

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. M. Herrmann

**Probiotikasubstitution bei Frühgeborenen:
Analyse der zeitlichen Entwicklung der
Stuhlflora mit PCR-DGGE**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Nele Katinka Koegel

geboren am 08. Juni 1984 in Henstedt-Ulzburg

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	II
1 Zusammenfassungen.....	1
1.1 Abstract	1
1.2 Zusammenfassung.....	2
2 Einleitung.....	4
2.1 Die humane Mikroflora.....	4
2.1.1 Entwicklung der enteralen Mikroflora	4
2.1.2 Mikrobiom und Mikroflora	5
2.1.3 Einflüsse auf die Mikroflora	6
2.2 Gastrointestinale Immunität.....	8
2.2.1 Aufbau des Gastrointestinaltrakts.....	8
2.2.2 Komponenten der Abwehr	9
2.2.2.1 Epitheliale Barriere	9
2.2.2.2 Gastrointestinale Immunabwehr und Mikroflora.....	10
2.3 Nekrotisierende Enterocolitis (NEC)	13
2.3.1 Definition	13
2.3.2 Symptome und Diagnostik	13
2.3.3 Pathogenese.....	14
2.3.4 Therapeutische Ansätze	15
2.4 Prebiotika und Probiotika.....	15
2.4.1 Prebiotika	15

2.4.2	Probiotika.....	16
2.4.2.1	Wirkmechanismen.....	17
2.4.2.2	Probiotika zur NEC-Prävention bei Frühgeborenen	18
2.4.2.3	Chancen und Kontroversen	19
2.5	Methoden zur Untersuchung der Stuhlflora	22
2.5.1	Konventionelle Methoden	22
2.5.2	16S rDNA basierte Typisierungsmethoden.....	23
2.5.2.1	Polymerasen- Kettenreaktion (PCR).....	25
2.5.2.2	„Genomic Fingerprinting“.....	25
2.5.2.3	Sequenzierung	26
2.6	Zielsetzung.....	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Studienkohorte.....	28
3.1.2	Materialgewinnung.....	28
3.1.3	Reagenzien.....	28
3.1.4	Puffer und Lösungen	30
3.1.5	Primer.....	32
3.1.6	Geräte	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	DNA-Aufreinigung aus dem Stuhl	33
3.2.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	34

3.2.3	Agarosegel Elektrophorese	35
3.2.4	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	35
3.2.4.1	Herstellung eines denaturierenden Gradientengels	35
3.2.4.2	Nachweis komplexer Bakteriensignaturen.....	37
3.2.4.3	Identifizierung der einzelnen Spezies durch Sequenzieren.....	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Klinische Daten	39
4.2	Untersuchung der Stuhlflora, Darstellung individueller Verläufe	40
4.2.1	Analyse mittels DGGE am Beispiel von Patient IS-05.....	40
4.2.1.1	Darstellung der Befunde und Analyseergebnisse.....	41
4.2.1.2	Nachweis bakterieller DNA mittels PCR.....	42
4.2.1.3	DGGE.....	42
4.2.1.4	Sequenzanalyse	43
4.2.2	Einfluss von Pro- und Antibiotika auf die bakterielle Stuhlflora	45
4.2.3	Neugeboreneninfektionen	49
4.2.4	Zusammenfassung: Individuelle Verläufe	52
4.3	Chronologie der Besiedlung (kumulativ)	53
4.3.1	Besiedlung in den ersten Lebenswochen	53
4.3.2	Qualitativer Nachweis der Bakterienspezies	56
4.3.3	Zusammenfassung kumulativer Befunde.....	57
5	Diskussion	59
5.1	Kritische Analyse der klinischen Studie.....	59

5.2	Beurteilung der mikrobiologischen Ergebnisse	59
5.2.1	Kritische Analyse der kumulativen Ergebnisse	59
5.3	Analyse der Einzelfalldarstellung.....	60
5.3.1	Methode der PCR-DGGE am Beispiel IS-05	60
5.3.2	Einfluss durch Pro- und Antibiotika	61
5.3.2.1	Geringer Nachweis probiotischer Mikroorganismen	62
5.3.3	Neugeboreneninfektionen	64
5.4	Vergleich zu anderen Studien mit molekularen Analysetechniken	64
5.5	Limitationen	68
5.5.1	Kritische Analyse der Kolonisationsmuster	68
5.5.2	Beurteilung der Ergebnisse.....	68
5.6	Schlussfolgerung.....	70
5.7	Ausblick.....	71
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Danksagung.....	81

1 Zusammenfassungen

1.1 Abstract

Development of preterm gut flora after oral supplementation with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* (Infloran®) analysed by PCR-DGGE

Introduction: In preterm infants the risk of Necrotizing Enterocolitis (NEC) is reduced by oral probiotic supplementation. The protective effect could be associated with changes of the gut flora (direct effects) or indirect effects modulating bacterial-host-interaction at the mucosal interface or the intestinal and systemic immune system. In the present prospective exploratory study Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) a molecular culture-independent method was established to document effects of probiotic bacteria on the preterm gut flora.

Material and Methods: In the present prospective randomized cross-over study we analysed the development of the bacterial community structure in stool samples of preterm infants for the first six weeks of life. 21 preterm infants at a gestational age less than 32 weeks and with birth-weight less than 1500g were included. Groups supplemented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* (Infloran®) at weeks one to three (group A) and weeks four to six (groups B) were compared. The signatures of multiple bacterial genomes were regularly monitored in stool samples by PCR-DGGE and the specific bands were identified by subsequent sequence typing. Bacterial signatures are available of more than 300 samples (twelve patients).

Results: Bacterial DNA was not amplified in the first stool sample (meconium), except for a few patients with congenital bacterial infections. In the first weeks of life the development of an individual bacterial pattern was monitored in stool samples. We could show that the development and the composition of the predominant bacterial species in infants stool were not altered by modulation of probiotic supplementation. In both groups, the development of infants stool flora was initiated with gram-negative bacteria, followed by gram-positive cocci and a delayed colonisation of anaerobic bacteria. These results go

along with common knowledge about the preterm gut flora. Interestingly, specific bands for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* were almost not detected despite probiotic substitution.

Conclusions: PCR DGGE was established as a culture-independent, non-selective method at the Universität des Saarlandes. Despite the limitation of the few cases it may be concluded that probiotic supplementation was not associated with significant changes of preterm infants stool flora. Therefore we hypothesize that prevention of NEC might be associated with more indirect effects which still remain to be confirmed in future studies.

1.2 Zusammenfassung

Probiotikasubstitution bei Frühgeborenen: Analyse der zeitlichen Entwicklung der Stuhlflora mit PCR-DGGE

Einleitung: Bei frühgeborenen Kinder kann das Risiko der Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) durch Probiotikagabe gesenkt werden. Diese Effekte können durch Veränderung der Darmflora (direkte Effekte) oder durch indirekte, immunmodulatorische Einflüsse hervorgerufen werden. Zur Untersuchung direkter Einflüsse auf die Stuhlflora wurde als Kultur-unabhängige molekulare Methode die PCR-DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese) etabliert. Diese Methode erlaubt die nicht-selektive, qualitative Verlaufsanalyse des enteralen Mikrobioms.

Material und Methoden: In der vorliegenden, prospektiven, randomisierten Studie analysierten wir die bakterielle Zusammensetzung in Stuhlproben von Frühgeborenen mit weniger als 1500g Geburtsgewicht und unter 32 Wochen Geburtsalter in den ersten sechs Lebenswochen. Durchgeführt wurde die Studie im cross over design, was bedeutet, dass den 21 eingeschlossenen Patienten in den ersten drei (Gruppe A), bzw. von der vierten bis sechsten Lebenswoche (Gruppe B) einmal täglich eine Kapsel Infloran® (*Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis*) oral mit der Nahrung appliziert wurde. Bei zwölf Patienten wurden Signaturen multipler bakterieller Genome mittels Denaturierender Gradientengelelektrophorese (PCR-DGGE) nachgewiesen und die spezifischen Banden mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung identifiziert. Insgesamt wurden mehr als 300 Stuhlproben

von zwölf Patienten untersucht.

Ergebnisse: Aus den ersten Stuhlproben (Mekonium) konnte, abgesehen von einigen wenigen Patienten mit einer kongenitalen Infektion, keine bakterielle DNA amplifiziert werden. Die Stuhlprobenanalysen der ersten Lebenswochen zeigten individuelle bakterielle Muster. Wir konnten darstellen, dass die Chronologie und die Zusammensetzung der dominierenden bakteriellen Spezies bei kindlichen Stuhlproben nicht durch Probiotikagabe verändert wurden. In beiden Gruppen begann die Besiedlung mit gramnegativen Enterobakterien, kurz darauf gefolgt von grampositiven Kokken und einer verzögerten Kolonisierung mit Anaerobiern. Diese Befunde entsprechen dem bisher bekannten Wissen um die unreife Darmflora. Interessanterweise konnten spezifische Banden von *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis* kaum detektiert werden.

Schlussfolgerung: Mithilfe der PCR-DGGE als Kultur-unabhängiger Nachweis von Bakteriensignaturen konnte die Entwicklung des enteralen Erregerspektrums bei Frühgeborenen dargestellt und detailliert analysiert werden. Trotz der geringen untersuchten Fallzahlen zeigen die Untersuchungen, dass die probiotische Zufütterung nicht mit signifikanten Veränderungen in der Stuhlflora Frühgeborener assoziiert war. Deshalb wird postuliert, dass die Prävention der NEC durch Probiotika mit indirekten Effekten, wie beispielsweise Interaktionen an der Mukosa-Oberfläche, oder der Stimulation des Immunsystems in Zusammenhang gebracht werden kann. Diese Hypothese muss in weiterführenden Studien bestätigt werden.

2 Einleitung

2.1 Die humane Mikroflora

2.1.1 Entwicklung der enteralen Mikroflora

Bei der Geburt ist der kindliche Gastrointestinaltrakt steril. Die bakterielle Besiedlung beginnt wenige Stunden nach der Geburt und erfolgt bei spontan entbundenen, gesunden, reifen Neugeborenen zunächst mit mütterlichen Keimen des Geburtskanals (Ley 2006). Im Verlauf werden zudem auch Umweltkeime sowie Keime aus der Muttermilch und der elterlichen Flora beispielsweise durch Körperkontakt übertragen und von dem Kind aufgenommen (Morelli 2008).

Da das Darmmilieu bei Geburt ein positives Redoxpotential aufweist, sind die ersten Keime die fakultativ anaerob wachsenden *E.coli*, *Streptococci* und *Enterococci*, denen, nachdem sie das Redoxpotential erfolgreich reduziert haben, etwa ein bis drei Tage später strikt anaerobe Bakterien wie *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* und *Clostridia* folgen (Bourlioux 2003, Caicedo 2005, Johannson 2008, Mackie 1999).

In den ersten Lebenstagen ist die Flora noch von aeroben Keimen geprägt, zum Ende der ersten Lebenswoche dominieren dann zunehmend anaerobe Bakterien und die Gesamtmenge aller Bakterien beträgt bereits 10^9 colony forming units /ml (CFU/ml) (Bezirtzglou 1997). Spätestens in der zweiten Lebenswoche zeigt sich bei gesunden, nicht hospitalisierten Reifgeborenen eine individuelle Flora, dominiert von Bifidobakterien aus der Muttermilch (Magne 2005). Durch die Aufnahme von fester Nahrung wird die Mikroflora nochmals durch anaerobe Kokken wie *Peptostreptococci* und *Peptococci*, sowie *Veillonella* ergänzt (Bezirtzglou 1997).

Die kindliche Darmflora ist zunächst nicht sehr komplex, wird oft von einer taxonomischen Gruppe dominiert und weist große interindividuelle Unterschiede auf (Palmer 2007). Nach einem Jahr gleicht sich die Mikroflora eines Säuglings bereits der von Erwachsenen an und mit zwei Jahren entspricht sie im Prinzip der adulten Stuhlflora (Palmer 2007, Mackie 1999). Interessanterweise ist die kindliche Darmflora in diesem Alter der ihrer Eltern nicht mehr ähnlicher als der anderer Erwachsener (Ley 2006, Palmer 2007). Die Entwicklung der enteralen Mikroflora folgt also zeitlich definierten Mustern.

2.1.2 Mikrobiom und Mikroflora

Als Mikrobiom wird das kollektive Genom sämtlicher Bakterien im menschlichen Körper bezeichnet (Ley 2006). Es umfasst etwa zwei Millionen Gene (Caicedo 2005) und übersteigt damit die Anzahl der menschlichen Gene im Körper um mindestens zwei Zehnerpotenzen (Ley 2006, Macpherson 2004).

Der Begriff „Mikrobiota“ wurde von Savage (Savage 1977) geprägt und bezeichnet alle in einem bestimmten Kompartiment ansässigen Bakterien. Im menschlichen Darm umfasst dies 10^{13} bis 10^{14} Mikroorganismen (Caicedo 2005, Johannson 2008) aus etwa 400- 500 verschiedenen Spezies (Lievin-Le Moal 2006, Palmer 2007) und übersteigt damit die Anzahl an menschlicher Zellen im Körper um den Faktor 10 (Johannson 2008).

Der obere Gastrointestinaltrakt ist deutlich geringer besiedelt als der untere (Bezirtzglou 1997). So befinden sich im Magen aufgrund des niedrigen pH-Wertes und der kurzen Verweildauer lediglich 10^3 bis 10^5 CFU/ml (Marteau 2001). Dennoch überleben dank des schnellen Weitertransports viele Bakterien das extrem azide Milieu, sodass die bakterielle Dichte im Jejunum bereits 10^5 CFU/ml und im Ileum 10^6 bis 10^8 CFU/ml beträgt. Da im Kolon durch die sehr langsame Fortbewegung der Faeces eine wichtige Voraussetzung für bakterielles Wachstum gewährleistet ist, findet sich hier die dichteste Besiedlung mit 10^{10} bis 10^{11} CFU/ml (Bourlioux 2003).

Auch die Bakterienspezies unterscheiden sich in den Lokalisationen; die relative Menge anaerober Bakterien nimmt von oral nach aboral kontinuierlich zu. Die säurefesten *Lactobacilli*, sind aufgrund ihrer spezifischen Fähigkeit am Magenepithel zu adherieren dort auch vermehrt zu finden. Auch fakultative Anaerobier wie beispielsweise säurefeste *Streptococci* machen die im oberen Gastrointestinaltrakt residente Flora aus. Im Dünndarm finden sich zudem auch *Enterococci* sowie Anaerobier wie *Bacteroides*, *Clostridia* und *Bifidobacteria*, die im Kolon auch aufgrund des geringen Redoxpotentials (Mackie 1999) 99% der Mikroflora ausmachen (Lievin-Le Moal 2006).

Die bakterielle Kolonisation im gesunden erwachsenen Darm folgt einem bestehenden Grundmuster, das dennoch individuelle und geographische Unterschiede wie beispielsweise beim Bifidobakterium zulässt. Vorherrschende Bakterien entspringen aus den Abteilungen Firmicutes und Bacteroides (Bäckhed 2005, Ley 2006). Die prädominante Flora des Kolons besteht aus strikt anaeroben Keimen, zu denen außer den bereits genannten *Bifidobacteria*,

Clostridia und *Bacteroides* noch weitere Bakterien wie *Eubacteria*, *Ruminococci*, *Peptostreptococci*, *Butyrovibrio*, *Fusobacteria*, sowie *Peptococci* und *Atopobium* gehören. Fakultative Anaerobier wie *E.coli*, *Enterococci*, *Klebsiella*, *Lactobacilli* und *Proteus* stellen die subdominante Flora (Guarner 2003, Palmer 2007). Zudem sind gelegentlich zu finden: strikt anaerobe *Veillonella* und *Faecalibacteria* sowie fakultativ anaerobe *Propionibacteria*, *Bacilli* und *Staphylococci* (Mackie 1999).

2.1.3 Einflüsse auf die Mikroflora

Verschiedene Faktoren können auf die Entwicklung der Darmflora Einfluss nehmen. Prominente Beispiele hierfür sind zum einen die Art der zugefügten Nahrung, also Formulanahrung oder Muttermilch, der Geburtsmodus, bei dem eine spontane vaginale Entbindung der operativen Sectio caesarea gegenübersteht, sowie antibiotische Therapien. Auch Frühgeburtlichkeit und die damit verbundenen lang andauernden Krankenhausaufenthalte beeinflussen die Mikroflora des kindlichen Magen-Darm-Trakts (Westerbeek 2006).

Muttermilch enthält etwa 10^9 CFU/l, und zwar hauptsächlich *Bifidobacteria* sowie (Koagulasenegative) *Staphylococci*, *Streptococci*, *Micrococci*, *Propionibacteria*, *Corynebacteria* und *Lactobacilli* (Mackie 1999, Morelli 2008). Gestillte Säuglinge weisen daher eine Darmflora auf, die von Bifidobakterien dominiert wird, obwohl auch *Lactobacilli*, *Enterobacteria* und *Streptococci* bei diesen Kindern nachgewiesen werden können (Bezirtzoglou 1997, Gewolb 1999). Bei Kindern, die mit Formulanahrung ernährt wurden, ist eine wesentlich heterogenere Flora zu verzeichnen, die neben Bifidobakterien auch vermehrt (fakultative) Pathogene wie *Enterobacteria*, *Streptococci*, *Bacteroides*, sowie *Clostridium difficile* aufweist (Mackie 1999, Westerbeek 2006).

Bei Neugeborenen, die per Sectio caesarea entbunden wurden, ist die Besiedlung mit Anaerobiern verzögert (Bezirtzoglou 1997). Insgesamt weisen diese Kinder eine geringere Gesamtzahl an Bakterien, im Speziellen von *Bacteroides* und *Bifidobacteria* auf (Bezirtzoglou 1997, Martin 2008, Morelli 2008). Auch Antibiotika führen zu einer Reduktion der Gesamtmenge an kolonisierenden Bakterien. Insbesondere betroffen sind hiervon je nach Medikament *Lactobacilli*, die sehr sensibel auf Antibiotika reagieren, aber auch andere, zum Teil fakultativ pathogene Keime wie beispielsweise *Clostridia*, können durch Antibiotikagabe reduziert werden (Blakey 1982, Magne 2005).

Frühgeburtlichkeit besteht per definitionem bei einem Entbindungstermin vor der 37+0

Schwangerschaftswoche. Aufgrund körperlicher Unreife kommt es bei Frühgeborenen häufig zu Komplikationen, beginnend bei respiratorischen Anpassungsstörungen bis hin zu intrakraniellen Ventrikelblutungen, die oftmals schwerwiegende Langzeitschäden zur Folge haben.

Auch die Entwicklung der Darmflora ist durch die Frühgeburtlichkeit beeinträchtigt, da zum einen der Gastrointestinaltrakt noch unreif und somit vulnerabel gegenüber Pathogenen ist und zum anderen Frühgeborene oft für lange Zeit hospitalisiert sind, im Rahmen einer intensivmedizinischen Betreuung antibiotische Therapien erhalten und somit Hospitalkeimen einschließlich multiresistenten Erregern exponiert sind. Diese Faktoren können die Darmflora negativ beeinflussen und führen zu einer verzögerten Besiedlung bzw. zu einer Fehlbesiedlung des Darmes. Die noch unreifen Zellen des Darmepithels tendieren zu überschießenden Immun- und Entzündungsreaktionen. Zudem können durch ihre unvollständige Mukussekretion nicht schnell genug Toxine aus dem Lumen ausgeschwemmt werden (Claud 2008, Schnabl 2008). Die eingeschränkte Darmmotilität und Verdauung sorgt für eine längere Verweildauer von Pathogenen und unvollständig zersetzten Nahrungsbestandteilen und birgt folglich die Gefahr der bakteriellen Überwucherung (Claud 2008, Schnabl 2008). Strukturelle Unreife der Epithelbarriere fördert ebenfalls die Translokation pathogener Mikroorganismen (Caicedo 2005).

Die Mikroflora von Frühgeborenen ist im Vergleich zu der von reifen Neugeborenen wenig untersucht. Dennoch weisen aktuelle Studien auf eine geringere Vielfalt der Keimflora (Magne 2005, Martin 2008) und Verzögerung der Kolonisation insbesondere mit *Bifidobacteria* und anderen Anaerobiern hin (Caicedo 2005, Gewolb 1999). Direkt nach der Geburt treten frühzeitig grampositive Keime wie beispielsweise *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus hämolyticus* auf. Zudem erfolgt ebenfalls frühzeitig in den ersten Lebenswochen eine Besiedlung mit gramnegativen fakultativ-pathogenen Keimen wie *Klebsiella* und *E.coli*, während protektive Keime wie beispielsweise *Lactobacilli* erst sehr verzögert auftreten. Auch *Clostridia* und *Bacteroides* werden in diesem Zeitraum gelegentlich nachgewiesen (Magne 2005, Westerbeek 2006). *Enterococci* wie *E. faecalis* sind in der zweiten bis vierten Woche ebenfalls in deutlich höheren Mengen als bei Reifgeborenen vorhanden. Durch das Fehlen von protektiven Bifidobakterien sind auch die immunmodulatorischen Möglichkeiten im Gastrointestinaltrakt Frühgeborener eingeschränkt (Claud 2008).

Zusammenfassend wird postuliert, dass durch die unreifen Epithelzellen, der eingeschränkten Motilität, einer erhöhten Permeabilität der Mukosa (Blakey 1982) und der verspäteten Besiedlung mit protektiven Keimen eine Prädisposition für die enterale Fehlbesiedlung mit (fakulta-

tiv) pathogenen Bakterien geschaffen wird (Caicedo 2005), die bei Frühgeborenen schwerwiegende Entzündungen wie die Nekrotisierende Enterokolitiden (NEC) zur Folge haben kann.

2.2 Gastrointestinale Immunität

2.2.1 Aufbau des Gastrointestinaltrakts

Der Gastrointestinaltrakt bewältigt im Rahmen der Verdauung vielfältige Aufgaben, wie beispielsweise Sekretion verschiedener Hormone, Aufnahme von lebenswichtigen Stoffen und Vitaminen, sowie die Etablierung des Immunsystems zum Schutz vor pathogenen Keimen.

Der histologische Aufbau folgt einem einheitlichen Grundkonzept, ist jedoch je nach Abschnitt der jeweiligen Funktion angepasst. Das Lumen wird von einer einreihigen Schicht aus zylindrischem Epithel, der *Lamina epithelialis mucosae* begrenzt. Darunter liegt eine Schicht lockeren Bindegewebes, die *Lamina propria mucosae*, in dem Kapillaren sowie das intrinsische Nervensystem enthalten sind. Sie wird durch eine dünne Muskelschicht, der *Lamina muscularis mucosae* von der Submukosa, einer weiteren Bindegewebsschicht getrennt. Abschließend liegt die *Muscularis externa*, die aus einer Längs- und einer Ringmuskulatur-schicht besteht und für die peristaltischen Bewegungen des Darms zuständig ist (Klinke 2005).

Die Epithelschicht ist zur Absorption und Sekretion von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser wichtig und braucht zu diesem Zweck eine möglichst große Oberfläche. Um die Gesamtoberfläche von 200- 300m² (Bourlioux 2003) zu erreichen, werden unterschiedliche Mechanismen eingesetzt. Im oberen Gastrointestinaltrakt bildet die Darmschleimhaut zirkuläre Kerkring-Falten (*plicae circulares*), sowie Krypten und Zotten, während im Bereich des Kolons die Oberflächenvergrößerung beinahe ausschließlich durch die Ausbildung von Krypten ermöglicht wird.

In der Epithelschicht befinden sich vier verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben: Enterozyten, Becherzellen, endokrine Zellen und Paneth-Zellen. Drei der Zelllinien entstehen aus pluripotenten Stammzellen am Boden der Krypten und wandern in ein bis zwei Tagen in Richtung Zottenspitze. Hierzu gehören die absorbierenden Enterozyten, deren luminaler Seite ein Bürstensaum aus Mikrovilli zum Schutz vor Adhäsion pathogener Keime aufsitzt. Die Becherzellen bilden Muzine, aus denen der schützende Mukus gebildet wird, der die

Epithelschicht von Innen auskleidet. Endokrine Zellen sind für die Sekretion von Verdauungshormonen zuständig. Die Paneth-Zellen, die am Boden der Krypten zu finden sind und nicht aus den Stammzellen entspringen, spielen eine bedeutende Rolle in der Immunantwort und Infektabwehr (Klinke 2005). Durch sogenannte tight junctions (TJ), adherent junctions (AJ) und Desmosomen werden Zellverbände gebildet, die eine kontrollierte, parazelluläre semipermeable Diffusion und Zell-Zell-Kontakte gewährleisten (Lievin-Le Moal 2006). Zwei Komponenten, mit denen diese komplexen Zellverbände kontinuierlich interagieren, sind Nahrungsbestandteile und die Mikroflora (Bourlioux 2003, Caicedo 2005).

2.2.2 Komponenten der Abwehr

Die Abwehr gegen pathogene Keime im Gastrointestinaltrakt basiert hauptsächlich auf drei Komponenten (Bourlioux 2003). Die epitheliale Barriere wird gebildet durch die Produktion einer schützenden Muzinschicht und antimikrobiellen Substanzen. Die Mikroflora erfüllt ihre Abwehrfunktion unter anderem durch Konkurrenz mit Pathogenen sowie der Ausbildung von pathogen-schädigenden Substanzen (z.B. antimikrobielle Peptide, Bakteriozine) und der Stimulation des gastrointestinalen Immunsystems. Dieses wiederum bildet den dritten Teil der Abwehr und verfügt über spezifische Mechanismen zur Aktivierung der angeborenen und erworbenen Immunabwehr sowie zur Differenzierung zwischen Mikroflora und Pathogenen.

