

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu
Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

**Staphylococcus epidermidis-Infektionen bei Neugeborenen:
Einfluss von Wirtsfaktoren, Erregermerkmalen und
prophylaktischer Teicoplanintherapie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von
Mathias Heidemann
aus Berlin
Lübeck 2017

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Härtel

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Drömann

Tag der der mündlichen Prüfung: 19.1.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.1.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Frühgeburtlichkeit	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Infektionen als Ursache der Frühgeburtlichkeit	2
1.1.3 Risikofaktoren	2
1.2 Sepsis	3
1.2.1 Definition und Symptome	3
1.2.2 Risikofaktoren der Late onset-Sepsis	5
1.2.3 Diagnose	6
1.2.4 Therapie der Late onset-Sepsis	7
1.2.5 Prävention der Late onset-Sepsis	8
1.3 Das Immunsystem	9
1.3.1 Barrierefunktion der Haut	9
1.3.2 Humorale Komponenten des Immunsystems	10
1.3.3 Toll-Like-Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege	12
1.4 Koagulasenegative Staphylokokken	13
1.4.1 Besiedlung Neugeborener	13
1.4.2 Pathogenitätsfaktoren	13
1.4.3 Mechanismen von KONS zum Überleben auf der Haut und sym- biontische Beziehungen zum Wirt	17
1.5 Das Diuretikum Furosemid und seine immunmodulatorische Wirkung .	19
1.5.1 Pharmakologische Eigenschaften	19
1.5.2 Der Klinische Einsatz von Furosemid in Pädiatrie und Neonatologie	20
1.5.3 Beeinflussung des Immunsystems durch Furosemid	21
2 Fragestellung	23

3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Untersuchungsmaterial	25
3.1.2	Labormaterial	29
3.2	Methoden	33
3.2.1	Vollblutstimulationstests 1 - ELISA	33
3.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Essay: ELISA	34
3.2.3	Vollblutstimulationstests 2 - FACS	35
3.3	Verzicht auf Glykopeptide in Lübeck - VERGIL	39
3.4	Datenauswertung	39
3.5	Ethikvotum	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Eigenschaften der untersuchten Staphylococcus epidermidis-Stämme . .	41
4.2	Vergleich der Immunantwort auf Staphylococcus epidermidis-Isolate (Klinikisolate und Mutanten)	41
4.3	Immunreaktion unter Furosemid	50
4.3.1	Stimulation mit LPS unter aufsteigenden Konzentrationen Furosemid	50
4.3.2	Stimulation durch Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, Pam ₃ Cys und LPS	53
4.4	VERGIL - Verzicht auf Glykopeptide in Lübeck	54
5	Diskussion	57
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	IX
9	Danksagung	XIII
10	Lebenslauf	XV
11	Eidesstattliche Versicherung	XVII

Abkürzungsverzeichnis

agr	Accessory Gene Regulator
AMP	Antimikrobielle Polypeptide
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Units
CFU/WBC	Colony Forming Unit / White Blood Cell (Leukozyt)
CRP	C-reaktives Protein
E.coli	Escherichia coli
ELBW	Extremely Low Birth Weight, Geburtsgewicht ≤ 1000 Gramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Essay
EOS	Early-onset-Sepsis
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamase
fbe	Fibrinogen Binding Protein
ICD10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems Version 10
IDSa	Infectious Diseases Society of America
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KONS	Koagulasenegative Staphylokokken
LBW	Low Birth Weight, Geburtsgewicht 1500 bis 2499 Gramm
LOS	Late-onset-Sepsis
LPS	Lipopolysaccharid

MALDI-TOF ...	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight
MD2	Myeloid Differentiation Factor 2
mecA	Gen des Penicillin-bindenden Proteins PBP2A
MIC	Minimale Inhibitorische Konzentration
MLST	Multilocus sequence typing
MRSA	Methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs ...	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88
NEO-KISS	Surveillance System nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen
NICHD	National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network
NO	Stickstoffmonoxid
Pam ₃ Cys	(S)-(2,3- bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)- Lys ₃ -OH-Trihydrochlorid
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGA	Poly- γ -D-Glutamat
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin
PSMs	Phenol-Soluble Modulins
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
SGA	Small for Gestational Age
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter-inducing Interferon- <i>beta</i>
VLBW	Very Low Birth Weight, Geburtsgewicht 1000 bis 1499 Gramm
WHO	World Health Organisation

Tabellenverzeichnis

1.1	Frühgeburtlichkeit begünstigende Risikofaktoren [1][2]	2
1.2	NEO-KISS-Kriterien der neonatalen Sepsis	4
1.3	Übersicht TLR-Rezeptoren	12
1.4	Phasen der Biofilmbildung	15
1.5	Pädiatrische Indikationen für Furosemid	20
3.1	Geschlecht, Gestationsalter und Geburtsgewicht der eingeschlossenen Neugeborenen	25
3.2	Übersicht der untersuchten Staphylococcus Epidermidis-Stämme	26
3.3	Staphylococcus epidermidis 1457 und Mutanten	27
3.4	Reagenzien	29
3.5	Monoklonale Antikörper	29
3.6	Geräte	30
3.7	Verbrauchsmaterial	31
3.8	Geräte und Materialien am ehemaligen Institut für Mikrobiologie und Hygiene	32
4.1	Neonatale IL6-Expression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis- Isolate	43
4.2	Neonatale Il10-Expression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis- Isolate	44
4.6	Adulte IL6-Expression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis- Isolate	48
4.7	Adulte Il10-Expression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis- Isolate	49
4.8	Neonatale und adulte IL6-Expression unter Furosemid	50
4.9	Neonatale und adulte IL8-Expression unter Furosemid	51
4.10	Neonatale und adulte TNF α -Expression unter Furosemid	52

4.11 Neonatale Interleukinexpression bei Stimulation durch <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228, LPS, Pam ₃ Cys und Furosemid	53
4.12 Übersicht der in der VERGIL-Studie erfassten Neugeborenen	54
4.13 Häufigkeit von Sepsis mit Erregernachweis in der Blutkultur	55
4.14 Antibiotikaeinsatz in Prozent der Fälle	56
8.1 Nomenklatur Gelelektrophorese	X

Abbildungsverzeichnis

1.1	Furosemid (4-Chlor-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoylanthranilsäure) . . .	19
4.1	Neonatale IL6-Expression bei Stimulation mit 1 bzw. 10 CFU/WBC . .	42
4.2	Neonatale IL10-Expression bei Stimulation mit 1 bzw. 10 CFU/WBC .	45
4.3	Vergleich der durch Sepsis- und Kolonisationsisolate induzierten neona- talen IL6- bzw. IL10-Expression	46
8.1	Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese der Stämme $K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$.	X
8.2	Erfassungsbogen VERGIL	XI

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Die Frühgeburtlichkeit ist ein weltweit auftretendes, ernst zu nehmendes Gesundheitsproblem. 34% aller Kindstode waren 2002 in den USA auf Frühgeburtlichkeit oder durch die Frühgeburtlichkeit entstehende Komplikationen zurückzuführen [3].

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Nach ICD10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems Version 10) der WHO (World Health Organisation) handelt es sich bei Frühgeburtlichkeit um eine Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche oder weniger als 259 Tage nach der letzten Menstruation der Mutter (P07.3, sonstige vor dem Termin Geborene). Neugeborene mit extremer Unreife haben laut ICD10 ein Gestationsalter von weniger als 28 vollendeten Wochen (P07.2) [4]. Das Gestationsalter ist die Dauer vom ersten Tag der letzten Regelblutung bis zum Geburtstermin des Kindes [5].

Die ICD10 unterteilt untergewichtige Neugeborene in Neugeborene mit sonstigem Untergewicht (2499 bis 1000 Gramm, P07.1) und Neugeborene mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (unter 1000 Gramm, P07.0) [4]. Häufig werden Neugeborene auch in vier Gruppen eingeteilt: Normalgewichtige (≥ 2500 Gramm Geburtsgewicht, Niedriggewichtige LBW (Low Birth Weight, Geburtsgewicht 1500 bis 2499 Gramm), sehr Untergewichtige VLBW (Very Low Birth Weight, Geburtsgewicht 1000 bis 1499 Gramm) und extrem Untergewichtige ELBW (Extremely Low Birth Weight, Geburtsgewicht ≤ 1000 Gramm) [6][7].

In Deutschland kommen laut Daten der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 6–9% der Kinder vor der Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche zur Welt, 1,3% der Lebendgeborenen werden mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm geboren [8][9].

Aufgrund häufiger werdender Mehrlingsgeburten, vermehrter Nutzung assistierter Reproduktionstechniken und einem größeren Anteil älterer Mütter über 34 Jahre sind diese Werte in den letzten 20 Jahren in Industrienationen leicht ansteigend [10][11].

1.1.2 Infektionen als Ursache der Frühgeburtlichkeit

Bereits 1977 wurden stille obere Genitalinfektionen mit Frühgeburtlichkeit in Verbindung gebracht [12]. Klinisch stille obere Genitalinfektionen sind bei Spontangeburt häufig und werden heute als Ursache für 20-25% der Frühgeburten gesehen. Dabei scheinen frühe Frühgeburten eher mit einer Infektion assoziiert als späte Frühgeburten. Die einzige Infektion des unteren Genitaltraktes, die ursächlich mit Frühgeburtlichkeit in Zusammenhang gebracht werden kann, ist die bakterielle Vaginosis [13].

1.1.3 Risikofaktoren

Die Ursachen der Frühgeburtlichkeit sind vielfältig und werden von anatomischen, physiologischen, endokrinologischen, immunologischen und klinischen Faktoren der Mutter und des Feten beeinflusst. Tabelle 1.1 fasst diese Faktoren zusammen.

Tabelle 1.1: Frühgeburtlichkeit begünstigende Risikofaktoren [1][2]

Maternal	Amnioninfektionssyndrom
	Vorzeitige Wehen
	Vorzeitiger Blasensprung
	Hormonelle Fehlregulationen (z.B. Progesteronmangel)
	Cervixinsuffizienz
	EPH-Gestose
Fetal	Intrauterine Wachstumsverzögerung
	Mehrlingsschwangerschaften
	Chromosomale Auffälligkeiten
Plazentar/Uterin	Uteroplazentäre Ischämie, pathologischer Doppler
	erhöhte Kontraktilität des Myometriums
	Plazentalösung

1.2 Sepsis

1.2.1 Definition und Symptome

Einteilung nach Symptombeginn Ein Beginn der Sepsis während der ersten drei Lebenstage wird als EOS (Early-onset-Sepsis), ein Beginn nach der 72. Lebensstunde als LOS (Late-onset-Sepsis) klassifiziert. Während bei reifen Neugeborenen LOS häufig durch *E.coli* (*Escherichia coli*), *Staphylococcus aureus* und B-Streptokokken verursacht werden, stellen bei sehr untergewichtigen Neugeborenen (VLBW) KONS (Koagulase-negative Staphylokokken) die wichtigsten LOS-Erreger dar [14][15].

Häufig werden Krankenhauskeime nachgewiesen, die zum Beispiel durch Kontakte zum Ärzte- und Pflegepersonal übertragen werden. Das Erregerspektrum der LOS wird vor allem durch KONS dominiert, während die EOS häufig durch Staphylokokken und Gram-negative Keime aus dem Geburtskanal der Mutter verursacht wird [14][16]. In mehreren Studien wurden bei etwa 35% bis 54% der LOS KONS als Erreger isoliert [14][17][18].

Symptome und Diagnosekriterien Ursprünglich wurde das Krankheitsbild der Sepsis für Erwachsene definiert: Gleichzeitig zu einem SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), was durch mehr als ein Symptom aus Temperatur $\leq 36^{\circ}\text{C}$ oder $\geq 38^{\circ}\text{C}$, Herzfrequenz über 90/min, Tachypnoe und Leukozytose bzw. Leukopenie gekennzeichnet ist, muss der Nachweis einer Infektion erfolgen. Bei einer schweren Sepsis liegt zusätzlich eine Organ-Dysfunktion, eine Minderperfusion oder Hypotonie vor. Ein septischer Schock ist charakterisiert durch eine Sepsis bei gleichzeitigem Kreislaufversagen [19]. Diese Definition, die 2001 bei einer Internationalen Konferenz zu Sepsis-Definition unter Hinzufügung von unter anderem neuen Laborwerten (z.B. C-reaktives Protein, Procalcitonin) bestätigt wurde, berücksichtigt jedoch Besonderheiten Neugeborener nicht [20].

Weltweit wurden aufgrund der fehlenden Übertragbarkeit der Erwachsenenmedizin auf die Neonatologie mit dem Ziel der Optimierung der Therapie kleiner Neugeborener daher neonatologische Netzwerke mit Surveillancemöglichkeiten gegründet. Hier sind in Deutschland besonders das Deutsche Frühgeborenenennetzwerk (German neonatal network, GNN) und das NEO-KISS (Surveillance System nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen) des Nationalen Referenzzentrums für die Surveillance von nosokomialen Infektionen zu nennen. Internationale Organisationen mit ähnlicher Aufgabe stellen das NICHD (National Institute of Child Health and Human

Development Neonatal Research Network) (USA), das Vermont Oxford Network (USA) und die Israel National VLBW Database dar [21].

Die durch das NEO-KISS erarbeiteten Diagnosekriterien der Sepsis bei Früh- und Neugeborenen sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Definitionen der Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach Surveillance-Protokoll NEO-KISS des Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité Berlin[22]

Sepsis	Definition
I.) Klinische Sepsis (kein Erregernachweis)	Betreuender Arzt beginnt mit antimikrobieller Therapie für ≥ 5 Tage und kein Erregernachweis in Blutkultur bzw. nicht getestet und keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle und zwei Sepsiszeichen*
II.) Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (aber kein KONS)	Erreger (der kein KONS ist) aus Blut oder Liquor isoliert und zwei Sepsiszeichen*
III.) Mikrobiologisch bestätigte Sepsis (aber nur KONS)	KONS als alleiniger Erreger aus Blut isoliert und zwei Sepsiszeichen* und ein Laborparameter**
*Sepsiszeichen	- o Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ oder Temperaturinstabilität oder Hypothermie $<36,5^{\circ}\text{C}$ - o Tachykardie $>200/\text{min}$ oder neue/vermehrte Bradykardien $<80/\text{min}$ - o Rekapillarierungszeit >2 Sekunden - o Neue oder vermehrte Apnoen (>20 Sekunden) - o Metabolische Azidose mit Basenüberschuss (BE) $< -10\text{mval/l}$ - o Hyperglykämien (Blutzucker $>140\text{ mg/dl}$) - o Andere: graues Hautkolorit, erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler Allgemeinzustand, Apathie etc.
** Laborparameter	- o CRP $>2\text{mg/dl}$ / Interleukin 6 bis 8 erhöht - o I/T-Ratio (Verhältnis unreifer zu reifen Granulozyten) $<0,2$ - o Leukozytopenie $<5/\text{nl}$ - o Thrombozytopenie $<100/\text{nl}$

Morbidität und Mortalität der LOS Die LOS-Rate ist umgekehrt proportional zum Geburtsgewicht und zum Gestationsalter [23]. Ein 100 Gramm höheres Geburtsgewicht verringert nach Fanaroff et al. (1998) das Sepsis-Risiko um 11%, eine Erhöhung des Gestationsalters um eine Woche verringert das Risiko um 14%. Weiterhin zeigen männliche Neugeborene, sowie Kinder mit einem RDS (Respiratory Distress Syndrome) ein erhöhtes Risiko. Auch ein verringertes Baseline-IgG im Serum erhöht das Risiko für eine Sepsis [23]. Der Anteil der durch KONS verursachten LOS an allen LOS ist hoch: In den Jahren 2009 bis 2010 waren nahezu die Hälfte (114 von 235) der durch

das Deutsche Frühgeborenennetzwerk dokumentierten LOS durch KONS verursacht [24].

Die Mortalität der durch KONS verursachten LOS ist gering: In der Studie des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) starben 7% aller VLBW ohne Infektion. Eine durch KONS verursachte LOS erhöhte die Sterblichkeit auf 10%. 2-3% aller KONS-LOS verlaufen tödlich [25][26]. Stoll et al. (2004) konnten zeigen, dass das neurologische Outcome von septischen Kindern schlechter war als von Kindern ohne Sepsis. So traten Zerebralparenzen nach KONS-LOS häufiger auf, die psychomotorische Entwicklung war verlangsamt und der Kopfumfang war geringer [27]. Durch KONS verursachte LOS verlaufen selten fulminant.

Durch die bei einer Sepsis erhöhte Morbidität und Mortalität ergeben sich signifikant längere Krankenhausverweildauern und Behandlungskosten. Die durchschnittliche stationäre Behandlungsdauer verlängert sich durch eine Sepsis von 60 auf 79 Tage [14]. Frühgeborene mit einer LOS werden länger intensivmedizinisch behandelt [28].

1.2.2 Risikofaktoren der Late onset-Sepsis

Die Anlage von Gefäßkathetern ist durch die Fähigkeit koagulasenegativer Bakterien, Plastikoberflächen zu besiedeln und dort einen schützenden Biofilm zu bilden, ein entscheidender Virulenzfaktor zur Ausbildung einer Sepsis (siehe Kapitel 1.4.2) [29]. Es wird weiterhin diskutiert, dass neben der Haut auch die Mukosa des Darms als Erregerreservoir für KONS-LOS fungiert [30][31].

Auch ein verzögerter Nahrungsaufbau erhöht das Risiko: Vor allem die Gabe intravenöser Lipide ist mit Staphylokokken-Septitiden assoziiert [32]. Es konnte nachgewiesen werden, dass parenterale Ernährung die Funktion neutrophiler Granulozyten und damit die bakterizide Aktivität gegen KONS verringert [33]. Weiterhin ist in vitro ein immunmodulatorischer Effekt von Lipiden und Glukose zu beobachten: Bei Zugabe von Lipiden und Glucose zu einem Vollblutansatz mit *Staphylococcus epidermidis* wurden vermehrt proinflammatorische Zytokine freigesetzt [34].

Stillen kann den Krankheitsverlauf der LOS durch KONS hingegen positiv beeinflussen. In einer Studie von Linder et al. (2011) konnte für Kinder stillender Mütter ein statistisch signifikanter kürzerer Krankheitsverlauf nachgewiesen werden [35].

1.2.3 Diagnose

Für eine mikrobiologisch bestätigte KONS-Sepsis werden nach NEO-KISS-Kriterien neben einer positiven Blutkultur zwei klinische Sepsiszeichen und ein positiver Laborparameter gefordert (s. Tabelle 1.2).

Blutkultur Der Nachweis einer Bakteriämie in Form einer positiven Blutkultur ist von großer diagnostischer und therapeutischer Relevanz, da die Isolation des Erregers Resistenztestungen ermöglicht und eine optimale antibiotische Therapie ermöglicht. Ein sicherer Ausschluss einer Bakteriämie würde im Gegenzug zu Antibiotikaeinsparung und zu einer Verringerung von Resistenzbildungen führen.

Die Interpretation der Ergebnisse - nur 10% der Blutkulturen bringen ein positives Ergebnis - birgt in der Neonatologie einige Schwierigkeiten: Issacman et al. (1996) haben gezeigt, dass die Isolationsraten der Blutkulturen mit zunehmender Blutmenge wachsen [36]. Häufig werden jedoch zu geringe Blutmengen abgenommen, was die Sensitivität der Blutkulturen verringert [37]. Speziell bei Frühgeborenen mit entsprechend geringem Blutvolumen kann die mehrfache Abnahme adäquater Blutmengen zu kritischen Blutverlusten und Transfusionsbedarf führen [38]. Daher wird in der klinischen Praxis nur eine Blutkultur abgenommen, der Ausschluss von Kontaminationen über mehrfache Abnahmen ist dementsprechend risikoreich und nicht üblich [39][40]. Zum Ausschluss von Kontaminationen sollte die Entnahme einer Blutkultur aus einer frischen peripheren oder zentralen Punktionsstelle einer Entnahme aus einem liegenden Katheter unbedingt vorgezogen werden [41][42]. Auch die Präanalytik ist ein entscheidender Faktor: In einer Studie von Connell et al. (2007) waren auch nach einer Personalschulung nur 50% der Proben korrekt abgenommen [43].

Laborparameter Als globale Entzündungsmarker dienen hier oftmals das CRP (C-reaktives Protein) und IL (Interleukin) 6. Das CRP wird als diagnostisches Mittel häufig genutzt, ein Anstieg im Serum ist nach 12 bis 24 Stunden messbar. Allerdings liegt die Sensitivität einer einzelnen CRP-Bestimmung beim ersten Sepsis-Verdacht bei nur ca. 61,5%, was durch wiederholte Messungen innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Infektion deutlich verbessert werden kann [44]. Interleukin 6 wird in der frühen Phase der Antwort auf Infektionen ausgeschüttet, hat seinen Peak am Tag der Infektion und ist dementsprechend gut als früher serologischer Marker einer Infektion geeignet [45][46].

1.2.4 Therapie der Late onset-Sepsis

Aufgrund dieser Schwierigkeiten einer mikrobiologischen Diagnosestellung einer Sepsis und der Dauer zwischen Abnahme von Laborproben und Erhalt des Ergebnisses erfolgt die Antibiotikatherapie häufig empirisch nach dem klinischen Erscheinungsbild der Patienten. Nach Stoll et al. (2002) erhielten 56% der VLBW-Neugeborenen eine antibiotische Therapie, die nach dem 3. Lebenstag begann. Zu beobachten war neben einer negativen Korrelation zwischen Antibiotikabedarf und Gestationsalter auch eine negative Korrelation zwischen Antibiotikabedarf und Geburtsgewicht. Die am häufigsten genutzten Antibiotika waren Gentamicin, Vancomycin, Cefotaxim, Ampicillin und Tobramycin [14].

Antibiotikaeinsparungen durch bessere diagnostische Instrumente sind wichtig, um Resistenzbildungen und Septitiden mit multiresistenten Keimen zu vermeiden. Hierzu wurden zum Beispiel Guidelines innerhalb einzelner Intensivstationen oder mehrerer Zentren zur Glykopeptid-Einsparung eingesetzt [47][48].

Bei Verdacht auf eine Sepsis stellt sich die Frage, ob ein potentiell infizierter Katheter entfernt oder zur weiteren antibiotischen Therapie der selten fulminant verlaufenden KONS-Septitiden belassen werden soll. Aktuelle Richtlinien der IDSA (Infectious Diseases Society of America) sehen bei unkomplizierten KONS-Bakterämien kein grundsätzliches Entfernen lange liegender zentraler Katheter vor. Stattdessen kann eine verlängerte intravenöse antibiotische Therapie oder ein „Antibiotic Lock“ (Siehe Kapitel 1.2.5) durchgeführt werden. Bei einer klinischen Verschlechterung unter antibiotischer Therapie bzw. einer verlängerten oder erneuten Bakteriämie sollte der Katheter auch bei KONS-Bakterämien entfernt werden. Bei Nachweis von *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp. oder Gram-negativen Keimen empfehlen die IDSA-Richtlinien auch bei unkomplizierten Bakteriämien das Entfernen von zentralvenösen Kathetern, da die Sanierung dieser Keime deutlich schwieriger ist [49].

Glykopeptide Die Antibiotika der Gruppe der Glykopeptide, deren wichtigste Vertreter Teicoplanin und Vancomycin sind, stellen Reserveantibiotika gegen Multiresistente Staphylokokken und Enterokokken-Stämme dar. Sie greifen in den Zellwand-aufbau Gram-positiver Bakterien ein und sind daher gegen Gram-negative Bakterien unwirksam. Die Gabe von Glykopeptiden erfolgt intravenös (bzw. zur Behandlung einer pseudomembranösen Enterokolitis auch oral), da sie nicht enteral resorbiert werden. Glykopeptide sind nephrotoxisch und ototoxisch. Sowohl Nephrotoxizität als auch Ototoxizität sind bei Vancomycin stärker ausgeprägt als bei Teicoplanin [50]. Vancomycin wird in empirischen Therapieregimen zur Initialtherapie bei Verdacht auf eine Sepsis

mit MRSA (Methicillinresistenter *Staphylococcus aureus*)-Risiko häufig verwendet [17]. Da KONS häufig mecA-positiv und gegen β -Laktam-Antibiotika resistent sind, stellen Glykopeptide eine entscheidende Therapieoption von KONS-LOS dar [51][52].

Trotz des günstigeren Nebenwirkungsprofils, günstigerer Kinetik und in Erwachsenen-Studien bewiesener ähnlicher klinischer und bakteriologischer Wirksamkeit[53] wurde Teicoplanin in den USA erst 2009 zugelassen, weshalb es mehr Studien zu Vancomycin als zu Teicoplanin gibt. In neueren Studien scheint Teicoplanin jedoch etwas wirksamer zu sein als Vancomycin [54].

Glykopeptid-Resistenzen treten seit der zweiten Hälfte der 1980er Jahre vor allem bei KONS (relevant vor allem bei *Staphylococcus epidermidis*) und Enterokokken, sowie seltener bei *Staphylococcus aureus* und einigen nicht humanpathogenen Keimen auf, wobei Resistenzen gegen Teicoplanin häufiger beobachtet werden als gegen Vancomycin [55][56]. Aufgrund dieser Resistenzlage werden auch neuere Antibiotika, wie zum Beispiel das Aminoglykosid Arbekacin oder das Oxazolidonon Linezolid eingesetzt [51]. Zur Verhinderung von Resistenzbildungen wird auch ein Rotationsprinzip angedacht. Allerdings sind diese Ansätze noch nicht gesichert und nicht im Setting einer LOS bei Neugeborenen erprobt worden [57][58].

1.2.5 Prävention der Late onset-Sepsis

Glykopeptide Aufgrund des hohen Risikos von Gram-positiven KONS-LOS bei Risikoneugeborenen werden teilweise prophylaktische Glykopeptidgaben - entweder als kontinuierliche Infusion oder in Form von mehrfach täglichen Einzelgaben - appliziert [59]. In einigen von Craft et al. 2000 in einem Cochrane Review evaluierten Studien konnte bei einer prophylaktischen Glykopeptidgabe eine verringerte Anzahl positiver Blutkulturen nachgewiesen werden, was unter anderem durch methodische Probleme (wie Abnahmen von Blutkulturen aus liegenden und eventuell Antibiotikareste enthaltenden Kathetern) erklärbar sein kann. In keiner dieser Studien konnte ein Effekt einer Vancomycin-Prophylaxe auf die Mortalität oder auf die Krankenhausverweildauer gezeigt werden [59].

In Anbetracht der unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Glykopeptiden (unter anderem Schallempfindungsschwerhörigkeiten und Nephrotoxizität, siehe Kapitel 1.5.1) und der Förderung von Resistenzentwicklungen kann eine prophylaktische Glykopeptidgabe derzeit nach Jardine et al. (2008) und Lodha et al. (2008) nicht empfohlen werden [60][61].

Eine weitere Technik ist das „**Antibiotic Lock**“: Da systemisch angewandte Antibiotika das Lumen einliegender Gefäßkatheter schlecht erreichen, können bei Nichtbenutzung antibiotische Agenzien wie Glykopeptide in das Lumen nicht genutzter liegender Verweilkatheter eingebracht werden [62][63]. Ein Cochrane Review von Taylor et al. (2015) beschreibt keinen positiven Effekt bei Auswertung von drei Studien mit unterschiedlichen Strategien zum Antibiotic Lock [64].

1.3 Das Immunsystem

Das Abwehrsystem des Menschen wird in zwei Teile eingeteilt: Das angeborene (auch unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt eine erste Abwehrreaktion sicher, die meist nicht zur vollständigen Elimination eines Erregers führt, jedoch die Zeit bis zum Greifen des erworbenen Immunsystems überbrücken kann. Zum unspezifischen Immunsystem gehören Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, sowie das Komplementsystem, während das erworbene Immunsystem vor allem durch B- und T-Lymphozyten getragen wird [65].

1.3.1 Barrierefunktion der Haut

Die Haut ist die äußere Barriere des Körpers und schützt den Körper nicht nur vor physischen Schäden, sondern stellt auch einen immunologisch relevantes Organ dar [66]. Die Haut von Frühgeborenen ist unreif, dementsprechend dauert die postpartale Reifung länger als bei reifen Neugeborenen [67][68]. Zusätzlich zur Unreife der Haut besteht bei sehr untergewichtigen Neugeborenen eine stark verringerte Vernix caseosa, die reife Neugeborene unter anderem vor Mazerationen und Infektionen schützt [69].

