 42: MWU-Test zu antibiotischer Behandlung bzgl. der Diversitätsparameter an den Entnahmetagen 0-2	57
Tabelle 43: MWU-Test zu antibiotischer Behandlung bzgl. der Diversitätsparameter an den Entnahmetagen 3-5	57
Tabelle 44: Spearman-Korrelation zw. den Diversitätsparametern und den im Blut gemessenen Interleukinen.....	59
Tabelle 45: Spearman-Korrelation zw. den gemessenen Phyla und den im Blut gemessenen Interleukinen	59
Tabelle 46: Spearman-Korrelation zw. ausgewählten Genera und den im Blut gemessenen Interleukinen	61

1 Einleitung

Die Neugeborenenensepsis stellt in westlich geprägten Ländern eine der häufigsten Ursachen für eine erhöhte Mortalität und Morbidität unter Säuglingen dar (Heron, 2018). Trotz mittlerweile standardmäßig empfohlener peripartaler Gruppe-B-Streptokokken-Prophylaxe (GBS) konnte die Gesamtinzidenz der Neugeborenenensepsis nicht gesenkt werden (Schrag et al., 2016). Es besteht daher weiterhin der Bedarf einer präziseren Diagnostik und verbesserten Therapie. Bezüglich der diagnostischen Möglichkeiten wäre ein verlässlicher, sensitiver Biomarker von großem Wert, um bestmöglich informiert die Entscheidung zu einem antibiotischen Therapiebeginn starten zu können. Die Bestimmung eines solchen Biomarkers im Blut bietet sich dabei nicht zuletzt aufgrund der routinemäßig durchgeführten Blutentnahme an. Die bisher bereits in der klinischen Routine verwendeten Zytokine wie IL-6 und IL-8 sind dabei hinsichtlich Sensitivität und Spezifität limitiert (Wynn et al., 2014).

Zu dieser Problemstellung soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten, indem mehrere – bisher nicht etablierte – Zytokine auf ihre potenzielle Funktion als diagnostischer Biomarker getestet werden.

Der zweite Schwerpunkt dieser Dissertation soll auf den möglichen Zusammenhängen zwischen der Neugeborenenensepsis und dem gastrointestinalen Mikrobiom der Neugeborenen liegen. Gerade in den ersten Lebensmonaten ist das Mikrobiom noch sehr beeinflussbar durch äußere Einwirkungen. Es finden sich zunehmend Belege für den Einfluss des Mikrobioms bei der Entstehung vor allem chronischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Diabetes mellitus, Adipositas und Chronisch-Entzündliche Darmerkrankungen. Während einer neonatalen Sepsis ist das mögliche Zusammenspiel zwischen gastrointestinalen Bakterien einerseits und dem menschlichen Körper andererseits jedoch noch weitgehend unerforscht. An diesen Punkt soll diese Studie ansetzen und mittels 16s-DNA-Analysen phylogenetische Untersuchungen des Mikrobioms während der ersten Lebensstage vornehmen. Ziel ist die Ermittlung und Quantifizierung potenzieller Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung, die durch eine systemische Infektion bedingt sein könnten.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Neugeborenenensepsis

Die internationale Forschung zum Thema Neugeborenenensepsis unterliegt einigen schwierigen Grundbedingungen. Zum einen ist es nach wie vor nicht gelungen, eine einheitliche, weithin anerkannte Definition aufzusetzen (Wynn et al., 2014, Strunk et al., 2024). Zum anderen ist nur ein Bruchteil der Erkrankungen durch eine positive Blutkultur nachzuweisen, sodass der Großteil der antibiotischen Behandlungen als sog. „culture-negative sepsis“ erfolgt (Fjalstad et al., 2016).

Die Ausführungen im Folgenden sind unter diesen beiden Gesichtspunkten zu betrachten. Unter „Sepsis“ ist im Folgenden stets die Neugeborenenensepsis gemeint.

2.1.1 Definition der Neugeborenenensepsis

Eine grundlegende Einteilung der Neugeborenenensepsis erfolgt nach dem Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung. Zum einen ist dies die Early-Onset-Sepsis, im folgenden EOS abgekürzt. Diese wird überwiegend definiert durch einen Krankheitsbeginn max. 72 h nach Geburt. Zum anderen die Late-Onset-Sepsis, folglich definiert durch ein Auftreten später als 72 h nach Geburt (LOS). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Bild der EOS. Neben der zeitlichen Unterteilung unterscheiden sich EOS und LOS vor allem durch unterschiedliche Infektionswege und daraus resultierend unterschiedlichen Erregerprofilen. Während die EOS normalerweise durch ein perinatales Geschehen entsteht, steht bei der LOS eine nosokomiale Ätiologie im Vordergrund.

2.1.2 Epidemiologie der Neugeborenenensepsis

Die Inzidenz der kulturgesicherten Neugeborenenensepsis liegt in der westlichen Hemisphäre bei ca. 0,8 bis 1,0 pro 1.000 Lebendgeburten (Schrag et al., 2016, Fjalstad et al., 2016, Stoll et al., 2011). Erwähnenswert ist hierbei, dass zwar die Inzidenz der GBS-Sepsis gesenkt werden konnte, dies aber auf die Gesamtinzidenz von Sepsitiden keinen Einfluss hatte (Schrag et al., 2016). In einer neueren prospektiven Kohortenstudie bestätigten sich diese Zahlen mit 1,08 Fällen pro 1.000 Lebendgeburten (Stoll et al., 2020). Dabei zeigten sich große Unterschiede je nach Schwangerschaftswoche (SSW), wie der folgenden Darstellung zu entnehmen ist:

SSW	Anzahl Pathogennachweis/Anzahl Probanden	Inzidenzrate (1 pro 1.000 Lebendgeburten)
22-38	67/3.628	18,47
29-33	50/8.056	6,21
34-36	14/19.195	0,73
≥ 37	104/185.970	0,56

Tabelle 1: Inzidenz pro 1.000 Lebendgeburten der EOS nach Gestationsalter aufgeschlüsselt in den USA während der Jahre 2015-2017 (Stoll et al., 2020)

Allen Studien zur Neugeborenenensepsis ist ein Grundproblem gemein: das Fehlen einer einheitlichen Definition abseits der durch eine positive Blutkultur gesicherten Sepsis (Wynn et al., 2014). Dies hat zur Folge, dass die Diagnosezahlen der kulturpositiven bzw. kulturnegativen Sepsitiden deutlich voneinander abweichen – die Verhältnisse reichen von 1:6 bis 1:16 (Klingenberg et al., 2018).

2.1.3 Ätiologie der Neugeborenenensepsis

Die beiden häufigsten Erreger der EOS sind GBS und *Escherichia coli* (*E. coli*) (Stoll et al., 2020, Schrag et al., 2016). Dabei zeigt sich eine deutliche Aufteilung dieser beiden Erreger je nach Gestationsalter der Neugeborenen. Unter Reifgeborenen überwiegen GBS deutlich, während Frühgeborene häufiger von *E. coli* betroffen sind (Schrag et al., 2016, Stoll et al., 2011, Weston et al., 2011). Besonders deutlich zeigt sich dieser Befund in einer norwegischen Studie, die nur Reifgeborene eingeschlossen hat und annähernd keine Fälle von *E. coli*-Infektionen dokumentiert hat (Fjalstad et al., 2016). Weitere Bakterien, die die EOS hervorrufen können, sind u. a. *Streptococcus viridans*, *Enterokokken*, *Staphylococcus aureus*, und *Haemophilus influenzae*. In einer Studie aus 2020 hat *E. coli* mittlerweile mit 35,3 % einen größeren Anteil an allen Fällen als GBS (29,8 %), wobei sich auch hier klare Unterschiede bzgl. des Gestationsalters zeigen (Stoll et al., 2020). Sehr selten können auch Viren und Pilze eine Rolle spielen (Stoll et al., 2011, Schrag et al., 2016, Fjalstad et al., 2016, Stoll et al., 2020).

Die Infektion selbst geschieht entweder noch intrauterin über die Plazenta bzw. durch aufsteigende Erreger oder während des Geburtsvorgangs beim Durchtritt durch den Geburtskanal, der mit den entsprechenden Bakterien besiedelt ist. Zweiteres wird als vertikaler Übertragungsweg von Mutter zu Kind bezeichnet (Shane et al., 2017). Es sei erwähnt, dass diese vertikale Übertragung von Bakterien auch als relevant für die Entwicklung des physiologischen Mikrobioms gesehen wird (Ferretti et al., 2018).

2.1.4 Risikofaktoren und Diagnostik der Neugeborenenensepsis

Die relevantesten Risikofaktoren der Neugeborenenensepsis sind maternales Fieber vor bzw. während der Geburt, vorzeitiger Blasensprung, eine mögliche GBS-Besiedlung der Mutter und das Gestationsalter (Zemlin et al., 2019, Puopolo et al., 2011, Stoll et al., 2020). Eine Diagnose der Neugeborenenensepsis erfolgt – wie bereits erwähnt – entweder durch eine positive Blutkultur oder Liquorprobe oder durch eine Kombination klinischer und laborchemischer Parameter. Problematisch bei den Blutkulturen ist die Verzögerung zwischen Abnahme und Befundergebnis, da innerhalb dieses Zeitraums für gewöhnlich die Entscheidung für oder gegen eine antibiotische Therapie getroffen wird. Eine retrospektive Studie aus Belgien, die Coagulase-negative Staphylokokken miteinschloss, ermittelte eine mediane Zeit bis zum positiven Befund (time to positivity) von Blutkulturen bei Verdacht auf EOS oder LOS von 22 Stunden. Bei Verdacht

auf EOS waren 9,1 % der Blutkulturen positiv. Die Differenz bei Gram-negativen und -positiven Bakterien lag bei 11,17 h zu 23,59 h für EOS und LOS zusammen betrachtet (Guerti et al., 2011).

Das klinische Erscheinungsbild der erkrankten Neugeborenen kann sehr variieren und zeigt Überschneidungen mit anderen Erkrankungen in der Neugeborenenphase. Es zeigen sich eher unspezifische Symptome wie Trinkschwäche, Tachy- bzw. Bradykardie, Tachy- bzw. Bradypnoe, Dyspnoe, Zittern, ein gräuliches Hautkolorit und eine deutlich verlängerte Rekapillarisierungszeit über zwei bzw. drei Sekunden.

Wynn et al. bestätigen diese Vielfalt an klinischen Symptomen und deren unterschiedliche diagnostische Verwendung je nach Krankenhaus und Studie (Wynn et al., 2014). Differentialdiagnosen können so nur unter erschwerten Bedingungen bewertet werden.

Als Bestandteil der Laboranalytik sind meist ein inflammatorischer Biomarker oder bestimmte Aspekte des Differentialblutbildes vorhanden. Am häufigsten sind hierbei das C-reaktive-Protein (CRP), das Procalcitonin, die Interleukine 6 und 8 sowie die Leukozytenzahlen bzw. genauer die Zahl der neutrophilen Granulozyten (Zemlin et al., 2019). Diese weisen zum Teil sehr unterschiedliche Werte bei den statistischen Gütekriterien auf – sowohl die verschiedenen Biomarker untereinander als auch dieselben Biomarker in verschiedenen Untersuchungen. So konnten Chauhan et al. für das in Mainz verwendete IL-6 eine Spezifität von ca. 63 % und eine Sensitivität von 100 % in ihrem Review ausmachen, während sich im Review von Iroh Tam et al. eine Spanne von 70-100 % Spezifität und 74-83 % Sensitivität ergab (Chauhan et al., 2017, Iroh Tam and Bendel, 2017).

Um die Entscheidung einer empirischen antibiotischen Therapie zu unterstützen, existiert ein aus den USA stammender Risikorechner, der maternale Risikofaktoren sowie das klinische Befinden der Neugeborenen berücksichtigt – Laborparameter hingegen sind nicht enthalten (<http://kp.org/eoscalc>, zuletzt aufgerufen am 11.10.2024).

2.1.5 Therapie und Prävention der Neugeborenenensepsis

Die deutsche S2k-Leitlinie „Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften gibt keine eindeutige Empfehlung zu bestimmten Antibiotika als empirische Therapie (Zemlin et al., 2019). Als Beispiel für eine weit verbreitete Kombination wird Ampicillin plus Gentamicin für die EOS angegeben und im weiteren auf die konkreten Bedingungen vor Ort verwiesen (lokale Resistenzen, Risikofaktoren etc.) (Zemlin et al., 2019).

Das britische Pendant, das National Institute for Health and Clinical Excellence, nennt hingegen die Kombination von Penicillin G plus Gentamicin unter Berücksichtigung lokaler Resistenzen als erste Wahl (Health, 2012). Zwei weitere amerikanische Reviews empfehlen die Kombination von Ampicillin plus Gentamicin in Kombination mit einer supportiven Therapie (z. B. Flüssigkeitssubstitution). Als Zeitpunkt zur Reevaluation der Antibiotikatherapie gelten

36 bzw. 48 Stunden (Simonsen et al., 2014, Shane et al., 2017). Zusammenfassend sind im internationalen Vergleich eine Kombination aus einem Penicillin-(Derivat) + Gentamicin unter Berücksichtigung individueller Faktoren Mittel der Wahl in Bezug auf die antibiotische Therapie.

Präventionsansätze richten sich bisher stets gegen die Gruppe-B-Streptokokken. Etabliert ist die Intrapartale Antibiotikaphylaxe (IPA). Hierbei gibt es zwei Modelle: ein generelles Screening aller Schwangeren auf GBS-Besiedlung oder ein risikobasiertes Vorgehen. In Deutschland wird Ersteres empfohlen sowie bei positivem Screeningergebnis die erste Antibiotikagabe mittels Penicillin G als Mittel der Wahl bei Wehenbeginn bzw. bei Blasensprung. (Franz et al., 2017). Das risikobasierte Vorgehen hingegen, wie z. B. in Großbritannien empfohlen, empfiehlt einen GBS-Abstrich nur bei Vorliegen von Risikofaktoren, wie z. B. erhöhte Temperatur der Mutter oder vorzeitigem Blasensprung (Gynaecologists, 2017)

Neben der IPA stellt die maternale Impfung gegen *S. agalactiae* einen vielversprechenden Präventionsansatz dar. Diese ist jedoch noch nicht in der klinischen Routine etabliert, sondern Gegenstand der Forschung. Einerseits wird durch eine solche Impfung ein längerfristiger Schutz der Neugeborenen angestrebt. Andererseits wäre die Distribution einfacher und mögliche Antibiotikaresistenzen würden kein Problem mehr darstellen (Chen et al., 2013). Ein weiterer Vorteil der Impfung wäre, dass keine peripartalen Zeitfenster zu berücksichtigen wären, wie es bei der IPA der Fall ist. So zeigten beispielsweise Bianco et al. eine deutlich verringerte Effektivität der IPA, wenn die Gabe weniger als vier Stunden vor Geburt erfolgte (Bianco et al., 2016). Derzeit befindet sich ein möglicher Impfstoff in der Auswertung, zu dem vielversprechende Zwischenergebnisse mit einer Reduktion der GBS-Erkrankungen publiziert werden konnten (Madhi et al., 2023).

2.2 Das neonatale Mikrobiom

Im Folgenden soll der aktuelle Forschungsstand im Bereich des Mikrobioms wiedergegeben werden. Beim Begriff „Mikrobiom“ handelt es sich nachfolgend stets um das Mikrobiom (bzw. Bakteriom) des Gastrointestinaltraktes (GIT).

2.2.1 Zusammensetzung des Mikrobioms

Lange galt die Vermutung, dass die Zahl der bakteriellen Zellen im menschlichen Körper um den Faktor 10 höher als die der humanen Zellen ist (Luckey, 1972). Mittlerweile wird dieses Verhältnis eher in der Größenordnung von 1,3:1 angegeben (Sender et al., 2016, Rosner, 2014). Die Anzahl der Bakterien nimmt dabei von oral nach aboral exponentiell zu und erreicht im Kolon ca. 10^{12} colony forming units/ml (O'Hara and Shanahan, 2006) – s. Abb. 1. Dadurch nimmt das Kolon den größten Stellenwert in der Erforschung des Mikrobioms ein.

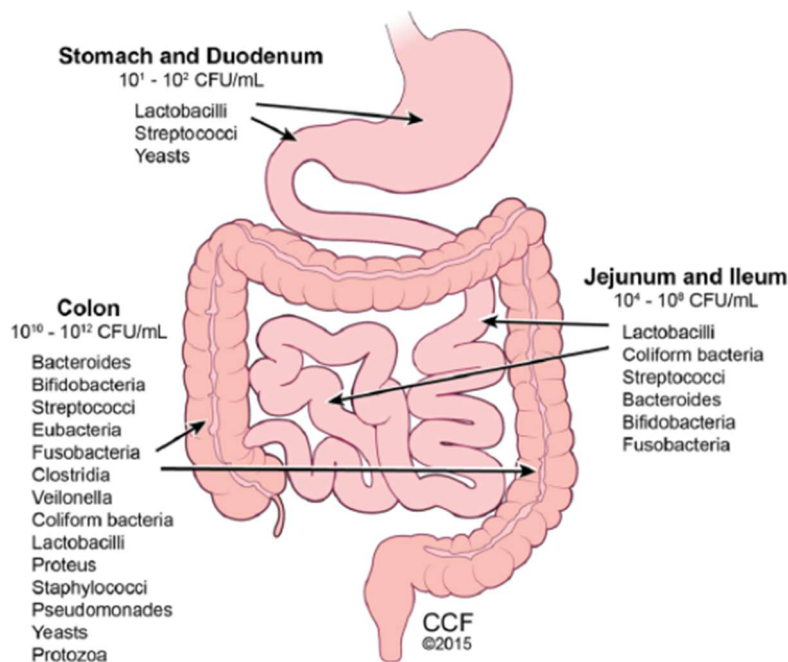


Abbildung 1: Bakterienverteilung im GIT

(Cresci and Bawden, 2015)

Die Zusammensetzung des Mikrobioms wird für gewöhnlich auf Phylum- und Genusebene betrachtet.

Im Jahr 2014 konnten knapp über 1.000 Spezies im GIT identifiziert werden – davon 957 Bakterien (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014).

Eine Studie von Arumugam et al. aus dem Jahr 2011 hat die Einteilung des Mikrobioms in drei sogenannte Enterotypen vorgeschlagen (Abbildung 2). Charakterisiert sind diese Enterotypen durch die jeweilige relative Dominanz einer Bakteriengattung (Arumugam et al., 2011).

1. Enterotyp B: Dominanz von *Bacteroides*
2. Enterotyp P: Dominanz von *Prevotella*
3. Enterotyp R: Dominanz von *Ruminococcus*

Wichtig zu erwähnen ist, dass sich keine Zusammenhänge zu Geschlecht, Alter oder Herkunft zeigen ließen. In Abbildung 2 wird die jeweilige relative abundance der gesunden, erwachsenen Probanden der drei Genera veranschaulicht. Dabei gehören *Bacteroides* und *Prevotella* dem Phylum der Bacteroidetes an, *Ruminococcus* dem der Firmicutes. Die nächsten beiden Phyla Actinobacteria und Proteobacteria erreichen deutlich geringere Zahlen.

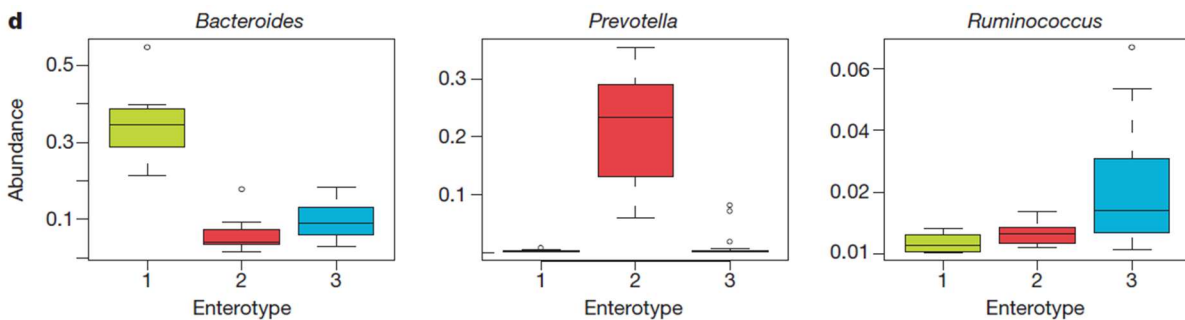


Abbildung 2: Dominanz der Genera in den 3 Enterotypen, grün = *Bacteroides*, rot = *Prevotella*, blau = *Ruminococcus*, y- Achse mit prozentualen Anteil der reads

(Arumugam et al., 2011)

Neben der taxonomischen Unterschiede konnten auch Unterschiede auf funktioneller Ebene gezeigt werden. So war bei dem von *Bacteroides* geprägten Enterotyp der Biotinsyntheseweg überrepräsentiert, bei dem Enterotyp *Prevotella* der Thiaminsyntheseweg und bei Enterotyp *Ruminococcus* der Hämsyntheseweg.

In späteren Untersuchungen zeigte sich oftmals ein ähnliches Bild in den unterschiedlichen Zusammensetzungen des Mikrobioms.

Wu et al. stellten zwei Cluster fest: jeweils mit *Prevotella* und *Bacteroides* als dominierende Genera und zusätzlich *Ruminococcus* als untergeordnetem Genus insbesondere in der von *Bacteroides* dominierten Variante. Zusätzlich konnte ein starker Zusammenhang zu Ernährungsgewohnheiten hergestellt werden: Probanden mit dem Enterotyp *Bacteroides* nahmen eine tierbasierte protein- und fettreiche Ernährung zu sich, diejenigen mit dem Enterotyp *Ruminococcus* vor allem eine kohlenhydratbasierte. Bei Umstellung der Ernährung änderte sich zwar die Zusammensetzung, die Enterotypen-Dominanz wurden aber beibehalten (Wu et al., 2011). Eine Studie, die das Mikrobiom von Populationen aus den USA, Venezuela und Malawi verglich, bestätigte die Wichtigkeit von *Bacteroides* und *Prevotella* – eine Gruppenzuteilung zu den bereits genannten Enterotypen war jedoch nicht möglich (Yatsunenko et al., 2012).

Dieselben drei Enterotypen wie bei Arumugam et al. konnten von Zhou et al. bei 236 Probanden aus dem Human Microbiome Project konstatiert werden (Zhou et al., 2014) und wurden ebenso in einer flämischen Population nachgewiesen (Falony et al., 2016).

Betrachtet man die α -Diversität der Enterotypen, fällt der Enterotyp *Ruminococcus* mit der taxonomisch und funktionell größten Diversität auf (Costea et al., 2018).

Huse et al. hingegen zeigten, dass auf Ebene der operational taxonomic units (OTU) die Grenzen zwischen unterschiedlichen Enterotypen kaum noch vorhanden sind, auch wenn *Bacteroides*-OTUs am häufigsten vorkamen (Huse et al., 2012).

Es lässt sich zusammenfassen, dass aufgrund der enorm großen Variabilität und der hohen Zahl an möglichen Einflussgrößen die Einteilung des Mikrobioms in feste Gruppen nicht möglich ist, auch wenn sich eine Tendenz hin zu „präferierten“ Zusammensetzungen – mit *Bacteroides* und *Prevotella* als Hauptgenera – feststellen lässt (Costea et al., 2018, Liang et al., 2017, Zupancic et al., 2012, Bartsch et al., 2023).

Eine andere Vorgehensweise wählten Lloyd-Price et al., die das gesunde Mikrobiom vor allem anhand seiner Funktionen definieren – unabhängig von der konkreten Spezies, die diese erfüllen (Lloyd-Price et al., 2016). Kernfunktionen sind hierbei einerseits die Produktion kurzkettiger Fettsäuren aus Ballaststoffen (short chain fatty acids – SCFA) als eine wichtige Energiequelle des Kolonepithels und andererseits die Verwertung von Glycosaminoglycanen (Flint et al., 2012, Abubucker et al., 2012) – bei letzterem spielten Vertreter der Bacteroidesspezies eine führende Rolle (Turnbaugh et al., 2009).

Der bisherigen Mikrobiomforschung liegt eine Verzerrung der Daten in der Hinsicht zugrunde, dass die überwiegende Zahl der Probanden aus Ländern mit westlicher Ernährungs- und Lebensweise stammt. Exemplarisch zeigt sich dies bei den Untersuchungen von Yatsunenko et al., die einen großen Unterschied zwischen der Population aus den USA einerseits und aus Venezuela bzw. Malawi andererseits ausmachten, wie in Abbildung 3 dargestellt ist (Yatsunenko et al., 2012).

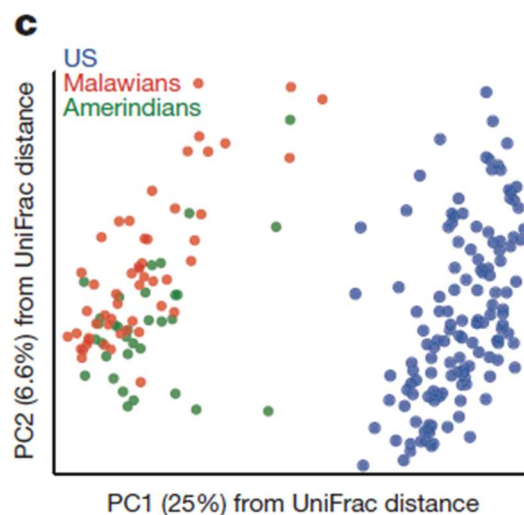


Abbildung 3: β -Diversität mittels multidimensionaler Skalierung der UniFrac-Distanz zw. drei Populationen aus Malawi, Venezuela und den USA

(Yatsunenko et al., 2012)

2.2.2 Entwicklung des neonatalen Mikrobioms und seine Einflussfaktoren

Das gastrointestinale Mikrobiom unterscheidet sich zum Zeitpunkt der Geburt noch deutlich von dem eines Erwachsenen. Bereits im Laufe der ersten Lebensjahre gleicht sich die Zusammensetzung jedoch immer mehr dem adulten Mikrobiom an.

Im Folgenden soll diese Entwicklung und die darauf Einfluss nehmenden Faktoren vorgestellt werden. Unbestritten ist dabei die Rolle der postnatalen Faktoren, wohingegen die Existenz einer pränatalen Besiedlung unklar ist.

2.2.2.1 Diskussion einer pränatalen Kolonisation

Mehrere Arbeitsgruppen fanden durch DNA-Sequenzierungen Hinweise zur Existenz von Bakterien in Nabelschnurblut, der Plazenta oder im Fruchtwasser, wobei der Nachweis vollständiger, lebensfähiger Bakterien nicht gelang (Satokari et al., 2009, Aagaard et al., 2014, Oh et al., 2010, Stout et al., 2013, Jiménez et al., 2005).

Weitere Studien stellten jene Ergebnisse in Frage, da es sich aufgrund der sehr geringen Anzahl auch um eine Kontamination bei Probenentnahme handeln könnte (Lauder et al., 2016, Lim et al., 2018).

Ein ausführliches Review von Perez-Muñoz et al. kam zu dem Ergebnis, dass die Datenlage noch zu schwach sei, um von einer pränatalen Kolonisation ausgehen zu können (Perez-Muñoz et al., 2017), sodass die wissenschaftliche Aufarbeitung und Diskussion weiter anhält (Blaser et al., 2021).

2.2.2.2 Einfluss durch Geburtsmodus

Großer Einflussfaktor auf die Entwicklung des Mikrobioms ist der Geburtsmodus – vaginal oder per Sectio caesarea (CS). Bei einer Entbindung per Kaiserschnitt umgeht das neugeborene Kind den natürlichen Geburtstrakt, wo es normalerweise in Kontakt mit der Vaginalflora der Mutter kommt. Besonders relevant erscheint dies angesichts der Tatsache, dass der Kaiserschnitt mittlerweile mit einigen unerwünschten Entwicklungen der Kinder in Verbindung gebracht wird – darunter Asthma bronchiale, Adipositas und Allergien. Das Mikrobiom scheint hierbei eine Rolle zu spielen (Sevelsted et al., 2015, Magne et al., 2017).

Die Vaginalflora ist geprägt durch Bakterien aus dem Genus der *Lactobacillae* (Ravel et al., 2011), die zur Milchfermentation fähig sind und damit bei der Verdauung von Muttermilch eine wichtige Rolle spielen.

Eine Studie aus 2010 Fallzahl konnte zeigen, dass das Mikrobiom von natürlich entbundenen Kindern der Vaginalflora ihrer Mütter sehr stark ähnelt, während das von per Kaiserschnitt entbundenen deutlich größere Unterschiede im Vergleich zur Hautflora der Mutter aufweist. Zudem konnte bei den Neugeborenen kein Unterschied in der bakteriellen Zusammensetzung von Haut-, Mund-, Nasal- und Darmflora nach Geburt festgestellt werden – die Differenzierung nach Körperstelle erfolgte also erst postnatal (Dominguez-Bello et al., 2010).

In einer weiteren Studie wird nicht *Lactobacillus* als wichtigstes Genus bei vaginal entbundenen Neugeborenen genannt, sondern *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Streptococcus* und *Rothia* – allesamt Bakterien eines eher aeroben Milieus (Bäckhed et al., 2015).

Chu et al. hingegen konnten in Bezug auf den Geburtsmodus nur einen kleinen Unterschied in der Zusammensetzung und keinen Unterschied in den exprimierten Funktionen im Alter von sechs Wochen zeigen (Chu et al., 2017).

Der Versuch, durch Übertragung von Vaginalsekret die Zusammensetzung des Mikrobioms bei Sectio-Kindern derjenigen von vaginal geborenen anzupassen, gelang bereits und es gibt

Hinweise, dass die neurologische Entwicklung positiv beeinflusst werden kann (Dominguez-Bello et al., 2016, Zhou et al., 2023).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Großteil der Untersuchungen darauf hindeutet, dass CS-geborene Kinder eine insgesamt niedrigere Diversität und ein geringeres Auftreten von *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *Bacteroides* zeigen (Kim et al., 2019).

2.2.2.3 Einfluss durch Ernährung

Die frühestmögliche Form, in der sich Ernährung auf die Entwicklung des Mikrobioms auswirken kann, ist die Versorgung des Neugeborenen entweder mit Muttermilch oder Formulanahrung. Im späteren Lebensverlauf sind die Unterschiede insbesondere durch die verschiedenen Essgewohnheiten in geographisch unterschiedlichen Regionen geprägt.

Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt Muttermilch als ausschließliche Ernährung für Kinder bis zum sechsten Lebensmonat und bis zum zweiten Lebensjahr als Teilkost (Michaelsen et al., 2000).

Galt früher die Annahme, dass Muttermilch steril sei, konnten mittlerweile Bakterien darin nachgewiesen werden (Fitzstevens et al., 2017). Die häufigsten Genera sind *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* (Jost et al., 2013, Heikkilä and Saris, 2003). Ähnlich zum gastrointestinalen Mikrobiom wandelt sich auch die bakterielle Zusammensetzung von Muttermilch. Mit fortschreitender Zeit kommen zu den o. g. Bakterien solche hinzu, die typisch für die Mundflora sind – z. B. *Veillonella* und *Prevotella* (Cabrera-Rubio et al., 2012). Muttermilch wird sowohl eine pro- als auch präbiotische Funktion zugeschrieben; probiotisch, da lebensfähige, die Gesundheit des Darmtrakts begünstigende Bakterien enthaltend und präbiotisch durch die Förderung von deren Proliferation im GIT (Kim et al., 2019, Moossavi et al., 2018). Albenberg und Wu verallgemeinern für den Unterschied zwischen Muttermilch und Formulaernährung, dass bei gestillten Kinder mehr aerobe und bei nicht-gestillten mehr anaerobe Bakterien im GIT zu finden sind. Zudem seien bei der Ernährung mit Muttermilch mehr *Bifidobacteria* vertreten (Albenberg and Wu, 2014). Eine Dominanz von *Bifidobacteria* im ersten Lebensjahr konnten auch Yatsunenکو et al. zeigen (Yatsunenکو et al., 2012). Der starke Einfluss der Ernährung mit oder ohne Muttermilch zeigte sich auch bei Bäckhed et al (Bäckhed et al., 2015). Außerdem bestätigten Stewart et al., dass Muttermilch der stärkste Einflussfaktor bzgl. der Mikrobiomentwicklung im ersten Lebensjahr zu sein scheint. Das Mikrobiom von gestillten Kindern ist vor allem *Bifidobacteria* zuzuordnen, wohingegen bei nicht-gestillten Kindern *E. coli* am häufigsten vorkam (Stewart et al., 2018).

