

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach

Die Dynamik der Hautkolonisation
von Früh- und Neugeborenen mit Staphylokokken

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

vorgelegt von
Dennis Knaack
aus Lübeck

Lübeck 2015

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. J. K.-M. Knobloch

2. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. med. Julia Welzel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.09.2015

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die mikrobielle Hautbesiedlung bei Neugeborenen	2
1.2. Das Genus <i>Staphylococcus</i>	4
1.3. Klinische Relevanz von Koagulase-negativen Staphylokokken bei Neugeborenen.....	5
1.4. Die neonatale Sepsis als Fremdkörper-assoziierte Infektion durch Koagulase-negative Staphylokokken	6
1.5. Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika.....	9
1.6. Epidemiologie von <i>S. epidermidis</i>	11
1.7. Virulenzfaktoren von Koagulase-negativen Staphylokokken.....	12
1.7.1. Biofilmbildung.....	12
1.7.2. Bedeutung der Biofilmbildung	16
1.7.3. Interaktionen von <i>S. epidermidis</i> mit dem menschlichen Immunsystem und der menschlichen Haut.....	18
1.8. Ableitung der Fragestellung	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Material	25
2.1.1. Bakterienstämme.....	25
2.1.2. Antibiotika und Enzyme	25
2.1.3. Oligonukleotide.....	26
2.1.4. Kits.....	27
2.1.5. Chemikalien und Medien.....	27
2.1.6. Einwegartikel und Verbrauchsmittel	28
2.1.7. Geräte und Hilfsmittel.....	29
2.1.8. Lösungen und Puffer.....	31

2.1.9. Nährmedien.....	32
2.1.10. Programme.....	33
2.2. Methoden.....	34
2.2.1. Methodik des Hautkolonisationscreenings.....	34
2.2.2. Pulsfeldgelelektrophorese.....	38
2.2.3. DiversiLab.....	40
2.2.4. <i>Multi Locus Sequence Typing</i>	43
2.2.5. Bestimmung der Virulenz-assoziierten Gene <i>icaA</i> und <i>mecA</i>	44
2.2.6. Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. Kolonisation mit Staphylokokken in den ersten Lebenstagen.....	46
3.2. Kolonisation mit Staphylokokken in den ersten drei Lebensmonaten.....	51
3.3. <i>S. epidermidis</i> als Hautkolonisator und Verursacher einer Sepsis.....	58
3.4. Klonale Verwandtschaft der <i>S. epidermidis</i> Stämme.....	65
4. Diskussion.....	75
4.1. Erstkolonisation bei Neugeborenen.....	75
4.2. Dynamik der Kolonisation bei Frühgeborenen einer Intensivstation.....	78
4.3. Klonale Analyse ausgewählter Isolate.....	80
5. Schlussbetrachtung und Ausblick.....	90
6. Zusammenfassung.....	91
Literaturverzeichnis.....	X
Anhang.....	XXXIV
Danksagung.....	XLIX
Lebenslauf.....	L
Veröffentlichungen.....	LI

Abkürzungsverzeichnis

Aap	<i>accumulation associated protein</i>
<i>agr</i>	<i>accessory gene regulator</i>
AMPs	<i>antimicrobial peptides</i> = antimikrobielle Peptide
aps	<i>antimicrobial peptide sensor</i>
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> = destilliertes Wasser
<i>arcC</i>	Gen der <i>carbamate kinase</i>
<i>aroE</i>	Gen der <i>shikimate dehydrogenase</i>
Atle/ Aae	Autolysin-/ Adhäsions-Protein
Bap	<i>biofilm associated protein</i>
CC	<i>clonal complex</i> = Klonaler Komplex
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung
eDNA	Extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Embp	<i>extracellular matrix-binding protein</i> = Extrazelluläres Matrix-bindendes Protein
EOS	<i>Early-Onset-Sepsis</i>
ES	EDTA Sarkosin
Esp	<i>S. epidermidis serine protease</i>
EtOH	Ethanol
Fbe	<i>Fibrinogen-Binding Protein</i> = Fibrinogen-bindendes Protein
GehD	Lipase Protein für die Kollagenadhäsion
<i>gtr</i>	Gen des <i>ABC transporter</i>
<i>ica</i>	<i>intercellular adhesion</i>
IG	Immunglobulin