Die Haut wird durch eine Vielzahl protektiver Stoffe geschützt: So werden Enzyme, die mikrobielle Strukturen zerstören (z.B. Lysozyme), Peptide, die für Keime wichtige essentielle Elemente wie zum Beispiel Zink oder Eisen binden können (z.B. Calprotectin, Lactoferrin), und Proteine, die mikrobielle Membranen penetrieren (z.B. Defensine, Cathelicidine), gebildet [70]. Die Produktion dieser AMP (Antimikrobielle Polypeptide) wird vor allem von Keratinozyten, Mastzellen, Neutrophilen und Sebozyten getragen [71]. Einige dieser AMP sind nicht nur auf der Haut, sondern auch in der Vernix caseosa

und in Organen wie dem respiratorischen System zu finden [72][73]. AMP sind auch im Nabelschnurblut nachweisbar [74].

1.3.2 Humorale Komponenten des Immunsystems

Überwinden Krankheitserreger die Barriere der Haut, erfolgt der Versuch einer Elimination der Erreger zunächst durch die Phagozytose durch Gewebsmonozyten und Makrophagen. Gelingt diese nicht, wandern - angelockt durch von Makrophagen ausgeschütteten Chemokinen - aus dem Blut neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in das Entzündungsareal ein. Einige dieser ausgeschütteten Chemokine wurden in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Immunreaktionen genutzt. Die kaskadenartige Akzeleration der Immunreaktion manifestiert sich in den klassischen klinischen Entzündungszeichen: Schmerz, Hitze, Rötung, Schwellung und einer Funktionseinschränkung des Organs [75].

Zytokine

Zytokine, eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen mit einem Molekulargewicht von 8-40000 Dalton, werden von fast allen kernhaltigen Zellen synthetisiert und dienen der Kommunikation der Zellen im Organismus. Auch die Zellen des Immunsystems synthetisieren diese Peptide [76]. Die Wirkungen der Zytokine sind vielfältig. So kann ein Zytokin - abhängig von Ort und Zeitpunkt der Freisetzung - sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben [77].

Interleukin 6 Das von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelien und Fibroblasten freigesetzte IL6 war zunächst hauptsächlich für seine proinflammatorische Wirkung bekannt: Es fördert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und die Induktion der B-Zell-Differenzierung, hat über die Stimulation der hämatogenen Progenitorzellen im Knochenmark eine hämatopoetische Wirkung und bewirkt eine Stimulation der Reifung von Megakaryozyten [78]. Heute sind jedoch auch antiinflammatorisch-regulatorische Wirkungen bekannt [79]. IL6 nimmt nach heutigem Kenntnisstand eine entscheidende Rolle beim Wechsel der angeborenen zur erworbenen Immunantwort ein [80].

Interleukin 8 IL8 gilt vor allem als proinflammatorisch. Es bewirkt als Chemokin die Migration der Leukozyten in das Gewebe und aktiviert die Degranulation von neutrophilen Granulozyten [76]. IL8 wird synthetisiert von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen und wirkt an neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten [81]. IL8 wirkt weiterhin angiogenetisch [82].

Interleukin 10 ist ein wichtiges antiinflammatorisches Zytokin, es durchbricht die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Entzündungskaskade [76]. Es wird ausgeschüttet von Monozyten/Makrophagen, Th2-Zellen und B-Zellen. Es inhibiert die Produktion von IL1, IL6, IL8, $\text{TNF}\alpha$ sowie die T-Zell Proliferation [77][83].

$\text{TNF}\alpha$ wird durch Makrophagen, natürliche Killerzellen und T-Zellen bei Infektion, Trauma und Ischämie, sowie bei deren Stimulation durch T-Zellen und Toxine ausgeschüttet und wirkt synergistisch mit dem proinflammatorischen IL1 [65][76]. Es steigert die Ausschüttung von IL8 und anderer proinflammatorischer Zytokine. $\text{TNF}\alpha$ fördert die Emigration der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut ins Interstitium, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen (über Platelet-activating factor, Leukotriene, Prostaglandine, NO (Stickstoffmonoxid)) auf den Endothelien steigert [84]. Weiterhin wird das Gerinnungssystem aktiviert, so dass ein Entzündungsherd eingedämmt werden kann. Bei Überexpression entstehen disseminierte kleine Thromben, $\text{TNF}\alpha$ ist dann ein wichtiger Botenstoff im Rahmen des septischen Schocks [85].

Das Komplementsystem

Das Komplementsystem, welches einen weiteren essenziellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellt, wird nach Aktivierung über die 3 Pathways (klassischer Pathway, Mannose-binding-lectin, alternativer Pathway) von löslichen Plasmaproteinen getragen. Es dient der Opsonisierung und der direkten Lyse von fremden Bakterien und Zellen, es verstärkt die Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten und bildet eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [86]. PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), ein im Biofilm wichtiges Exopolysaccharid (siehe auch Kapitel 1.4.2), gilt als starker Aktivator des Komplementsystems [87]. Das Komplementsystem ist nach Untersuchungen von Granslo et al. (2013), in denen nach Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Stämme im Blut reifer Neugeborener im Vergleich zu Kontrollproben Erwachsener eine geringere Komplementaktivierung stattfand, unreif, was eine erhöhte Anfälligkeit gegen *Staphylococcus epidermidis*-Infektionen erklären könnte [88].

1.3.3 Toll-Like-Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege

Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über Membranrezeptoren, die evolutionär gut konservierte, häufig vorkommende Zellbestandteile von Mikroorganismen (engl. PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns)), die bei höheren Lebewesen nicht vorkommen, registrieren. Zu diesen Rezeptoren gehört die Gruppe der TLR (Toll-Like-Rezeptoren), die auch von Lymphozyten, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren binden unter anderem Lipoproteine, Peptidoglykane, bei Gram-negativen Bakterien LPS (Lipopolysaccharid) und bei Gram-positiven Erregern Lipoteichonsäuren [89][90]. Nach dem Binden eines Pathogens an den TLR-Rezeptor werden über die Auslösung einer komplizierten intrazellulären Signalkaskade proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL1 und IL12 synthetisiert und ausgeschüttet, was den Beginn einer Entzündungsreaktion initiiert [91].

In dieser Arbeit wurden als Stimulantien *Staphylococcus epidermidis*-Isolate, LPS und Pam₃Cys ((S)-(2,3- bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser(S)-Lys₃-OH-Trihydrochlorid), ein vom N-Terminus bakterieller Lipopeptide abgeleitetes synthetisches Lipopeptid [92], genutzt. Diese binden an TLR, weitere Stimulantien, Kofaktoren bei der extrazellulären Bindung und die intrazellulären Signalwege sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst.

Tabelle 1.3: Übersicht der relevanten TLR-Rezeptoren und der jeweiligen Signalwege [93][94][95]

	TLR1/TLR2	TLR2	TLR4
relevante Stimulantien	Lipopeptide (z.B. Pam3Cys)	PSMs von Staphylococcus epidermidis , Lipoteichonsäuren, Lipopeptide, Peptidoglykane	LPS , RSV (Respiratory-Syncytial-Virus)-Hüllproteine
Membranständige Kofaktoren bei Rezeptorbindung	CD (Cluster of Differentiation) 14	TLR6 (verstärkend), TLR1 (inhibierend)	MD2 (Myeloid Differentiation Factor 2)
Intrazelluläre Signalwege	MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88)-Signalweg		MyD88-Signalweg (frühe Phase) und TRIF (TIR-Domain-Containing Adapter-inducing Interferon- <i>beta</i>)-Signalweg (späte Phase)*

* Bei Aktivierung von TLR4 werden beide Signalwege zur Ausbildung einer suffizienten proinflammatorischen Immunantwort benötigt [94].

1.4 Koagulasenegative Staphylokokken

Die Gattung der Staphylokokken wurde erstmals 1883 durch den Chirurgen Sir Alexander Ogston beschrieben [96]. Staphylokokken sind Gram-positive kugelförmige Bakterien, die unbeweglich sind und häufig traubenförmige Formationen bilden. Grundsätzlich können Staphylokokken in 2 Gruppen eingeteilt werden: Koagulasepositive Staphylokokken bilden das Enzym Koagulase, welches Blut gerinnen lässt. Die klinisch wichtigste Art dieser Gruppe ist *Staphylococcus aureus*. Fehlt die Fähigkeit zur Blutkoagulation, spricht man von KONS. Der beim Mensch am häufigsten gefundene Keim dieser Gruppe ist *Staphylococcus epidermidis*. Weitere humanmedizinisch relevante KONS sind *S.saphrophyticus*, *S.haemolyticus*, *S.capitis*, *S.simulans*, *S.hominis* und *S.warneri* [97].

KONS stellen einen Teil der normalen mikrobiellen Hautflora des Menschen dar. Während der Fokus des klinischen Interesses früher auf *Staphylococcus aureus* lag und KONS als harmlose Hautkeime betrachtet wurden, gilt ihnen heute aufgrund ihrer Rolle als Verursacher vor allem nosokomialer Infektionen ein gesteigertes Interesse [98][99][100].

1.4.1 Besiedlung Neugeborener

Während der ersten Lebensstage wird die Haut der Neugeborenen besiedelt [101]. Vorherrschend sind hierbei zunächst Staphylokokken und Streptokokken, später nimmt deren Anteil jedoch zugunsten einer diversifizierteren Mikroflora ab [102][103]. Besonders dicht besiedelte KONS-Reservoirs sind der Perianalbereich, die Axilla, die Areole hinter dem Ohr und die Nasenschleimhäute, während an Unterarmen und Beinen - typischen Stellen zur Anlage venöser Zugänge - eine geringere Besiedlung nachzuweisen ist [30].

1.4.2 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenität eines Erregers wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen zum Beispiel Antibiotikaresistenzen, die insbesondere im klinischen Umfeld die Pathogenität eines Keimes mitbestimmen. Unter Virulenzfaktoren werden die virulenten Eigenschaften eines Keimes verstanden.

Sowohl für die Kolonialisierung als auch für die Infektion sind Virulenzfaktoren nötig, die dem Bakterium das Überleben in seinem Habitat sichern. So spielen sowohl Adhäsionsfaktoren, die Fähigkeit dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, als auch Toxine und degenerative Exoenzyme eine Rolle. KONS bilden im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* deutlich seltener Virulenzfaktoren aus [104].

Biofilm

Die Rolle des Biofilms Der wichtigste Virulenzfaktor von *Staphylococcus epidermidis* ist die Fähigkeit an Biomaterialien zu adherieren und dort einen Biofilm zu bilden, der die Bakterienzellen vor dem Zugriff des Immunsystems, aber auch vor Antibiotika schützt und einen mechanischen Schutz bietet [105]. Biofilme sind komplex aufgebaut, bestehen aus Bakterienzellen bzw. Bakterienzellaggregationen, extrazellulären Polymeren und dazwischen liegenden Kanälen, die der Versorgung der Bakterienzellen dienen [106]. Innerhalb eines Biofilms stellen die zellulären Bestandteile ca. 10% der Gesamtmasse dar. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist variabel. Die wichtigsten Adhäsionsfaktoren sind *in vitro* PIA, extrazelluläre DNA und extrazelluläre Proteine. Daneben besteht die Matrix auch aus Lipiden und Biosurfactants. Die Rolle der extrazellulären Matrix ist vielfältig: Unter anderem dienen sie der Adhäsion an Fremdmaterialien, über Kohäsionskräfte der Stabilität, der Wasserretention, dem Austausch genetischer Informationen, der Protektion vor äußeren Einflüssen (zum Beispiel vor dem Immunsystem und Antibiotika) sowie der Energiespeicherung [107][108][109].

Beeinflussung des Immunsystems durch Biofilme PIA bildende (*icaADBC*-positive) Bakterien rufen eine geringere proinflammatorische Immunantwort des Wirts hervor als *icaADBC*-negative Stämme, was möglicherweise durch den Biofilm zu erklären ist [110]. Biofilme stellen einen Schutz gegen Bestandteile des Immunsystems dar. Dazu gehört der Schutz vor Leukozyten, allerdings konnte eine Penetration des Biofilmes von *Staphylococcus aureus* in einer künstlichen Umgebung mit Scherbewegungen, die den Bedingungen im Gefäßsystem entsprechen soll, gezeigt werden [105][111]. Es besteht weiterhin hinter einem Biofilm Schutz vor der Opsonisierung durch Komplementfaktor C3b und IgG (Immunglobulin G), obwohl bei Infektionen mit Biofilm-positiven Bakterien deutlich mehr Komplementfaktor C3a aktiviert wird als durch Biofilm-negative Mutanten. Durch die verringerte Opsonisierung besteht ein Schutz vor der Phagozytose durch Granulozyten [112]. Es bestehen jedoch auch direkte Wir-

kungen des Biofilms auf das angeborene Immunsystem: So ist eine Senkung der Phagozytenaktivität beschrieben, was auch planktonische Bakterien schützt [113][114].

Biofilmbildung Die vier Phasen der Biofilmbildung sind in Tabelle 1.4 dargestellt.

Tabelle 1.4: Die vier Phasen der Biofilmbildung

1 Adhärenz an Biomaterialien oder Fremdkörpern wie Kathetern

- zunächst unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen: Van-der-Waals-Kräfte und evtl. Elektrostatistische Interaktionen, Adhäsine und Autolysine (AtlE und Aae) sind bei *Staphylococcus epidermidis* relevant [104].
- Fremdmaterialien werden vom Körper schnell mit einer Schicht aus Kollagen, Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin überzogen. Adhärenzfaktoren, bezeichnet als MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) interagieren mit dieser und initiieren eine Adhäsion [115].

2 Akkumulation der Bakterien in mehreren Schichten

- Wird vor allem durch das Exopolysaccharid PIA getragen [104]. PIA wird durch im *icaADBC*-Operon codierte Proteine produziert und durch die regulatorische Sequenz *icaR* reguliert. Die Repression durch *icaR* kann durch Ethanol aufgehoben werden [116].
- Die Regulatorgene *SarA* und *sigB* spielen in der Akkumulationsphase eine regulatorische Rolle [117][118].

3 Reifung des Biofilms

- Bildung pilzförmiger Zellverbände mit dazwischenliegenden Versorgungskanälen. Der Metabolismus, die Struktur und Physiologie der in einem Zellverbund des Biofilms wachsenden Bakterien ist ähnlich und unterscheidet sich vom Metabolismus freier, planktonischer Bakterien [115].

4 Freisetzung von Bakterien aus dem Biofilm

- Die Freisetzung - die am schlechtesten erforschte Phase - scheint vom „quorum sensing factor“ *agr* (Accessory Gene Regulator), der die Genexpression der Bakterien in Abhängigkeit von der Zelldichte beeinflusst und im Biofilmverbund herunter reguliert ist, abhängig zu sein [104][119].
-

Antibiotika und Biofilme Die Beeinflussung der Diffusion von Antibiotika durch Biofilme ist umstritten. So konnte sowohl für die Betalaktamantibiotika Oxacillin und Cefotaxim als auch für Vancomycin eine verringerte Diffusion durch von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* gebildete Biofilme nachgewiesen werden, während die Diffusion von Ciprofloxacin und Amikacin gegenüber einem Vergleichsmedium nicht beeinflusst wurde [120]. Andererseits konnte in fluoreszenzmikroskopischen Messungen keine Verringerung der Diffusion von Vancomycin durch *Staphylococcus aureus*-Biofilme nachgewiesen werden [121]. Weiterhin wachsen Bakterienzellen im Verbund des Biofilms teilweise langsamer, woraus eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika resultiert [105]. In Biofilmen von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* herrscht eine erhöhte Mutationsrate, was zu Resistenzbildungen gegen

Antibiotika führen kann. Oxidativer Stress kann diese Mutationen verursachen [122].

Es bestehen darüber hinaus Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und der Biofilmbildung: Einerseits wurde bei Antibiotika-Konzentrationen unterhalb der MIC (Minimale Inhibitorische Konzentration) in zahlreichen Studien eine Induktion der Biofilmbildung belegt. Eine gesteigerte Biofilmbildung wurde bei *Staphylococcus epidermidis* zum Beispiel durch Cephalosporine, Macrolide und Tetracycline nachgewiesen, der Effekt ist aber auch für Vancomycin beschrieben [123][124]. Andererseits verringert der Biofilm die Aktivität von Vancomycin und Teicoplanin [125].

Es wird weiterhin vermutet, dass die räumliche Nähe der in Biofilmen organisierten Bakterien über einen verbesserten Austausch von Resistenzgenen zu gehäuften Antibiotikaresistenzen führt [126]. Interessanterweise ist die Biofilmmasse von *Staphylococcus epidermidis* unter Therapie mit Glykopeptiden erhöht. Vancomycin kann einen Biofilm jedoch nicht auflösen: Es zerstört nur die zellulären Bestandteile, die Biofilm-Matrix bleibt jedoch bestehen, was eventuell für eine Rekolonisation wichtig sein könnte [54].

Weitere Virulenzfaktoren

Ein weiterer Virulenzfaktor, der *Staphylococcus epidermidis* das Überleben in seinem Habitat ermöglicht, ist PGA (Poly- γ -D-Glutamat), ein saures Polyamid, welches unter anderem von *Bacillus*- und *Staphylococcus*-Spezies gebildet wird. Es schützt die Bakterienzellen vor dem Zugriff des angeborenen Immunsystems - besonders vor antimikrobiellen Peptiden und neutrophiler Phagozytose. Weiterhin bietet es Schutz vor hohen Salzkonzentrationen, was *Staphylococcus epidermidis* ein Überleben in seinem Habitat der menschlichen Haut ermöglicht. PGA wird als unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung katheterassoziierter Infektionen gesehen [127].

Obwohl *Staphylococcus epidermidis* im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus* nur wenige weitere Virulenzfaktoren ausbildet, kann er zudem extrazelluläre Enzyme wie Lipasen, die ihm das Überleben in fettigen Sekreten sichern, und Proteasen, die Wirtsproteine degradieren können, synthetisieren [104][128].

Antibiotikaresistenzen

Antibiotikaresistenzen stellen einen häufig auftretenden Pathogenitätsfaktor von großer klinischer Relevanz dar. Resistenzen gegenüber Methicillin, aber auch anderen Antibiotika sind weit verbreitet [129][130][131]. Ein Transfer von Resistenzgenen zwischen

unterschiedlichen Staphylokokken-Spezies ist bekannt [132][133]. *Staphylococcus epidermidis* kann Methicillin-Resistenzen auf *Staphylococcus aureus*-Stämme übertragen [134][135]. Auch ein Transfer zwischen Staphylokokken und anderen Bakterien wie ein Transfer einer Vancomycinresistenz von *Enterococcus faecalis* auf *Staphylococcus aureus* wurde beschrieben [136]. Antibiotika-Resistenzen stellen außerdem einen Selektionsfaktor dar. In einer von Krediet et al. (2004) durchgeführten Studie setzten sich Stämme mit Resistenzen gegen Beta-Laktam-Antibiotika gegen Stämme ohne diese Resistenzen durch [137]. Verantwortlich für Resistenzen gegen Beta-Laktam-Antibiotika ist das Gen *mecA* (Gen des Penicillin-bindenden Proteins PBP2A), welches ein Penicillin-Bindungs-Protein mit geringer Affinität zu Penicillin codiert [138].

1.4.3 Mechanismen von KONS zum Überleben auf der Haut und symbiontische Beziehungen zum Wirt

Hautkeime benötigen bestimmte Eigenschaften, um die menschliche Haut besiedeln zu können. Einerseits stellen KONS auf der Haut ein wichtiges Erregerreservoir für Blutinfektionen dar, andererseits bilden sie auch Stoffe, die andere Bakterien mit höherer Virulenz verdrängen [31]. *Staphylococcus epidermidis* konkurriert dabei insbesondere mit dem häufiger invasiven *Staphylococcus aureus* [139]. Es besteht eine Symbiose zwischen besiedelnden Hautkeimen und dem angeborenen Immunsystem: Hautkeime können das Immunsystem unterstützen und Infektionen vorbeugen [71]. Demnach können Peptide der Gruppe der PSMs (Phenol-Soluble Modulins) vorteilhaft für den Wirt sein. Einige PSMs verursachen Membranlöcher in pathogenen Keimen wie *Staphylococcus aureus*, A-Streptokokken und *E.coli* [140]. Weiterhin können PSMs, deren proinflammatorische Wirkung bekannt ist, auch modulierend auf das unspezifische Immunsystem wirken: So verstärkt das zu der Gruppe der PSMs gehörende Delta-Toxin die Aktivität von Granulozyten gegen A-Streptokokken [104][141]. Schlussendlich sind diese symbiotischen Beziehungen noch nicht vollständig erforscht. PSMs können durch ihre proinflammatorische Wirkung auch zur Virulenz von *Staphylococcus epidermidis* beitragen. Wahrscheinlich sind diese PSMs daher bei intaktem Immunsystem vorteilhaft für den Wirt und können bei einer Immunschwächung schädlich werden [71].

Weiterhin besteht die Theorie eines „zellulären Primings“ durch *Staphylococcus epidermidis*: Über TLR (s.Kapitel 1.3) findet eine Aktivierung des Immunsystems statt, so dass bei einem folgenden Kontakt mit einem virulenteren Keim eine gezieltere und schnellere Immunantwort initiiert werden kann [142]. Auch konnte gezeigt werden,

dass als Kommensalen auf der Haut vorkommende *Staphylococcus epidermidis*-Isolate über TLR2 und Transkriptionsfaktor NF- κ B eine permanent geringe Ausschüttung von AMP verursachen. Zu diesen unter anderem von Keratinozyten ausgeschütteten AMP zählen β -Defensine HBD-1 bis HBD-3 und RNase 7. Die Produktion dieser AMP scheint ausreichend zu sein, um ein Wachstum auf der menschlichen Haut zu limitieren. Pathogene Keime können die Ausschüttung der AMP wiederum inhibieren, so dass diese über andere Signalwege (Phosphatidylinositol-3-kinase und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) erfolgt. Interessanterweise konnte im Experiment gezeigt werden, dass die Hemmung des TLR2/NF- κ B-Weges bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten aufgehoben werden kann und schließlich eine deutlich höhere Sekretion an AMP resultiert [143][144].

Neben iatrogen gebildeten Eintrittspforten, beispielsweise durch Anlage venöser Katheter [131], können auch Haarfollikel, die in der Haut Neugeborener in hoher Dichte vorliegen, eine Eintrittspforte für Hautkeime bilden. Das Krankheitsbild des Erythema toxicum neonatorum wird mit der Besiedlung Neugeborener durch Hautkeime vor allem durch KONS, die diese Eintrittspforte nutzen, in Verbindung gebracht. Das Neugeborenenexanthem wird demnach schließlich als Korrelat der angeborenen Immunantwort auf die Besiedlung der Haarfollikel gesehen [145].

1.5 Das Diuretikum Furosemid und seine immunmodulatorische Wirkung

1.5.1 Pharmakologische Eigenschaften

Furosemid (4-Chlor-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoylanthranilsäure), ein seit den 1960er Jahren bekanntes Schleifendiuretikum, hemmt den $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$ -Cotransporter im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife der Niere [146][147][148]. Es findet in Pädiatrie und Neonatologie rege Anwendung [149]. Ein dem $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$ -Cotransporter der Niere (Typ NKCC2) sehr ähnlicher Transporter (Typ NKCC1) wurde zudem in zahlreichen Geweben wie dem Kolon, den Speicheldrüsen und der Stria vascularis gefunden, was für das Verständnis der Nebenwirkungen von Furosemid von Relevanz ist [150].

Pharmakokinetik Neben einer intravenösen oder oralen Gabe ist auch die inhalative Applikation von Furosemid möglich [151]. Furosemid hat eine hohe Plasmaeiweißbindung (ca. 98% an Albumin gebunden) und wird im proximalen Tubulus aktiv in das Tubuluslumen sezerniert. Von dort aus gelangt es mit dem Fluss des Harns bis an den Wirkort im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife [152].

Furosemid ist plazentagängig, es wird häufig zur Therapie maternalen Ödeme eingesetzt. Die Plasmahalbwertszeit ist dabei umgekehrt proportional zum Gestationsalter, was bei der Dosierung von Furosemid beachtet werden muss [154].

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen Zu den durch die Wirkung auf Niere und Wasserhaushalt bedingten unerwünschten Arzneimittelleffekten zählen Dehydratation, Hypokaliämie, Hyponaträmie, die metabolische Alkalose und die Hyperurikämie. Extrarenale Nebenwirkungen bestehen - teilweise bedingt durch das Vorhandensein von NKCC1-Transportern in extrarenalen Geweben - in Hyperglykämien, Schallempfindungsschwerhörigkeiten bis zur Gehörlosigkeit und Pankreatitiden [155]. Eine weitere wichtige unerwünschte Wirkung bei langfristiger Furosemidtherapie besteht in der durch die Hypercalciurie bedingten Ausbildung von Nierensteinen, die wiederum sekundär zu einer Urosepsis führen kann [156].

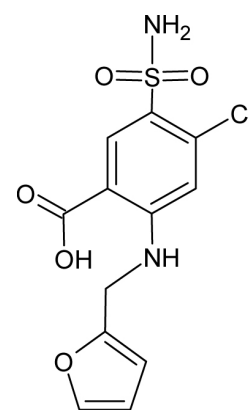


Abbildung 1.1:
Furosemid
(4-Chlor-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoylanthranilsäure)[153]

Weiterhin wird die Therapie mit Furosemid als größter Risikofaktor für die Nephrocalcinose bei Frühgeborenen gesehen [157]. Über eine Stimulation der Synthese von renalem Prostaglandin E_2 erhöht die Therapie mit Furosemid die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines persistierenden Ductus Arteriosus [158].

1.5.2 Der Klinische Einsatz von Furosemid in Pädiatrie und Neonatologie

Während Diuretika bei Erwachsenen häufig zur Therapie renaler Erkrankungen, Hypertonie und (Links-)Herzinsuffizienz eingesetzt werden, stellt bei Frühgeborenen die Behandlung der BPD (Bronchopulmonale Dysplasie) eine wichtige Indikation dar [155][159]. Tabelle 1.5 gewährt einen Überblick über pädiatrische Indikationen von Furosemid.

Tabelle 1.5: Pädiatrische Indikationen für Furosemid nach Witte et al.[155]

pulmonale Erkrankungen	BPD (Hauptindikation bei Frühgeborenen) , RDS, pulmonale Ödeme (durch erhöhten hydrostatischen Druck oder erhöhte alveoläre Permeabilität)
Herz-Kreislaufkrankungen	Hypervolämie, (kongestive) Herzinsuffizienz - meist verursacht durch Anomalien und daraus resultierender veränderter Hämodynamik
renale Erkrankungen	Nephrotisches Syndrom, Glomerulonephritis, chronische Niereninsuffizienz, Prophylaxe und Therapie von akutem Nierenversagen, Nephrocalcinose [160]
Zentrales Nervensystem	erhöhter Hirndruck
weitere Indikationen	Chemotherapien, z.B. Verringerung der Toxizität von Cyclophosphamid

Furosemid bei pulmonalen Erkrankungen Die Wirkung auf Atemwege und Lunge ist nicht nur über die renale Wirkung von Furosemid erklärbar, da die pulmonale Wirkung von Furosemid vor der renalen Wirkung von Furosemid einsetzt. Bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen konnte bei inhalativer Anwendung von Furosemid eine Steigerung von Compliance und Tidalvolumen gezeigt werden [161]. Dieser Effekt ist auch für intravenöse Applikation von Furosemid beschrieben [162]. Der einer Steigerung der pulmonalen Compliance zugrunde liegende Wirkmechanismus wird in einer Erhöhung des in den Atemwegen gebildeten PGE_2 (Prostaglandin E_2) und Prostazyklin, sowie in der Relaxierung der glatten Muskulatur der Atemwege über ein intrazelluläres Absenken von Natrium und Calcium gesehen [163][164].

Schon Ende der 1980er Jahre wurde ein abmildernder Effekt von inhalativ appliziertem Furosemid auf asthmatische Symptome beschrieben [165]. Moscato et al. (1991) konnten eine Inhibition der neutrophilen Chemotaxis zeigen [166]. Die Wirkung von Furosemid ist ähnlich der Wirkung der Chromone, jedoch ist es für den klinischen Einsatz bei Asthma bronchiale nicht wirksam genug [167].

1.5.3 Beeinflussung des Immunsystems durch Furosemid

Auch wurde eine direkte immunsuppressive Wirkung von Furosemid untersucht: Yuengsrigul et al. (1999) konnten zeigen, dass die durch LPS induzierte Freisetzung der Interleukine $\text{TNF}\alpha$, IL6 und IL8 je nach gleichzeitig applizierter Dosis Furosemid in vitro dosisabhängig abnehmend ist. Dieser Effekt war mit der Wirkung einer equimolaren Dosis Hydrocortison vergleichbar. Hohe Furosemid-Konzentrationen waren zudem zytotoxisch [168]. Auch Sheikhi et al. (2007) haben eine abhängig von der Furosemid-Dosis verringerte IL6- und $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung beschrieben [169].