Die präbiotische Rolle wird vor allem den in der Muttermilch enthaltenen unverdaulichen Oligosacchariden (human milk oligosaccharides – HMO) zugeschrieben (Albenberg and Wu, 2014, Tamburini et al., 2016). In vitro zeigte sich eine positive Wirkung von HMOs auf die Genera *Bifidobacteria* und *Bacteroides*, die diese besonders gut verwerten können (Marcobal

et al., 2010). Hierzu konnten mittlerweile einige passende Genloci gefunden werden (Marcobal and Sonnenburg, 2012, O'Callaghan and van Sinderen, 2016).

Besonders *Bifidobacterium* scheint einen positiven Einfluss auf die Gesundheit zu besitzen: So konnte im Labor aus Kinderstuhl extrahierten *Bifidobacteria* eine antipathogene Aktivität nachgewiesen werden (Liévin et al., 2000). In einer Mausstudie konnte ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Acetatproduktion von *Bifidobacteria* – als Produkt der HMO-Verwertung – und einem stärkeren Schutz gegenüber enterohämorrhagischen *E. coli* gezeigt werden (Fukuda et al., 2011). Unter klinischen Bedingungen zeigte der Einsatz von *Bifidobacteria* als Probiotikum bei der Prävention der Nekrotisierenden Enterocolitis unter Frühgeborenen eine positive Wirkung (Patole et al., 2016). Dies konnte jedoch bei einer aktuelleren Studie nicht bestätigt werden – auch wenn der Trend zu einer Eubiose befördert werden kann (Van Rossum et al., 2024).

Auch nach der Neugeborenenphase behält die Art der Ernährung einen starken Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms. Beispielhaft zeigten Maier et al. den Einfluss der Kohlenhydrate auf die Zusammensetzung des Mikrobioms. So veränderte sich diese bei vermehrter Ernährung mit vom Menschen nicht verdaubarer Stärke (resistente Stärke) zu einem erhöhten Vorkommen von Firmicutes im Vergleich zu Bacteroidetes (Maier et al., 2017). Ein ähnlicher Einfluss von resistenter Stärke konnte bereits zuvor in einer Studie von Walker et. al gezeigt werden (Walker et al., 2011).

Die bereits erwähnte Studie von Yatsunenکو et al. verglich drei Populationen aus den USA, dem Amazonas und einer ländlichen Region in Malawi. Durch die sehr unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten der Menschen lässt sich deren Einfluss auf die Ausprägung des Mikrobioms nachvollziehen, auch anhand der genetisch kodierten Funktionen des Mikrobioms. Beim Vergleich innerhalb der Gruppe von mit Muttermilch ernährten Kindern war zunächst das Mikrobiom von Kindern aus den USA mit weniger Enzymen zur Verwertung von HMOs ausgestattet. Dieser Unterschied verkehrt sich mit steigendem Alter und damit einhergehenden Veränderungen der Ernährung: In den USA herrscht ein großes Angebot an Fleisch und Milch, während in Malawi und Venezuela die Kost vor allem pflanzenbasiert ist. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der Urease-Kodierung, die in Malawi und Venezuela deutlich stärker ausgeprägt war und vermutlich der Synthese von Ammonium für essenzielle Aminosäuren dient. Zusammengefasst zeigte sich der Trend, dass es große Unterschiede zwischen dem US-amerikanischen Mikrobiom und dem der anderen beiden Populationen gab, die sich aufgrund der verschiedenen Ausprägung der Enzymkodierung gut mit den Ernährungsgewohnheiten – tier- vs. pflanzenbasiert – assoziieren ließen (Yatsunenکو et al., 2012).

Eine zweite Studie, die die westlich geprägte Ernährungsweise mit der aus weniger entwickelten Ländern verglich, kam zu ähnlichen Ergebnissen. Bei einer Gegenüberstellung von Kindern aus Italien und Burkina Faso im Alter von 1-6 Jahren zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Gewichtung von Firmicutes bzw. Bacteroidetes im Mikrobiom. Erstere waren

bei den italienischen Kindern deutlich stärker repräsentiert, zweitens bei den burkinischen, wie in Abb. 4 zu sehen ist (De Filippo et al., 2010).

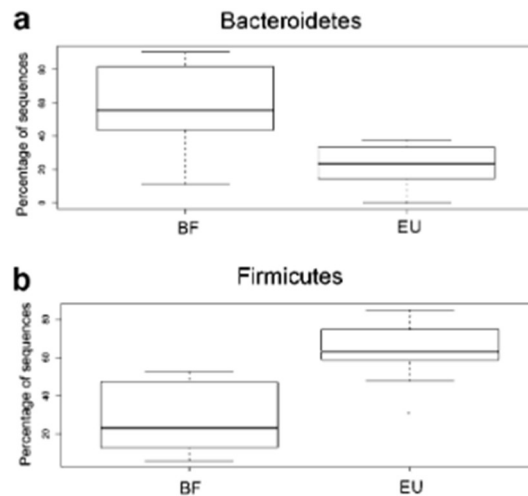


Abbildung 4: Anteile der Phyla an den Sequenzen
BF = Kinder aus Burkina Faso; EU = Kinder aus Italien
(De Filippo et al., 2010)

Die Unterschiede in der Ernährung der beiden Populationen zeigten sich abermals in der Gewichtung von tierischen Proteinen und Fetten sowie der Gesamtkalorienzufuhr, die bei den italienischen Kindern deutlich höher war. Damit einhergehend zeigte sich eine signifikant höheren Konzentration an SCFAs unter den burkinischen Kindern.

Die wichtige Rolle von Ballaststoffen bei der Erholung des Mikrobioms nach einem Stressereignis und auch scheinbar bei Aminosäuren im GIT konnte auch bei einer kontrollierten Studie von Tanes et al. nachgewiesen werden (Tanes et al., 2021).

2.2.2.4 Einfluss von Antibiotika

Der Einfluss von Antibiotika auf das Mikrobiom ist durch die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung offenkundig. Gerade in den ersten Lebensmonaten und -jahren ist dieser von besonderer Bedeutung, da die Implikationen für die folgenden Jahre schwerwiegend sein können. So sinkt durch die frühe Gabe von Antibiotika – gerade bei gestillten Kindern – die β -Diversität deutlich (Vatanen et al., 2018).

Der Einfluss beginnt bereits pränatal mit der Gabe von IPA. In einer longitudinalen Studie von Azad et al. zeigt sich ein besonders starker Einfluss im Alter von 3 Monaten im Sinne eines verringerten Reichtums an Bakterien. Stillen scheint wiederum als protektiver Faktor zu fungieren (s. o.) (Azad et al., 2016).

Während mit fortschreitendem Alter die Diversität normalerweise zunimmt, sorgte die Gabe von Vancomycin, Ampicillin, Meropenem oder Cefepim bei Frühgeborenen für einen Rückgang der Diversität (Gasparrini et al., 2019).

Besonders relevant ist bei der frühen Gabe von Antibiotika die Entwicklung von „antibiotic resistance genes“ (ARG). Schon die Gabe von IPA zieht eine verstärkte Expression der ARGs nach sich (Pärnänen et al., 2018). In einer longitudinalen Studie von Yassour et al. führte bei Kindern von 2 bis 36 Monaten die Gabe von Antibiotika zu einem – wenn auch hauptsächlich vorübergehenden – Abfall des Reichtums und einem Anstieg der ARGs (Yassour et al., 2016). Von besonderer Relevanz ist der Anstieg der ARGs im Kontext der neonatalen Intensivmedizin, da das Mikrobiom von Frühgeborenen besonders anfällig für Störungen ist (Schwartz et al., 2020).

Ein zweiter wichtiger Punkt bei der Gabe von Antibiotika in diesem Alter ist die Reifeverzögerung des Mikrobiom (age regression). Gemeint ist damit eine Zusammensetzung des Mikrobioms, die einem jüngerem chronologischen Alter als dem eigentlichen des Kindes entspricht (Schwartz et al., 2020).

Bokulich et al. zeigten bis zum Alter von 12 Monaten eine age regression durch Antibiotika mit einer anschließenden Erholung (Bokulich et al., 2016). Bei Gasparrini et al., die Frühgeborene untersuchten, dauerte es 15 Monate bis zur erneuten Angleichung der Mikrobiome (Gasparrini et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gabe von Antibiotika in den ersten Lebensmonaten tiefgreifenden Einfluss auf das Mikrobiom hat und die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen fördert.

2.2.3 Mikrobiom und neonatale Sepsis

Mittlerweile gibt es insbesondere in der Neonatologie viele Hinweise auf die protektive Rolle eines „gesunden“ Mikrobioms zur Verhinderung einer Sepsis – bzw. der Dysbiose als Risikofaktor für die Entstehung einer Sepsis (Adelman et al., 2020). Unter Dysbiose versteht man dabei ein ungünstiges Verhältnis von (potenziell) pathogenen und gesundheitsfördernden Bakterien.

Der Schwerpunkt der bisherigen Forschung liegt dabei auf der LOS. Bei Frühgeborenen wurde die LOS mit einem vermehrten Vorkommen von nicht obligat anaeroben Staphylokokken-Spezies im GIT assoziiert (Shaw et al., 2015, Graspeuntner et al., 2018) – vor allem auf Kosten von *Bifidobacteria*, die einer Verbesserung der epithelialen Barriere des Magen-Darm-Traktes dienen (Ewaschuk et al., 2008). Passend zur höheren Inzidenz der Neugeborenensepsis unter Frühgeborenen sind deren GIT länger von nicht obligat anaerob lebenden Bakterien besiedelt (Korpela et al., 2018). Auch im Mausmodell konnten Hinweise gefunden werden, die in dieselbe Richtung deuten: So führte die Dominanz von anaeroben Bakterien zu einer größeren Resistenz gegenüber einer LOS (Singer et al., 2019) und eine höhere α -Diversität zu einem besseren Überleben. Zusätzlich scheint die erhöhte α -Diversität in Zusammenhang mit einer erhöhten CD4⁺-T-Zell-Antwort zu stehen (Fay et al., 2019, Cabrera-Perez et al., 2016). Auch die humorale Immunantwort durch IgA-Antikörper wird durch das Mikrobiom beeinflusst

(Wilmore et al., 2018). Die genaue Wechselwirkung zwischen Mikrobiom und Immunsystem während des Verlaufs einer Sepsis ist nach wie vor nur gering erforscht (Adelman et al., 2020). Die Auswirkungen auf die Ausschüttungen von Zytokinen sind noch nicht verstanden. In einem Mausmodell führte eine Stuhltransplantation bei Pneumonie-erkrankten Mäusen zu einer Reduzierung der Level von Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) und IL-10 (Schuijt et al., 2016). Auch über die Ernährung mit präbiotischen Ballaststoffen ließ sich das TNF-Level beeinflussen (Morowitz et al., 2017).

Die bereits erwähnten SCFAs spielen bei der Immunmodulation ebenfalls eine Rolle: Das von *Bifidobacteria* produzierte Acetat beispielsweise wirkte im Mausmodell protektiv gegen *E. coli* (Fukuda et al., 2011). Butyrat, das von *Clostridia* und *Faecalibacteria* – beide häufige Vertreter im GI – erzeugt wird, reguliert TNF- α und IL-6 (Parada Venegas et al., 2019). Ein Überblick über die vielfältigen Zusammenhänge bietet folgende Grafik von Adelman et al (Adelman et al., 2020):

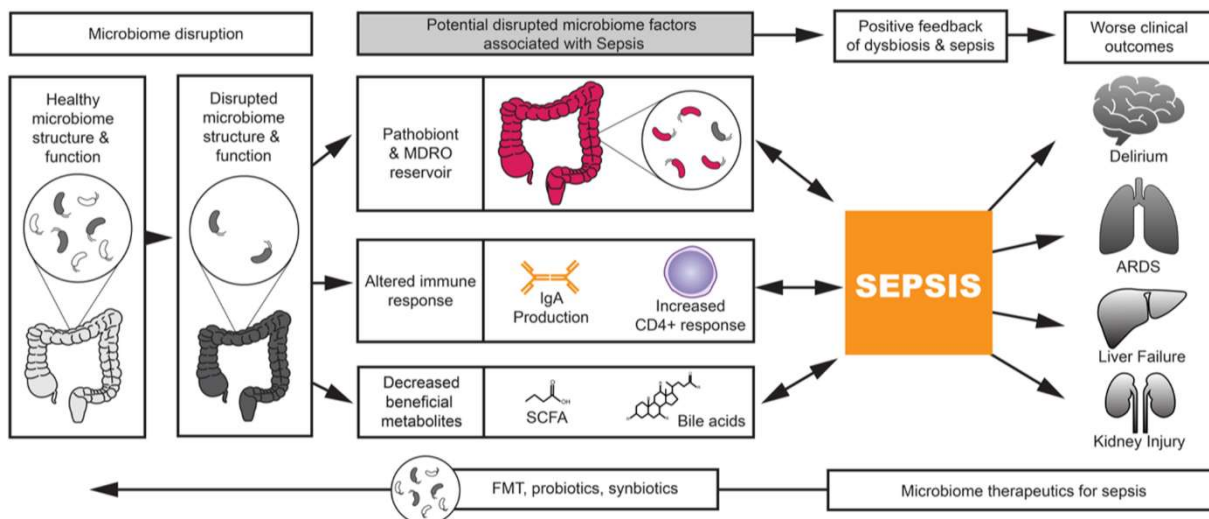


Abbildung 5: Wechselwirkungen zw. Infektionsgeschehen bei Sepsis und Mikrobiom

3 Material und Methoden

Es handelt sich um eine unverblindete, kontrollierte, nicht-interventionelle, monozentrische Beobachtungsstudie mit explorativem Charakter, die im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum von März 2018 bis Oktober 2019 durchgeführt wurde.

3.1 Studiendesign, Rekrutierung und Studienpopulation

In dem oben genannten Zeitraum wurden reifgeborene Kindern auf der Säuglingsstation und Wochenbettstation am Universitätsklinikum Mainz konsekutiv eingeschlossen.

Einschlusskriterien waren:

- Errechnetes Gestationsalter > 36 + 6 SSW
- Altersentsprechende Entwicklung
- Spontangeburt oder per Sektio
- Schriftliche Einwilligung durch einen Elternteil

Ausschlusskriterien waren:

- Chirurgische Eingriffe
- Angeborene Stoffwechselerkrankungen
- Primäre Chromosomenaberrationen
- Erhalt eines Impfstoffes

Patienten bzw. Erziehungsberechtigte, die keine schriftliche Einwilligung erteilten, waren nicht teilnahmeberechtigt. Die Studie stand im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde mit Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz durchgeführt. Die Rekrutierung erfolgte durch den Autor der Dissertationsarbeit.

Alle Kinder wurden über den Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Der Geburtstag wurde als Tag 0 definiert. Im Anschluss erfolgte retrospektiv die Einteilung der Patienten in die Sepsisgruppe und Kontrollgruppe.

Eine Einteilung in die Sepsisgruppe erfolgte entweder bei mikrobiologisch gesicherter Diagnose per Blutkultur oder bei Vorliegen von mindestens vier Punkten aus dem im Folgenden aufgeführten Scoring-System, welches bereits zuvor in der Arbeitsgruppe Gehring verwendet wurde (Kliwer, 2019). Um eine eindeutigere Einteilung zwischen Neugeborenen mit (wahrscheinlicher) Sepsis und gesunden vornehmen zu können, wurde die Anforderung im

Vergleich zum ursprünglichen Score von drei auf vier Punkte erhöht. Die Kriterien, für deren Erfüllung je ein Punkt vergeben wurde, lauten wie folgt:

- Klinik eines reduzierten Allgemeinzustands (Trinkschwäche, Zittern, blasses Hautkolorit, Rekapillarisierungszeit > 3 sec.)
- Leukozytose > 34/nl
- Leukozytopenie < 9,5/nl
- Hyper- oder Hypothermie: > 38,5° C bzw. < 36,0° C
- CRP > 10 mg/l und andere Laborparameter, die auf eine bakterielle Infektion hindeuten können (Erhöhung stabkerniger neutrophiler Granulozyten, Thrombozytopenie)
- Tachykardie > 190/min bzw. Bradykardie < 90/min
- Atmung (Dyspnoe, Tachypnoe, Atemunterstützung > 30 min)
- Mütterliches Risiko (GBS-Nachweis, Infektionszeichen in Form von erhöhtem CRP, Leukozyten, Temperatur, grünes Fruchtwasser, Blasensprung > 18 h)

3.2 Entnahme der Stuhlproben

Die Gewinnung der Stuhlproben erfolgte über das Pflegepersonal der Stationen, auf denen die Neugeborenen behandelt wurden. Bei jedem Windelwechsel sollten diese auf Stuhlgang überprüft werden und dieser zunächst bei -20 ° C im Gefrierschrank der Stationen für max. 72 h gelagert werden. Im Anschluss wurden die Proben pseudonymisiert und im Labor der Arbeitsgruppe für pädiatrische Immunologie und Infektiologie der Universitätsmedizin Mainz bei -80 ° C asserviert.

3.3 Entnahme der Blutproben

Für die Blutproben wurden keine zusätzlichen Blutentnahmen bei den Neugeborenen durchgeführt. Es wurde auf die Überstände der bereits entnommenen Proben, die im Zentrallabor der Universitätsmedizin für max. fünf Tage bei 4 ° C gelagert wurden, zurückgegriffen. Die ebenso pseudonymisierten Proben wurden für die dauerhafte Aufbewahrung in das Labor der Arbeitsgruppe für pädiatrische Immunologie und Infektiologie der Universitätsmedizin Mainz transportiert und dort bei -80° C eingefroren.

Die Proben sind definiert als eine Vollblutabnahme in ein Serum- oder Lithium-Heparin-Röhrchen.

3.4 Analyse der Stuhlproben

Die Analyse der in den Stuhlproben enthaltenen DNA erfolgte durch das Next-generation-sequencing-Verfahren (NGS) der 16s-DNA-Sequenzierung. Alle Stuhlproben jünger als 48 h wurden als Mekonium definiert. Für diese wurde ein Grenzwert von mindestens 200 reads

festgelegt. Bei Stuhlproben älter als 48 h lag dieser bei ≥ 5.000 reads. Auf Grundlage dieser Grenzwerte wurden von 44 gesammelten Proben sieben von der Auswertung ausgeschlossen. Zusätzlich erfolgte die Analyse von zwei Negativkontrollen.

Die Stuhlproben wurden hinsichtlich der phylogenetischen Verteilung auf Phylum- und Genu-sebene analysiert und es fand eine Berechnung der ökologischen Diversitätsindizes Shannon-Weaver-Index, Chao1-Index, Berger-Parker-Dominanzindex dbp und Simpson-Diversitätsindex (1-D, mit D = Simpsonindex).

3.4.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der mikrobiellen RNA aus den Stuhlproben wurde auf Basis des QIAamp® PowerFecal® Pro DNA-Kits der Firma Qiagen mit einigen Anpassungen der verwendeten Volumina durch die Arbeitsgruppe Gehring durchgeführt (s. Anhang).

3.4.2 Vorbereitung für Sequenzierung

Die weitere Vorbereitung der Proben (Amplifizierung, Indexierung, Aufreinigung) für die Sequenzierung erfolgte gemäß des Laborprotokolls der Arbeitsgruppe Gehring, das auf dem 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation von Illumina aufbaut (s. Anhang).

3.4.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit einem Miseq-Gerät von Illumina auf Basis des v2 Protokolls mittels SBS-Chemie (sequencing by synthesis) durchgeführt (s. Anhang 8.1).

3.4.4 Zuordnung der Gensequenzen

Die taxonomische Zuordnung der aus dem NGS gewonnen bakteriellen genetischen Daten erfolgte durch einen qualifizierten und geschulten Mitarbeiter der AG Pädiatrische Immunologie und Infektiologie, Mainz. Es erfolgte eine Korrektur der unterschiedlichen „read counts“ durch Rarefizierung. Die Zuordnung geschah auf Basis der SilvaNGS-Datenbank (www.arb-silva.de; Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.5 Analyse der Blutproben

Die Analyse der Blutproben erfolgte durch eine Durchflusszytometrie. Die Proben wurden für die Durchflusszytometrie durch eine Kopplung der zu messenden Inhaltsstoffe mit Farbstoffen durch ein Cytometric Bead Array (CBA) vorbereitet.

3.5.1 Probenvorbereitung

Die Blutproben wurden mit Hilfe des Cytometric Bead Arrays der Firma BD Biosciences für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Zur Anwendung kam dabei das BD CBA Flex Set. Eine Standardreihe für die Messparameter wurde gemäß Protokoll des Flex Sets vorbereitet.

3.5.2 Messung per Durchflusszytometrie

Nach Vorbereitung der Proben erfolgte die Messung der Parameter mit dem FACSCanto von BD nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie.

3.6 Gemeinsame Auswertung von Blut- und Stuhlproben

In die gemeinsame Auswertung der beiden Probenarten flossen nur von denjenigen Kindern Proben ein, von denen sowohl Blut- als auch Stuhlproben existierten, die am selben Tag entnommen wurden.

3.7 Materialien

Im Folgenden sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien gelistet, die für die Laborexperimente verwendet wurden.

3.7.1 Geräte

Für die Analyse der Blutproben wurden folgende Geräte genutzt:

Gerät	Name	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD Biosciences; Heidelberg
Gefrierschrank	Comfort	Liebherr; Kirchdorf an der Iller
Gefrierschrank (-80°C)	Herafreeze	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Laborschüttler	Reax2000	Heidolph Instruments; Schwabach
Pipette (max. 20 µl)	Research	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max. 200 µl)	Reference	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max. 1000 µl)	Reference	Eppendorf; Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

Tabelle 2: Geräte für die Analyse der Blutproben

Für die DNA-Messung der Stuhlproben fanden folgende Geräte Verwendung:

Gerät	Name	Hersteller
Gefrierschrank	Comfort	Liebherr; Kirchdorf an der Iller
Gefrierschrank (-80°C)	Herafreeze	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
PCR-Gerät	Bioer Lifetouch	Bioer, Hangzhou, China
UV-Kamera	UVsolo	Biometra, Göttingen
Kugelmühle	TissueLyser II	Qiagen, Hilden
DNA-Messgerät	Qubit 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

Tabelle 3: Geräte für die Analyse der Stuhlproben

3.7.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden für die Laborarbeiten mit den Blut- und Stuhlproben verwendet:

Produkt	Hersteller
Human IL-1 β Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IL-6 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IL-8 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IL-10 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IL-12p70 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IL-13 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human MCP-1 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human TNF Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human IP10 Flex Set	BD Biosciences; Heidelberg
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences; Heidelberg
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf; Hamburg
15 ml und 50 ml Röhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen
FACS-Teströhrchen	BD Biosciences; Heidelberg
Pipettenspitzen	Starlab; Hamburg

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Blutproben

Produkt	Hersteller
DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (250)	Qiagen, Hilden
Nuklease-freies- Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
AMPure XP – magnetische Beads	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien
Agarose Standard für DNA-Elektrophorese	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Qubit™ 1X dsDNA HS working solution	Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon
Ethidiumbromid [0,95 mg/ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
MiSeq® v2 Reagent Kit	Illumina Inc., San Diego, Kalifornien
Nextera XT Index Kit	Illumina Inc., San Diego, Kalifornien
Nextera XT Index Kit Set D	Illumina Inc., San Diego, Kalifornien
PhiX Control v3	Illumina Inc., San Diego, Kalifornien
PCR-Mix-Kit KAPA Hifi Hotstart ReadyMix	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Analyse der Stuhlproben

3.8 Statistische Analysen und Datenmanagement

Die klinischen Studienparameter wurden über die klinikinterne Patientenverwaltungssoftware SAP® (SAP SE, Walldorf, Deutschland) erfasst.

Die klinischen Parameter wurden mittels Excel® (Version 2201 Fa. Microsoft) aufgezeichnet. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von SPSS Statistics® (Version 27 für Windows, Fa. IBM) durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine deskriptive Analyse der Daten. Bei kontinuierlichen Variablen erfolgte zur Testung auf das Vorliegen einer Normalverteilung eine visuelle Analyse der Histogramme und Q-Q-Plots sowie eine statistische Testung mittels Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test. In Abhängigkeit des Vorliegens einer Normalverteilung wurden die kontinuierlichen Variablen mittels Mittelwert (+/- Standardabweichung) oder Median (Quartile) dargestellt. Für die statistische Testung von Gruppenunterschieden zwischen den verschiedenen Stuhl- und Blutproben wurde aufgrund der Nicht-Normalverteilung bzw. der nicht metrischen Skalierung der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU) durchgeführt.

Grundlage der statistischen Vergleiche war die mittlere relative Häufigkeit (relative abundance) der Bakterien. Als Grenzwert zum Einschluss in die statistischen Analysen wurde für die Phyla und Genera eine relative Häufigkeit von mindestens 1 % in mindestens einer Probe festgelegt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden auf Genusebene nur diejenigen Genera statistisch getestet, die über das gesamte Kollektiv hinweg eine mittlere relative Häufigkeit von mindestens 1 % aufwiesen.

Um die statistische Unabhängigkeit der Proben für den MWU-Test zu gewährleisten, wurden diese auf Grundlage des Entnahmetages aufgeteilt: Die Gruppe „Früh“ bestand aus Proben der Tage 0 bis 2, Gruppe „Spät“ aus Proben der Tage 3 bis 5. Existierten innerhalb der Gruppen mehrere Proben von einem Kind, floss in Gruppe „Früh“ die Probe vom jeweils frühesten Tag und in Gruppe „Spät“ die Probe vom jeweils spätesten Tag in die Analysen mit ein. Ebenfalls aus Gründen der statistischen Genauigkeit wurden die Korrelationsuntersuchungen mittels Spearman nach Tagen getrennt durchgeführt.

Die Korrektur der p-Werte bei multiplen Testen erfolgte mit der false discovery rate (FDR) durch das Benjamini-Hochberg-Verfahren. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die Korrektur von multiplen p-Werten, wurde das Erweiterungsbundle STATS_PADJUST, Version 1.0.4 vom 03.02.2016, in SPSS installiert. Dafür notwendig war die Installation des R-Plugins Version 3.6.

4 Ergebnisse

4.1 Studienkollektiv

Es wurden 32 Kinder bzw. deren Eltern für eine Studienteilnahme angesprochen. Von zwei Elternpaaren wurde die Teilnahme abgelehnt. Bei einem Kind erfolgte der Ausschluss aufgrund von Frühgeburtlichkeit. Folglich umfasste das analysierte Studienkollektiv 29 Probanden.

4.2 Allgemeine Parameter und Sepsisscore

Mittels des oben erwähnten Scoresystems wurden 21 Kinder in die Kontroll- und 8 Kinder in die Sepsisgruppe eingeteilt. Die Verteilung der Scorepunkte zeigt sich wie folgt:

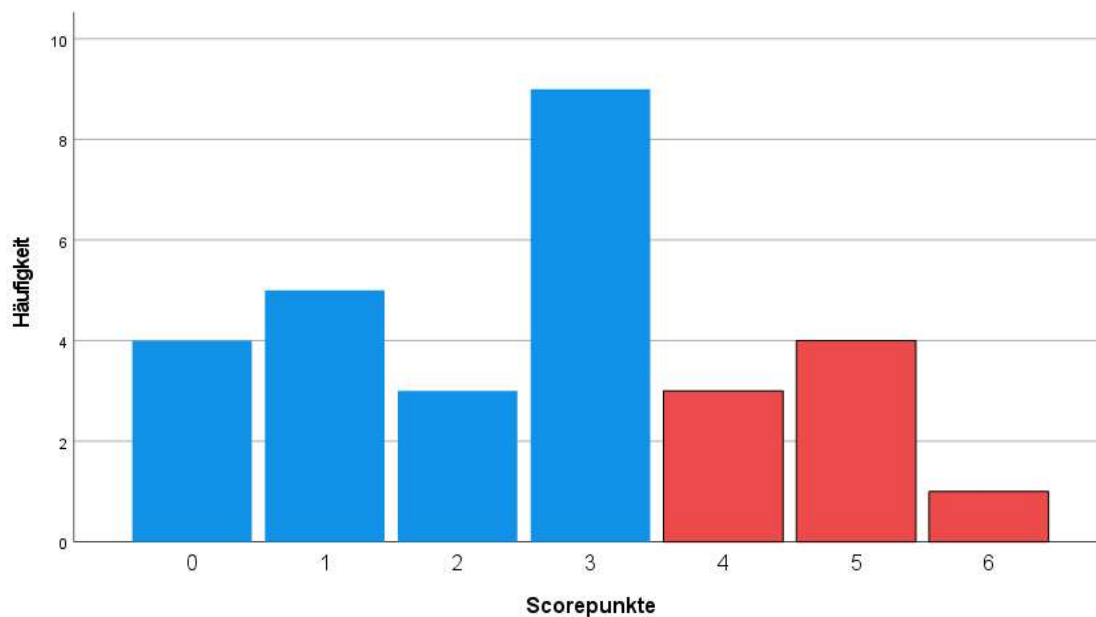


Abbildung 6: Verteilung der Scorepunkte unter den Probanden. Ab 4 Punkten wurde die Diagnose Sepsis gestellt.

Für einen allgemeinen Überblick über das Studienkollektiv wurden ausgewählte klinische Parameter miteinander verglichen. Dabei zeigten sich ähnliche Verteilungen in der Sepsis- und Kontrollgruppe.

	Sepsisgruppe (n = 8)	Kontrollgruppe (n = 21)	Gesamt (n = 29)
♀ [%]	5 (62,5 %)	10 (47,6 %)	15 (51,7 %)
Geburtsgewicht [g] (Median) [25./75. P.]	3.440 [3.135; 3.612,5]	3.490 [2.785; 3.715]	3.480 [3.015; 3.690]
SSW (Median) [25./75. P.]	39+6 [39+2; 40+3]	40+0 [38+4; 40+4]	39+6
Geburt per Sectio (%)	0	23,8	17,2
Dauer der Antibiose in d (Median) [25./75. P.]	6 [4,5; 7]	3,5 [2,75; 7]	5 [3; 7]
Erhalt einer Antibio- se (%)	100	66,7	75,9
CRP-Wert [mg/dl] (Mittelwert) [Min./Max.]	19,5 [0; 57]	5,935 [0; 24]	9,81 [0;57]
IL-6-Wert [pg/ml] (Median) [25./75. P.]	946 [47,25; 39.489]	30 [12; 55,5]	46 [12; 396]
Nabelschnur-pH (Median) [25./75. P.]	7,22 [7,15; 7,31]	7,25 [7,21; 7,33]	7,25 [7,19; 7,32]
Positive Blutkultur	0	0	0

Tabelle 6: Klinische Parameter des Studienkollektivs. Bei CRP ein fehlender Wert, bei IL-6 drei fehlende Werte.

Um auf mögliche signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu testen, wurde ein MWU-Test durchgeführt. Dieser zeigte ausschließlich beim IL-6-Wert einen signifikanten Unterschied.

	MR Kontrollgruppe	MR Sepsisgruppe	Signifikanz
Geburtsgewicht	15,17	14,56	0,867
SSW [d]	14,62	16,00	0,864
Dauer d. Antibiose	9,86	14,38	0,254
CRP-Wert	12,48	19,56	0,114
IL-6-Wert	10,92	19,31	0,048
Nabelschnur-pH	12,76	9,83	0,588

Tabelle 7: Vergleich ordinaler bzw. metrischer Parameter mittels MWU-Test. MR = Mittlerer Rang; Signifikanz nach FDR

4.3 Anzahl der Blutproben

Es wurden 33 Blutproben von 23 Patienten gesammelt. Davon konnten bei 30 Proben (Sepsis: 6, Kontrolle 24) von 21 Kindern erfolgreich Messungen durchgeführt werden. Nach Einteilung der Proben in die Gruppen „Früh“ und „Spät“ wurden 25 Proben statistisch getestet. Die gemessenen Blutproben verteilten sich auf die Lebensstage folgendermaßen:

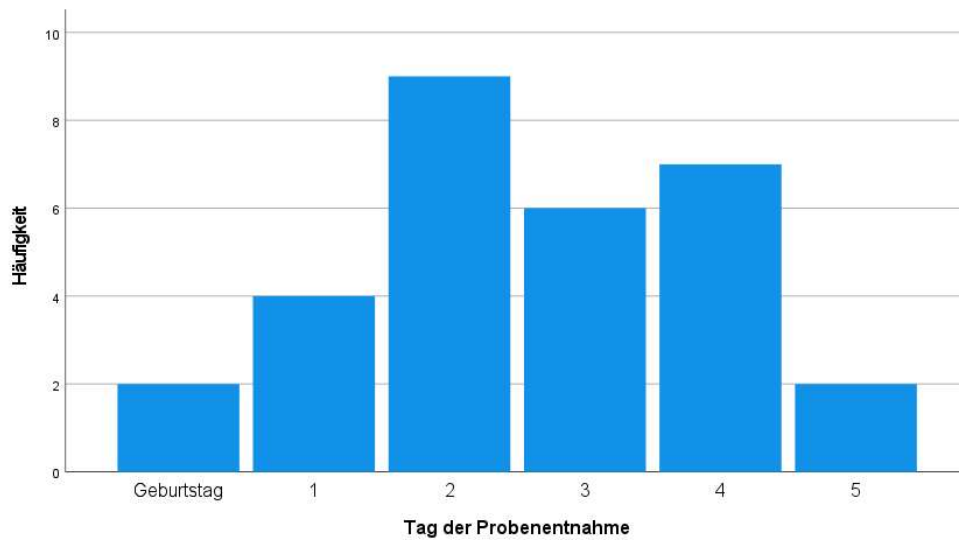


Abbildung 7: Tagesverteilung der gemessenen Blutproben

Die Tagesverteilung der 25 getesteten Proben (83,3%) von 21 Kindern ist in Abbildung 8 dargestellt.