2.2.2.1 Epitheliale Barriere

Die epitheliale Barriere hat verschiedene Funktionen. Die mechanische Abwehr erfolgt hauptsächlich über Mikrovilli auf Enterozyten und Becherzellen. Diese produzieren Muzine, insbesondere Muc2, aus denen eine Mukusschicht gebildet wird, die eine wichtige physikalische Barriere darstellt (Lievin-Le Moal 2006). Die schützende Schleimschicht besteht aus zwei Lagen unterschiedlicher Konsistenz und Beschaffenheit (Johannson 2008, Matsuo 1997): Eine eher unbewegliche, durch membranständige Muzine am Darmepithel festheftende (Lievin-Le Moal 2006), etwa 100µm dicke Schicht, in der sich keine Bakterien befinden und eine mit 50µm etwas dünnere, diskontinuierliche, frei über die innere Schicht fließende äußere Lage, in der sich sehr viele Keime, insbesondere die der residenten Flora befinden. Da beide Lagen als Hauptbestandteil das Peptid Mucin aufweisen wurde postuliert (Johannson 2008), dass die äußere Muzinschicht aus der Inneren gebildet und durch Proteolyse wasserlöslich und für Bakterien permeabler gemacht wird. Aufgrund der hohen Dichte der inneren Schicht und deren Hydrophobie wird ein Durchdringen der Bakterien bis zur Epithelschicht bei gesunden Menschen verhindert, sodass kaum Keime in der tiefen Mukusschicht zu finden sind

(Bourlioux 2003). Bei Muc2-negativen Mäusen konnte jedoch ein direkter Zellkontakt mit Pathogenen beobachtet werden (Johannson 2008).

Tief in den Krypten befinden sich pyramidenförmige exokrine Paneth-Zellen. Von ihnen werden unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich sogenannte antimikrobielle Peptide (AMP) produziert, die in der unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Bisher konnten u.a. Cathelicidine und Defensine als zwei wichtige Familien identifiziert werden. AMP verfügen über eine große Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum an Pathogenen von gramnegativen und grampositiven Bakterien über Fungi und Protozoen bis hin zu ummantelten Viren (Lievin-Le Moal 2006). In Zusammenarbeit mit ebenfalls sezernierten antimikrobiellen Molekülen wie beispielsweise Lysozymen wirken die AMP durch Zerstörung von pathogener Zellmembran mittels Porenbildung, Veränderung des chemischen Gradienten, Reduktion der Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen und Zellwand sowie Hemmung der enzymatischen Aktivität.

2.2.2.2 Gastrointestinale Immunabwehr und Mikroflora

Eine weitere Komponente der gastrointestinalen Pathogenabwehr besteht aus dem lokalen Immunsystem, hauptsächlich geprägt durch das mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), der Zusammenlagerung von Lymphfollikeln zu Peyer'schen Plaques mit M-Zellen, sowie dendritischen und Paneth-Zellen.

Das angeborene Immunsystem bietet die Möglichkeit rasch und unspezifisch auf Pathogene zu reagieren und umfasst die Immunantwort mit AMP, Zytokinen und Chemokinen, die wiederum Leukozyten, weitere Immunzellen sowie das spezifische Immunsystem aktivieren. Dieses reagiert in der Regel erst nach einigen Tagen und beinhaltet die Ausbildung von Memory Zellen und spezifischen T- und B-Zellen (Lievin-Le Moal 2006).

Dringen Pathogene in den Gastrointestinaltrakt ein, muss das Immunsystem reagieren. Zum besseren Verständnis der Immunantwort wird zunächst auf die Mechanismen der Pathogeninteraktion eingegangen.

Darmpathogene vermehren sich unter Beeinträchtigung des Wirts und der protektiven Bakterien (Ley 2006). Sie können sowohl eine infektiöse oder toxische als auch selten eine kanzerogene Wirkung haben. Zu den pathogenen Keimen zählen unter anderem *Clostridia*, *Staphylococci*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, und *Proteus*. Potentielle Pathogene sind oft bereits in der normalen Darmflora enthalten und erst ab einer großen Keimzahl krankheitsauslösend. Zu

ihnen gehören *Enterobacteria (E.coli)*, *Enterococci*, *Streptococci* und *Bacteroides*. Protektive Keime sind hauptsächlich *Bifidobacteria* und *Lactobacilli*.

Der erste Schritt der klinisch relevanten Infektion beginnt in der Regel mit der Adhäsion am Bürstensaum der Epithelzellen. Diese wird oftmals durch die Sekretion von Virulenzfaktoren unterstützt (Lievin-Le Moal 2006, Magalhaes 2007). Voraussetzung für die Pathogenese ist meist das Durchdringen der Mukosa, die sogenannte Translokation, und die freie Bewegung zwischen und innerhalb der Zellen, um sich schließlich in einer geeigneten Nische einzunisten und zu vermehren (Guarner 2003, Lievin-Le Moal 2006). Verschiedene Organismen haben hierfür unterschiedliche Methoden entwickelt. *Entamoeba histolytica* beispielsweise sezerniert spezifische Zysteinproteasen, die die innere Mukusschicht zerstören (Johansson 2008). Das Cholera-Toxin bindet mit einer hohen Affinität an Rezeptoren der Becherzellen und sorgt so für eine massive Muzinausschüttung, während das Toxin A des *Clostridium difficile* ebenso wie *Helicobacter pylori* die Muzinsekretion herabsenken können (Lievin-Le Moal 2006).

Um auf derlei Angriffe zu reagieren, ist das Darmepithel mit spezifischen Rezeptoren, sogenannten pattern recognition molecules (PRM), ausgestattet und dadurch in der Lage, Pathogene frühzeitig zu identifizieren. Zwei wichtige Rezeptorfamilien sind hervorzuheben: die vorwiegend extrazellulären, ins Lumen ragenden toll-like receptors (TLR) und die intrazellulären nod-like receptors (NLR) (Lievin-Le Moal 2006). Interagieren diese nun mit einem Pathogen, wird über second-messenger Signalkaskaden (meist NFκB) das spezifische und unspezifische Immunsystem aktiviert, welches anschließend zu einer Entzündungsreaktion führt. Auch sogenannte „danger signals“, ausgelöst durch absterbende Zellen, werden registriert und können eine Immunantwort hervorrufen.

Damit jedoch nicht auch die residente Mikroflora eine solche massive Entzündungsreaktion hervorruft, können die Rezeptoren zwischen pathogenen und protektiven Keimen differenzieren indem sie pathogen-associated molecular pattern (PAMP) und microbe-associated molecular pattern (MAMP) erkennen und unterscheiden (Lievin-Le Moal 2006, Magalhaes 2007). Zudem hat die residente Flora eine immunsuppressive und immunedukative Wirkung. *Lactobacilli* sind beispielsweise in der Lage, über die Stimulation des zentralen Inhibitors IκBα die Aktivierung von NFκB zu unterdrücken, sowie - ähnlich dem *Bacteroides thetaiotaomicron* - die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-8 herabzuregulieren. Dies schützt den Gastrointestinaltrakt vor überschießenden Immunreaktionen gegenüber seiner Symbionten in der Mikroflora (Lievin-Le Moal 2006, Magalhaes 2007).

Die Mikroflora spielt für den Gastrointestinaltrakt unter anderem in der Immunabwehr und im Bereich der Verdauung eine wichtige Rolle. Nahrungsbestandteile können Größtenteils unterstützt durch humane Verdauungsenzyme, Hormone und Magensäure absorbiert werden. Die Verarbeitung von für den Menschen unverdaulichen Stoffen, wie beispielsweise bestimmte komplexere Zucker, Alkohole und Fasern aus der Nahrung sowie Mukus und abgestorbene Zellen des Wirts, wird von der Mikroflora übernommen (Guarner 2003). Insbesondere bei der Lipolyse und Proteolyse sowie bei der Synthese von kurzkettigen Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen ist der Mensch auf die Unterstützung der residenten Flora angewiesen (Bourlioux 2003, Penders 2006). So fehlen beispielsweise viele Enzyme zur Fermentation von Glykanen zu kurzkettigen Fettsäuren (Magalhaes 2007), die wiederum trophische Effekte auf das Darmepithel ausüben (Guarner 2003). Auch die Angiogenese im Dünndarm wird insbesondere durch *B. thetaiotaomicron* und den Paneth-Zellen stimuliert. Unter anderem konnte in keimfreien Mäusen gezeigt werden, dass die Angiogenese eingeschränkt und erst nach vollständiger bakterieller Besiedlung weiter fortgesetzt wurde (Stappenbeck 2002).

Eine weitere wichtige Funktion nimmt die Mikroflora im Bereich der Immunabwehr ein. Zum einen konkurriert sie mit Pathogenen um Nahrung und Rezeptoren am Darmepithel und besetzt und schützt somit die Epithelzellen (Rastall 2004). Zum anderen werden inhibitorische Metaboliten produziert und ein saures Milieu geschaffen, um somit die Pathogenkolonisation einzuschränken (Bourlioux 2003, Guarner 2003). Weiterhin produzieren sie antimikrobielle Substanzen, sogenannte Bakteriozine (Guarner 2003). Exemplarisch hierfür sind zu nennen *Bifidobacteria* und *Lactobacilli*, die einen besonderen antimikrobiellen Effekt beispielsweise durch eine erhöhte Mukussekretion auf *Salmonella enterica*, *E.coli* und andere darmpathogene Keime haben (Lievin-Le Moal 2006, Rastall 2004, Westerbeek 2006). Auch *Ruminococci* haben ein System entwickelt, indem sie Ruminococcin A zur Abwehr von Clostridien produzieren (Morelli 2008), die auch durch *Peptostreptococci* inhibiert werden können.

Besonders wichtig ist die mikrobielle Stimulation des Darms zur Ausbildung eines funktionierenden Immunsystems. Erst durch den postnatalen Kontakt des Darmepithels mit residenter Bakterienflora kann das gastrointestinale Immunsystem ausgebildet werden und reifen. So sind beispielsweise in keimfreien Mäusen nicht nur die Payer'schen Plaques und die Zahl der muzin-produzierenden Becherzellen vermindert, sondern auch andere Immunorgane wie die Milz und Lymphknoten sind in ihrer Architektur und Funktion gestört (Lievin-Le Moal 2006, Macpherson 2004).

Um diese protektiven Funktionen von Bakterien zu nutzen werden sogenannte Probiotika eingesetzt, also Präparate, in denen entsprechende Mikroorganismen enthalten sind.

2.3 Nekrotisierende Enterocolitis (NEC)

2.3.1 Definition

Die Nekrotisierende Enterokolitis ist eine der häufigsten gastroenterologischen Notfälle im Neugeborenenalter und bezeichnet eine entzündliche, nekrotische Veränderungen der Darmschleimhaut im Kolon oder terminalen Ileum (Schmolzer 2006, Schnabl 2008) mit hoher Mortalität (15%-30%) (Ladd 2009, Lin PW 2006) und Langzeitmorbidity. Betroffen sind meist Frühgeborene und von diesen wiederum insbesondere jene mit weniger als 1000g Geburtsgewicht, bzw. unter 28 Wochen Gestationsalter (Deshpande 2007, Schnabl 2008, Szajewska 2010).

2.3.2 Symptome und Diagnostik

Gekennzeichnet ist die NEC durch verschiedene klinische Symptome und radiologische Auffälligkeiten. Meist beginnt sie akut oder subakut (Schnabl 2008) im Laufe der zweiten Lebenswoche, also zu einem Zeitpunkt, zu welchem Erstkomplikationen der Frühgeburtlichkeit häufig bereits kontrolliert werden konnten (Schmolzer 2006). Gastrointestinale Symptome wie Durchfall, das Absetzen blutiger Stühle, Hämatochezia, ein geblähtes Abdomen, abdominale Erythema und Nahrungsintoleranz, aber auch systemische, septische Zeichen wie Respirations- und Zirkulationsstörungen, Reduktion des Allgemeinzustandes und Apathie zeigen das Ausmaß möglicher Symptome (Claud 2008, Lin PW 2006, Schmolzer 2006). Bei etwa einem Drittel der Fälle kommt es zur Darmperforation (AlFaleh 2010), die die massive Gefahr einer Sepsis und Peritonitis bis hin zum septischen Schock mit Todesfolge birgt.

Ein sonografisch und radiologisch wichtiger Befund ist die sogenannte Pneumatosis intestinalis, die auf intramurale Gasansammlungen in der Darmwand hinweist und vermutlich durch bakterielle Fermentation intraluminaler Substrate entsteht (Hoy 1990). Ebenfalls radiologisch und sonografisch lassen sich Gas im Portalvenensystem (Lin PW 2006, Santulli 1975), dilatierte Darmschlingen, Ileus und Subileus darstellen (Ladd 2009). Laborparameter sind eher unspezifisch und zeigen unter anderem erhöhte IL-8 Werte, Thrombozytopenie, Neutropenie, Hyperglykämie sowie eine metabolische Azidose (Lin PW 2006, Schnabl 2008). Der histopathologische Befund weist je nach Ausmaß und Fortschreiten der Erkrankung im gesamten

Gastrointestinaltrakt nekrotische Läsionen und Blutungen mit Prädominanz im terminalen Ileum und Kolon auf (Santulli 1975, Schnabl 2008). Klassifiziert wurde die NEC bereits im Jahre 1978 von Bell et al. (aus: Lin PW 2006). Sie reicht von Stadium IA bis IIIB, wobei Stadium I die vermutete Krankheit, Stadium II die definitive, radiologisch Nachgewiesene und Stadium III ein bereits gefährlich weit fortgeschrittenes Krankheitsbild mit der Gefahr der Perforation bezeichnet (Lin PW 2006).

2.3.3 Pathogenese

Es wird von einer multifaktoriellen Pathogenese ausgegangen, zu deren Risikofaktoren Frühgeburtlichkeit, geringes Geburtsgewicht, bakterielle Fehlbesiedlung, Formulanahrung und genetische Faktoren zählen (Bin-Nun 2006, Lin 2008, Szajewska 2010). Beispielsweise weisen Kinder mit schwarzer Hautfarbe ein erhöhtes Risiko auf, während das Geschlecht keine Rolle zu spielen scheint (Holman 1997). Da die NEC nicht bereits in utero auftritt (Ladd 2009, Lin 2005) wird angenommen, dass postnatale Faktoren wie z.B. die Fehlbesiedlung des bei Geburt sterilen Darms beispielsweise mit *Clostridia*, *Enterobacteria*, koagulasenegativen Streptokokken und Rotaviren an der Pathogenese beteiligt ist (Peter 1999). Diese Keime wurden überzufällig häufig im Zusammenhang mit NEC nachgewiesen, dennoch konnte bislang kein spezifischer, krankheitsauslösender Keim identifiziert werden (Magne 2005, Schnabl 2008). Darmischämien, die durch das instabile Herz-Kreislauf-System Frühgeborener und deren noch unreifer Fähigkeit, den vaskulären Widerstand zu regulieren (Schnabl 2008) zustande kommen, sind ebenfalls an der Pathogenese beteiligt: Die mangelnde Blutversorgung führt zu einer Störung der Schleimhautbarriere und im Folgenden über Entzündungen zu nekrotischen Läsionen, in denen wiederum für Pathogene die Möglichkeit der bakteriellen Überwucherung und Translokation besteht (Schmolzer 2006). Anschließend kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion, die eine massive Entzündung hervorruft (Schanler 2006). Zudem besteht die Hypothese, dass ein weiterer pathogenetischer Faktor der NEC in einer exzessiv erhöhten Apoptoserate der Epithelzellen besteht, sodass ein vermehrter Zelluntergang und folglich Gewebeschäden der Darmschleimhaut zu erkennen sind (Lin PW 2008). Weiterhin sind endemische Häufungen zu vermuten, da in manchen Kliniken und Gebieten beinahe keine NEC auftritt, während andere überdurchschnittlich viele NEC-Fälle vorweisen (AlFaleh 2010, Martin 2008).

2.3.4 Therapeutische Ansätze

Aufgrund der multifaktoriellen Ursache der Erkrankung ist die Therapie vorwiegend symptomatisch. Eine breite antibiotische Behandlung (Ladd 2009), ausschließlich parenterale Ernährung, engmaschige Überwachung klinischer und laborchemischer Parameter sowie im Stadium III Unterstützung der Atmung und des Herz-Kreislaufsystems, sind unter anderem Bestandteil der Interventionen (Ladd 2009, Lin PW 2006, Schnabl 2008). Trotz intensiver konservativer Maßnahmen muss bei etwa 20% bis 40% der kleinen Patientinnen und Patienten chirurgisch interveniert werden. Die Letalität bei Diesen liegt dennoch bei etwa 50% (Lin PW 2006). Langzeitfolgen, wie das Kurzdarmsyndrom und Darmstrikturen finden sich bei etwa einem Viertel bis einem Drittel der Kinder (AlFaleh 2010, Schanler 2006). Weitere komplexe Folgen sind unter anderem neurologische Defizite, Kleinwüchsigkeit und Schwerhörigkeit (Lin PW 2006).

Um diese Erkrankung, die bis zu 10% aller Frühgeborenen befallen kann (Lin 2008), gar nicht erst auftreten zu lassen, gibt es verschiedene Präventionsmaßnahmen. Da von den genannten Risikofaktoren lediglich der Nahrungsaufbau beeinflussbar ist, setzen hier die meisten Interventionen an. Es wird ein gemäßigter, aber stetiger Nahrungsaufbau mit Muttermilch angestrebt, da diese ausgesprochen protektive Substanzen beinhaltet und eine bis zu zehnfache Risikoreduktion in Bezug auf NEC aufweist. Der Nahrungsaufbau sollte jedoch vorsichtig erfolgen, da frühzeitige Nahrungsaufnahme einerseits vor Darmatrophien schützen soll (Schnabl 2008), andererseits eine zu rasche Steigerung einen Risikofaktor für NEC darstellt (Lin PW 2006). Weiterhin haben sich je nach Klinik Maßnahmen wie pränatale Steroidgabe, Nahrungsergänzung mit trophischen Zusätzen, IgA- und präventive Antibiotikagabe etabliert (Lin PW 2006, Schnabl 2008).

Seit einiger Zeit werden zunehmend auch Pre- und Probiotika zur NEC-Prävention eingesetzt, die als Vertreter der protektiven Darmkeime durch verschiedene Mechanismen die Abwehr des Darms gegen Pathogene unterstützen und somit vor NEC schützen. Diese sind gegenwärtig Bestandteil intensiver Forschungen und Thema der vorliegenden Arbeit.

2.4 Prebiotika und Probiotika

2.4.1 Prebiotika

Prebiotika sind definiert als für den Menschen unverdauliche Nahrungsbestandteile, die selek-

tiv das Wachstum protektiver, probiotischer Bakterien fördern (Gibson 1995, Magne 2005). Neben dem prominentesten Vertreter der Fructooligosaccharose (Gibson 1995, Szajewska 2010) gehören auch Lactulose, Inulin und andere Oligosaccharide zu den Prebiotika (Rastall 2004). Natürlicherweise werden sie von Neugeborenen über die Muttermilch aufgenommen (Szajewska 2010). Auch Formulanahrung wird mit prebiotischen Zusätzen ergänzt, um eine möglichst muttermilch-ähnliche Zusammensetzung zu gewährleisten. Prebiotika können sowohl zur NEC-Prävention bei Risikopatienten, als auch zur Verhinderung anderer Erkrankungen eingesetzt werden.

Unselektive Prebiotika, sogenannte „colonic food“, sind natürlicherweise im Darm vorkommende Nahrungsbestandteile von Bakterien (Gibson 1995). Prebiotika sollten selektiv sein, das bedeutet, dass sie hauptsächlich von protektiven Keimen wie *Bifidobacteria* aber auch *Lactobacilli* oder *Ruminococci* (Gibson 1995) metabolisiert werden und folglich für diese ein wachstumsförderndes Klima schaffen. Dadurch entstehen vermehrt für den Menschen wichtige metabolische Endprodukte wie beispielsweise kurzkettige Fettsäuren, aber auch die Vitamin- und Elektrolytaufnahme kann durch Prebiotikaeinnahme indirekt gefördert werden (Gibson 1995, Schanler 2006). Weitestgehend entsprechen prebiotische Effekte denen der protektiven Mikroflora: Auch durch sie wird der pH-Wert gesenkt, Adhäsion pathogener Keime abgewehrt und eine überschießende Immunreaktion abgeschwächt (Mackie 1999, Srinivasjois 2009). Zudem sollte ein Prebiotikum nicht bereits im oberen Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, sondern erst im Kolon, um hier die angestrebten positiven Effekte hervorzurufen (Gibson 1995). Insbesondere Fructooligosaccharide fördern das Wachstum von *Bifidobacteria* (Magne 2005, Millar 2003).

2.4.2 Probiotika

Das Wort „Probiotikum“ kommt aus dem griechischen und bedeutet „für das Leben“ (Schmolzer 2006). Definiert werden Probiotika nach der von Fuller et al. (Fuller 1989) geprägten, aktuellen WHO-Definition von 2001 als „*live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host*“ (Salminen 2010, WHO/FAO 2001). Probiotika gehören aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln nicht zu den Medikamenten, sondern fallen in die Gruppe der Nahrungsergänzungsmittel (Bourlioux 2003). Sie entsprechen in der Regel protektiven Keimen der adulten Darmflora. Das bedeutet, dass vorwiegend Bakterien der *Bifidobacteria* (*B.infantis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.longum*, *B.lactis*), der *Lactobacilli* (*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.rhamnosus*

GG), aber auch *Streptococci* (*S.salivarius* subsp. *thermophilus*, *S.lactis*) und das Hefepräparat *Saccharomyces boulardii* eingesetzt werden (Guthmann 2010). Einzig untersuchtes, in dem humanen Keimspektrum vorkommendes, fakultativ anaerobes Probiotikum bisher ist das *E.coli nissle* (Magne 2005). Bei frühgeborenen Kindern verabreicht man aktuell bevorzugt die Gruppe der Bifidobakterien, Laktobazillen und Prebiotika, die sowohl als Einzel- als auch als Kombinationspräparate eingesetzt werden (Guthmann 2010). Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Präparat Infloran® enthält pro Kapsel mindestens 10^9 lebende Keime *Lactobacillus acidophilus* und mindestens 10^9 lebende Keime *Bifidobacterium infantis*.

2.4.2.1 Wirkmechanismen

Probiotische Wirkungen auf die intestinale Flora Frühgeborener sollen die protektiven Effekte der gesunden Mikroflora imitieren. Bei diesen Patienten wird, der zugrunde liegenden Hypothese folgend, die bakterielle Fehlbesiedlung zu einer Prädominanz von Bifidobakterien verändert und somit konsekutiv die Gefahr der NEC verringert, indem probiotische Präparate eingesetzt werden. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass nach Verabreichung dieser Mikroorganismen protektive klinische Effekte erkennbar sind (Bin-Nun 2006, Dani 2002, Lin HC 2005, Lin HC 2008). So ist nach Probiotikagabe eine Tendenz zu vermehrter Kolonisation mit protektiven, einer geringeren Kolonisation mit pathogenen und antibiotikaresistenten Keimen, einer geringeren Anzahl rezidivierender gastrointestinaler Infekte (Millar 2003) und vor allem eine geringere NEC-Rate zu verzeichnen als bei Frühgeborenen, die diese Zusätze nicht bekommen haben. Genaue mikrobiologische Wirkmechanismen konnten bisher aber nicht identifiziert werden.

Auch die immunologischen Effekte der intestinalen Abwehr sollen unterstützt werden. Es wird davon ausgegangen, dass Probiotika die Produktion antimikrobieller Substanzen wie IgA induzieren, mit Pathogenen um Adhäsionsstellen konkurrieren, die Zellverbände und „tight junctions“ stärken, die Permeabilität der Darmschleimhaut reduzieren und somit eine bakterielle Translokation und Überwucherung der Darmschleimhaut mit pathogenen Keimen verhindern (Gibson 1995, Lin PW 2008, Martin 2008, Salminen 2010). Zudem deuten viele Untersuchungen auf immunsuppressive Effekte durch Produktion antiinflammatorischer Zytokine (Lin PW 2008, Millar 2003, Schnabl 2008), Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 (Lievin-Le Moal 2006), Ausbildung des antiinflammatorischen PRMs CD 14 (Neu 2005) und Inhibition des NFκB Signalwegs (Rougé 2009) hin, sowie auf das Verhindern einer überschießenden Entzündungsreaktion. Die Senkung des luminalen pH-Werts erfolgt durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren und starker Säuren, die neben Vitaminen als

metabolische Endprodukte gelten (Gibson 1995). Weitere Effekte sind vermutlich die Entfernung von Schwermetallen (Salminen 2010), Reduktion der Apoptoserate durch Genstimulation (Lin PW 2008), Erhöhung der Motilität und Verkürzung der Magenentleerungszeit (Braga 2011).

Probiotika müssen verschiedene Bedingungen erfüllen, um als solche eingesetzt zu werden. Sie sollten, ebenso wie die Prebiotika, nicht bereits im oberen Gastrointestinaltrakt zersetzt werden. Deshalb sind unter anderem *Lactobacilli* beliebte probiotische Bakterien, da diese sehr säureresistent gegenüber Magen- und Gallensäuren sind (Hammermann 2006). Des Weiteren sollte es möglich sein, Probiotika in großen Mengen lebend zu verpacken, ohne dass diese während der Lagerung absterben. Sie sollten unschädlich sein und lange genug im Gastrointestinaltrakt überleben und kolonisieren, um ihre vorteilhaften Effekte auf den Wirt zu entfalten (Gibson 1995, Martin 2008).

2.4.2.2 Probiotika zur NEC-Prävention bei Frühgeborenen

In die Studie von Bin-Nun et al. wurden 145 frühgeborene Kinder mit weniger als 1500g Geburtsgewicht eingeschlossen. Nach Therapieprotokoll erfolgte die Gabe des probiotischen Präparats ABC Dophilus® ($0,35 \times 10^9$ CFU *Bifidobacterium infantis*, $0,35 \times 10^9$ CFU *Streptococcus thermophilus*, $0,35 \times 10^9$ CFU *Bifidobacterium bifidum*) in Muttermilch oder Formulanahrung bzw. in der Placebogruppe nur Muttermilch oder Formulanahrung einmal täglich vom ersten Lebenstag bis zur (korrigierten) 36. Schwangerschaftswoche. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Reduktion der NEC-Rate in der Probiotika Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (3/72 [4%] versus 12/73 [16,4%]). Auch der Schweregrad der NEC konnte durch Probiotikagabe reduziert werden.