IL	Interleukin
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LMP	<i>low melting point</i>
LOS	<i>Late-Onset-Sepsis</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight</i>
<i>mecA</i>	Gen des Penicillin-bindenden Proteins PBP2a
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MRSE	methicillinresistenter <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> = Massenspektrometrie
MSCRAMMs	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
<i>mutS</i>	Gen des <i>DNA mismatch repair protein</i>
NGS	Neugeborenenstation
NITS	neonatologische Intensivstation
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i> = Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBP	Penicillinbindungsprotein
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PGA	<i>poly-γ-DL-glutamic acid</i>
PNAG = PIA	<i>poly-N-acetyl glucosamine</i> = <i>polysaccharide intercellular adhesion</i> = Interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PSM	<i>phenol soluble modulín</i>
<i>pyrR</i>	Gen des <i>pyrimidine operon regulatory protein</i>

RKI	Robert Koch Institut
<i>SCCmec</i>	<i>staphylococcal chromosome cassette mec</i>
Sdr	<i>serine-aspartate dipeptid-repeats protein</i>
SE	Saline EDTA
<i>Srt</i>	Sortase
SS	Schwangerschaftswoche
ST	Sequenztyp
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TE	Tris EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i> = Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	<i>toll like receptor</i> = Toll-like Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> = Tumornekrosefaktor
<i>tpiA</i>	Gen der <i>triosephosphate isomerase</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	<i>tryptic soy agar</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
TSB _{EtOH}	TSB supplementiert mit 3 % EtOH
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VLBW	<i>very low birth weight infants</i> = sehr kleine Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1.500 g
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>yqiL</i>	Gen der <i>acetyl coenzyme A acetyltransferase</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
ZVK	zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Die bakterielle Hautflora bei Säuglingen	3
Abbildung 1-2:	Phasen der Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i>	13
Abbildung 1-3:	Schema einer Persister-Infektion.....	17
Abbildung 1-4:	Entwicklung des Immunsystems beim Neugeborenen	21
Abbildung 3-1:	Schema der eingeschlossenen Neugeborenen und Isolate der ersten Lebenswoche.....	47
Abbildung 3-2:	Prozentuale Verteilung der Staphylokokkenisolate pro Proband	49
Abbildung 3-3:	Schema der eingeschlossenen Neugeborenen und Isolate bzgl. der Langzeitbeobachtung.....	52
Abbildung 3-4:	Prävalenz phänotypischer <i>S. epidermidis</i> Muster bei Neugeborenen einer Intensivstation über zwölf Wochen.....	55
Abbildung 3-5:	Prozentuales Vorkommen der Staphylokokken-Isolate bei Neugeborenen der Langzeitbeobachtung	57
Abbildung 3-6:	Prävalenz phänotypischer <i>S. epidermidis</i> Muster bei Proband R	60
Abbildung 3-7:	Molekularbiologische Verwandtschaft ausgewählter <i>S. epidermidis</i> Isolate des Probanden R mittels Pulsfeldelektrophorese.....	61
Abbildung 3-8:	Molekularbiologische Verwandtschaft ausgewählter <i>S. epidermidis</i> Isolate des Probanden R mittels der Diversilab-Methode	64
Abbildung 3-9:	„ <i>Population Snapshot</i> “ der typisierten MLST-Sequenztypen der ersten Lebenswoche.....	67
Abbildung 3-10:	„ <i>Population Snapshot</i> “ der typisierten Sequenztypen der Intensiv- und Neugeborenenstation der ersten Lebenswoche	68
Abbildung 3-11:	<i>eBurst</i> der typisierten MLST-Sequenztypen der ersten Lebenswoche nach Umstellung des <i>primary founders</i> auf den Klonalen-Komplex 6	69
Abbildung 3-12:	Vergleich von <i>S. epidermidis</i> Isolaten des MLST ST 5 mittels der Diversilab-Methode.....	73