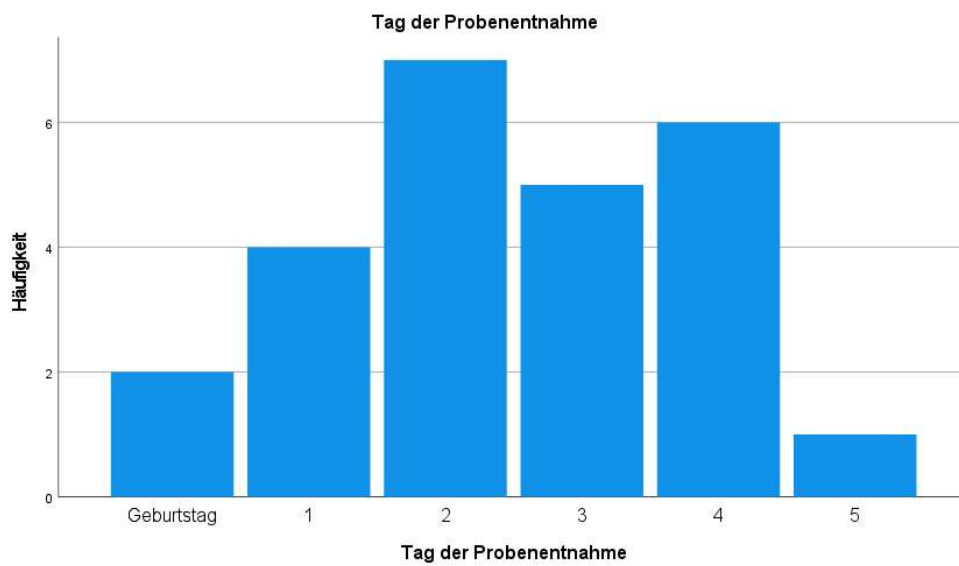


Abbildung 8: Tagesverteilung der statistisch getesteten Blutproben

Ein Überblick über Anzahl und Verteilung der Proben bietet die Tabelle 8.

Anzahl gesammelte Blutproben	Anzahl gemessene Blutproben	Anzahl getestete Blutproben
33	30	25

Tabelle 8: Anzahl der Blutproben

Von den 25 getesteten Proben stammten vier Proben (16%) von Kindern, die einen Sepsisscore von vier oder mehr aufwiesen und dementsprechend in die Sepsisgruppe eingeteilt wurden – davon drei Proben in der Gruppe „Früh“ und eine Probe in der Gruppe „Spät“.

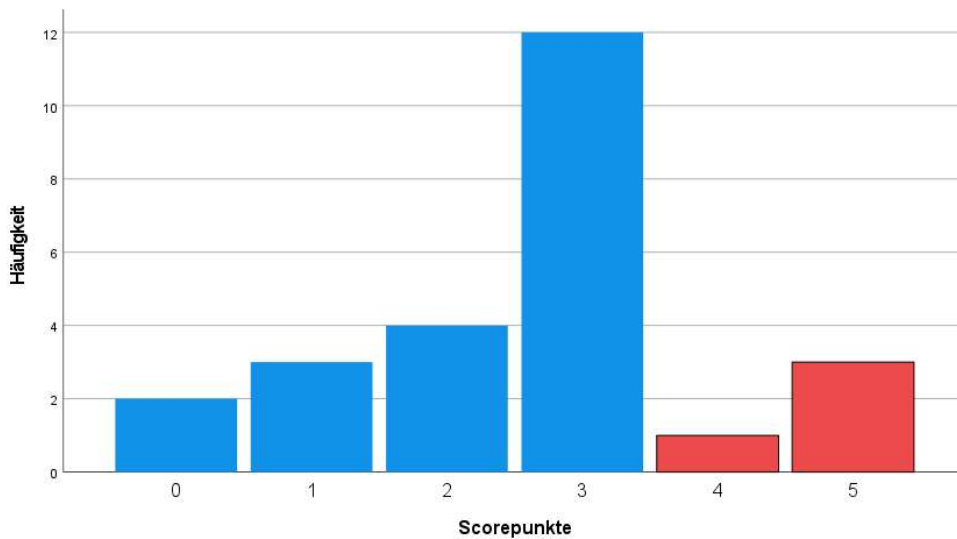


Abbildung 9: Verteilung der Scorepunkte unter den getesteten Blutproben. Ab einem Wert von 4 wurde die Diagnose Sepsis gestellt.

Sepsisgruppe	Kontrollgruppe	Gesamt
4	21	25

Tabelle 9: Verteilung der getesteten Blutproben

4.4 Anzahl der Stuhlproben

Von vier der 29 Kinder des Gesamtkollektivs konnten keine Stuhlproben gesammelt werden; insgesamt wurden 44 Stuhlproben gewonnen. Es erfolgte der Ausschluss von sieben Proben aufgrund einer nicht ausreichenden read-Anzahl in der 16s-DNA-Sequenzierung, sodass insgesamt 37 Proben von 23 Kindern in die Analyse der Stuhlproben eingeschlossen wurden. Nach Einteilung der Proben in die Gruppen „Früh“ und „Spät“ wurden 27 Proben statistisch getestet.

Ein Überblick über Anzahl und Verteilung der Proben bietet die Tabelle 10:

Anzahl gesammelte Stuhlproben	Anzahl gemessene Stuhlproben	Anzahl getestete Stuhlproben
44	37	27

Tabelle 10: Anzahl der Stuhlproben

Die Entnahme der gemessenen Proben verteilte sich auf die Lebenstage wie folgt:

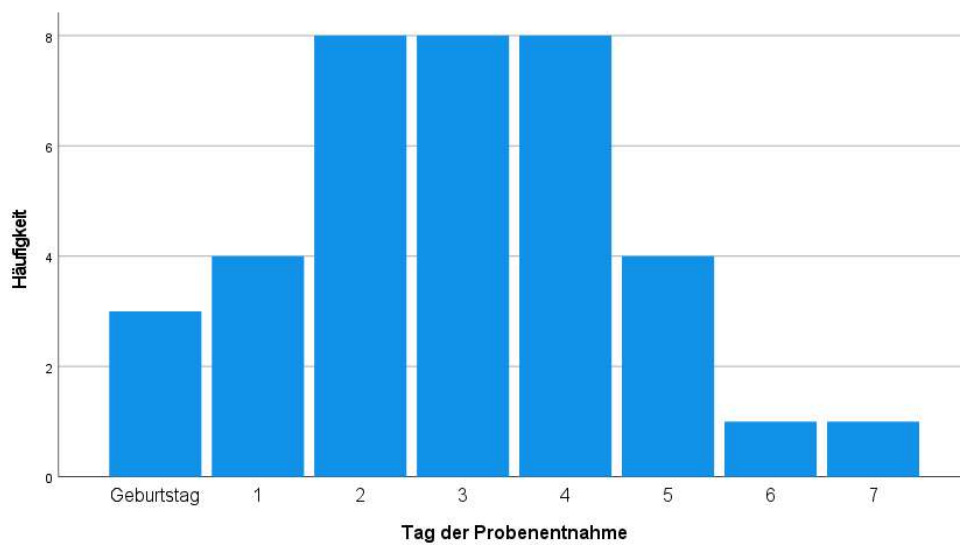


Abbildung 10: Tagesverteilung der Stuhlproben

Die Tagesverteilung der 27 getesteten Proben ist in Abbildung 11 dargestellt.

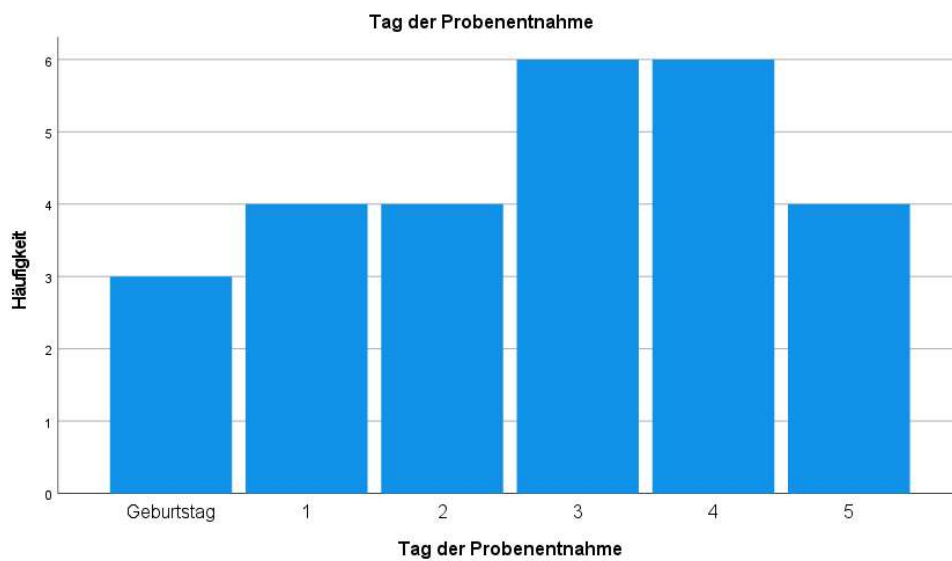


Abbildung 11: Verteilung der statistisch getesteten Stuhlproben

Von den 27 getesteten Proben stammten sieben Proben von sechs Kindern mit einem Sepsisscore ≥ 4 (25,9 %), wie in Abb. 13 zu sehen ist.

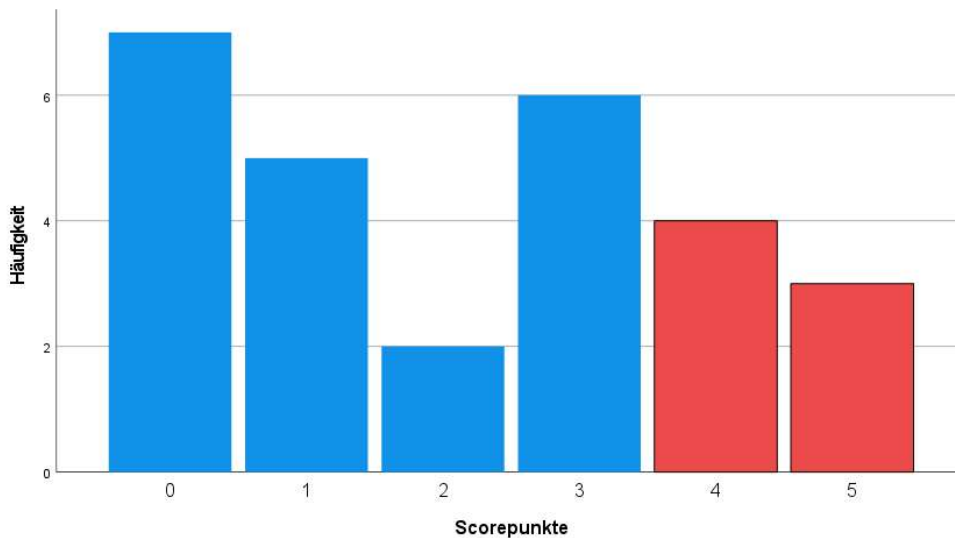


Abbildung 12: Verteilung der Scorepunkte unter den getesteten Stuhlproben. Ab einem Wert von 4 wurde die Diagnose Sepsis gestellt.

Fünf der 27 getesteten Stuhlproben (18,5 %) entstammten von Kindern, die per Kaiserschnitt entbunden wurden. Keines dieser Kinder wurde der Sepsisgruppe zugewiesen. Je eine Probe von Proband 206 und 229 entstammten von Kindern, deren Mütter eine IPA erhielten.

4.5 Verhältnis der septischen und antibiotisch behandelten Patienten

Anhand der unten stehenden Kreuztabelle lässt sich erkennen, dass sämtliche als septisch erkrankt definierten Kinder, von denen Proben ausgewertet wurden, auch antibiotisch behandelt wurden. Gleichzeitig erhielten neun Patienten eine antibiotische Therapie, ohne dass diese (im Nachhinein) als septisch erkrankt definiert wurden.

		Sepsis		Gesamt (%)
		Ja (%)	Nein (%)	
Antibiose	Ja (%)	6 (27)	9 (41)	15 (68)
	Nein (%)	0	7 (32)	7 (32)
Gesamt (%)		6 (27)	16 (73)	22 (100)

Tabelle 11: Kreuztabelle zu Sepsis und Antibiose für alle statistisch ausgewerteten Probanden

Eine signifikante Assoziation nach dem exakten Test nach Fisher (zweiseitig) bestand bei einem p-Wert von 0,121 nicht.

4.6 Stuhl- und Blutproben vom gleichen Tag

Von sieben Kindern konnten sowohl Stuhl- als auch Blutproben vom gleichen Tag gesammelt werden. Davon entfielen drei Probenpaare auf den Entnahmezeitraum 0-2 und vier Probenpaare auf den Zeitraum 3-5. Diese Proben wurden in die gemeinsame Analyse von Blut- und Stuhlproben mit einbezogen. Dabei gab es eine Paarung von Blut- und Stuhlproben, die einem Sepsiskind entstammte.

4.7 Ergebnisse der Blutuntersuchungen

Um mögliche Unterschiede zwischen der Kontroll- und Sepsisgruppe herauszuarbeiten wurden die Zytokinverteilungen mittels MWU-Test untersucht:

	Tag der Entnahme 0-2			Tag der Entnahme 3-5		
	Kontrolle (N = 10)	Sepsis (N = 3)	p-Wert (MWU)	Kontrolle (N = 11)	Sepsis (N = 1)	p-Wert (MWU)
IL-1 β [pg/ml]	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,903	0 (0; 0)	0	1,000
IL-6 [pg/ml] (eig. Messung)	0 (0; 151,4)	0 (0; 0)	0,903	0 (0; 0)	0	0,981
IL-6 [pg/ml] (Zentrallabor)	42,5 (15; 169,5)	129 (20; /)	0,240	12 (34,5; 58,5)	195000	0,310
IL-8 [pg/ml]	8,99 (0; 60,7)	28,63 (0; /)	0,903	0 (0; 21)	1,25	0,981
IL-10 [pg/ml]	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1,000	0 (0; 0)	0	0,981
IL-12p70 [pg/ml]	14,31 (13,4; 15,8)	22,26 (15,4; /)	0,193	13,68 (11,8; 14,5)	12,97	0,981
IL-13 [pg/ml]	34,65 (33,7; 36,7)	47,17 (44,4; /)	0,162	34,52 (33,9; 34,9)	33,75	0,981
IP-10 [pg/ml]	21,12 (0; 108)	145,20 (0; /)	0,903	50,98 (0; 128,5)	0	0,981
MCP-1 [pg/ml]	172,12 (0; 496,2)	0 (0; /)	1,000	148,74 (0; 479,4)	46,30	0,981
TNF- α [pg/ml]	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1,000	0 (0; 0)	0	1,000

Tabelle 12: Werte der gemessenen Zytokine. Mediane sowie in Klammern 25. und 75. Perzentile der gemessenen Laborparameter. 3 IL-6-Werte von Zentrallabor aus Kontrollgruppe der Tage 3-5 fehlend. p-Werte nach MWU-Test und FDR-korrigiert.

TNF- α konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede mittels MWU-Test zwischen den beiden Gruppen nachweisen. IL-27 ist in der Tabelle nicht aufgeführt, da die Messung technisch nicht realisiert werden konnte. Die Messung von IL-6 im Zentrallabor konnte durch eigene Messungen nur in wenigen Fällen wiederholt werden, IL-1 β konnte in nur einer Probe gemessen werden, IL-10 in zwei Proben, wodurch keine Quartile gebildet werden konnten.

Eine nicht-signifikante Tendenz zeigte sich während der Entnahmetage 0-2 bei den Interleukinen 12p70 und 13 – diese wiesen bei Sepsis erhöhte Werte auf.

Die grafische Darstellung mittels Boxplot veranschaulicht, dass tendenziell höhere Werte aller Zytokine während der Lebensstage 0-2 gemessen wurden als zu den späteren Zeitpunkten und macht die oben beschriebenen Tendenzen bei IL-12p70 und IL-13 sichtbar. Auf die grafische Darstellung von TNF-alpha wurde aus Mangel an Werten verzichtet.

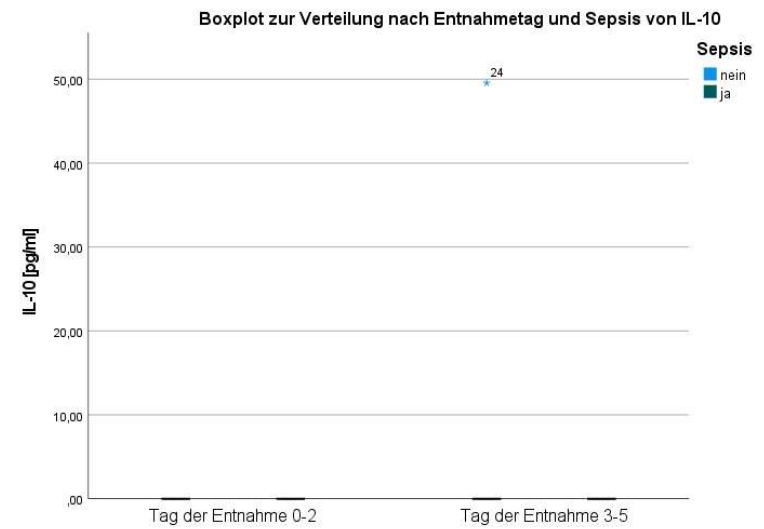
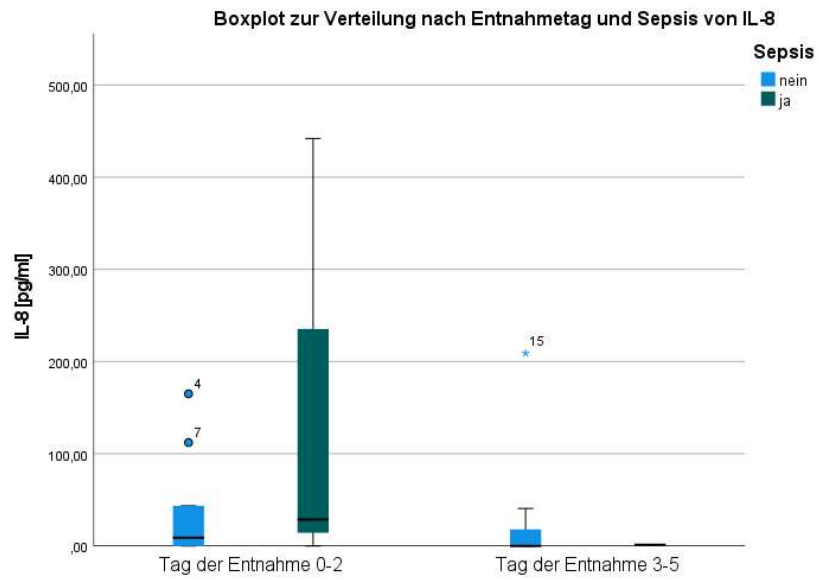
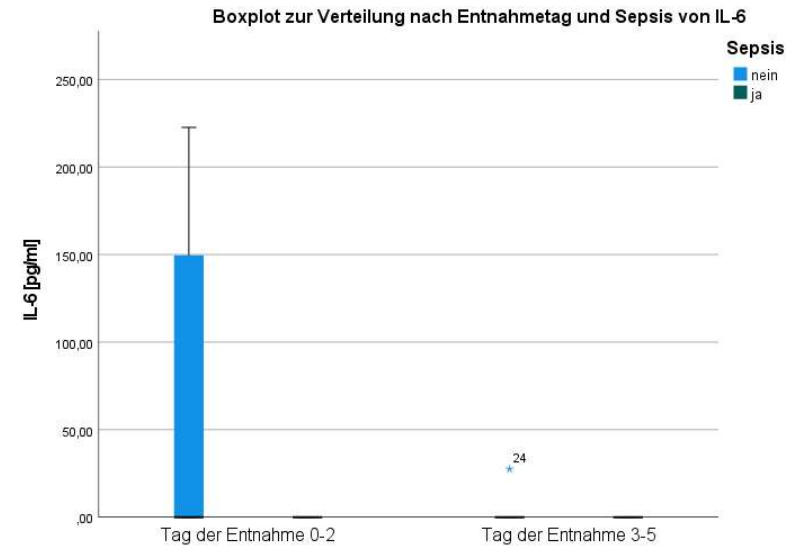
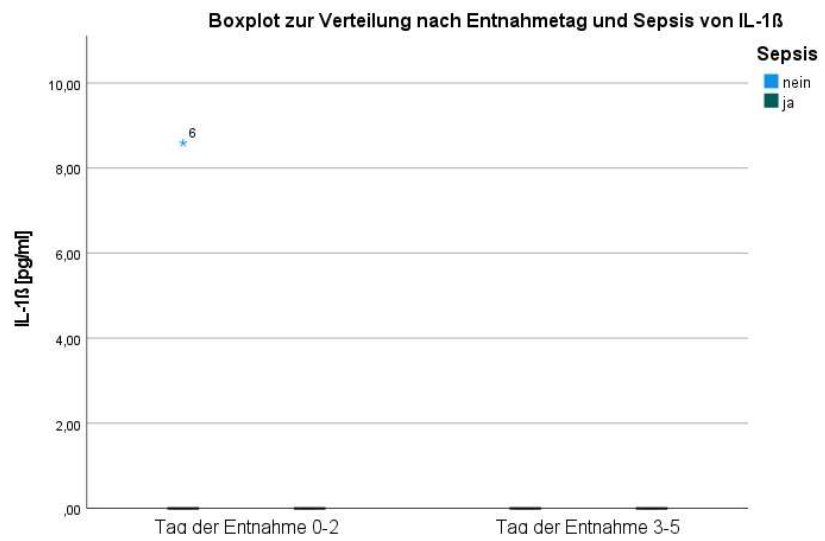


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung der Laborparameter IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 mittels Boxplot.

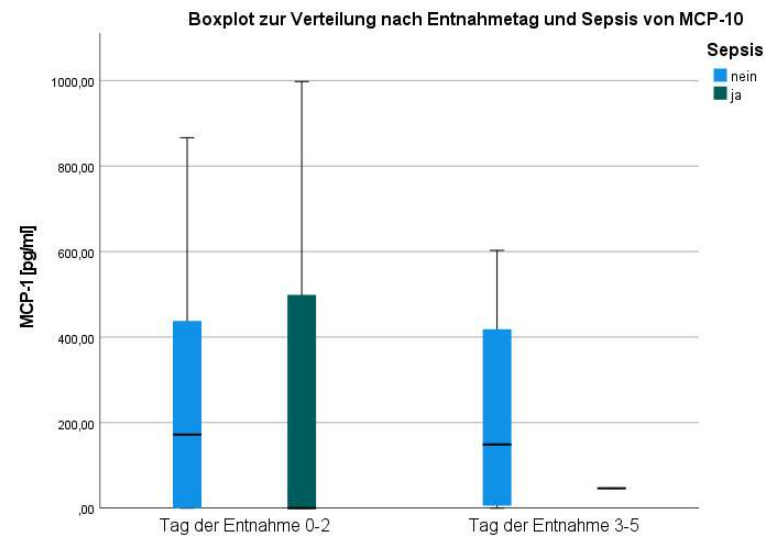
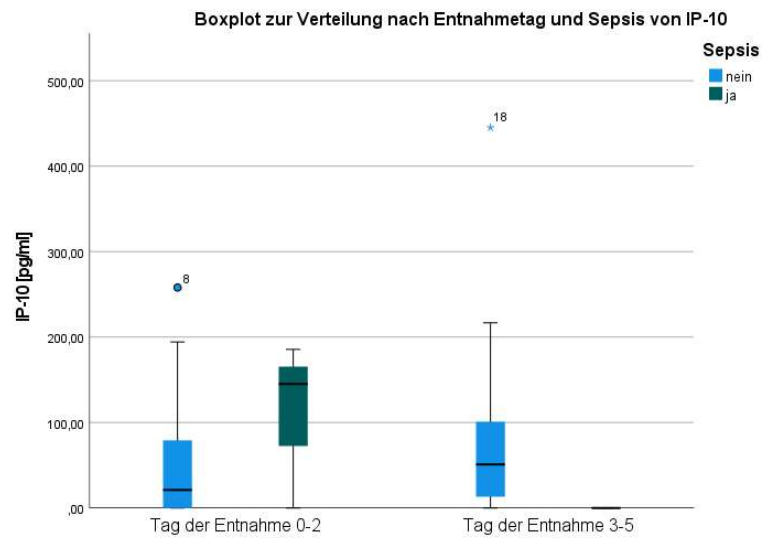
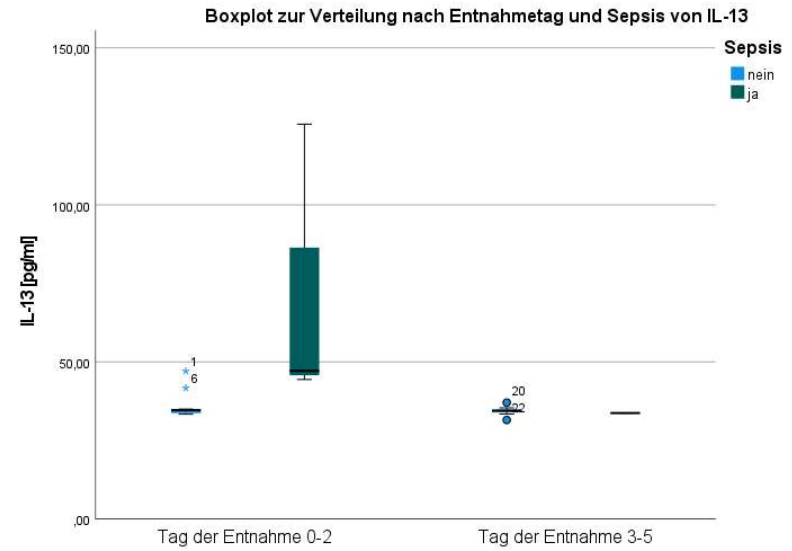
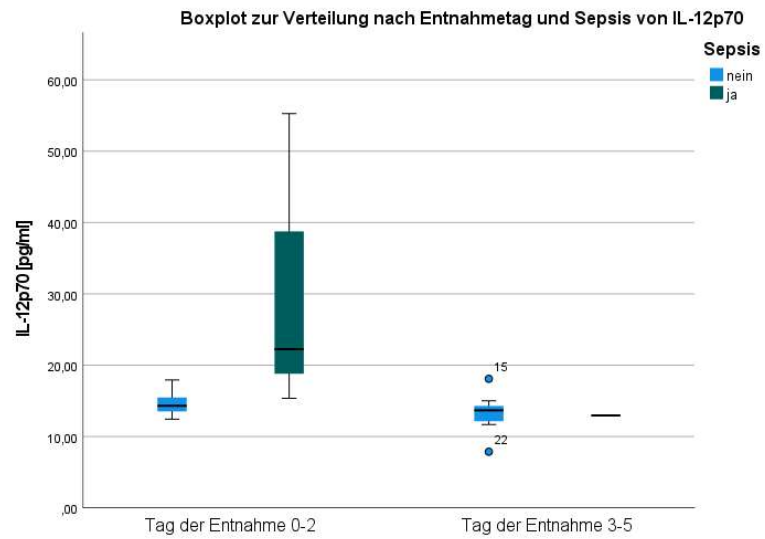


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Verteilung der Laborparameter IL-12p70, IL-13, IP-10 und MCP-10 mittels Boxplot.

4.8 Ergebnisse der Stuhluntersuchungen

Als Maß der biologischen Vielfalt wurden die relative abundance sowie die total abundance der reads betrachtet. Die Betrachtung der Ergebnisse erfolgte auf den taxonomischen Ebenen Phylum und Genus.

Zusätzlich wurden die biologischen Diversitätsindizes Shannon, Chao1, dbp und Simpson-Diversitätsindex analysiert.

Funktionelle Einheiten, die im Mittel eine relative Häufigkeit von Null aufwiesen, wurden von statistischen Analysen ausgeschlossen.

4.8.1 Relative und total abundance sowie Korrelationen auf Phylumebene

Es konnten fünf unterschiedliche Phyla nachgewiesen werden: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria und Verrucomicrobiota. In 33 der 37 Proben (89,2 %) stellten Bakterien einer der drei Phyla Bacteroidetes, Firmicutes oder Proteobacteria mind. 50 % aller reads.

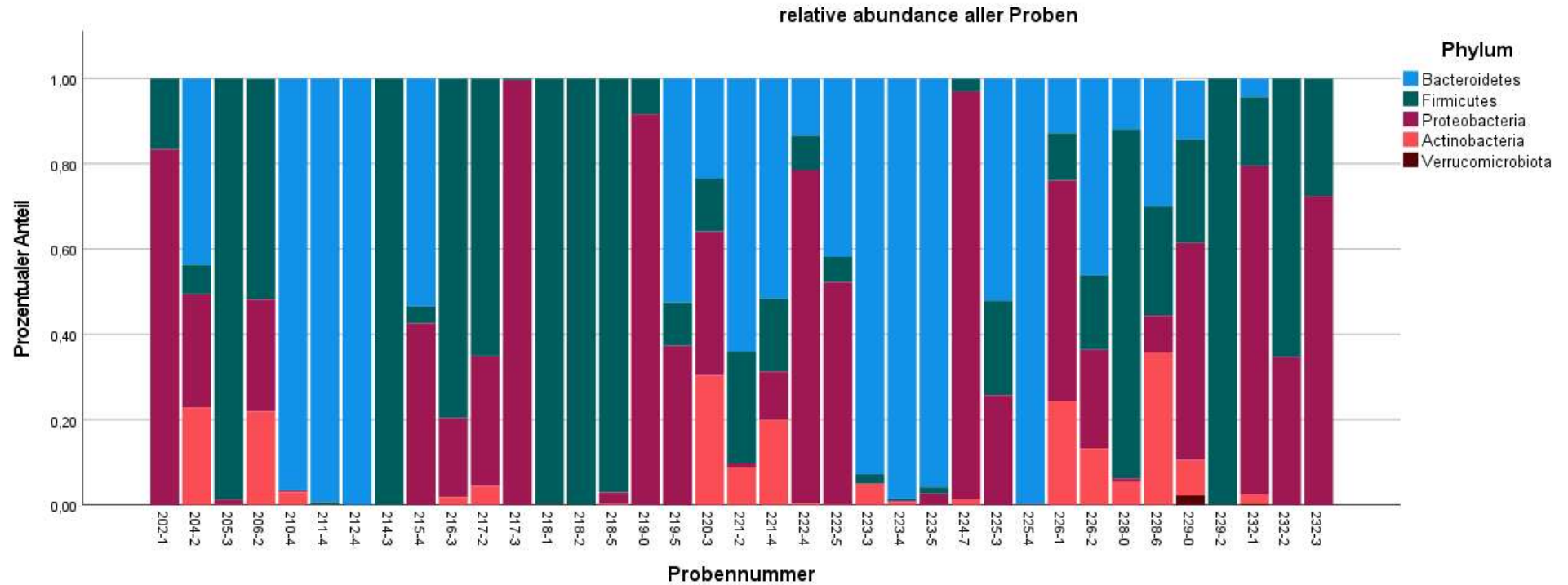


Abbildung 15: relative abundance aller Proben

Die total abundance der Proben unterschied sich dabei z. T. deutlich. Die Probe 229-0 ist trotz ihrer geringen Anzahl an reads als Mekoniumprobe gemäß der im Methodenteil geschilderten Grenzwerte in die Auswertung miteinbezogen worden.