Lakhani et al. (1997) konnten weiterhin zeigen, dass Furosemid die Fähigkeit von Granulozyten Frühgeborener zur Phagozytose einschränkt. Zwischen reifen Neugeborenen und Erwachsenen bestand dahingehend jedoch kein Unterschied [170].

2 Fragestellung

Infektiöse Komplikationen durch *Staphylococcus epidermidis* stellen in der Neonatologie ein ernst zu nehmendes Risiko dar. Zum Verständnis der Late-onset-Sepsis durch *Staphylococcus epidermidis* ist einerseits eine Kenntnis von der klinischen Auswirkung erregerspezifischer Virulenzfaktoren, andererseits auch eine Kenntnis der durch die Erreger induzierten Immunreaktion Neugeborener und deren Beeinflussung durch ärztliches Handeln von Relevanz.

Aus diesem Grund setzen manche Neugeborenenintensivstationen prophylaktisch Glykopeptide bei liegendem Gefäßkatheter ein. Die Datenlage dafür ist allerdings unklar.

Daraus ergeben sich in dieser Arbeit die zu überprüfende Thesen:

These 1 *Staphylococcus epidermidis*-Isolate, die im Rahmen einer Sepsis gewonnen wurden, induzieren eine stärkere Inflammation bzw. Antiinflammation als im Rahmen von Routineproben gewonnene Isolate.

These 2 Neben der Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms, der über einen Escape-Mechanismus zu einer messbaren Verringerung der Immunantwort führt, sind auch weitere Virulenzfaktoren wie Lipasen und Proteasen für die Immunreaktion relevant.

These 3 Furosemid wirkt immunsuppressiv, dieser Effekt kann durch eine Reduktion der Zytokinantwort belegt werden.

These 4 Eine prophylaktische Gabe von Glykopeptiden zur Prävention neonataler Septitiden erhöht das Risiko von Nebenwirkungen wie Schallempfindungsschwerhörigkeiten oder Niereninsuffizienzen. Bei unklarer Datenlage einer prophylaktischen Glykopeptidgabe ist zu prüfen, ob ein Verzicht auf prophylaktische Teicoplaningaben die Sepsisrate erhöht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Blutproben Zur Überprüfung der Thesen 1 bis 3 wurden Untersuchungen an Nabelschnurblut Neugeborener (geboren zwischen Juli 2009 und Juni 2011, Gestationsalter siehe Tabelle 3.1) durchgeführt. Nach pränataler Aufklärung und Einwilligung der Eltern wurde das Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen überführt und innerhalb von 24 Stunden für die Versuche genutzt.

Tabelle 3.1: Geschlecht, Gestationsalter und Geburtsgewicht der eingeschlossenen Neugeborenen; S.e. = *Staphylococcus epidermidis*; m = männlich; w = weiblich; MW= Mittelwert; MD = Median; min = Minimum; max = Maximum

Stimulans	n	Geschlecht			Gestationsalter [Wochen+Tage]				Geburtsgewicht [Gramm]			
		m	w		MW	MD	min	max	MW	MD	min	max
Sepsis- und Kolonisationsisolate	24	17	7		38+1,5	38+3,5	34+2	41+0	3207,5	3285	2000	4070
S.e. 1457 und Deletionsmutanten	5	3	2		39+0,6	39+0	37+0	40+5	3500	3490	2350	4230
Furosemid: Auf- steigende LPS- Konzentrationen	10	4	6		37+5,6	37+6	32+2	41+2	2925	2856,5	1765	4500
Furosemid: LPS, Pam3Cys und S.e. ATCC 12228	6	3	3		39+1,7	39+1,5	37+1	40+5	3422,5	3225	2260	4625

Als Kontrolle diente Blut freiwilliger adulter Spender, die sich im Rahmen einer Blutspende am Institut für Transfusionsmedizin zwischen Juni 2009 und Juni 2011 am

UKSH, Campus Lübeck, dazu bereit erklärten, ihr über eine periphere Venenpunktion gewonnenes Blut zur Verfügung zu stellen. Sowohl Nabelschnur- als auch Spenderblut wurden bei Raumtemperatur gelagert und gemäß der zuvor durchgeführten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [171] nach spätestens 24 Stunden verarbeitet.

Als Einschlusskriterium wurde eine Leukozytenzahl von $\geq 5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ festgelegt. Gestationsalter, Geburtsgewicht und Geschlecht der Kinder sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.2: Übersicht der untersuchten Staphylococcus Epidermidis-Stämme

Bezeichnung [◇]	Herkunft	Biofilm TSB*	Biofilm TSB+3% Ethanol*	icaA [⊕]	mecA / Oxacillin-resistenz ^{⊕⊙}	MLST-ST
$S1^{-r}$	Sepsis isolat aus 2009	0,0160	0,0064	-	+	59
$S2^{-r}$	Sepsis isolat aus 2008	0,0334	0,0401	-	+	59
$K1^{+r}$	Kolonisationsisolate $K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$ aus Untersuchung zur Besiedlung Neugeborener, zur Verfügung gestellt von D. Knaack und Prof. Dr. J. Knobloch	0,1579	1,3211	+	+	2
$K2^{+r}$		0,3044	0,0260	-	+	498
$K3^{-r}$		0,0329	0,0305	-	+	5
$K4^{-r}$		0,0617	0,0333	-	+	NEU
$K5^{+r}$		0,1982	1,7907	+	+	2
$K6^{-s}$		0,0212	0,0364	-	-	495
$K7^{-s}$		0,0802	0,0222	-	-	110
$M1^{+s}$	S. epidermidis 1457	2,2740	3,1001	+	-	86
$M2^{+s}$	S.epidermidis 1457 M10	0,1055	0,0313	+	-	86
$M3^{+s}$	S.epidermidis 1457sigB	0,1549	1,1304	+	-	86
$M4^{+s}$	S.epidermidis 1457sigBagr	0,2996	1,8355	+	-	86

◇ Zur Bezeichnung der Stämme wird folgender Code verwendet: S = Sepsis isolat; K = Kolonisationsisolat; M = S.epidermidis 1457 und dessen Mutanten. Im Exponenten ist die Fähigkeit zur Biofilmbildung im TSB-Medium (+ = Biofilm-positiv; - = Biofilm-negativ), sowie die Oxacillinresistenz (s = Oxacillin-sensibel; r = Oxacillin-resistent) verschlüsselt.

* Biofilm definiert bei $\geq 0,1$, photometrischer Nachweis durch dreimalige 4fach-Bestimmung[172]

⊕ „+“ = positiv, „-“ = negativ

⊙ Die Ergebnisse der Analyse per VITEK 2[®] waren dabei mit den Ergebnissen der PCR zur Analyse des mecA-Gens jeweils kongruent

Staphylococcus epidermidis-Isolate Insgesamt wurden die immunologische Reaktion auf 13 verschiedene Staphylococcus epidermidis-Stämme untersucht. Herkunft und Eigenschaften der Bakterienstämme sind in Tabelle 3.2 dargestellt. An diesen Proben wurden die Thesen 1 und 2 untersucht.

Bei den Stämmen $S1^{-r}$ und $S2^{-r}$ handelt es sich um Klinikisolate zweier Kinder mit LOS aus den Jahren 2008 und 2009. Die Stämme $K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$ stammen von auf den Stationen der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKSH, Campus Lübeck behandelter Neugeborener und wurden im Rahmen einer longitudinalen Untersuchung der Kolonisation Neugeborener (Dissertation von Dennis Knaack: „Die Dynamik der Hautkolonisation von Früh- und Neugeborenen mit Staphylokokken“ [172], Institut für Mikrobiologie und Hygiene, UKSH, Campus Lübeck) gewonnen. Bei den Stämmen $K1^{+r}$ bis $K5^{+r}$ wurden Oxacillin-resistente Keime mit unterschiedlichen Fähigkeiten zur Biofilmbildung, bei $K6^{-s}$ und $K7^{-s}$ Oxacillin-sensible und Biofilm-negative Stämme ausgewählt.

$M2^{+s}$ bis $M4^{+s}$ sind Deletionsmutanten des Wildtypstammes $M1^{+s}$ (Staphylococcus epidermidis 1457), anhand derer die Auswirkung von Biofilm und extrazellulären Virulenzfaktoren auf die Immunantwort untersucht wurde. Diese Stämme wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Knobloch (ehemaliges Institut Mikrobiologie und Hygiene, UKSH, Campus Lübeck) zur Verfügung gestellt. Die Art und Auswirkung dieser Mutationen sind in Tabelle 3.3 kurz zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Staphylococcus epidermidis 1457 und Mutanten

S. epidermidis 1457 (Wildtyp) ($M1^{+s}$)	Isolat eines infizierten zentralen Venenkatheters, PIA/HA-positiv, starke Biofilmbildung (PIA als wichtigste Matrixkomponente [87]), geringe Expression extrazellulärer Virulenzfaktoren [173][174]
S.epidermidis 1457 M10 ($M2^{+s}$)	PIA/HA-negativ durch Insertion von Transposon Tn917 in icaA-Gen von icaADBC, wird als Biofilm-negativ angesehen[175], je nach Milieu ist jedoch auch eine geringe PIA-unabhängige Biofilmbildung möglich (in TSB + Glucose DNA- und proteinreicher Biofilm [87]), weitere Virulenzfaktoren unverändert [176]
S.epidermidis 1457sigB ($M3^{+s}$)	verminderte Biofilmbildung, vermehrte Expression extrazellulärer Virulenzfaktoren (Lipasen und Proteasen) [177]
S.epidermidis 1457sigBagr ($M4^{+s}$)	verminderte Biofilmbildung, keine extrazellulären Virulenzfaktoren [178]

Die mikrobiologische Untersuchung der verwendeten Isolate wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Herrn Dennis Knaack in Zusammenarbeit mit dem ehemaligen Institut für Mikrobiologie und Hygiene (bis 2015, seitdem Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie), UKSH, Campus Lübeck (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. W. Solbach) durchgeführt. Die Stämme wurden per MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight) (MALDI-TOF MS Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) als *Staphylococcus epidermidis*-Isolate identifiziert und zur Identifikation epidemiologischer Zusammenhänge durch MLST (Multilocus sequence typing) weiter genotypisch charakterisiert. Klonale Verwandtschaften der Kolonisationsisolate untereinander wurden durch eine Pulsfeldgelelektrophorese ausgeschlossen (Ergebnis siehe Anhang, Abbildung 8.1).

Die Analyse der Oxacillin-Resistenz erfolgte automatisiert per VITEK 2[®] (Firma BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) und durch eine *mecA*-Bestimmung (per PCR, *mecA*-Primer wie durch Rohde et al. (2004) beschrieben [179]). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde wie durch Christensen et al. (1985) und Knobloch et al. (2001) beschrieben untersucht: Bakterienansätze in einem TSB-Medium mit bzw. ohne 3%-Ethanol-Zusatz (Ethanol hebt die Wirkung des *icaA*DBC-Repressors *icaR* auf, so dass *in vitro* Mutanten im regulatorischen *SigB*-Operon zur vollständigen PIA-abhängigen Biofilmbildung gebracht werden können [177][180]) wurden inkubiert, die gebildeten Biofilme mit Gentianaviolett gefärbt, in 70% Isopropanol homogenisiert und schließlich photometrisch bestimmt [117][172][181].

Als Surrogatparameter zur Fähigkeit der Bildung eines PIA-positiven Biofilms wurde bei allen Stämmen weiterhin durch eine PCR das *icaA*-Gen bestimmt - bei *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Mutanten sind die Ergebnisse in Abhängigkeit der in Tabelle 3.3 beschriebenen Mutationen und dessen Auswirkungen zu sehen.

Die so ermittelten Charakteristika der genutzten Keime sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

3.1.2 Labormaterial

Tabelle 3.4: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Furosemid-Natrium, Lasix 20 mg	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland
Pam ₃ Cys	AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach, Deutschland
Staphylococcus epidermidis(ATCC®12228 TM)	American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA
RPMI (Roswell park Memorial Institute) 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HEPES-Puffer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer, pH 7,2, Gibco	Invitrogen, Auckland, Neuseeland
Monensin sodium salt, 90-95% TLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid von E.coli 0127: B8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland
Magermilchpulver, Fluka Analytical	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
10000 µg/ml Penicillin/ Streptomycin, 200 mM L-Alanyl-L-glutamin, 100 mM Natrium-Pyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Saponin Calbiochem	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.5: Monoklonale Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
IL6 unkonjugiert	MQ2-13A5	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
IL6-FITC	MQ2-13A5, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
IL8 unkonjugiert	G265-8	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
IL8-PE	G265-8, Phycoerythrin (PE)-konjugiert	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
TNF α	MAb11	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

TNF α -FITC	MAB11, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CD14 PC5	RMO52, Phycoerythrincyanin (PC5)-konjugiert	Beckman Coulter Company, Marseille, Frank- reich

Tabelle 3.6: Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer BD FACS Canto	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sterilwerkbank HSP12	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotana 46 RSC	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hämatologie Analyser ABX Micros 60	Axon Lap AG, Stuttgart, Deutschland
Brutschrank, Typ BB6220	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Brutschrank, Typ T6	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Analysewaage Mettler AE240	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
ELISA-Reader , Sunrise-Basic	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
ELISA-Washer, M8/2CH Columbus Plus	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden
Pipettierhilfe, Gilson Pipetting Aid	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Vortexer MS1 und MS2 Minishaker IKA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pipetten Reference, 100-1000, 100, 0,5-10 μ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Research, 10-100 μ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette plus (Combitip)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 3.7: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Lithium-Heparin-Röhrchen S-Monovette 7,5 ml LH	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 und 1000 µl ultratip	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips 100+1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-seal micro tubes (1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
6-Well-Platten, steril, Nunclon surface	NUNC, Roskilde, Dänemark
Röhren 5 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Falcon Tubes, Cellstar Tubes steril 15, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Impfeschlingen 1, 10 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Columbia Blood Agar Base, CM0331	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England
Schafsblut defibriniert 100 ml	Oxoid Deutschland GmbH, ORT
Petrischalen 92 x 16 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Photometer-Küvetten REF 67.742	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Sterile Pipetten 5, 10, 25 ml	NUNC, Roskilde, Dänemark
Transferpipetten 6 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Combitips plus 2,5, 5, 50 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryo-Kulturröhrchen "Cryobank"	Copan Diagnostics Inc., Murietta, USA
Atenschutzmaske Dräger X-plore 1730 V FFP3	Dräger Safety AG & Co KGaA, Lübeck, Deutschland

Tabelle 3.8: Geräte und Materialien am ehemaligen Institut für Mikrobiologie und Hygiene

Material	Hersteller
Sterilwerkbank Biohit Antares	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge "5810 R"	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spiralplater WASP	Meinrup DWS Laborgeräte GmbH
Photometer "Bio Rad SmartSpec Plus"	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipettus "Hirschmann pipetus-akku"	Belden Electronics GmbH, Schalksmühle, Deutschland
Impfchlingen 10 µl	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Blutagarplatten, COS	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Falcon Tubes 15 ml BD-Falcon	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen Filter-Tips PEIPP natur	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
sterile Pipetten 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Alkohol 70 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kryo-Kulturröhrchen "Cryobank"	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland

3.2 Methoden

In dieser Arbeit wurde für die Analyse der Immunantwort bei Stimulation durch *Staphylococcus-Epidermidis*-Isolate ein Vollblutsepsismodell verwendet, im Überstand einer Kultur wurden Interleukinexpressionen quantitativ über das Verfahren des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Essay) bestimmt. Zur Analyse der Immunreaktion unter Furosemid wurden Interleukine intrazellulär durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2.1 Vollblutstimulationstests 1 - ELISA

Die Analyse der Immunantwort bei Stimulation von Vollblut durch die gewählten *Staphylococcus epidermidis*-Isolate (siehe Tabelle 3.2) erfolgte in ELISA-Technik. Als Probenanzahl wurde zunächst $n=5$ gewählt: Jedes Isolat wurde zur Stimulation von Nabelschnurblut von 5 Neugeborenen verwendet. Eine adulte Kontrollgruppe (ebenfalls $n=5$) diente dem Vergleich zwischen neonataler und adulter Immunantwort.

Um die für jeden Bakterienstamm spezifische photometrische Dichte einer Bakterienlösung in physiologischer Kochsalzlösung zu ermitteln, wurden zunächst Verdünnungsreihen durchgeführt.

Diese Vorversuche wurden für die Sepsis- und Kolonisationsisolate ($S1^{-r}$ bis $K7^{-s}$) in den Laborräumen der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin durchgeführt. Die Untersuchung der Deletionsmutanten sowie deren Wildtypform *Staphylococcus epidermidis* 1457 ($M1^{+s}$ bis $M4^{+s}$) wurden - nach der vorgeschriebenen Sicherheitsbelehrung und ärztlicher Untersuchung - in den gemäß Gentechnik-Sicherheitsverordnung als S2-Laboratorien zertifizierten Räumlichkeiten der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Knobloch am damaligen Institut für Mikrobiologie und Hygiene durchgeführt.

Hierzu wurden Bakterien in einer isotonischen Natriumchloridlösung gelöst, Lösungen unterschiedlicher optischer Dichte hergestellt und auf Schafsblutagar ausgestrichen, um die Extinktion bei $1 \cdot 10^8$ CFU (Colony Forming Units) pro Milliliter zu ermitteln.

Es wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ Leukozyten eingesetzt, in sterilen 6-Well-Platten vorgelegt und mit Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium, welches zuvor mit 10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-alanyl-L-Glutamin, 100 mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren angereichert wurde, auf 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Blut mit 1 bzw. 10 CFU/WBC (Colony Forming Unit / White Blood Cell

(Leukozyt)) stimuliert. Eine unstimulierte Probe diene als Negativkontrolle. Die Ansätze wurden für 24 Stunden bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre inkubiert. Die zellfreien Überstände wurden in kleine Reaktionsgefäße überführt und bei -20° C eingefroren, um die sezernierten Zytokine später in einem ELISA zu messen.

Protokoll

1. Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut (mit dem Hämatologie Analyser ABX Micros 60). Errechnen der benötigten Probenmenge, so dass in den 6-Well Platten jeweils $5 \cdot 10^6$ Leukozyten eingesetzt werden
2. Ansetzen des Mediums: 96 ml RPMI + 4 ml Zusätze (10000µg/ml Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-alanyl-L-Glutamin, 100 mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentielle Aminosäuren)
3. Herstellen der Bakterienlösung: $1 \cdot 10^8$ CFU, photometrische Kontrolle
4. Vorlegen der errechneten Blutmenge in sterile 6-Well-Platten
5. Auffüllen der Proben mit Medium (RPMI+Zusätze), so dass nach Zugabe der Bakterienlösung 5 ml Gesamtvolumen erreicht werden
6. Stimulation mit 1 bzw. 10 CFU/WBC der untersuchten Staphylococcus Epidermidis-Stämme
7. Inkubation: 24 Stunden / 5% CO₂
8. Überführen des zellfreien Überstandes in kleine Reaktionsgefäße, Einfrieren bei -20°C bis zur ELISA-Messung

3.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Essay: ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine im Überstand wurde das Verfahren des ELISA genutzt. Das Prinzip des ELISA beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen: Der Grund der Wells der im ELISA-Kit enthaltenen Microtiterplatten ist mit gegen das zu messende Zytokin gerichteten monoklonalen Primärantikörpern beschichtet („gecoatet“). Die Zytokine fungieren als Antigene und binden an diese Antikörper. Ein enzymgekoppelter, ebenfalls gegen das Zytokin gerichteter Sekundärantikörper bindet daraufhin an das Zytokin. Eine durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym katalysierte Farbreaktion führt zu einer photometrisch messbaren Farbveränderung der Probe. Die Farbveränderung ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Zytokins, dessen Konzentration durch eine Standardkurve errechnet werden kann.

Protokoll R&D Systems IL10 Quantikine ELISA

1. Vorbereitung aller Reagenzien und Proben gemäß Kit-Anleitung
2. 50 µl Assay Diluent RD1W (Blockierungspuffer) in jedes Well
3. 200 µl Standard- bzw. Proben (ggf. vorverdünnt) in jeweilige Wells, Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur
4. 4 mal mit Waschpuffer waschen
5. 200µl des Sekundärantikörpers in jedes Well, Inkubation 1 Stunde bei Raumtemperatur
6. 4 mal mit Waschpuffer waschen
7. 200 µl Substratlösung in jedes Well, Inkubation 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit
8. Stoppen der Farbreaktion durch Hinzufügen von 50 µl Stop-lösung je Well
9. Innerhalb von 30 Minuten photometrische Messung am ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 540 nm)

3.2.3 Vollblutstimulationstests 2 - FACS

In diesem Vollblutstimulationstest wurde die Zytokinsynthese (IL6, IL8, $\text{TNF}\alpha$) CD14-positiver Zellen untersucht. Die Methodik wurde zuvor von unserer Arbeitsgruppe etabliert und beschrieben [182]. Diese Technik wurde zur Analyse der Immunsuppression durch Furosemid (These 3) gewählt. Die Versuche mit aufsteigenden LPS-Konzentrationen wurden an n=10 Nabelschnurproben durchgeführt (adulte Kontrollgruppe n=6). Die Ansätze mit Stimulation durch LPS, Pam₃Cys und Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 wurden an n=6 Nabelschnurproben durchgeführt.

Zellkultur

Analog zur Hämolyse-Vollblutstimulation wurden $5 \cdot 10^6$ Leukozyten/ml eingesetzt. Die Untersuchungen wurden in sterilen 24-Well-Platten durchgeführt, als Nährmedium diente das oben beschriebene RPMI-Medium mit Zusätzen. Ein unstimulierter Ansatz diente jeweils als Negativkontrolle.

Stimuliert wurden die Ansätze

- für die Untersuchungen zur Auswirkung von Furosemid (Lasix®) mit aufsteigenden Furosemid-Konzentrationen (1 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml Vollblut) und nach einer Minute mit 50 µl einer LPS-Verdünnung (1 µl LPS/999 µl RPMI-Puffer), welches die Zytokinproduktion (IL6, IL8, TNF α) in den CD14+ Zellen induziert.
- in einer zweiten Versuchsreihe wurde zur Untersuchung der Immunsuppression durch Furosemid bei Stimulation mit Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, LPS und Pam₃Cys zuerst die Hälfte der Ansätze mit 10 µg Furosemid/ml Vollblut versetzt. Anschließend wurde jeweils ein Ansatz mit Furosemid und ein Ansatz ohne Furosemid mit 50 µl einer LPS-Verdünnung (1 µl LPS/999 µl RPMI-Puffer), 10 CFU/WBC Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 bzw. 1,5 µl Pam₃Cys (1 µg/ml) stimuliert.

Daraufhin wurde dem Ansatz Monensin, ein Metabolit aus Streptomyces cinnamomensis, welcher über eine Blockierung intrazellulärer Transportfunktionen zur Akkumulation synthetisierter Peptide im Golgi-Apparat führt [183], hinzugesetzt. Der Zusatz von Monensin ermöglichte die spätere intrazelluläre Messung der Zytokine. Jeweils eine unstimulierte Kontrollprobe wurde mitgeführt.

Protokoll

1. Vollblut ($5 \cdot 10^6$ Leukozyten eingesetzt) mit Nährmedium auf insgesamt 1,5 ml ergänzen
2. Einsetzen von Furosemid (Konzentrationen siehe oben, Furosemidvolumen jeweils 15 µl)
3.
 - für die Versuche mit aufsteigender Konzentration Furosemid jeweils Einsetzen von 0,05 µl LPS, eine Probe dient als unstimulierte Kontrolle, eine weitere Probe wird ausschließlich mit LPS stimuliert
 - für die Versuche mit 1,5 pg Pam₃Cys, 10 CFU/WBC Staphylococcus epidermidis 12228 bzw. 50 µl LPS-Lösung (siehe oben) wird jeweils ein Ansatz mit zuvor eingesetztem Furosemid, sowie ein Ansatz ohne Furosemid mit dem jeweiligen Reagenz versetzt. Es bleibt ebenfalls ein Ansatz unstimuliert. Vor Zugabe der Stimulantien (LPS, Pam₃Cys bzw. Staphylococcus epidermidis ATCC 12228) wurden die Furosemid-Ansätze jeweils eine Stunde vorinkubiert.
4. nach 1 Minute Hinzusetzen von 50 µl Monensinansatz (Verdünnung: 990 µl Medium + 10 µl Monensin)
5. Inkubation für 4 Stunden bei 37°C / 5% CO₂

Zellfixation

Die anschließende Zellfixation mit Paraformaldehyd gewährleistet den Erhalt der Zellmorphologie und der intrazellulären Antigenität. Sie ermöglicht weiterhin die Permeabilisation der Zellmembranen mit Saponin, was für die intrazelluläre Färbung der Interleukine durch Antikörper essentiell ist.

Protokoll

Tag 1

1. Auffüllen der Wells mit PBS-Puffer
2. Überführen in Falcon Tubes, Auffüllen mit PBS, mischen
3. Zentrifugieren: 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute
4. Absaugen des Überstandes
5. Hinzufügen von 1 ml PFA 4% in jedes Falcon Tube. Gründlich auf dem Vortex-Schüttler mischen.
6. Inkubation: 10 Minuten bei 4°C, zwischendurch 1 mal durchmischen (vortexen)
7. Zentrifugieren: 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute
8. Absaugen des Überstandes
9. 1ml Magermilch 5% zu jedem Tube hinzugeben
10. Lagerung über Nacht im Kühlschrank bei 4°C

Tag 2

1. Zentrifugieren von Zellen und Magermilch: 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute, anschließend Absaugen der Magermilch
2. Zellen in 1 ml Saponin (2 ml Saponin-Stocklösung, 2 ml HEPES-Puffer, 196 ml PBS-Puffer) resuspendieren, daraufhin 10 Minuten bei 4°C inkubieren
3. 10 µl CD14 PC5 Antikörper als Monozyten-Oberflächenmarker in jedes Probenröhrchen vorlegen
4. 5 µl unkonjugierte Antikörper in die Röhrchen der Nagtivkontrolle vorlegen, um ungebundene Antikörper abzufangen
5. 10 µl 1:20 verdünnte Antikörper (IL6-FITC, TNF α -FITC, IL8-PE) in jeweiliges Röhrchen hinzufügen

6. jeweils 200 µl der Zellsuspension in die FACS-Röhrchen pipettieren, mischen
7. 20 Minuten bei 4°C inkubieren
8. in alle Röhrchen 1 ml Saponin pipettieren, 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugieren, danach Absaugen des Überstandes
9. Zu den Negativkontrollen 10 µl verdünnte (1:20) Antikörper hinzufügen, mischen, 20 Minuten bei 4°C inkubieren
10. den unkonjugierten Proben 1 ml Saponin hinzufügen, 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugieren, Überstand absaugen
11. 500 µl auf alle Röhrchen pipettieren, gut mischen
12. Lagerung der Proben in Dunkelheit

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einer Messung des durch die fluoreszenzmarkierten Antikörper emittierten Lichtes. Hierzu wird die Probe vom Gerät (BD FACS Canto, Becton Dickinson GmbH) aufgenommen und in einer laminaren Strömung von einem Laser angeregt. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper emittieren daraufhin Licht, welches durch einen Detektor ausgewertet wird. Neben einer numerischen Auszählung der Zellen lassen sich durch die Messung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht auch Aussagen über Größe und Granularität der Zellen treffen.

Prinzip der intrazellulären Zytokinfärbung In dieser Studie wurde die zuvor in unserer Arbeitsgruppe etablierte und beschriebene Methode der intrazellulären Interleukinmessung genutzt [182]. Eine Permeabilisierung wurde mit dem Pflanzen-Glykosid Saponin, welches durch eine Interaktion mit dem Cortisol der Zellmembranen eine reversible Permeabilisierung der Zellen gewährleistet, erreicht. Durch Monensin akkumulieren die synthetisierten Proteine im Golgi-Apparat. Die zu messenden Interleukine können durch die fluoreszierenden Antikörper, welche die permeabilisierten Membranen überwinden können, markiert werden.

Zellen des monozytären Systems wurden durch den eingesetzten fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen den CD14-Rezeptor, welcher auf monozytären Zellen/Makrophagen und gelegentlich auf Granulozyten exprimiert ist [184], erkennbar gemacht.

In jeder Probe konnten mindestens 2000 CD14 exprimierende Zellen gemessen werden. Apoptotische Zellen, Zell-Bruchstücke und Granulozyten wurden anhand des von ihnen gestreuten Lichtes durch Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Sperren von der Zählung

ausgeschlossen. Die Negativkontrolle, in der fluoreszierende Antikörper blockiert wurden, diente zur Einstellung des Schwellenwertes. Der Schwellenwert wurde auf $<2\%$ festgelegt. Alle Zellen oberhalb dieses Schwellenwertes wurden als positiv gewertet.