Die Studie von Dani et al. wurde in zwölf Intensivstationen durchgeführt und schloss 585 Frühgeborene mit einem Geburtsalter unter 33 Wochen und einem Geburtsgewicht von weniger als 1500g ein. Als Probiotikum wurde Dicloflor® (*Lactobacillus rhamnosus GG* 6×10^9 CFU) plus Muttermilch oder Formulanahrung bzw. in der Kontrollgruppe Placebo mit Muttermilch oder Formulanahrung vom ersten Lebenstag bis zur Entlassung einmal täglich verabreicht. Untersucht wurden die Kinder in Bezug auf Sepsis, NEC und Harnwegsinfekte. Insgesamt war die Inzidenz dieser Erkrankungen gering und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dennoch wurde in der Probiotika Gruppe eine Tendenz zur Verzögerung des Krankheitsbeginns beobachtet.

Bei den Studien von Lin et al. aus den Jahren 2005 und 2008 wurden 260 bzw. 434 frühgeborene Kinder mit weniger als 1500g Geburtsgewicht und 2008 als zusätzliches Kriterium unter 33 Wochen Gestationsalter in die Studie eingeschlossen. Die aktuellere und größere Studie von beiden war zudem eine mulizentrische Studie, die in sieben neonatalen Intensivstationen (NICU) Level III durchgeführt wurde. In dieser Studie bekamen die Patienten Infloran® mit Muttermilch oder Formula bzw. nur Muttermilch oder Formula verabreicht, während 2005 noch keine Formulanahrung eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung des Präparats wurde von 2005 (*Lactobacillus acidophilus* 1×10^6 CFU und *Bifidobacterium infantis* 1×10^6 CFU) zum Jahre 2008 verändert (*Lactobacillus acidophilus* 1×10^6 CFU und *Bifidobacterium bifidum* 1×10^6 CFU). Nach Therapieprotokoll wurden Probiotika und Placebo zweimal täglich von Tag sieben bis zur Entlassung bzw. 2008 insgesamt für sechs Wochen verabreicht. In beiden Studien konnte eine signifikante Reduktion der NEC-Rate, sowie ein geringerer Schweregrad der NEC in der Probiotikagruppe nachgewiesen werden (NEC II 2005 in der Studiengruppe 2/180 [1,1%] versus 10/187 [5,3%] in der Placebogruppe, NEC II 2008 in der Studiengruppe 4/217 [1,84%] versus 20/217 [9,22%] in der Placebogruppe). 2005 traten in der Placebogruppe bei sechs Patienten NEC im Stadium III auf, während in der Probiotikagruppe kein NEC III-Fall nachweisbar war und zudem eine Reduktion der Sepsisrate nachgewiesen wurde. 2008 konnte außerdem eine geringere Todesrate durch NEC in der Probiotikagruppe gefunden werden (Lin 2005).

Nebenwirkungen der probiotischen Therapie wurden in keiner der Studien beobachtet (Guthmann 2010). Die vier vorgestellten Studien zeigen die Spannweite an Therapieprotokollen und Ergebnissen auf. Bezüglich der Ergebnisse muss festgehalten werden, dass sich im Laufe der vergangenen zwanzig Jahre zahlreiche Studien mit dem Thema Pro- und Prebiotika beschäftigt haben, von denen die Mehrheit einen klinischen Effekt nachweisen konnte. Auch diverse Metaanalysen wurden im Laufe der letzten Jahre erstellt und kommen entsprechend der Datenlage zu demselben Ergebnis, wie an den Arbeiten von Deshpande et al. aus dem Jahre 2007 bzw. der aktualisierten Version von 2010 gezeigt werden konnte. 2007 wurden sieben Studien eingeschlossen und 2010 elf Studien. Beide Metaanalysen kamen zu dem Ergebnis, dass Probiotika signifikant günstige Effekte auf die Endpunkte NEC, Gesamtmortalität und den Zeitraum bis zur vollständigen enteralen Ernährung haben, aber bezüglich der Sepsis keine definitiven Aussagen getroffen werden konnten.

2.4.2.3 Chancen und Kontroversen

Mögliche positive Effekte sind nicht nur bei Frühgeborenen zur Verhinderung von Darment-

zündungen nutzbar; auch andere Patienten können von Probiotikagabe profitieren. So wird bei entzündlichen Darmerkrankungen (Millar 2003), Durchfallerkrankungen, Rotaviren, Pseudomembranöser Kolitis und Reisediarrhö, RSV, aber auch bei atopischen Hauterkrankungen oder zur Abmilderung von Impfreaktionen vermehrt mit Probiotika gearbeitet (Salminen 2010).

An den vorgestellten Studien wird deutlich dass, obwohl ähnliche Probiotika eingesetzt werden, bei der genauen Auswahl nach wie vor kein einheitliches Konzept erkennbar ist. Vieles deutet darauf hin, dass Kombinationstherapien verschiedener Probiotika oder auch Pre- und Probiotikamischungen effektiver als Monotherapien sind (Salminen 2010, Szajewska 2010). Die Unklarheit über den optimalen probiotischen Mikroorganismus könnte unter anderem auch daran liegen, dass bisher kaum Studien durchgeführt wurden, in denen Probiotika nicht nur mit Placebo, sondern auch untereinander verglichen wurden. Dass jeder Organismus unterschiedliche Eigenschaften bezüglich seiner Wirkung und Kolonisationsrate hat, kann ebenfalls mitverantwortlich sein (Schanler 2006). Auch die Art der Dosierung und die Dauer der Therapie sind noch offen. Die Präparate enthalten zwischen $0,35 \times 10^9$ (Bin-Nun 2006) und 6×10^9 CFU (Manzoni 2006). Die Therapiekonzepte reichen von einmal täglich in der ersten drei Lebenswochen (Mohan 2006) bis zweimal täglich für den gesamten Krankenhausaufenthalt nach Frühgeburtlichkeit, also zum Teil zwei bis drei Monate (Lin 2006). Wichtig hierfür ist auch die Frage, ob, wann und über welchen Zeitraum probiotische Mikroorganismen überhaupt kolonisieren. Momentan wird beispielsweise bei *Lactobacilli spp.* davon ausgegangen, dass sie zu 60% bis 80% kolonisieren (Da la Cochetiere 2004), innerhalb von sieben Tagen anwachsen und ihre probiotischen Effekte entfalten (Awad 2010). Zudem vermutet man, dass Probiotika nur transient besiedeln, also nach Absetzen der Therapie nach einem gewissen Zeitraum im Darm und im Stuhl nicht mehr nachweisbar sind (Bourlioux 2003, Isolauri 2007, Magne 2005). Parallelinterventionen wie Antibiotikagabe werden ebenfalls uneinheitlich berücksichtigt. Obwohl viele Antibiotika Probiotika wie beispielsweise *Lactobacilli* erfassen (Magne 2005), werden diese in manchen Studien unter laufender Therapie weitergegeben. Zusätzlich bedacht werden muss die Tatsache, dass NEC in manchen Kliniken endemisch ist, während sie in anderen gar nicht vorkommt (AlFaleh 2010, Martin 2008). Es herrschen also noch sehr unklare Vorstellungen über genaue Therapievorschriften, sodass diese Detailfragen einer weiteren Klärung bedürfen (Deshpande 2007).

Nach wie vor wird über die Frage der Sicherheit bezüglich der oralen Applikation probiotischer Keime debattiert. Obwohl in sämtlichen hier vorgestellten Studien keine Nebenwirkun-

gen festgestellt wurden, liegen Einzelberichte zu Laktobazillenseptitiden bei immuninkompetenten Kindern vor (Ladd 2009, Land 2005, Martin 2008). Da Frühgeborene in diese Kategorie fallen, sind diese Befunde zu berücksichtigen. Extreme low birth weight infants (ELBW) mit weniger als 1000g Geburtsgewicht sind am häufigsten von NEC betroffen. Dennoch ist die Datenlage zu diesen Patienten bezüglich der präventiven Probiotikagabe unzureichend und die vorliegenden Studien deuten darauf hin, dass bei diesen Kindern die Wirksamkeit und Kolonisationsrate eingeschränkt ist (Da la Cochetiere 2004, Deshpande 2007, Schmolzer 2006). Auch wird diskutiert, ob diese Kinder aufgrund ihrer extremen Unreife und Immunsuffizienz einem erhöhten Risiko einer probiotikainduzierten Sepsis ausgesetzt sind (Szajewska 2010). Die Frage der Langzeitfolgen bleibt ungeklärt (Mackie 1999, Martin 2008), ebenso wie die der cross-colonisation, also ein Überspringen der Bakterien auf Kinder ohne probiotische Therapie sowie die der Entwicklung einer Antibiotikaresistenz probiotischer Bakterien (Millar 2010). Auf dieser Grundlage wird aktuell über die Frage diskutiert, ob ein routinemäßiger Einsatz von Probiotika zum jetzigen Zeitpunkt bereits zu vertreten ist.

Die Metaanalyse von Deshpande et al. (Deshpande 2010) und Guthmann et al. (Guthmann 2010) sind Grundlage aktueller Diskussionen zum Probiotikaeinsatz bei Frühgeborenen. Beide sprechen sich aufgrund der von ihnen dargestellten Datenlage für einen routinemäßigen Probiotikaeinsatz bei Frühgeborenen aus. Weitere Studien seien aufgrund der Evidenz nicht nötig. Zudem sei es laut Deshpande unethisch weiterhin placebokontrollierte Studien durchzuführen, da hierdurch den Patienten der Placebogruppe eine, in randomisierten, kontrollierten Studien nachgewiesene Therapie vorenthalten werden würde. Diese Aussagen führen zu Kontroversen. Gegner des probiotischen Routineeinsatzes weisen auf die bereits angesprochenen Probleme bezüglich der Datenlage zu Kindern mit weniger als 1000g Geburtsgewicht, der Laktobazillensepsis, des unklaren Therapiekonzepts und der unbekanntenen Langzeitfolgen hin (Mihatsch 2010, Millar 2010). Für Befürworter hingegen ist die klinische Wirksamkeit und folglich ein routinemäßiger Einsatz probiotischer Therapeutika überzeugend (Tarnow-Mordi 2010). Bezüglich der Langzeitfolgen konnten Guthmann et al. beispielsweise zeigen, dass in dreijähriger Nachbeobachtung keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Wachstums und neuronaler Entwicklung zwischen Probiotika- und Placebogruppen festgestellt wurde (Guthmann 2010). Zudem sei laut Deshpande et al. eher mit Langzeitfolgen der NEC zu rechnen und ein probiotischer Routineeinsatz vertretbar, da somit dieser Krankheit präventiv entgegen werden könne. Dass noch viel zu diesem Thema geforscht werden kann und sollte ist durchaus richtig. Auf welcher Grundlage und mit welchen Methoden ist Gegenstand aktueller Debatten und daher mit Spannung zu beobachten.

2.5 Methoden zur Untersuchung der Stuhlflora

Die Analyseverfahren der medizinischen Mikrobiologie haben sich im Laufe der vergangenen zehn bis zwanzig Jahre stark verändert. Wurden traditionellerweise Patientenproben mit kulturellen und mikroskopischen Methoden untersucht, wendet man heute zunehmend molekularbiologische Techniken wie beispielsweise die PCR an. Dieser Wandel hängt unter anderem mit der erhöhten Spezifität moderner Methoden zusammen. In der Forschung spielen diese Techniken eine große Rolle, da durch sie auch unbekannte Bakterien und Viren identifiziert werden können. Auch in der Probiotikaforschung gewinnen sogenannte 16S rDNA basierte fingerprint Methoden und moderne Sequenzierungsmethoden (deep sequencing) zunehmend an Bedeutung.

In diesem Teil werden besonders die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen sowie ihren Anwendungsbereichen vorgestellt. Beispielhaft werden die in Infloran® vorkommenden *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* anhand der jeweils vorgestellten Methode morphologisch, biochemisch und phylogenetisch eingeordnet.

2.5.1 Konventionelle Methoden

Kulturelle Anzucht

Lactobacilli wachsen auf Blutagar als winzige Kolonien gelegentlich mit Vergrünung (Seeliger 1990). Sie sind mikroaerophil und ihr Hämolyseverhalten ist negativ oder zeigt eine α -Hämolyse. Selektivmedien sind zuckerhaltig und haben einen leicht sauren pH-Wert.

Bifidobacteria leben unter obligat anaeroben Bedingungen und bilden glatte kleine Kolonien ohne Filamente.

Zu den klassischen Analyseverfahren gehört die Anzucht von Bakterien auf Nährmedien. Spezialmedien wie Selektiv- und Elektivmedien unterstützen bzw. unterdrücken durch entsprechende Zusätze das Wachstum bestimmter Organismen (Kayser 2010). Die Anzucht auf festen Nährmedien erfolgt durch den sogenannten „Drei-Ösen-Ausstrich“ (Köhler 2001). Anschließend werden die Kulturen aerob oder unter Sauerstoffverschluss anaerob bei 37°C für 24 bis 48 Stunden bebrütet (Hof 2005). Die Bakterienkolonien werden anhand ihrer Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit, Farbe und Geruch beurteilt (Hahn 2009, Hof 2005). Zudem kann auf Blutagar das Hämolyseverhalten der Bakterien beobachtet werden. Resistenzen gegen Antibiotika können durch die Auflage von Antibiotikaplättchen auf das beimpfte

Nährmedium bestimmt werden (Köhler 2001). Durch kulturelle Anzucht ist meist eine recht detaillierte Aussage bezüglich des angezüchteten Bakteriums sowie eine taxonomische Einordnung möglich. Limitationen liegen unter anderem in der visuellen Beurteilung und der Tatsache, dass nicht jedes Bakterium kultivierbar ist (Mohan 2006). Dennoch sind die kulturellen Methoden nach wie vor aus der Routinediagnostik nicht wegzudenken, da sie preiswert sind, relativ genau und ohne großen Arbeitsaufwand viele wichtige Bakterien identifizieren.



Abb. 1: Kolonien von *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* auf MacConkey-Agar.

2.5.2 16S rDNA basierte Typisierungsmethoden

*Phylogenetische Einordnung des **Lactobacillus acidophilus**:*

Reich/Domäne: *Bacteria*, Entwicklungslinie/Abteilung: *Firmicutes*, Klasse: *Bacilli*, Ordnung: *Lactobacillales*, Familie: *Lactobacillaceae*, Gattung: *Lactobacillus* Spezies: ***Lactobacillus acidophilus***

*Phylogenetisch Einordnung des **Bifidobacterium infantis**:*

Reich/Domäne: *Bacteria*, Entwicklungslinie/Abteilung: *Actinobacteria*, Klasse: *Actinobacteria* Ordnung: *Bifidobacteriales*, Familie: *Bifidobacteriaceae*, Gattung: *Bifidobacterium* Spezies: ***Bifidobacterium infantis***

Molekulare Methoden unterliegen dem Grundprinzip der DNA-Analyse. Um eine phylogene-

tische Einordnung zu ermöglichen, wurde in den 1970er Jahren die 16S rDNA Analyse von dem Mikrobiologen Carl Woese entwickelt. Diese beruht auf der Tatsache, dass alle prokaryoten Ribosomen aus den Untereinheiten 23S und 16S bestehen, wobei letztere mit ihren 1500 Nukleotiden für die phylogenetische Differenzierung von Bakterien geeignet ist (Munk 2008). Grundsätzlich ist die 16S rDNA in verschiedene Regionen unterschiedlicher Variabilität aufgeteilt (V1- V8). Stark konservierte Regionen haben eine geringe Variabilität, das heißt sie weisen selbst in phylogenetisch weit entfernten Spezies eine identische Sequenz, sogenannte gruppenspezifische Sequenzen auf. In den hochvariablen Regionen werden einzelne Spezies unterschieden (V7, V8). So unterscheiden sich beispielsweise *Bifidobacterium infantis* und *Bifidobacterium bifidum* nur in den Sequenzen dieser Regionen. Innerhalb einer Gattung liegen die Sequenzunterschiede bei 5%, innerhalb einer Spezies bei 3% (Munk 2008).

Bakterien können durch diese Methode phylogenetisch eingeordnet werden. Die drei sogenannten Urreiche beinhalten die beiden prokaryoten Domänen *Bacteria* und *Archea* sowie die eukaryote *Eukarya*. In den gruppenspezifischen Sequenzen der 16S rRNA können diese entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhänge noch nachgewiesen werden. Die meisten im Menschen vorkommenden Bakterien entstammen der Domäne *Bacteria*, während Pilze und Tiere der *Eukarya* Domäne entspringen. Von den *Bacteria* gehen nun wiederum verschiedene Entwicklungslinien, wie beispielsweise die *Actinobacteria* oder *Firmicutes* ab (Munk 2008). Eine detailliertere Einteilung nach Bergey's Manual erfolgt nach Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Spezies (Bergey's Manual 1936). Je nachdem welche Region der 16S rRNA analysiert wird, kann eine entsprechende taxonomische Einordnung erfolgen.

Durch die Analyse konservierter und hochkonservierter Regionen (V3) kann mittels sogenannter Universalprimer eine Vielzahl von Bakterien amplifiziert werden, die dann durch genauere Sequenzanalyse weiter identifiziert werden (Schwiertz 2003).

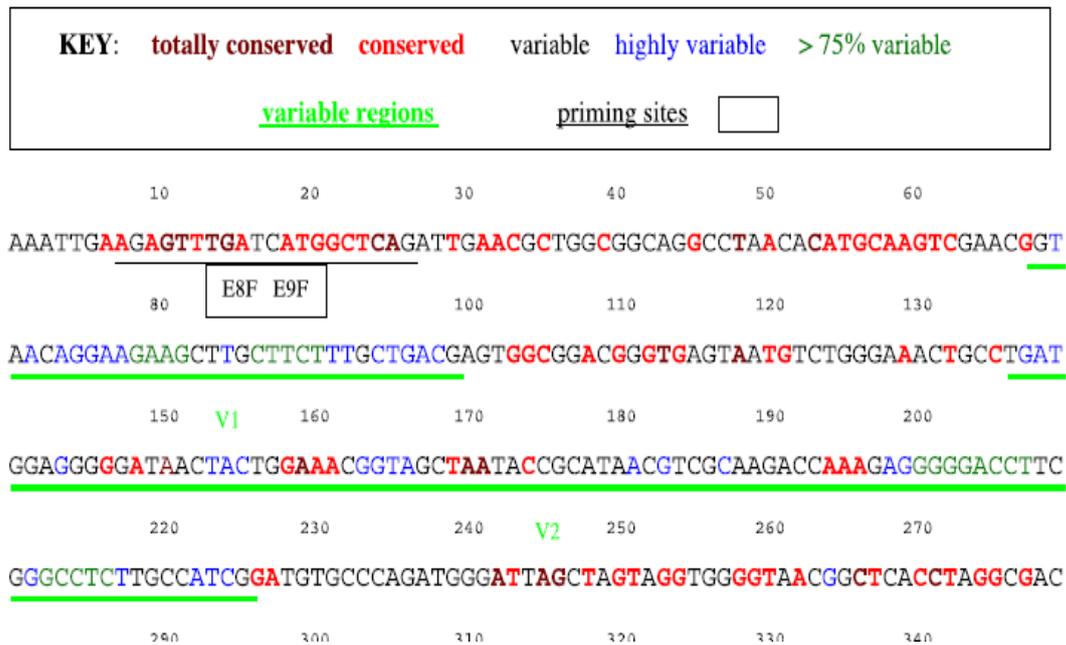


Abb. 2: Variable und konservierte Regionen der 16S rRNA mit möglichen Primer- und Sondenansatzstellen (Baker 2005).

2.5.2.1 Polymerasen- Kettenreaktion (PCR)

Eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden ist die PCR (Mullis 1986). Sie ermöglicht den Nachweis extrem geringer DNA-Mengen durch Vervielfältigung spezifischer Regionen der 16S rRNA oder der DNA (Hahn 2009, Hof 2005, Köhler 2001). Diese DNA wird anschließend nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Anhand des mitgeführten Molekulargewichtsmarker und der Bandendicke kann grob abgeschätzt werden, ob viel oder wenig DNA in der Probe enthalten ist. Wurden spezifische Primer eingesetzt, können nun bereits qualitative Aussagen zu der Bakterienspezies getroffen werden. Zur genaueren Bestimmung nach Verwendung von Universalprimern sowie zur quantitativen Analyse kommen weitere Methoden zum Einsatz.

2.5.2.2 „Genomic Fingerprinting“

Eine Möglichkeit zur genaueren Differenzierung und Identifizierung bieten die „Fingerprint-Methoden“. Hierbei erfolgt nach der 16S rDNA-PCR, bei den im Agarosegel positiven Proben, eine detaillierte Analyse der jeweiligen DNA durch den Nachweis spezifischer Bakteriensignaturen. Zu diesen Methoden gehören unter anderem die hier verwendete Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) und die Temperaturgradienten Gelelektrophorese (TGGE).

Mit diesen Methoden kann die Zusammensetzung der polymikrobiellen Flora dargestellt werden. Das Prinzip der DGGE beruht auf der Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren von 16S rDNA PCR Produkten unter denaturierenden Bedingungen. Da die drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin stärker als die zwei Bindungen zwischen Adenin und Thymin sind, werden DNA-Stränge anhand ihres CG-Gehalts aufgetrennt. Durch den Harnstoffgradienten, der von oben nach unten zunimmt, entsprechen die weiter unten liegenden Banden Mikroorganismen, deren DNA viele CG-Bindungen aufweist. Der Vorwärtsprimer enthält eine sogenannte „GC-Clamp“, eine Sequenz aus 39 Nukleotiden am 5'-Ende, die nur aus Cytosin und Guanin besteht, um die DNA des PCR Produkts vor einer kompletten Dissoziation zu bewahren (Schwiertz 2003). Eine Bande entspricht demnach der 16S rDNA einer Bakterienspezies und kann optisch und computergestützt mit einem mitgeführten Marker abgeglichen werden, der Bakteriensignaturen verschiedener Spezies auf entsprechender Höhe enthält. Eine weitere Identifikationsmöglichkeit bietet die Sequenzierung der aus dem Gel separierten Banden. Eine nicht-selektive Darstellung der verschiedenen Bakterienspezies sowie qualitative Verlaufsanalysen werden durch die DGGE ermöglicht.

Mögliche Limitationen dieser Methode sind zum einen, dass die 16S rDNA der Bakterien mittels PCR unterschiedlich gut amplifiziert wird. Zum anderen konkurrieren Bakterien um Primerbindungsstellen, sodass vorwiegend Keime der dominanten Flora erfasst werden (Da la Cochetiere 2004). Technische Faktoren wie Gel-zu-Gel-Varianten aufgrund der manuellen Herstellung sowie die optische Auswertung der Befunde können ein Problem darstellen (Tourlomousis 2010). Insgesamt verschafft diese Methode jedoch einen sehr genauen Überblick auf das Mikrobiom der Darmflora. Dies ist auch ein Vorteil gegenüber anderen molekularbiologischen Methoden wie der real time PCR oder der Multiplex-PCR, die durch ihre Spezifität ausschließlich die explizit gesuchten Mikroorganismen zeigen.

2.5.2.3 Sequenzierung

Zur Identifizierung der Primärstruktur bakterieller DNA muss die Reihenfolge der Nukleotidbausteine, die sogenannte Sequenz aufgetrennt werden. Die Sanger-Sequenzierung gehört zu den Standardverfahren und beruht auf dem Einbau sogenannter „Didesoxynukleotide“ (ddNTP), die an zwei Enden (2' und 3') statt an einem desoxigeniert sind (Kayser 2010). Diese können mit dem vorherigen Nukleotid verbunden werden, danach erfolgt ein Strangabbruch. Anschließend werden die DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt und die Sequenz abgelesen. Mithilfe von mehrfarbigen fluoreszenzmarkierten ddNTPs kann in modernen Se-

quenzierungsverfahren die Analyse in einem gemeinsamen Lauf durchgeführt werden. Die Sequenzen können nachfolgend in internationalen Datenbanken (z.B.: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit anderen Sequenzen verglichen werden und anhand der Ähnlichkeit die zugrunde liegende Bakterienart identifiziert werden.

Wird die Sanger-Sequenzierung im Anschluss an eine DGGE angewendet, können Doppelsequenzen entstehen, die keine einwandfreie Identifizierung gewährleisten. Dies geschieht meist, wenn die ausgeschnittene Bande eigentlich aus zwei sehr nah aneinander liegenden Banden mit ähnlicher Auftrennung bestehen. Meistens ist jedoch eine eindeutige Identifizierung möglich.

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie ist es, ein nicht-selektives, kultur-unabhängiges Nachweisverfahren zur Analyse der Stuhlflora Frühgeborener nach Probiotikagabe zu etablieren. In der vorliegenden Studie wird die DGGE als eines der ersten Male zur Klärung des mikrobiellen Einflusses von Probiotika auf die Darmflora Frühgeborener verwendet. Da durch diese Methode eine zeitliche Verlaufsanalyse und eine nicht-selektive Darstellung der dominanten Keimflora dokumentiert werden kann, ist sie für diese Untersuchungen geeignet. Für die vorliegende Arbeit war die DGGE deshalb besonders interessant, weil so nicht nur die explizit gesuchten *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* gezeigt werden konnten, sondern das gesamte Mikrobiom eines Patienten im Verlaufe der ersten Lebenswochen dargestellt werden kann.