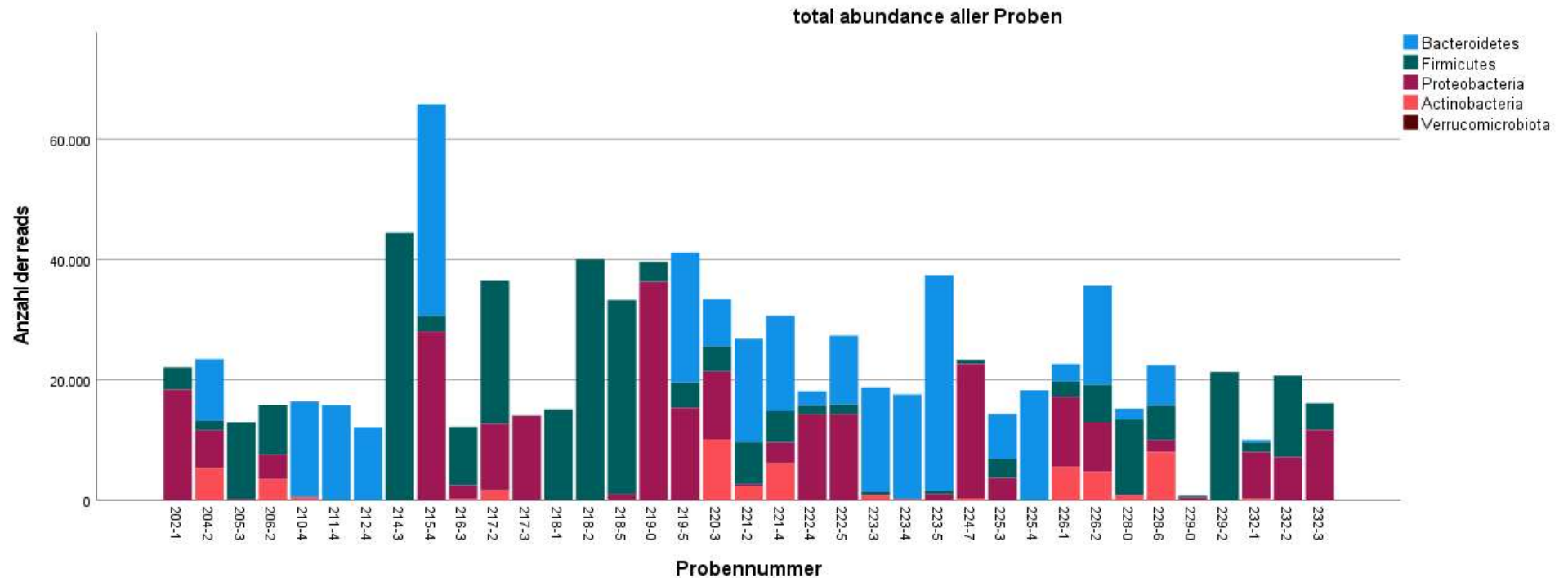


Abbildung 16: total abundance aller Proben

In der Tabelle 13 ist die statistische Verteilung der fünf Phyla in den 37 Proben mit ausreichend reads dargestellt. Die deutlich am stärksten vertretenen Phyla waren Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria. Actinobacteria waren bereits deutlich weniger vertreten. Verrucomicrobiota erreichten nur in einer einzelnen Probe einen 2-%-Anteil.

	Mittelwert [%]	Median [%]	25. Perzentile [%]	75. Perzentile [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
Bacteroidetes	32,39	13,40	0,05	52,98	0	100
Firmicutes	32,62	16,62	3,45	65,20	0	100
Proteobacteria	29,20	23,15	0,34	51,28	0	100
Actinobacteria	5,71	0,28	0,03	6,89	0	36
Verrucomicrobiota	0,07	0	0	0	0	2

Tabelle 13: Verteilungsparameter der relative abundance der gemessenen Phyla.

Die bivariaten Korrelationen der Phyla an den Tagen 2, 3 und 4 werden in den Tabellen 14-16 dargestellt. An Tag 2 zeigte sich ein negativer Zusammenhang von Firmicutes mit Bacteroidetes und Actinobacteria auf. An Tag 3 konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen festgestellt werden. An Tag 4 zeigte sich eine negative Assoziation von Bacteroidetes mit Firmicutes und Proteobacteria.

	Bacteroidetes		Firmicutes		Proteobacteria		Actinobacteria		Verrucomicrob.	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffiz.	p-Wert
Bacteroidetes	1	/	-0,83	0,03	-0,07	0,87	-0,71	0,1	/	/
Firmicutes	-0,83	0,03	1	/	-0,33	0,63	-0,91	0,01	/	/
Proteobacteria	-0,07	0,87	-0,33	0,63	1	/	0,26	0,64	/	/
Actinobacteria	0,71	0,1	-0,91	0,01	0,26	0,64	1	/	/	/
Verrucomicrobiota	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabelle 14: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 2. N = 8. Verrucomicrobiota nicht vorkommend in den Proben. p-Werte FDR-korrigiert

	Bacteroidetes		Firmicutes		Proteobacteria		Actinobacteria		Verrucomicrob.	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffiz.	p-Wert
Bacteroidetes	1	/	-0,57	0,35	0,05	0,95	0,32	0,63	-0,25	0,69
Firmicutes	-0,57	0,35	1	/	-0,57	0,35	-0,02	0,95	-0,58	0,35
Proteobacteria	0,05	0,95	-0,57	0,35	1	/	-0,42	0,51	0,58	0,35
Actinobacteria	0,32	0,63	-0,02	0,95	-0,42	0,51	1	/	-0,42	0,51
Verrucomicrobiota	-0,25	0,69	-0,58	0,35	0,58	0,35	-0,42	0,51	1	/

Tabelle 15: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 3. N = 8. p-Werte FDR-korrigiert

	Bacteroidetes		Firmicutes		Proteobacteria		Actinobacteria		Verrucomicrob.	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffiz.	p-Wert
Bacteroidetes	1	/	-0,81	0,045	-0,91	0,01	-0,57	0,21	/	/
Firmicutes	-0,81	0,045	1	/	0,62	0,20	0,41	0,38	/	/
Proteobacteria	-0,91	0,01	0,62	0,20	1	/	0,33	0,42	/	/
Actinobacteria	-0,57	0,21	0,41	0,38	0,33	0,42	1	/	/	/
Verrucomicrobiota	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabelle 16: Spearman-Korrelation der Phyla an Tag 4. N = 8. Verrucomicrobiota nicht vorkommend in den Proben. p-Werte FDR-korrigiert

4.8.2 Relative abundance und Korrelationen auf Genusebene

50 Genera hatten eine relevante relative abundance von mindestens 1 % in einer Probe und wurden dementsprechend in die statistische Auswertung eingeschlossen. Der prozentuale Anteil der Genera an den Proben zeigt sich wie folgt:

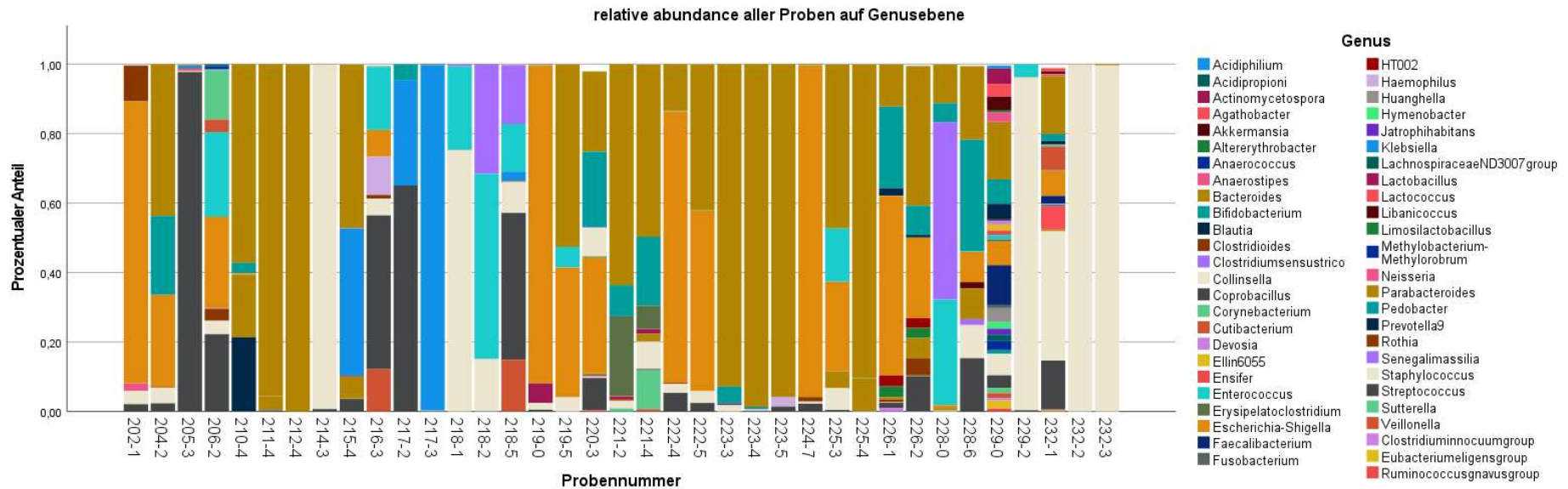


Abbildung 17: relative abundance aller Proben auf Genusebene

Den größten Anteil am Phylum Bacteroidetes machte das Genus Bacteroides (Gesamtmedian 16,6 %) aus. Das Phylum Firmicutes wurde durch die Genera Staphylococcus (Gesamtmedian 2,64 %) sowie Streptococcus (Gesamtmedian 0,72 %) geprägt und innerhalb des Phylums Proteobacteria dominierte das Genus Escherichia-Shigella (Gesamtmedian 0,31 %).

Es erfolgte eine genauere Betrachtung der Korrelationen derjenigen Genera mit einer mittleren relative abundance > 1 %. Diese waren *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium sensu stricto*, *Enterococcus*, *Erysipelaclostridium*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Parabacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Veillonella*. In mehr als der Hälfte der Proben (67,6 %) machte eines der eben genannten Genera mehr als die Hälfte aller reads aus.

	Mittelwert [%]	Median [%]	25. Perzentile [%]	75. Perzentile [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
<i>Bacteroides</i>	30,57	16,60	0,04	51,03	0	100
<i>Bifidobacterium</i>	4,47	0,04	0	5,20	0	32,13
<i>Clostridium sensu stricto</i>	2,72	0	0	0	0	51,01
<i>Enterococcus</i>	5,16	0	0	2,50	0	53,31
<i>Erysipelaclostridium</i>	0,83	0	0	0	0	23,05
<i>Escherichia-Shigella</i>	17,71	0,31	0,05	26,42	0	95,54
<i>Klebsiella</i>	4,76	0	0	0	0	99,43
<i>Parabacteroides</i>	1,69	0	0	0,72	0	18,04
<i>Staphylococcus</i>	16,11	2,64	0,14	8,38	0	100
<i>Streptococcus</i>	9,42	0,72	0,03	7,33	0	97,75
<i>Veillonella</i>	0,8	0	0	0	0	14,89

Tabelle 17: Verteilungsparameter der relative abundance der häufigsten Genera.

Die Korrelationen zwischen diesen Genera an den einzelnen Tagen sah wie folgt aus:

	<i>Bacteroides</i>		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Clostridium sensust.</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Erysipelaclos.</i>		<i>Esch.-Shig.</i>		<i>Klebsiella</i>		<i>Parabacter.</i>		<i>Staphyloco.</i>		<i>Streptoco.</i>		<i>Veillonella</i>	
	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p
<i>Bacteroides</i>	1	/																				
<i>Bifidobacterium</i>	0,87	0,14	1	/																		
<i>Clostridium sensust.</i>	-0,03	0,97	-0,41	0,82	1	/																
<i>Enterococcus</i>	-0,4	0,82	-0,66	0,48	0,72	0,48	1	/														
<i>Erysipelaclostridium</i>	0,66	0,48	-0,51	0,66	-0,05	0,97	-0,43	0,79	1	/												
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,18	0,88	0,24	0,88	0,19	0,88	0,03	0,97	-0,19	0,88	1	/										
<i>Klebsiella</i>	-0,02	0,97	0,02	0,97	0,07	0,97	0,07	0,97	-0,33	0,88	-0,22	0,88	1	/								
<i>Parabacteroides</i>	0,6	0,55	0,48	0,69	0,05	0,97	-0,43	0,79	0,96	<0,01	-0,06	0,97	-0,33	0,88	1	/						
<i>Staphylococcus</i>	-0,64	0,5	-0,6	0,55	-0,06	0,97	0,36	0,97	-0,48	0,69	0,26	0,97	-0,55	0,64	-0,51	0,66	1	/				
<i>Streptococcus</i>	0,2	0,88	0,31	0,88	0,19	0,88	0,03	0,88	-0,19	0,88	-0,12	0,97	-0,76	0,48	-0,06	0,97	-0,69	0,48	1	/		
<i>Veillonella</i>	0,25	0,88	-0,58	0,57	0,66	0,48	0,66	0,48	-0,22	0,88	-0,25	0,88	-0,22	0,88	-0,22	0,88	0,25	0,88	-0,25	0,88	1	/

Tabelle 18: Spearman-Korrelation der häufigsten Genera an Tag 2. N = 8. p-Werte FDR-korrigiert.

	<i>Bacteroides</i>		<i>Bifidobacterium</i>		<i>Clostridium sensust.</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Erysipelaclos.</i>		<i>Esch.-Shig.</i>		<i>Klebsiella</i>		<i>Parabacter.</i>		<i>Staphyloco.</i>		<i>Streptoco.</i>		<i>Veillonella</i>	
	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p
<i>Bacteroides</i>	1	/							/	/												
<i>Bifidobacterium</i>	0,55	0,72	1	/					/	/												
<i>Clostridium sensust.</i>	-0,25	0,81	0,66	0,7	1	/			/	/												
<i>Enterococcus</i>	0,01	0,98	0,22	0,81	0,25	0,81	1		/	/												
<i>Erysipelaclostridium</i>	/	/	/	/	/	/	/		/	/												
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,24	0,81	0,33	0,81	0,58	0,72	0,78	0,59	/	/	1	/										
<i>Klebsiella</i>	-0,75	0,59	-0,43	0,81	-0,22	0,81	0,02	0,98	/	/	-0,16	0,87	1	/								
<i>Parabacteroides</i>	0,52	0,72	0,2	0,82	0,54	0,72	0,53	0,72	/	/	0,73	0,59	-0,33	0,81	1	/						
<i>Staphylococcus</i>	0,26	0,81	-0,36	0,81	-0,41	0,81	-0,32	0,81	/	/	-0,21	0,81	-0,66	0,70	-0,06	0,92	1	/				
<i>Streptococcus</i>	0,46	0,81	0,08	0,91	0,25	0,81	0,52	0,72	/	/	0,46	0,81	0,17	0,85	0,09	0,91	-0,26	0,81	1	/		
<i>Veillonella</i>	-0,08	0,91	0,28	0,81	-0,14	0,87	0,59	0,72	/	/	0,25	0,81	-0,22	0,81	-0,22	0,81	0,08	0,91	0,42	0,81	1	/

Tabelle 19: Spearman-Korrelation der häufigsten Genera an Tag 3. N = 8. p-Werte FDR-korrigiert

Am Entnahmetag 3 konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen festgestellt werden.

	Bacteroides		Bifidobacterium		Clostridi- umsensust.		Enterococ- cus		Ery- sipelaclos.		Esch.-Shig.		Klebsiella		Parabacter.		Staphyloco.		Streptoco.		Veillonella	
	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p	Koeff.	p
<i>Bacteroides</i>	1	/			/	/																
<i>Bifidobacterium</i>	-0,383	0,83	1	/	/	/																
<i>Clostridi- umsen- sustricto</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Enterococ- cus</i>	-0,082	0,85	0,415	0,78	/	/	1	/														
<i>Ery- sipelaclostri- dium</i>	-0,247	0,85	0,581	0,72	/	/	-0,143		1	/												
<i>Escherichia- Shigella</i>	-0,515	0,78	0,548	0,72	/	/	0,415	0,78	-0,083	0,85	1	/										
<i>Klebsiella</i>	-0,412	0,78	-0,249	0,85	/	/	-0,143	0,85	-0,143	0,85	0,083	0,85	1	/								
<i>Parabactero- ides</i>	-0,22	0,85	0,11	0,85	/	/	0,592	0,72	-0,085	0,85	-0,196	0,85	0,254	0,85	1	/						
<i>Staphylococ- cus</i>	-0,429	0,78	0,563	0,72	/	/	-0,412	0,78	0,577	0,72	0,18	0,85	-0,247	0,85	0,317	0,85	1	/				
<i>Streptococ- cus</i>	-0,743	0,72	0,078	0,85	/	/	-0,498	0,78	0,249	0,85	0,289	0,85	0,415	0,78	-0,27	0,85	0,635	0,72	1	/		
<i>Veillonella</i>	-0,247	0,85	0,581	0,72	/	/	-0,143	0,85	1	< 0,01	-0,083	0,85	-0,143	0,85	-0,085	0,85	0,577	0,72	0,249	0,85	1	/

Tabelle 20: Spearman-Korrelation der häufigsten Genera an Tag 4. p-Werte FDR-korrigiert

Am Entnahmetag 4 konnte für das Genus Clostridi-umsensust. keine Korrelation errechnet werden. Hier fällt der starke Zusammenhang zwischen Veillonella und Erysipelaclostridium auf.

4.8.3 Biologische Diversitätsparameter

Weiterer Untersuchungsgegenstand waren die biologischen Diversitätsindizes Shannon, Chao1, dbp sowie Simpson's Diversitätsindex (1-D).

	Mittelwert	Median	25. Perzentile	75. Perzentile	Minimum	Maximum
Shannon	1,23	1,13	0,71	1,77	0,04	2,64
Chao1	16,08	13,00	9,00	20,50	5,00	44,00
dbp	0,57	0,53	0,40	0,73	0,21	0,99
Simpson	0,55	0,56	0,40	0,75	0,01	0,86

Tabelle 21: Häufigkeitsparameter der Diversitätsparameter über alle Proben hinweg

Zur graphischen Veranschaulichung sind folgend Boxplots zur Häufigkeitsverteilung der vier Parameter über das gesamte Studienkollektiv zu sehen:

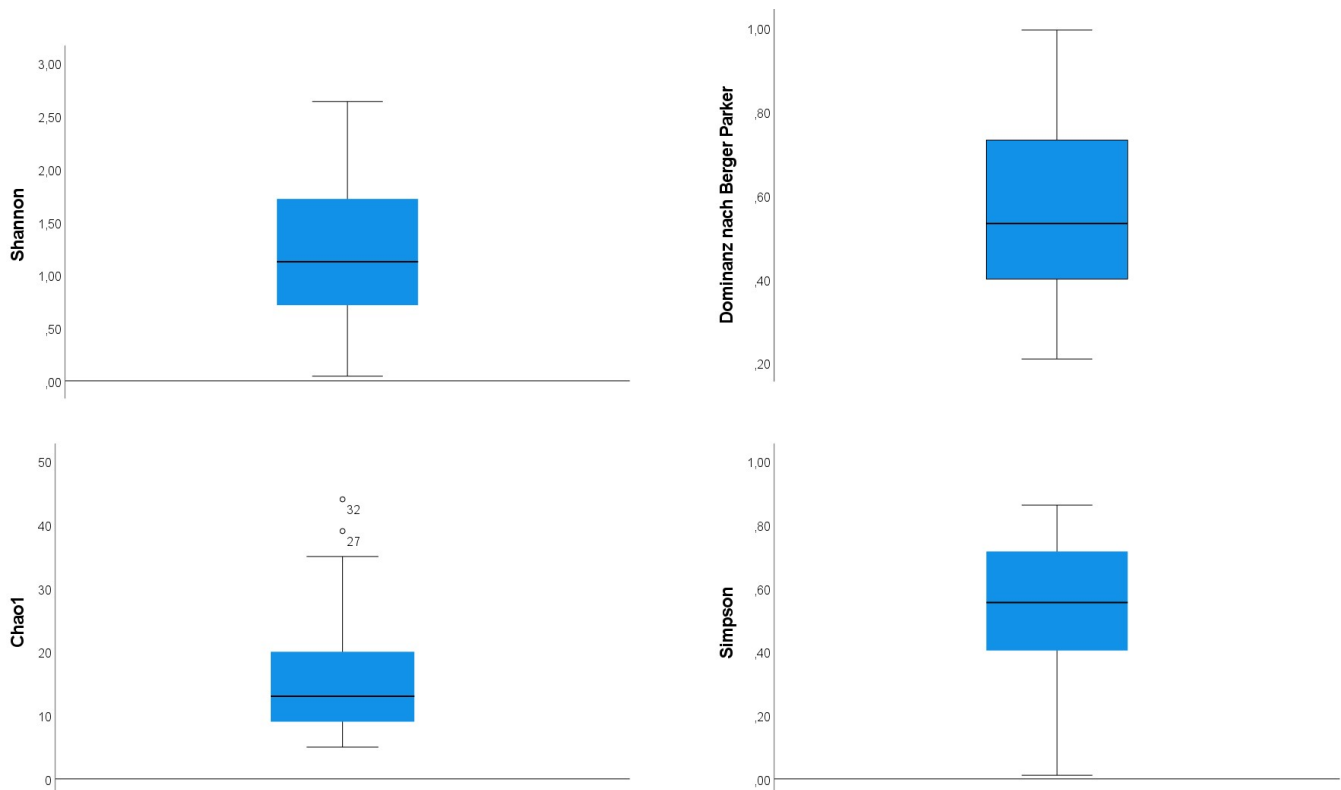


Abbildung 18: Boxplots zu den Diversitätsparametern

Werden die Mediane der Parameter nach Lebensstagen aufgeschlüsselt, ist eine geringe Änderung der Werte über die Zeit festzustellen (Tab. 23). Zu beachten ist, dass sowohl an Tag 6 als auch 7 nur eine einzelne Probe ausgewertet wurde.

	Tag 0 (N = 3)	Tag 1 (N = 4)	Tag 2 (N = 8)	Tag 3 (N = 8)	Tag 4 (N = 8)	Tag 5 (N = 4)	Tag 6 (N = 1)	Tag 7 (N = 1)
Shannon	1,27	1,09	1,21	1,13	0,95	1,22	2,11	0,24
Chao1	15	19	10,5	13	12	14,5	25	10
dbp	0,5	0,7	0,48	0,67	0,52	0,50	0,24	0,96
Simpson	0,64	0,47	0,65	0,51	0,56	0,62	0,85	0,09

Tabelle 22: Mediane der Diversitätsparameter an den ersten acht Lebenstagen, bzw. Wert der einzelnen Probe

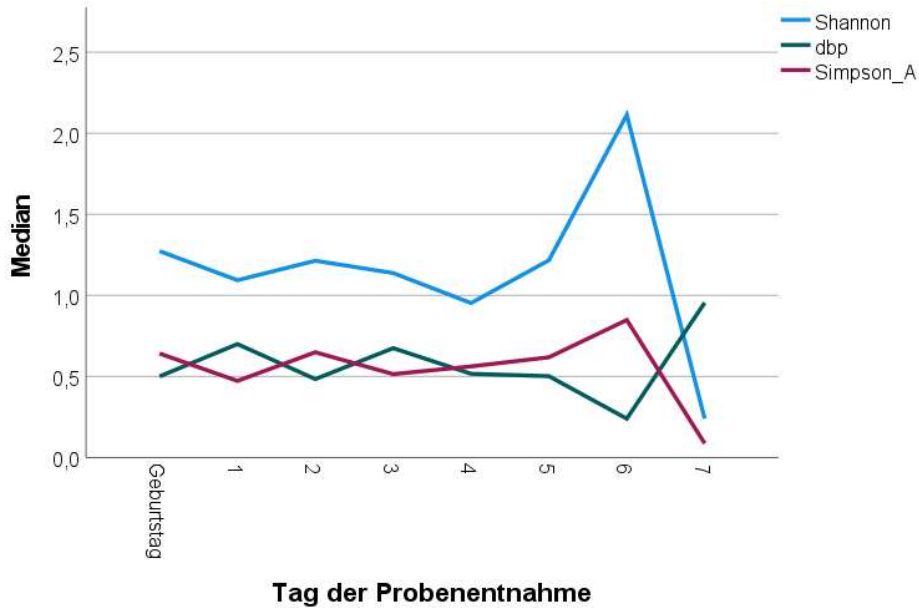


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Mediane von Shannon, dbp und Simpson

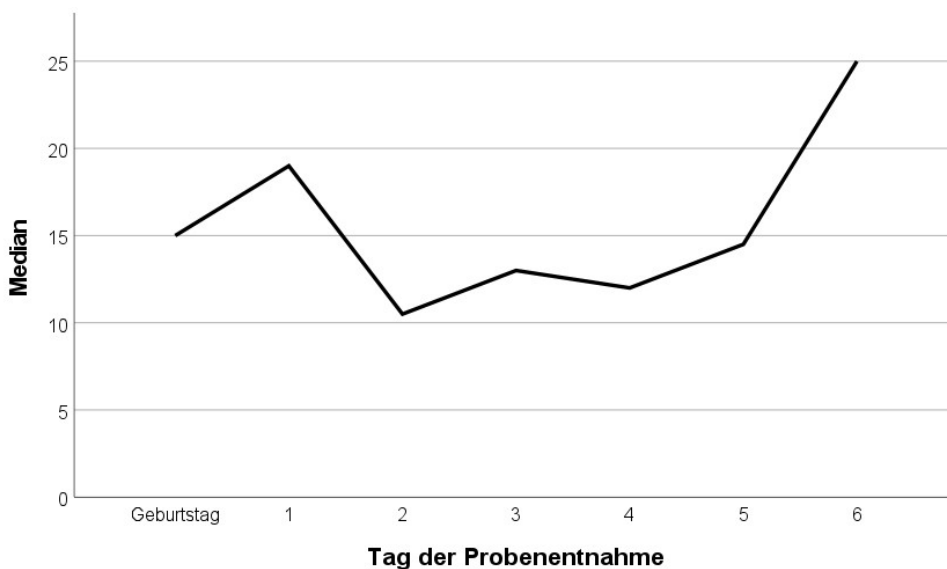


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf des Medians von Chao1

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der biologischen Diversität und den Phyla und Genera zu testen, wurde die Korrelation zwischen den Parametern berechnet. Auf die Darstellung für Verrucomicrobiota wurde verzichtet. Auch wenn nur ein signifikanter Zusammenhang

festgestellt werden konnte (an Tag 3), fällt auf, dass keine Regelmäßigkeit in der Ausprägung der Korrelation zu beobachten ist.

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
Bacteroidetes	0,306	0,461	0,477	0,436	-0,064	0,145	0,199	0,636
Firmicutes	-0,57	0,28	-0,468	0,436	0,471	0,239	-0,545	0,217
Proteobacteria	0,428	0,39	-0,013	0,975	-0,609	0,145	0,556	0,217
Actinobacteria	0,581	0,28	0,399	0,436	-0,619	0,145	0,591	0,217

Tabelle 23: Spearman-Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 2. p-Wert FDR-korrigiert

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
Bacteroidetes	0,289	0,65	0,119	0,78	-0,217	0,786	0,275	0,721
Firmicutes	-0,191	0,65	-0,191	0,78	0,115	0,786	-0,151	0,721
Proteobacteria	-0,195	0,65	0,16	0,78	0,181	0,786	-0,203	0,721
Actinobacteria	0,509	0,65	0,946	0,004	-0,388	0,786	0,418	0,721

Tabelle 24: Spearman-Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 3. p-Wert FDR-korrigiert

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
Bacteroidetes	-0,285	0,659	-0,481	0,304	0,011	0,98	-0,129	0,884
Firmicutes	0,59	0,248	0,727	0,094	-0,296	0,94	0,39	0,884
Proteobacteria	0,032	0,939	0,226	0,094	0,16	0,94	-0,062	0,68
Actinobacteria	0,709	0,196	0,714	0,591	-0,458	0,94	0,532	0,68

Tabelle 25: Spearman-Korrelation der Diversitätsparameter u. wichtigsten Phyla an Tag 4. p-Wert FDR-korrigiert

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der Genera.

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	0,37	0,83	0,53	0,48	-0,23	0,96	0,23	0,96
<i>Bifidobacterium</i>	0,24	0,83	0,24	0,78	-0,05	0,96	0,05	0,96
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,36	0,83	0,64	0,43	-0,52	0,96	0,52	0,96
<i>Enterococcus</i>	-0,22	0,83	0,26	0,78	-0,03	0,96	0,03	0,96
<i>Erysipelotrichidium</i>	0,31	0,83	0,6	0,43	-0,06	0,96	0,06	0,96
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,67	0,78	0,31	0,78	-0,71	0,52	0,71	0,52
<i>Klebsiella</i>	-0,08	0,87	0,15	0,8	-0,03	0,96	0,03	0,96
<i>Parabacteroides</i>	0,44	0,83	0,66	0,43	-0,19	0,96	0,19	0,96
<i>Staphylococcus</i>	-0,14	0,87	-0,35	0,78	0,02	0,96	-0,02	0,96
<i>Streptococcus</i>	0,07	0,87	0,17	0,8	-0,12	0,96	0,12	0,96
<i>Veillonella</i>	-0,25	0,83	0,08	0,84	0,02	0,96	-0,08	0,96

Tabelle 26: Spearman-Korrelation zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 2. p-Werte FDR-korrigiert.

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	0,67	0,2	0,47	0,34	-0,65	0,62	0,55	0,26
<i>Bifidobacterium</i>	0,74	0,19	0,8	0,18	-0,36	0,62	0,57	0,26
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,58	0,21	0,58	0,33	-0,25	0,62	0,41	0,39
<i>Enterococcus</i>	0,56	0,21	0,62	0,33	-0,61	0,27	0,61	0,26
<i>Erysipelaclostridium</i>	/	/	/	/	/	/	/	
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,76	0,19	0,64	0,33	-0,76	0,26	0,76	0,26
<i>Klebsiella</i>	-0,66	0,2	-0,41	0,35	0,65	0,26	-0,66	0,26
<i>Parabacteroides</i>	0,59	0,21	0,53	0,35	-0,66	0,26	0,48	0,32
<i>Staphylococcus</i>	0,02	0,96	-0,31	0,45	-0,31	0,62	0,19	0,65
<i>Streptococcus</i>	0,23	0,65	0,48	0,35	-0,13	0,76	0,25	0,61
<i>Veillonella</i>	0,41	0,39	0,42	0,35	-0,41	0,62	0,58	0,26

Tabelle 27: Spearman-Korrelation zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 3. p-Werte FDR-korrigiert.

	Shannon		Chao1		dbp		Simpson	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	-0,48	0,47	-0,77	0,22	0,33	0,7	0,31	0,76
<i>Bifidobacterium</i>	0,78	0,23	0,68	0,22	-0,53	0,45	0,7	0,33
<i>Clostridium sensu stricto</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Enterococcus</i>	0,41	0,52	0,25	0,55	-0,08	0,98	0,41	0,62
<i>Erysipeloclostridium</i>	0,58	0,34	0,58	0,26	-0,58	0,45	0,58	0,33
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,29	0,63	0,33	0,47	0,01	0,98	0,17	0,82
<i>Klebsiella</i>	0,25	0,63	0,42	0,44	-0,41	0,62	0,25	0,79
<i>Parabacteroides</i>	0,66	0,34	0,69	0,22	-0,66	0,45	0,66	0,33
<i>Staphylococcus</i>	0,24	0,63	0,38	0,44	-0,19	0,93	0,1	0,82
<i>Streptococcus</i>	0,04	0,93	0,41	0,44	-0,05	0,98	-0,12	0,82
<i>Veillonella</i>	0,58	0,34	0,58	0,26	-0,58	0,45	0,58	0,34

Tabelle 28: Spearman-Korrelation zw. Diversitätsparametern und Genera an Entnahmetag 4. p-Werte FDR-korrigiert.

4.8.4 Vergleich zwischen Kontroll- und Sepsisgruppe

In dieser Studie wurde mittels MWU-Test untersucht, ob sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen an Sepsis erkrankten Kindern und gesunden feststellen ließen. Wie bereits im Methodenteil erläutert, wurden dazu zwei Subgruppen gebildet, die entsprechend der Entnahmetage 0-2, bzw. 3-5 gebildet wurden.