3.3 Verzicht auf Glykopeptide in Lübeck - VERGIL

Zur prospektiven Untersuchung des Verzichts auf eine prophylaktische Gabe von Teicoplanin bei liegendem Gefäßkatheter bei Frühgeborenen <1500 g Geburtsgewicht (VLBW) wurden Daten des Deutschen Frühgeborenen-Netzwerkes (GNN - German Neonatal Network), die im Rahmen des klinischen Monitorings erhoben wurden, genutzt. Zur Kontrolle wurde eine historische Kohorte (2003 bis 2008) ausgewertet. Hierzu wurden neben auf den Stationen verwendeten Datenerfassungsbögen (siehe Anhang, Abbildung 8.2) Arztbriefe und Überwachungskurven genutzt. Überwacht wurden klinische Parameter, die auf einen Infekt hindeuten können, die Lage von Kathetern, sowie die Dauer der Antibiotikatherapie und der dabei eingesetzten Medikamente.

3.4 Datenauswertung

Zur Datenauswertung wurde das Programm SPSS 22.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) verwendet. Für die Auswertung der experimentell gewonnenen Daten zu Interleukinexpression in den beschriebenen Vollblutstimulationsansätzen wurde neben der explorativen Datenanalyse für unverbundene Stichproben der Mann-Whitney-U-Test, für verbundene Stichproben der Wilcoxon-Test verwendet. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Prüfgruppen wurde im Rahmen der VERGIL-Studie der exakte zweiseitige Fisher-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde jeweils $p \leq 0,05$ festgelegt.

Zur Überprüfung der These der Abhängigkeit der neonatalen Immunantwort von den Pathogenitätsfaktoren Biofilmbildung und Oxacillinresistenz wurden im Rahmen der Datenauswertung aus der Gruppe der Kolonisationsisolate jeweils Subgruppen gebildet und miteinander verglichen (Biofilm-positive vs. Biofilm-negative Keime bzw. Oxacillin-resistente Keime vs. Oxacillin-sensible Keime). Ebenso wurden die Sepsis-isolate und Kolonisationsisolate zusammengefasst und miteinander verglichen.

3.5 Ethikvotum

Alle Teile dieser Arbeit wurden nach einem positiven Ethikvotum (AZ 05-119 vom 26.07.2005) der Ethikkommission der Universität zu Lübeck durchgeführt. Die Eltern der jeweiligen Kinder gaben nach entsprechender Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Nutzung des Nabelschnurblutes und zur Datenerhebung im Rahmen der Studien ab. Auch die erwachsenen Blutspender hatten ihr schriftliches Einverständnis zur Nutzung für wissenschaftliche Zwecke erteilt.

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der untersuchten *Staphylococcus epidermidis*-Stämme

Aus Tabelle 3.2 geht hervor, dass die Stämme $K1^{+r}$, $K2^{+r}$, $K5^{+r}$, $M1^{+s}$, $M2^{+s}$, $M3^{+s}$ und $M4^{+s}$ in einem TSB-Medium bei einem cut-off-Wert von $\geq 0,1$ Biofilm-positiv sind. Die Sepsis-isolate sowie die Stämme $K1^{+r}$ bis $K5^{+r}$ sind Oxacillin-resistent, die Stämme $K6^{-s}$ und $K7^{-s}$, sowie *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Mutanten ($M1^{+s}$ bis $M4^{+s}$) Oxacillin-sensibel.

4.2 Vergleich der Immunantwort auf *Staphylococcus epidermidis*-Isolate (Klinikisolate und Mutanten)

Die Untersuchung der bei Stimulation mit den Sepsis- bzw. Kolonisationsisolaten und *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Deletionsmutanten induzierten Immunantwort wurde mithilfe der geschilderten extrazellulären Messung des proinflammatorischen IL6 und des antiinflammatorischen IL10 in ELISA-Technik durchgeführt.

Neonatale Gruppe Die Ergebnisse der explorativen Datenanalyse mit Mittelwert, 95% Konfidenzintervall für den Mittelwert und Median sind in den entsprechenden Ergebnistabellen dargestellt. Diesen Tabellen sind auch die durch einen Mann-Whitney-U-Test ermittelten signifikanten Zusammenhänge zwischen den jeweiligen Interleukin-expressionen zu entnehmen.

Wie aus Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1 hervorgeht, unterscheiden sich die beiden Sepsis-isolate hinsichtlich der Induktion der neonatalen IL6-Antwort nicht. Ebenso gab es beim Vergleich der durch die Kolonisationsisolate induzierten IL6-Expression untereinander keine signifikanten Zusammenhänge.

Allerdings können beim Vergleich von Sepsis- und Klinikisolaten gegeneinander Unterschiede hinsichtlich der IL6-Expression gezeigt werden. Dabei kann bei beiden Keimkonzentrationen beobachtet werden, dass die Biofilm-negativen Sepsis-isolate jeweils eine höhere proinflammatorische IL6-Expression induzieren als einzelne Biofilm-positive bzw. Biofilm-negative Kolonisationsisolate. (vgl. Tabelle 4.1: x1-x3 und y1-y6). *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Deletionsmutanten unterscheiden sich hinsichtlich der induzierten IL6-Expression nicht voneinander.

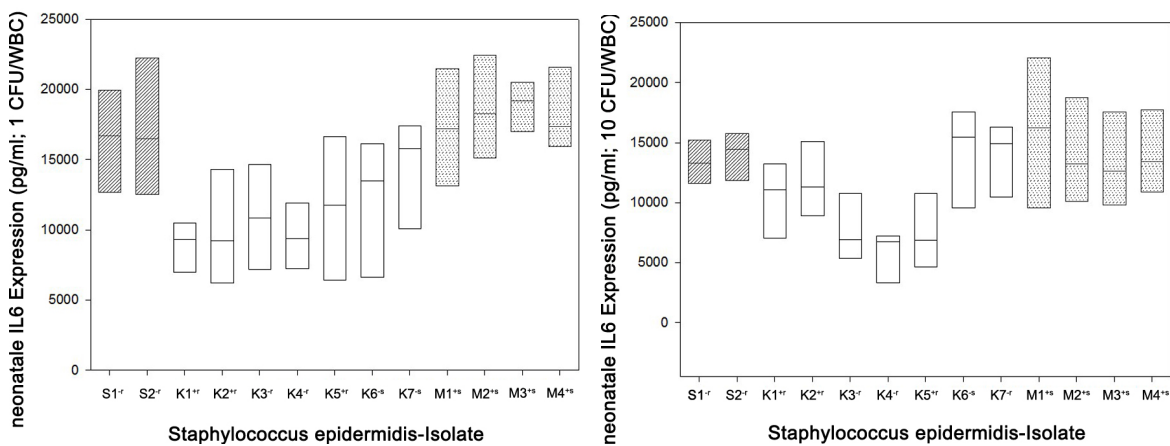


Abbildung 4.1: Neonatale IL6-Expression (1 bzw. 10 CFU/WBC), dargestellt sind 25/75 Perzentile, Median; $S1^{-r}$, $S2^{-r}$, $K1^{+r}$ bis $K3^{-r}$ und $K5^{+r}$ bis $K7^{-s}$ jeweils $n=5$; $K4^{-r}$ und $M1^{+s}$ bis $M4^{+s}$ $n=4$

4.2 Vergleich der Immunantwort auf *Staphylococcus epidermidis*-Isolate (Klinikisolate und Mutanten)

Tabelle 4.1: Neonatale IL6-Expression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Isolate in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median

	IL6 1 CFU/WBC				IL6 10 CFU/WBC			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
$S1^{-r}(x1;x2;x3;y1;y2;y3)$	16400,6	11226,2	21575,0	16682,0	13383,0	10913,2	15852,8	13273,0
$S2^{-r}(y4;y5;y6)$	17215,4	9952,0	24478,8	16516,0	13934,6	11185,7	16683,5	14445,0
$K1^{+r}(x1)$	8849,4	6526,1	11172,7	9331,0	10325,8	6375,6	14276,0	11087,0
$K2^{+r}(x2)$	100057,0	4449,9	15664,1	9234,0	11848,6	7152,5	16544,7	11282,0
$K3^{-r}(y1;y4)$	10900,8	5990,9	15810,7	10839,0	7840,0	4306,0	11375,6	6937,0
$K4^{-r}(x3;y2;y5)$	6502,5	5593,0	13412,0	9342,5	6938,0	6407,4	7468,6	6906,0
$K5^{+r}(y3;y6)$	11569,2	4683,4	18455,0	11771,0	7543,6	3671,1	11416,1	6853,0
$K6^{-s}$	11800,4	5699,6	17901,2	13478,0	13948,6	7148,8	20748,4	15440,0
$K7^{-s}$	14152,4	9349,2	18955,6	15778,0	13682,6	9375,0	17990,2	14887,0
$M1^{+s}$	18402,0	12106,2	24697,8	18889,0	18010,8	9873,9	26147,6	18482,0
$M2^{+s}$	18781,5	11038,3	26524,7	19714,5	15715,5	9910,9	21520,1	15520,0
$M3^{+s}$	19444,0	17215,5	21672,5	19846,5	14787,5	9561,9	20013,1	14815,5
$M4^{+s}$	19140,0	13769,1	24510,9	18427,0	15072,5	9898,9	20246,1	15155,5
1 CFU/WBC	x1: $S1^{-r} > K1^{+r}$, p=0,008; x2: $S1^{-r} > K2^{+r}$, p=0,032; x3: $S1^{-r} > K4^{-r}$, p=0,016							
10 CFU/WBC	y1: $S1^{-r} > K3^{-r}$, p=0,016; y2: $S1^{-r} > K4^{-r}$, p=0,016; y3: $S1^{-r} > K5^{+r}$, p=0,008;							
	y4: $S2^{-r} > K3^{-r}$, p=0,016; y5: $S2^{-r} > K4^{-r}$, p=0,016; y6: $S2^{-r} > K5^{+r}$, p=0,016							

Tabelle 4.2: Neonatale IL10-Expression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis-Isolate in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median

	IL10 1 CFU/WBC				IL10 10 CFU/WBC			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
$S1^{-r}(y1)$	76,9	2,3	151,5	65,0	204,9	32,8	377,1	190,3
$S2^{-r}(x1;x2;x3;y4)$	340,2	82,8	597,6	389,9	300,6	34,5	566,8	305,5
$K1^{+r}(x1)$	110,1	54,4	165,8	123,5	193,8	52,7	334,9	157,7
$K2^{+r}(x2;y3;y4)$	109,6	47,4	171,7	96,6	313,3	148,9	477,8	282,2
$K3^{-r}(x3;y3)$	71,2	27,0	115,5	68,0	116,8	48,7	194,9	117,4
$K4^{-r}(y1;y2;y4;y5)$	78,3	16,6	139,9	77,0	86,3	41,6	131,0	97,6
$K5^{+r}$	160,2	38,5	281,8	146,2	216,6	52,3	381,0	183,8
$K6^{-s}$	142,9	0	357,1	77,0	156,9	54,7	259,0	177,2
$K7^{-s}(y5)$	122,4	0,9	243,8	71,9	203,3	85,0	321,6	166,6
$M1^{+s}$	151,4	102,6	200,1	146,9	180,8	84,2	277,4	188,7
$M2^{+s}$	132,9	89,0	176,7	143,9	190,7	72,1	309,3	177,0
$M3^{+s}$	140,8	96,5	185,2	158,1	239,0	97,6	380,3	244,8
$M4^{+s}$	134,3	70,7	197,9	158,1	261,2	65,8	456,6	244,8
1 CFU/WBC	x1: $S2^{-r} > K1^{+r}$, p=0,036; x2: $S2^{-r} > K2^{+r}$, p=0,036; x3: $S2^{-r} > K3^{-r}$, p=0,036							
10 CFU/WBC	y1: $S1^{-r} > K4^{-r}$, p=0,036; y2: $S2^{-r} > K4^{-r}$, p=0,036; y3: $K2^{+r} > K3^{-r}$, p=0,036;							
	y4: $K2^{+r} > K4^{-r}$, p=0,016; y5: $K7^{-s} > K4^{-r}$, p=0,008							

Die neonatale IL10-Expression ist in Tabelle 4.2 und Abbildung 4.2 dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass die IL10-Expression bei beiden Keimkonzentrationen bei Stimulation mit den Sepsisisolaten teilweise signifikant höher ist als bei Stimulation mit einzelnen teilweise Biofilm-positiven, teilweise Biofilm-negativen Kolonisationsisolaten (Tabelle 4.2: x1-x3; y1; y2). Bei Stimulation mit 1 CFU/WBC gab es keine Unterschiede innerhalb der Subgruppen der Sepsis- und Kolonisationsisolate. Bei der höheren Keimkonzentration (10 CFU/WBC) sind hingegen anders als bei der Analyse der IL6-Expression auch Unterschiede innerhalb der Gruppe der Kolonisationsisolate messbar (y3-y5). Bezüglich der IL10-Expression können zwischen Staphylococcus epidermidis 1457 und dessen Deletionsmutanten keine Unterschiede ermittelt werden.

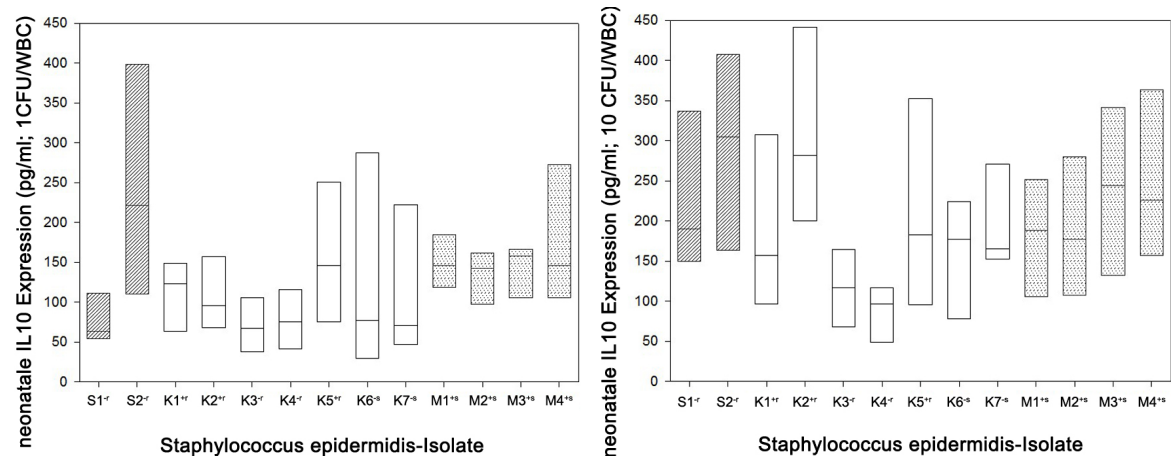


Abbildung 4.2: Neonatale IL10-Expression (1 bzw. 10 CFU/WBC), dargestellt sind 25/75 Perzentile, Median; $S1^{-r}$, $S2^{-r}$, $K1^{+r}$ bis $K3^{-r}$, $K5^{+r}$ bis $K7^{-s}$ und $M1^{+s}$ bis $M3^{+s}$ jeweils $n=5$; $M4^{+s}$ $n=4$; $K4^{-r}$ [10CFU] $n=5$

Zusätzlich wurden, um die These einer sich bei Stimulation durch Sepsis- und Kolonisationsisolate unterscheidenden Immunantwort zu überprüfen (These 1), die **Ergebnisse der Stimulationen mit Sepsis- oder Kolonisationsisolaten zusammengefasst** und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 und Abbildung 4.3 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass die Sepsisolate bei beiden Keimkonzentrationen eine höhere IL6-Expression induzieren als die Kolonisationsisolate. Bei Stimulation mit 10 CFU/WBC ist die durch die Sepsisolate induzierte IL10-Expression ebenfalls höher als die durch die Kolonisationsisolate induzierte, wohingegen hier bei 1 CFU/WBC keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Messung neonataler Interleukinexpression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Isolate - Sepsis- und Kolonisationsisolate jeweils zusammengefasst - in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls für den Mittelwert; MD=Median; p = Ergebnis des Mann-Whitney-U-Rangsummentestes; Sepsis $n=10$, Kolonisation $n=32$

	Sepsisolate ($S1^{-r}$ und $S2^{-r}$)				Kolonisationsisolate ($K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$)				p
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD	
IL6 (1CFU/WBC)	16808,0	13369,0	20247,0	16599,0	11289,9	9832,0	12747,8	10822,5	0,001
IL6 (10CFU/WBC)	13658,8	12224,3	15093,3	13640,5	9988,1	8362,6	11613,6	10590,5	0,024
IL10 (1 CFU/WBC)	163,9	67,4	260,5	111,3	130,5	81,5	179,4	85,0	0,415
IL10 (10 CFU/WBC)	261,4	181,2	341,7	235,8	180,2	140,2	220,2	153,6	0,047

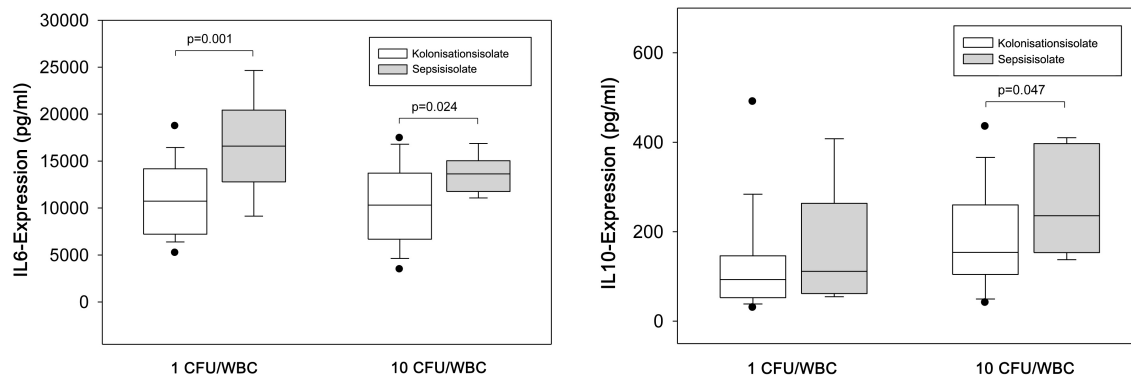


Abbildung 4.3: Vergleich der durch Sepsis- und Kolonisationsisolate induzierten neonatalen IL6- bzw. IL10-Expression, Sepsis-isolate ($S1^{-r}$ und $S2^{-r}$) $n=10$; Kolonisationsisolate ($K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$) $n=32$; dargestellt sind Median, Quartilenabstände, 95%-Konfidenzintervalle und Extremwerte, sowie die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Rangsummentestes

Ebenso wurde die Gruppe der Kolonisationsisolate zur Überprüfung des Einflusses von Biofilm und Oxacillinresistenz jeweils in zwei Subgruppen unterteilt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.4 und 4.5 dargestellt. Zwischen den Subgruppen der Biofilm-positiven und -negativen Keime gibt es hinsichtlich der IL6-Induktion keine Unterschiede. Bei 10 CFU/WBC war die IL10-Expression bei Stimulation mit den Biofilm-positiven Isolaten höher. Weiterhin fällt auf, dass die Oxacillin-sensiblen Keime ($K6^{-s}$ und $K7^{-s}$) bei 10 CFU/WBC eine signifikant höhere IL6-Expression induzieren als die Oxacillin-resistenten Keime, wobei sich die IL10-Expression nicht unterscheidet.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Messung neonataler Interleukinexpression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis-Isolate - Biofilm-positive und Biofilm-negative Kolonisationsisolate jeweils zusammengefasst - in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD=Median; p = Ergebnis des Mann-Whitney-U-Rangsummentestes; Biofilm-negativ $n=19$, Biofilm-positiv $n=15$

	Biofilm-negativ ($K3^{-r} + K4^{-r} + K6^{-s} + K7^{-s}$)				Biofilm-positiv ($K1^{+r} + K2^{+r} + K5^{+r}$)				p
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD	
IL6 (1CFU/WBC)	11698,8	9765,2	13632,5	10839,0	10158,5	1879,3	12437,8	9331,0	0,24
IL6 (10CFU/WBC)	10795,4	8536,3	13054,4	10094,0	9906,0	7896,9	11915,1	11087,0	0,56
IL10 (1 CFU/WBC)	105,0	56,3	153,8	71,9	126,6	88,9	164,3	123,5	0,071
IL10 (10 CFU/WBC)	142,7	103,8	181,7	138,3	241,3	169,9	312,6	259,8	0,025

4.2 Vergleich der Immunantwort auf *Staphylococcus epidermidis*-Isolate (Klinikisolate und Mutanten)

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Messung neonataler Interleukinexpression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Isolate - Oxacillin-sensibel und Oxacillin-resistente Kolonisationsisolate jeweils zusammengefasst - in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD=Median; p = Ergebnis des Mann-Whitney-U-Rangsummentestes; Oxacillinsensibel n=10, Oxacillin-resistent n=24

	Oxacillin-sensibel ($K6^{-s} + K7^{-s}$)				Oxacillin-resistent ($K1^{+r} + K2^{+r} + K3^{-r} + K4^{-r} + K5^{+r}$)				
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD	p
IL6 (1CFU/WBC)	12976,4	9865,1	16087,8	14628,0	10203,8	8623,3	11784,4	9551,0	0,109
IL6 (10CFU/WBC)	13815,0	10722,3	16908,9	15163,5	8981,1	7580,5	10381,7	7445,0	0,003
IL10 (1 CFU/WBC)	132,6	37,7	227,5	74,4	107,0	80,6	133,4	94,8	0,838
IL10 (10 CFU/WBC)	180,1	117,6	242,6	168,2	188,8	135,8	241,7	135,3	0,602

Adulte Kontrollgruppe Die Ergebnisse der Untersuchung der adulten Interleukin-expression sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.6: Adulte IL6-Expression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Isolate in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median; jeweils n=5

	IL6 1 CFU/WBC				IL6 10 CFU/WBC			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
$S1^{-r}$	5200,2	2555,1	7845,3	5707,0	10616,4	5723,3	15509,5	9410,0
$S2^{-r(x1;y1)}$	5952,2	2143,4	9761,0	4948,0	15513,6	8804,9	22222,3	15540,0
$K1^{+r(x2;y1;y2)}$	3762,8	2574,8	4950,8	3405,0	7450,2	4400,5	10499,9	6674,0
$K2^{+r(x3)}$	4055,8	2799,2	5312,4	3913,0	10996,4	712,4	14872,4	9503,0
$K3^{-r}$	5243,4	2760,3	7726,5	4818,0	6222,2	6222,2	18764,2	12094,0
$K4^{-r(x2;x3;x4)}$	6445,8	4299,4	8592,2	5767,0	11123,2	5639,1	16607,3	10852,0
$K5^{+r(x5)}$	5637,0	3705,6	7570,4	5745,0	10821,0	4475,3	17166,7	9396,0
$K6^{-s(x1;x4;x5;y2)}$	3143,6	2138,7	4148,5	3276,0	15159,6	9113,0	17206,2	12621,0
$K7^{-s}$	4810,2	1127,1	8493,3	6277,0	10707,0	5961,7	15452,3	11715,0
$M1^{+s}$	5520,0	0	16248,9	4343,1	12235,4	4235,5	20235,2	13957,5
$M2^{+s}$	5078,4	549,7	9607,2	4016,1	12516,2	5601,2	19431,2	13963,5
$M3^{+s}$	3862,8	1905,4	5820,2	3842,4	12409,3	3123,1	21695,5	12618,0
$M4^{+s}$	5913,7	857,3	10970,0	5703,9	12999,0	0	29533,8	14955,0
1 CFU/WBC	x1: $S2^{-r} > K6^{-s}$, p=0,032; x2: $K4^{-r} > K1^{+r}$, p=0,008; x3: $K4^{-r} > K2^{+r}$, p=0,032; x4: $K4^{-r} > K6^{-s}$, p=0,008; x5: $K5^{+r} > K6^{-s}$, p=0,016							
10 CFU/WBC	y1: $S2^{-r} > K1^{+r}$, p=0,032; y2: $K6^{-s} > K1^{+r}$, p=0,032							

Dabei fällt auf, dass hinsichtlich der IL6-Induktion zwischen den Sepsis- und Kolonisationsisolaten nur vereinzelt signifikante Unterschiede bestehen (Tabelle 4.6: x1; y1). Beim Vergleich der beiden Sepsisolate gegeneinander ergeben sich wie in der Neugeborenenengruppe keine signifikanten Unterschiede, allerdings unterscheiden sich die durch die Kolonisationsisolate induzierten IL6-Antworten teilweise voneinander. Dabei ergibt sich unter Betrachtung der Fähigkeit der Biofilmbildung keine Regelmäßigkeit. Teilweise induzieren Biofilm-negative Keime eine höhere IL6-Antwort als Biofilm-positive

(vgl. Tabelle 4.6: x2; x3; y2), allerdings induziert das Biofilm-positive Isolat $K5^{+r}$ auch eine höhere Interleukin 6-Expression als das Biofilm-negative Isolat $K6^{-s}$ (x5).

Sepsisisolat $S1^{-r}$ induziert bei Stimulation mit 1CFU/WBC eine höhere IL10-Expression als die Kolonisationsisolate $K1^{+r}$ und $K6^{-s}$ (vgl. Tabelle 4.7: x1; x2). Bei Stimulation mit 10 CFU/WBC ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge hinsichtlich der IL10-Expression.

Bezüglich der durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Deletionsmutanten induzierten IL6 bzw. IL10-Expression bestehen wie in der neonatalen Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.7: Adulte IL10-Expression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*-Isolate in pg/ml; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median; jeweils n=5

	IL10 1 CFU/WBC				IL10 10 CFU/WBC			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
$S1^{-r}(x1;x2)$	236,6	107,3	365,9	182,2	242,7	74,1	411,2	284,3
$S2^{-r}$	138,4	0	315,1	88,9	200,7	31,3	370,1	209,8
$K1^{+r}(x1)$	73,6	0	165,1	50,5	210,2	29,6	390,9	164,5
$K2^{+r}$	105,6	21,5	189,7	76,8	225,0	149,0	301,0	230,4
$K3^{-r}$	157,4	0	380,9	80,2	257,3	76,4	438,3	268,3
$K4^{-r}$	139,1	30,2	248,0	113,0	211,3	121,7	300,9	212,2
$K5^{+r}$	122,6	0	279,7	60,7	187,7	39,7	335,6	145,7
$K6^{-s}(x2)$	63,2	0	145,4	38,9	147,7	88,2	207,2	168,9
$K7^{-s}$	123,1	51,7	194,5	116,6	184,8	93,2	276,4	183,5
$M1^{+s}$	60,8	31,3	90,2	53,0	166,4	108,4	224,4	149,0
$M2^{+s}$	75,3	44,6	106,1	75,5	183,5	90,1	277,0	170,5
$M3^{+s}$	79,8	56,2	103,4	80,8	211,1	81,9	340,2	191,7
$M4^{+s}$	79,2	53,4	104,9	75,7	171,3	139,3	203,2	177,9
1 CFU/WBC	x1: $S1^{-r} > K1^{+r}$, p=0,032;				x2: $S1^{-r} > K6^{-s}$, p=0,032			

4.3 Immunreaktion unter Furosemid

4.3.1 Stimulation mit LPS unter aufsteigenden Konzentrationen Furosemid

IL6-Expression Die Daten der explorativen Datenanalyse der IL6-Expression und die ermittelten signifikanten statistischen Zusammenhänge sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass sowohl in der neonatalen als auch in der adulten Kontrollgruppe die IL6-Expression bei Stimulation mit LPS über den unstimulierten Proben liegt (Tabelle 4.8: x1; y1). Während in der neonatalen Gruppe keine weiteren signifikanten Zusammenhänge bestehen, bestehen in der adulten Kontrollgruppe einige Unterschiede (y2; y3; y4). Die neonatale IL6-Expression war in allen stimulierten Proben jeweils geringer als die adulte IL-6-Expression (jeweils $p=0,028$).

Tabelle 4.8: Neonatale und adulte IL6-Expression unter Furosemid, Prozentualer Anteil der erfassten Monozyten, der IL6 exprimiert; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median, neonatale Gruppe n=10, adulte Gruppe n=6

	neonatal				adult			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
unstimuliert ^{x1,y1}	0,3	0,0	0,6	0,1	0,6	0,2	1,0	0,7
LPS ^{x1,y1,y2}	20,2	12,5	27,9	17,4	41,7	24,2	59,3	43,2
LPS + 1,5 µg Furosemid ^{y3}	20,5	11,6	29,4	16,6	37,7	22,4	53,0	35,5
LPS + 15 µg Furosemid ^{y2,y3,y4}	17,8	12,6	23,0	17,8	33,8	16,5	51,0	30,8
LPS + 150 µg Furosemid ^{y4}	17,3	11,4	23,2	17,2	39,3	23,5	55,2	38,3
neonatal	x1: LPS > unstimuliert, $p=0,005$							
adult	y1: LPS > unstimuliert, $p=0,028$							
	y2: LPS > LPS + 15 µg Furosemid, $p=0,046$							
	y3: LPS + 1,5 µg Furosemid > LPS + 15 µg Furosemid, $p=0,046$							
	y4: LPS + 150 µg Furosemid > LPS + 15 µg Furosemid, $p=0,028$							

IL8-Expression Die Ergebnisse der Messung der IL8-Expression und der statistischen Datenauswertung sind in Tabelle 4.9 dargestellt. In der neonatalen Gruppe ist demnach die IL8-Expression bei 1,5 µg signifikant höher als bei 150 µg Furosemid-Zusatz (Tabelle 4.9: x2) in der adulten Kontrollgruppe ist die IL8-Expression bei 15 und 150 µg Furosemid-Zusatz gegenüber einer Stimulation mit LPS ohne Furosemid-zusatz verringert (y2; y3).