Ein weiteres Ziel ist die Überprüfung des Einflusses von Probiotika auf die mikrobielle Zusammensetzung im Gastrointestinaltrakt Frühgeborener. Aufgrund des explorativ-prospektiven Charakters der Studie wird dies anhand von exemplarisch dargestellten Patienten erfolgen. Der komplexe Aufbau von Gastrointestinaltrakt und Immunsystem deutet darauf hin, dass bereits kleine Veränderungen wie Probiotikagabe großen Einfluss haben können. Die DGGE bietet die Möglichkeit, sowohl direkte Einflüsse von Probiotika auf die Darmflora, durch den Nachweis von *Bifidobacterium infantis* und *Lactobacillus acidophilus*, als auch indirekte Einflüsse, beispielsweise durch Veränderungen des Keimspektrums nachzuweisen.

Die Etablierung der nicht-selektiven Methode DGGE sollte für diese und nachfolgende Studien die Möglichkeit bieten, den Einfluss von Probiotika auf die gastrointestinale Mikroflora bei Frühgeborenen zu analysieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Studienkohorte

Im August 2007 wurde in Kooperation mit der neonatologischen Abteilung des Universitätsklinikums des Saarlandes eine prospektive, randomisierte, explorative klinische Studie zum Thema „Probiotika bei Frühgeborenen“ durchgeführt. Einschlusskriterien für diese Studie waren Früh- und Neugeborene vor der vollendeten 32. Schwangerschaftswoche (32 + 0/7) oder unter 1500g Geburtsgewicht. Ausschlusskriterien waren komplexe Fehlbildungen sowie eine Nahrungskarenz von mehr als sieben Tagen.

Durchgeführt wurde die Studie im „cross over design“. Dies bedeutet, dass den Patienten in den ersten drei Wochen (Gruppe A) bzw. von der vierten bis sechsten Lebenswoche (Gruppe B) einmal täglich eine Kapsel des Probiotikums in gelöster Form zugefügt wurde. Die Randomisierung der 21 untersuchten Patienten (IS-01- IS-21) erfolgte anhand einer entsprechenden Randomisierungsliste.

Das verwendete Probiotikum Infloran® enthält pro Kapsel mindestens 10^9 lebende Keime *Lactobacillus acidophilus* und mindestens 10^9 lebende Keime *Bifidobacterium infantis*. Infloran® wurde bei einigen Patienten, entsprechend dem Studienprotokoll, auch unter laufender Antibiotikatherapie verabreicht.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Nr. 09/07 genehmigt.

3.1.2 Materialgewinnung

Die Stuhlproben wurden regelmäßig an mehreren Tagen pro Woche asserviert und bei -20°C eingefroren. Es wurden sowohl klinische Daten erfasst als auch insgesamt über 300 Stuhlproben von zwölf Patienten aus beiden Gruppen mikrobiologisch analysiert.

3.1.3 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden für die Untersuchungen verwendet:

Tabelle1: Reagenzien.

Reagenzien	Hersteller
Ammonium Peroxodisulfat (APS) >98% ACS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bromophenol Blue Na-salt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
dNTP Set 1: 4 x 25 µmol dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 100 mM, pH 8.4-8.6	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ExoSAP-IT	USB Europe GmbH, Staufen, Deutschland
Glycerin	Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland
HotStarTaq <i>Plus</i> -Polymerase Kit, Inhalt: 100 x 250 units HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase, 10x PCR Buffer, 10x CoralLoad PCR Buffer, 5x Q-Solution, 25 mM MgCl ₂	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
Hyplex® Prep Modul, enthaltende Chemikalien: 10ml Puffer B1, 2,5ml Reagenz B2, 7ml Puffer B5 (Konzentrat), 30ml Puffer BW, 13ml Puffer BE	Fa. BAG Health Care, Lich, Deutschland
Isopropanol	WVR, Darmstadt, Deutschland
Molekulargewichtsmarker Gel-Pilot 1kb Plus Ladder (100)	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland

QA Agarose TM	Fa. MP biomedical, Illkirch, Frankreich
SYBR® Gold nucleic acid gel stain	Invitrogen GmBh, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin ultra pure grade (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmBh, München, Deutschland
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 1:10 verdünnt	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie GmBh, München, Deutschland

Sämtliches PCR-Wasser wurde mit einer Milipore Anlage gereinigt.

3.1.4 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer

1xTAE-Puffer wurde durch eine 1: 50 Verdünnung des 50x TAE-Puffers (Tabelle 2) mit Aqua destilata hergestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der TAE-Puffer.

Chemikalien	Hersteller	50xTAE-Puffer (pH 8,5)
Trisma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmBh, München, Deutschland	242,0g
Eisessig	Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland	57ml
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Titriplex III	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland	100ml
Aqua destilata		Bis auf 1000ml auffüllen

Ladepuffer

Der Ladepuffer enthält 250mg Bromphenolblau, 250mg Xylene Cyanol, sowie 35ml Glycerin und 65ml 50 millimolare EDTA-Lösung und wird bei Raumtemperatur gelagert.

Acrylamidlösungen

Die Acrylamidlösungen enthalten nachfolgende Reagenzien und wurden abgedunkelt kühl (4°C) gelagert. Nach ihrer Herstellung wurden sie einmalig für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Acrylamidlösungen.

Chemikalien	Hersteller	0%	LDS (40%)	HDS (70%)
Acrylamide 40% Solution	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	18,8ml	18,8ml	18,8ml
50xTAE-Puffer		2,0ml	2,0ml	2,0ml
Formamide ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland		16ml	28ml
Harnstoff 99,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland		16,8g	29,4g
Aqua destilata		79,8ml	ca. 20ml	ca. 20ml
Gesamtmenge		100ml	100ml	100ml

SYBR-Gold-Lösung

Die SYBR-Gold-Lösung enthält 30µl SYBR-Gold und 300ml 1xTAE-Puffer und wird abgedunkelt gelagert.

EDTA-Lösung

Die EDTA-Lösung enthält 18,612g EDTA ca.100ml Aqua destilata und wird mit NaOH auf pH-Wert von 8,0 titriert.

APS-Lösung

Die APS-Lösung enthält 0,1g Ammoniumpersulfate APS sowie 1ml Aqua destilata und wird bei -20°C gelagert.

3.1.5 Primer

Tabelle 4: Primer.

GC 27 forward	<i>(GC-Clamp:5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCG CCC CCG CCC C-3')AGAGTTTGATCCTGGCTCAG</i>
16s forward	<i>ATTACCGCGGCTGCTGG</i>
517 reverse	<i>AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG</i>

3.1.6 Geräte

Abgesehen von handelsüblichen Labormaterialien wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Geräte.

Geräte und sonstige Materialien	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DCode System for DGGE	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GENbag microaer	Fa. bioMérieux, Frankreich
Mikrowelle	Fa. Elektrolux Haushaltsgeräte, Vertriebs GmbH, Nürnberg
Parafilm®	Fa. American National Can, Greenwich, USA
ThermoCycler: Typ Biometra T-Gradient 48	Fa. Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

Transilluminator	Reichert Chemietechnik GmbH & Co, Heidelberg
Vortexer: Typ Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage: Typ Mettler P160N	Mettler-Toledo GmbH, Schweiz
Zentrifuge: Typ Himac CT 15 E von Hitachi	VWZ International bvba, Leuven, Belgien

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Aufreinigung aus dem Stuhl

Die Aufreinigung der DNA aus Stuhl erfolgte mit dem *Hyplex® Prep Modul* der Firma *BAG Health Care* entsprechend der Herstellerangabe (BAG Health Care). Zur Vorbereitung wurde der Inkubator auf 99°C vorgeheizt und die Puffer B5 und B3 angesetzt. Für den Puffer B5 wurden 28ml Ethanol (96% bis 100%) zum Puffer B5 Konzentrat hinzugegeben; zur Herstellung von Puffer B3 der gesamte Puffer B1 zum Reagenz B2 gegeben. Zur Lösung eventueller, lagerungsbedingt entstandener Präzipitate wurden die Puffer B3, B5 und BE vor Gebrauch bei 50°C inkubiert.

Für die Aufreinigung der DNA wurde etwa ein halbes Schöpfelchen (ca. 5g) aus der Stuhlprobe möglichst in gefrorenem Zustand in ein Filtrationsfläschchen gegeben und gevortext. Nachdem die ersten fünf Tropfen verworfen und 2ml der filtrierte Stuhlsuspension in ein Röhrchen gegeben worden waren, wurde dieses für zwei Minuten bei 13.000 UpM (maximale Umdrehungszahl) zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde mit 200µl *hyplex* Lysepuffer resuspendiert und bei 99° C für zehn Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension erneut für zwei Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert und vom Überstand 200µl in ein Eppendorfröhrchen gegeben.

Als Vorbereitung für die DNA-Bindung wurden der Suspension zunächst 200µl Puffer B3 und anschließend, nach kurzem vortexen 210µl Ethanol hinzugefügt und im Folgenden die gesamte Probe in ein Filterröhrchen (*hyplex® Prep Säule*) pipettiert, eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nachdem für den Waschvorgang das Filterröhrchen auf ein weiteres Eppendorfröhrchen ge-

steckt, 500µl Puffer BW hinzugefügt, erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, wiederholte man diesen Vorgang mit 600µl des Puffer 5. Nachdem hier ebenfalls der Überstand verworfen wurde, sollte, um das restliche Ethanol zu entfernen, das Filterröhrchen nochmals auf ein Eppendorfröhrchen gesteckt und kurz zentrifugiert werden.

Zur DNA-Elution wurde das Filterröhrchen auf ein kleineres (1,5ml) Gefäß gesetzt und 100µl Puffer BE direkt auf die Silka-Membran gegeben. Nach einer Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde hochreine DNA in dem Überstand abschließend für eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert und kühl (-20°C) gelagert.

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erfolgte mit dem HotStarTaq*Plus*-Polymerase Kit der Firma Qiagen nach Herstelleranweisung. Der Mastermix wurde entsprechend der Tabelle 6 angesetzt:

Tabelle 6: Mastermix Ansatz für die PCR.

Reagenz	Volumen (µl)
PCR-Puffer 10x	5
Q-Lösung 5x	10
Nukleotide (dNTPs)	2,25
<i>Primer GC 27 F</i>	0,5
<i>Primer 517 R</i>	0,5
HotStarTaq <i>Plus</i>	0,3
Aqua ad iniectabilia,	26,45
Gesamtvolumen	45,1 µl/Ansatz

Von der aufgereinigten DNA, einer Positiv- und einer Negativkontrolle wurden je 5µl zu dem Mastermix hinzugegeben. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss kühl gelagert (4°C) oder direkt weiter verwendet. Im ThermoCycler lief die PCR mit folgendem Programm in 30 Zyklen ab:

Tabelle 7: PCR im ThermoCycler mit Programm 56.

95°C	15 min
94°C	1 min
58°C	1 min
72°C	1:30 min
72°C	7 min
4°C	∞

3.2.3 Agarosegel Elektrophorese

Um festzustellen, in welchen Proben bakterielle DNA isoliert werden konnte, wurde eine Agarosegel Elektrophorese durchgeführt.

Hierfür wurden 0,2g Agarosepulver abgewogen und mit 20ml 1:10 verdünntem TBE-Puffer vermischt, die Spiegelgrenze am Erlenmeyerkolben markiert und die Suspension kurz aufgekocht, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde dem leicht abgekühlten Gemisch (ca. 50°C) 3µl Ethidiumbromid hinzugefügt, das Gemisch in eine vorbereitete Gelkammer mit eingesetzten Kämmen gegeben und vollständig abgekühlt. War der gelförmige Zustand erreicht, konnte mit der Befüllung begonnen werden.

Pro Geltasche wurden 3 µl Ladepuffer mit 5µl PCR-Produkt vermischt und in die Tasche gefüllt. Zusätzlich zu den Positiv- und Negativkontrollen wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Nachdem bei 125 Volt für 20 Minuten die Gelelektrophorese abgelaufen war, konnte unter UV-Licht (260nm) bakterielle DNA in Form von Banden erkannt und dokumentiert werden.

3.2.4 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die PCR-Produkte, bei denen durch die Gelelektrophorese bakterielle 16S rDNA nachgewiesen werden konnte, wurden nun mittels DGGE anhand ihrer Laufeigenschaften im Gradientengel aufgetrennt. Dies erfolgte durch einen Harnstoff-Gradienten im denaturierenden Polyacrylamid-Gel.

3.2.4.1 Herstellung eines denaturierenden Gradientengels

Die DGGE wurde mit dem DCode System for DGGE der Firma BioRad nach Herstelleranleitung durchgeführt. Aufgrund der Toxizität wurden Nitril-Handschuhe verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die Glasplatten mit Isopropanol gründlich gereinigt und luftgetrocknet, um jegliche Verunreinigung zu verhindern. Im Anschluss wurden die 1mm messenden „spacer“ zwischen die kleine und die große Glasplatte gelegt, mit der weißen Plastikkarte ausgerichtet und mit Schraubleisten fixiert. Hierfür mussten die Unterkanten absolut eben sein, da sonst die flüssige Acrylamidlösung ausgelaufen wäre. Die gesamte Konstruktion wurde nun in den „casting stand“ (Gießstand) gestellt und die Kammhöhe markiert.

Das Trenngel wurde mit Hilfe des „Model 475 Gradient formers“ (Gradientenformer) der Firma BioRad hergestellt. Die Schläuche wurden hierfür mit dem Y-Stück verbunden, sodass die Flüssigkeit aus beiden, auf ihre Durchlässigkeit hin geprüften Spritzen, in einen Schlauch mündete.

Nun wurden jeweils 20ml der HDS (high-density-solution) und der LDS (low-density-solution) in ein beschriftetes Gefäß pipettiert, die HDS mit 300µl Farbpuffer versetzt und anschließend je 45µl 10% APS-Lösung und 18µl TEMED hinzugegeben. Dies löste den Polymerisierungsvorgang aus.

Beide Spritzen wurden mit je 15ml HDS- beziehungsweise LDS-Lösung gefüllt, die Spritze mit der HDS hinten, die mit der LDS vorne am „Gradient former“ befestigt, beide Schläuche vorn an den Spritzen festgeschraubt und die Kanüle mittig zwischen den Glasplatten festgeklebt. Daraufhin wurde langsam, aber gleichmäßig das Rad gedreht, um einen Gradienten im Acrylamidgel zu formen und eventuelle Luftblasen durch stetiges Klopfen abgelassen. War das Gel ca. 0,5cm über der markierten Linie und der entstandene Gradient gut an der, nach oben hin schwächer werdenden Färbung zu erkennen, war der Vorgang beendet. Um das Gel vor Austrocknung zu schützen, wurde Isopropanol auf das Gel gegeben und etwa eine halbe Stunde gewartet.

Zur Herstellung des Sammelgels wurde das Isopropanol entfernt und anschließend 5ml der 0%-Lösung mit 45µl APS und 4,5µl TEMED versetzt, auf das Gel pipettiert und der Kamm eingesetzt.

Es wurden möglichst immer zwei Gele parallel hergestellt, da im „sandwich core“ (Gelhalter/Innenteil) Platz für zwei Gele war und somit mehrere Analysen gleichzeitig durchgeführt werden konnten. Die fertigen Gele mussten mindestens vier Stunden vollständig auspolymerisieren bis mit der DGGE begonnen werden konnte. Sie wurden in diesem Zeitraum mit feuchten Tüchern vor Austrocknung geschützt.

Mit dem DCode System for DGGE konnten die Proben bei einer definierten Temperatur elektrophoretisch aufgetrennt werden. Etwa eine Stunde vor Beginn der Elektrophorese wurde der in einer Isolierbox stehende Elektrophoresetank mit 7,5 Liter 1xTAE-Puffer befüllt und auf 60°C vorgeheizt. Die Kämme wurden aus den Gelen entfernt, diese in den mit „rechts“ und „links“ markierten „sandwich core“ eingesetzt und dieser wiederum in den Elektrophoresetank eingehängt. Vorher waren etwa 500ml des vorgewärmten TAE-Puffers abgeschöpft worden und nun oben auf die Gele gegeben um diese komplett zu überdecken.

Die Geltaschen wurden einzeln mit einer kleinen Pipette oder einer Hamilton Spritze ausgespült, um eventuell vorhandene Gelreste aus den Taschen zu lösen und zu entfernen.

Nun wurde - wie bei der Agarosegel Elektrophorese - pro Tasche je 5µl PCR-Produkt mit 3µl Farbpuffer hinein pipettiert. Ein Molekulargewichtsmarker sowie eine Negativprobe wurden auch hier mitgeführt. Der DNA-Größenmarker wurde zur Orientierung immer auf dieselbe Seite pipettiert.

Anschließend wurde die Pumpe angestellt und die Elektrophorese bei 70 Volt für 16 Stunden durchgeführt.

3.2.4.2 Nachweis komplexer Bakteriensignaturen

Bei der DGGE handelt es sich um eine „Fingerprint Methode“ zum Nachweis komplexer bakterieller Populationen. Diese wurden wie folgt dargestellt:

Kurz vor Ablauf der 16 Stunden wurde die SYBR-Gold-Lösung angesetzt (1:100.000 in TAE Puffer), dann die Gele aus den Glasplatten gelöst und einheitlich markiert (beispielsweise Gel 1: rechte Ecke oben ein Dreieck, Gel 2: rechte Ecke oben ein Quadrat abtrennen).

Anschließend wurden sie in die Färbeschale transferiert, für zehn Minuten auf dem Schwenktisch eingefärbt und danach mit einer Klarsichthülle vorsichtig aus der Schale gehoben. Die Färbelösung wurde über einen Aktivkohlefilter entsorgt.

Die digitale Fotodokumentation der Gele erfolgte mit dem „Gel Doc™ XR+ System“ in verschiedenen Beleuchtungsstufen.

3.2.4.3 Identifizierung der einzelnen Spezies durch Sequenzieren

Zur Identifizierung und Isolierung der spezifischen bakteriellen DNA wurden die Banden

unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten, in beschriftete Eppendorfgefäße Aqua destilata gegeben und das PCR Produkt über Nacht eluiert. Kontaminationen waren unbedingt zu vermeiden, da die DNA in der nachfolgenden PCR erneut amplifiziert wurde (nested PCR). Auf einem ausgedruckten Foto wurden die Banden ebenfalls beschriftet, um eine spätere Zuordnung zu gewährleisten.

Aus dem Eluat konnte mit den Primern „16S forward“ und „517 reverse“ eine PCR aus der spezifischen DNA angesetzt und in 26 Zyklen ausgeführt werden (s. 3.2.2). Im Anschluss wurde erneut eine Agarosegel Elektrophorese durchgeführt und die positiven PCR-Produkte zur Sequenzierung mit ExoSAP anverdaut. Hierfür wurden je 5µl Amplifikat mit 2µl gekühlter (-20°C) ExoSAP versetzt, zunächst für 15 Minuten bei 37°C und im Anschluss ebenfalls für 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Die verwendeten Primer wurden 1:10 mit Aqua destilata verdünnt und in einem auswärtigen Labor (4base lab GmbH, Reutlingen, Deutschland) mittels Sanger-Sequenzierung bearbeitet.

Die ermittelten Sequenzen wurden anhand der Histogramme auf ihre Reinheit überprüft (Finch TV) und eventuelle Mischsequenzen ausgeschlossen. Im Folgenden wurden sie in der Datenbank „<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>“ mit sämtlichen dort vorliegenden Sequenzen verglichen und die entsprechende Bakterienspezies des spezifischen PCR Produkts ermittelt. Ab einer Übereinstimmung von >97% galt in der vorliegenden Arbeit die Bakterienart als identifiziert.

4 Ergebnisse

In dieser Promotionsarbeit wurde die Fingerprint Methode DGGE zur Analyse von Stuhlproben Frühgeborener nach Probiotikagabe im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum des Saarlandes etabliert.

4.1 Klinische Daten

Während der klinischen Phase der Studie im August 2007 wurden Daten und Befunde sowohl der 21 untersuchten Frühgeborenen als auch deren Mütter in der pädiatrischen Abteilung des Universitätsklinikum des Saarlands gesammelt und dokumentiert. Von zwölf Patienten aus beiden Gruppen wurden insgesamt über 300 Stuhlproben mittels DGGE analysiert und ausgewertet. Die Patientencharakteristik der beiden Behandlungsgruppen (Tabelle 8) stellt zunächst die charakteristischen, klinischen Befunde zusammengefasst dar.

Tabelle 8: Patientencharakteristik.

	Gruppe A (1.-3. Woche)	Gruppe B (4.-6. Woche)
Patienten [n]	13	8
Gemini [n (%)]	5 (38%)	3 (38%)
Gestationsalter [d (\pmSD)]	201 (\pm 18)	203 (\pm 17)
Geburtsgewicht [g (\pmSD)]	1132 (\pm 378)	1296 (\pm 335)
Nabelschnur [pH-Wert (\pmSD)]	7,29 (\pm 0,1)	7,33 (\pm 0,1)
Sektio [n (%)]	10 (77%)	8 (100%)
Mütterliches CRP >5mg/L [n (%)]	5 (38%)	5 (63%)
Chorioamnionitis [n (%)]	3 (23%)	2 (25%)
Mütterliche Antibiotika [n (%)]	7 (54%)	5 (63%)

Im Verlauf der Hospitalisation wurden verschiedene Interventionen und Untersuchungen durchgeführt (Tabelle 9). Eine intensivmedizinische Betreuung erfolgte im Durchschnitt über 32 Tage (Gruppe A) bzw. über 26 Tage (Gruppe B), die Mortalität lag während des Beobachtungszeitraums bei null. Bezüglich der NEC wurden bei 38% der Patienten in Gruppe A und

50% in Gruppe B positive Hämocult®-Ergebnisse gefunden, bei einem Patienten wurde bei klinischem Verdacht auf NEC eine Laparoskopie durchgeführt; eine NEC konnte jedoch bei keinem nachgewiesen werden. Weitere klinische Daten wurden im Rahmen einer unabhängigen klinischen Doktorarbeit an der Kinderklinik am Universitätsklinikum des Saarlandes erhoben und analysiert.

Tabelle 9: Klinischer Verlauf.

	Gruppe A (1.-3. Woche)	Gruppe B (4.-6. Woche)
Patienten [n]	13	8
Intensivtherapie [d (±SD)]	32,4 (±22,4)	26,3 (±30,8)
Hospitalisation [d (±SD)]	79,3 (±27,2)	65,0 (±22,7)
Bakteriämie [n (%)]	1 (8%)	1 (13%)
Koagulasenegative Staphylokokken in Blutkulturen [n (%)]	3 (23%)	1 (13%)
NEC [n (%)]	0 (0%)	0 (0%)
Nahrungsstopp [n (%)]	3 (23%)	3 (38%)
Laparoskopie [n (%)]	1 (8%)	0 (0%)
Hämocult positiv [n (%)]	5 (38%)	4 (50%)
ZVK [d (±SD)]	22,4 ± 12,4	20,5 ± 8,1
Antibiotika [d (±SD)]	23,5 ± 11,8	21,1 ± 7,12
Fieber [d (±SD)]	0 ± 0	0,1 ± 0,4
Reanimation [n (%)]	2 (15%)	0 (0%)
Mortalität [n (%)]	0 (0%)	0 (0%)

4.2 Untersuchung der Stuhlflora, Darstellung individueller Verläufe

4.2.1 Analyse mittels DGGE am Beispiel von Patient IS-05

Anhand von einem Patienten (IS-05) wird exemplarisch der Analysevorgang mittels PCR-DGGE vorgestellt. Es erfolgt zunächst eine Zusammenfassung der klinischen und mikrobiologischen Befunde und somit eine Darstellung des individuellen Musters der Darmflora von

Patient IS-05 (Abbildung 3).

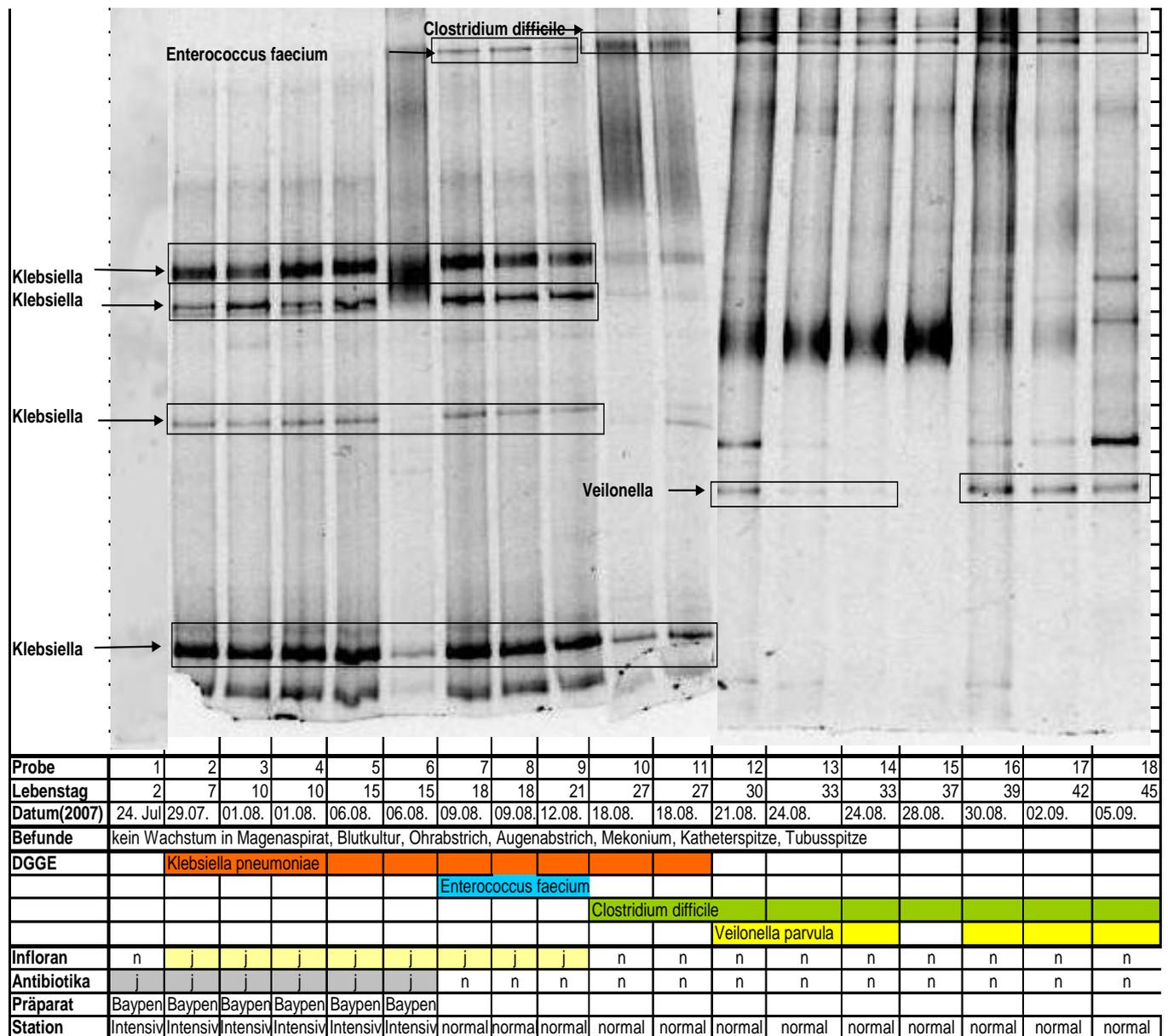


Abb. 3: Exemplarische Darstellung der enterale Flora (DGGE) eines Patienten (IS-05) zusammen mit klinischen Befunden.