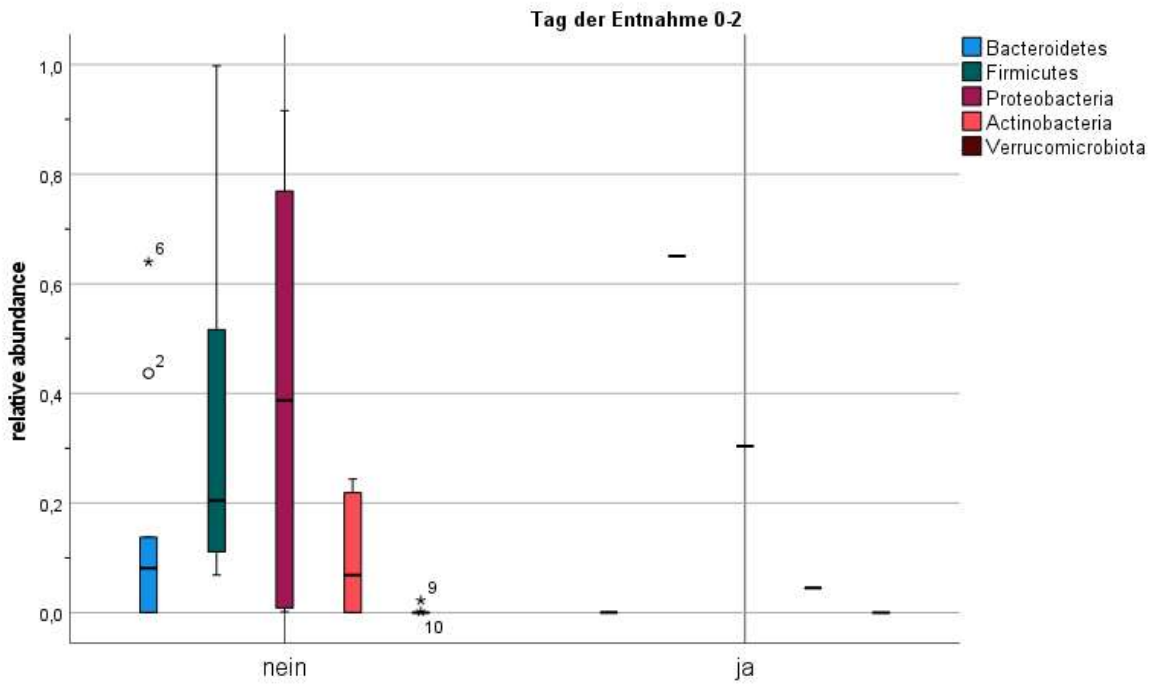
Untersuchungsgegenstand war die Phylogenetik auf Phylum- und Genusebene sowie die bereits bekannten biologischen Diversitätsparameter.

4.8.4.1 Phylumebene

Auffallend sind insbesondere die unterschiedlichen Medianwerte bei Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria. Zudem ist die Spannweite von Firmicutes in der Sepsisgruppe deutlich kleiner. An den Entnahmetagen 0-2 konnte nur eine Probe aus der Sepsisgruppe gesammelt werden.

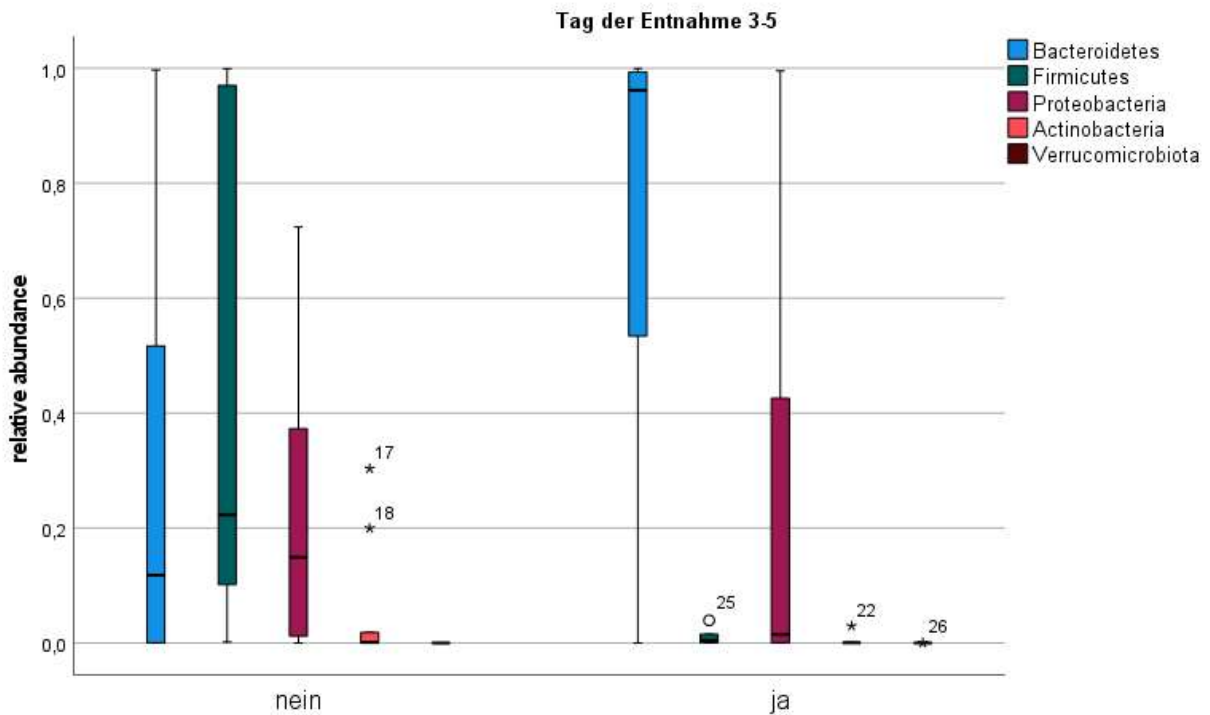
	Gruppe „Früh“ – Sepsis (N = 1)	Gruppe „Früh“ – Kontrolle (N = 10)	Gruppe „Spät“ – Sepsis (N = 6)	Gruppe „Spät“ – Kontrolle (N = 10)
Bacteroidetes	0,0004	0,0812	0,9618	0,1181
Firmicutes	0,6508	0,2047	0,0047	0,2231
Proteobacteria	0,3038	0,3873	0,0148	0,1493
Actinobacteria	0,451	0,0689	0,0004	0,0013
Verrucomicrobiota	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabelle 29: Mediane der relative abundance der Phyla in den jeweiligen Gruppen.



Sepsis

Abbildung 21: Boxplot zur relativen Häufigkeit der Phyla bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 0-2. Antennen mit Minimal- bzw. Maximalwert, der unter dem 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQA) liegt. Punkte sind Ausreißer zw. dem 1,5- und 2,5-fachen IQA, Sterne über dem 2,5-fachen IQA.



Sepsis

Abbildung 22: Boxplot zur relativen Häufigkeit der Phyla bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 3-5.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich im Mann-Whitney-U-Test in der Gruppe „Früh“ (Tage 0-2) keine Unterschiede.

	MR Sepsis (N = 1)	MR Kontrolle (N = 10)	p-Wert
Bacteroidetes	2,00	6,40	1,000
Firmicutes	9,00	5,70	1,000
Proteobacteria	6,00	6,00	1,000
Actinobacteria	5,00	6,10	1,000
Verrucomicrobiota	5,00	6,10	1,000

Tabelle 30: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 0-2. MR = Mittlerer Rang im MWU-Test. p-Wert FDR-korrigiert.

In der Gruppe „Spät“ (Tage 3-5) fiel auf, dass in der Sepsisgruppe signifikant weniger Bakterien aus dem Phylum Firmicutes auftraten ($p = 0,015$) und mehr Bakterien aus dem Phylum Bacteroidetes ($p = 0,14$).

	MR Sepsis (N = 6)	MR Kontrolle (N = 10)	p-Wert
Bacteroidetes	11,50	6,70	0,140
Firmicutes	4,17	11,10	0,015
Proteobacteria	7,50	9,10	0,635
Actinobacteria	7,00	9,40	0,613
Verrucomicrobiota	9,33	8,00	0,635

Tabelle 31: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 3-5. p-Wert FDR-korrigiert.

4.8.4.2 Genusebene

	Gruppe 1 – Sepsis (N = 1)	Gruppe 1 – Kontrolle (N = 10)	Gruppe 2 – Sepsis (N = 6)	Gruppe 2 – Kontrolle (N = 10)
<i>Bacteroides</i>	0,0003	0,1165	0,7634	0,1166
<i>Bifidobacterium</i>	0,0451	0,0375	0,0001	0,0002
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Escherichia-Shigella</i>	0,0002	0,1671	0,0003	0,0000
<i>Enterococcus</i>	0,0000	0,0005	0,0000	0,0002
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Klebsiella</i>	0,3037	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Parabacteroides</i>	0,0000	0,0000	0,0195	0,0000
<i>Staphylococcus</i>	0,0000	0,0385	0,0008	0,0447
<i>Streptococcus</i>	0,6507	0,0181	0,0024	0,0160
<i>Veillonella</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabelle 32: Mediane der relative abundance der Genera in den jeweiligen Gruppen.

Der folgende Boxplot zeigt die Verteilung der relativen Häufigkeit der Genera an den Tagen 0-2, bzw. 3-5. Außer bei *Bacteroides* zeigten sich zahlreiche Ausreißer.

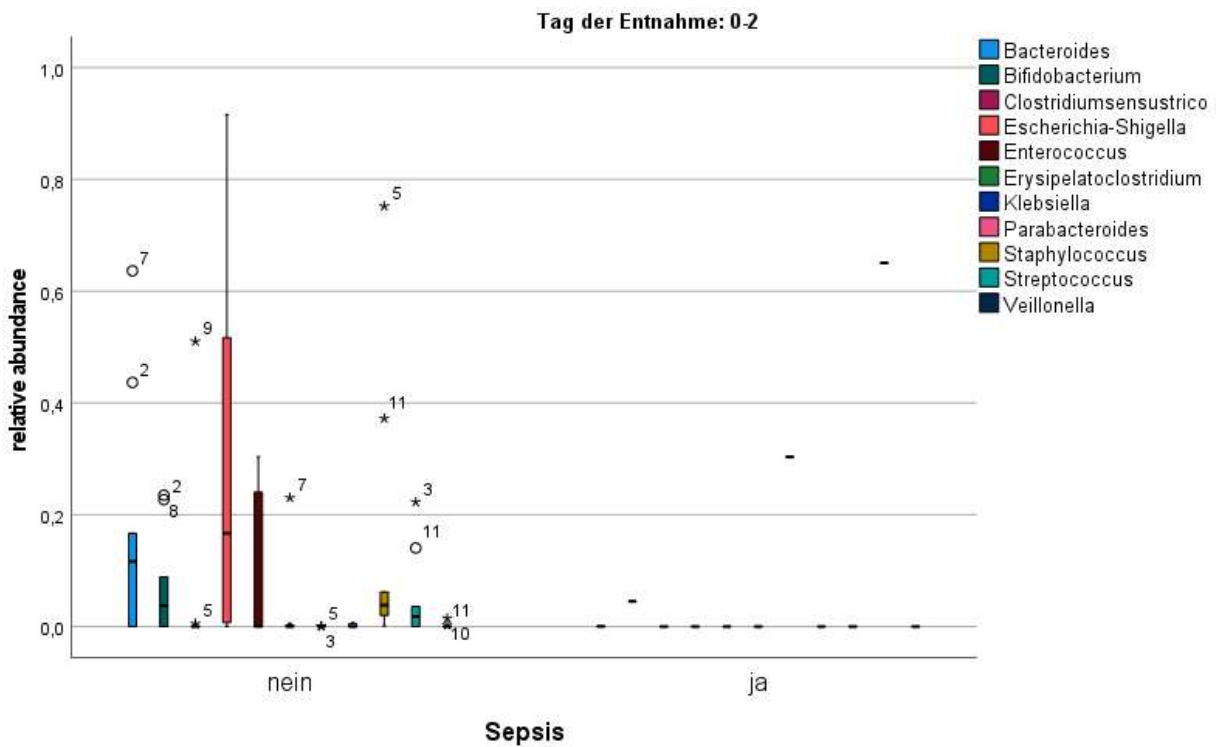


Abbildung 23: Boxplot zur relativen Häufigkeit der häufigsten Genera bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 0-2 Punkte sind Ausreißer zw. dem 1,5- und 2,5-fachen IQA, Sterne über dem 2,5-fachen IQA.

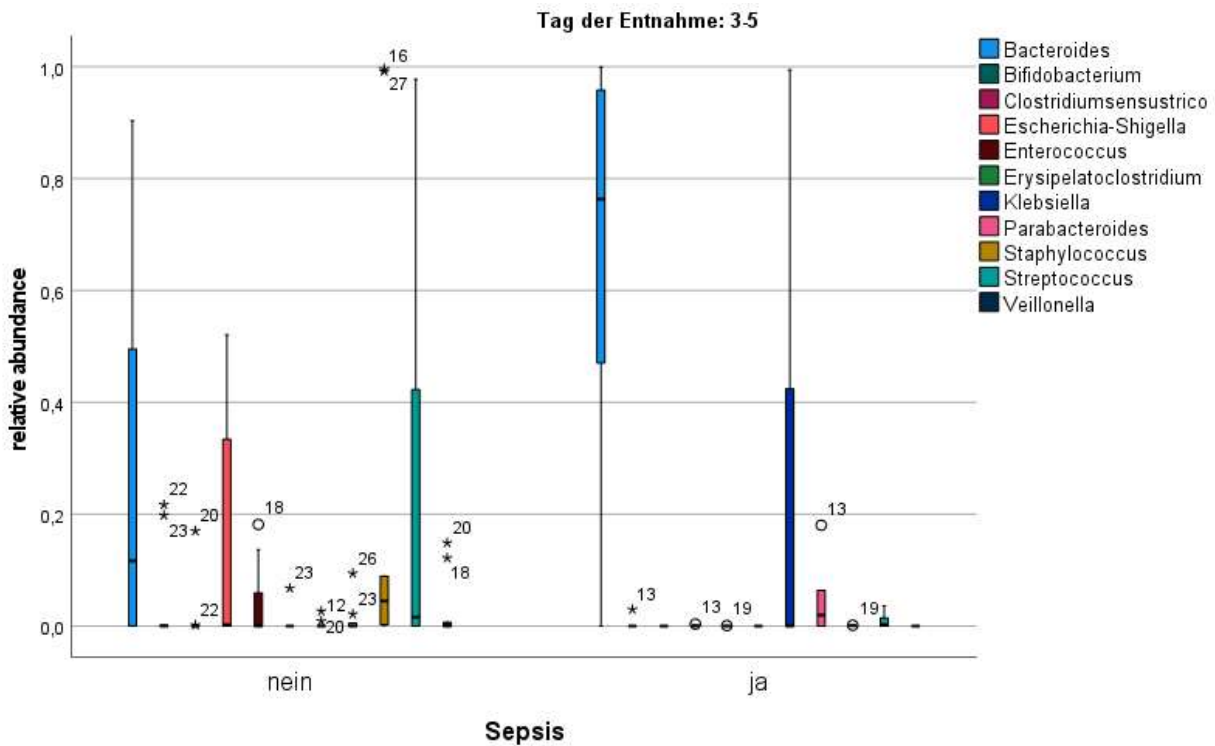


Abbildung 24: Boxplot zur relativen Häufigkeit der häufigsten Genera bei Sepsis- und Kontrollproben in den Tagen 3-5.

Beim Testen der Genera auf Unterschiede bzgl. des Auftretens einer Sepsis zeigten sich in der Gruppe 2 (Tage 3-5) mehr *Bacteroides* in der Sepsisgruppe ($p = 0,401$) und signifikant mehr *Staphylococci* in der Kontrollgruppe ($p = 0,001$):

	MR Sepsis (N = 1)	MR Kontrolle (N = 10)	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	2,00	6,40	0,800
<i>Bifidobacterium</i>	6,00	6,00	1,000
<i>Clostridium sensu stricto</i>	4,00	6,20	0,800
<i>Escherichia-Shigella</i>	1,00	6,50	0,500
<i>Enterococcus</i>	3,50	6,25	0,800
<i>Erysipelatoclostridium</i>	4,50	6,15	0,800
<i>Klebsiella</i>	11,00	5,50	0,500
<i>Parabacteroides</i>	4,00	6,20	0,800
<i>Staphylococcus</i>	1,00	6,50	0,500
<i>Streptococcus</i>	11,00	5,50	0,500
<i>Veillonella</i>	6,15	4,50	0,800

Tabelle 33: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 0-2. p-Wert FDR-korrigiert.

	MR Sepsis (N = 6)	MR Kontrolle (N = 10)	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	11,25	6,85	0,401
<i>Bifidobacterium</i>	7,75	8,95	0,776
<i>Clostridium sensu stricto</i>	7,50	9,10	0,776
<i>Escherichia-Shigella</i>	9,50	6,83	0,579
<i>Enterococcus</i>	7,00	9,40	0,578
<i>Erysipelatoclostridium</i>	8,00	8,80	0,792
<i>Klebsiella</i>	9,17	8,10	0,784
<i>Parabacteroides</i>	9,92	7,65	0,578
<i>Staphylococcus</i>	3,67	11,40	0,001
<i>Streptococcus</i>	6,67	9,60	0,578
<i>Veillonella</i>	7,00	9,40	0,578

Tabelle 34: MWU-Test bzgl. Unterschiede zw. Sepsis- u. Kontrollgruppe in den Tagen 3-5. p-Werte FDR-korrigiert.

4.8.4.3 Diversitätsparameter

Im Folgenden wurden die Werte analog zur Phylogenetik aufgeschlüsselt und nach Sepsis- und Kontrollgruppe bzw. den Entnahmetagen analysiert. Dabei ergaben sich folgende Mediane in den jeweiligen Gruppen:

	Gruppe „Früh“-Sepsis (N = 1)	Gruppe „Früh“-Kontrolle (N = 10)	Gruppe „Spät“-Sepsis (N = 6)	Gruppe „Spät“-Kontrolle (N = 10)
Shannon	0,79	1,29	0,61	1,31
Chao1	7	16	11	14
dbp	0,65	0,57	0,73	0,48
Simpson	0,48	0,60	0,35	0,63

Tabelle 35: Mediane der 4 Parameter in den jeweiligen Gruppen.

Graphisch dargestellt zeigen sich die Boxplots für die Parameter folgendermaßen:

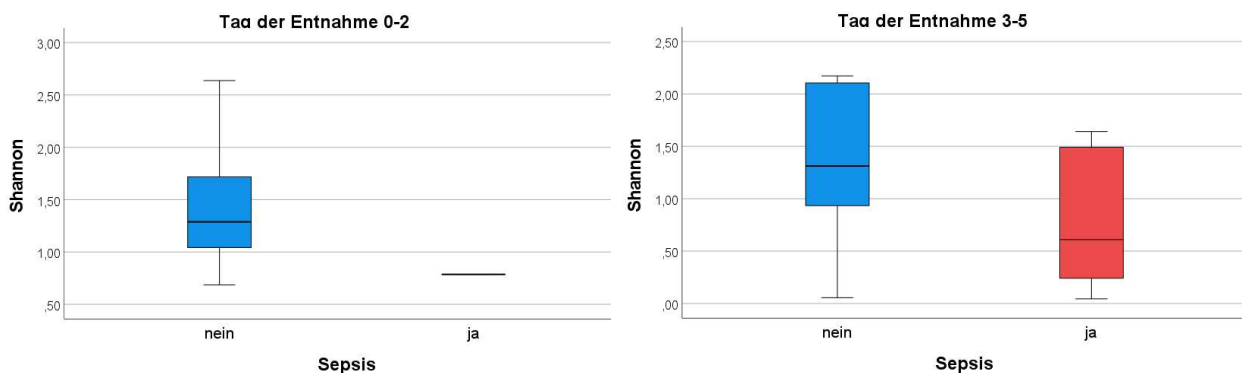


Abbildung 25: Boxplots zu Shannon aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis

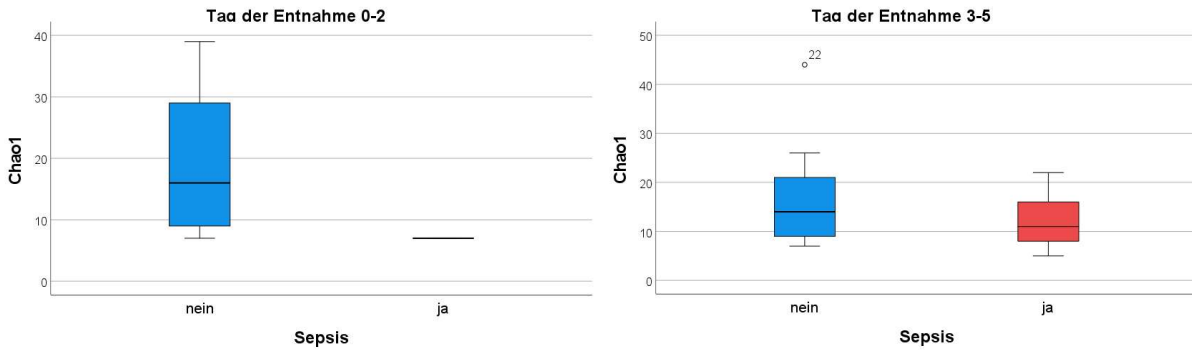


Abbildung 26: Boxplots zu Chao 1 aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis

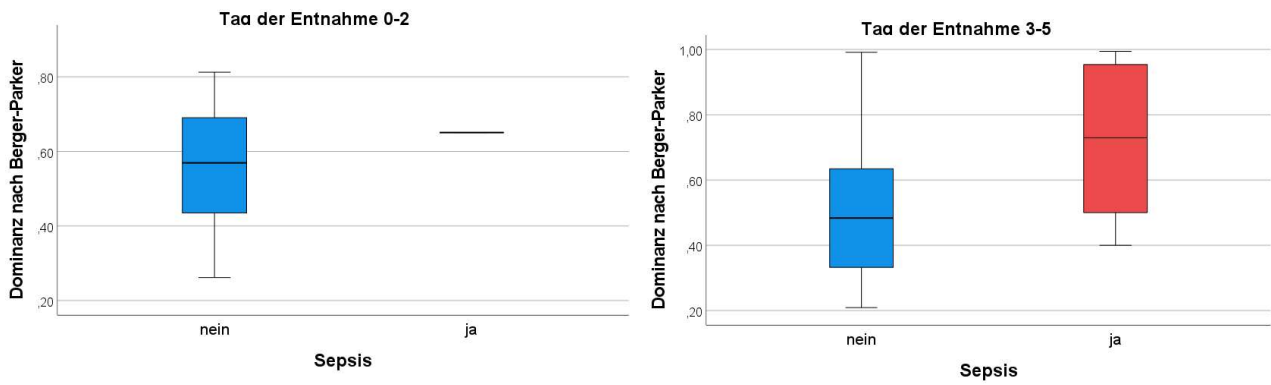


Abbildung 27: Boxplots zur Dominanz aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis

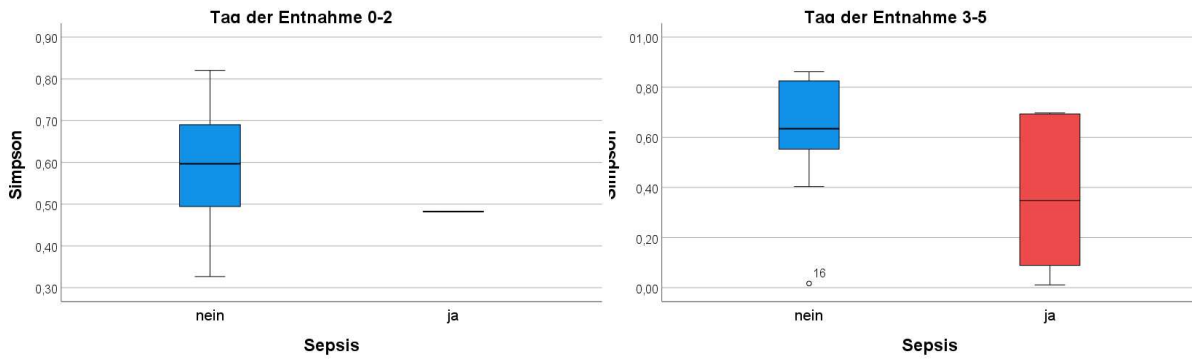


Abbildung 28: Boxplots zu Simpson aufgeteilt nach Entnahmetag und Sepsis

Die Überprüfung mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelte keine statistisch signifikanten Unterschiede, bestätigte jedoch die Tendenz zu einem diverserem Mikrobiom bei gesunden Kindern – vor allem während der Entnahmetage 3-5.

	MR Sepsis	MR Kontrolle	p-Wert
Shannon	3,00	6,30	0,727
Chao1	1,50	6,45	0,727
dbp	7,00	8,90	0,909
Simpson	3,00	6,30	0,727

Tabelle 36: MWU-Test der Parameter zw. Kontroll- und Sepsisgruppe in den Tag 0-2. p-Werte FDR-korrigiert.

	MR Sepsis	MR Kontrolle	p-Wert
Shannon	5,83	10,10	0,196
Chao1	7,08	9,35	0,368
dbp	11,00	7,00	0,196
Simpson	9,90	6,17	0,196

Tabelle 37: MWU-Test der Parameter zw. Kontroll- und Sepsisgruppe in den Tag 3-5. p-Werte FDR-korrigiert.

4.8.5 Vergleich zwischen Spontangeburt und Sectiones

Um einen möglichen Einfluss des Geburtsweges auf die Verteilung der Phyla bzw. Genera prüfen, wurde ein MWU-Test zur Unterscheidung auf diesen beiden Ebenen durchgeführt. Sämtliche CS-Proben entstammten von Kindern der Kontrollgruppe bzgl. EOS.

Phylumebene

	MR Sectio (N = 3)	MR Spontangeburt (N = 8)	p-Wert
Bacteroidetes	5,88	6,33	0,921
Firmicutes	5,63	7,00	0,921
Proteobacteria	6,13	5,67	0,921
Actinobacteria	6,63	4,33	0,921
Verrucomicrobiota	5,00	8,67	0,665

Tabelle 38: MWU-Test der Phyla bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 0-2. MR = Mittlerer Rang. p-Wert FDR-korrigiert.

	MR Sectio (N = 2)	MR Spontangeburt (N = 14)	p-Wert
Bacteroidetes	9,07	4,50	0,668
Firmicutes	7,86	13,00	0,668
Proteobacteria	8,07	11,50	0,695
Actinobacteria	8,71	7,00	0,875
Verrucomicrobiota	8,57	8,00	0,933

Tabelle 39: MWU-Test der Phyla bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 3-5. MR = Mittlerer Rang. p-Wert FDR-korrigiert.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Genusebene

	MR Sectio	MR Spontangeburt	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	5,63	7,00	0,99
<i>Bifidobacterium</i>	6,44	4,83	0,99
<i>Clostridiumsen- sustricto</i>	6,00	6,00	1
<i>Enterococcus</i>	5,69	6,83	0,99
<i>Erysipelaclostridium</i>	5,31	7,83	0,99
<i>Escherichia-Shigella</i>	6,50	4,67	0,99
<i>Klebsiella</i>	6,00	6,00	1
<i>Parabacteroides</i>	6,13	5,67	1
<i>Staphylococcus</i>	4,50	10,00	0,132
<i>Streptococcus</i>	5,94	6,17	1
<i>Veillonella</i>	6,17	5,06	0,732

Tabelle 40: MWU-Test der Genera bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 0-2. MR = Mittlerer Rang. p-Wert FDR-korrigiert.

	MR Sectio	MR Spontangeburt	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	9,00	5,00	0,765
<i>Bifidobacterium</i>	9,07	4,50	0,765
<i>Clostridiumsen- sustricto</i>	8,04	11,75	0,765
<i>Enterococcus</i>	8,29	10,00	0,856
<i>Erysipelaclostridium</i>	8,57	8,00	0,933
<i>Escherichia-Shigella</i>	8,79	6,50	0,856
<i>Klebsiella</i>	8,29	10,00	0,856
<i>Parabacteroides</i>	8,93	5,50	0,765
<i>Staphylococcus</i>	7,57	15,0	0,363
<i>Streptococcus</i>	8,54	8,25	0,933
<i>Veillonella</i>	8,07	11,50	0,765

Tabelle 41: MWU-Test der Genera bzgl. des Geburtsweges in den Tagen 3-5. MR = Mittlerer Rang. p-Wert FDR-korrigiert.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auf Ebene der Genera. In der Gruppe „Früh“ stach das Genus *Staphylococcus* mit mehr Vertretern dieses Genus bei einer Spontangeburt hervor ($p = 0,132$). An den Tagen 3-5 waren *Staphylococci* erneut häufiger bei einer vaginalen Entbindung vertreten ($p = 0,363$).

4.8.6 Vergleich hinsichtlich antibiotischer Therapie

Um die Auswirkungen der antibiotischen Therapie auf die Phylogenetik des Mikrobiom zu untersuchen, wurde erneut für die beiden nach Entnahmetag gebildeten Gruppen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten alle einen p-Wert $> 0,5$ nach FDR-Korrektur. Nur während der Entnahmetage 3-5 zeigte sich eine nennenswerte Tendenz zu mehr Actinobacteria bei Abwesenheit der Therapie.

Bei Durchführung des MWU-Tests bzgl. der Diversitätsparameter zeigten sich hingegen statistisch signifikante Ergebnisse für die Entnahmetage 3-5:

	MR Antibiose (N = 6)	MR Kontrolle (N = 5)	p-Wert
Shannon	6,80	5,33	1,00
Chao1	6,90	5,25	1,00
dbp	6,00	6,00	1,00
Simpson	6,20	5,83	1,00

Tabelle 42: MWU-Test zu antibiotischer Behandlung bzgl. der Diversitätsparameter an den Entnahmetagen 0-2. p-Werte FDR-korrigiert.

	MR Antibiose (N = 3)	MR Kontrolle (N = 13)	p-Wert
Shannon	7,15	14,33	0,019
Chao1	7,27	13,83	0,019
dbp	9,85	2,67	0,019
Simpson	7,15	14,33	0,025

Tabelle 43: MWU-Test zu antibiotischer Behandlung bzgl. der Diversitätsparameter an den Entnahmetagen 3-5. p-Werte FDR-korrigiert.

4.9 Zusammenführende Analyse von Blut- und Stuhluntersuchungen

Die Proben, für die eine gemeinsame Analyse durchgeführt wurde, waren: 204-2, 206-2, 216-3, 217-3, 219-5, 225-4 und 226-1.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den relativen Häufigkeiten der Phyla und Genera bzw. den Diversitätsparametern einerseits und den im Blut gemessenen Interleukinen andererseits zu untersuchen, wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt. Da für IL-1 β und IL-6 in den o. g. Proben keine Werte gemessen werden konnten, wurde auf eine diesbezügliche Analyse verzichtet. Zudem war in den ausgewählten Proben das Genus *Erysipelaclostridium* nicht vertreten.

Einzig bei IP-10 konnte ein signifikanter positiver Zusammenhang mit der Diversität festgestellt werden.

	IL-8		IL-10		IL-12p70		IL-13		IP-10		MCP-10	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
Shannon	0,512	0,411	-0,612	0,393	0,607	0,393	0,393	0,575	0,955	0,002	0,074	0,913
Chao1	0,197	0,806	-0,612	0,393	0,571	0,393	0,214	0,806	0,901	0,048	-0,037	0,937
dbp	-0,512	0,411	0,612	0,393	-0,286	0,713	-0,429	0,539	0,577	0,393	-0,148	0,858
Simpson	0,512	0,411	-0,612	0,393	0,571	0,393	0,357	0,610	0,427	0,036	0,368	0,913

Tabelle 44: Spearman-Korrelation zw. den Diversitätsparametern und den im Blut gemessenen Interleukinen; p-Werte FDR-korrigiert

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Analyse der Phyla: Nur zwischen IP-10 und dem Phylum Firmicutes zeigte sich ein stark positiver Zusammenhang.

	IL-8		IL-10		IL-12p70		IL-13		IP-10		MCP-10	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
Bacteroidetes	-0,749	0,544	-0,612	0,544	-0,214	0,846	0,214	0,846	-0,216	0,846	0	1
Firmicutes	0,611	0,544	-0,408	0,26	0,643	0,544	0,429	0,726	0,955	0,03	0,111	0,846
Proteobacteria	-0,109	0,846	-0,515	0,69	0,523	0,69	0,126	0,846	0,5	0,846	-0,111	0,846
Actinobacteria	-0,197	0,846	0,612	0,544	0,25	0,846	0,179	0,846	-1,08	0,69	-0,729	0,544
Verrucomicrobiota	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.	k. d.