Wie zuvor bei der IL6-Expression geschildert, ist auch die IL8-Expression in allen stimulierten Ansätzen in der adulten Gruppe höher als in der neonatalen Gruppe (jeweils $p=0,028$).

Tabelle 4.9: Neonatale und adulte IL8-Expression unter Furosemid, Prozentualer Anteil der erfassten Monozyten, der IL8 exprimiert; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median, neonatale Gruppe n=10, adulte Gruppe n=6

	neonatal				adult			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
unstimuliert ^{x1,y1}	0,5	0,0	1,4	0,1	1,9	0,7	3,0	1,7
LPS ^{x1,y1,y2,y3}	23,4	14,7	32,0	23,9	84,1	71,7	96,5	90,0
LPS + 1,5 µg Furosemid ^{x2}	26,3	15,8	36,8	23,0	81,0	68,0	93,9	84,5
LPS + 15 µg Furosemid ^{y2}	22,0	13,3	30,7	22,8	76,9	65,4	88,4	78,0
LPS + 150 µg Furosemid ^{x2,y3}	20,4	13,0	27,8	16,8	77,5	63,0	92,2	84,2
neonatal	x1: LPS > unstimuliert, $p=0,005$							
	x2: LPS + 1,5 µg Furosemid > LPS + 150 µg Furosemid, $p=0,022$							
adult	y1: LPS > unstimuliert, $p=0,028$							
	y2: LPS > LPS + 15 µg Furosemid, $p=0,028$							
	y3: LPS > LPS + 150 µg Furosemid, $p=0,028$							

Tumornekrosefaktor α -Expression Die Ergebnisse der Messung der TNF α -Expression und der statistischen Datenauswertung sind detailliert in Tabelle 4.10 dargestellt. Die TNF α -Expression ist in der neonatalen Gruppe bei Stimulation mit LPS mit 1,5 μ g Furosemid-Zusatz höher als bei 15 μ g Furosemid-Zusatz, allerdings ist die TNF α -Expression gleichzeitig bei 150 μ g Furosemid-Zusatz höher als bei 1,5 μ g bzw 15 μ g Furosemid-Zusatz (Tabelle 4.10: x2; x3; x4). In der adulten Gruppe ist die TNF α -Expression bei LPS-Stimulation stärker als bei Stimulation LPS und 15 μ g Furosemid-Zusatz (y2).

Auch bei der Messung von TNF α ist die adulte Interleukinexpression in allen stimulierten Proben vergleichsweise höher als die entsprechenden neonatalen Proben (jeweils $p=0,028$).

Tabelle 4.10: Neonatale und adulte TNF α -Expression unter Furosemid, Prozentualer Anteil der erfassten Monozyten, der TNF α exprimiert; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median, neonatale Gruppe $n=10$, adulte Gruppe $n=6$

	neonatal				adult			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
unstimuliert ^{x1,y1}	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2	0,0	0,4	0,2
LPS ^{x1,y1,y2}	2,2	0,8	3,6	1,7	11,4	9,8	12,9	11,7
LPS + 1,5 μ g Furosemid ^{x2,x3,y2}	2,3	1,2	3,4	2,2	10,8	7,0	14,7	10,1
LPS + 15 μ g Furosemid ^{x2,x4}	1,5	1,0	2,1	1,7	8,1	6,1	10,0	8,0
LPS + 150 μ g Furosemid ^{x3,x4}	3,1	2,1	4,1	3,2	11,3	8,6	13,9	10,8
neonatal	x1: LPS > unstimuliert, $p=0,005$ x2: LPS + 1,5 μ g Furosemid > LPS + 15 μ g Furosemid, $p=0,021$ x3: LPS + 150 μ g Furosemid > LPS + 1,5 μ g Furosemid, $p=0,028$ x4: LPS + 150 μ g Furosemid > LPS + 15 μ g Furosemid, $p=0,005$							
adult	y1: LPS > unstimuliert, $p=0,028$ y2: LPS > LPS + 15 μ g Furosemid, $p=0,028$							

4.3.2 Stimulation durch Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, Pam₃Cys und LPS

Ergänzend zu den in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Konzentrationsreihen wurden die Versuche um Ansätze mit Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, Pam₃Cys und LPS erweitert. Anhand der zuvor in Kapitel 4.3.1 dargestellten Ergebnisse wurde entschieden, 15 µg Furosemid ($\hat{=}$ 10 µg Furosemid/ml Vollblut) einzusetzen, da bei dieser Konzentration in der Erwachsenenengruppe unter Furosemid jeweils eine geringere Interleukinexpression zu beobachten war. Die Ergebnisse und relevante signifikante Zusammenhänge sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Tabelle 4.11: Neonatale Interleukinexpression bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, LPS, Pam₃Cys und Furosemid, Prozentualer Anteil der erfassten Monozyten, der IL6 bzw. IL8 exprimiert; MW=Mittelwert; UG und OG = untere und obere Grenze des 95% Konfidenzintervalles für den Mittelwert; MD = Median, n=6

	IL6				IL8			
	MW	UG	OG	MD	MW	UG	OG	MD
unstimuliert*	0,5	0,2	0,7	0,5	5,6	1,5	9,8	4,6
LPS	15,8	8,2	23,5	15,1	35,8	20,9	50,7	36,1
LPS + 15 µg Furosemid	16,3	7,6	25,0	15,0	36,1	19,5	52,7	30,2
Staph.epi 10CFU/WBC ^{x1,y1}	16,6	4,0	29,1	11,6	42,2	27,1	57,3	38,8
Staph.epi 10CFU/WBC + 15 µg Furosemid ^{x1,y1}	12,6	2,0	23,2	9,8	32,8	18,8	46,9	26,5
Pam ₃ Cys (1,5 µl)	8,1	0,0	16,8	4,8	27,7	10,4	45,0	21,1
Pam ₃ Cys (1,5 µl) + 15 µg Furosemid	8,6	0,6	16,6	5,6	24,8	10,3	39,3	23,05

* die Interleukinexpression war in der unstimulierten Probe jeweils geringer als in den stimulierten Proben, jeweils p=0,028

x1: IL6 Staph.epi 10CFU/WBC + 15 µg Furosemid < Staph.epi 10CFU/WBC, p=0,046;
y1: IL8 Staph.epi 10CFU/WBC + 15 µg Furosemid < Staph.epi 10CFU/WBC, p=0,028

Wie in Tabelle 4.11 dargestellt, ist bei Stimulation durch Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 sowohl die neonatale IL6- als auch die IL8-Expression durch den Zusatz von Furosemid signifikant verringert (Tabelle 4.11: x1; y1). Bei Stimulation mit LPS bzw. Pam₃Cys erbringt der Zusatz von Furosemid keine signifikante Veränderung der Interleukinexpression.

4.4 VERGIL - Verzicht auf Glykopeptide in Lübeck

Durch die nachfolgenden epidemiologisch erfassten und statistisch ausgewerteten Daten sollte die Auswirkung eines Verzichts auf prophylaktische Glykopeptidtherapien auf die Sepsishäufigkeit und den Antibiotikaeinsatz untersucht werden.

Die Gruppen der in der VERGIL-Studie eingeschlossenen Neugeborenen sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts, des Gestationsalters, des Geburtsgewichts und der Häufigkeit von Mehrlingsgeburten.

Tabelle 4.12: Übersicht der in der VERGIL-Studie erfassten Neugeborenen

		Teicoplanin-Propylaxe		Gesamt	p
		nein	ja		
Neugeborene [n]		243	306	549	
Geburtsgewicht (Gramm)	Mittelwert	1041	1071		0,477*
	Standardabweichung	334	286		
	Median	1090	1103		
	n	243	306	549	
Gestationsalter (Wochen)	Mittelwert	28,37	28,85		0,079*
	Standardabweichung	2,8	2,68		
	Median	28,5	28,64		
	n	240	306	546	
Geschlecht (%)	weiblich	45,9	50,2	48,2	0,341#
	männlich	54,1	49,8	51,8	
	n total	244	293	537	
Mehrling (%)		29,2	24,9	26,9	0,282#

* Ermittelt über den Mann-Whitney-U-Test

Ermittelt über den Exakten zweiseitigen Fisher-Test

In Tabelle 4.12 sowie in den weiteren Tabellen ist zu beachten, dass sich die Anzahl der auswertbaren Messdaten [n] zwischen den einzelnen Items aufgrund während der klinischen Datenerhebung durch das Deutsche Frühgeborenennetzwerk nicht immer vollständig erhobenen Datensätze teilweise unterscheidet. Das jeweilige [n] ist den Tabellen zu entnehmen.

Wie aus Tabelle 4.13 hervorgeht, nahm die Rate einer Sepsis mit Erregernachweis im Zeitraum seit Verzicht auf eine prophylaktische Glykopeptidgabe signifikant zu. Es wurden mehr LOS diagnostiziert, die in erster Linie durch Gram-positive Erreger beinhalten. Die Häufigkeit eines Nachweises von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus* nahm signifikant zu, während sich für die übrigen Keime keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen.

Tabelle 4.13: Häufigkeit von Sepsis mit Erregernachweis in der Blutkultur

	Teicoplanin-Prophylaxe		p [#]
	nein	ja	
Sepsis mit positiver Blutkultur ⁿ¹ (%)	14,6	5,6	0
Late-onset-Sepsis mit Erregernachweis ⁿ² (%)	12,3	2	0
Gram-positive Sepsis ⁿ² (%)	11	3,2	0,001
Gram-negative Sepsis ⁿ² (%)	2,7	1,2	0,316
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁿ³ (%)	6,4	2,4	0,043
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ⁿ³ (%)	4,3	0	0,001
<i>Staphylococcus hominis</i> ⁿ³ (%)	0,4	0	0,484
<i>Staphylococcus capitis</i> ⁿ³ (%)	0,4	0	0,484
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁿ³ (%)	0	0,4	1
B-Streptokokken ⁿ³ (%)	0,4	0,4	1
Enterokokken ⁿ³ (%)	0	0,4	1
<i>E.coli</i> ⁿ³ (%)	2,1	0,8	0,272
Klebsiellen ⁿ³ (%)	0,9	0	0,234

[#] Ermittelt über den Exakten zweiseitigen Fisher-Test

ⁿ¹: n[keine Prophylaxe]=239; n[Prophylaxe]=306

ⁿ²: n[keine Prophylaxe]=219; n[Prophylaxe]=249

ⁿ³: n[keine Prophylaxe]=234; n[Prophylaxe]=249

In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der Untersuchung des Antibiotikaverbrauches dargestellt. Daraus geht hervor, dass der Verzicht auf eine prophylaktische Gabe von Teicoplanin nach März 2010 eingehalten wurde: Es wurde nur noch in 2,7% der Fälle eine prophylaktische Teicoplanin-Gabe registriert. Dabei nahm der therapeutische Einsatz von Teicoplanin zu. Auch der Verbrauch von Aminoglykosiden, Penicillinen und Carbapenemen nahm signifikant zu.

Insgesamt ist während des Verzichts auf eine prophylaktische Glykopeptidtherapie also ein Anstieg von Gram-positiven (KONS-)Infektionen bei gleichzeitig insgesamt gestiegenem Glykopeptidverbrauch zu beobachten.

Tabelle 4.14: Antibiotikaeinsatz in Prozent der Fälle

	Teicoplanin-Prophylaxe		p [#]
	nein	ja	
Aminoglykoside ⁿ¹ (%)	95,9	78,6	0
Penicilline ⁿ² (%)	92,8	79,1	0
Carbapeneme ⁿ¹ (%)	24,4	3,6	0
Glykopeptide ⁿ¹ (%)	49,3	37,7	0
Prophylaxe Teicoplanin ⁿ¹ (%)	2,7	29,5	0,006

[#] Ermittelt über den Exakten zweiseitigen Fisher-Test

ⁿ¹: n[keine Prophylaxe]=221; n[Prophylaxe]=281

ⁿ²: n[keine Prophylaxe]=221; n[Prophylaxe]=278

5 Diskussion

Die Beziehungen zwischen Sepsiserregern wie *Staphylococcus epidermidis* und Wirt sind komplex. Ziel dieser Arbeit war einerseits eine Analyse der Bedeutung von Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus epidermidis* auf den Wirt, andererseits auch eine Untersuchung der iatrogenen Beeinflussung der Immunreaktion des Wirtes und der Vermeidung der Septitiden in der klinischen Praxis.

Dabei konnte gezeigt werden, dass

- bei der in-vitro-Stimulation von Vollblut durch Sepsisolate eine signifikant höhere proinflammatorische Immunantwort induziert wird als bei Stimulation mit Kolonisationsisolaten.
- das Diuretikum Furosemid bei Neugeborenen bei Stimulation mit *Staphylococcus epidermidis*, bei Erwachsenen bei Stimulation mit LPS immunsuppressiv wirkt.
- in einer klinischen Beobachtungsstudie der Verzicht auf eine prophylaktische Teicoplaningabe bei liegendem Gefäßkatheter zu einem Mehrverbrauch an therapeutisch eingesetztem Teicoplanin führt.

Durch Fortschritte in der Neonatologie kann eine zunehmend geringere Sterblichkeit Frühgeborener erreicht werden. Sowohl bei Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht als auch bei reifen Neugeborenen sind Septitiden nicht nur aufgrund der Mortalität und Folgeerkrankungen, sondern auch aufgrund der sozioökonomischen Kosten von großer klinischer Bedeutung [15][27][185][186]. Vor diesem Hintergrund ist eine Kenntnis der Eigenschaften pathogener Keime und der neonatalen Immunantwort auf diese Erreger von hoher therapeutischer Konsequenz.

Während bei reifen Neugeborenen LOS häufig durch *E.coli*, *Staphylococcus aureus* und B-Streptokokken verursacht werden, stellt die Gruppe der KONS die bei weitem

häufigsten Pathogene der LOS unter sehr untergewichtigen Neugeborenen (VLBW) dar.

Während früher eine insuffiziente Bildung proinflammatorischer Interleukine als Ursache der neonatalen Sepsis gesehen wurde, gilt heute sowohl eine überschießende proinflammatorische als auch eine nicht ausreichende antiinflammatorische Immunantwort als ursächlich für die Ausbildung des klinischen Bildes einer Sepsis [187][188]. Als Gegenreaktion der proinflammatorischen Immunantwort, die zum Bild eines SIRS führen kann, wird ein antiinflammatorisches CARS (Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome) beschrieben [189]. Entscheidend für eine nicht überschießende und dennoch suffiziente Immunantwort ist daher eine Balance pro- und antiinflammatorischer Interleukine [190]. In den letzten Jahren wird das Verständnis der Pathophysiologie der neonatalen Sepsis zum Beispiel durch die Kenntnis von TLR und den entsprechenden intrazellulären Signalkaskaden oder den Interaktionen zwischen regulatorischen T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems immer differenzierter [191][192].

Die **Reaktion des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion mit *Staphylococcus epidermidis* (Thesen 1 und 2)** ist komplex und wird durch die Leukozytenaktivierung, die Zytokinsekretion und die Aktivierung des Komplementsystems getragen [193]. Die Phagozytose der Bakterienzellen durch Granulozyten ist wiederum komplementabhängig [194]. Die Wechselwirkungen zwischen einem PIA-positiven Biofilm und diesen Komponenten des angeborenen Immunsystems sind vielfältig: In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein PIA-positiver Biofilm gegenüber einem PIA-negativen Biofilm eine höhere Aktivierung des Komplementsystems induziert [87][112].

Staphylococcus aureus ist sogar in der Lage, ein Protein zu bilden, welches den Ablauf der Komplementkaskade unterbrechen kann [195]. Andererseits schützt die Ausbildung des Biofilms die Bakterien vor einer Opsonisierung, wodurch weniger Leukozyten aktiviert werden und somit ein Schutz vor der granulozytenabhängigen Tötung der Bakterien besteht [105][112][196]. Dieser Effekt wird auch als Escape-Mechanismus beschrieben.

PIA gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor für Biomaterial-assoziierte Infektionen, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte [197]. Allerdings konnten in mehreren Studien auch invasive PIA-negative Keime nachgewiesen werden [198][199].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Auswirkung einzelner Virulenzfaktoren auf die neonatale Interleukinexpression untersucht werden, um vor dem Hintergrund der

oben geschilderten Sepsiskonzepte für die Ausbildung des klinischen Bildes einer Sepsis besonders begünstigende Erregerfaktoren zu identifizieren.

Daher wurde, um die neonatale Immunantwort auf einzelne Stimulantien auf Interleukinebene zu untersuchen, durch unsere Arbeitsgruppe das genutzte Vollblutsepsismodell etabliert [110][171]. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnten Härtel et al. (2008) zeigen, dass bei Stimulation durch einen Biofilm-positiven, IcaADBC-positiven (PIA bildenden) *Staphylococcus epidermidis*-Stamm eine deutlich geringere IL6-Expression als durch einen IcaADBC-negativen Stamm induziert wurde [110]. Klingenberg et al. (2005) konnten zeigen, dass Neugeborene mit KONS-Septitiden, die durch Biofilm-positive Keime verursacht wurden, ein geringeres CRP als Neugeborene mit einer Biofilm-negativen KONS-Sepsis haben [200]. Diese Ergebnisse können mit der Escape-Theorie erklärt werden: Die Bakterienzellen sind im Biofilm durch zelluläre und humorale Bestandteile des Immunsystems ebenso wie durch Antibiotika schlechter zu erreichen [105][193][201][202].

Die beschriebenen Ergebnisse sollten in der hier vorliegenden Arbeit durch eine Analyse der Reaktion des Immunsystems bei Stimulation durch gesicherte Sepsis- und Kolonisationsisolate ergänzt werden. Bei der Auswahl der Kolonisationsisolate wurde besonders auf den Virulenzfaktor Biofilmbildung und auf eine Oxacillinresistenz geachtet, so dass kommensale Keime, die diese wichtigsten Pathogenitätsfaktoren nicht besitzen, mit scheinbar pathogeneren verglichen werden konnten.

Die Biofilmbildung gilt als der wichtigste Virulenzfaktor von KONS. Weitere Virulenzfaktoren sind zum Beispiel Proteasen, die AMP spalten oder Toxine wie PSMs (s. auch Kapitel 1.4.2) [201][202]. Auf Intensivstationen persistierende Keime verfügen meist über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren [203]. Über die klinische Auswirkung einzelner Virulenzfaktoren ist jedoch wenig bekannt. Rohde et al. (2004) konnten zeigen, dass eine Analyse des *icaADBC*-Genes (Biofilm) und des *mecA*-Genes (Oxacillin-Resistenz) wenig Rückschlüsse zur Diskrimination zwischen invasiven und besiedelnden (kommensalen) *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen erlauben [179]. Ebenso scheint laut Vandecasteele et al. (2003) die Analyse von *ica*, *aap* (Biofilm) und *atlE*-Genen (initiale Adhäsion) ungeeignet zu sein [198]. Bradford et al. (2006) kamen zu ähnlichen Ergebnissen (*icaA*, *icaC*, *icaD*, *atlE*, *fbe* (Fibrinogen Binding Protein)) [204]. Sepsisolate sind nach Jain et al. (2009) häufiger Biofilm-positiv als Kolonisationsisolate [205].

Zur Betrachtung der Auswirkung des Biofilms wurden in dieser Arbeit Biofilm-positive

und Biofilm-negative Klinikisolate zu Subgruppen zusammengefasst und miteinander verglichen. Der Escape-Theorie widersprechend konnten dabei - obwohl einige Biofilmbildner geringere Interleukinexpressionen induzierten als andere Biofilmbildner (siehe Tabellen 4.1 und 4.2) - keine signifikanten Unterschiede der Interleukinexpression gezeigt werden. Diese Beobachtung kann durch die Auswirkung weiterer Virulenzfaktoren bedingt sein.

Antibiotikaresistenzen wie die klinisch wichtige Oxacillinresistenz werden als wichtiger Selektionsfaktor für das Überleben eines *Staphylococcus epidermidis*-Stammes auf der Intensivstation gesehen [137][203]. Dabei scheinen die jeweiligen Resistenzmuster der Bakterienstämme die jeweils genutzten Antibiotikaregime abzubilden [206]. Von Relevanz ist das Zusammenspiel der Pathogenitätsfaktoren Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz: Ein Biofilm kann durch eine langsame Penetration des Antibiotikums bedingte geringere Wirkspiegel oder durch eine im saureren Umgebungsmilieu durch oxidativen Stress hervorgerufene erhöhte Mutationsrate die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen begünstigen [122][207]. Der Transfer von Antibiotikaresistenzen wird weiterhin durch die räumliche Enge zwischen den Bakterienzellen in einem Biofilm begünstigt [208].

Eine direkte Beeinflussung der neonatalen Immunantwort durch Antibiotikaresistenzen erscheint fraglich. Klingenberg et al. (2005) konnten zwar zeigen, dass KONS mit Oxacillin- und Aminoglykosidresistenzen in vivo ein höheres CRP induzierten als Sepsis-isolate ohne diese Resistenzen [200]. Möglicherweise ist diese Beobachtung jedoch auch durch die Antibiotikaresistenzen selbst bedingte Selektion und mit gleichzeitig ausgebildeten weiteren Virulenzfaktoren assoziiert. Andererseits könnte eine verlängerte Dauer bis zu einer suffizienten antibiotischen Therapie zu höheren CRP-Werten geführt haben.

In unserer Studie ergaben sich keine Unterschiede zwischen Oxacillin-resistenten und -sensiblen Stämmen hinsichtlich der neonatalen Interleukinexpression (s. Tabellen 4.1 und 4.2). Fasst man die Kolonisationsisolate in zwei Subgruppen (oxacillinresistent und -sensibel) zusammen, ergab sich bei der höheren Keimkonzentration 10 CFU/WBC für die oxacillinsensiblen Isolate (siehe Tabelle 4.5) eine höhere IL6-Expression als für die oxacillinresistenten Isolate.

Interessanterweise fielen beim Vergleich der jeweils in Subgruppen zusammengefassten Sepsis- und Kolonisationsisolate Unterschiede auf: So konnte in der Subgruppe der

Sepsisolate bei beiden Keimkonzentrationen eine höhere IL6-Expression gemessen werden als in der Subgruppe der Kolonisationsisolate.

Bei der höheren Keimkonzentration (10 CFU/WBC) bestand weiterhin ein schwach signifikanter Zusammenhang der IL10-Expression zugunsten einer höheren Expression bei Stimulation durch die Sepsisolate ($p=0,047$; s. Tabelle 4.3).

Es kann bei der Stimulation durch die Sepsisolate bei der geringeren Keimkonzentration also eine Imbalance zugunsten einer Proinflammation beobachtet werden, was im Rahmen der oben beschriebenen Sepsistheorien logisch erscheint. Bei der höheren Keimkonzentration wird bei Stimulation durch die Sepsisolate in dieser Arbeit jedoch auch mehr IL10 exprimiert, was dann für eine im Vergleich gestiegene Antiinflammation und eine balanciertere Immunantwort spricht.

Durch welche Virulenzfaktoren könnte diese Beobachtung bedingt sein?

Einerseits waren die Sepsisolate beide Biofilm-negativ. In der Gruppe der Kolonisationsisolate wurden einige Biofilm-positive Keime eingeschlossen, so dass die Ergebnisse - obgleich beim Vergleich zwischen den Biofilm-positiven und -negativen Klinikisolate-Subgruppen untereinander kein signifikanter Unterschied bestand - durch den Virulenzfaktor Biofilm beeinflusst sein könnten. Andererseits war die IL6-Expression bei einzelnen Biofilm-negativen Kolonisationsisolaten geringer als bei den ebenfalls Biofilm-negativen Sepsisolaten, so dass weitere nicht untersuchte Virulenzfaktoren von Relevanz sein könnten. Hier könnte eine umfassendere mikrobiologische Diagnostik der Sepsisolate weitere Erkenntnisse bringen, obwohl wie oben beschrieben von genetischen Analysen nicht direkt auf die Invasivität eines Stammes geschlossen werden kann. Weiterhin könnte die Untersuchung der Sepsis- und Klinikisolate durch die geringen aus der Nabelschnur gewonnenen Blutmengen beeinflusst sein: Das gewonnene Blut eines Neugeborenen war nicht ausreichend, um es mit allen Bakterienstämmen zu stimulieren, so dass auf Seiten der Neugeborenen interindividuelle Unterschiede der Immunantwort die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Um die Wirkung der Virulenzfaktoren isolierter betrachten zu können, wurde daraufhin die durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 und drei Deletionsmutanten induzierte Immunantwort untersucht. Die geschilderte mögliche Beeinflussung durch die Wahl der Blutproben konnte dabei vermieden werden, da die Proben jeweils mit allen vier Keimen stimuliert werden konnten. Eine Übersicht von *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Deletionsmutanten ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Entgegen der Annahme, dass die Fähigkeit zur Ausbildung eines PIA-positiven Biofil-

mes die Interleukinausschüttung des Wirtes verringert, konnte in unserem Studienmodell weder in der neonatalen noch in der adulten Gruppe ein Unterschied zwischen dem stark biofilmbildenden *Staphylococcus epidermidis* 1457 bzw. dessen Mutanten M10 (PIA negativ, gemäß photometrischer Messung und gewähltem cut-off-Wert minimale Biofilmbildung, allerdings in der Literatur meist als Biofilm-negativ angesehen, siehe Tabelle 3.3), der sigB-Deletionsmutante (geringe Biofilmbildung, stärkere Expression von Lipasen und Proteasen), sowie der sigBagr-Deletionsmutante (geringe Biofilmbildung, keine extrazellulären Lipasen/Proteasen) gezeigt werden.

Diese Daten sind nicht kongruent mit einer 2011 von Fredheim et al. veröffentlichten Studie: Bei Stimulation mit dem PIA-negativen *Staphylococcus epidermidis* 1457 M10 konnten im Vollblutansatz deutlich höhere Interleukinwerte als bei Stimulation mit dem Wildtyp, der einen PIA-positiven Biofilm bildete, gemessen werden. Bestimmt wurden in dieser Studie, deren Ergebnisse die Theorie des Escape-Mechanismus stützen, insgesamt 13 pro- und 2 antiinflammatorische Interleukine, von denen 13 bei Stimulation durch M10 relativ zur Stimulation durch den Wildtyp erhöht waren [87]. In dieser Studie konnte IL10 jedoch nicht bestimmt werden, da in den Vollblutansätzen erst nach 12 Stunden eine Erhöhung gemessen werden kann.

Weiterhin waren die von Fredheim et al. gemessenen Unterschiede der Zytokinexpression zwar signifikant, doch teilweise gering. Aufgrund der geringen Unterschiede und der interindividuell recht unterschiedlichen Interleukinantwort [110] könnte eine Erhöhung der Probenzahl in der hier vorliegenden Arbeit zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung der Escape-Theorie nötig sein.

In einer Studie von Granslo et al. (2013) wurde die Komplementausschüttung reifer Neugeborener durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen PIA-negativer Deletionsmutante M10 in Vollblutansätzen untersucht und mit der Immunantwort einer adulten Kontrollgruppe verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass im neonatalen Blut bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 gegenüber der adulten Kontrollgruppe höhere IL6-, bei Stimulation mit durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 M10 höhere IL8-Werte messbar waren. Weiterhin konnte sowohl bei Stimulation durch den PIA-positiven Wildtyp als auch bei Stimulation durch die PIA-negative Deletionsmutante im adulten Blut eine höhere Komplementaktivierung als im neonatalen Blut gemessen werden [88].

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden die adulte und neonatale Interleukin 6 und 10-Expression bei der Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis* 1457 und den

beschriebenen Deletionsmutanten verglichen. Es konnten hier jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen neonataler und adulter Gruppe gezeigt werden.