4.2.1.1 Darstellung der Befunde und Analyseergebnisse

Von Patient IS-05 lagen insgesamt 18 Stuhlproben vor, davon 8 aus dem Zeitraum mit und 10 ohne Probiotikagabe. Die erste Probe stammt vom 2., die Letzte vom 45. Lebenstag. Inflozan® wurde verabreicht von Tag 5 bis 21, Antibiotika von Tag 1 bis 16. An den ersten 5 Lebenstagen wurden Meclozillin und Gentamycin (2-tägig) verabreicht, anschließend erfolgte eine Monotherapie mit Meclozillin.

Bei diesem Patienten konnten mittels konventioneller mikrobiologischen Methoden bei-

spielsweise aus dem Magenaspirat und Blutkulturen oder Stuhlproben keine positiven Befunde erhoben werden, mittels der DGGE wurden jedoch mehrere Bakterienspezies in Stuhlproben nachgewiesen. Nach der Sequenzanalyse ergaben sich für den exemplarisch dargestellten Patienten folgende Befunde: durch die DGGE wurden vom 7. bis 21. Lebenstag *Klebsiella pneumoniae*, vom 18. bis 27. Lebenstag *Enterococcus faecium*, vom 27. bis 45. *Clostridium difficile* und vom 30. bis 45. *Veillonella parvula* nachgewiesen. Die *Klebsiella* traten unter Infloran®- und Antibiotikagabe auf und verschwanden nach Absetzen des Antibiotikums erst nachdem auch das Probiotikum abgesetzt wurde. Die Enterokokken traten ausschließlich in dem Zeitraum auf, in dem nur Infloran® gegeben wurde. *Clostridia* und *Veillonella* wurden im späteren, pro- und antibiotikafreien Bereich nachgewiesen.

Die exemplarische Darstellung vier weiterer Patienten sind in den nachfolgenden Abschnitten zu finden, die anderen Patienten wurden in der kumulativen Auswertung mitberücksichtigt.

4.2.1.2 Nachweis bakterieller DNA mittels PCR

Die hochreine bakterielle DNA aus den Stuhlproben konnte mittels PCR amplifiziert und in der Agarose Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die positiven Bänder entsprachen PCR-Produkten bakterieller DNA, die durch 16S rDNA Universalprimer amplifiziert wurden. Am vorliegenden Beispiel (Abbildung 4) gezeigt, trifft dies mit Ausnahme der ersten unmittelbar postnatalen Probe für sämtliche Verlaufspuren zu. Die erkennbaren Primer Dimere entstehen durch unspezifische Reaktionen. Die positiven Proben wurden nun mittels DGGE weiter analysiert.

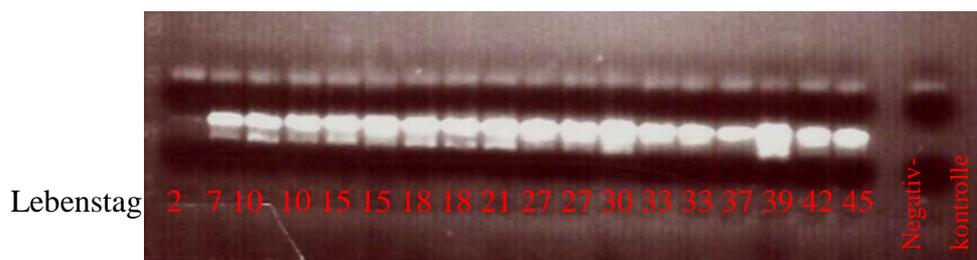


Abb. 4: Darstellung der Amplifikate der Stuhlproben (IS-05) unter UV-Licht nach 16S rDNA PCR.

4.2.1.3 DGGE

Anschließend wurden die spezifischen bakteriellen Signaturen nachgewiesen und nachfolgend das individuelle Keimmuster des Patienten analysiert.

Zunächst wurden die Proben mittels DGGE anhand ihres Denaturierungsverhaltens (CG-Gehalt) im Gradientengel aufgetrennt. Die so entstandenen Banden der verschiedenen Bakterienspezies lagen aufgrund der unterschiedlichen Laufeigenschaften im Gradientengel auf verschiedenen Höhen. Dadurch waren auch optisch Veränderungen im Keimspektrum erkennbar. Bei dem exemplarisch vorgestellten Patienten war bereits in der visuellen Beurteilung erkennbar, dass das bakterielle Keimspektrum bis Tag 27, also bis eine Woche nach Abschluss der Infloränge® konstant blieb und ab Tag 30 ein komplett neues Muster zeigte. In der ersten Stuhlprobe (Mekonium) konnte keine bakterielle Besiedlung nachgewiesen werden (Abbildung 3 und 4).

4.2.1.4 Sequenzanalyse

Zur Spezifizierung der Bakterien erfolgte anschließend die Sequenzanalyse. Die PCR Produkte für spezifische Bakterien wurden aus distinkten Banden eluiert und die daraus amplifizierte, spezifische DNA zur Bestimmung der Bakterienart sequenziert. Anschließend wurden die Rohdaten anhand ihrer Histogramme (Finch TV) zunächst auf ihre Reinheit überprüft. Jede Farbe entsprach jeweils einer spezifischen Base. Exemplarisch wird ein Ausschnitt der reinen Sequenz einer *Klebsiella pneumoniae* (Nukleotidsequenz: 104 - 150) des Patienten IS-05 gezeigt (Abbildung 5). „Rein“ bedeutet in diesem Fall, dass keine übereinander liegenden Basen erkennbar waren, sodass davon auszugehen war, dass die sequenzierte DNA nur von einer Bakterienart stammten.

Des Weiteren konnten zum Teil Mischsequenzen innerhalb der Amplifikate aus einer Bande festgestellt werden, sodass hier die Bakterienart nicht differenziert werden konnte. Da für Patient IS-05 ausschließlich reine Sequenzen ermittelt wurden, wurde ein Beispiel für Mischsequenzen von Patient IS-18 abgebildet (Abbildung 6). Hier war erkennbar, dass mindestens zwei Basen übereinander lagen, sodass nicht klar bestimmt werden konnte, welches Bakterium vorhanden war.

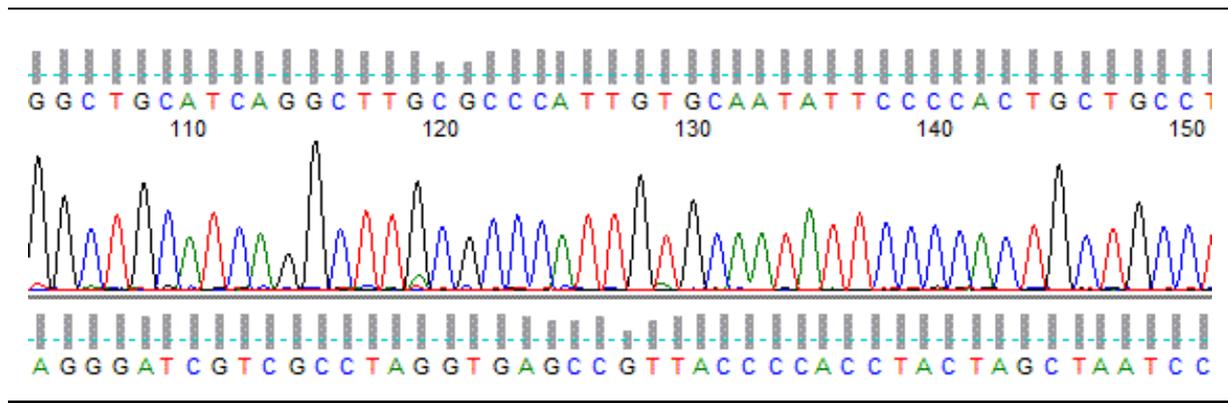


Abb. 5: Reine Sequenz, Histogramm von *Klebsiella pneumoniae*, Patient IS-05, Nukleotidsequenz 104-150.

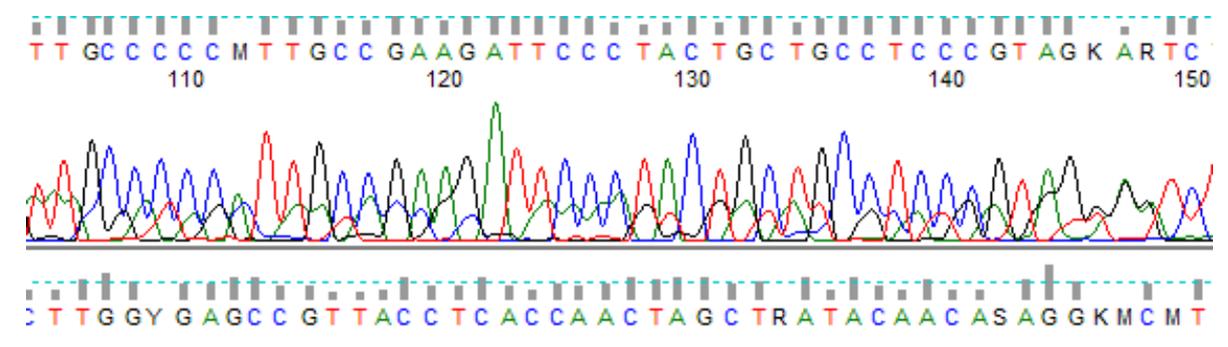


Abb. 6: Mischsequenz, Patient IS-18, Nukleotidsequenz 104-150.

Nach der Analyse der Histogramme wurden die reinen Sequenzen mit der internationalen Datenbank „www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST“ abgeglichen und die Bakterienspezies ermittelt. Die prozentuale Übereinstimmung und der Nukleotidabgleich wurden überprüft und nachgerechnet. Ein Ausschnitt aus dem Datenbankenabgleich der bereits abgebildeten *Klebsiella pneumoniae* Sequenz wird nachfolgend gezeigt (Abbildung 7). Der gezeigte Ausschnitt (Basen 60 - 180) wies eine komplette Übereinstimmung (100%) mit der verglichenen *Klebsiella pneumoniae* auf.

Ein weiterer Ausschnitt aus dem Datenbankenabgleich zeigt die bereits vorgestellte Mischsequenz von Patient IS-18 (Abbildung 8). Diese entsprach zwar zu 96% dem *Streptococcus sp.* es konnten aber durch die Mischsequenzen einige Basen nicht identifiziert werden und wurden abhängig von dem Basenpaar mit K, R, Y etc. charakterisiert (sogenannte Whobble) so dass keine eindeutige Identifizierung der vorgegebenen Sequenz stattfinden konnte.

```

AGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCG 60-120
|||||
AGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCG Probe

GCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTT 121- 180
|||||
GCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTT Probe

```

Abb. 7: Blast Ergebnis, reine Sequenz im Vergleich mit „CP000964.1 *Klebsiella pneumoniae* 342, complete genome“, 100%ige Übereinstimmung, Patient IS-05, Basen 60-180.

```

CCGTAGKARCTCTGGGCSGTGYCTYAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCG 140-196
|||||
CCGTAGCAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCG Probe

GCTATKTRTCGWCGCCTTGGYGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTRATACAACASAGGKM 197-256
|||||
GCTATGTATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATACAACGCAGGTC Probe

```

Abb. 8: Blast Ergebnis, Mischsequenz im Vergleich mit „*Streptococcus sp. oral clone* BP2-67 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence“, Patient IS-18, Basen 140 -256.

4.2.2 Einfluss von Pro- und Antibiotika auf die bakterielle Stuhlflora

Aufgrund des prospektiven, explorativen Charakters der vorliegenden Studie werden nachfolgend exemplarisch Patienten vorgestellt, bei denen entweder eine Reaktion oder kein Einfluss durch pro- und antibiotische Therapien zu verzeichnen sind (Abbildung 9 und 10).

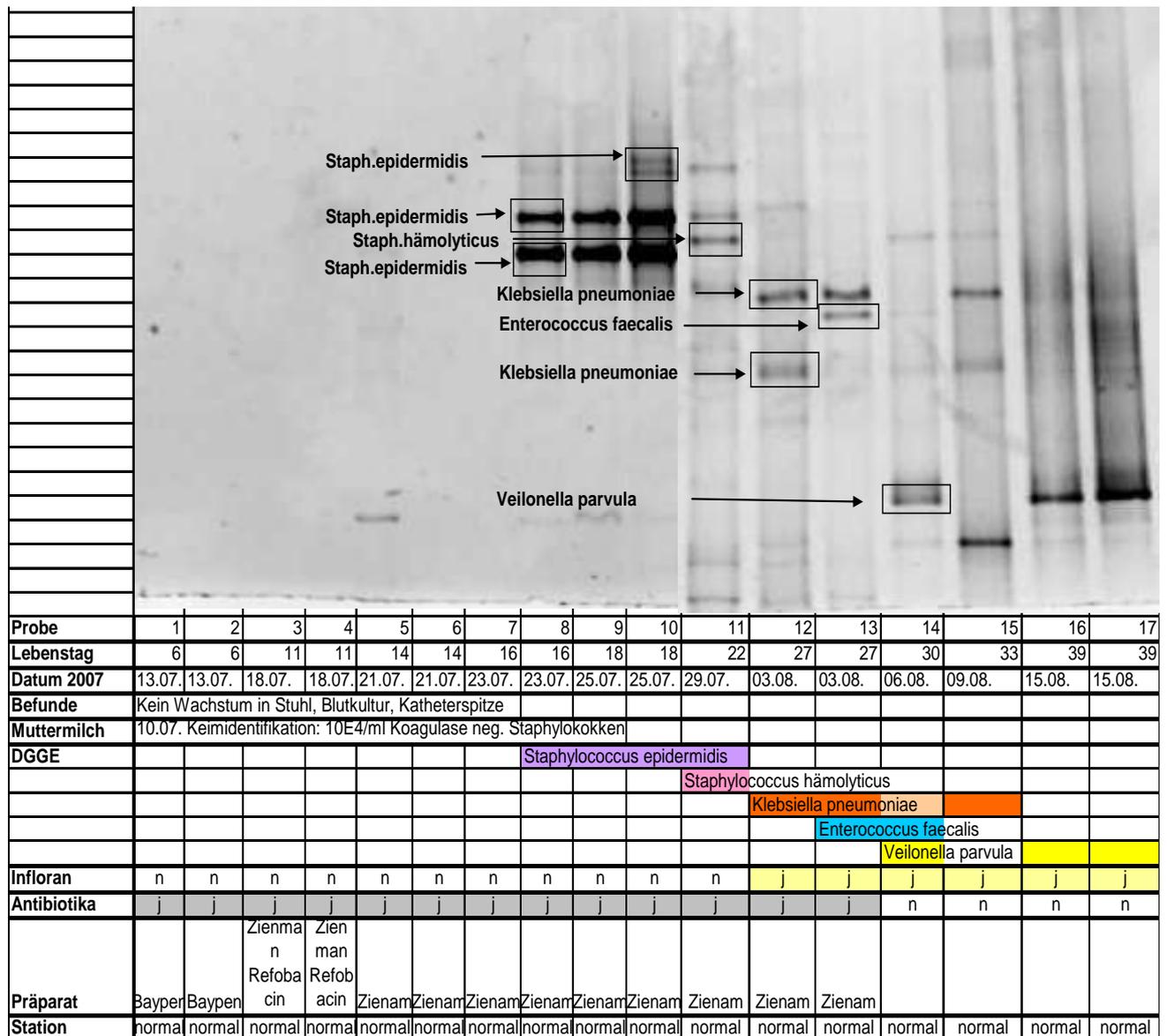


Abb. 9: Dargestellt wurde der Wechsel im Keimspektrum von ausschließlich grampositiven Kokken hin zu einer Mischflora von Grampositiven, Gramnegativen und Anaerobiern nach Beendigung der antibiotischen und Beginn der probiotischen Therapie am Beispiel von Patient IS-03.

Eine Veränderung, die zum gleichen Zeitpunkt wie die Inflorangabe® eintrat, war anhand der bakteriellen Sequenzen von Patient IS-03 zu erkennen. Die erste untersuchte Stuhlprobe stammte vom 6., die letzte vom 39. Lebensstag. Insgesamt wurden 17 Stuhlproben gesammelt und untersucht, davon 6 aus dem Zeitraum mit und 11 ohne Probiotikagabe. Infloran® wurde verabreicht von Tag 26 bis 44, Antibiotika von Tag 1 bis 27. Die antibiotische Therapie beinhaltete in den ersten sechs Lebenstagen Meclozillin, gefolgt von einer Kombination aus Gentamycin und Imipenem für weitere sechs Tage und bis zum Ende der Antibiotikagabe eine Monotherapie mit dem Carbapenem.

Unter antibiotischer Therapie bis zu Lebenstag 27 konnten ausschließlich grampositive *Staphylococci* nachgewiesen werden. Danach traten zeitgleich mit der Inflorangabe® eine Mischflora aus gramnegativen *Klebsiella pneumoniae*, grampositiven *Enterococci* und anaeroben *Veillonella parvula* auf. Das Auftreten der Anaerobier erfolgte bei diesem Patienten zeitgleich mit dem Absetzen des Antibiotikums.

Mittels konventioneller Methoden wurden in der Muttermilch koagulasenegative *Staphylococci sp.* nachgewiesen. Diese konnten in der ersten Stuhlprobe vom 6. Lebenstag in der DGGE nicht mehr nachgewiesen werden, entsprechen aber den Befunden vom 16. bis 22. Lebenstag: durch die DGGE wurden vom 16. bis 22. Tag *Staphylococcus epidermidis*, am 22. Lebenstag *Staphylococcus haemolyticus* nachgewiesen. Von Tag 27 bis 33 konnte eine Besiedlung mit *Klebsiella pneumoniae*, von Tag 27 bis 30 mit *Enterococcus faecalis* und von Tag 30 bis 39 mit *Veillonella parvula* gezeigt werden.

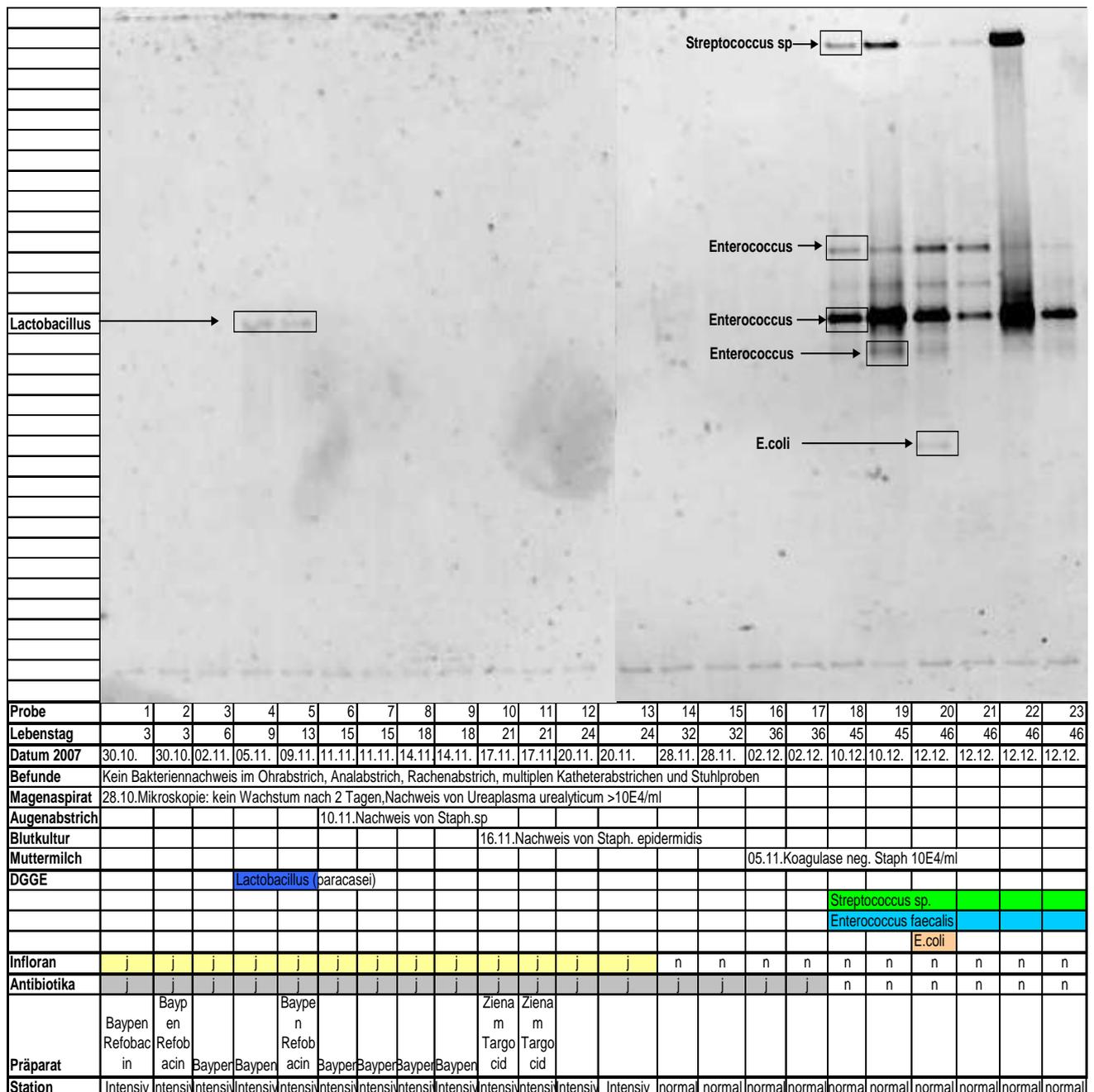


Abb. 10: Fehlende Veränderung der Keimflora durch Pro- und Antibiotikatherapie am Beispiel von Patient IS-18.

Bei Patient IS-18 waren keine auffälligen Befunde durch pro- oder antibiotische Therapie zu verzeichnen. Die erste untersuchte Stuhlprobe stammte vom 3., die letzte vom 46. Lebenstag. Insgesamt wurden 23 Stuhlproben gesammelt und untersucht, davon 13 aus dem Zeitraum mit und 10 ohne Probiotikagabe. Infloran® wurde verabreicht von Tag 6 bis 22, Antibiotika von Tag 1 bis 36. Die antibiotische Therapie bestand in den ersten fünf Tagen aus einer Kombinationstherapie von Gentamycin und Meclozillin, gefolgt von einer Meclocillin-Monotherapie über den restlichen Therapiezeitraum, unterbrochen von einer kurzen Kombination aus Imipenem und Teicoplanin an Tag 20 und 21.

Einige Tage nach Ende der Antibiotikatherapie traten erstmals an Tag 45 eine signifikante Keimzahl auf. Optisch zeigt sich an den Tagen 45 und 46 ein sehr homogenes Muster bakterieller Signaturen gekennzeichnet vorwiegend von grampositiven Kokken. Während der parallel laufenden anti- und probiotischen Therapie konnte an den Tagen 9 und 13 *Lactobacillus casei/paracasei* nachgewiesen werden. Dies ist der einzige Patient, bei dem ein Nachweis aus dieser Bakterienfamilie gelang.

Mittels konventioneller Methoden wurden im Magenaspirat *Ureaplasma urealyticum*, im Augenabstrich *Staphylococci sp.*, in der Blutkultur *Staphylococci epidermidis* und Koagulasenegative *Staphylococci sp.* in der Muttermilch nachgewiesen. Die im Magenaspirat am ersten Lebenstag nachgewiesenen Ureaplasmen konnten mittels DGGE ebenso wenig verifiziert werden wie die in Blutkultur und Augenabstrich nachgewiesenen Staphylokokken. Durch die DGGE wurden vom 9. bis 13. Lebenstag *Lactobacillus casei/paracasei*, vom 45. bis 46. Lebenstag sowohl *Streptococcus sp.* als auch *Enterococcus faecium* und in einer Probe von Tag 46 *Escherichia coli* nachgewiesen.

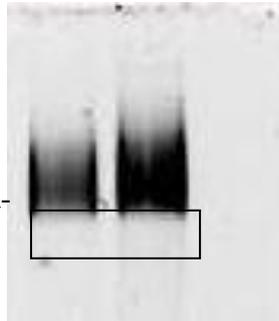
4.2.3 Neugeboreneninfektionen

Wie erwartet waren die ersten Stuhlproben (Mekonium) meist steril bzw. ließen sich nur wenige Keime nachweisen. Bei zwei Patienten konnte jedoch eine konnatale bakterielle Infektion durch molekulare Analyse von Mekonium festgestellt werden (Abbildung 11).