Tabelle 45: Spearman-Korrelation zw. den gemessenen Phyla und den im Blut gemessenen Interleukinen; p-Werte FDR-korrigiert; k. d. = keine Daten

Im Folgenden ist der Zusammenhang zwischen IP-10 und Firmicutes, bzw. Shannon und Simpson graphisch als Streudiagramm dargestellt:

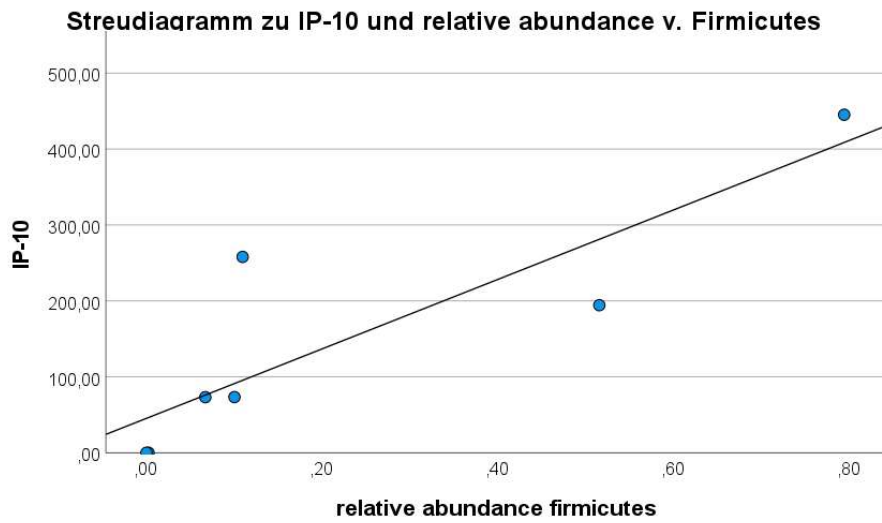


Abbildung 29: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und der relative abundance von Firmicutes

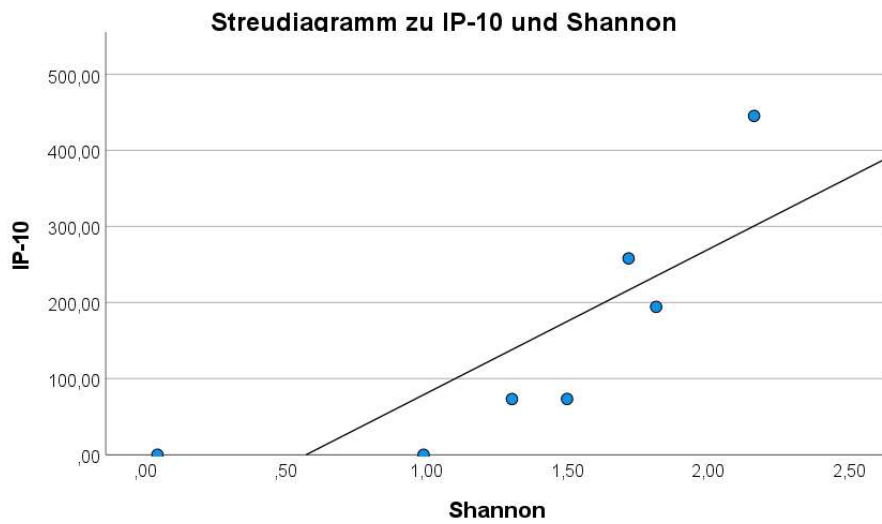


Abbildung 30: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und Shannon

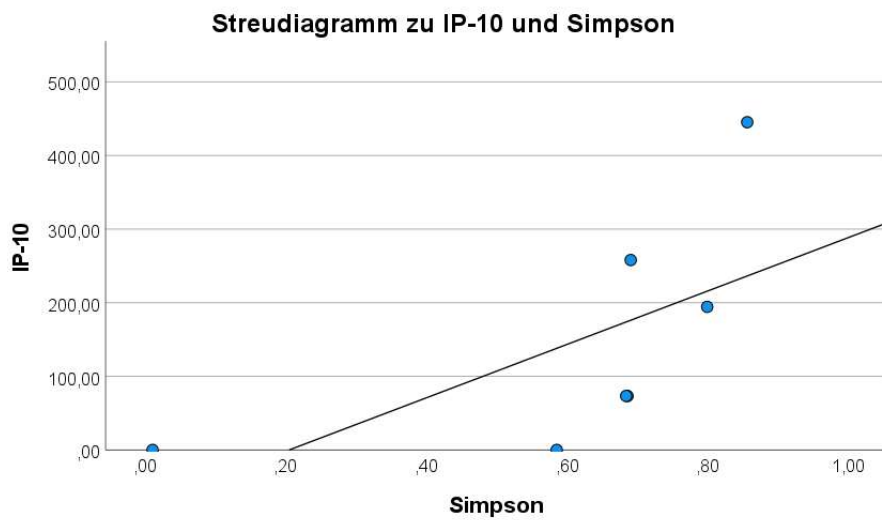


Abbildung 31: Streudiagramm zum Zusammenhang von IP-10 und Simpson

Die Korrelationsanalyse mit den Genera ergab keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

	IL-8		IL-10		IL-12p70		IL-13		IP-10		MCP-10	
	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert	Koeffizient	p-Wert
<i>Bacteroides</i>	-0,07	0,897	-0,515	0,711	0,378	0,774	0,198	0,819	0,573	0,711	-0,542	0,711
<i>Bifidobacterium</i>	-0,07	0,897	-0,515	0,711	0,378	0,774	0,198	0,819	0,573	0,711	-0,542	0,711
<i>Clostridium sensu stricto</i>	0,45	0,774	-0,167	0,819	0,612	0,711	-0,204	0,819	0,206	0,819	-0,424	0,774
<i>Enterococcus</i>	0,797	0,711	0	1	0,371	0,774	0,148	0,819	0,449	0,774	0,385	0,774
<i>Erysipelaclostridium</i>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Escherichia-Shigella</i>	-0,374	0,774	-0,408	0,774	0,786	0,711	0,714	0,711	0,523	0,711	-0,334	0,819
<i>Klebsiella</i>	0,337	0,819	0,676	0,711	0,158	0,819	-0,197	0,819	-0,308	0,819	0,102	0,886
<i>Parabacteroides</i>	-0,516	0,711	-0,255	0,819	-0,267	0,819	-0,535	0,711	-0,18	0,819	-0,277	0,819
<i>Staphylococcus</i>	0,433	0,744	-0,204	0,819	0,179	0,819	0,75	0,711	0,468	0,774	0,371	0,774
<i>Streptococcus</i>	0,709	0,711	-0,204	0,819	0,286	0,819	0,071	0,897	0,631	0,711	-0,148	0,819
<i>Veillonella</i>	0,676	0,711	-0,167	0,819	-0,204	0,819	0,204	0,819	0,618	0,711	0,635	0,711

Tabelle 46: Spearman-Korrelation zw. ausgewählten Genera und den im Blut gemessenen Interleukinen; das Genus *Erysipelaclostridium* konnte in diesen Proben nicht nachgewiesen werden; p-Werte FDR-korrigiert

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf die Untersuchungen der Blutproben die IL-6-Level in der Sepsiskohorte wider Erwarten niedrig und die von IL-12 bzw. IL-13 erhöht waren, weswegen auf eben diese Faktoren genauer eingegangen werden soll.

Die Messung der Stuhlproben erbrachte im Allgemeinen eine Mikrobiomzusammensetzung wie sie anhand früherer Studien zu erwarten war. Im Speziellen fiel jedoch ein vermehrter Nachweis des Phylums Bacteroidetes in der Sepsisgruppe auf, obwohl diese prinzipiell als gesundheitlich zuträglich eingeschätzt werden.

5.1 Zytokine als diagnostischer Marker

Diese Studie ergab, dass die IL-6 Level im Gesamtkollektiv genauso wie in der Sepsiskohorte erniedrigt waren, obwohl dieses neben CRP, der Leukozytenzahl und Procalcitonin in der klinischen Routinediagnostik etabliert ist.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Befunde wäre die Zeitverzögerung in der Bestimmung von IL-6 durch das Studienteam. IL-6 kann mit einer Halbwertszeit von ca. 100 Minuten starke Schwankungen in der Messung aufweisen (Waage et al., 1989). Bei genauerer Betrachtung zeigt sich zudem, dass nur sechs Proben – davon nur eine Sepsisprobe – in den ersten 48 Lebensstunden der Kinder entnommen wurden, also der Phase, in der IL-6 unter der Annahme eines perinatalen Infektionsbeginns typischerweise erhöht ist (Coulie et al., 1987, Snick, 1990). Zusätzlich relevant wird dies durch die weitere Zeitverzögerung, dass die Blutproben nicht primär für die Studie gewonnen wurden, sondern als Restproben dem Zentrallabor entstammten, was eine längere Lagerzeit nach sich zog.

Ein zukünftiges Studiendesign sollte diesen Aspekt stärker in Betracht ziehen und dementsprechend den Fokus der Probensammlung auf die ersten Lebensstunden legen.

Als zweiter Untersuchungsgegenstand sollen die erhöht gemessenen Spiegel von IL-12 in den ersten Lebenstagen diskutiert werden.

Im Allgemeinen ist Interleukin 12 als ein heterodimeres Zytokin bekannt, das aus genetisch nicht verwandten Untereinheiten besteht und von B-Zellen, phagozytischen Zellen und einigen antigenpräsentierenden Zellen produziert wird (Kobayashi et al., 1989). Die Unterform p70 ist die biologisch aktive Variante. Dabei wird es vor allem durch mikrobielle Reize aktiviert und fördert die zelluläre Immunabwehr (Nguyen et al., 2020).

In der Literatur lassen sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IL-12 und der immunologischen Reaktion bei einer Neugeborenenensepsis finden. Mancuso et al. untersuchten in ihrer Studie neugeborene Mäuse 36 h nach einer induzierten Infektion. Hierbei konnten sie stark erhöhte IL-12-Spiegel nachweisen. Die Gabe von anti-IL-12-Antikörpern führte zu einer erhöhten Letalität, während eine zusätzliche Gabe von rekombinantem IL-12 sogar einen therapeutischen Effekt erzielte (Mancuso et al., 1997). IL-12 fungierte also als protektiver Faktor.

Eine japanische Studie untersuchte Zytokin-Serumspiegel aus dem Nabelschnurblut von 224 Neugeborenen, die auf die perinatale Intensivstation aufgenommen werden mussten: IL-12 blieb in mehr als 80 % der Fälle unter einem Spiegel von 1 pg/ml und zeigte keine Korrelation mit maternalen oder neonatalen Komplikationen, ohne dass diese genauer spezifiziert wurden (Takahashi et al., 2010). Es ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass Frühgeborene einen Großteil des Studienkollektivs ausmachten. Sugitharini et al. untersuchten mehrere Zytokine bei EOS von 118 erkrankten Neugeborenen und stellten signifikant erhöhte Werte von IL-12 fest. Sensitivität und Spezifität wurden nicht bestimmt (Sugitharini et al., 2013). Auch hier wurde ein durchschnittlich jüngeres Kollektiv mit niedrigerem Geburtsgewicht untersucht. Eine prospektive Kohortenstudie aus Neuseeland bestimmte die Serumspiegel mehrerer Interleukine von 117 Neonaten, die auf der Intensivstation aufgrund einer EOS antibiotisch behandelt wurden, um deren statistischen Gütekriterien zu bestimmen. Unter den getesteten Interleukinen stach IL-12 eher als Bestätigungstest denn als Suchtest hervor, da die Sensitivität bei 17 % und die Spezifität bei 99 % lag (Sherwin et al., 2008). In der Arbeit von Kliewer et al. konnte IL-12 nur in Einzelfällen nachgewiesen werden, ein Vergleich mit der vorliegenden Untersuchung erscheint also kaum möglich (Kliewer, 2019).

Auch wenn in den letzten Jahren IL-12 nicht im Fokus des Forschungsinteresses lag, erscheint angesichts der jüngsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein erneuter und genauerer Blick sinnvoll. Ähnlich wie bei Interleukin 6 sollte das Sammeln von Proben direkt zu Lebensbeginn erfolgen, um der Kinetik von IL-12 gerecht zu werden.

Neben IL-12 konnte ebenfalls bei Interleukin 13 festgestellt werden, dass die Werte während der Entnahmetage 0-2 in der Sepsisgruppe höher als in der Kontrollgruppe waren ($p = 0,162$). IL-13 wird vor allem von TH-2-Zellen ausgeschüttet (Iwaszko et al., 2021). Es spielt eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen sowie bei der parasitären Abwehr (Finkelman et al., 2004, Gour and Wills-Karp, 2015). Zudem ist es als B-Zell-Aktivator bekannt und inhibiert die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12 (Defrance et al., 1994, Hershey, 2003). Im Mausmodell konnte ein protektiver Effekt bei induzierter (neonataler) Sepsis gezeigt werden: Die Mortalität wurde dosisabhängig durch Gentransfer von humanem IL-4 oder IL-13 reduziert (Nicoletti et al., 1997, Baumhofer et al., 1998).

Eine Studie, die eine mögliche Rolle von IL-13 bei Kindern mit Sepsis untersuchte, stellte niedrigere Serumspiegel bei denjenigen Kindern fest, die verstarben oder einen septischen Schock erlitten (Blanco-Quirós et al., 2005). Takahashi et al. stellten wie bei IL-12 auch bei IL-13 in über 80 % der Kinder Serumspiegel von unter 1 pg/ml fest. Interessanterweise zeigte IL-12 nur mit IL-13 eine positive Korrelation. Dies widerspricht den oben genannten Studien, die eine inhibierende Wirkung von IL-13 auf die IL-12-Ausschüttung feststellten. Die bereits erwähnte Untersuchung von Sugitharini et al. ist eine der wenigen klinischen EOS-Studien,

die auch IL-13 bestimmte. In der Studie konnten keine unterschiedlichen Levels bei der Sepsis- und Kontrollgruppe gemessen werden (Sugitharini et al., 2013).

IL-13 erscheint angesichts der Studienlage nur bedingt als diagnostischer Biomarker geeignet. Der bedeutenden Rolle von IL-13 bei allergischen und parasitären Entwicklungen liegt eine andere Pathophysiologie zugrunde als derjenigen im Rahmen einer EOS. Als anti-inflammatorisches Zytokin ist eine Hochregulation in der Frühphase einer Infektion – die den entscheidenden Zeitraum für eine zuverlässige Diagnose darstellt – nicht zu erwarten. Vielmehr weisen die Studienergebnisse auf eine protektive Funktion des Zytokins hin – eventuell, indem eine überschießende Reaktion des Immunsystems verhindert wird.

5.2 Ergebnisse der Stuhluntersuchungen

Die Ergebnisse der Mikrobiomsequenzierung sollen im Folgenden analog zu Kapitel 4 unter den Aspekten der phylogenetischen Vielfalt auf Ebene der Phyla und der Genera sowie der α -Diversität diskutiert werden.

5.2.1 Diskussion der Studienpopulation bzgl. Phylogenetik und α -Diversität

In der vorliegenden Studie wurden primär die Phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria und Verrucomicrobiota nachgewiesen, wovon Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria deutlich stärker repräsentiert waren. Jeweilige Hauptvertreter der Phyla waren *Bacteroides* für Bacteroidetes, *Staphylococci* und *Streptococci* für Firmicutes, *Escherichia-Shigella* für Proteobacteria sowie *Bifidobacteria* für Actinobacteria. Firmicutes zeichnete sich durch zwei anstelle von einem prägenden Genus aus. Bakterien aus dem Phylum Verrucomicrobiota erreichten nur in einer Probe einen Anteil von 2 %.

Im Allgemeinen sind die wichtigsten und vorherrschenden Phyla in den ersten Tagen– mit großer interindividueller Varianz – Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria. Von diesen dreien sind Firmicutes und Proteobacteria noch einmal häufiger zu erwarten. Zusätzlich lassen sich Actinobacteria in geringerer Zahl und gelegentlich Verrucomicrobiota nachweisen. Für gewöhnlich setzen sich die Phyla aus nur einem oder wenigen Genera zusammen: Bei Bacteroidetes sind dies in der Regel *Bacteroides*. Bei Firmicutes zeigt sich mehr Vielfalt, da der Einfluss durch den Geburtsmodus stärker erscheint (z. B. mehr *Staphylococci* bei CS-Kindern). Proteobacteria werden meist durch *Escherichia-Shigella* sowie *E. coli* repräsentiert sowie Actinobacteria vor allem durch *Bifidobacteria* (Hill et al., 2017, Del Chierico et al., 2015, Bäckhed et al., 2015, Dogra et al., 2015, Palmer et al., 2007, Podlesny and Fricke, 2021). Die vorliegenden Daten zeigen damit eine weitgehende Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen anderer Untersuchungen. Ebenso wie bei Dogra et al. präsentierte sich Firmicutes mit zwei anstelle nur eines prominenten Genus (Dogra et al., 2015).

Auch das bereits deutlich geringere Auftreten von Actinobacteria ist in Einklang mit anderen Studien zu bringen (Del Chierico et al., 2015, Chichlowski et al., 2012, Milani et al., 2017). Als möglicher Erklärungsansatz hierfür kann v. a. der starke Einfluss der Ernährung mit Muttermilch auf den Hauptvertreter *Bifidobacteria* aufgeführt werden, da dieser in den ersten Lebenstagen noch nicht so starken Einfluss ausgeübt haben kann.

Bezüglich der α -Diversität in der vorliegenden Untersuchung wurden während der ersten acht Lebenstage Shannon-Werte von ca. 1,2 errechnet (s. Tab. 23).

Wie bereits unter 2.2.3 erwähnt, kann eine intestinale Dysbiose begünstigend für die Entstehung einer neonatalen Sepsis wirken. Nicht zuletzt die α -Diversität ist hierfür ein guter Anhaltspunkt, sodass diese von großem Interesse ist. Die aktuelle Forschungslage zeigt, dass mit Geburt von einer im Vergleich zum adulten Mikrobiom geringeren Vielfalt, die im Lauf der Zeit stetig zunimmt, auszugehen ist. (Bogaert et al., 2023, Stewart et al., 2018, Bäckhed et al., 2015, Bokulich et al., 2016).

Reyman et al., ermittelten bei gesunden Reifgeborenen einen medianen Shannon-Index von 1,21 kurz nach Geburt (Reyman et al., 2022). Auch Bogaert et al. stellten eine Entwicklung von ca. 0,75 am Tag der Geburt hin zu ca. 1,5 nach einer Woche fest (Bogaert et al., 2023). Ferreti et al. bemerkten bei Reifgeborenen gesunden Kindern in den ersten 24 Lebensstunden einen Shannon-Index von ca. 2 (Median) mit anschließendem Abfall auf Werte von 1 bis 1,5 in den folgenden vier Tagen. Die hier vorliegenden Werte ähneln damit im Gesamtkollektiv sehr denen von gesunden Kindern. Dies ist angesichts des Überhangs von gesunden Proben am Gesamtkollektiv nicht überraschend. Die starken Schwankungen an Tag 6 und 7 erscheinen bei jeweils nur einer einzelnen Dosis kaum verwertbar.

Bei einer kombinierten Betrachtung von α -Diversität und Phylogenetik zeigte sich ein Zusammenhang von erhöhter Diversität bei Bacteroidetes und erniedrigter bei Firmicutes in der vorliegenden Studie. Shaw et al. kamen – bei Frühgeborenen – auf Genusebene zu einem ähnlichen Ergebnis, da ein stark negativer Zusammenhang von *Escherichia-Shigella*, die zur Familie der Enterobacteriaceae gehören, mit α -Diversität und Äquität gemessen werden konnte ($p = 0,022$ bzw. $0,088$) (Shaw et al., 2015).

Ebenso konnte bei Frühgeborenen mit LOS eine erniedrigte Diversität mit einem vermehrten Vorkommen von nicht obligat anaeroben Staphylococci sowie Enterobacteriaceae assoziiert werden (Adelman et al., 2020, Singer et al., 2019, Shaw et al., 2015, Graspeuntner et al., 2018).

In einem weiteren Schritt wurden die Korrelationen der Phyla und Genera zueinander untersucht. In der vorliegenden Arbeit weisen Bacteroidetes – abgesehen von Actinobacteria – fast nur negative Korrelationen mit den anderen Phyla und davon insbesondere mit Firmicutes auf.

Dies ist gut vereinbar mit dem Aspekt, dass in einem Großteil der Proben ein Phylum, respektive ein Genus die absolute Mehrheit der reads stellte (s. 4.8.1, bzw. 4.8.2).

Die Untersuchung von Del Chierico et al., in der größtenteils per Sectio entbundene Kinder eingeschlossen wurden, zeigte in der Subgruppe der spontan entbundenen Kinder für Bacteroidetes teils positive Zusammenhänge mit Actinobacteria und Verrucomicrobiota – also den verhältnismäßig weniger stark vertretenen Phyla – sowie zwischen Firmicutes und Proteobacteria als weitere Vertreter der „Top 3“ eine inverse Korrelation. Dies ließe sich dahingehend interpretieren, dass es zwei gefestigte Phyla-Kombinationen geben könnte.

Auf den ersten Blick scheint im Studienkollektiv also ein „normales“ Mikrobiom vorzuliegen, wie es bei Reifgeborenen, die spontan entbunden wurden und bei denen keine weiteren peripartalen Perturbationen eintraten, zu erwarten gewesen wäre. Im Folgenden soll dennoch ein genauerer Blick auf mögliche Unterschiede unter Rücksichtnahme der unterschiedlichen Einflussfaktoren genommen werden sowie ein möglicher Einfluss einer neonatalen Infektion und die antibiotische Behandlung einer solchen diskutiert werden.

5.2.2 Mögliche Rolle von Bacteroidetes und Firmicutes bei der EOS

Ein unerwartetes Ergebnis der Arbeit war, dass das Phylum Bacteroidetes (und darunter *Bacteroides* als maßgebliches Genus) in der Sepsiskohorte deutlich häufiger nachgewiesen werden konnte als in der Kontrollgruppe. Demgegenüber war Firmicutes bei den Sepsispatienten seltener als in der Kontrollgruppe. Die signifikant inverse Korrelation zwischen Bacteroidetes und Firmicutes lässt mutmaßen, dass bei einer größeren Probanden- und Probenzahl auch die erhöhte Anzahl an Bacteroidetes bei EOS-Proben statistisch signifikant hätte nachgewiesen werden können.

Eine prospektive Fall-Kontroll-Studie aus Spanien verglich frühgeborene, zweieiige Zwillingspaare, von denen ein Geschwisterkind an einer Sepsis erkrankt war und das andere Kind gesund blieb: Sie stellten eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Sepsis und verringerten Messungen von obligat anaerob lebenden *Bacteroides*-Spezies und *Bifidobacteria* sowie einem vermehrten Auftreten von (fakultativ) aeroben *Enterobacteriaceae* fest. Diese Erkenntnis steht in Gegensatz zu der vorliegenden Studie, in der tendenziell mehr *Bacteroides* bei den Sepsisfällen gemessen wurden. *Staphylococci*, die ebenfalls fakultativ anaerob leben, wurden dagegen signifikant weniger gemessen. Ein vermehrtes Auftreten von *Escherichia-Shigella* oder *Klebsiella* als Vertreter der *Enterobacteriaceae* konnte nicht festgestellt werden. Als möglichen Erklärungsansatz führen Cernada et al. an, dass ein inverser Zusammenhang zwischen *Bacteroides* und einigen Genen, die für oxidativen Stress kodieren, gemessen werden konnte (Cernada et al., 2016).

Der große Einfluss des Gestationsalters auf die Zusammensetzung des Mikrobioms im Sinne einer tendenziell negativen Korrelation mit dem Auftreten von Bacteroidetes macht etwaige Vergleiche nur bedingt möglich – dennoch liefern diese Untersuchungen wertvolle Hinweise.

Dornelles et al., die ebenfalls nur mit einer klinischen EOS-Diagnose und Frühgeborenen arbeiteten, stellten im Mekonium von diesen mehr Proteobacteria bei Sepsisproben als bei gesunden Kindern fest (Dornelles et al., 2022). Teil dieses Phylums ist u. a. das Genus *Escherichia-Shigella* mit *E. coli* als einem der bekanntesten Vertreter. Auch hier ist jedoch wieder auf die bedingte Vergleichbarkeit aufgrund der Frühgeburtlichkeit hinzuweisen. Nicht zuletzt *E. coli* als häufigster Erreger der EOS bei Frühgeborenen ist damit nachvollziehbar prominent.

Bakterien der Gattung *Bacteroides* werden im Allgemeinen neben *Bifidobacteria* und *Lactobacillus* den der Darmgesundheit vorteilhaften Spezies zugeordnet. Es wäre also eher zu erwarten gewesen, dass in der gesunden Kontrollgruppe mehr Bacteroidetes (und damit *Bacteroides*) zu messen sind. Damit stellt sich die Frage zu Ursache und Wirkung hinsichtlich eines möglichen gegenverkehrten Verhältnisses zwischen *Bacteroides* und EOS.

Eine direkte Rolle von *Bacteroides* als Verursacher der Sepsis ist sehr unwahrscheinlich, da diese bei Blutkulturen nahezu keine Rolle spielen.

Die verschiedenen Spezies von *Bacteroides* erfüllen im Normalfall wichtige Funktionen im GIT. So wird ein Einfluss auf das Immunsystem diskutiert: Das von *B. fragilis* exprimierte Polysaccharid A scheint für eine Induktion des antiinflammatorischen IL-10 verantwortlich zu sein (Sommese et al., 2012, Ramakrishna et al., 2019, Cohen-Poradosu et al., 2011). Zwar kann IL-10 u. a. vor einer überschießenden Immunreaktion bei septischem Geschehen schützen, es existieren jedoch Hinweise, dass bei Neonaten eine übermäßige Produktion von IL-10 nachteilige Effekte im Rahmen einer GBS-Erkrankung nach sich ziehen kann, indem die Funktion von neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt wird (Andrade et al., 2013, Madureira et al., 2011). In diesem Falle wäre eine starke Besiedlung mit *Bacteroides*-Spezies als nachteilig anzusehen.

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine erhöhten IL-10-Spiegel oder eine Korrelation von *Bacteroides* mit IL-10 gemessen werden, auch wenn dies unter dem Aspekt des kleinen Studienkollektivs zu betrachten ist.

Wie bereits erwähnt, spielen neben den *Bifidobacteria* auch *Bacteroides*-Spezies eine wichtige Rolle bei der Produktion der bereits erwähnten SCFAs, die wiederum aus human milk oligosaccharides synthetisiert werden können. SCFAs werden u. a. mit einer gehemmten Immunantwort (u. a. durch Inhibition von IL-6) in Verbindung gebracht (Morrison and Preston, 2016, Parada Venegas et al., 2019). Dadurch könnten *Bacteroides* auf einem weiteren Weg für eine nicht ausreichende Immunantwort verantwortlich sein.

Gegen diesen Ansatz spricht, dass SCFAs, die von *Bacteroides*-Spezies produziert werden, auch schützende Funktionen im GIT ausüben. Acetat, das bei einer *E.coli*-Infektion möglicherweise eine unterstützende Funktion einnimmt, wird neben *Bifidobacteria* auch von *Bacteroides* synthetisiert (Fukuda et al., 2011). Butyrat wiederum trägt zu einer verstärkten Expression

von tight-junctions der Epithelzellen bei und verringert somit das Risiko einer transmembranalen Infektion (Nagpal et al., 2018). Auch das u. a. von *Bacteroides* produzierte Indol, das keine SCFA ist, verstärkt die intestinale Barriere. Gleichzeitig wirkt es jedoch auch antiinflammatorisch über IL-10 (Bansal et al., 2010, Gomaa, 2020).

Auf Ebene der humoralen Immunantwort könnten Vertreter von *Bacteroides* ebenfalls eine schützende Rolle durch die Produktion von IgA spielen (Wilmore et al., 2018). Klinisch zeigt sich der Eindruck, dass anaerobe Bakterien bei neonataler Sepsis für einen günstigen Verlauf verantwortlich sind (Singer et al., 2019).

Firmicutes und ihre Hauptgenera *Staphylococcus* und *Streptococcus* wiederum sind zum einen als Teil der normalen Darmflora zu betrachten. Zum anderen gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass sie im Neugeborenenalter als eine Art Wegbereiter für die Reifung des Mikrobioms fungieren. So scheinen sie – bei großer interindividueller Varianz – als fakultativ anaerobe Spezies durch den sukzessiven Verbrauch von Sauerstoff den Weg für obligat anaerobe Bakterien (z. B. *Bacteroides*, *Bifidobacteria*) zu ebnet. *Bacteroides* und *Bifidobacteria*, welche wiederum auf die Verwertung von HMOs spezialisiert sind, finden dadurch ein für sie geeignetes Habitat vor (s. 2.2.2.3) (Lee and Chiu, 2023, Stewart et al., 2018).

Diesen Befund erhebt auch ein Review von Milani et al. Der Anteil der Bacteroidetes nimmt dabei mit fortschreitendem Alter zu, bis sie gemeinsam mit Firmicutes die dominierenden Phyla im Erwachsenenalter sind (Milani et al., 2017, Costea et al., 2018, Del Chierico et al., 2015). Das vermehrte Vorkommen von Bacteroidetes in der vorliegenden Untersuchung könnte also als eine vorzeitige Reifung des Mikrobioms gewertet werden. Wertet man dies als „frühreif“, wäre die Hypothese aufzustellen, dass aufgrund nicht bekannter Effekte in den ersten Lebenstagen ein anaerobes GI-Milieu eher zur Entstehung einer neonatalen Sepsis beiträgt als diese verhindert. Gestützt würde dies durch die normalerweise frühestens nach einigen Wochen auftretende Dominanz von Bacteroidetes. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Konzentration von SCFA zum Zeitpunkt der Krankheit zu kennen.

Mehrere Studien zeigten, dass der GI-Trakt unter ungünstigen Umständen eine Rolle in der Entstehung einer Sepsis spielen kann – sei es direkt als Ursprungsort des verursachenden Pathogens oder indirekt durch Dysbiose und damit einhergehender Prädisposition: So konnten el Manouni el Hassani et al. bei dem Großteil der LOS-Fälle den in der Blutkultur ausgemachten Erreger in vorher abgenommenen Stuhlproben identifizieren und auch Carl et al. fanden entsprechende Hinweise (el Manouni el Hassani et al., 2021, Carl et al., 2014). Die entsprechende Konsequenz, Bacteroidetes als mögliche Sepsisverursacher zu vermuten erscheint jedoch aufgrund der aufgeführten Studienlage unwahrscheinlich.

5.2.3 Rolle der antibiotischen Therapie bei der Beurteilung des neonatalen Mikrobioms

In der vorliegenden Studie erhielten alle der Sepsisgruppe zugeteilten Kinder eine antibiotische Therapie. Nach wie vor wird bei klinischem Verdacht auf eine Sepsis frühzeitig antibiotisch therapiert. Nach Stocker et al. kommen auf eine kulturpositive Sepsis 50 bis 100 behandelte Neugeborene (Stocker et al., 2023). Eine zweite Studie von 2019 ermittelte mit einem Median von 69,5:1 ein ähnliches Verhältnis (Schulman et al., 2019).

In dieser Studie erhielten bis auf vereinzelte Ausnahmen alle antibiotisch behandelten Neugeborenen eine Kombinationstherapie mit Ampicillin/Gentamicin. In der Gruppe „Spät“ machte sich dies durch eine starke Verringerung der Diversität deutlich bemerkbar.

Es ist zu erwarten, dass je nach Wahl des konkreten antibiotischen Wirkstoffs die Phyla/Genera unterschiedlich stark betroffen sind. Fouhy et al., die explizit die Auswirkungen der Kombination Ampicillin/Gentamicin auf das Mikrobiom untersuchten, stellten u. a. einen Rückgang von Bacteroidetes und keine Veränderungen für *Staphylococci* (Fouhy et al., 2012) fest. Auch Ferrer et al. identifizierten *Bacteroides* als eines der sensibelsten Genera für antibiotische Störungen; die Kombination von Ampicillin und Gentamicin schien jedoch sowohl auf *Bacteroides* als auch auf *Staphylococci* Einfluss auszuüben (Ferrer et al., 2017). Schwartz et al. stellten wiederum einen so stark ausgeprägten Einfluss von Gentamicin auf *Staphylococcus aureus* fest, um damit nicht nur die Entwicklung dieser Spezies, sondern die des gesamten Mikrobioms vorhersagen zu können (Schwartz et al., 2020).