Diese differenten Ergebnisse können einerseits im Studiendesign begründet sein: Die von Granslo et al. genutzte Inkubationszeit betrug 30 Minuten und bildete damit vor allem die initiale Phase der Immunreaktion ab. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt. Weiterhin wurde in der durch Granslo veröffentlichten Studie die Anzahl der Leukozyten in den Versuchsansätzen nicht berücksichtigt, so dass Unterschiede der Leukozytenanzahl die gemessenen Interleukinkonzentrationen beeinflussen könnten, während in dieser Arbeit die gleiche Anzahl Leukozyten jeweils mit zwei verschiedenen Bakterienkonzentrationen stimuliert wurde.

In einer vorbestehenden Arbeit konnte anhand der hier genutzten Vollblutstimulationsmodelle gezeigt werden, dass die proinflammatorische durch IL6 abgebildete Immunantwort mit dem Gestationsalter steigt, bis bei reifen Neugeborenen eine mit Erwachsenen vergleichbare Immunantwort besteht. Die antiinflammatorische Immunantwort war dagegen nicht vom Gestationsalter abhängig [110]. In einer Studie von Tatad et al. (2008) lag die bei Vollblutstimulation durch einen hitzeinaktivierten *Staphylococcus epidermidis*-Stamm induzierte IL6-Expression sowohl unreifer als auch reifer Neugeborener unter der adulten Expression [209]. Aus den in der hier vorliegenden Arbeit vorliegenden Daten können aufgrund des Studiendesigns - es sollten mehrere Keime an Nabelschnurblut reifer Neugeborener getestet werden - keine Aussagen getroffen werden.

Die hier vorliegende Studie hat Limitationen. Der Fokus lag auf einer Untersuchung einer größeren Gruppe von Keimen, so dass die Anzahl des pro Keim stimulierten Untersuchungsmaterials (n [Neugeborene]) limitiert wurde. Wie oben beschrieben konnte in der Gruppe der Sepsis- und Kolonisationsisolate aufgrund der teilweise geringen Menge Nabelschnurblutes nicht jedes Blut mit allen Keimen stimuliert werden. Daher könnten die Ergebnisse bei einer vorbeschriebenen interindividuellen Schwankung der Immunantwort [110] bei kleiner Probandenanzahl von individuellen Unterschieden der Interleukinexpression bei gleichem Stimulus beeinflusst sein. Eine Erhöhung der Probandenzahl könnte hier hilfreich sein, um weitere Zusammenhänge - insbesondere auch bei der Untersuchung der Auswirkung des Biofilms und der Analyse von *Staphylococcus epidermidis* 1457 und dessen Deletionsmutanten - zu finden. Ebenfalls ist keine Aussage über die Auswirkungen eines niedrigen Geburtsgewichts auf die Interleukinexpression zu treffen. Tröger et al. (2013) konnten zeigen, dass untergewichtige (SGA (Small for

Gestational Age)) Neugeborene mit einem Gestationsalter ≤ 32 Wochen bei Stimulation durch LPS sowohl eine verringerte proinflammatorische IL6- und IL8-Expression, als auch eine verringerte antiinflammatorische IL10-Expression zeigen [210]. Die Auswirkung vorbeschriebener Auswirkungen maternaler intrauteriner Infektionen auf die neonatale Interleukinexpression [211] kann anhand der hier vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden.

Ferner wurde als Probenmaterial Nabelschnurblut von reifen Neugeborenen verwendet. KONS-LOS sind insbesondere bei niedriggewichtigen bzw. sehr untergewichtigen Frühgeborenen von Relevanz. Hier wären im weiteren Verlauf auch Untersuchungen an Blut von Frühgeborenen denkbar. Zwischen der Abnahme des Nabelschnurblutes und der Ausbildung einer LOS könnten auch externe Faktoren die Immunantwort beeinflussen und damit Risikofaktoren für die Ausbildung einer LOS darstellen. So konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die proinflammatorische Immunantwort durch eine parenterale Ernährung mit Lipiden und Glukose beeinflusst werden kann [34]. Ebenso könnte eine Hyperglykämie immunmodulierend sein [212].

Aus Tabelle 3.2 geht hervor, dass gemäß MLST sowohl die beiden zunächst zufällig ausgewählten Sepsisolate ebenso wie zwei der Kolonisationsisolate in einem Verwandtschaftsverhältnis stehen. Durch eine Pulsfeldgelelektrophorese konnten klonale Verwandtschaftsverhältnisse der Kolonisationsisolate ausgeschlossen werden.

Wichtig ist auch ein Kenntnis der Epidemiologie von *Staphylococcus epidermidis*: Es werden regional teilweise unterschiedliche in Kliniken persistierende Klone beobachtet und für invasive *Staphylococcus epidermidis*-Infektionen ein umschriebenes Spektrum *Staphylococcus epidermidis*-Klone als verantwortlich gesehen [213][214][215].

Die in dieser Arbeit zur Stimulation verwendeten Sepsis- und Kolonisationsisolate wurden allesamt auf den Stationen der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKSH, Campus Lübeck gesammelt. Ein horizontaler Gentransfer der analysierten Stämme untereinander und die gemeinsame Zugehörigkeit zu einem auf den Lübecker Stationen persistierenden „Klonalitäts-Cluster“ ist daher anzunehmen, wodurch die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit schließlich beeinflusst sein können. Eine Ausweitung der Analysen auf Isolate unterschiedlicher Herkunft könnte gemeinsam mit fortgesetzten genotypischen Analysen letztlich ergänzende Kenntnisse über die Virulenz der Klinikisolate bringen.

Weiterhin können multiple Pharmaka die Interaktionen zwischen Wirt und Neugeborenem beeinflussen. In Voruntersuchungen wurde beispielsweise ein Effekt von Ibuprofen und Indomethacin beschrieben [216].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die These einer **Immunsuppression durch Furosemid (These 3)** überprüft.

Furosemid, ein Schleifendiuretikum, das den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife der Niere hemmt, findet in der Neonatologie regen Einsatz, die Indikationen sind in Tabelle 1.5 zusammen gefasst.

Mehrfach wurde eine immunsuppressive Funktion durch Furosemid beschrieben: Die Ergebnisse der Studien von Yuengsrigul et al. (1999) bzw. Sheikhi (2007) et al. deuten auf eine konzentrationsabhängig verringerte Ausschüttung von IL6, IL8 und $\text{TNF}\alpha$ hin [168][169]. Dabei ist der immunsuppressive Einfluss von Furosemid von Yuengsrigul gar als vergleichbar zur Wirkung einer equimolaren Dosis Hydrocortison beschrieben [168]. Lakhani et al. (1997) beobachteten außerdem eine durch Furosemid herabgesetzte Fähigkeit der Granulozyten zur Phagozytose [170].

Die genannten Arbeiten beziehen sich auf die Immunantwort Erwachsener. Ziel der hier vorliegenden Studie war eine Untersuchung des Einflusses von Furosemid auf die neonatale Immunantwort. Hierzu wurde die bereits etablierte Methodik der intrazellulären Messung der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL8 und $\text{TNF}\alpha$ in Monozyten in durchflusszytometrischer Technik gewählt [182]. Zur Stimulation der Monozyten diente LPS unter Zusatz von verschiedenen Furosemidkonzentrationen bzw. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, LPS, Pam₃Cys.

Bei aufsteigenden Furosemidkonzentrationen ließ sich in der neonatalen Gruppe die Hypothese einer Immunsuppression durch Furosemid nicht bestätigen. Bei der Betrachtung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression ergeben sich dabei teils gar widersprüchliche Daten, da bei größeren Furosemiddosen teils eine stärkere $\text{TNF}\alpha$ -Expression zu messen war als bei geringeren Dosen (siehe Tabelle 4.10). In der adulten Gruppe konnte hingegen beobachtet werden, dass sowohl die IL6-, als auch die IL8- und $\text{TNF}\alpha$ -Expression bei Zugabe von 15 µg Furosemid verringert wurde (vgl. Tabellen 4.8, 4.9 und 4.10). Dieser Beobachtung folgend wurde in den folgenden Versuchen 15 µg Furosemid eingesetzt.

Die besonders in der neonatalen Gruppe nicht mit den Daten von Sheiki et al. bzw. Yuengsrigul et al. übereinstimmenden Ergebnisse können in einer unterschiedlichen Methodik begründet sein: Während in den genannten Arbeiten Zellkulturen angelegt wurden und die Interleukinexpression im Überstand gemessen wurde, wurde die Interleukinexpression in der hier vorliegenden Arbeit zur Überprüfung der immunsuppressiven Wirkung durch aufsteigende Furosemid-Konzentrationen auf Monozyten-Zellebene

gemessen. Andererseits konnten trotz einer in der adulten Gruppe geringeren Probenzahl (jeweils $n=6$, neonatale Gruppe $n=10$) bei Erwachsenen mehr für eine Immunsuppression sprechende Zusammenhänge als in der neonatalen Gruppe gezeigt werden. Möglicherweise wirkt das Schleifendiuretikum bei Neugeborenen also weniger immunsuppressiv als bei Erwachsenen.

Um die Hypothese der Immunsuppression durch Furosemid in einem Sepsismodell weiter zu überprüfen, wurde weiterhin der Einfluss von Furosemid auf die Immunantwort bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*, Pam₃Cys und LPS untersucht. Die Ergebnisse (s. Kapitel 4.3.2) zeigen eine durch Furosemid signifikant verringerte IL6- und IL8- Expression bei Stimulation durch *Staphylococcus epidermidis*. Die über TLR2/TLR6 initiierte und über den MyD88-Signalweg fortgeleitete proinflammatorische Immunantwort (s. Kapitel 1.3.2) scheint durch Furosemid demnach supprimiert zu werden. Gleichzeitig ließ sich durch Furosemid weder bei Stimulation durch LPS (initiiert über TLR2/MD2, fortgeleitet über den MyD88 und TRIF-Signalweg) noch bei Stimulation durch Pam₃Cys (initiiert über TLR1/TLR2/CD14, MyD88-Signalweg) eine verringerte Immunantwort nachweisen.

In den Arbeiten von Yuengsrigul et al. (1999) und Sheiki et al. (2007) wurden isolierte Monozyten über 24 Stunden mit LPS (Yuengsrigul) bzw. mit Phytohaemagglutinin stimuliert, im Überstand der Kultur wurden daraufhin die Interleukine gemessen [168][169]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein Vollblutansatz gewählt und - im Falle von *Staphylococcus epidermidis* - mit Erregern stimuliert. Ein Einsetzen eines Gram-negativen Keimes in dem hier gewählten Vollblutsepsismodell könnte hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse also weitere Erkenntnisse zur immunsuppressiven Wirkung von Furosemid erbringen.

Auf zellulärer Ebene bestehen bezüglich der Ursache der in mehreren Studien beobachteten immunsuppressiven Wirkung von Furosemid bislang keine Theorien. Weder auf Ebene der Toll-like-Rezeptoren TLR1, TLR2 noch TLR4, noch auf Ebene der zahlreichen an den jeweiligen intrazellulären Signalwegen beobachteten Proteine [94] wurde bislang ein immunsuppressiver Effekt von Furosemid beschrieben. Um Auskunft über die Wirkungsebene von Furosemid zu erlangen, wären beispielsweise Vollblutansätze mit Blut von TLR1/TLR2-, TLR2- bzw. TLR4 - Knockout-Mäusen denkbar. Um bei Stimulation durch LPS zwischen der schnellen über MyD88 geleiteten und der langsamen über TRIF geleiteten Phase der Signaltransduktion zu differenzieren, könnten weitere Ansätze mit unterschiedlichen Inkubationszeiten hilfreich sein. Letztendlich wäre auch eine Hemmung der Signaltransduktion auf Ebene der intrazellulären Faktoren bis

zur Transkription der Interleukin-mRNA und weiteren Translation denkbar. Auch ein möglicher zytotoxischer Effekt durch Furosemid könnte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse postulieren also eine immunsuppressive Wirkung von Furosemid. Diese konnte in dieser Arbeit durch die Stimulation mit *Staphylococcus epidermidis* gezeigt werden, während in früheren Arbeiten andere Stimulantien genutzt wurden. Um weitere Gewissheit über die Genese der immunsuppressiven Wirkung zu erlangen, könnte das hier genutzte Vollblutsepsismodell durch Variierung von eingesetzten Stimulantien, eingesetztem Blut und Inkubationszeit dienen.

Neben einer Kenntnis der Auswirkung von erregerspezifischen Pathogenitätsfaktoren auf den Wirt und den Eigenschaften des wirtsspezifischen Immunsystems sowie dessen Beeinflussung durch ärztliches Handeln ist die Evaluation des Umgangs mit dem LOS-Risiko im klinischen Alltag von Relevanz. Hierzu wurde die **Auswirkung des Verzichts auf eine prophylaktische Glykopeptidgabe (These 4)** untersucht.

Etwa 75% der LOS bei Frühgeborenen gelten als durch Gram-positive Erreger verursacht, ca. 50% der LOS werden durch KONS hervorgerufen [24][217]. Eine prophylaktische Gabe von Glykopeptiden wird intensiv diskutiert: Einerseits scheint sie die Häufigkeit einer Sepsis mit Erregernachweis zu verringern. Andererseits hat eine Vancomycin-Prophylaxe keinen Effekt auf die Dauer der Hospitalisierung bzw. auf die Mortalität gezeigt [59]. Es entstehen durch eine Vancomycin-Therapie neue Risiken durch Nebenwirkungen - unter anderem Schallempfindungsschwerhörigkeiten und Nephropathien (siehe Kapitel 1.2.4) - und Resistenzbildungen: Zu beobachten ist eine Zunahme von vancomycinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen, sowie eine zunehmende Relevanz von gegen das über Stuhl und Urin ausgeschiedene Vancomycin resistenter Enterokokken [56][59][218][219].

Interessant ist zunächst die Sepsishäufigkeit bzw. die Keimnachweisrate: In der hier vorliegenden Studie ist seit Beginn des Glykopeptidverzichts im März 2010 eine deutliche Zunahme des Erregernachweises (Steigerung von 5,6% auf 14,6%, vgl. Tabelle 4.13) zu beobachten. Diese Steigerung kann durch eine erhöhte Aufmerksamkeit bei der Indikationsstellung und rechtzeitige Abnahmen von Blutkulturen vor Beginn einer antibiotischen Therapie, sowie durch eine verbesserte Präanalytik und Analytik bedingt sein. Die vom US-amerikanischen NICHD erhobenen Nachweisraten liegen mit 21% [14] bzw. 24,4% [217] ebenso wie vom NEO-KISS erhobenen Nachweisraten mit 21,2% [185] deutlich über den hier ermittelten Werten. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch

auch, dass im angloamerikanischen Raum teilweise mehrere periphere Blutkulturen abgenommen werden, um Blutkulturkontaminationen mit KONS zu identifizieren [18]. Bei häufigeren Abnahmen von Blutkulturen ist dabei jedoch auch ein Nachweis anderer Keime wahrscheinlicher. In Lübeck wurden während des Beobachtungszeitraumes bei einem Nachweis von KONS zum Ausschluss von Kontaminationen nicht regelhaft weitere Blutkulturen abgenommen: Bei einer geringen Nachweisrate von 10% in den Blutkulturen [36] (vgl. Kapitel 1.2.3) sind häufige Abnahmen von Blutkulturen mit einem hohen Blutverlust und damit mit einem möglicherweise schlechteren Outcome der Patienten verbunden. Während des Auswertungszeitraumes wurde bei Sepsisverdacht in Lübeck nur eine periphere Blutkultur abgenommen, als Sepsisdefinition wurden die NEO-KISS-Kriterien (vgl. Tabelle 1.2) genutzt.

Doch nicht nur falsch-positive Keimnachweise im Sinne von Kontaminationen durch KONS können die Interpretation der Nachweisraten erschweren: Bei einer geringen Wahrscheinlichkeit eines Keimnachweises in Blutkulturen und im Vergleich selteneren Abnahmen von Blutkulturen ist auch ein höherer Anteil an falsch-negativen Blutkulturergebnissen zu vermuten. Bei einer geringen Letalität von KONS-Septitiden [25] ist somit der Parameter „klinische Sepsis“ entscheidender als ein definitiver Keimnachweis. Aufgrund von international uneinheitlichen Definitionen klinischer Septitiden und dem im angloamerikanischen Raum forcierten Keimnachweis ist ein Vergleich mit Literaturdaten hier jedoch insgesamt schwierig.

Durch unsere Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer prospektiven Multicenterstudie über das GNN der Einfluss von einer Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) mit den 26 häufigsten Sepsiserregern (z.B. Septifast®, Fa. Roche) auf die ärztliche Entscheidungsfindung zur Sepsistherapie überprüft. Die PCR-Diagnostik scheint als zusätzliches diagnostisches Mittel teilweise geeignet, wobei sie die geringe Sensitivität der Blutkultur nicht ausgleichen kann. Problematisch sind unter anderem ein ebenfalls bestehendes Kontaminationsrisiko, die fehlende Möglichkeit von Resistenztestungen und die hohen Kosten [220].

Die Gruppe der Gram-positiven Erreger stellt den größten Anteil des erfassten Erregerpektrums dar, innerhalb der Gruppe dominieren KONS - insbesondere *Staphylococcus epidermidis* - was sich mit Angaben aus Literatur deckt [14][24][217]. Septitiden mit Nachweis von *Staphylococcus aureus* sind in Lübeck hingegen selten (ohne Prophylaxe 0%, mit Prophylaxe 0,4% aller erfassten Neugeborenen). In einer Studie von Boghossian et al. (2013) waren 10,7% der Septitiden durch *Staphylococcus aureus* verursacht [217].

Eine klinische Sepsis trat während des Verzichts auf eine Glykopeptid-Prophylaxe insgesamt häufiger auf als zuvor (34,2% ohne Prophylaxe, 12,8% mit Prophylaxe). Gleichzeitig stieg nicht nur der Verbrauch von Aminoglykosiden, Penicillinen und Carbapenemen signifikant an - es wurden während des Verzichts auf eine Teicoplanin-Prophylaxe insgesamt sogar mehr Glykopeptide eingesetzt als zuvor. Diese Daten sind jedoch kritisch zu sehen, da in der historischen Kohorte der Parameter „klinische Sepsis“ seltener dokumentiert wurde. Weitere prospektive Studien mit einheitlicher Dokumentation sind notwendig, um diese Daten zu überprüfen.

Die während des Verzichts auf Glykopeptide in Lübeck höhere Rate klinischer Septitiden könnte durch eine genauere Datenerhebung bedingt sein: Zwischen 2003 und 2008 wurden die Daten weniger genau erhoben, das Monitoring über das Deutsche Frühgeborenennetzwerk wird zunehmend vollständiger durchgeführt. Es könnte also angenommen werden, dass während der Teicoplanin-Prophylaxe nicht alle klinischen Septitiden erfasst wurden und die tatsächliche Rate höher lag.

Der insgesamt gestiegene Glykopeptidverbrauch kann durch eine Änderung des empirischen antibiotischen Therapiekonzeptes bei Septitiden bedingt sein: Während des Beobachtungszeitraumes erfolgte zur Verminderung des Selektionsdruckes zur Ausbildung von ESBL (Extended-Spectrum-Betalaktamase)-Keimen [221] ein Wechsel von Therapieregimen, die eine Gabe von Cephalosporinen wie Cefuroxim und Cefotaxim beinhalteten hin zu einer First-line-Therapie mit Teicoplanin und Gentamicin.

Auch Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen können die Ergebnisse beeinflussen: Obwohl es zwischen dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht keine signifikanten Zusammenhänge gab, lag das Gestationsalter der Gruppe ohne Teicoplaninprophylaxe durchschnittlich 3,3 Tage (entspricht 0,48 Wochen, vgl. Tabelle 4.12) unter der Gruppe mit entsprechender Prophylaxe. Das Geburtsgewicht war in der Gruppe ohne Teicoplaninprophylaxe 30 Gramm geringer. Sowohl ein geringes Geburtsgewicht als auch ein geringes Gestationsalter prädisponieren für eine neonatale KONS-Sepsis [14][23][222], so dass eine Beeinflussung der Daten dadurch denkbar ist.

Durch die vor 2008 weniger vollständig erhobene Dokumentation lassen sich die klinischen Verläufe der Gruppen zum Beispiel hinsichtlich einer sich unterscheidenden Mortalität nicht ausreichend vergleichen. Daten zu Nebenwirkungen wie zu mit Glykopeptidtherapie assoziierten nephrologischen Komplikationen wurden nicht erhoben.

Als Konsequenz der beschriebenen Daten erhalten Neugeborene mit einem Gestationsalter unter der 26. Schwangerschaftswoche regulär eine Teicoplaninprophylaxe. Wei-

terhin soll nun über ein Antibiotic Stewardship in einem interdisziplinären Team aus Neonatologen, Infektiologen und Mikrobiologen ein rationalerer Einsatz von Antiinfektiva gewährleistet werden, wobei insbesondere auch auf eine rechtzeitige Beendigung von antibiotischen Therapien Wert gelegt wird.

Von großer Relevanz zur Infektionsprophylaxe ist im stationären Umfeld sicherlich das Einhalten von Hygieneregeln: Vielfach wurde über endemische KONS-Isolate auf Neugeborenenintensivstationen berichtet [223][224][225]. Zur Vermeidung der Übertragung durch das Krankenhauspersonal ist eine regelmäßige und korrekte Händedesinfektion eminent wichtig [226][227]. Auch das strikt sterile Anlegen zentraler Venenzugänge sowie die sterile Vorbereitung und Verabreichung von Flüssigkeiten über die Venenzugänge ist von Relevanz [228]. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Protokolle zum Umgang mit zentralen Venenkathetern das Auftreten ZVK-assoziiierter Infektionen verringern können [229][230]. Darüber hinaus ist auch ein Zusammenhang zwischen Faktoren wie Personalknappheit oder Stationsüberbelegungen mit einem Anstieg nosokomialer Infektionen beschrieben [231][232]. Weiterhin wird diskutiert, inwieweit weitere Maßnahmen wie eine Gabe von Lactoferrin, Probiotika und Ernährung mit Muttermilch sehr untergewichtige Neugeborene vor dem Auftreten einer Sepsis schützen können [222][233].

Diese Arbeit verdeutlicht die komplexen Zusammenhänge zwischen erregerspezifischen und wirtsspezifischen Faktoren, die zur Ausbildung einer Late-onset-Sepsis führen können, im klinischen Setting der neonatologischen Intensivstation. Von immunologischer Grundlagenforschung über mikrobiologische Fragestellungen bis hin zu klinischen Studien, die über den Aufbau von Surveillance-Systemen wie dem Deutschen Frühgeborennennetzwerk oder dem NEO-KISS immer besser durchgeführt werden können, bietet sich mit dem Ziel einer besseren Patientenversorgung ein weites Feld zukünftiger Forschung.

6 Zusammenfassung

Durch medizinische Fortschritte in der Neonatologie kann eine zunehmend geringere Sterblichkeit Neugeborener erreicht werden. Die Late-onset-Sepsis durch *Staphylococcus epidermidis* stellt ein weiterhin ernst zu nehmendes Gesundheitsrisiko für Frühgeborene dar.

Zur Therapieverbesserung und Vermeidung von Late-onset-Septitiden ist eine Kenntnis der Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Erreger von großer Relevanz. Einerseits müssen hierfür die Wirkung der Erreger unter Berücksichtigung seiner Pathogenitätsfaktoren auf den Wirt, andererseits auch die Reaktion des Immunsystems des Wirtes auf den Erreger bekannt sein. Auch das ärztliche Handeln kann das Immunsystem des Neugeborenen beeinflussen und so zum Beispiel durch eine medikamentöse Immunsuppression das Ausbilden des klinischen Bildes einer Sepsis begünstigen.

Um die Virulenz des Haut und Darm besiedelnden *Staphylococcus epidermidis* besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit anhand eines in-vitro Vollblutsepsismodells die Immunreaktion von Neugeborenen auf zwei Sepsisolate und sieben auf pädiatrischen Stationen gesammelte Kolonisationsisolate untersucht. Hierbei wurde Nabelschnurblut von insgesamt 29 neugeborenen Kindern verwendet und anhand eines ELISA die bei Stimulation mit den *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten ausgeschütteten Interleukine IL6 und IL10 bestimmt. Dabei induzierten die Sepsisolate sowohl eine stärkere proinflammatorische als auch teilweise eine stärkere antiinflammatorische Immunantwort. Die gewählten Isolate wurden hinsichtlich eines Effektes der Pathogenitätsfaktoren Biofilmbildung und Oxacillinresistenz miteinander verglichen, wobei die Theorie eines zuvor beschriebenen Escape-Mechanismus, nach dem sich biofilmbildende Bakterien durch den Biofilm dem Immunsystem entziehen können, nur teilweise bestätigt werden konnte. Um den Effekt der Biofilmbildung isoliert zu betrachten und weitere Virulenzfaktoren zu untersuchen, wurde das Vollblutsepsismodell auch genutzt, um den Einfluss von *Staphylococcus epidermidis* 1457 und drei Deletionsmutanten, die sich auch hinsichtlich ihrer Eigenschaften zur Biofilmbildung und weiterer extrazellulärer

Virulenzfaktoren wie Lipasen und Proteasen unterscheiden, zu untersuchen. Hierbei konnten keine Unterschiede der Induktion der Interleukinexpression festgestellt werden.

Um weitere Kenntnis über sepsisbegünstigende Auswirkungen des ärztlichen Handelns zu erlangen, wurde in dieser Arbeit experimentell die immunsupprimierende Wirkung von Furosemid untersucht. Während in der Literatur bei Erwachsenen bei Stimulation mit LPS und Phytohaemagglutinin eine bis zu äquimolaren Cortisondosen vergleichbare immunsuppressive Wirkung beschrieben wird, gibt es keine vergleichbaren Daten für Neugeborene. Hierbei konnte im Vollblutstimulationsmodell bei Proben adulter Probanden ein immunsuppressiver Effekt beobachtet werden, während die Immunsuppression bei neonatalen Proben nicht nachvollziehbar war. In weiteren Versuchen konnte bei Stimulation mit *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 erstmals ein immunsuppressiver Effekt gezeigt werden.

Weiterhin sollte die umstrittene Praxis einer prophylaktischen Glykopeptidprophylaxe für sehr kleine Frühgeborene untersucht werden. Im Rahmen einer klinischen Datenerhebung, zu der auch seit dem Jahr 2003 erhobene Daten aus dem Deutschen Frühgeborenennetzwerk verwendet wurden, konnte ein durch koagulasenegative Staphylokokken dominiertes Erregerspektrum festgestellt werden. Während des Beobachtungszeitraumes konnte - möglicherweise auch aufgrund einer Veränderung empirischer antibiotischer Therapieregime - ein Mehrverbrauch an Teicoplanin beobachtet werden. Auch konnte eine gestiegene Anzahl klinischer Late-onset-Septitiden dokumentiert werden.

Aufgrund der Relevanz der Late-onset-Sepsis durch koagulasenegative Staphylococci gebührt klinischen Sepsiszeichen im klinischen Alltag eine hohe Aufmerksamkeit. Dabei bieten die komplexen Wechselwirkungen zwischen Immunsystem des Wirtes, den Auswirkungen der in der Intensivmedizin aufwendigen iatrogenen Maßnahmen und speziellen Eigenschaften der Erreger ein umfangreiches Forschungsfeld, um die Entstehung der Septitiden besser zu verstehen und schließlich die wachsenden Herausforderungen der Infektiologie zu meistern.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Romero, J. Espinoza, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, S. Hassan, O. Erez, T. Chaiworapongsa, and M. Mazor. The preterm parturition syndrome. *BJOG*, 113 Suppl 3:17–42, Dec 2006.
- [2] Dr. med. Berthold Koletzko. *Kinder- und Jugendmedizin, 13. Auflage, Seite 56*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, Germany, 2007.
- [3] William M Callaghan, Marian F MacDorman, Sonja A Rasmussen, Cheng Qin, and Eve M Lackritz. The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the united states. *Pediatrics*, 118(4):1566–1573, Oct 2006.
- [4] Bernd Graubner. *ICD-10-GM 2013 Systematisches Verzeichnis - Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision - German Modification Version 2011 - Stand 24.09.2010 Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision - German Modification*. Deutscher Aerzte-Verlag, Köln, 1. aufl. edition.
- [5] William A. Engle, American Academy of Pediatrics Committee on Fetus , and Newborn. Age terminology during the perinatal period. *Pediatrics*, 114(5):1362–1364, Nov 2004.
- [6] Bettylou Sherry, Zuguo Mei, Laurence Grummer-Strawn, and William H. Dietz. Evaluation of and recommendations for growth references for very low birth weight (< or =1500 grams) infants in the united states. *Pediatrics*, 111(4 Pt 1):750–758, Apr 2003.
- [7] A. Valcamonico, P. Accorsi, C. Sanzeni, P. Martelli, P. La Boria, A. Cavazza, and T. Frusca. Mid- and long-term outcome of extremely low birth weight (elbw) infants: an analysis of prognostic factors. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 20(6):465–471, Jun 2007.
- [8] Gesundheitsberichterstattung des Bundes. "Entbindungen, lebendgeborene und schwangerschaften". www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gasts&p_aid=0&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=4614 Zuletzt besucht am 12.01.2017.
- [9] Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. *Qualitätsreport 2013, Seite 131ff.* 2014.
- [10] Robert L Goldenberg, Jennifer F Culhane, Jay D Iams, and Roberto Romero. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 371(9606):75–84, Jan 2008.