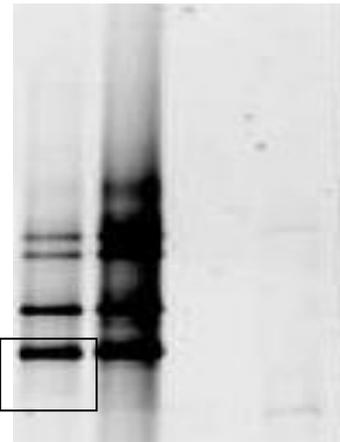
Bei Patient IS-04 konnte mittels 16S rDNA PCR DGGE eine Neugeboreneninfektion mit *Ureaplasma urealyticum* nachgewiesen werden. Diese bestätigte sich am zweiten Lebenstag in den konventionellen, kulturellen Methoden im Magenaspirat. Im Mekonium konnten durch bakteriologische Reinkulturen keine Besiedlung gezeigt werden, wohl aber bereits am ersten Tag durch die DGGE. Ähnliches galt für Patienten IS-02. Hier konnte durch DGGE am sechsten Lebenstag und mittels kultureller Methoden am zweiten Lebenstag im Stuhl bzw. im Magen- und Bronchialaspirat eine Infektion mit *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen werden.

Das individuelle Keimspektrum beider Patienten in Zusammenschau mit den kulturellen Befunden und medikamentösen Interventionen wird ebenfalls dargestellt. Die Stuhlproben der Tage nach den Infektionen zeigten sich unter laufender antibiotischer Therapie steril, bevor eine erneute Besiedlung begann (Abbildung 12 und 13).

Ureaplasma urealyticum



Staphylococcus epidermidis



Probe	1	2	3
Lebenstag	1	1	5
Magenaspirat	U. urealyticum (2. Lebenstag)		
Absaugesekret	Staph.warneri		
DGGE	U. urealyticum (1. Lebenstag)		

Probe	1	2	3	4
Lebenstag	6	6	9	9
Magenaspirat	S. epidermidis (2. Lebenstag)			
Bronchialaspirat	S. epidermidis (2. Lebenstag)			
Mekonium	Kein Nachweis			
DGGE	S. epidermidis (6. Lebenstag)			

Abb. 11: Ausschnitt der DGGE von Patienten mit connataler Infektion. IS-04 mit Nachweis von *Ureaplasma urealyticum* und IS-02 mit *Staphylococcus epidermidis*.

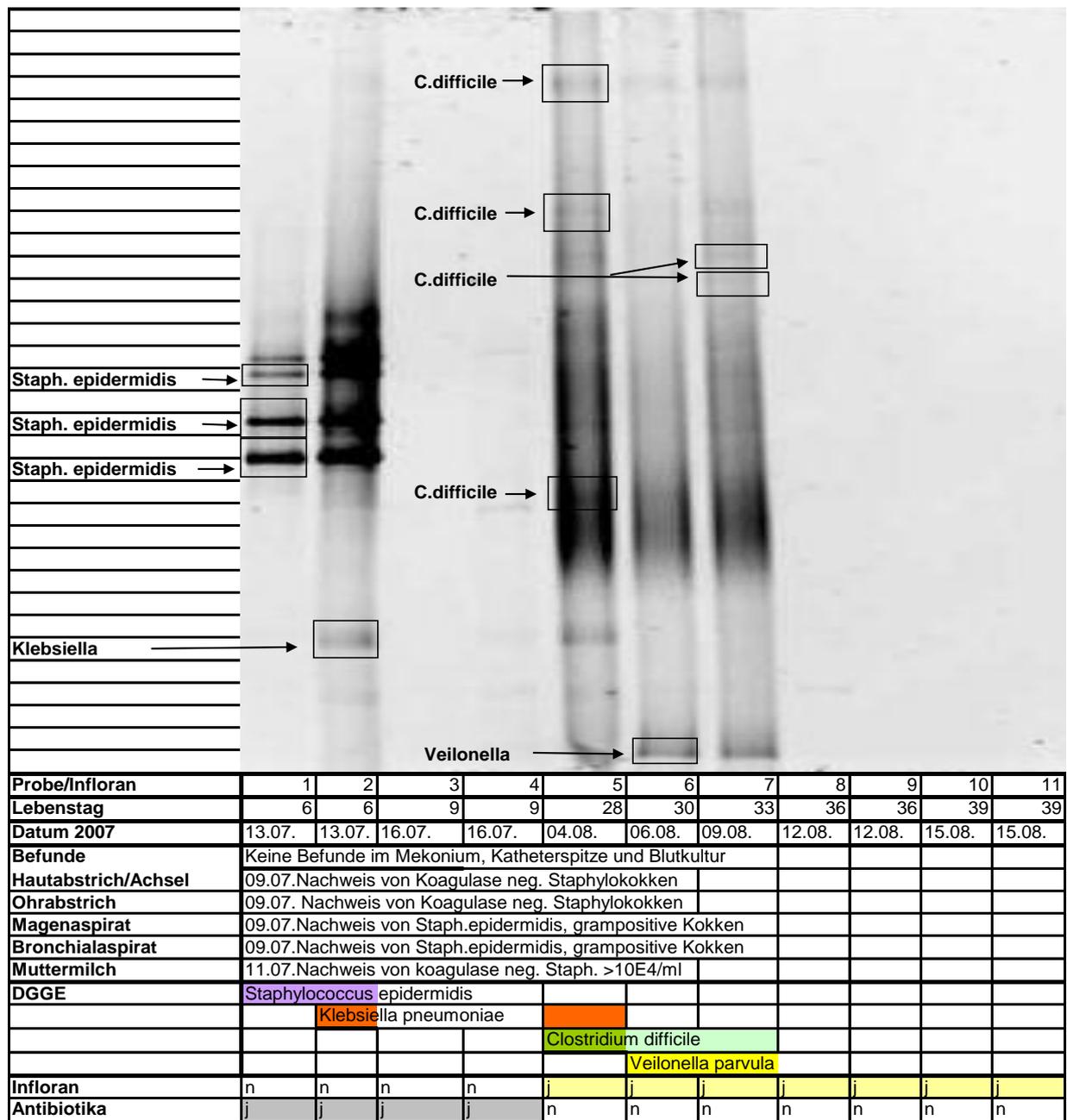


Abb. 12: Individuelles Muster der Darmflora (genomischer Fingerabdruck) bei Patient IS-02.

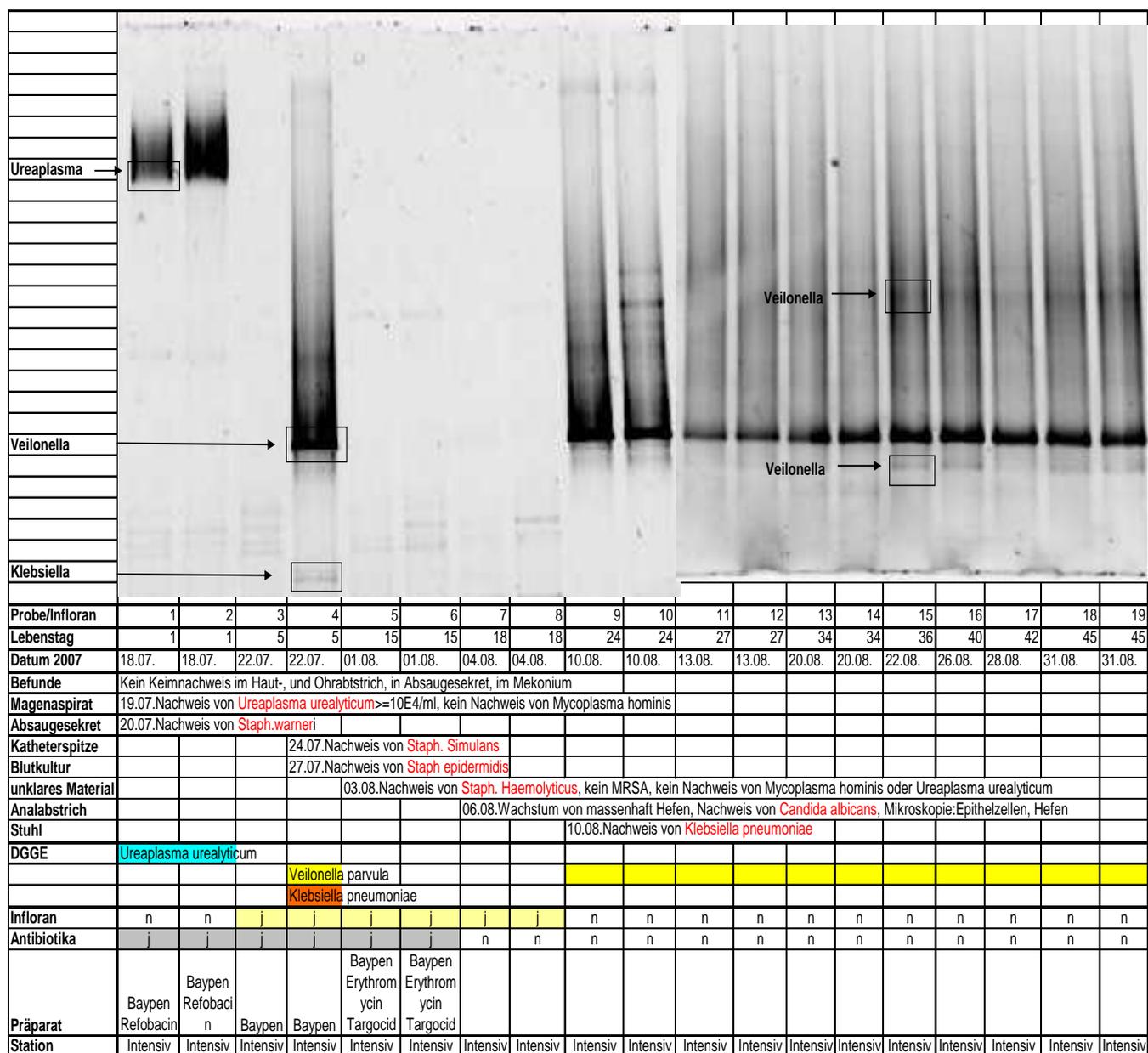


Abb. 13: Individuelles Muster der Darmflora (genomischer Fingerabdruck) bei Patient IS-04.

4.2.4 Zusammenfassung: Individuelle Verläufe

Insgesamt kann festgestellt werden, dass durch die Methode der PCR DGGE eine sehr umfassende Darstellung der individuellen bakteriellen Stuhlflora eines jeden Patienten gewährleistet wurde. Dies ermöglichte die genaue Beurteilung und Auswertung der Befunde. Es ergaben sich für jeden Patienten individuelle Bakteriensignaturen, die sich im zeitlichen Ablauf veränderten. Eine statistische Auswertung begleitender Einflüsse wie antibiotische Therapie, Ernährung oder Probiotikagabe war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich, wohl aber für einzelne Patienten wie bei Patient IS-03 und IS-18 dargestellt wurde. Anhand von Patient IS-

05 wurde exemplarisch gezeigt, wie durch die DGGE-Analyse ein spezifisches Keimmuster, der sogenannte „genomische Fingerabdruck“, dargestellt werden kann. Dieses konnte nun mit klinischen Einflüssen in Zusammenhang gebracht und individuell ausgewertet werden. In zwei Fällen gelang der genotypische Bakteriennachweis im Mekonium einer (Neugeborenen-) Infektionen mit *Ureaplasma urealyticum* und *S.epidermidis*, die durch konventionelle Methoden bestätigt wurde.

4.3 Chronologie der Besiedlung (kumulativ)

Zunächst wurde das Mekonium analysiert. Dieses war abgesehen von den zwei, bereits vorgestellten Neugeboreneninfektionen, steril. Mittels konventioneller Methoden konnte weiterhin nebenbefundlich bei einem Patienten (IS-15) *Candida albicans* nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich, dass im Mekonium der untersuchten Patienten mittels DGGE in 80% der Fälle und durch konventionelle mikrobiologische Methoden in 89% keine Besiedlung nachgewiesen werden konnte (Tabelle 10).

Tabelle 10: Stuhlproben der ersten Lebenswoche (Mekonium).

	Patienten	Stuhl (DGGE)	Stuhl (konventionell)
GruppeA (n=7)	IS-04	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
	IS-05	-	-
	IS-14	-	-
	IS-15	nt	<i>Candida albicans</i>
	IS-16	-	nt
	IS-18	-	-
	IS-20	nt	nt
GruppeB (n=5)	IS-02	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
	IS-03	-	nt
	IS-06	-	-
	IS-09	-	-
	IS-21	-	-
Insgesamt		80% nicht besiedelt	89% nicht besiedelt

nt= not tested , - = no colonisation

4.3.1 Besiedlung in den ersten Lebenswochen

In den untersuchten Stuhlproben der ersten Lebenswochen wurde zunächst eine Besiedlung mit Gramnegativen nachgewiesen, dicht gefolgt von Grampositiven und anschließend von Anaerobiern (Abbildung 14). Auf beide Gruppen bezogen lag der Median der Gramnegativen bei Tag 9, der Grampositiven bei Tag 16 und der Anaerobier an Tag 27. In Bezug auf die ein-

zelen Gruppen lag der gramnegative Median bei Gruppe A an Tag 9, bei Gruppe B an Tag 18, der der Grampositiven für Gruppe A an Tag 22 und für Gruppe B an Tag 9 und bei den Anaerobiern für Gruppe A an Tag 21 und für Gruppe B an Tag 28 (Abbildung 15). In der Einzeldarstellung zeigte sich, dass der Median bei Gruppe B für Gramnegative nach dem für Grampositive liegt. Dies unterschied sich von dem Gesamtmedian und dem von Gruppe A. Aufgrund der geringen Fallzahl war jedoch keine statistische Auswertung möglich.

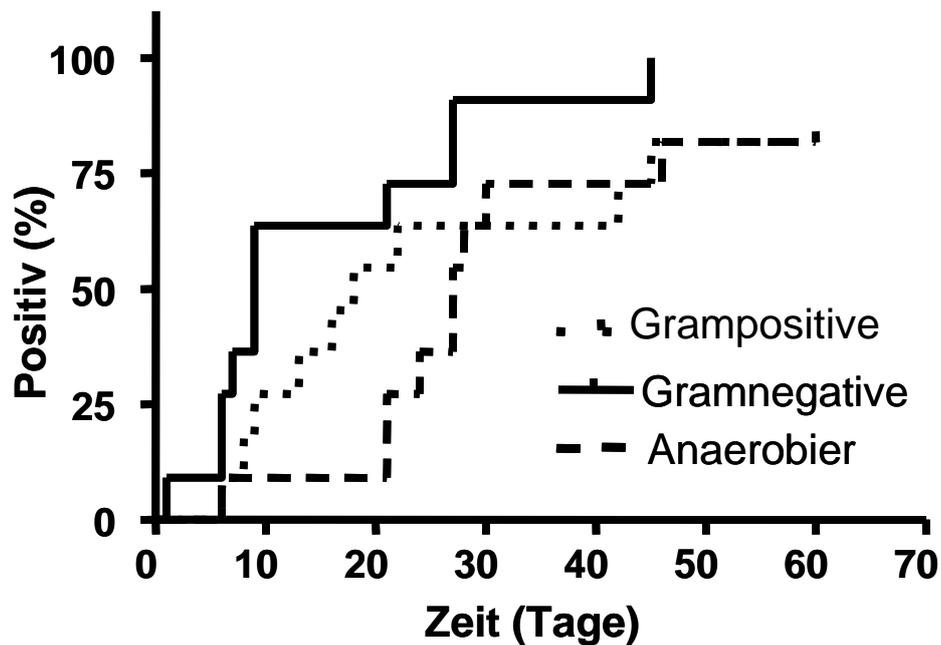


Abb. 14: Chronologie der enteralen Besiedlung für Bakteriengruppen. Dargestellt wurde eine Verlaufsanalyse mit gramnegativen, grampositiven und anaeroben Keimen für Gruppe A und Gruppe B zusammen, dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve.

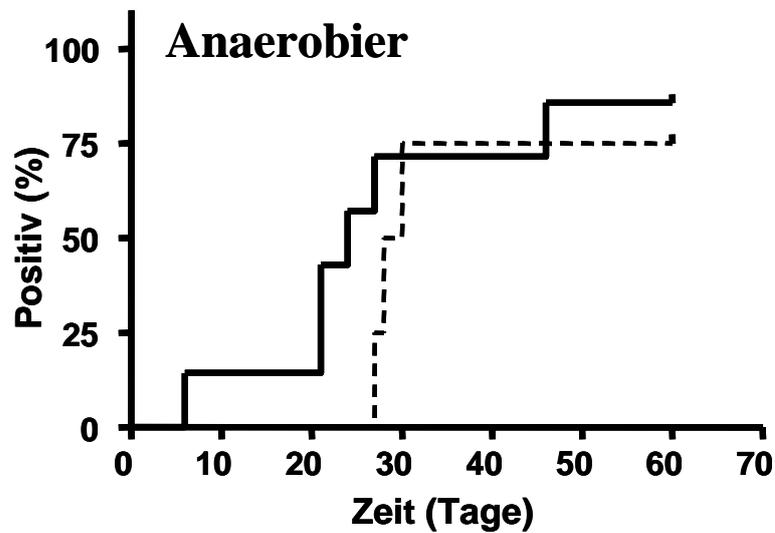
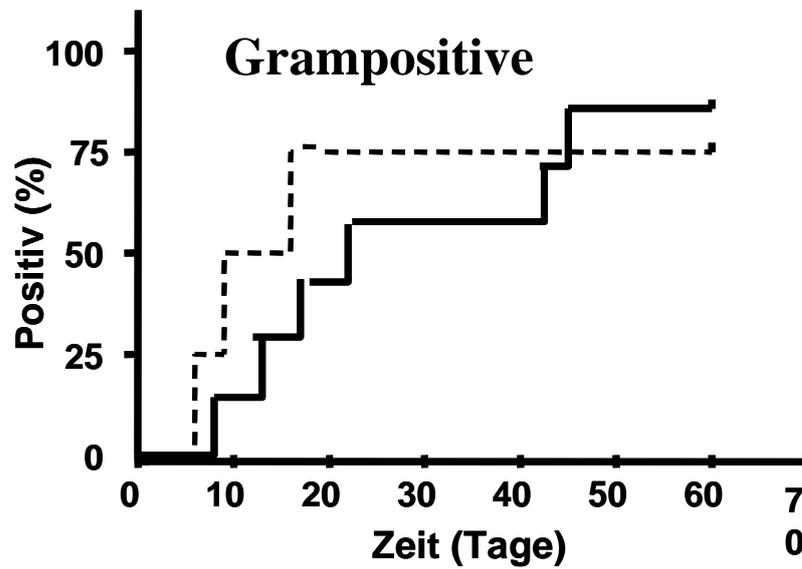
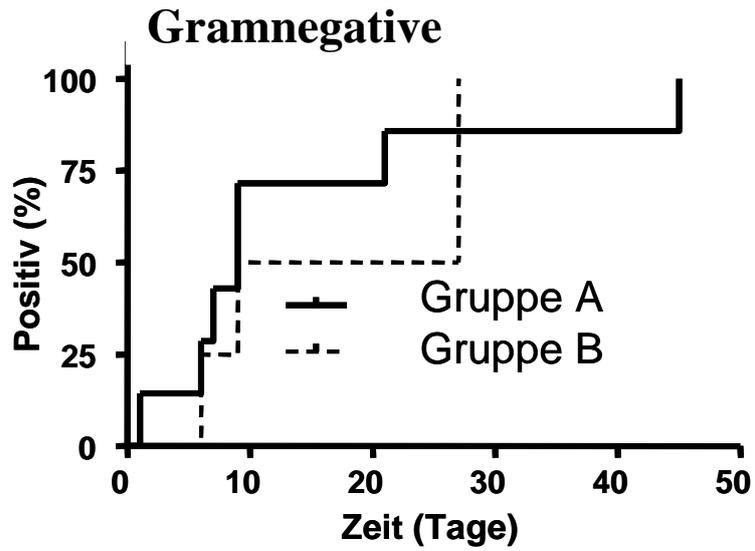


Abb. 15: Chronologie der enteralen Besiedlung für Bakteriengruppen. Dargestellt wurden

Einzelanalysen der Verlaufsanalyse mit gramnegativen, grampositiven und anaeroben Keime für Gruppe A und Gruppe B im Vergleich, dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve.

4.3.2 Qualitativer Nachweis der Bakterienspezies

Insgesamt konnten in den über 300 untersuchten Stuhlproben 16 verschiedene Bakterienarten nachgewiesen werden. Die erfassten Keime werden nachfolgend tabellarisch dargestellt und dem jeweiligen Patienten zugeordnet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Sequenzierungsergebnisse nach DGGE: Kompletter Überblick nachgewiesener Bakterien.

Bakterium	Patient (Gruppe A)	Bakterium	Patient (Gruppe B)
Ureaplasma urealyticum	IS-04	Staphylococcus epidermidis	IS-02
Veillonella parvula		Klebsiella pneumoniae	
Klebsiella pneumoniae		Clostridium difficile	
Klebsiella pneumoniae	IS-05	Veillonella parvula	IS-03
Enterococcus faecium		Staphylococcus epidermidis	
Clostridium difficile		Staphylococcus haemolyticus	
Veillonella parvula	IS-14	Klebsiella pneumoniae	IS-09
Klebsiella pneumoniae		Enterococcus faecalis	
Streptococcus salivarius		Veillonella parvula	
Veillonella sp.	IS-15	Staphylococcus epidermidis	IS-21
Clostridium difficile		Enterobacter	
Lactococcus lactis		Escherichia coli	
Enterococcus faecalis		Escherichia coli	
Klebsiella pneumoniae		Clostridium difficile	
Burkholderia	IS-16		
Enterococcus faecalis			
Klebsiella pneumoniae			
Lactococcus lactis			
Veillonella sp.	IS-18		
Lactobacillus sp.			
Streptococcus sp.			
Enterococcus faecalis			
Escherichia coli	IS-20		
Staphylococcus haemolyticus			
Escherichia coli			
Veillonella sp.			

Die Kumulativdarstellung im Gruppenvergleich zeigt, in wie viel Prozent der Patienten die jeweiligen Bakterienspezies nachweisbar waren (Tabelle 12). An grampositiven Bakterien waren Staphylokokken in 80% der Patienten aus der Gruppe B vertreten, sowie in 14% der Patienten aus Gruppe A. Enterokokken wurden in Patienten aus Gruppe A mit 57% häufiger

erfasst als in Patienten aus Gruppe B mit 20%. In beiden Gruppen wurden aus dem gramnegativen Bereich in insgesamt 58% der Patienten *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen, wobei auch diese öfter in Gruppe A zu finden waren (71% Gruppe A, 40% Gruppe B). Aus dem anaeroben Bereich wurden in Patienten der Gruppe A *Veillonella sp.* zu 86% nachgewiesen und in Patienten der Gruppe B in 40%. Interessanterweise konnte *Lactobacillus sp.* lediglich einmal in Patient IS-18 und *Bifidobacterium infantis* gar nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt wurde gezeigt, dass grampositive Kokken, *Klebsiella* und *Veillonella* in beiden Gruppen die Darmflora dominierten, wobei auch hier berücksichtigt werden musste, dass aufgrund der limitierten Patientenzahl keine statistische Aussage möglich war.

Tabelle 12: Sequenzierungsergebnisse: Prozentuale Angabe nachgewiesener Bakterien bezogen auf die Patienten.

	Bakterium	Beide Gruppen (n=12)	Gruppe A (n=7) (1.-3. Woche)	Gruppe B (n=5) (4.-6. Woche)
Grampositive	Staphylococcus sp.	5 (42%)	1 (14%)	4 (80%)
	Staph. epidermidis	3 (25%)	0 (0%)	3 (60%)
	Staph. haemolyticus	2 (16%)	1 (14%)	1 (20%)
	Streptococcus sp.	2 (16%)	2 (29%)	0 (0%)
	S. spp.	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)
	S. salivarius	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)
	Enterococcus sp.	5 (42%)	4 (57%)	1 (20%)
	E. faecalis	4 (33%)	3 (43%)	1 (20%)
	E. faecium	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)
	Lactococcus lactis	2 (16%)	2 (29%)	0 (0%)
Gramnegative	Klebsiella pneumoniae	7 (58%)	5 (71%)	2 (40%)
	Escherichia coli	4(33%)	2 (29%)	2 (40%)
	Ureaplasma urealyticum	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)
	Enterobacter	1 (8%)	0 (0%)	1 (20%)
	Burkholderia	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)
Anaerobier	C. difficile	4 (33%)	2 (29%)	2 (40%)
	Veillonella sp.	7 (58%)	5 (86%)	2 (40%)
	V. parvula	5 (42%)	3 (43%)	2 (40%)
	V. sp.	3(25%)	3 (43%)	0 (0%)
	Lactobacillus sp.	1 (8%)	1 (14%)	0 (0%)

4.3.3 Zusammenfassung kumulativer Befunde

Nach Darstellung der kumulativen Befunde konnte gezeigt werden, dass sich die prozentuale Verteilungshäufigkeit der Bakterienspezies zwischen beiden Gruppen unterschied, insgesamt jedoch ein ähnliches Bakterienspektrum zu verzeichnen war. Die in Infloran® enthaltenen

Bifidobacteria und *Lactobacilli* konnten mittels DGGE bis auf eine Ausnahme bei Patient IS-18 nicht nachgewiesen werden.

Die chronologische Reihenfolge, in der die Bakterien den sterilen Magen-Darm-Trakt der Neugeborenen besiedelten, begann mit Gramnegativen, gefolgt von Grampositiven und schließlich Anaerobiern. Die in der ersten Lebenswoche abgesetzten Stuhlproben waren in 80% mit der DGGE als Nachweismethode und 89% mit konventionellen Methoden steril.