Es wäre also anhand der genannten Studien eher ein verminderter Anteil von Bacteroidetes in der Sepsisgruppe zu erwarten gewesen; die (statistisch nicht signifikante) größere Rolle von Bacteroidetes ist somit durchaus zu hinterfragen. Angesichts der Tatsache, dass *Bacteroides* in den seltensten Fällen direkte Verursacher einer EOS sind und, wie bereits beschrieben, primär den vorteilhaften Spezies zuzuordnen sind, ist die weit verbreitete Anwendung von Ampicillin/Gentamicin zumindest aus Sicht möglicher Mikrobiomstörungen kritisch zu sehen.

In Bezug auf die α -Diversität ist eine nachteilige Wirkung von Antibiotika beschrieben und erscheint wenig überraschend (Reyman et al., 2022). Reyman et al. konnten in ihrer Untersuchung keinen signifikanten Unterschied zwischen drei verglichenen Antibiotika-Therapieregimen feststellen.

Als zweiter relevanter Aspekt der Antibiotikaverwendung muss die peripartale Antibiotikaprophylaxe betrachtet werden. Häufigste Wirkstoffe sind hierbei Penicillin und Ampicillin. Der Effekt der vertikalen Transmission von der Mutter auf das Kind wird hiervon naturgemäß besonders beeinflusst. Zhou et al. stellten die Entwicklung einer IPA-bedingten Dysbiose mit einem Rückgang von *Lactobacillus* (aus dem Phylum Firmicutes) im neonatalen Mikrobiom fest, ohne weitere Kausalitäten darstellen zu können (Zhou et al., 2020). Gleichzeitig ist der Nutzen einer durch IPA verhinderten GBS-Sepsis unbestritten. In der vorliegenden Studie erhielt nur ein

sehr geringer Anteil der betroffenen Mütter eine peripartale Prophylaxe, sodass von keinem großen Effekt ausgegangen werden muss.

5.2.4 Einfluss weiterer Faktoren

Kaiserschnitt

In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein geringer Teil der Kinder per Kaiserschnitt entbunden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten zwischen den Geburtsmodi nicht festgestellt werden. Einer Metaanalyse von Podlesny und Fricke und vielen Einzelstudien zufolge, wären bei einer Vaginalgeburt mehr *Bifidobacteria*, *Bacteroides* und *E. coli* zu erwarten gewesen, bei einem Kaiserschnitt hingegen mehr *Staphylococci* (Podlesny and Fricke, 2021, Hill et al., 2017, Bäckhed et al., 2015). Zusätzlich konnten in den Proben der CS-Kinder bei Del Chierico et al. nur geringste Mengen Bacteroidetes gemessen werden (Del Chierico et al., 2015).

Sämtliche CS-Proben in der vorliegenden Untersuchung waren der Kontrollgruppe zugeordnet. Damit muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das signifikant häufigere Auftreten von Firmicutes in der Kontrollgruppe durch die Proben der CS-Kinder beeinflusst wurde und die Entbindung per Kaiserschnitt als Confounder fungiert.

Vertikale Transmission

Ferretti et al. konnten genauso wie Bogaert et al. zeigen, dass im Allgemeinen ein großer Anteil der Spezies im Mikrobiom der Neugeborenen auch in Proben der jeweiligen Mütter vorhanden ist. Im Spezifischen gelang dies für *Bacteroides* und *Bifidobacteria* (Ferretti et al., 2018, Bogaert et al., 2023). Auch Yassour et al. konnten stellenweise die direkte Übertragung von *Bacteroides* und *Bifidobacteria* von der Mutter auf das Kind nachweisen (Yassour et al., 2018). Interessanterweise scheint die peripartale antibiotische Prophylaxe durchaus einen Einfluss auf die Weitergabe der Spezies zu haben, die antibiotische Behandlung der Neugeborenen wiederum nicht (Podlesny and Fricke, 2021). Die grundsätzliche Schwierigkeit, den möglichen Einfluss einer antibiotischen Therapie von dem der EOS abzugrenzen, hat also in Bezug auf diese Art der Mikrobiombeeinflussung keine Bedeutung.

Angesichts der Tatsache, dass der typische Infektionsweg einer EOS wie bereits unter 2.1.2 beschrieben, der vertikale Weg von der Mutter auf das Kind prä- oder intrapartal ist, sollte diesem Aspekt in zukünftigen Untersuchungen eine größere Rolle zugeschrieben werden.

Ernährung

Nicht zuletzt hat die Ernährung mit Muttermilch – wie bereits beschrieben – einen starken Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms. Der Einfluss entsteht durch die in Muttermilch enthaltenen HMOs, die von Bakterien zu SCFAs verstoffwechselt werden. Der Ernährungsmodus wurde in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls nicht erfasst. Aufgrund des kurzen

Erfassungszeitraumes zu Lebensbeginn ist jedoch von einer eher weniger wichtigen Rolle auszugehen.

5.3 Limitationen der Arbeit

Wie bei den meisten Studien, die sich mit neonataler Sepsis beschäftigen, ist auch in der vorliegenden Untersuchung ein grundsätzliches Problem das Fehlen von kulturpositiven Fällen. Auch Reyman et al. beispielsweise konnten bei 147 eingeschlossenen Kindern, die an einer Sepsis erkrankt waren, diese nur in zwei Fällen mikrobiologisch nachweisen (Reyman et al., 2022).

Als weitere Limitation ist zu nennen, dass in dieser Untersuchung die Sequenzierung mittels 16s-DNA-Methode durchgeführt wurde. Damit gingen im Vergleich zum „whole-genome-shotgun-sequencing“ einige Einschränkungen einher. Eine Analyse der mikrobiellen Verteilung auf Speziesebene war hierdurch nicht möglich. So wäre z. B. von Interesse gewesen, auf welche Spezies sich das Genus *Staphylococcus* verteilte, um eine mögliche Kontamination durch *S. epidermidis* untersuchen zu können. Ebenso wäre es von Interesse gewesen, innerhalb des Genus *Streptococcus* *S. agalactiae* und damit den häufigsten Erreger der EOS bei Reifgeborenen zu identifizieren.

Die Betrachtung funktioneller Einheiten konnte ebenfalls nicht durchgeführt werden. Vor allem die möglichen Auswirkungen der systemischen Inflammation auf die (metabolischen) Funktionen des Mikrobioms wären hier von großem Interesse gewesen.

Mit Blick auf die geringe Zahl an eingeschlossenen Probanden und insbesondere die geringe Anzahl der Sepsispatienten wurde auf eine weitergehende statistische Analyse der Zytokine im Sinne einer Bestimmung von Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV verzichtet. Eine genaue Aussage über die Testgütekriterien und damit die Beurteilung der klinischen Anwendbarkeit der verschiedenen Zytokine konnte somit nicht getroffen werden.

Auch in Hinblick auf die Analysen des Mikrobioms schränkte die geringe Patientenzahl die Möglichkeit der statistischen Analysen ein, sodass innerhalb der nach Entnahmetag gebildeten Gruppen nur für die Tage 3-5 statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass bei einer größeren Patientenzahl mehr Signifikanzen nachgewiesen worden wären und somit die Aussagekraft der Untersuchung im Ganzen – besonders aber auf Genusebene – hätte erhöht werden können.

Wie bereits erwähnt, ist insbesondere die Rolle der verabreichten Antibiotika nicht von einem möglichen Einfluss der neonatalen Sepsis zu trennen. Eventuelle Scheinkorrelationen können in diesen Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. Eine detailliertere Datenerfassung

sowie ein größeres Studienkollektiv wären notwendig gewesen, um diese gewissenhaft ausschließen zu können.

Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, unterliegt die Zusammensetzung des Mikrobiom gerade während der ersten Lebensstage großen Schwankungen. Ähnlich zu vielen anderen Mikrobiomstudien, die nur einen Querschnitt erheben, hätte ein longitudinaler Ansatz der Studie mit festgelegten Zeitpunkten für das Sammeln der Proben vermutlich zu statistisch stabileren Ergebnissen geführt und gleichzeitig den zeitlichen Verlauf selbst als potenziellen Störfaktor identifizieren können. Hierfür wären jedoch deutlich größere Ressourcen in der Phase des Probensammelns nötig gewesen.

6 Zusammenfassung

Diese Dissertationsschrift beschäftigte sich mit zwei Fragestellungen im Rahmen der ersten Lebenstage von Neugeborenen, die an einer early-onset-Sepsis erkrankten.

Zum einen sollten anhand von Blutproben verschiedene Zytokine auf ihr Potenzial als diagnostische Biomarker für eine Early-onset-Sepsis untersucht werden.

Zum anderen wurde das gastrointestinale Mikrobiom der Neugeborenen auf mögliche Unterschiede zwischen gesunden und an EOS erkrankten Kindern untersucht.

Die Erforschung des Mikrobioms hat in den letzten 15 Jahren erstaunliche Einblicke in das Zusammenspiel der Mikroorganismen mit dem menschlichen Körper geliefert: In den ersten Lebensmonaten wird der Grundstein für ein ausgeglichenes, gesundes Mikrobiom gelegt. Dementsprechend weitreichend können die Auswirkungen einer systemischen Infektion in dieser Zeit sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Neugeborenen anhand eines Sepsisscores, der klinische, maternale und labortechnische Parameter berücksichtigte, in zwei Kohorten aufgeteilt – eine Sepsis- und eine Kontrollgruppe. Es wurden während der ersten acht Lebenstage Blut- bzw. Stuhlproben gesammelt.

In den Blutanalysen zeigten sich für keine der untersuchten Zytokine signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten. Näher betrachtet wurden in dieser Arbeit die beiden Interleukine 12 und 13, die jeweils höhere Spiegel in der Sepsisgruppe an den Entnahmetagen 0-2 aufwiesen.

Nach Vergleich mit der einschlägigen Literatur muss die Eignung von IL-13 als diagnostischer Biomarker der EOS in Zweifel gezogen werden, da es als anti-inflammatorisches Zytokin vor allem bei allergischen und parasitären Reaktionen bzw. Infektionen von Relevanz ist und somit keine prominente Rolle zu Beginn einer bakteriellen Infektion zu erwarten ist.

Für IL-12 hingegen gibt es in dieser Untersuchung wie auch in der Literatur deutliche Hinweise, dass es als einer der ersten Akteure in der Immunabwehr Potenzial für die Verwendung als diagnostischer Biomarker hat, sodass eine weitere Erforschung dieses Zytokins sinnvoll erscheint.

Die Mikrobiomanalyse brachte drei nennenswerte Aspekte hervor. Erstens konnte gezeigt werden, dass während der Entnahmetage 3 bis 5 Bakterien des Phylums Firmicutes signifikant häufiger bei gesunden Kindern vorkommen. Zweitens waren Bacteroidetes innerhalb der Sepsisgruppe vorherrschend. Dieses Bild wird von einem stark negativen Korrelationskoeffizienten dieser beiden Phyla von -0,706 ergänzt. Drittens wies das Mikrobiom der erkrankten Kinder während der Lebenstage 3 bis 5 eine niedrigere Diversität auf.

Wird ein Vergleich zur Forschungsliteratur gezogen, überraschen die Ergebnisse der ersten beiden Punkte, da das Genus *Bacteroides* als Hauptvertreter des Phylums Bacteroidetes mit größtenteils positiven, bzw. protektiven Effekten assoziiert wird. Gleichzeitig zeigen Untersuchungen, dass die von *Bacteroides* produzierten SCFAs u. U. bremsend auf das Immunsystem wirken können und somit potenziell im Rahmen eines septischen Geschehens nachteilige Effekte erzielen könnten.

Ein zusätzlicher Erklärungsansatz für den vermehrten Nachweis könnte die Rolle von *Bacteroides* bei der Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 spielen, da dieses im Rahmen einer GBS-Infektion nachteilige Effekte zu verursachen scheint. In Zusammenschau der aktuellen Forschungserkenntnisse liegt eine protektive Rolle von *Bacteroides* nahe, womit ein erhöhtes Vorkommen in der Kontrollgruppe zu erwarten gewesen wäre.

Auch wenn auf Basis der vorliegenden Ergebnisse keine kausalen Aussagen getätigt werden können, erscheint die Kausalitätskette plausibler, dass eine Dysbiose des Mikrobioms die Entstehung einer early-onset-Sepsis begünstigt, als dass eine EOS die möglichen Unterschiede des Mikrobioms verursacht.

Die vorliegenden Ergebnisse schaffen sowohl hinsichtlich der untersuchten Zytokine als auch des Mikrobioms Anreize zu Folgeuntersuchungen:

Die Forschung im Bereich der Neugeborenen-sepsis ist bisher sehr auf die LOS und Frühgeborene konzentriert. Der Fokus dieser Studie lag hingegen auf Reifgeborenen sowie der EOS und konnte damit für diesen bisher eher weniger untersuchten Bereich neues Wissen generieren. Insbesondere die mögliche Rolle von Interleukin 12 als Biomarker für die EOS als weitergehender Untersuchungsgegenstand soll hier genannt sein.

Betrachtet man den typischerweise vertikalen Übertragungsweg einer EOS, erscheint eine erneute Untersuchung der Wechselwirkung von EOS und Mikrobiom vor allem als Mutter-Kind-Analyse sinnvoll. Die Kombination eines solchen Studiensettings mit der Rekrutierung von kulturesicherten Sepsitiden könnte sowohl mögliche Auslöser einer EOS als auch mögliche Auswirkungen einer EOS besser differenzieren.

7 Literaturverzeichnis

- AAGAARD, K., MA, J., ANTONY, K. M., GANU, R., PETROSINO, J. & VERSALOVIC, J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6, 237ra65-237ra65.
- ABUBUCKER, S., SEGATA, N., GOLL, J., SCHUBERT, A. M., IZARD, J., CANTAREL, B. L., RODRIGUEZ-MUELLER, B., ZUCKER, J., THIAGARAJAN, M., HENRISSAT, B., WHITE, O., KELLEY, S. T., METHÉ, B., SCHLOSS, P. D., GEVERS, D., MITREVA, M. & HUTTENHOWER, C. 2012. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS computational biology*, 8, e1002358-e1002358.
- ADELMAN, M. W., WOODWORTH, M. H., LANGELIER, C., BUSCH, L. M., KEMPKER, J. A., KRAFT, C. S. & MARTIN, G. S. 2020. The gut microbiome's role in the development, maintenance, and outcomes of sepsis. *Critical Care*, 24, 278.
- ALBENBERG, L. G. & WU, G. D. 2014. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology*, 146, 1564-1572.
- ANDRADE, E. B., ALVES, J., MADUREIRA, P., OLIVEIRA, L., RIBEIRO, A., CORDEIRO-DA-SILVA, A., CORREIA-NEVES, M., TRIEU-CUOT, P. & FERREIRA, P. 2013. TLR2-Induced IL-10 Production Impairs Neutrophil Recruitment to Infected Tissues during Neonatal Bacterial Sepsis. *The Journal of Immunology*, 191, 4759.
- ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D. R., FERNANDES, G. R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J.-M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNANDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUROKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H. B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E. G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W. M., BRUNAK, S., DORÉ, J., META, H. I. T. C., ANTOLÍN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H. M., ALMEIDA, M., BRECHOT, C., CARA, C., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FOERSTNER, K. U., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., HUBER, W., VAN HYLCKAMAVLIEG, J., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KNOL, J., LAKHDARI, O., LAYEC, S., LE ROUX, K., MAGUIN, E., MÉRIEUX, A., MELO MINARDI, R., M'RINI, C., MULLER, J., OOZEER, R., PARKHILL, J., RENAULT, P., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., SUNAGAWA, S., TORREJON, A., TURNER, K., VANDEMEULEBROUCK, G., VARELA, E., WINOGRADSKY, Y., ZELLER, G., WEISSENBACH, J., EHRLICH, S. D. & BORK, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-180.
- AZAD, M., KONYA, T., PERSAUD, R., GUTTMAN, D., CHARI, R., FIELD, C., SEARS, M., MANDHANE, P., TURVEY, S., SUBBARAO, P., BECKER, A., SCOTT, J., KOZYRSKYJ, A. & INVESTIGATORS, T. C. S. 2016. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 123, 983-993.
- BÄCKHED, F., ROSWALL, J., PENG, Y., FENG, Q., JIA, H., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., LI, Y., XIA, Y., XIE, H., ZHONG, H., KHAN, M. T., ZHANG, J.,

- LI, J., XIAO, L., AL-AAMA, J., ZHANG, D., LEE, Y. S., KOTOWSKA, D., COLDING, C., TREMAROLI, V., YIN, Y., BERGMAN, S., XU, X., MADSEN, L., KRISTIANSEN, K., DAHLGREN, J. & WANG, J. 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host & microbe*, 17, 690-703.
- BANSAL, T., ALANIZ, R. C., WOOD, T. K. & JAYARAMAN, A. 2010. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 228-233.
- BARTSCH, M., HAHN, A. & BERKEMEYER, S. 2023. Bridging the Gap from Enterotypes to Personalized Dietary Recommendations: A Metabolomics Perspective on Microbiome Research. *Metabolites*, 13, 1182.
- BAUMHOFER, J. M., BEINHAEUER, B. G., WANG, J. E., BRANDMEIER, H., GEISLER, K., LOSERT, U., PHILIP, R., AVERSA, G. & ROGY, M. A. 1998. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence. *European Journal of Immunology*, 28, 610-615.
- BIANCO, A., LAROSA, E., PILEGGI, C., PAVIA, M. & COLLABORATIVE WORKING, G. 2016. Appropriateness of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Neonatal Group B Streptococcus Disease. *PloS one*, 11, e0166179-e0166179.
- BLANCO-QUIRÓS, A., CASADO-FLORES, J., GARROTE ADRADOS, J. A., MORO, M. N., ANTÓN, J. A. & SANZ, E. A. 2005. Interleukin-13 is involved in the survival of children with sepsis. *Acta Paediatr*, 94, 1828-31.
- BLASER, M. J., DEVKOTA, S., MCCOY, K. D., RELMAN, D. A., YASSOUR, M. & YOUNG, V. B. 2021. Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. *Microbiome*, 9, 8.
- BOGAERT, D., VAN BEVEREN, G. J., DE KOFF, E. M., LUSARRETA PARGA, P., BALCAZAR LOPEZ, C. E., KOPPENSTEINER, L., CLERC, M., HASRAT, R., ARP, K., CHU, M. L. J. N., DE GROOT, P. C. M., SANDERS, E. A. M., VAN HOUTEN, M. A. & DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A. 2023. Mother-to-infant microbiota transmission and infant microbiota development across multiple body sites. *Cell Host & Microbe*, 31, 447-460.e6.
- BOKULICH, N. A., CHUNG, J., BATTAGLIA, T., HENDERSON, N., JAY, M., LI, H., D LIEBER, A., WU, F., PEREZ-PEREZ, G. I., CHEN, Y., SCHWEIZER, W., ZHENG, X., CONTRERAS, M., DOMINGUEZ-BELLO, M. G. & BLASER, M. J. 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science translational medicine*, 8, 343ra82-343ra82.
- CABRERA-PEREZ, J., BABCOCK, J. C., DILEEPAN, T., MURPHY, K. A., KUCABA, T. A., BADOVINAC, V. P. & GRIFFITH, T. S. 2016. Gut Microbial Membership Modulates CD4 T Cell Reconstitution and Function after Sepsis. *J Immunol*, 197, 1692-8.
- CABRERA-RUBIO, R., COLLADO, M. C., LAITINEN, K., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. & MIRA, A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, 96, 544-51.
- CARL, M. A., NDAO, I. M., SPRINGMAN, A. C., MANNING, S. D., JOHNSON, J. R., JOHNSTON, B. D., BURNHAM, C.-A. D., WEINSTOCK, E. S., WEINSTOCK, G. M., WYLIE, T. N., MITREVA, M., ABUBUCKER, S., ZHOU, Y., STEVENS, H. J., HALL-MOORE, C., JULIAN, S., SHAIKH, N., WARNER, B. B. & TARR, P. I. 2014. Sepsis From the Gut: The Enteric Habitat of Bacteria That Cause Late-Onset Neonatal Bloodstream Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 58, 1211-1218.

- CERNADA, M., BAUERL, C., SERNA, E., COLLADO, M. C., MARTINEZ, G. P. & VENTO, M. 2016. Sepsis in preterm infants causes alterations in mucosal gene expression and microbiota profiles compared to non-septic twins. *Sci Rep*, 6, 25497.
- CHAUHAN, N., TIWARI, S. & JAIN, U. 2017. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microbial pathogenesis*, 107, 234-242.
- CHEN, V. L., AVCI, F. Y. & KASPER, D. L. 2013. A maternal vaccine against group B Streptococcus: past, present, and future. *Vaccine*, 31 Suppl 4, D13-D19.
- CHICHLOWSKI, M., DE LARTIGUE, G., GERMAN, J. B., RAYBOULD, H. E. & MILLS, D. A. 2012. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 55, 321-7.
- CHU, D. M., MA, J., PRINCE, A. L., ANTONY, K. M., SEFEROVIC, M. D. & AAGAARD, K. M. 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine*, 23, 314-326.
- COHEN-PORADOSU, R., MCLOUGHLIN, R. M., LEE, J. C. & KASPER, D. L. 2011. Bacteroides fragilis–Stimulated Interleukin-10 Contains Expanding Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 204, 363-371.
- COSTEA, P. I., HILDEBRAND, F., ARUMUGAM, M., BÄCKHED, F., BLASER, M. J., BUSHMAN, F. D., DE VOS, W. M., EHRLICH, S. D., FRASER, C. M., HATTORI, M., HUTTENHOWER, C., JEFFERY, I. B., KNIGHTS, D., LEWIS, J. D., LEY, R. E., OCHMAN, H., O'TOOLE, P. W., QUINCE, C., RELMAN, D. A., SHANAHAN, F., SUNAGAWA, S., WANG, J., WEINSTOCK, G. M., WU, G. D., ZELLER, G., ZHAO, L., RAES, J., KNIGHT, R. & BORK, P. 2018. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature microbiology*, 3, 8-16.
- COULIE, P. G., CAYPHAS, S., VINK, A., UYTENHOVE, C. & VAN SNICK, J. 1987. Interleukin-HP1-related hybridoma and plasmacytoma growth factors induced by lipopolysaccharide in vivo. *Eur J Immunol*, 17, 1217-20.
- CRESCI, G. A. & BAWDEN, E. 2015. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 30, 734-746.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J. B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G. & LIONETTI, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14691-14696.
- DEFRANCE, T., CARAYON, P., BILLIAN, G., GUILLEMOT, J. C., MINTY, A., CAPUT, D. & FERRARA, P. 1994. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med*, 179, 135-43.
- DEL CHIERICO, F., VERNOCCHI, P., PETRUCCA, A., PACI, P., FUENTES, S., PRATICÒ, G., CAPUANI, G., MASOTTI, A., REDDEL, S., RUSSO, A., VALLONE, C., SALVATORI, G., BUFFONE, E., SIGNORE, F., RIGON, G., DOTTA, A., MICCHELI, A., DE VOS, W. M., DALLAPICCOLA, B. & PUTIGNANI, L. 2015. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLOS ONE*, 10, e0137347.
- DOGRA, S., SAKWINSKA, O., SOH, S.-E., NGOM-BRU, C., BRÜCK, W. M., BERGER, B., BRÜSSOW, H., LEE, Y. S., YAP, F., CHONG, Y.-S., GODFREY, K. M., HOLBROOK, J. D., VOS, W. M. D. & BELLO, M. G. D. 2015. Dynamics

- of Infant Gut Microbiota Are Influenced by Delivery Mode and Gestational Duration and Are Associated with Subsequent Adiposity. *mBio*, 6, e02419-14.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G., COSTELLO, E. K., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., FIERER, N. & KNIGHT, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 11971-11975.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G., DE JESUS-LABOY, K. M., SHEN, N., COX, L. M., AMIR, A., GONZALEZ, A., BOKULICH, N. A., SONG, S. J., HOASHI, M., RIVERA-VINAS, J. I., MENDEZ, K., KNIGHT, R. & CLEMENTE, J. C. 2016. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature medicine*, 22, 250-253.
- DORNELLES, L. V., PROCIANOY, R. S., ROESCH, L. F. W., CORSO, A. L., DOBBLER, P. T., MAI, V. & SILVEIRA, R. C. 2022. Meconium microbiota predicts clinical early-onset neonatal sepsis in preterm neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 35, 1935-1943.
- EL MANOUNI EL HASSANI, S., NIEMARKT, H. J., BERKHOUT, D. J. C., PEETERS, C. F. W., HULZEBOS, C. V., VAN KAAM, A. H., KRAMER, B. W., VAN LINGEN, R. A., JENKEN, F., DE BOODE, W. P., BENNINGA, M. A., BUDDING, A. E., VAN WEISSENBRUCH, M. M., DE BOER, N. K. H. & DE MEIJ, T. G. J. 2021. Profound Pathogen-Specific Alterations in Intestinal Microbiota Composition Precede Late-Onset Sepsis in Preterm Infants: A Longitudinal, Multicenter, Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, 73, e224-e232.
- EWASCHUK, J. B., DIAZ, H., MEDDINGS, L., DIEDERICHS, B., DMYTRASH, A., BACKER, J., LOOIJER-VAN LANGEN, M. & MADSEN, K. L. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295, G1025-34.
- FALONY, G., JOOSSENS, M., VIEIRA-SILVA, S., WANG, J., DARZI, Y., FAUST, K., KURILSHIKOV, A., BONDER, M. J., VALLES-COLOMER, M., VANDEPUTTE, D., TITO, R. Y., CHAFFRON, S., RYMENANS, L., VERSPECHT, C., DE SUTTER, L., LIMA-MENDEZ, G., D'HOE, K., JONCKHEERE, K., HOMOLA, D., GARCIA, R., TIGCHELAAR, E. F., EECKHAUDT, L., FU, J., HENCKAERTS, L., ZHERNAKOVA, A., WIJMENGA, C. & RAES, J. 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (New York, N.Y.)*, 352, 560-564.
- FAY, K. T., KLINGENSMITH, N. J., CHEN, C.-W., ZHANG, W., SUN, Y., MORROW, K. N., LIANG, Z., BURD, E. M., FORD, M. L. & COOPERSMITH, C. M. 2019. The gut microbiome alters immunophenotype and survival from sepsis. *The FASEB Journal*, 33, 11258-11269.
- FERRER, M., MÉNDEZ-GARCÍA, C., ROJO, D., BARBAS, C. & MOYA, A. 2017. Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical Pharmacology*, 134, 114-126.
- FERRETTI, P., PASOLLI, E., TETT, A., ASNICAR, F., GORFER, V., FEDI, S., ARMANINI, F., TRUONG, D. T., MANARA, S., ZOLFO, M., BEGHINI, F., BERTORELLI, R., DE SANCTIS, V., BARILETTI, I., CANTO, R., CLEMENTI, R., COLOGNA, M., CRIFO, T., CUSUMANO, G., GOTTARDI, S., INNAMORATI, C., MASE, C., POSTAI, D., SAVOI, D., DURANTI, S., LUGLI, G. A., MANCABELLI, L., TURRONI, F., FERRARIO, C., MILANI, C., MANGIFESTA, M., ANZALONE, R., VIAPPANI, A., YASSOUR, M., VLAMAKIS, H., XAVIER, R., COLLADO, C. M., KOREN, O., TATEO, S., SOFFIATI, M., PEDROTTI, A., VENTURA, M., HUTTENHOWER, C., BORK, P. & SEGATA, N. 2018. Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different

- Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*, 24, 133-145.e5.
- FINKELMAN, F. D., SHEA-DONOHUE, T., MORRIS, S. C., GILDEA, L., STRAIT, R., MADDEN, K. B., SCHOPF, L. & URBAN, J. F., JR. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev*, 201, 139-55.
- FITZSTEVENS, J. L., SMITH, K. C., HAGADORN, J. I., CAIMANO, M. J., MATSON, A. P. & BROWNELL, E. A. 2017. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract*, 32, 354-364.
- FJALSTAD, J. W., STENSVOLD, H. J., BERGSENG, H., SIMONSEN, G. S., SALVESEN, B., RØNNESTAD, A. E. & KLINGENBERG, C. 2016. Early-onset Sepsis and Antibiotic Exposure in Term Infants: A Nationwide Population-based Study in Norway. *The Pediatric infectious disease journal*, 35, 1-6.
- FLINT, H. J., SCOTT, K. P., LOUIS, P. & DUNCAN, S. H. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9, 577-589.
- FOUHY, F., GUINANE, C. M., HUSSEY, S., WALL, R., RYAN, C. A., DEMPSEY, E. M., MURPHY, B., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., STANTON, C. & COTTER, P. D. 2012. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 5811-5820.
- FRANZ, A., HÄRTEL, C., HERTING, E., KEHL, S., GILLE, C., DOUBEK, K., SPELLERBERG, B., MAIER, R. F., VETTER, K. & EGLIN, K. 2017. Prophylaxe der Neugeborenen-sepsis – frühe Form – durch Streptokokken der Gruppe B. Leitlinie des BVF, BVDfK, der DGGG, DGHM, DGPI, DGPM und GNPI. (S2k-Level, AWMF-Registernummer 024/020, März 2016). *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*, 221, 122-129.
- FUKUDA, S., TOH, H., HASE, K., OSHIMA, K., NAKANISHI, Y., YOSHIMURA, K., TOBE, T., CLARKE, J. M., TOPPING, D. L., SUZUKI, T., TAYLOR, T. D., ITOH, K., KIKUCHI, J., MORITA, H., HATTORI, M. & OHNO, H. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469, 543-547.
- GASPARRINI, A. J., WANG, B., SUN, X., KENNEDY, E. A., HERNANDEZ-LEYVA, A., NDAO, I. M., TARR, P. I., WARNER, B. B. & DANTAS, G. 2019. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nat Microbiol*, 4, 2285-2297.
- GOMAA, E. Z. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 2019-2040.
- GOUR, N. & WILLS-KARP, M. 2015. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*, 75, 68-78.
- GRASPEUNTNER, S., WASCHINA, S., KÜNZEL, S., TWISSELMANN, N., RAUSCH, T. K., CLOPPENBORG-SCHMIDT, K., ZIMMERMANN, J., VIEMANN, D., HERTING, E., GÖPEL, W., BAINES, J. F., KALETA, C., RUPP, J., HÄRTEL, C. & PAGEL, J. 2018. Gut Dysbiosis With Bacilli Dominance and Accumulation of Fermentation Products Precedes Late-onset Sepsis in Preterm Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 69, 268-277.
- GUERTI, K., DEVOS, H., IEVEN, M. M. & MAHIEU, L. M. 2011. Time to positivity of neonatal blood cultures: fast and furious? *J Med Microbiol*, 60, 446-53.
- GYNAECOLOGISTS, R. C. O. O. A. 2017. Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 124, e280-e305.

- HEALTH, N. C. C. F. W. S. A. C. S. 2012. *Antibiotics for Early-Onset Neonatal Infection: Antibiotics for the Prevention and Treatment of Early-Onset Neonatal Infection*, London, RCOG Press.
- HEIKKILÄ, M. P. & SARIS, P. E. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, 95, 471-8.
- HERON, M. 2018. Deaths: Leading Causes for 2016. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 67, 1-77.
- HERSHEY, G. K. K. 2003. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 677-690.
- HILL, C. J., LYNCH, D. B., MURPHY, K., ULASZEWSKA, M., JEFFERY, I. B., O'SHEA, C. A., WATKINS, C., DEMPSEY, E., MATTIVI, F., TUOHY, K., ROSS, R. P., RYAN, C. A., O' TOOLE, P. W. & STANTON, C. 2017. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome*, 5, 4.
- HUSE, S. M., YE, Y., ZHOU, Y. & FODOR, A. A. 2012. A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters. *PLOS ONE*, 7, e34242.
- IROH TAM, P.-Y. & BENDEL, C. M. 2017. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatric research*, 82, 574-583.
- IWASZKO, M., BIAŁY, S. & BOGUNIA-KUBIK, K. 2021. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*, 10, 3000.
- JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M. L., MARTÍN, R., ODRIOZOLA, J. M., NUENO-PALOP, C., NARBAD, A., OLIVARES, M., XAUS, J. & RODRÍGUEZ, J. M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current microbiology*, 51, 270-274.
- JOST, T., LACROIX, C., BRAEGGER, C. & CHASSARD, C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr*, 110, 1253-62.
- KIM, H., SITARIK, A. R., WOODCROFT, K., JOHNSON, C. C. & ZORATTI, E. 2019. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Current allergy and asthma reports*, 19, 22-22.
- KLIEWER, N. 2019. *Biomarker für Neonatale Sepsis: Interleukin-27 und CXCL-10*. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.
- KLINGENBERG, C., KORNELISSE, R. F., BUONOCORE, G., MAIER, R. F. & STOCKER, M. 2018. Culture-Negative Early-Onset Neonatal Sepsis - At the Crossroad Between Efficient Sepsis Care and Antimicrobial Stewardship. *Front Pediatr*, 6, 285.
- KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R. M., CLARK, S. C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B. & TRINCHIERI, G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*, 170, 827-45.
- KORPELA, K., BLAKSTAD, E. W., MOLTU, S. J., STRØMMEN, K., NAKSTAD, B., RØNNESTAD, A. E., BRÆKKE, K., IVERSEN, P. O., DREVON, C. A. & DE VOS, W. 2018. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific Reports*, 8, 2453.
- LAUDER, A. P., ROCHE, A. M., SHERRILL-MIX, S., BAILEY, A., LAUGHLIN, A. L., BITTINGER, K., LEITE, R., ELOVITZ, M. A., PARRY, S. & BUSHMAN, F. D. 2016. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome*, 4, 29-29.