- [11] Stacy Beck, Daniel Wojdyla, Lale Say, Ana Pilar Betran, Mario Merialdi, Jennifer Harris Requejo, Craig Rubens, Ramkumar Menon, and Paul F A Van Look. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*, 88(1):31–38, Jan 2010.
- [12] J. R. Bobitt and W. J. Ledger. Unrecognized amnionitis and prematurity: a preliminary report. *J Reprod Med*, 19(1):8–12, Jul 1977.
- [13] W. W. Andrews, J. C. Hauth, and R. L. Goldenberg. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol*, 17(7):357–365, 2000.
- [14] Barbara J Stoll, Nellie Hansen, Avroy A Fanaroff, Linda L Wright, Waldemar A Carlo, Richard A Ehrenkranz, James A Lemons, Edward F Donovan, Ann R Stark, Jon E Tyson, William Oh, Charles R Bauer, Sheldon B Korones, Seetha Shankaran, Abbot R Laptook, David K Stevenson, Lu-Ann Papile, and W. Kenneth Poole. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the nichd neonatal research network. *Pediatrics*, 110(2 Pt 1):285–291, Aug 2002.
- [15] Daniela Testoni, Madoka Hayashi, Michael Cohen-Wolkowicz, Daniel K Benjamin, Jr, Renato D. Lopes, Reese H. Clark, Daniel K. Benjamin, and P Brian Smith. Late-onset bloodstream infections in hospitalized term infants. *Pediatr Infect Dis J*, 33(9):920–923, Sep 2014.
- [16] B. J. Stoll, T. Gordon, S. B. Korones, S. Shankaran, J. E. Tyson, C. R. Bauer, A. A. Fanaroff, J. A. Lemons, E. F. Donovan, W. Oh, D. K. Stevenson, R. A. Ehrenkranz, L. A. Papile, J. Verter, and L. L. Wright. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the national institute of child health and human development neonatal research network. *J Pediatr*, 129(1):72–80, Jul 1996.
- [17] Lorry G Rubin, Pablo J Sánchez, Jane Siegel, Gail Levine, Lisa Saiman, William R Jarvis, and Pediatric Prevention Network. Evaluation and treatment of neonates with suspected late-onset sepsis: a survey of neonatologists’ practices. *Pediatrics*, 110(4):e42, Oct 2002.
- [18] M. G. Karlowicz, E. S. Buescher, and A. E. Surka. Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. *Pediatrics*, 106(6):1387–1390, Dec 2000.
- [19] American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20(6):864–874, Jun 1992.
- [20] Mitchell M Levy, Mitchell P Fink, John C Marshall, Edward Abraham, Derek Angus, Deborah Cook, Jonathan Cohen, Steven M Opal, Jean-Louis Vincent, Graham Ramsay, and International Sepsis Definitions Conference. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med*, 29(4):530–538, Apr 2003.
- [21] Kirstin Faust, Wolfgang Göpel, Egbert Herting, and Christoph Härtel. Sepsis bei frühgeborenenhgeborenen mit einem sehr niedrigen geburtsgewicht. epidemiologie, risikofaktoren und präventionsstrategien. *Chemotherapie-Journal*, 20:1, 2011.

- [22] Protokoll surveillance nosokomialer infektionen bei frühgeborenen mit einem geburtsgewicht < 1.500g nationales referenzzentrum für surveillance von nosokomialen infektionen am institut für hygiene und umweltmedizin charité-universitätsmedizin berlin. www.nrzh-hygiene.de, Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin (Direktorin Prof. Dr. med. Petra Gastmeier), Charité - Universitätsmedizin Berlin gemeinsame Einrichtung von Freier Universität Berlin und Humboldt-Universität Berlin Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin, 12 2009.
- [23] A. A. Fanaroff, S. B. Korones, L. L. Wright, J. Verter, R. L. Poland, C. R. Bauer, J. E. Tyson, J. B. Philips, W. Edwards, J. F. Lucey, C. S. Catz, S. Shankaran, and W. Oh. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. the national institute of child health and human development neonatal research network. *Pediatr Infect Dis J*, 17(7):593–598, Jul 1998.
- [24] Christoph Härtel, C. Härtel, Kirstin Faust, Stefan Avenarius, Bettina Bohnhorst, Michael Emeis, Corinna Gebauer, Peter Groneck, Friedhelm Heitmann, Thomas Hoehn, Mechthild Hubert, Angela Kribs, Helmut Küster, Reinhard Laux, Michael Mögel, Dirk Müller, Dirk Olbertz, Claudia Roll, Jens Siegel, Anja Stein, Matthias Vochem, Ursula Weller, Axel von der Wense, Christian Wieg, Jürgen Wintgens, Claudia Hemmelmann, Arne Simon, Egbert Herting, Wolfgang Göpel, and German Neonatal Network (G. N. N) . Epidemic microclusters of blood-culture proven sepsis in very-low-birth weight infants: experience of the german neonatal network. *PLoS One*, 7(6):e38304, 2012.
- [25] B. J. Stoll, T. Gordon, S. B. Korones, S. Shankaran, J. E. Tyson, C. R. Bauer, A. A. Fanaroff, J. A. Lemons, E. F. Donovan, W. Oh, D. K. Stevenson, R. A. Ehrenkranz, L. A. Papile, J. Verter, and L. L. Wright. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the national institute of child health and human development neonatal research network. *J Pediatr*, 129(1):63–71, Jul 1996.
- [26] Monica M. Lahra, Philip J. Beeby, and Heather E. Jeffery. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics*, 123(5):1314–1319, May 2009.
- [27] Barbara J. Stoll, Nellie I. Hansen, Ira Adams-Chapman, Avroy A. Fanaroff, Susan R. Hintz, Betty Vohr, Rosemary D. Higgins, National Institute of Child Health , and Human Development Neonatal Research Network. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*, 292(19):2357–2365, Nov 2004.
- [28] Sharon E Perlman, Lisa Saiman, and Elaine L Larson. Risk factors for late-onset health care-associated bloodstream infections in patients in neonatal intensive care units. *Am J Infect Control*, 35(3):177–182, Apr 2007.
- [29] Dietrich Mack, Angharad P Davies, Llinos G Harris, Holger Rohde, Matthias A Horstkotte, and Johannes K-M Knobloch. Microbial interactions in staphylococcus epidermidis biofilms. *Anal Bioanal Chem*, 387(2):399–408, Jan 2007.

- [30] K. Eastick, J. P. Leeming, D. Bennett, and M. R. Millar. Reservoirs of coagulase negative staphylococci in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 74(2):F99–104, Mar 1996.
- [31] Silvia F Costa, Marisa H Miceli, and Elias J Anaissie. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis*, 4(5):278–286, May 2004.
- [32] C. Avila-Figueroa, D. A. Goldmann, D. K. Richardson, J. E. Gray, A. Ferrari, and J. Freeman. Intravenous lipid emulsions are the major determinant of coagulase-negative staphylococcal bacteremia in very low birth weight newborns. *Pediatr Infect Dis J*, 17(1):10–17, Jan 1998.
- [33] Y. Okada, N. J. Klein, H. K. van Saene, G. Webb, H. Holzel, and A. Pierro. Bactericidal activity against coagulase-negative staphylococci is impaired in infants receiving long-term parenteral nutrition. *Ann Surg*, 231(2):276–281, Feb 2000.
- [34] Berit Haase, Kirstin Faust, Mathias Heidemann, Tasja Scholz, Martin Demmert, Birte Tröger, Alexander Herz, and Christoph Härtel. The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by staphylococcus epidermidis. *Inflamm Res*, Nov 2010.
- [35] Nehama Linder, Adriana Hernandez, Limor Amit, Gil Klinger, Shai Ashkenazi, and Itzhak Levy. Persistent coagulase-negative staphylococci bacteremia in very-low-birth-weight infants. *Eur J Pediatr*, 170(8):989–995, Aug 2011.
- [36] D. J. Isaacman, R. B. Karasic, E. A. Reynolds, and S. I. Kost. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *J Pediatr*, 128(2):190–195, Feb 1996.
- [37] G. Jawaheer, T. J. Neal, and N. J. Shaw. Blood culture volume and detection of coagulase negative staphylococcal septicaemia in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 76(1):F57–F58, Jan 1997.
- [38] E. Nexø, N. C. Christensen, and H. Olesen. Volume of blood removed for analytical purposes during hospitalization of low-birthweight infants. *Clin Chem*, 27(5):759–761, May 1981.
- [39] J. P. BATTERY. Blood cultures in newborns and children: optimising an everyday test. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 87(1):F25–F28, Jul 2002.
- [40] D. Leyssene, S. Gardes, P. Vilquin, J-P. Flandrois, G. Carret, and B. Lamy. Species-driven interpretation guidelines in case of a single-sampling strategy for blood culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Apr 2011.
- [41] Linda M. McLaughlin, Garry D T. Inglis, Adam B. Hoellering, and Mark W. Davies. Relationship between blood culture collection method and proportion of contaminated cultures in neonates. *J Paediatr Child Health*, 49(2):105–108, Feb 2013.
- [42] Vennila Ponnusamy, Vidheya Venkatesh, Anna Curley, Patrick Musonda, Nicholas Brown, Catherine Tremlett, and Paul Clarke. Segmental percutaneous central venous line cultures for diagnosis of catheter-related sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 97(4):F273–F278, Jul 2012.

-
- [43] Thomas G Connell, Mhisti Rele, Donna Cowley, Jim P Buttery, and Nigel Curtis. How reliable is a negative blood culture result? volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics*, 119(5):891–896, May 2007.
- [44] W. E. Benitz, M. Y. Han, A. Madan, and P. Ramachandra. Serial serum c-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics*, 102(4):E41, Oct 1998.
- [45] Emine Kocaba?, Aysun Sarikcio?lu, Necmi Aksaray, Gül?ah Seydao?lu, Yalçın Seyhun, and Akgün Yaman. Role of procalcitonin, c-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr*, 49(1):7–20, 2007.
- [46] P. C. Ng, S. H. Cheng, K. M. Chui, T. F. Fok, M. Y. Wong, W. Wong, R. P. Wong, and K. L. Cheung. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and c-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 77(3):F221–F227, Nov 1997.
- [47] Chia-Hua Chiu, Ian C Michelow, Jonathan Cronin, Steven A Ringer, Timothy G Ferris, and Karen M Puopolo. Effectiveness of a guideline to reduce vancomycin use in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*, 30(4):273–278, Apr 2011.
- [48] Sameer J. Patel, Adebayo Oshodi, Priya Prasad, Patricia Delamora, Elaine Larson, Theoklis Zaoutis, David A. Paul, and Lisa Saiman. Antibiotic use in neonatal intensive care units and adherence with centers for disease control and prevention 12 step campaign to prevent antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J*, 28(12):1047–1051, Dec 2009.
- [49] Leonard A. Mermel, Michael Allon, Emilio Bouza, Donald E. Craven, Patricia Flynn, Naomi P. O'Grady, Issam I. Raad, Bart J A. Rijnders, Robert J. Sherertz, and David K. Warren. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*, 49(1):1–45, Jul 2009.
- [50] K. Aktories, U. Förstermann, F.B. Hofmann, and K. Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Seite 815 bis 817*. Elsevier, Urban & Fischer, 2009.
- [51] Mohan P Venkatesh, Frank Placencia, and Leonard E Weisman. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Semin Pediatr Infect Dis*, 17(3):120–127, Jul 2006.
- [52] O. Plan, G. Cambonie, E. Barbotte, P. Meyer, C. Devine, C. Milesi, O. Pidoux, M. Badr, and J. C. Picaud. Continuous-infusion vancomycin therapy for preterm neonates with suspected or documented gram-positive infections: a new dosage schedule. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 93(6):F418–F421, Nov 2008.
- [53] M. J. Wood. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 37(2):209–222, Feb 1996.
- [54] J. Claessens, M. Roriz, R. Merckx, P. Baatsen, L. Van Mellaert, and J. Van Eldere. Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing staphylococcus epidermidis biofilms in vitro. *Int J Antimicrob Agents*, 45(4):368–375, Apr 2015.

- [55] F. Biavasco, C. Vignaroli, and P. E. Varaldo. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19(6):403–417, Jun 2000.
- [56] George H. Talbot, John Bradley, John E Edwards, Jr, David Gilbert, Michael Scheld, John G. Bartlett, and Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America . Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*, 42(5):657–668, Mar 2006.
- [57] D. P. Raymond, S. J. Pelletier, T. D. Crabtree, T. G. Gleason, L. L. Hamm, T. L. Pruett, and R. G. Sawyer. Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit. *Crit Care Med*, 29(6):1101–1108, Jun 2001.
- [58] E. Raineri, L. Crema, S. Dal Zoppo, A. Acquarolo, A. Pan, G. Carnevale, F. Albertario, and A. Candiani. Rotation of antimicrobial therapy in the intensive care unit: impact on incidence of ventilator-associated pneumonia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29(8):1015–1024, Aug 2010.
- [59] A. P. Craft, N. N. Finer, and K. J. Barrington. Vancomycin for prophylaxis against sepsis in preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD001971, 2000.
- [60] L. A. Jardine, G D T. Inglis, and M. W. Davies. Prophylactic systemic antibiotics to reduce morbidity and mortality in neonates with central venous catheters. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD006179, 2008.
- [61] A. Lodha, A. D. Furlan, H. Whyte, and A. M. Moore. Prophylactic antibiotics in the prevention of catheter-associated bloodstream bacterial infection in preterm neonates: a systematic review. *J Perinatol*, 28(8):526–533, Aug 2008.
- [62] B. Bastani, J. Minton, and S. Islam. Insufficient penetration of systemic vancomycin into the permcath lumen. *Nephrol Dial Transplant*, 15(7):1035–1037, Jul 2000.
- [63] B. Messing, S. Peitra-Cohen, A. Debure, M. Beliah, and J. J. Bernier. Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter-related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 12(2):185–189, 1988.
- [64] Jacqueline E. Taylor, Kenneth Tan, Nai Ming Lai, and Susan J. McDonald. Antibiotic lock for the prevention of catheter-related infection in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*, (6):CD010336, 2015.
- [65] K.M. Murphy, P. Travers, M. Walport, L. Seidler, and I. Hauaer-Siller. *Janeway Immunologie, 7. Auflage, Seite 1 bis 51*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [66] J. K. Salmon, C. A. Armstrong, and J. C. Ansel. The skin as an immune organ. *West J Med*, 160(2):146–152, Feb 1994.
- [67] Anthony J Mancini. Skin. *Pediatrics*, 113(4 Suppl):1114–1119, Apr 2004.
- [68] Y. N. Kalia, L. B. Nonato, C. H. Lund, and R. H. Guy. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol*, 111(2):320–326, Aug 1998.

- [69] S. B. Hoath, W. L. Pickens, and M. O. Visscher. The biology of vernix caseosa. *Int J Cosmet Sci*, 28(5):319–333, Oct 2006.
- [70] Lars Steinstraesser, Ursula Kraneburg, Frank Jacobsen, and Sammy Al-Benna. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 216(3):322–333, Mar 2011.
- [71] Richard L Gallo and Teruaki Nakatsuji. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol*, 131(10):1974–1980, Oct 2011.
- [72] G. Marchini, S. Lindow, H. Brismar, B. Ståbi, V. Berggren, A-K. Ulfgren, S. Lonne-Rahm, B. Agerberth, and G. H. Gudmundsson. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol*, 147(6):1127–1134, Dec 2002.
- [73] Richard L. Gallo, Masamoto Murakami, Takaaki Ohtake, and Mohamed Zaiou. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol*, 110(6):823–831, Dec 2002.
- [74] Kirstin Faust, Göpel Wolfgang, Moser Katja, Temole Gloriette, Bartels Maren, Wieg Christian, Tröger Birte, Herting Egbert, and Härtel Christoph. Differential expression of antimicrobial polypeptides in cord blood samples of preterm and term infants. *Acta Paediatr*, 103(4):e143–e147, Apr 2014.
- [75] K.M. Murphy, P. Travers, M. Walport, L. Seidler, and I. Hauaer-Siller. *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Seite 68ff. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [76] C. A. Dinarello. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2):503–508, Aug 2000.
- [77] S. M. Opal and V. A. DePalo. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4):1162–1172, Apr 2000.
- [78] T. Kishimoto, S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86(4):1243–1254, Aug 1995.
- [79] Hideo Yasukawa, Masanobu Ohishi, Hiroyuki Mori, Masaaki Murakami, Takatoshi Chinen, Daisuke Aki, Toshikatsu Hanada, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Masahiko Hoshijima, Toshio Hirano, Kenneth R Chien, and Akihiko Yoshimura. Il-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of socs3 in macrophages. *Nat Immunol*, 4(6):551–556, Jun 2003.
- [80] Simon A Jones. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for il-6. *J Immunol*, 175(6):3463–3468, Sep 2005.
- [81] M. Baggiolini and I. Clark-Lewis. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 307(1):97–101, Jul 1992.
- [82] A. E. Koch, P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner, and R. M. Strieter. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258(5089):1798–1801, Dec 1992.

- [83] J. E. de Vries. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med*, 27(5):537–541, Oct 1995.
- [84] J. S. Pober, M. P. Bevilacqua, D. L. Mendrick, L. A. Lapierre, W. Fiers, and M. A. Gimbrone. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol*, 136(5):1680–1687, Mar 1986.
- [85] J. P. Mira, A. Cariou, F. Grall, C. Delclaux, M. R. Losser, F. Heshmati, C. Cheval, M. Monchi, J. L. Teboul, F. Riché, G. Leleu, L. Arbibe, A. Mignon, M. Delpech, and J. F. Dhainaut. Association of tnf2, a tnf-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*, 282(6):561–568, Aug 1999.
- [86] M. J. Walport. Complement. first of two parts. *N Engl J Med*, 344(14):1058–1066, Apr 2001.
- [87] Elizabeth G Aarag Fredheim, Hildegunn Norbakken Granslo, Trond Flægstad, Yngve Figenschau, Holger Rohde, Irina Sadovskaya, Tom Eirik Mollnes, and Claus Klingenberg. Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63(2):269–280, Nov 2011.
- [88] Hildegunn N Granslo, Claus Klingenberg, Elizabeth A Fredheim, Ganesh Acharya, Tom Eirik Mollnes, and Trond Flægstad. Staphylococcus epidermidis biofilms induce lower complement activation in neonates as compared with adults. *Pediatr Res*, 73(3):294–300, Mar 2013.
- [89] Tom van der Poll and Steven M Opal. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*, 8(1):32–43, Jan 2008.
- [90] Charles A Janeway and Ruslan Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216, 2002.
- [91] Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, and Osamu Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783–801, Feb 2006.
- [92] A. Reitermann, J. Metzger, K. H. Wiesmüller, G. Jung, and W. G. Bessler. Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or hapten. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 370(4):343–352, Apr 1989.
- [93] A. M. Hajjar, D. S. O’Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (tlr) 2 and tlr1 or tlr6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*, 166(1):15–19, Jan 2001.
- [94] Taro Kawai and Shizuo Akira. Signaling to nf-kappab by toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13(11):460–469, Nov 2007.
- [95] Maciej Siedlar, Marion Frankenberger, Elke Benkhart, Terje Espevik, Martina Quirling, Korbini-an Brand, Marek Zembala, and Loems Ziegler-Heitbrock. Tolerance induced by the lipopeptide pam3cys is due to ablation of il-1r-associated kinase-1. *J Immunol*, 173(4):2736–2745, Aug 2004.
- [96] Sir alexander ogston, k.c.v.o., m.d., c.m., ll.d. *Br Med J*, 1(3554):325–327, Feb 1929.

- [97] H. Hof and R. Dörris. *Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektologie, Hygiene*. Duale Reihe. Thieme Georg Verlag, 2009.
- [98] M. E. Rupp and G. L. Archer. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*, 19(2):231–43; quiz 244–5, Aug 1994.
- [99] Hilmar Wisplinghoff, Tammy Bischoff, Sandra M Tallent, Harald Seifert, Richard P Wenzel, and Michael B Edmond. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39(3):309–317, Aug 2004.
- [100] D. Isaacs and Australasian Study Group For Neonatal Infections. A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in australasian neonatal units. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 88(2):F89–F93, Mar 2003.
- [101] Elizabeth A. Grice and Julia A. Segre. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9(4):244–253, Apr 2011.
- [102] C. T. D’Angio, K. L. McGowan, S. Baumgart, J. St Geme, and M. C. Harris. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J Pediatr*, 114(6):1029–1034, Jun 1989.
- [103] Kimberly A Capone, Scot E Dowd, Georgios N Stamatas, and Janeta Nikolovski. Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol*, 131(10):2026–2032, Oct 2011.
- [104] Michael Otto. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci*, 9:841–863, Jan 2004.
- [105] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418):1318–1322, May 1999.
- [106] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49:711–745, 1995.
- [107] Hans-Curt Flemming and Jost Wingender. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9):623–633, Sep 2010.
- [108] Henning Büttner, Dietrich Mack, and Holger Rohde. Structural basis of staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5:14, 2015.
- [109] D Mack. Molecular mechanisms of staphylococcus epidermidis biofilm formation. *The Journal of hospital infection*, 43 Suppl:S113–S125, Dec 1999.
- [110] C. Härtel, I. Osthues, J. Rupp, B. Haase, K. Röder, W. Göpel, E. Herting, and C. Schultz. Characterisation of the host inflammatory response to staphylococcus epidermidis in neonatal whole blood. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 93(2):F140–F145, Mar 2008.

- [111] Jeff G. Leid, Mark E. Shirtliff, J. W. Costerton, and Paul Stoodley. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to staphylococcus aureus biofilms. *Infect Immun*, 70(11):6339–6345, Nov 2002.
- [112] Sascha A Kristian, Timo A Birkenstock, Ursula Sauder, Dietrich Mack, Friedrich Götz, and Regine Landmann. Biofilm formation induces c3a release and protects staphylococcus epidermidis from igg and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis*, 197(7):1028–1035, Apr 2008.
- [113] J. Rodgers, F. Phillips, and C. Olliff. The effects of extracellular slime from staphylococcus epidermidis on phagocytic ingestion and killing. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 9(2):109–115, Aug 1994.
- [114] Cuong Vuong, Jovanka M Voyich, Elizabeth R Fischer, Kevin R Braughton, Adeline R Whitney, Frank R DeLeo, and Michael Otto. Polysaccharide intercellular adhesin (pia) protects staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*, 6(3):269–275, Mar 2004.
- [115] Paul D Fey and Michael E Olson. Current concepts in biofilm formation of staphylococcus epidermidis. *Future Microbiol*, 5(6):917–933, Jun 2010.
- [116] Kevin M Conlon, Hilary Humphreys, and James P O’Gara. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in staphylococcus epidermidis. *J Bacteriol*, 184(16):4400–4408, Aug 2002.
- [117] J. K. Knobloch, K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht, and D. Mack. Biofilm formation by staphylococcus epidermidis depends on functional rsbu, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol*, 183(8):2624–2633, Apr 2001.
- [118] L. D. Handke, S. R. Slater, K. M. Conlon, Sinead T O’Donnell, M. E. Olson, K. A. Bryant, M. E. Rupp, J. P. O’Gara, and P. D. Fey. SigB and sara independently regulate polysaccharide intercellular adhesin production in staphylococcus epidermidis. *Can J Microbiol*, 53(1):82–91, Jan 2007.
- [119] Blaise R Boles and Alexander R Horswill. Agr-mediated dispersal of staphylococcus aureus biofilms. *PLoS Pathog*, 4(4):e1000052, Apr 2008.
- [120] Rachna Singh, Pallab Ray, Anindita Das, and Meera Sharma. Penetration of antibiotics through staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 65(9):1955–1958, Sep 2010.
- [121] S. Daddi Oubekka, R. Briandet, M-P. Fontaine-Aupart, and K. Steenkest. Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6):3349–3358, Jun 2012.
- [122] Victoria J. Ryder, Ian Chopra, and Alex J. O’Neill. Increased mutability of staphylococci in biofilms as a consequence of oxidative stress. *PLoS One*, 7(10):e47695, 2012.

- [123] Jeffrey B. Kaplan. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs*, 34(9):737–751, Sep 2011.
- [124] J. S. Cargill and M. Upton. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of staphylococcus epidermidis. *J Clin Pathol*, 62(12):1112–1116, Dec 2009.
- [125] M. Souli and H. Giamarellou. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(4):939–941, Apr 1998.
- [126] Claus Klingenberg, Elizabeth Aarag, Arild Rønnestad, Johanna Ericson Sollid, Tore Gunnar Abrahamsen, Gry Kjeldsen, and Trond Flaegstad. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*, 24(9):817–822, Sep 2005.
- [127] Stanislava Kocianova, Cuong Vuong, Yufeng Yao, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Frank R. DeLeo, and Michael Otto. Key role of poly-gamma-dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of staphylococcus epidermidis. *J Clin Invest*, 115(3):688–694, Mar 2005.
- [128] Steven R Gill, Derrick E Fouts, Gordon L Archer, Emmanuel F Mongodin, Robert T Deboy, Jacques Ravel, Ian T Paulsen, James F Kolonay, Lauren Brinkac, Mauren Beanan, Robert J Dodson, Sean C Daugherty, Ramana Madupu, Samuel V Angiuoli, A. Scott Durkin, Daniel H Haft, Jessica Vamathevan, Hoda Khouri, Terry Utterback, Chris Lee, George Dimitrov, Lingxia Jiang, Haiying Qin, Jan Weidman, Kevin Tran, Kathy Kang, Ioana R Hance, Karen E Nelson, and Claire M Fraser. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant staphylococcus epidermidis strain. *J Bacteriol*, 187(7):2426–2438, Apr 2005.
- [129] S. Stefani and P. E. Varaldo. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in europe. *Clin Microbiol Infect*, 9(12):1179–1186, Dec 2003.
- [130] I. Raad, A. Alrahwani, and K. Rolston. Staphylococcus epidermidis: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis*, 26(5):1182–1187, May 1998.
- [131] Gordon Y C Cheung and Michael Otto. Understanding the significance of staphylococcus epidermidis bacteremia in babies and children. *Curr Opin Infect Dis*, 23(3):208–216, Jun 2010.
- [132] B. A. Forbes and D. R. Schaberg. Transfer of resistance plasmids from staphylococcus epidermidis to staphylococcus aureus: evidence for conjugative exchange of resistance. *J Bacteriol*, 153(2):627–634, Feb 1983.
- [133] J. Naidoo. Interspecific co-transfer of antibiotic resistance plasmids in staphylococci in vivo. *J Hyg (Lond)*, 93(1):59–66, Aug 1984.
- [134] Anne-Merethe Hanssen, Gry Kjeldsen, and Johanna U Ericson Sollid. Local variants of staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother*, 48(1):285–296, Jan 2004.

- [135] Henry F. Chambers and Frank R. Deleo. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 7(9):629–641, Sep 2009.
- [136] Helen Pearson. ‘superbug’ hurdles key drug barrier. *Nature*, 418(6897):469, Aug 2002.
- [137] Tannette G Krediet, Ellen M Mascini, Ellen van Rooij, Judith Vlooswijk, Armand Paauw, Leo J Gerards, and André Fleer. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol*, 42(3):992–995, Mar 2004.
- [138] B J Hartman and A Tomasz. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 158:513–516, May 1984.
- [139] Michael Otto. Molecular basis of *staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*, 34(2):201–214, Mar 2012.
- [140] Anna L Cogen, Kenshi Yamasaki, Katheryn M Sanchez, Robert A Dorschner, Yuping Lai, Daniel T MacLeod, Justin W Torpey, Michael Otto, Victor Nizet, Judy E Kim, and Richard L Gallo. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol*, 130(1):192–200, Jan 2010.
- [141] Anna L Cogen, Kenshi Yamasaki, Jun Muto, Katheryn M Sanchez, Laura Crotty Alexander, Jackelyn Tanios, Yuping Lai, Judy E Kim, Victor Nizet, and Richard L Gallo. *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulin-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group a streptococcus. *PLoS One*, 5(1):e8557, 2010.
- [142] A. L. Cogen, V. Nizet, and R. L. Gallo. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol*, 158(3):442–455, Mar 2008.
- [143] Kim A. Brogden. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3):238–250, Mar 2005.
- [144] Ines Wanke, Heiko Steffen, Christina Christ, Bernhard Krismer, Friedrich Götz, Andreas Peschel, Martin Schaller, and Birgit Schitteck. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol*, 131(2):382–390, Feb 2011.
- [145] Giovanna Marchini, Annika Nelson, Josefine Edner, Solbritt Lonne-Rahm, Anneli Stavr us-Evers, and Kjell Hultenby. Erythema toxicum neonatorum is an innate immune response to commensal microbes penetrated into the skin of the newborn infant. *Pediatr Res*, 58(3):613–616, Sep 2005.
- [146] W. STOKES. A new effective diuretic–lasix. *Br Med J*, 2(5414):910–914, Oct 1964.
- [147] M. B. Burg. Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int*, 9(2):189–197, Feb 1976.