5 Diskussion

5.1 Kritische Analyse der klinischen Studie

Bei der klinischen Studie handelte es sich um eine randomisierte, kontrollierte, prospektive Untersuchung zum Einsatz von Probiotika zur Prävention von NEC. Die Patienten beider Interventionsgruppen wiesen gleiche klinische Merkmale und Befunde auf, sodass hier das Risiko eines Bias gering ist. Das gewählte „cross over“ Studiendesign trägt den aktuellen Debatten Rechnung, die fordern, aus ethischen Gründen keine placebokontrollierten Studien mehr durchzuführen. Zudem konnte somit eine studieninterne Kontrollgruppe geschaffen werden. Bezüglich der inhaltlichen Analyse der klinischen Studie wird an die separate Doktorarbeit der Kinderklinik des Universitätsklinikums des Saarlands verwiesen.

5.2 Beurteilung der mikrobiologischen Ergebnisse

5.2.1 Kritische Analyse der kumulativen Ergebnisse

Die bakterielle Besiedlung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stuhlproben begann chronologisch mit fakultativ aeroben und gramnegativen, gefolgt von grampositiven Bakterien und anschließend erfolgte die verzögerte Besiedlung mit anaeroben Mikroorganismen. Im Vergleich von beiden Gruppen zeigt sich in Gruppe B (Woche 4 bis 6) der Median der Grampositiven vor dem der Gramnegativen. Dies ist abweichend von der Gesamtwertung und Befunden der Gruppe A, bei der Bewertung ist die limitierte Fallzahl mit einzubeziehen. Die verzögerte Besiedlung mit anaeroben Mikroorganismen stimmt mit den bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Darmflora Frühgeborener überein (Caicedo 2005, Gewolb 1999).

In beiden Gruppen ist, in den von uns analysierten Stuhlproben ein ähnliches Keimspektrum mit grampositiven Kokken, *Klebsiella* und *Veillonella* zu verzeichnen. Die Dominanz von *Veillonella sp* ist auffällig, konnte aber bereits in vorangegangenen Untersuchungen bei Frühgeborenen nachgewiesen werden (Claud 2008, Mackie 1999). Ihr vermehrtes Vorkommen ist möglicherweise mit der residenten Krankenhausflora oder einer sehr hohen Übereinstimmung zur Primersequenz zu erklären. Die dominanten Keime *Klebsiella*, *Staphylococci*, und *Enterococci* entsprechen der Datenlage zum unreifen Gastrointestinaltrakt. Ebenfalls ins Keimspektrum des Frühgeborenen passen die nachgewiesenen *Clostridia sp.*, *E.coli* und *Enterococci*,

die bei diesen Kindern nach heutigem Wissensstand vermehrt auftreten (Magne 2005, Westerbeek 2006). Der Nachweis von koagulasenegativen Staphylokokken kann zudem auch durch ihr häufiges Vorkommen in Muttermilch erklärt werden (Gewolb 1999).

5.3 Analyse der Einzelfalldarstellung

5.3.1 Methode der PCR-DGGE am Beispiel IS-05

Mit der DGGE wurde eine Kultur-unabhängige Methode zur Analyse komplexer bakterieller Lebensgemeinschaften für die Stuhl Diagnostik am Universitätsklinikum des Saarlands entwickelt. Die DGGE wurde bisher vorwiegend in der Umwelttechnologie, zur Bodenanalyse und Identifizierung von Mikroorganismen in Biofilmen und Schwammarten (Millar MR 1996) sowie zur Analyse von Zahnplaques (Da la Cochetiere 2004) verwendet. In dieser Studie wird die DGGE zum einen der ersten Male zur Klärung des mikrobiellen Einflusses von Probiotika auf die Darmflora Frühgeborener verwendet (Schwiertz 2003). Wir entschieden uns für diese Untersuchungstechnik, auf Grund des nicht-selektiven Ansatzes zum Nachweis komplexer Darmkeime. Dieser konnte durch die initial propagierten, spezifischen Methoden wie die Multiplex-PCR nicht gewährleistet werden. Nachteil dieser Techniken war gerade die Spezifität, die die Möglichkeit verwehrte auch Mikroorganismen nachzuweisen, die nicht explizit gesucht wurden. Die DGGE verschaffte durch die optische Darstellung und nachfolgender Sequenzierung prädominanter bakterieller Signaturen einen unselektiven Blick auf das Mikrobiom der Probanden. Dadurch konnten auch indirekte Effekte der Probiotika auf das Keimspektrum erkannt werden (Favier 2002).

Die mikrobiologischen Befunde wurden aufgrund des explorativen Charakters der Studie exemplarisch vorgestellt, als Beispielkandidat galt Patient IS-05. Anhand dieser Vorstellung war der Analysevorgang gut nachvollziehbar. Es zeigte sich, dass mittels der DGGE visuell die Entwicklung des Keimspektrums der ersten Lebenswochen gut zu erkennen ist. Durch nachfolgende Sequenzierung konnten spezifische Erreger nachgewiesen werden. Entwicklungen im zeitlichen Verlauf beispielsweise bezüglich der Pro- und Antibiotikagabe wurden aufgezeigt. Bei Pat. IS-05 traten unter laufender Therapie mit Meclozillin *Klebsiella* und *E. faecium* auf, die von diesen Antibiotika nicht erfasst werden (Lüllmann 2006). Das zeitgleich gegebene Infloran® hatte keinen sicher erkennbaren Effekt auf die Darmflora. Nach Ende beider Therapien traten gramnegative *Clostridium difficile* und anaerobe *Veillonella parvula* auf. Diese Befunde könnten aber auch dem regulären Verlauf der bakteriellen Kolonisation bei

Frühgeborenen entsprechen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass mit der DGGE Keime erfasst wurden die durch konventionelle Methoden nicht nachgewiesen wurden. Allgemeingültige Rückschlüsse können aus den Einzelfalldarstellungen nicht gezogen werden.

5.3.2 Einfluss durch Pro- und Antibiotika

Grundsätzlich bestehen verschiedene Möglichkeiten, auf die gastrointestinale Flora einzuwirken. Antibiotika haben einen starken Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung im Darm. Durch diese Medikamente werden sowohl protektive als auch schädliche Mikroorganismen erfasst, sodass die Gesamtkeimzahl reduziert und die Zusammensetzung verändert wird.

Da die Stuhlflora bei Früh- und Neugeborenen in den ersten Lebenswochen einem natürlichen Wandel unterzogen ist, war die Untersuchung exogener Einflüsse durch Probiotika bzw. antibiotische Therapie eingeschränkt. Kumulative Aussagen bezüglich der Veränderungen des Keimspektrums unter Infloran® oder Breitbandantibiose konnten nicht getroffen werden. Es konnten jedoch anhand exemplarisch vorgestellter Patienten Beispiele für und wider einer Veränderung des Keimspektrums nach entsprechenden Therapien gezeigt werden.

Ein Beispiel für eine solche Veränderung stellt Patient IS-03 dar. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass unter laufender Antibiose ausschließlich potentiell-pathogene Keime wie *Staphylococci* (*S.hämolyticus*, *S.epidermidis*) und *Klebsiella sp.* nachzuweisen waren. Es besteht also ein recht homogenes Bild ohne protektive oder anaerobe Mikroorganismen, da diese vermutlich von der antibiotischen Breitbandtherapie erfasst wurden. Eine Normalisierung der Keimflora erfolgte erst nach Absetzen der Therapie.

Patient IS-18 hingegen zeigt keine so eindeutige Reaktion auf die Antibiotikagabe. Hier erfolgte die Pro- und Antibiotikagabe zeitgleich. Als einziger Keim konnte in diesem Zeitraum *Lactobacillus casei/paracasei* nachgewiesen werden. Dass sich hier ein normales Keimspektrum erst nach 45 Tagen entwickelt, also 9 Tage nach Absetzen der antibiotischen Therapie und vorher ebenfalls kaum Mikroorganismen nachgewiesen wurden, könnte zwar an der recht langen Antibiotikatherapie liegen (36 Tage), ist aber an dem vorliegendem DGGE-Profil nicht eindeutig nachzuvollziehen.

Eine Reaktion auf die Probiotika zeigt sich bei dem exemplarisch vorgestellten Patienten IS-03. Hier ändert sich an Tag 27, dem zweiten Tag der probiotischen- und dem Letzten der antibiotischen Therapie, das Muster bakterieller Signaturen von grampositiven (*Staphylococci*) zu gramnegativen Mikroorganismen (*Klebsiella pneumoniae*), grampositiven *Enterococci*

und ab Lebensjahr 30 auch zu *Veillonella parvula*. Diese Befunde zeigen, dass mit Beginn der probiotischen Therapie fakultative Pathogene von Keimen der residenten Normalflora wie *Veillonella parvula* und *Enterococci* abgelöst wurden. Nach Absetzen dieser Antibiotika und Beginn der Probiotika kolonisierte zwar zunächst noch *Klebsiella sp.*, im Verlauf stellte sich aber eine ausgeglichene Keimflora ein. Hier ist also eine positive Veränderung des Keimspektrums durch Ende der antibiotischen und Beginn der probiotischen Therapie zu verzeichnen.

Patient IS-18 hingegen zeigt keine Veränderung des Keimspektrums unter Probiotikatherapie. In diesem Zeitraum wurde mit der DGGE von Tag 9 bis 13 mit 98%iger Übereinstimmung *Lactobacilli casei/paracasei* nachgewiesen. Andere Mikroorganismen wurden unter paralleler Infloran®- und Antibiotikaintervention nicht nachgewiesen. Erst drei Wochen nach Absetzen des Probiotikums kam es zur Kolonisation mit *Streptococci sp.*, *Enterococci faecalis* und *E.coli*, also Mikroorganismen der Normalflora.

Zusammenfassend können sehr individuelle Veränderungen im Keimspektrum unter der Therapie mit Infloran® auftreten, die keine Aussagen über die Kausalität zulassen. Dennoch sind positive Effekte erkennbar. So traten bei paralleler Anti- und Probiokagabe als einzige Keime protektive *Lactobacilli casei/paracasei* auf. Bei einem weiteren Patienten wurde erst nach Beginn der Infloranthherapie® und Absetzen der Antibiose ein normalisiertes Keimspektrum festgestellt.

5.3.2.1 Geringer Nachweis probiotischer Mikroorganismen

Lactobacilli sp. konnte bei Patienten IS-18 von Tag 9 bis 13 nachgewiesen werden, Bifidobakterien zu keinem Zeitpunkt. Ein Nachweis dieser Bakterien aus Stuhlproben Frühgeborener gelingt generell selten, da der Gastrointestinaltrakt dieser Patienten meist wenig mit protektiven Bakterien besiedelt ist (Magne 2005, Westerbeek 2006). Da den in der vorliegenden Arbeit analysierten Patienten über drei Wochen hinweg Probiotika mit *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* verabreicht wurden bedarf der geringe Nachweis dieser Bakterien einer intensiveren Analyse.

Die Ursachen für den geringen Nachweis probiotischer Mikroorganismen sind vermutlich multifaktoriell. Zum einen vermutet man, dass Probiotika nur transient besiedeln, also nach Absetzen der Therapie und Ablauf eines gewissen Zeitraums nicht mehr im Darm und im Stuhl nachweisbar sind (Bourlioux 2003, Isolauri 2007, Magne 2005). Dies bedeutet, dass in der klinischen Studie der Zeitraum, in dem die probiotischen Bakterien überhaupt erfasst wer-

den konnten, sehr kurz war. Ist nur eine geringe Menge an probiotischer DNA in einer Probe enthalten, kann diese mitunter nicht von den Universalprimern erfasst werden (Da la Cochetiere 2004). Gerade Bifidobakterien sind aufgrund der erhöhten Sequenzunterschiede schwer mit Universalprimern nachzuweisen (aus: Rougé 2010).

Eine weitere mögliche Ursache ist, dass die probiotischen Bakterien ihre Effekte gar nicht direkt durch Kolonisation erreichen und somit auch im Stuhl nicht oder nur sehr gering vorhanden sind. Bei einer bisher angenommenen Kolonisationsrate von 60% bis 80% bei *Lactobacilli* (Da la Cochetiere 2004) ist es möglich, dass in der vorliegenden Studie die Kolonisationsrate eher unterdurchschnittlich lag. Die in vorangegangenen Studien nachgewiesenen klinischen Verbesserungen (Lin HC 2005, Lin HC 2008) wären unter anderem durch immunmodulatorische, indirekte Effekte zu erklären. Das würde bedeuten, dass probiotische Keime ihre Wirkung vorwiegend durch Interaktionen mit den Oberflächenrezeptoren des Darmepithels erzeugen. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, haben probiotische Bakterien immunmodulatorische Wirkungen und verhindern somit überschießende Entzündungsreaktionen, die an der Pathogenese der NEC beteiligt sind. Des Weiteren erwirken sie durch die Produktion bakterizider Substanzen eine Reduktion pathogener Keime. Dies würde heißen, dass Bifidobakterien und Laktobazillen durch Einnahme von Probiotika die Flora Reifgeborener nicht direkt imitieren, sondern über indirekte Effekte wirken. Somit gehörten sie auch nicht zur prädominanten Bakterienflora im Stuhl und sind von daher nur schwer mit der DGGE zu erfassen (Jossens 2010).

Eine weitere mögliche Erklärung ist in der Antibiotikasensitivität probiotischer Keime zu finden. Die untersuchten Patienten erhielten im Durchschnitt in den ersten drei Lebenswochen eine antibiotische Breitbandtherapie. Bereits Blakey et al. (Blakey 1982) konnten in ihrer Studie keine *Lactobacilli* bei zeitgleicher Antibiotikaintervention nachweisen. Auch Magne et al. (Magne 2005) resümieren in ihrem Artikel, dass eine Parallelintervention von Pro- und Antibiose wenig sinnvoll sei, da die protektiven Keime sofort vernichtet würden. Millar et al. (Millar MR 1993) konkretisieren dies, indem sie insbesondere Flucloxacillin und Netilmicin als *Lactobacilli*-erfassende Antibiotika erwähnten. Durch diese intravenöse Antibiotikatherapie reduzierte sich bei einigen der dort untersuchten Kindern die Besiedlung mit *Lactobacilli* um den Faktor 10^4 . Da *Lactobacilli* weitestgehend Penicillin- und Cephalosporin sensibel sind und sowohl in unserer Untersuchung, als auch in der von Millar et al. diese Antibiotika verwendet wurden, ist hierin eine Erklärung für den geringen Nachweis probiotischer Mikroorganismen zu finden.

Eine weitere Erklärung ist in den methodischen Limitationen und der klinischen Durchführung zu finden. Durch Einsatz von Universalprimern und bei einer unregelmäßigen Probenasservierung konnten einige Keime weniger erfolgreich erfasst werden. Bei angenommenen sieben Tagen von Beginn der probiotischen Therapie bis zur Kolonisation und einer insgesamt nur dreiwöchigen Intervention ist es denkbar, dass in den nicht entnommenen Stuhlproben *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* enthalten waren (Awad 2010).

5.3.3 Neugeboreneninfektionen

Mittels DGGE wurde in Gruppe A bei IS-04 eine Besiedlung des Mekoniums mit *Ureaplasma urealyticum* nachgewiesen. Der frühzeitige Nachweis direkt postnatal spricht für eine bereits intrauterin erworbene Neugeboreneninfektion. Diese bestätigte sich am zweiten Lebenstag in den konventionellen, kulturellen Methoden im Magenaspirat, im Mekonium konnte durch diese Methode jedoch keine Besiedlung festgestellt werden. Die DGGE mit anschließender Sequenzierung ist folglich zur Detektion von Neugeboreneninfektionen ebenfalls nutzbar und erheblich sensibler als herkömmliche, kulturelle Methoden.

Bei Patient IS-02 aus Gruppe B wurde in der ersten Stuhlprobe von Tag 6 *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Bereits am 2. Lebenstag wurde im Magensaft und Bronchialsekret mittels kultureller Methoden ebenfalls *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Dies stützt die These, dass es sich hier ebenfalls um eine Neugeboreneninfektion handelt. Alternativ könnte die Besiedlung auch schon der regulären Darmflora entsprechen, da am 6. Lebenstag bei Frühgeborenen oftmals die Besiedlung mit Grampositiven beginnt.

Mittels konventioneller Methoden wurde lediglich in IS-15 eine Besiedlung im Mekonium festgestellt, bei dem sich *Candida albicans* nachweisen ließen. Dies konnte durch die DGGE nicht bestätigt werden, da die hierfür eingesetzten Primer keine Hefen erfassen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die PCR-DGGE zur Detektion von Neugeboreneninfektionen gut geeignet ist.

5.4 Vergleich zu anderen Studien mit molekularen Analysetechniken

Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten Studien, in der eine „Fingerprint-Technik“ zur Klärung der Fragestellung verwendet wurde, ob Probiotika neben klinischen auch mikrobiologisch nachweisbare Effekte mit sich bringen. In den meisten Probiotikastudien wurden aus-

schließlich klinische Befunde der Patienten dokumentiert oder kulturelle Methoden zur Stuhl-analyse verwendet. Studien, die mit kulturellen Methoden arbeiten zeigen nach aktuellen Erkenntnissen ein eingeschränktes Bild der kindlichen Darmflora, so dass die Datenlage bezüglich der Darmflora Frühgeborener bisher unvollständig beschrieben ist (Morelli 2008, Magne 2005).

Einige Studien verwendeten bereits molekulare Methoden zu unterschiedlichen Fragestellungen. Favier et al. (Favier 2002) setzten bereits die DGGE zur Analyse der kindlichen Darmflora im zeitlichen Verlauf ein. Hier wurde die Stuhlflora zweier gesunder, reifer Neugeborenen über zehn Monate molekularbiologisch verfolgt. Schwiertz et al. (Schwiertz 2003) verwendeten DGGE zum Vergleich der Heterogenität in der Darmflora Früh- und Reifgeborener, während Millar et al. (Millar MR 1996) DGGE mit kulturellen Methoden verglichen, um die Flora Frühgeborener mit und ohne NEC zu analysieren. De la Cochetiere et al. (De la Cochetiere 2004) analysierten die Stuhlproben zwölf frühgeborener Kinder mittels TTGE. Auch Rougé et al. (Rougé 2010) arbeiteten mit Stuhlproben Frühgeborener, indem sie die molekularen Analysetechniken TTGE und dHPLC mit kulturellen Methoden verglichen. Die Untersuchung der Probiotikatherapie mittels „Fingerprint-Methoden“ ist ein neues, vielversprechendes Einsatzgebiet für klinische Studien.

Die Studie von Schwiertz et al. (Schwiertz 2003) ist unserer Fragestellung am ähnlichsten. Hier wurden die Stuhlproben der ersten vier Wochen (täglich über die ersten zwei Lebenswochen, danach Tag 17, 21, 24, 28) von 29 hospitalisierten Frühgeborenen, zum Teil unter laufender antibiotischer Therapie mit denen von 15 reifgeborenen (Lebenstag sechs), gestillten, nicht hospitalisierten Säuglingen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, sehr große interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede. Während sich das Keimspektrum der Frühgeborenen im Verlauf zunehmend ähnelte, wiesen die Reifgeborenen sehr unterschiedliche, individuelle Muster auf. Die Keimflora zeigte zunächst - ähnlich wie die Studie von Favier et al. - recht homogene DGGE-Profile der Frühgeborenen, die zunehmend komplexer wurden. Als mögliche Ursache wird die sogenannte „cross-colonisation“ hypothetisiert, also ein Überspringen der Krankenhauskeime zwischen den Patienten. Auch unsere Studie zeigte vorwiegend sterile oder gering besiedelte Stuhlproben an den ersten Lebenstagen, die dann ein zunehmend breiteres Bakterienspektrum enthielten. Die hauptsächlich nachgewiesenen Bakterien bei Schwiertz et al. entsprachen mit *Enterococci*, *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli* zum Teil denen unserer Studie. Zum Nachweis von Bifidobakterien wurden in dieser Studie spezifische Primer eingesetzt. Bei den Reifgeborenen konn-

ten gelegentlich Bifidobakterien nachgewiesen werden, während dies bei den Frühgeborenen nicht der Fall war. Der fehlende Nachweis bei Frühgeborenen entspricht ebenfalls unseren Befunden, hier wurden jedoch keine oralen Probiotika verabreicht. Die Studie zeigt aber, dass Bifidobakterien grundsätzlich mit der DGGE erfasst werden können. Dies wurde auch in eigenen Voruntersuchungen gezeigt. Bei einigen Patienten konnte eine Reduktion der bakteriellen Komplexität durch Antibiotika festgestellt werden, in der Gesamttendenz war wider Erwarten jedoch kein Einfluss der Antibiotikatherapie auf das Keimspektrum zu verzeichnen, obwohl vermutlich auch hier Breitbandantibiotika verwendet wurden.

Favier et al. (Favier 2002) führten eine Verlaufsstudie an zwei reifgeborenen, gesunden, gestillten Kindern durch, deren mikrobielle Stuhlprofile über zehn Monate hinweg optisch durch DGGE dargestellt wurden. Grundsätzlich war ein Wandel von einem frühen *Bifidobacteria*-dominierten Bild zu einem komplexeren Keimspektrum im Verlauf zu verzeichnen. Dominante Mikroorganismen waren neben den Bifidobakterien *Enterococci*, *Streptococci*, *Enterobacteria*, *Ruminococci* und *Clostridia*. Interessanterweise konnten hier die Bifidobakterien bei beiden Patienten aufgrund des hohen CG-Gehalts recht weit unten auf dem Gel erfasst werden.

Rougé et al. (Rougé 2010) verglichen bei der Analyse von Stuhlproben Frühgeborener kulturelle und molekulare Methoden. Bei den zehn eingeschlossenen Patienten wurden einmal pro Woche während des gesamten Krankenhausaufenthalts Stuhlproben asserviert. Bis auf eines wurden alle mit Breitbandantibiotika therapiert und vier erhielten zudem probiotische Präparate mit *LGG* und *Bifidobacterium longum*. Die Stuhlproben von drei dieser Patienten wurden mit molekularen Methoden untersucht und es konnten bei zwei bzw. drei Kindern beide probiotischen Bakterien mit TTGE nachgewiesen werden. Wie bei den übrigen sieben wurden auch kulturelle Verfahren angewendet, die jedoch jeweils nur bei einem Patienten einen probiotischen Mikroorganismus nachwies. Das Keimspektrum zeigte mit kulturellen Methoden eine Dominanz von koagulasen negativen Staphylokokken, sowie bei etwa 50% *Enterococci* und *Clostridia sp.*, während mit molekularen Methoden ein wesentlich detaillierteres Bild gezeichnet werden konnte.

Millar et al. (Millar MR 1996) untersuchten den Aspekt der Unterschiede im bakteriellen Spektrum bei Kindern mit und ohne NEC im Vergleich von kulturellen Methoden und DGGE. Wesentlicher Befund war die Ergänzung der kulturell nachgewiesenen Bakterien durch molekulare Methoden. Nebenbefundlich, aber für uns interessant konnte bei einigen Kindern, denen zuvor *LGG* verabreicht wurde, dieses Bakterium kulturell nachgewiesen wer-

den. Leider wurde der prozentuale Anteil derjenigen Kinder, bei denen dieser Befund auftrat, nicht weiter ausgeführt. Gleiches gilt für die Frage, ob dieser Nachweis auch mit molekularen Methoden gelang. Dennoch fiel hier eine Korrelation zwischen dem Nachweis von *LGG* und *S. salivarius* auf, sodass vermutet wurde, *LGG* modifiziere die Mundflora oder die des Dünndarms.

Shen et al. (Shen 2011) verglichen in ihrer Studie den Einfluss prebiotischer Präparate und Muttermilch auf Stuhlproben von zehn siebenmonatigen, formulaernährten Reifgeborenen. Die verwendeten Nährböden wurden mit Muttermilch und Prebiotika angereichert, mit den Stuhlproben beimpft und anschließend bebrütet. Es konnten ähnliche wachstumsfördernde Effekte für sämtliche Substrate insbesondere auf *Bifidobacteria* mittels DGGE und FISH nachgewiesen werden. Diese Befunde unterstützen die Hypothese von Gibson et al. (Gibson 1995), die längerfristige Effekte auf die Kolonisation von protektiven Keimen durch prebiotische Präparate im Vergleich zu Probiotika konstatierten.

Aufgrund der anderen Fragestellungen und Schwerpunktsetzung der vorgestellten molekularen Studien, ist ein Vergleich mit den eigenen Daten nur eingeschränkt möglich. Die nachgewiesenen Keimspektren bei Frühgeborenen konnten von uns bestätigt werden. Interessant ist, dass der Nachweis von probiotischen Bakterien in den vorgestellten Studien grundsätzlich möglich war. Dies erfolgte jedoch bis auf eine Ausnahme nur bei reifgeborenen, gestillten Säuglingen. Die Studie von Rougé et al. (Rougé 2010) ist daher wichtig, denn hier wurden in den meisten untersuchten Proben probiotische Bakterien nach oraler Verabreichung im Stuhl nachgewiesen. Dies könnte an der Methode der TTGE oder an den anderen verwendeten Primer liegen. Zudem wurden aufgrund der anderen Schwerpunktsetzung nur drei Patienten untersucht, sodass dies kein repräsentatives Ergebnis darstellt. Mit selektiven kulturellen Methoden und spezifischen molekularen Verfahren gelingt in der Regel die Anzucht dieser Bakterien aus Stuhlproben, während dies mit der DGGE bisher nur bei Reifgeborenen durchgeführt wurde.

Insgesamt stützt der Vergleich zu anderen molekularen Studien die Hypothese, dass durch Probiotika kein normales Keimspektrum durch Kolonisation von *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* zu imitieren ist. Vergleichsmöglichkeiten zu unserer spezifischen Fragestellung gibt es zwar noch nicht, die vorgestellten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Nachweis probiotischer Keime vor allem bei reifen, gestillten Säuglingen gelingt, die ohnehin eine Dominanz von Bifidobakterien im Gastrointestinaltrakt aufweisen. Die bereits vermutete transiente Besiedlung durch Probiotika (Bourlioux 2003, Gibson 1995, Isolauri 2007, Magne

2005) in Zusammenhang mit unseren Befunden sind hinweisend darauf, dass probiotische Mikroorganismen auch nach oraler Gabe nicht zur dominanten Darmflora Frühgeborener gehören und daher nicht durch die DGGE erfasst werden können. Dies spricht letztlich für indirekte, immunmodulatorische Effekte, die die klinische Wirksamkeit von Probiotika erklären.