- LEE, C.-C. & CHIU, C.-H. 2023. Link between gut microbiota and neonatal sepsis. *Journal of the Formosan Medical Association*.
- LIANG, C., TSENG, H.-C., CHEN, H.-M., WANG, W.-C., CHIU, C.-M., CHANG, J.-Y., LU, K.-Y., WENG, S.-L., CHANG, T.-H., CHANG, C.-H., WENG, C.-T., WANG, H.-M. & HUANG, H.-D. 2017. Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. *BMC Genomics*, 18, 932.
- LIÉVIN, V., PEIFFER, I., HUDAULT, S., ROCHAT, F., BRASSART, D., NEESER, J. R. & SERVIN, A. L. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47, 646-52.
- LIM, E. S., RODRIGUEZ, C. & HOLTZ, L. R. 2018. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*, 6, 87-87.
- LLOYD-PRICE, J., ABU-ALI, G. & HUTTENHOWER, C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8, 51-51.
- LUCKEY, T. D. 1972. Introduction to intestinal microecology. *The American journal of clinical nutrition*, 25, 1292-1294.
- MADHI, S. A., ANDERSON, A. S., ABSALON, J., RADLEY, D., SIMON, R., JONGIHLATI, B., STREHLAU, R., NIEKERK, A. M. V., IZU, A., NAIDOO, N., KWATRA, G., RAMSAMY, Y., SAID, M., JONES, S., JOSE, L., FAIRLIE, L., BARNABAS, S. L., NEWTON, R., MUNSON, S., JEFFERIES, Z., PAVLIAKOVA, D., MONERRI, N. C. S. D., GOMME, E., PEREZ, J. L., SCOTT, D. A., GRUBER, W. C. & JANSEN, K. U. 2023. Potential for Maternally Administered Vaccine for Infant Group B Streptococcus. *New England Journal of Medicine*, 389, 215-227.
- MADUREIRA, P., ANDRADE, E. B., GAMA, B., OLIVEIRA, L., MOREIRA, S., RIBEIRO, A., CORREIA-NEVES, M., TRIEU-CUOT, P., VILANOVA, M. & FERREIRA, P. 2011. Inhibition of IL-10 Production by Maternal Antibodies against Group B Streptococcus GAPDH Confers Immunity to Offspring by Favoring Neutrophil Recruitment. *PLOS Pathogens*, 7, e1002363.
- MAGNE, F., PUCHI SILVA, A., CARVAJAL, B. & GOTTELAND, M. 2017. The Elevated Rate of Cesarean Section and Its Contribution to Non-Communicable Chronic Diseases in Latin America: The Growing Involvement of the Microbiota. *Frontiers in pediatrics*, 5, 192-192.
- MAIER, T. V., LUCIO, M., LEE, L. H., VERBERKMOES, N. C., BRISLAWN, C. J., BERNHARDT, J., LAMENDELLA, R., MCDERMOTT, J. E., BERGERON, N., HEINZMANN, S. S., MORTON, J. T., GONZÁLEZ, A., ACKERMANN, G., KNIGHT, R., RIEDEL, K., KRAUSS, R. M., SCHMITT-KOPPLIN, P. & JANSSON, J. K. 2017. Impact of Dietary Resistant Starch on the Human Gut Microbiome, Metaproteome, and Metabolome. *mBio*, 8.
- MANCUSO, G., CUSUMANO, V., GENOVESE, F., GAMBUZZA, M., BENINATI, C. & TETI, G. 1997. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci. *Infection and Immunity*, 65, 3731-3735.
- MARCOBAL, A., BARBOZA, M., FROEHLICH, J. W., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., LEBRILLA, C. B. & MILLS, D. A. 2010. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J Agric Food Chem*, 58, 5334-40.
- MARCOBAL, A. & SONNENBURG, J. L. 2012. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 4, 12-5.
- MICHAELSEN, K. F., WEAVER, L., BRANCA, F. & ROBERTSON, A. 2000. Feeding and nutrition of infants and young children. *WHO regional publications, European Series*, 87, 288.
- MILANI, C., DURANTI, S., BOTTACINI, F., CASEY, E., TURRONI, F., MAHONY, J., BELZER, C., DELGADO PALACIO, S., ARBOLEYA MONTES, S.,

- MANCABELLI, L., LUGLI, G. A., RODRIGUEZ, J. M., BODE, L., DE VOS, W., GUEIMONDE, M., MARGOLLES, A., VAN SINDEREN, D. & VENTURA, M. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 81, e00036-17.
- MOOSSAVI, S., MILIKU, K., SEPEHRI, S., KHAFIPOUR, E. & AZAD, M. B. 2018. The Prebiotic and Probiotic Properties of Human Milk: Implications for Infant Immune Development and Pediatric Asthma. *Frontiers in pediatrics*, 6, 197-197.
- MOROWITZ, M. J., DI CARO, V., PANG, D., CUMMINGS, J., FIREK, B., ROGERS, M. B., RANGANATHAN, S., CLARK, R. S. B. & ANEJA, R. K. 2017. Dietary Supplementation With Nonfermentable Fiber Alters the Gut Microbiota and Confers Protection in Murine Models of Sepsis. *Critical Care Medicine*, 45, e516-e523.
- MORRISON, D. J. & PRESTON, T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7, 189-200.
- NAGPAL, R., WANG, S., AHMADI, S., HAYES, J., GAGLIANO, J., SUBASHCHANDRABOSE, S., KITZMAN, D. W., BECTON, T., READ, R. & YADAV, H. 2018. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. *Scientific Reports*, 8, 12649.
- NGUYEN, K. G., VRABEL, M. R., MANTOOTH, S. M., HOPKINS, J. J., WAGNER, E. S., GABALDON, T. A. & ZAHAROFF, D. A. 2020. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 11.
- NICOLETTI, F., MANCUSO, G., CUSUMANO, V., MARCO, R. D., ZACCONE, P., BENDTZEN, K. & TETI, G. 1997. Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *European Journal of Immunology*, 27, 1580-1583.
- O'CALLAGHAN, A. & VAN SINDEREN, D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol*, 7, 925.
- O'HARA, A. M. & SHANAHAN, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7, 688-693.
- OH, K. J., LEE, S. E., JUNG, H., KIM, G., ROMERO, R. & YOON, B. H. 2010. Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. *Journal of perinatal medicine*, 38, 261-268.
- PALMER, C., BIK, E. M., DIGIULIO, D. B., RELMAN, D. A. & BROWN, P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5, e177-e177.
- PARADA VENEGAS, D., DE LA FUENTE, M. K., LANDSKRON, G., GONZÁLEZ, M. J., QUERA, R., DIJKSTRA, G., HARMSSEN, H. J. M., FABER, K. N. & HERMOSO, M. A. 2019. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10.
- PÄRNÄNEN, K., KARKMAN, A., HULTMAN, J., LYRA, C., BENGTSSON-PALME, J., LARSSON, D. G. J., RAUTAVA, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, S., KUMAR, H., SATOKARI, R. & VIRTA, M. 2018. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications*, 9, 3891.
- PATOLE, S. K., RAO, S. C., KEIL, A. D., NATHAN, E. A., DOHERTY, D. A. & SIMMER, K. N. 2016. Benefits of Bifidobacterium breve M-16V Supplementation in Preterm Neonates - A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*, 11, e0150775.

- PEREZ-MUÑOZ, M. E., ARRIETA, M.-C., RAMER-TAIT, A. E. & WALTER, J. 2017. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5, 48-48.
- PODLESNY, D. & FRICKE, W. F. 2021. Strain inheritance and neonatal gut microbiota development: A meta-analysis. *International Journal of Medical Microbiology*, 311, 151483.
- PUOPOLO, K. M., DRAPER, D., WI, S., NEWMAN, T. B., ZUPANCIC, J., LIEBERMAN, E., SMITH, M. & ESCOBAR, G. J. 2011. Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics*, 128, e1155-e1163.
- RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M. & DE VOS, W. M. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38, 996-1047.
- RAMAKRISHNA, C., KUJAWSKI, M., CHU, H., LI, L., MAZMANIAN, S. K. & CANTIN, E. M. 2019. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nature Communications*, 10, 2153.
- RAVEL, J., GAJER, P., ABDU, Z., SCHNEIDER, G. M., KOENIG, S. S. K., MCCULLE, S. L., KARLEBACH, S., GORLE, R., RUSSELL, J., TACKET, C. O., BROTMAN, R. M., DAVIS, C. C., AULT, K., PERALTA, L. & FORNEY, L. J. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1, 4680-4687.
- REYMAN, M., VAN HOUTEN, M. A., WATSON, R. L., CHU, M. L. J. N., ARP, K., DE WAAL, W. J., SCHIERING, I., PLÖTZ, F. B., WILLEMS, R. J. L., VAN SCHAIK, W., SANDERS, E. A. M. & BOGAERT, D. 2022. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nature Communications*, 13, 893.
- ROSNER, J. 2014. Ten Times More Microbial Cells than Body Cells in Humans? *Microbe Magazine*, 9, 47-47.
- SATOKARI, R., GRÖNROOS, T., LAITINEN, K., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2009. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in applied microbiology*, 48, 8-12.
- SCHRAG, S. J., FARLEY, M. M., PETIT, S., REINGOLD, A., WESTON, E. J., PONDO, T., HUDSON JAIN, J. & LYNFIELD, R. 2016. Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics*, 138.
- SCHUIJT, T. J., LANKELMA, J. M., SCICLUNA, B. P., DE SOUSA E MELO, F., ROELOFS, J. J. T. H., DE BOER, J. D., HOOGENDIJK, A. J., DE BEER, R., DE VOS, A., BELZER, C., DE VOS, W. M., VAN DER POLL, T. & WIERSINGA, W. J. 2016. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*, 65, 575.
- SCHULMAN, J., BENITZ, W. E., PROFIT, J., LEE, H. C., DUEÑAS, G., BENNETT, M. V., JOCSON, M. A. L., SCHUTZENGEL, R. & GOULD, J. B. 2019. Newborn Antibiotic Exposures and Association With Proven Bloodstream Infection. *Pediatrics*, 144, e20191105.
- SCHWARTZ, D. J., LANGDON, A. E. & DANTAS, G. 2020. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Medicine*, 12, 82.
- SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R. 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164, 337-340.
- SEVELSTED, A., STOKHOLM, J., BØNNELYKKE, K. & BISGAARD, H. 2015. Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics*, 135, e92-e98.
- SHANE, A. L., SÁNCHEZ, P. J. & STOLL, B. J. 2017. Neonatal sepsis. *Lancet (London, England)*, 390, 1770-1780.

- SHAW, A. G., SIM, K., RANDELL, P., COX, M. J., MCCLURE, Z. E., LI, M. S., DONALDSON, H., LANGFORD, P. R., COOKSON, W. O., MOFFATT, M. F. & KROLL, J. S. 2015. Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants. *PLoS One*, 10, e0132923.
- SHERWIN, C., BROADBENT, R., YOUNG, S., WORTH, J., MCCAFFREY, F., MEDLICOTT, N. J. & REITH, D. 2008. Utility of interleukin-12 and interleukin-10 in comparison with other cytokines and acute-phase reactants in the diagnosis of neonatal sepsis. *Am J Perinatol*, 25, 629-36.
- SIMONSEN, K. A., ANDERSON-BERRY, A. L., DELAIR, S. F. & DAVIES, H. D. 2014. Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*, 27, 21-47.
- SINGER, J. R., BLOSSER, E. G., ZINDL, C. L., SILBERGER, D. J., CONLAN, S., LAUFER, V. A., DITORO, D., DEMING, C., KUMAR, R., MORROW, C. D., SEGRE, J. A., GRAY, M. J., RANDOLPH, D. A. & WEAVER, C. T. 2019. Preventing dysbiosis of the neonatal mouse intestinal microbiome protects against late-onset sepsis. *Nature Medicine*, 25, 1772-1782.
- SNICK, J. V. 1990. Interleukin-6: An Overview. *Annual Review of Immunology*, 8, 253-278.
- SOMMESE, L., PAGLIUCA, C., AVALLONE, B., IPPOLITO, R., CASAMASSIMI, A., COSTA, V., COLICCHIO, R., CERCIELLO, R., D'ARMIENTO, M., SCARPATO, M., GIOVANE, A., PASTORE, G., INFANTE, T., CICCODICOLA, A., FIORITO, C., D'ARMIENTO, F. P., SALVATORE, P. & NAPOLI, C. 2012. Evidence of *Bacteroides fragilis* Protection from *Bartonella henselae*-Induced Damage. *PLOS ONE*, 7, e49653.
- STEWART, C. J., AJAMI, N. J., O'BRIEN, J. L., HUTCHINSON, D. S., SMITH, D. P., WONG, M. C., ROSS, M. C., LLOYD, R. E., DODDAPANENI, H., METCALF, G. A., MUZNY, D., GIBBS, R. A., VATANEN, T., HUTTENHOWER, C., XAVIER, R. J., REWERS, M., HAGOPIAN, W., TOPPARI, J., ZIEGLER, A. G., SHE, J. X., AKOLKAR, B., LERNMARK, A., HYOTY, H., VEHIK, K., KRISCHER, J. P. & PETROSINO, J. F. 2018. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*, 562, 583-588.
- STOCKER, M., KLINGENBERG, C., NAVÉR, L., NORDBERG, V., BERARDI, A., EL HELOU, S., FUSCH, G., BLISS, J. M., LEHNICK, D., DIMOPOULOU, V., GUERINA, N., SELIGA-SIWECKA, J., MATON, P., LAGAE, D., MARI, J., JANOTA, J., AGYEMAN, P. K. A., PFISTER, R., LATORRE, G., MAFFEI, G., LAFORGIA, N., MÓZES, E., STØRDAL, K., STRUNK, T. & GIANNONI, E. 2023. Less is more: Antibiotics at the beginning of life. *Nature Communications*, 14, 2423.
- STOLL, B. J., HANSEN, N. I., SÁNCHEZ, P. J., FAIX, R. G., POINDEXTER, B. B., VAN MEURS, K. P., BIZZARRO, M. J., GOLDBERG, R. N., FRANTZ, I. D., 3RD, HALE, E. C., SHANKARAN, S., KENNEDY, K., CARLO, W. A., WATTERBERG, K. L., BELL, E. F., WALSH, M. C., SCHIBLER, K., LAPTOOK, A. R., SHANE, A. L., SCHRAG, S. J., DAS, A., HIGGINS, R. D., EUNICE KENNEDY SHRIVER NATIONAL INSTITUTE OF CHILD, H. & HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH, N. 2011. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*, 127, 817-826.
- STOLL, B. J., PUOPOLO, K. M., HANSEN, N. I., SÁNCHEZ, P. J., BELL, E. F., CARLO, W. A., COTTEN, C. M., D'ANGIO, C. T., KAZZI, S. N. J., POINDEXTER, B. B., VAN MEURS, K. P., HALE, E. C., COLLINS, M. V., DAS, A., BAKER, C. J., WYCKOFF, M. H., YODER, B. A., WATTERBERG, K. L., WALSH, M. C., DEVASKAR, U., LAPTOOK, A. R., SOKOL, G. M., SCHRAG,

- S. J. & HIGGINS, R. D. 2020. Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies. *JAMA Pediatr*, 174, e200593.
- STOUT, M. J., CONLON, B., LANDEAU, M., LEE, I., BOWER, C., ZHAO, Q., ROEHL, K. A., NELSON, D. M., MACONES, G. A. & MYSOREKAR, I. U. 2013. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *American journal of obstetrics and gynecology*, 208, 226.e1-226.e2267.
- STRUNK, T., MOLLOY, E. J., MISHRA, A. & BHUTTA, Z. A. 2024. Neonatal bacterial sepsis. *The Lancet*, 404, 277-293.
- SUGITHARINI, V., PREMA, A. & BERLA THANGAM, E. 2013. Inflammatory mediators of systemic inflammation in neonatal sepsis. *Inflammation Research*, 62, 1025-1034.
- TAKAHASHI, N., UEHARA, R., KOBAYASHI, M., YADA, Y., KOIKE, Y., KAWAMATA, R., ODAKA, J., HONMA, Y. & MOMOI, M. Y. 2010. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine*, 49, 331-337.
- TAMBURINI, S., SHEN, N., WU, H. C. & CLEMENTE, J. C. 2016. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine*, 22, 713-722.
- TANES, C., BITTINGER, K., GAO, Y., FRIEDMAN, E. S., NESSEL, L., ROY PALADHI, U., CHAU, L., PANFEN, E., FISCHBACH, M. A., BRAUN, J., XAVIER, R. J., CLISH, C. B., LI, H., BUSHMAN, F. D., LEWIS, J. D. & WU, G. D. 2021. Role of dietary fiber in the recovery of the human gut microbiome and its metabolome. *Cell Host & Microbe*, 29, 394-407.e5.
- TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-484.
- VAN ROSSUM, T., HAIß, A., KNOLL, R. L., MARIßEN, J., PODLESNY, D., PAGEL, J., BLESKINA, M., VENS, M., FORTMANN, I., SILLER, B., RICKLEFS, I., KLOPP, J., HILBERT, K., MEYER, C., THIELEMANN, R., GOEDICKE-FRITZ, S., KUNTZ, M., WIEG, C., TEIG, N., KÖRNER, T., KRIBS, A., HUDALLA, H., KNUF, M., STEIN, A., GILLE, C., BAGCI, S., DOHLE, F., PROQUITTÉ, H., OLBERTZ, D. M., SCHMIDT, E., KOCH, L., PIRR, S., RUPP, J., SPIEGLER, J., KOPP, M. V., GÖPEL, W., HERTING, E., FORSLUND, S. K., VIEMANN, D., ZEMLIN, M., BORK, P., GEHRING, S., KÖNIG, I. R., HENNEKE, P. & HÄRTEL, C. 2024. Bifidobacterium and Lactobacillus Probiotics and Gut Dysbiosis in Preterm Infants: The PRIMAL Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatrics*.
- VATANEN, T., FRANZOSA, E. A., SCHWAGER, R., TRIPATHI, S., ARTHUR, T. D., VEHIK, K., LERNMARK, Å., HAGOPIAN, W. A., REWERS, M. J., SHE, J.-X., TOPPARI, J., ZIEGLER, A.-G., AKOLKAR, B., KRISCHER, J. P., STEWART, C. J., AJAMI, N. J., PETROSINO, J. F., GEVERS, D., LÄHDESMÄKI, H., VLAMAKIS, H., HUTTENHOWER, C. & XAVIER, R. J. 2018. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*, 562, 589-594.
- WAAGE, A., BRANDTZAEG, P., HALSTENSEN, A., KIERULF, P. & ESPEVIK, T. 1989. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*, 169, 333-8.
- WALKER, A. W., INCE, J., DUNCAN, S. H., WEBSTER, L. M., HOLTROP, G., ZE, X., BROWN, D., STARES, M. D., SCOTT, P., BERGERAT, A., LOUIS, P., MCINTOSH, F., JOHNSTONE, A. M., LOBLEY, G. E., PARKHILL, J. & FLINT,

- H. J. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *Isme j*, 5, 220-30.
- WESTON, E. J., PONDO, T., LEWIS, M. M., MARTELL-CLEARY, P., MORIN, C., JEWELL, B., DAILY, P., APOSTOL, M., PETIT, S., FARLEY, M., LYNFIELD, R., REINGOLD, A., HANSEN, N. I., STOLL, B. J., SHANE, A. L., ZELL, E. & SCHRAG, S. J. 2011. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. *The Pediatric infectious disease journal*, 30, 937-941.
- WILMORE, J. R., GAUDETTE, B. T., GOMEZ ATRIA, D., HASHEMI, T., JONES, D. D., GARDNER, C. A., COLE, S. D., MISIC, A. M., BEITING, D. P. & ALLMAN, D. 2018. Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host Microbe*, 23, 302-311.e3.
- WU, G. D., CHEN, J., HOFFMANN, C., BITTINGER, K., CHEN, Y.-Y., KEILBAUGH, S. A., BEWTRA, M., KNIGHTS, D., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., SINHA, R., GILROY, E., GUPTA, K., BALDASSANO, R., NESSEL, L., LI, H., BUSHMAN, F. D. & LEWIS, J. D. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 334, 105-108.
- WYNN, J. L., WONG, H. R., SHANLEY, T. P., BIZZARRO, M. J., SAIMAN, L. & POLIN, R. A. 2014. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 15, 523-528.
- YASSOUR, M., JASON, E., HOGSTROM, L. J., ARTHUR, T. D., TRIPATHI, S., SILJANDER, H., SELVENIUS, J., OIKARINEN, S., HYÖTY, H., VIRTANEN, S. M., ILONEN, J., FERRETTI, P., PASOLLI, E., TETT, A., ASNICAR, F., SEGATA, N., VLAMAKIS, H., LANDER, E. S., HUTTENHOWER, C., KNIP, M. & XAVIER, R. J. 2018. Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life. *Cell Host & Microbe*, 24, 146-154.e4.
- YASSOUR, M., VATANEN, T., SILJANDER, H., HÄMÄLÄINEN, A.-M., HÄRKÖNEN, T., RYHÄNEN, S. J., FRANZOSA, E. A., VLAMAKIS, H., HUTTENHOWER, C., GEVERS, D., LANDER, E. S., KNIP, M. & XAVIER, R. J. 2016. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Science Translational Medicine*, 8, 343ra81-343ra81.
- YATSUNENKO, T., REY, F. E., MANARY, M. J., TREHAN, I., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., BALDASSANO, R. N., ANOKHIN, A. P., HEATH, A. C., WARNER, B., REEDER, J., KUCZYNSKI, J., CAPORASO, J. G., LOZUPONE, C. A., LAUBER, C., CLEMENTE, J. C., KNIGHTS, D., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-227.
- ZEMLIN, M., BERGER, A., FRANZ, A., GILLE, C., HÄRTEL, C., KÜSTER, H., MÜLLER, A., POHLANDT, F., SIMON, A. & MERZ, W. 2019. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen - S2k-Leitlinie 024-008. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- ZHOU, L., QIU, W., WANG, J., ZHAO, A., ZHOU, C., SUN, T., XIONG, Z., CAO, P., SHEN, W., CHEN, J., LAI, X., ZHAO, L.-H., WU, Y., LI, M., QIU, F., YU, Y., XU, Z. Z., ZHOU, H., JIA, W., LIAO, Y., RETNAKARAN, R., KREWSKI, D., WEN, S. W., CLEMENTE, J. C., CHEN, T., XIE, R.-H. & HE, Y. 2023. Effects of vaginal microbiota transfer on the neurodevelopment and microbiome of cesarean-born infants: A blinded randomized controlled trial. *Cell Host & Microbe*, 31, 1232-1247.e5.

- ZHOU, P., ZHOU, Y., LIU, B., JIN, Z., ZHUANG, X., DAI, W., YANG, Z., FENG, X., ZHOU, Q., LIU, Y., XU, X. & ZHANG, L. 2020. Perinatal Antibiotic Exposure Affects the Transmission between Maternal and Neonatal Microbiota and Is Associated with Early-Onset Sepsis. *mSphere*, 5, 10.1128/msphere.00984-19.
- ZHOU, Y., MIHINDUKULASURIYA, K. A., GAO, H., LA ROSA, P. S., WYLIE, K. M., MARTIN, J. C., KOTA, K., SHANNON, W. D., MITREVA, M., SODERGREN, E. & WEINSTOCK, G. M. 2014. Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome biology*, 15, R66-R66.
- ZUPANCIC, M. L., CANTAREL, B. L., LIU, Z., DRABEK, E. F., RYAN, K. A., CIRIMOTICH, S., JONES, C., KNIGHT, R., WALTERS, W. A., KNIGHTS, D., MONGODIN, E. F., HORENSTEIN, R. B., MITCHELL, B. D., STEINLE, N., SNITKER, S., SHULDINER, A. R. & FRASER, C. M. 2012. Analysis of the Gut Microbiota in the Old Order Amish and Its Relation to the Metabolic Syndrome. *PLOS ONE*, 7, e43052.

8 Anhang

8.1 Protokoll AG Gehring PCR-Vorbereitung

16S Amplicon PCR Forward Primer 5'

forward primer *overhang adapter* *gene-specific seqn.*
 → 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG

16S Amplicon PCR Reverse Primer 5'

reverse primer *overhang adapter*
 ← 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G GA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C

1. Amplicon PCR (alles lagern bei -25°C) in 96er well 0,2 ml PCR plate

Microbial Genomic DNA (5 ng/μl) <i>(in 10 μM Tris pH 8,5)</i>	2,5 μl	5,5 (DNA + H ₂ O)
Amplicon Forw. Primer (1 μM) <i>(5 μM)</i>	5,0 μl	1,0
Amplicon Rev. Primer (1 μM) <i>(5 μM)</i>	5,0 μl	1,0
2 x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12,5 μl	7,5
	25,0 μl	15,0 μl

95° C for 3 min

25 Zyklen : 95° C for 30 sec

55° C for 30 sec

72° C for 30 sec

72° C for 5 min

Hold at 4° C

1 μl der PCR für Bioanalyzer DNA 1000 ca. 550 bp

3 μl auf Agarose Gel 2%

2. PCR Clean-Up

→ nicht gemacht

Reinigen der V3/V4 Amplicons von freien Primern und Primerdimeren

- Amplicon-PCR Plate 1000g für 1 min
- AMPure XP beads auf RT bringen
- (-Überführen der PCR (24 µl) in MIDI plate wenn man mit shaker mixt)
- AMPure Beads vortexen 30 sec
- 20 µl AMPure XP Beads zu jeder Amplicon PCR
- Komplette Volumen mehrfach auf und ab pipettieren (Shaker 2 min MIDI Plate)
- 5 min RT inkubieren
- Platte für 2 min auf Magnetständer stellen (bis Überstand klar ist)
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Platte auf Magnetständer belassen + 200 µl frischem 80% Ethanol
30 sec inkubieren, Überstand abnehmen und verwerfen
- Wiederholen mit 200 µl Ethanol
- noch verbliebenen Ethanol mit Pipetten entfernen
- 10 min lufttrocknen der beads (immer noch auf dem Magnetständer)
- PCR Plate von Magnetständer entfernen
- + 52,5 µl 10 mM Tris pH 8,5
- mehrfach resusp (Shaker 2 min MIDI Plate)
- 2 min RT
- PCR-Plate auf Magnetständer stellen, 2 min, bis Überstand klar
- 50 µl vom Überstand (Amplicon PCR) in eine neue 96 well Plate überführen.

3

3. Index-PCR

Mit dem Nextera XT Index Kit. (24 oder 96 Indices)

Hier werden unterschiedliche Primer (N7xx und S5xx) als Index Primer verwendet, die dann später (wenn die Library gepoolt ist) eine eindeutige Zuweisung zum Ausgangspatient ermöglichen.....

Bsp mit 6 versch. N701-N706 und 4 versch. S501-S504

N701 S501	N702 S501	N703 S501	N704 S501	N705 S501	N706 S501
N701 S502	N702 S502	N703 S502	N704 S502	N705 S502	N706 S502
N701 S503	N702 S503	N703 S503	N704 S503	N705 S503	N706 S503
N701 S504	N702 S504	N703 S504	N704 S504	N705 S504	N706 S504

3. Index PCR

- 5 µl DNA der gereinigten Amplicon-PCR 1-2 µl } 5,5
 - + 5 µl Nextera XT Primer 1 (N7xx) 1
 - + 5 µl Nextera XT Primer 2 (S5xx) 1
 - + 25 µl 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix 7,5
 - + 10 µl PCR Grade water
-
- 50 µl Total Σ 15 µl

Mixen, verschließen, 1000g 1 min.....

- 95° C for 3 min
- 8 Zyklen : 95° C for 30 sec
- 55° C for 30 sec
- 72° C for 30 sec
- 72° C for 5 min
- Hold at 4° C

④

4. PCR Clean-Up-2

- Index-PCRs zentrifugieren 280g 1 min (Shaker 2 min MIDI Plate)
- AMPure XP beads vortexen
- ^{20-25µl beads} 56 µl Ampure XP beads in jede Index-PCR pipettieren (^{15µl} 50 µl), mixen (Shaker 2 min MIDI Plate)
- 5 min RT
- Platte in Magnetständer 2 min, bis Überstand klar ist
- Überstand entfernen und verwerfen
- + 200 µl frischen 80% Ethanol (im Magnetständer)
- 30 Sec. inkubieren
- Überstand entfernen und verwerfen
- Waschen mit 200 µl Ethanol wiederholen, Reste von Ethanol abpipettieren
- aus Magnetständer 10 min lufttrockenen lassen
- Index-PCR vom Magnetständer nehmen
- + 27,5 µl 10 mM Tris, pH 8,5 (*loc. der DNA*)
- beads mehrfach resusp. (Shaker 2 min MIDI Plate)
- 2 min RT
- auf den Magnetständer und 2 min inkub., bis Überstand klar ist
- 25 µl Index-PCR in neue 96 well Plate

~~1 µl einer 1:50 Verdünnung der final library auf Bioanalyzer DNA 1000 messen ca. 630 bp~~

mit Qubits gemessen (nächste Seite)

5

5. Library Quantifizierung und Pooling

DNA-Konz messen (ng/ μ l) *Qubit*

Umrechnen in nM

Und mit 10 mM *DEPC free water* Tris pH 8,5 auf 4 nM verdünnen

Aliquots von 5 μ l der auf 4 nM verd. Library spoolen (bis zu 96 Libraries in einem MiSeq run)

6. Library Denaturing und MiSeq Sample Loading

- Heizblock für Eppis auf 96°C vorheizen

- MiSeq reagent cartridge aus freezer zu RT

- Eisbad (3 Teile Eis, 1 Teil Wasser)

- HT1 Hybridization Buffer im Eisbad auftauen

- **Denaturierung:** 5 μ l der pooled library

+ 5 μ l 0,2 N NaOH (nicht älter als 1 Wo)

[4 nM] => [2 nM]

- vortexen, zentr. 280g 1 min

- 5 min inkubieren RT resultiert Einzelstrang 10 μ l denat. DNA *1:100*

- + 990 μ l gekühlten HT1 (Hybridisierungspuffer) = Konz von **20 pM** denat. DNA

-Verdünnung der Denat. DNA

Empf. wird damit zu beginnen

Endkonz.	2 pM	4 pM <i>(1:5)</i>	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denat. DNA	60 μ l	120 μ l	180 μ l	240 μ l	300 μ l
gekühlter HT1	540 μ l	480 μ l	420 μ l	360 μ l	300 μ l

- Verdünnungen auf Eis

Grenzen zw. den Proben, damit
 MiSeq weiß wo nichts zu messen
 ist. 25% d. bioinformatisch
 ausgewerkelten reads sind PhiX

Denaturierung und Verdünnung der PhiX-Kontrolle

- 2 µl PhiX-Library (10 nM)
- + 3 µl Tris pH 8,5 → 4 nM
- + 5 µl NaOH 0,2 N → 2 nM (2000 pM)
- vortexen u. 5 min RT
- + 990 µl pre-chilled HT1 → 20 pM

Endkonz.	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denat PhiX	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
gekühlter HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

Sample zum Beladen d. Cartridge (600 µl)

- 570 µl denat. und verdünnte amplicon library
- + 30 µl denat. und verdünnte PhiX Kontrolle = 5%
- aus Eis halten
- Heizblock hei? dann library 96°C 2 min (erst kurz vor Beladen u. Faktoren des Runs!)
- Tube invertieren zum mixen und sofort Eiswasserbad 5 min
- beladen der MiSeq reagent cartridge

9 Danksagung

10 Tabellarischer Lebenslauf