- [148] J. A. McRoberts, S. Erlinger, M. J. Rindler, and MH Saier, Jr. Furosemide-sensitive salt transport in the madin-darby canine kidney cell line. evidence for the cotransport of Na^+ , K^+ , and Cl^- . *J Biol Chem*, 257(5):2260–2266, Mar 1982.
- [149] J. Prandota. Clinical pharmacology of furosemide in children: a supplement. *Am J Ther*, 8(4):275–289, 2001.
- [150] M. Haas and B Forbush, 3rd. The Na^+ - K^+ - Cl^- cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol*, 62:515–534, 2000.
- [151] Jasmine Sahni and Stephanie J. Phelps. Nebulized furosemide in the treatment of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 16(1):14–22, Jan 2011.
- [152] D. C. Brater. Clinical pharmacology of loop diuretics in health and disease. *Eur Heart J*, 13 Suppl G:10–14, Dec 1992.
- [153] Strukturformel von Furosemid: selbst erstellt mit dem Programm ACD/ChemsSketch 12.0 der Firma Advanced Chemistry Development (Inc. 8 King Street East Suite 107; Toronto Ontario Canada M5C 1B5).
- [154] P. Vert, M. Broquaire, M. Legagneur, and P. L. Morselli. Pharmacokinetics of furosemide in neonates. *Eur J Clin Pharmacol*, 22(1):39–45, 1982.
- [155] M. K. Witte, J. E. Stork, and J. L. Blumer. Diuretic therapeutics in the pediatric patient. *Am J Cardiol*, 57(2):44A–53A, Jan 1986.
- [156] K. G. Hufnagle, S. N. Khan, D. Penn, A. Cacciarelli, and P. Williams. Renal calcifications: a complication of long-term furosemide therapy in preterm infants. *Pediatrics*, 70(3):360–363, Sep 1982.
- [157] Charlotte Gimpel, Alexandra Krause, Peter Franck, Marcus Krueger, and Christian von Schnakenburg. Exposure to furosemide as the strongest risk factor for nephrocalcinosis in preterm infants. *Pediatr Int*, 52(1):51–56, Feb 2010.
- [158] T. P. Green, T. R. Thompson, D. E. Johnson, and J. E. Lock. Furosemide promotes patent ductus arteriosus in premature infants with the respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med*, 308(13):743–748, Mar 1983.
- [159] B. Engelhardt, S. Elliott, and T. A. Hazinski. Short- and long-term effects of furosemide on lung function in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr*, 109(6):1034–1039, Dec 1986.
- [160] A. Narendra, M. P. White, H. A. Rolton, Z. I. Alloub, G. Wilkinson, J. H. McColl, and J. Beattie. Nephrocalcinosis in preterm babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 85(3):F207–F213, Nov 2001.
- [161] Y. Ohki, Y. Nako, T. Koizumi, and A. Morikawa. The effect of aerosolized furosemide in infants with chronic lung disease. *Acta Paediatr*, 86(6):656–660, Jun 1997.

- [162] Audra Stewart and Luc P. Brion. Intravenous or enteral loop diuretics for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (9):CD001453, 2011.
- [163] I. D. Pavord, A. Wisniewski, and A. E. Tattersfield. Inhaled frusemide and exercise induced asthma: evidence of a role for inhibitory prostanoids. *Thorax*, 47(10):797–800, Oct 1992.
- [164] E. L. Stevens, C. F. Uyehara, W. M. Southgate, and K. T. Nakamura. Furosemide differentially relaxes airway and vascular smooth muscle in fetal, newborn, and adult guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*, 146(5 Pt 1):1192–1197, Nov 1992.
- [165] S. Bianco, M. G. Pieroni, R. M. Refini, L. Rottoli, and P. Sestini. Protective effect of inhaled furosemide on allergen-induced early and late asthmatic reactions. *N Engl J Med*, 321(16):1069–1073, Oct 1989.
- [166] G. Moscato, A. Dellabianca, P. Falagiani, G. Mistrello, G. Rossi, and C. Rampulla. Inhaled furosemide prevents both the bronchoconstriction and the increase in neutrophil chemotactic activity induced by ultrasonic "fogöf distilled water in asthmatics. *Am Rev Respir Dis*, 143(3):561–566, Mar 1991.
- [167] Peter J. Barnes. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov*, 3(10):831–844, Oct 2004.
- [168] A. Yuengsrigul, T. W. Chin, and E. Nussbaum. Immunosuppressive and cytotoxic effects of furosemide on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 83(6 Pt 1):559–566, Dec 1999.
- [169] Abdolkarim Sheikhi, Yahya Jaberi, Abdolreza Esmailzadeh, Mohammad Khani, Mehdi Moosaeefard, and Mostafa Shafaqatian. The effect of cardiovascular drugs on pro-inflammatory cytokine secretion and natural killer activity of peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic heart failure in vitro. *Pak J Biol Sci*, 10(10):1580–1587, May 2007.
- [170] M. Lakhani, S. S. Usmani, R. A. Wapnir, and R. G. Harper. In vitro effect of furosemide on the chemiluminescence of polymorphonuclear neutrophils in preterm infants. *Biol Neonate*, 72(3):142–147, 1997.
- [171] Christian Schultz, Christina Rott, Petra Temming, Julia von Puttkammer, and Peter Bucky. Influence of specimen age and use of different negative controls in determination of intracytoplasmic levels of cytokines after whole-blood culture assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(2):295–298, Mar 2002.
- [172] D Knaack. *Die Dynamik der Hautkolonisation von Früh- und Neugeborenen mit Staphylokokken*. 2015.
- [173] D. Mack, N. Siemssen, and R. Laufs. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent staphylococcus epidermidis: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun*, 60(5):2048–2057, May 1992.
- [174] D. Mack, M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis*, 174(4):881–884, Oct 1996.

- [175] Martin Christner, Gefion C Franke, Nina N Schommer, Ulrike Wendt, Kim Wegert, Philip Pehle, Gesche Kroll, Christian Schulze, Friedrich Buck, Dietrich Mack, Martin Aepfelbacher, and Holger Rohde. The giant extracellular matrix-binding protein of staphylococcus epidermidis mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular microbiology*, 75:187–207, Jan 2010.
- [176] D. Mack, M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing staphylococcus epidermidis impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*, 62(8):3244–3253, Aug 1994.
- [177] Johannes K-M. Knobloch, Sebastian Jäger, Matthias A. Horstkotte, Holger Rohde, and Dietrich Mack. Rsbu-dependent regulation of staphylococcus epidermidis biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaab by repression of the negative regulator gene icaR. *Infect Immun*, 72(7):3838–3848, Jul 2004.
- [178] Sandra Schewe. *Wechselwirkung des agr-Quorum sensing-Systems mit dem Regulon des alternativen Sigmafaktors sB im Rahmen der Regulation von Virulenzfaktoren in Staphylococcus epidermidis - Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck*. Schewe, Sandra, 2009.
- [179] Holger Rohde, Matthias Kalitzky, Nicolaus Kröger, Stefanie Scherpe, Matthias A. Horstkotte, Johannes K-M. Knobloch, Axel R. Zander, and Dietrich Mack. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*, 42(12):5614–5619, Dec 2004.
- [180] James P O’Gara. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in staphylococcus epidermidis and staphylococcus aureus. *FEMS microbiology letters*, 270:179–188, May 2007.
- [181] G D Christensen, W A Simpson, J J Younger, L M Baddour, F F Barrett, D M Melton, and E H Beachey. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22:996–1006, Dec 1985.
- [182] Christian Schultz. Intracytoplasmic detection of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytes by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 215:29–39, 2003.
- [183] A. M. Tartakoff. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, 32(4):1026–1028, Apr 1983.
- [184] D. L. Simmons, S. Tan, D. G. Tenen, A. Nicholson-Weller, and B. Seed. Monocyte antigen cd14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*, 73(1):284–289, Jan 1989.
- [185] C. Geffers, S. Baerwolff, F. Schwab, and P. Gastmeier. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the german surveillance system for very-low-birthweight infants. *J Hosp Infect*, 68(3):214–221, Mar 2008.

- [186] Tricia J. Johnson, Aloka L. Patel, Briana J. Jegier, Janet L. Engstrom, and Paula P. Meier. Cost of morbidities in very low birth weight infants. *J Pediatr*, 162(2):243–49.e1, Feb 2013.
- [187] Christian Schultz, Christina Rott, Petra Temming, Peter Schlenke, Jens C Möller, and Peter Bucskey. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res*, 51(3):317–322, Mar 2002.
- [188] C. Schultz, T. Strunk, P. Temming, N. Matzke, and C. Härtel. Reduced il-10 production and -receptor expression in neonatal t lymphocytes. *Acta Paediatr*, 96(8):1122–1125, Aug 2007.
- [189] C. Schultz, P. Temming, P. Bucskey, W. Göpel, T. Strunk, and C. Härtel. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol*, 135(1):130–136, Jan 2004.
- [190] P. C. Ng, K. Li, R P O. Wong, K. Chui, E. Wong, G. Li, and T. F. Fok. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 88(3):F209–F213, May 2003.
- [191] Kenny D. Kronforst, Christy J. Mancuso, Matthew Pettengill, Jana Ninkovic, Melanie R. Power Coombs, Chad Stevens, Michael Otto, Carina Mallard, Xiaoyang Wang, Donald Goldmann, and Ofer Levy. A neonatal model of intravenous staphylococcus epidermidis infection in mice <24 h old enables characterization of early innate immune responses. *PLoS One*, 7(9):e43897, 2012.
- [192] Shimon Sakaguchi, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura, and Masahiro Ono. Regulatory t cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5):775–787, May 2008.
- [193] Timothy J. Foster. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*, 3(12):948–958, Dec 2005.
- [194] M. M. Frank and L. F. Fries. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 12(9):322–326, Sep 1991.
- [195] Suzan H M. Rooijackers, Maartje Ruyken, Anja Roos, Mohamed R. Daha, Julia S. Presanis, Robert B. Sim, Willem J B. van Wamel, Kok P M. van Kessel, and Jos A G. van Strijp. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on c3 convertases. *Nat Immunol*, 6(9):920–927, Sep 2005.
- [196] Cuong Vuong, Christiane Gerke, Greg A. Somerville, Elizabeth R. Fischer, and Michael Otto. Quorum-sensing control of biofilm factors in staphylococcus epidermidis. *J Infect Dis*, 188(5):706–718, Sep 2003.
- [197] M. E. Rupp, J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack. Characterization of staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun*, 67(5):2656–2659, May 1999.
- [198] S. J. Vandecasteele, W. E. Peetermans, R. R Merckx, B J A. Rijnders, and J. Van Eldere. Reliability of the ica, aap and atle genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant staphylococcus epidermidis isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect*, 9(2):114–119, Feb 2003.

- [199] Holger Rohde, Christoph Burdelski, Katrin Bartscht, Muzaffar Hussain, Friedrich Buck, Matthias A Horstkotte, Johannes K-M Knobloch, Christine Heilmann, Mathias Herrmann, and Dietrich Mack. Induction of staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology*, 55:1883–1895, Mar 2005.
- [200] Claus Klingenberg, Elizabeth Aarag, Arild Rønnestad, Johanna Ericson Sollid, Tore Gunnar Abrahamsen, Gry Kjeldsen, and Trond Flaegstad. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*, 24(9):817–822, Sep 2005.
- [201] Michael Otto. Staphylococcus epidermidis—the ‘accidental’ pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(8):555–567, Aug 2009.
- [202] Michael Otto. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci*, 9:841–863, Jan 2004.
- [203] C. Klingenberg, A. Rønnestad, A. S. Anderson, T. G. Abrahamsen, J. Zorman, A. Villaruz, T. Flaegstad, M. Otto, and J. Ericson Sollid. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clin Microbiol Infect*, 13(11):1100–1111, Nov 2007.
- [204] R. Bradford, R. Abdul Manan, A. J. Daley, C. Pearce, A. Ramalingam, D. D’Mello, Y. Mueller, W. Uahwatanasakul, Y. Qu, D. Grando, S. Garland, and M. Deighton. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25(5):283–290, May 2006.
- [205] Amita Jain and Astha Agarwal. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods*, 76(1):88–92, Jan 2009.
- [206] J. P. Burnie, M. Naderi-Nasab, K. W. Loudon, and R. C. Matthews. An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital-acquired infection. *J Clin Microbiol*, 35(7):1746–1750, Jul 1997.
- [207] P. S. Stewart and J. W. Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276):135–138, Jul 2001.
- [208] Rodney M. Donlan and J William Costerton. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2):167–193, Apr 2002.
- [209] A M Francesca Tatad, Mirjana Nesin, John Peoples, Sandy Cheung, Hong Lin, Cristina Sison, Jeffrey Perlman, and Susanna Cunningham-Rundles. Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. *Neonatology*, 94(1):8–15, 2008.

- [210] Birte Tröger, Thilo Müller, Kirstin Faust, Meike Bendiks, Michael K. Bohlmann, Susanne Thonnissen, Egbert Herting, Wolfgang Göpel, and Christoph Härtel. Intrauterine growth restriction and the innate immune system in preterm infants of >32 weeks gestation. *Neonatology*, 103(3):199–204, 2013.
- [211] O. Dammann and A. Leviton. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*, 42(1):1–8, Jul 1997.
- [212] Petra Temming, Birte Tröger, Susanne Thonnissen, Paul-Martin Holterhus, Christian Schultz, and Christoph Härtel. The effect of hyperglycemia on neonatal immune responses in-vitro. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 25(1):94–98, Jan 2012.
- [213] Svetlana Kozitskaya, Michael E Olson, Paul D Fey, Wolfgang Witte, Knut Ohlsen, and Wilma Ziebuhr. Clonal analysis of staphylococcus epidermidis isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, 43:4751–4757, Sep 2005.
- [214] Micael Widerström, Tor Monsen, Carina Karlsson, Helén Edebro, Anders Johansson, and Johan Wiström. Clonality among multidrug-resistant hospital-associated staphylococcus epidermidis in northern europe. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 41:642–649, 2009.
- [215] M Miragaia, J C Thomas, I Couto, M C Enright, and H de Lencastre. Inferring a population structure for staphylococcus epidermidis from multilocus sequence typing data. *Journal of bacteriology*, 189:2540–2552, Mar 2007.
- [216] I Osthues. *Charakterisierung der durch Staphylococcus epidermidis induzierten Immunantwort bei Früh- und Neugeborenen und deren Beeinflussung durch anti-inflammatorische Substanzen - Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde*. 2013.
- [217] Nansi S. Boghossian, Grier P. Page, Edward F. Bell, Barbara J. Stoll, Jeffrey C. Murray, C Michael Cotten, Seetha Shankaran, Michele C. Walsh, Abbot R. Lptook, Nancy S. Newman, Ellen C. Hale, Scott A. McDonald, Abhik Das, Rosemary D. Higgins, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development Neonatal Research Network. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J Pediatr*, 162(6):1120–4, 1124.e1, Jun 2013.
- [218] K. Hiramatsu. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat*, 1(2):135–150, 1998.
- [219] Cesar A. Arias and Barbara E. Murray. The rise of the enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*, 10(4):266–278, Apr 2012.
- [220] Birte Tröger, Christoph Härtel, Jan Buer, Michael Dördelmann, Ursula Felderhoff-Müser, Thomas Höhn, Nico Hepping, Georg Hillebrand, Angela Kribs, Janina Marissen, Dirk Olbertz, Peter-Michael Rath, Susanne Schmidtke, Jens Siegel, Egbert Herting, Wolfgang Göpel, Joerg Steinmann, and Anja Stein. Clinical relevance of pathogens detected by multiplex pcr in blood of very-low-birth weight infants with suspected sepsis - multicentre study of the german neonatal network. *PLoS one*, 11:e0159821, 2016.

- [221] Mark E. Rupp and Paul D. Fey. Extended spectrum beta-lactamase (esbl)-producing enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63(4):353–365, 2003.
- [222] Birte Tröger, B. ger, Wolfgang Göpel, Kirstin Faust, Thilo Müller, Gerhard Jorch, Ursula Felderhoff-Müser, Ludwig Gortner, Friedhelm Heitmann, Thomas Hoehn, Angela Kribs, Reinhard Laux, Claudia Roll, Michael Emeis, Michael Mögel, Jens Siegel, Matthias Vochem, Axel von der Wense, Christian Wieg, Egbert Herting, Christoph Härtel, and German Neonatal Network . Risk for late-onset blood-culture proven sepsis in very-low-birth weight infants born small for gestational age: a large multicenter study from the german neonatal network. *Pediatr Infect Dis J*, 33(3):238–243, Mar 2014.
- [223] Vladana Milisavljevic, Fann Wu, Jeannie Cimmotti, Janet Haas, Phyllis Della-Latta, Elaine Larson, and Lisa Saiman. Genetic relatedness of staphylococcus epidermidis from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*, 33(6):341–347, Aug 2005.
- [224] J. Huebner, G. B. Pier, J. N. Maslow, E. Muller, H. Shiro, M. Parent, A. Kropec, R. D. Arbeit, and D. A. Goldmann. Endemic nosocomial transmission of staphylococcus epidermidis bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J Infect Dis*, 169(3):526–531, Mar 1994.
- [225] O. Lyytikäinen, H. Saxén, R. Ryhänen, M. Vaara, and J. Vuopio-Varkila. Persistence of a multiresistant clone of staphylococcus epidermidis in a neonatal intensive-care unit for a four-year period. *Clin Infect Dis*, 20(1):24–29, Jan 1995.
- [226] Carmem Lucia Pessoa-Silva, Stéphane Hugonnet, Riccardo Pfister, Sylvie Touveneau, Sasi Dharan, Klara Posfay-Barbe, and Didier Pittet. Reduction of health care associated infection risk in neonates by successful hand hygiene promotion. *Pediatrics*, 120(2):e382–e390, Aug 2007.
- [227] S. Scheithauer, S. Trepels-Kottek, H. Häfner, D. Keller, T. Ittel, N. Wagner, K. Heimann, M. Schoberer, R. Schwarz, G. Haase, B. Waitschies, T. Orlikowsky, and S. Lemmen. Healthcare worker-related mrsa cluster in a german neonatology level iii icu: a true european story. *Int J Hyg Environ Health*, 217(2-3):307–311, Mar 2014.
- [228] A. Craft and N. Finer. Nosocomial coagulase negative staphylococcal (cons) catheter-related sepsis in preterm infants: definition, diagnosis, prophylaxis, and prevention. *J Perinatol*, 21(3):186–192, 2001.
- [229] Joseph Schulman, Rachel Stricof, Timothy P. Stevens, Michael Horgan, Kathleen Gase, Ian R. Holzman, Robert I. Koppel, Suhas Nafday, Kathleen Gibbs, Robert Angert, Aryeh Simmonds, Susan A. Furdon, Lisa Saiman, and New York State Regional Perinatal Care Centers . Statewide nicu central-line-associated bloodstream infection rates decline after bundles and checklists. *Pediatrics*, 127(3):436–444, Mar 2011.

- [230] Heather C. Kaplan, Carole Lannon, Michele C. Walsh, Edward F. Donovan, and Ohio Perinatal Quality Collaborative . Ohio statewide quality-improvement collaborative to reduce late-onset sepsis in preterm infants. *Pediatrics*, 127(3):427–435, Mar 2011.
- [231] S. Harbarth, P. Sudre, S. Dharan, M. Cadenas, and D. Pittet. Outbreak of enterobacter cloacae related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 20(9):598–603, Sep 1999.
- [232] B. M. Andersen, R. Lindemann, K. Bergh, B-I. Nesheim, G. Syversen, N. Solheim, and F. Lauge-rud. Spread of methicillin-resistant staphylococcus aureus in a neonatal intensive unit associated with understaffing, overcrowding and mixing of patients. *J Hosp Infect*, 50(1):18–24, Jan 2002.
- [233] Suzanne M. Garland, Jacinta M. Tobin, Marie Pirotta, Sepehr N. Tabrizi, Gillian Opie, Susan Donath, Mimi L K. Tang, Colin J. Morley, Leah Hickey, Linh Ung, Susan E. Jacobs, and ProPrems Study Group . The proprems trial: investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC Infect Dis*, 11:210, 2011.

8 Anhang

Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese

Abbildung 8.1:
Ergebnisse der
Pulsfeldgel-
elektrophorese
der Stämme
 $K1^{+r}$ bis $K7^{-s}$,
Verwendete No-
menklatur siehe
Tabelle 8.1

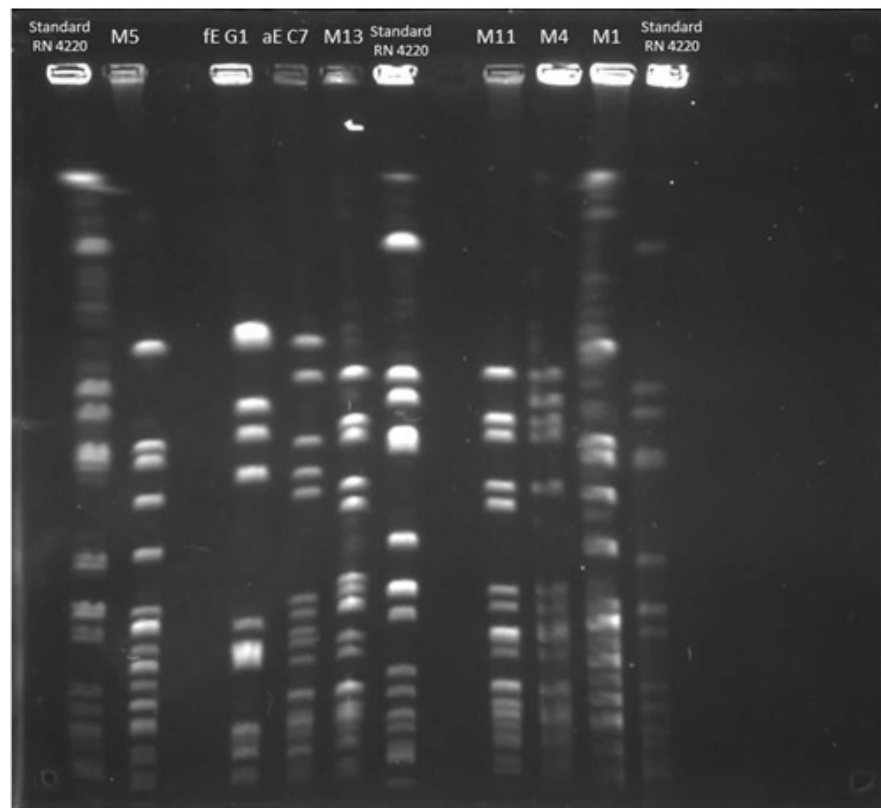


Tabelle 8.1: Nomenklatur Gelelektrophorese

Stamm	Bezeichnung Puls- feldgelelektropho- rese
$K1^{+r}$	M1
$K2^{+r}$	M4
$K3^{-r}$	M5
$K4^{-r}$	M13
$K5^{+r}$	M11
$K6^{-s}$	aE C7
$K7^{-s}$	fE G1

VERGIL



VERGIL



Patientenaufkleber

Diagnose:
 Entbindungsgrund:
 Entbindungsart:
 Geburtsgewicht:
 Gestationsalter:

Datum						
Gewicht						
Beatmung						
CPAP/SIMV						
O2-Bedarf						
Apnoe/h						
BGA						
O2/pcO2						
pH						
Beatmung						
CPAP/SIMV						
BZ						
Lac						
Katheter/Material						
PVK/Lage						
A.radialis(li., re.)						
NAK						
NVK						
ZVK						
1,2,3-lumig						
and.ZVK						
Grund für ZVK						
Temperatur						
zentral/peripher						
Blutwerte						
CRP>2,0 mg/dl						
IT ratio						
Thrombos						
Leukos						
Antibiose						
1						
2						
3						
4						
Sekret (Beurteilung)						
Röntgen/CT						
Mikrobiologie						
Ernährung						
parenteral						
enteral						
HuO/ml/d						
MM						
Bemerkungen						

VERGIL: Verzicht auf Glykopeptidantibiotika in Lübeck

Abbildung 8.2: Erfassungsbogen VERGIL

Ethikvotum

Alle Teile dieser Arbeit wurden nach einem positiven Ethikvotum (AZ 05-119 vom 26.07.2005) der Ethikkommission der Universität zu Lübeck durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.5).

9 Danksagung

Zuerst möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Härtel für die Überlassung des Themas, die vielen guten Anregungen, die langjährige geduldige wissenschaftliche Begleitung und schließlich auch für die praktische Ausübung seiner neonatologischen Expertise bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Dennis Knaack und Herrn Prof. Dr. med. Johannes Knobloch für das Überlassen der Hautkolonisationsisolate, die ausführliche mikrobiologische Diagnostik der verwendeten Bakterienstämme und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Anja Graf möchte ich ganz besonderes für die gute Einarbeitung im Labor, die vielen guten Gespräche und das Schaffen einer so freundlichen Laboratmosphäre danken. Ebenso gilt Frau Justina Bimschas Dank für die Begleitung der Arbeiten in den Laboren der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Knobloch.

Auch meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung und Zerstreuung während der anstrengenden Jahre des Berufseinstieges und der Fertigstellung der Dissertation danken.

Meinen Eltern möchte ganz besonders für die Ermöglichung des Studiums für den Weg dorthin und das Vertrauen danken.

Zuletzt möchte ich meiner eigenen kleinen Familie danken: Meiner Freundin für den Halt, die Rücksicht, die vergangenen und hoffentlich kommenden gemeinsamen Jahre und ihre vorbildliche Zielstrebigkeit, die mir bei der Arbeit an meiner eigenen Dissertation geholfen hat. Und schließlich einen beiden Töchtern, für die die Arbeit am Schreibtisch noch ein großes Mysterium zu sein scheint und mit denen ich jeden Tag die Welt ganz neu entdecken kann.

Mathias Heidemann

Lebenslauf



———— Persönliche Daten

Geburtsdatum **04.06.1986.**

Geburtsort **Berlin.**

———— Werdegang

seit 10/2013 **Weiterbildung zum Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde**, *An der Klinik für HNO-Heilkunde, UKSH, Campus Lübeck. Direktorin: Frau Prof. Dr. med. B. Wollenberg.*

10/2006 - **Studium der Humanmedizin**, *An der Universität zu Lübeck.*
05/2013

05/2013 *Zweites Staatsexamen, Note 2,0*

02/2012 - *Praktisches Jahr, Wahlfach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde*
01/2013

08/2008 *Erstes Staatsexamen, Note 2,0*

10/2005 - **Zivildienst**, *In den Integrationsgruppen der evangelischen Kindertagesstätte*
06/2006 *An der Aue in Trittau.*

08/1992 - **Grundschule und Gymnasium Trittau.**
06/2005

———— Promotion

Doktorand an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck, *Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. Härtel.*

Veröffentlichungen

- 2017 Birte Tröger, Mathias Heidemann, Ines Osthues, Dennis Knaack, Wolfgang Göpel, Egbert Herting, Johannes K. Knobloch, Christoph Härtel: Modulation of *S. epidermidis*-induced innate immune responses in neonatal whole blood, *Status 01/2017: In Einreichung*.
- 2017 Posterpräsentation auf der 88. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie: Mathias Heidemann, Christoph Härtel: Katheterassoziierte Infektionen: Charakterisierung der neonatalen Immunantwort bei in-vitro-Stimulation mit *Staphylococcus epidermidis*-Isolaten im Vollblut-Sepsismodell, *Status 01/2017: Abstract angenommen, Poster eingereicht*.
- 2016 Posterpräsentation auf der 87. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie: Mathias Heidemann, Christoph Härtel: Immunsuppression durch Furosemid bei Neugeborenen und Erwachsenen.
- 2010 Berit Haase, Kirstin Faust, Mathias Heidemann, Tasja Scholz, Martin Demmert, Birte Tröger, Alexander Herz, and Christoph Härtel. The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by *staphylococcus epidermidis*. *Inflamm Res*, Nov 2010.

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle inhaltlich oder wörtlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Ich stimme der Verwendung einer Anti-Plagiatssoftware ausdrücklich zu.

Ich versichere weiterhin, dass ich diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe. Diesem Promotionsverfahren sind keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren voraus gegangen.

Ort, Datum

Unterschrift