5.5 Limitationen

5.5.1 Kritische Analyse der Kolonisationsmuster

Sicherlich stellen kulturelle Analysen der Darmflora eine Limitation dar, da viele der residenten Bakterien nicht, - manche Autoren gehen von 60% bis 80% aus (Magne 2005) - oder nur schlecht mit diesen Methoden nachgewiesen werden können. Dies bedeutet, dass insbesondere die Ergebnisse älterer Studien, die kulturelle Methoden verwendeten, unter diesem Gesichtspunkt zu betrachten sind. Untersuchungen mit moderneren, molekularen Methoden deuten darauf hin, dass in kindlichen Stuhlproben deutlich größere Mengen an *Bacteroides* und *Lactobacilli* vorhanden sind und Clostridien bereits früher auftreten als bisher angenommen (Morelli 2008). Dies zeigt, dass die Datenlage insbesondere zur Darmflora Frühgeborener noch unvollständig ist.

Des Weiteren muss festgestellt werden, dass die meisten klinischen Studien- wie auch die Vorliegende- mit Stuhlproben arbeiten. Marteau et al. (Marteau 2001) konnten zeigen, dass in der Faeces zum Teil ganz andere bakterielle Zusammensetzungen vorherrschen als im Gastrointestinaltrakt. So sind beispielsweise lebende Anaerobier im Stuhl etwa um den Faktor 100 häufiger nachweisbar als im Zökum. Da die Zahl der fakultativen Anaerobier etwa gleich ist, führt es dazu, dass ihr prozentueller Anteil im Zökum bei etwa 25% im Stuhl jedoch nur bei 1% liegt. Somit können Ergebnisse, die aus Stuhlprobenanalysen gewonnen werden, nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die gesamte Mikroflora im Darm geben.

5.5.2 Beurteilung der Ergebnisse

Limitationen der klinischen Studie lagen unter anderem darin, dass bei vielen Patienten die mehrfach wöchentliche Stuhlasservierung nicht regelmäßig zu den vorgesehenen Intervallen stattfand, sodass zwischen den Zeitpunkten der Stuhlabnahme mitunter bis zu 10 Tage Unterbrechung lagen. Dies muss insbesondere bei Bewertung der qualitativen Analyse beachtet werden, da einige Mikroorganismen aufgrund der Unterbrechung vermutlich nicht erfasst werden konnten. Die geringe Anzahl der Studienteilnehmer und der mikrobiologisch unter-

suchten Probanden schränkten die Möglichkeit zur statistischen Analyse der Befunde ein. Dennoch konnte die Studie gut zur exemplarischen Darstellung und Etablierung einer neuen Methode dienen.

Einige Einschränkungen sind bei der optischen Beurteilung und qualitativen Verlaufsuntersuchung der Bakteriensignaturen zu beachten. Durch die manuelle Herstellung der Gele sind Variationen zwischen zwei Gelen nicht zu vermeiden. Dadurch erschien zum Teil optisch ein Bruch im Keimspektrum, der sich in später durchgeführten Sequenzierungen nicht bestätigte. Diesen Unterschieden kann durch computergestützte Kalibrierungsmethoden versucht werden entgegenzutreten (Tourlomousis 2010). Die optische Beurteilung stellt ebenfalls ein Problem dar, da bisher die Möglichkeiten allgemeingültiger digitaler Ähnlichkeitsanalysen eingeschränkt sind (Jossens 2010). Wir entgegneten diesen Problemen durch eine anschließende Sequenzanalyse der bakteriellen Signaturen.

Bei einigen Patienten wiesen Proben von gleichen Tagen gelegentlich unterschiedliche Bakteriensignaturen auf. Dies ist unter anderem mit inhibitorischen Stoffen zu erklären, die möglicherweise bei Verwendung größerer Stuhlmengen den Nachweis von DNA unterdrücken. Durch Einsatz von Polyvinylpyrrolidone kann versucht werden diesem Phänomen entgegenzuwirken (Da la Cochetiere 2004). Da die DNA-Aufreinigung aus dem Stuhl manuell erfolgte, könnten mitunter ungleiche Stuhlmengen verwendet worden sein, sodass diese inhibitorischen Effekte bei einigen Proben entstanden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum bei einigen Proben gar keine Bakterien nachgewiesen wurden. Weitere mögliche Erklärungen für dieses Phänomen wären eine Antibiotikatherapie sowie die Tatsache, dass in den ersten Lebensstagen physiologisch kaum Mikroorganismen im Stuhl nachzuweisen sind. Einige Bakterienspezies wiederum bilden zwei oder mehrere Banden. Dies fiel bereits bei Millar et al. auf (Millar 1996). Sie stellten die Ursachenhypothese auf, dass es sich um zwei verschiedene Spezies einer Gattung handele, die sehr ähnliche Sequenzen aufwiesen und daher nicht eindeutig identifiziert werden konnten.

Die Erfassung sämtlicher bakterieller DNA durch Universalprimer wird unter anderem durch die Konkurrenz der dominanten Mikroorganismen um Primerbindungsstellen eingeschränkt (Da la Cochetiere 2004). Zudem kann die 100%ige Übereinstimmung mit den gruppenspezifischen Sequenzen bis auf die Ebene der drei Urreiche ebenfalls in nicht gewährleistet werden, da bisher noch kein Universalprimer mit dieser Eigenschaft entwickelt wurde (Baker 2003). Insbesondere zwischen Universalprimersequenzen und denen der *Bifidobacteria* besteht eine verhältnismäßig niedrige Ähnlichkeit (aus: Rougé 2010). Das Detektionslimit der DGGE wird

auf 10^6 CFUg⁻¹ bzw. 1% der Gesamt-DNA (aus: Jossens 2010) in der Faeces geschätzt. Jossens et al. berichten beispielsweise, dass in 18 Fällen auf 16 DGGE-Profilen mittels rtPCR Bakterienspezies nachgewiesen werden konnten, obwohl in der DGGE keine Banden ersichtlich waren. Es wird daher durch die DGGE vornehmlich die dominante Stuhlflora erfasst, während explizit gesuchte Keime nachträglich mit spezifischen Methoden nachgewiesen werden können.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die DGGE ein nicht-selektives, kultur-unabhängiges Bild des Mikrobioms der Probanden vermittelt und die Möglichkeit zur Analyse klinischer Einflussfaktoren auf den Gastrointestinaltrakt bietet. Dennoch müssen zur Beurteilung der Ergebnisse die Limitationen der Methode bekannt sein.

5.6 Schlussfolgerung

Dies ist eine der ersten Studien, in der eine „Fingerprint Methode“ zur Untersuchung der Effekte von Probiotika auf die Darmflora Frühgeborener verwendet wurde. Hierfür etablierten wir die Methode der PCR-DGGE im Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum des Saarlandes. Mit diesem Verfahren konnten bei Stuhlproben von zwölf Patienten die individuelle prädominante Keimflora sowie qualitative Verlaufsuntersuchungen bakterieller Signaturen nach und während der Einnahme eines probiotischen Präparats durchgeführt werden. Aufgrund des explorativen Charakters der Studie erfolgte die Ergebnisdarstellung exemplarisch. Der Schwerpunkt lag auf der Etablierung der Methode, um weitere Arbeiten mit der PCR-DGGE am Uniklinikum des Saarlands zu ermöglichen.

Deutlich wurde in der kumulativen Analyse die verzögerte Kolonisation von Anaerobiern sowie das vermehrte Vorkommen von fakultativ-pathogenen Keimen wie *Staphylococci* und *Klebsiella*. Es zeigte sich eine auffällig häufige Besiedlung mit Bakterien aus der Familie der *Veillonella sp.* Auch weitere Keime der unreifen Darmflora wie *Streptococci*, *Enterococci* und *E.coli* konnten nachgewiesen werden.

Die Einzelfalldarstellung verfolgte den Analysevorgang am Beispiel des Patienten IS-05. Hier konnte die Methode der PCR-DGGE eindrücklich dargestellt werden. Anschließend wurde mit Sequenzierungsmethoden das individuelle Keimmuster des Patienten analysiert und mit weiteren Befunden in Zusammenhang gebracht.

Ein eindeutiger Einfluss von Probiotika auf das Keimspektrum kann nicht konstatiert werden,

dennoch waren positive Effekte erkennbar. Bei einem exemplarisch vorgestellten Patienten IS-03 normalisierte sich das Keimspektrum nach Absetzen der Antibiose und Beginn der probiotischen Therapie. Zudem konnte bei einem weiteren Patienten IS-18 unter laufender Pro- und Antibiotikagabe als einziger Keim *Lactobacilli casei/paracasei* nachgewiesen werden.

Die zugeführten *Bifidobacteria infantis* und *Lactobacilli acidophilus* konnten bei keinem Patienten im Stuhl nachgewiesen werden. Es erfolgte eine detaillierte Analyse auch unter Einbeziehung weiterer molekularer Studien der möglichen Erklärungen für dieses Phänomen. Es ist zu vermuten, dass die protektiven klinischen Effekte durch immunmodulatorische Wirkungsweisen der Bakterien hervorgerufen. Die nutzbringenden Wirkungen wären beispielsweise mit einer Induktion der Produktion antimikrobieller Substanzen und einer Suppression überschießender Entzündungsreaktionen durch Interaktionen an Oberflächenrezeptoren des Darmepithels zu erklären.

Bei zwei Patienten konnten mithilfe der DGGE und anschließender Sequenzierung Neugeboreneninfektionen mit *Ureaplasma urealyticum* und *S. epidermidis* festgestellt werden, so dass festgestellt wurde, dass die Methode auch für diese Analyse geeignet ist.

Die Etablierung dieser neuen Methode verschaffte uns die Möglichkeit einer nicht-selektiven Beurteilung des Mikrobioms und die Einordnung der Befunde bezüglich sämtlicher äußerer Faktoren.

5.7 Ausblick

Der Vergleich zu anderen molekularen Studien zeigte, dass grundsätzlich probiotische Bakterien mit DGGE erfasst werden können, jedoch meist bei reifgeborenen gestillten Säuglingen, bei denen *Bifidobacteria* zur dominanten Keimflora zählen. Zur besseren Detektion dieser Keime wurden von einigen Autoren zusätzlich zu „Fingerprint-Methoden“ spezifische Nährböden oder rtPCR eingesetzt. In den kommenden Jahren werden die modernen Sequenzierungsmethoden („deep Sequencing“) zunehmend Eingang in die Untersuchung bakteriologischer Lebensgemeinschaften finden. Diese Methoden sind ähnlich wie die DGGE und andere „Fingerprint-Methoden“ kulturunabhängig, zeichnen sich aber durch eine noch höhere Sensitivität und eine bessere Diskrimination zwischen verschiedenen Spezies aus.

Weitere Studien zur Untersuchung bakteriologischer Eigenschaften in Biofilm oder bei Pa-

tienten mit Mukoviszidose mit DGGE im Institut für Mikrobiologie und Hygiene sind bereits in Arbeit. Da die vorliegende Arbeit die erste ist, in der in unserem Institut mit dieser Technik gearbeitet wurde, lag der Schwerpunkt auf der Etablierung der Methode. In nachfolgenden Studien können nun auch Methoden bezüglich der Gel-zu-Gel-Varianten oder Mischsequenzen optimiert werden. Zudem können die in dieser Arbeit verwendeten Proben in weiteren Studien zusätzlich spezifisch analysiert und so *Lactobacilli acidophilus* und *Bifidobacteria infantis* explizit gesucht werden.

Nachfolgende klinische Studien, die eine größere Teilnehmerzahl sowie eine engmaschigere Stuhprobenasservierung beinhalten, können ebenfalls mittels DGGE analysiert werden, so dass auch statistische Aussagen bezüglich des Keimspektrums und der Probiotikawirkung möglich wären.

Zudem sollte in klinischen Studien keine Parallelintervention von Anti- und Probiose erfolgen. Interessant wäre auch der Vergleich von zwei verschiedenen pre- oder probiotischen Präparaten bzw. Dosierungen, um den aktuellen Debatten über eine geeignete, einheitliche Therapievorschrift zu entgegnen. Auch könnten in größeren, DGGE-analysierten Studien Aussagen bezüglich der Verweildauer probiotischer Bakterien getroffen werden.

Die molekulare Methode der DGGE hält vielversprechende Analysemöglichkeiten für weitere Studien bereit.

6 Literaturverzeichnis

- 1 AlFaleh K, Anabrees J, Bassler D (2010) Probiotics Reduce the Risk of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants: A Meta-Analysis. *Neonatology* 97: 93-99
- 2 Awad H, Mokhtar G, Imam SS (2010) Comparison Between Killed and Living Probiotic Usage Versus Placebo to Prevent Necrotising Enterocolitis and Sepsis in Neonates. *Pakistan J of Biol Sci* 13: 253-262
- 3 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL (2005) Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307: 1915-1920
- 4 BAG Health Care, Gebrauchsinformationen hyplex® Prep Modul
- 5 Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55: 541-555
- 6 Bergey's Manual Trust (1936) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. <http://www.bergeys.org/index.html>.
- 7 Bezirtzoglou E (1997) The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe* 3: 173-177
- 8 Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M (2006) Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J of Ped* 147: 192-196
- 9 Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL (1982) Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J Med Microbiol* 15: 519-529
- 10 Bio-Rad Dcode TM Universal Mutation Detection System
- 11 Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V (2003) The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine" held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nut* 78: 675-683
- 12 Braga TD, Pontes Da Silva GA, Cabral de Lira PI, de Carvalho Lima M (2011) Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, ran-

-
- domized, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 93: 81-86
- 13 Caicedo RA, Schanler RJ, Li N, Neu J (2005) The Developing Intestinal Ecosystem: Implications for the Neonate. *Ped Research* 48: 62562-8
 - 14 Claud EC, Walker WA (2008) Bacterial Colonization, Probiotics and Necrotizing Enterocolitis. *J Clin Gastroenterol* 42: 46-52
 - 15 Dani C, Bialdaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF (2002) Probiotics Feeding in Prevention of Urinary Tract Infection, Bacterial Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *Biol Neonate* 82:103-108
 - 16 De la Cochetiere MF, Piloquet H, Des Robert C (2004) Early Intestinal Bacterial Colonization and Necrotizing Enterocolitis in Premature Infants: The Putative Role of *Clostridium*. *Ped Research* 56: 366-370
 - 17 Deshpande G, Rao S, Patole S (2007) Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 369:1614-1620
 - 18 Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M (2010) Updated Meta-analysis of Probiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Pediatrics* 125: 921-930
 - 19 Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Appl Environ Microbiol* 68: 219-226
 - 20 Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378
 - 21 Gewolb IH, Schwalbe RS, Traciak VL, Harrison TS, Panigrahi P (1990) Stool microflora in extremely low birth weight infants. *Arch Dis Child Fet Neonat* 80: 167-173
 - 22 Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412
 - 23 Guarner F, Malagelada JR (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519
 - 24 Guthmann F, Kluthe C, Bühner C (2010) Probiotics for Prevention of Necrotizing Enterocolitis: An Updated Meta-analysis. *Klin PEDIATR* 222: 284-290

-
- 25 Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF (eds) (2009) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 6th ed. Springer, Heidelberg
 - 26 Hammermann C, Kaplan M (2006) Probiotics and neonatal intestinal infection. *Current Opin Infect Dis* 19: 277-282
 - 27 Hof H, Dörries R (eds) (2005) *Medizinische Mikrobiologie*. 3rd ed. Thieme, Stuttgart
 - 28 Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ (1997) The epidemiology of Necrotizing Enterocolitis Infant Mortality in the United States. *Am J Public Health* 87: 2026-2031
 - 29 Hoy C, Millar MR, Mac Kay P (1990) Quantitative changes in faecal microflora preceding necrotizing enterocolitis in premature neonates. *Arch Dis Child* 65: 1057-1059
 - 30 Isolauri E (2007) Probiotics in Preterms: A Controversial Issue. *J Ped Gastroent Nutr* 45: 188-189
 - 31 Johannson MEV, Phillipson M, Petersson J (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 105: 15064-15069
 - 32 Jossens M, Huys G, Van Steen K (2010) High-throughput method for comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis profiles from human faecal samples reveals significant increases in two bifidobacterial species after inulin-type probiotic intake. *FEMS Microbiology Ecol* 75: 343-349
 - 33 Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM (eds) (2010) *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 12th ed. Thieme, Stuttgart
 - 34 Klinke R, Pape HC, Silbernagl S (2005) *Physiologie*. 5th ed. Thieme, Stuttgart
 - 35 Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B (eds) (2001) *Medizinische Mikrobiologie*. 8th ed. Urban&Fischer, München
 - 36 Ladd N, Ngo T (2009) The use of probiotics in the prevention of necrotizing Enterocolitis in preterm infants. *Pharmacology Notes* 22: 287-291
 - 37 Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR (2005) Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115: 178-181

-
- 38 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124: 837-848
- 39 Lievin-le Moal V, Servin AL (2006) The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides and Microbiota. *Clin Microbiol Rev* 19: 315-337
- 40 Lin HC, Su BH, Chen AC (2005) Oral Probiotics Reduce the Incidence and Severity of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 115: 1-4
- 41 Lin HC, Hsu CH, Chen HL (2008) Oral Probiotics Prevent Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants: A Multicenter, Randomized Controlled Trial. *Pediatrics* 122: 693-700
- 42 Lin PW, Stoll BJ (2006) Necrotising enterocolitis. *Lancet* 368:1271-1283
- 43 Lin PW, Nasr TR, Berardinelli AJ (2008) The Probiotic *Lactobacillus GG* May Augment Intestinal Host Defense by Regulating Apoptosis and Promoting Cytoprotective Responses in the Developing Murine Gut. *Ped Research* 64: 511-516
- 44 Lüllmann H, Mohr K, Hein L (eds) (2006) *Pharmakologie und Toxikologie*. 16th ed. Thieme, Stuttgart
- 45 Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69: 1035-1045
- 46 Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature* 4: 478-485
- 47 Magalhaes JO, Tattoli I, Girardin SE (2007) The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Sem Immuno* 19: 106-115
- 48 Magne F, Suau A, Pochard P, Desjeux JF (2005) Fecal Microbial Community in Pre-term Infants. *J Ped Gastroent Nut* 41: 386-392
- 49 Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML (2006) Oral Supplementation with *Lactobacillus casei* Subspecies *rhamnosus* Prevents Enteral Colonization by *Candida* Species in Pre-term Neonates: A Randomised Study. *Clin Inf Dis* 42: 1735-1742

-
- 50 Marteau P, Pochart P, Doré J (2001) Comparative Study of Bacterial Groups within the Human Cecal and Fecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67: 4939-4942
- 51 Martin CR, Walker GA (2008) Probiotics: Role in Pathophysiology and Prevention in Necrotizing Enterocolitis. *Semin Perinatol* 32: 127-137
- 52 Matsuo K, Ota H, Akamatsu T (1997) Histochemistry of the surface mucus gel layer of the human colon. *Gut* 40: 782-789
- 53 Mihatsch W, Pohlandt F (2010) Können Probiotika bei Frühgeborenen unter 1500g schon als Bestandteil der klinischen Routine empfohlen werden? *Klin PEDIATR* 222: 282-283
- 54 Millar M, Wilks M, Fleming P, Costeloe K (2003) Probiotics for preterm infants? *Arch Dis Child. Fetal Neonatal Ed* 88: 354-358
- 55 Millar M, Wilks M, Fleming P, Costeloe K (2010) Should the use of probiotics in the preterm be routine? *Arch Dis Child. Fetal Neonatal Ed*: 1-5
- 56 Millar MR, Bacon C, Smith SL (1993) Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus GG*. *Arch Dis Child* 63: 483-487
- 57 Millar MR, Linton CJ, Cade A (1996) Application of 16s rRNA Gene PCR to Study Bowel Flora in Preterm Infants with and without Necrotizing Enterocolitis. *J Clin Microbiol* 34: 2506-2510
- 58 Mohan R, Koebnick C, Schildt J (2006) Effects of *Bifidobacterium lactis* B12 Supplementation on Intestinal Microbiota of Preterm Infants: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled study. *J of Clin Microbiol* 44: 4025-4031
- 59 Morelli L (2008) Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. *J Nutr* 138: 1791-1795
- 60 Munk K (ed) (2008) Taschenlehrbuch Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart
- 61 Neu J (2005) Probiotics: protecting the intestinal ecosystem? *J PEDIATR* 147: 143-146
- 62 Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB (2007) Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *Plos Biology* 7: 1556-1573

-
- 63 Penders J, Thijs C, Vink C (2006) Factors influencing the Composition of Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics* 118: 511-21
- 64 Peter CS, Feuerhahn M, Bohnhorst B (1999) Necrotizing enterocolitis: is there a relationship to specific pathogens? *Eur J Ped* 158: 67-70
- 65 Qiagen (2010) HotStarTaq® *Plus* PCR Handbook
- 66 Rastall RA (2004) Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. *J Nutr* 2022-2026
- 67 Report of a joint FHO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder milk with Live Lactic Acid Bacteria. (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
- 68 Rougé C, Piloquet H, Butel MJ (2009) Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight infants: a randomized, double-blind, controlled-trial. *Am J Clin Nutr* 89: 1828-1835
- 69 Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L (2010) Investigation of intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 16: 362-370
- 70 Salminen S, Nybom S, Meriluoto S (2010) Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health?. *Curr Opin Biotechnol* 21: 157-167
- 71 Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC (1975) Acute Necrotizing Enterocolitis in Infancy: a Review of 64 Cases. *Pediatrics* 55: 376-387
- 72 Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 31:107-33
- 73 Schanler RJ (2006) Probiotics and necrotizing enterocolitis in premature infants. *Arch Dis Child.Fetal Neonatal Ed* 91: 395-397
- 74 Schmolzer G, Urlesberger B, Haim M (2006) Multi-modale approach to prophylaxis of necrotizing Enterocolitis: clinical report and review of literature. *Ped Surg Int* 22: 573-80

-
- 75 Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson ABR (2008) Necrotizing enterocolitis: A multifactorial disease with no cure. *World j Gastroenterol* 14: 2142-2161
- 76 Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M (2003) Development of the Intestinal Bacterial Composition in Hospitalized Preterm Infants in Comparison with Breast-Fed, Full-Term Infants. *Ped Research* 54:393-399
- 77 Seeliger PR, Schröter H, Schröter G (1990) *Medizinische Mikrobiologie, Labordiagnostik und Klinik*. Urban & Schwarzenberg, München
- 78 Sekirov I, Finlay BB (2009) The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol* 587.17: 4159-4167
- 79 Shen Q, Tuohy KM, Gibson GR, Ward RE (2011) *In vitro* measurement of the impact of human milk oligosaccharides in the faecal microbiota of weaned formula-fed infants compared to a mixture of prebiotic fructoseoligosaccharides and galactoseoligosaccharides. *Letters in Appl Microbiology* 52: 337-343
- 80 Srinivasjois R, Rao S, Patole S (2009) Probiotic supplementation of formula in preterm neonates: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutr* 28: 237-242
- 81 Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Nat Acad Sci* 99: 15451-15455
- 82 Szajewska H, Guandalini S, Morelli L (2010) Effect of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Supplementation in Preterm Infants: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Ped Gastroent Nut* 51: 203-209
- 83 Tarnow-Mordi WO, Wilkinson D, Trivedi A, Brok J (2010) Probiotics Reduce All-Cause Mortality and Necrotizing Enterocolitis: It Is Time to Change Practice. *Pediatrics* 125: 1068-70
- 84 TIB Molbiol, <http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/principle/formats.html>
- 85 TIB Molbiol, <http://www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/principle/realtime.html>
- 86 Turlomousis P, Kemsley EK, Ridgway KP (2010) PCR-Denaturing Gradient Gel

Electrophoresis of Complex Microbial Communities: A two-step approach to address the Effect of Gel-to-Gel Variations and Allow Valid Comparisons Across a Large Dataset. *Microb Ecol* 59: 776-86

- 87 Westerbeek EAM, Van Den Berg A, Lafeber HN (2006) The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clin Nut* 25: 361-8
- 88 World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2001) Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria

7 Danksagung

Hiermit danke ich an erster Stelle dem Betreuer meiner Doktorarbeit PD Dr. med. Lutz von Müller, der mit viel Geduld und unglaublicher Herzlichkeit jederzeit Fragen beantwortete, Lösungen und Anregungen zeigte oder einfach Zeit für ein paar nette Worte fand! Diese Art von Unterstützung kann ich nur jedem wünschen.

Auch meinem Doktorvater und dem Institutsleiter Prof. Dr. med. Matthias Herrmann danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, hier meine Forschungen durchzuführen. Auch die sehr angenehme Atmosphäre, unterstützt durch verschiedenste Feierlichkeiten, Ausflüge und Kongresse ist zu einem großen Teil ihm zu verdanken.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Diana, die uns mit ihrer fröhlichen Art sehr gut einarbeitete und durch die bei mir die Freude an der Laborarbeit mit all ihren Tücken dennoch geweckt wurde. Auch Karin, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand gilt mein Dank.

Natürlich geht auch ein recht herzlicher Dank an die Mitarbeiter des Instituts für funktionelle Grenzflächen im Forschungszentrum Karlsruhe. Insbesondere Kerstin Scheu ermöglichte uns einen genauen Einblick in die DGGE und half uns wunderbar bei den ersten Schritten mit dieser Methode.

Ein letzter Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in Ruhe auf dem Balkon an meiner Promotionsarbeit schreiben ließen, während sie sich bereits durch die Entwürfe Derselbigem kämpften, ohne auch nur das Geringste zu verstehen. Vielen Dank für's Durchhalten und Unterstützen!