Abbildung 3-13: Klusteranalyse von <i>S. epidermidis</i> Isolaten mittels der Diversilab-Methode	74
Abbildung Anhang-1: Zeitpunkte der Probengewinnung.....	XXXV
Abbildung Anhang-2: Vergleich der Biofilmbildung ausgewählter Isolate	XXXV
Abbildung Anhang-3: Prozentuales Vorkommen phänotypischer <i>S. epidermidis</i> Muster bei Neugeborenen der Intensivstation in der ersten Lebenswoche	XXXVI
Abbildung Anhang-4: Prozentuales Vorkommen phänotypischer <i>S. epidermidis</i> Muster bei Neugeborenen der Normalstation in der ersten Lebenswoche	XXXVII
Abbildung Anhang-5: Ähnliche Studien der letzten 50 Jahre zur Hautbesiedlung von Neugeborenen	XLV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Extrazelluläre Matrix bindende Oberflächenproteine bei <i>S. epidermidis</i>	14
Tabelle 2-1:	Verwendete Bakterienstämme	25
Tabelle 2-2:	Verwendete Antibiotika und Enzyme.....	25
Tabelle 2-3:	Verwendete Oligonukleotide	26
Tabelle 2-4:	Verwendete Kits	27
Tabelle 2-5:	Verwendete Chemikalien und Medien	27
Tabelle 2-6:	Verwendete Einwegsartikel und Verbrauchsmittel	28
Tabelle 2-7:	Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	29
Tabelle 2-8:	Verwendete Lösungen und Puffer	31
Tabelle 2-9:	Verwendete Nährmedien	32
Tabelle 2-10:	Verwendete Programme/ Software.....	33
Tabelle 3-1:	Anzahl der Staphylokokken-Isolate der ersten Lebenswoche	48
Tabelle 3-2:	Anzahl der Staphylokokken-Isolate der ersten Lebenswoche bzgl. der Oxacillinresistenz und der Fähigkeit zur Biofilmbildung.....	50
Tabelle 3-3:	Anzahl der Staphylokokken-Isolate im zeitlichen Verlauf über zwölf Wochen.....	56
Tabelle 3-4:	Anzahl der Staphylokokken-Isolate bei Proband R.....	59
Tabelle 3-5:	Vergleich des PFGE-Musters und des phänotypischen Screenings ausgewählter Isolate	62
Tabelle 3-6:	Anzahl der gefundenen MLST Sequenztypen in der ersten Lebenswoche	66
Tabelle 3-7:	Vergleich der Biofilmtestung im Einfach- und Mehrfachansatz.....	70
Tabelle 3-8:	Vergleich des Nachweises des <i>icaA</i> -Gens zur Biofilmtestung.....	71
Tabelle 3-9:	Vergleich des Oxacillin-Screeningagars zur <i>mecA</i> -PCR.....	71
Tabelle Anhang-1:	Definition der Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem <i>Surveillance Protokoll NEO Kiss</i> des RKI.....	XXXIV

Tabelle Anhang-2:	Vergleich zwischen PFGE-Muster und phänotypischem Screening ausgewählter Isolate	XXXVIII
Tabelle Anhang-3:	MLST typisierte <i>S. epidermidis</i> Isolate aus der ersten Lebenswoche	XXXIX
Tabelle Anhang-4:	Ergänzung zu den MLST typisierten <i>S. epidermidis</i> Isolaten	XLI
Tabelle Anhang-5:	Ergänzende Informationen zur Methodik der Studien in Abbildung Anhang-5	XLVI

1. Einleitung

Die menschliche Haut beherbergt Millionen von friedlich lebenden Mikroorganismen, die untereinander und mit dem menschlichen Organismus interagieren und kommunizieren können. Vergleichbar zu Menschen können sie unterschiedlich „kulturell“ wie „gesellschaftlich“ geprägt sein und verschiedenste Fähigkeiten besitzen. In ihrer multikulturellen Gesellschaft können sie sich schützend und einbettend in einem hochkomplexen Biofilm zurückziehen und vergleichbar wie in einer Stadt leben (Watnick und Kolter, 2000). Dieses harmonische Zusammenleben auf und mit den Menschen kann durch äußere Einflüsse wie Verletzungen, Zerstörungen der Hautbarriere oder extern hinzukommenden Mikroorganismen gestört werden und zu Infektionen des Menschen führen. Früh- und Neugeborene sind hiervon besonders gefährdet, da sich auf ihrer sterilen Geburtshaut erstmals ein stabiles Mikrobiom, sowie immunologische Abwehrmechanismen gegenüber Eindringlingen entwickeln müssen.

Die Familie der Staphylokokken ist eine der „größten Bevölkerungsgruppen“ unserer Hautflora und ist mit ihrem Hauptvertreter, dem *Staphylococcus epidermidis*, für eine „gesunde und natürliche Haut“ verantwortlich. Sie können aktiv das Zusammenleben der Mikroorganismen auf der Haut beeinflussen und regeln. Bei einer (meistens ungewollten) Veränderung ihres „Gemütszustandes“ und ihrer „normalen Umgebung“ können Staphylokokken aber auch zu gefährlichen Infektionen der Haut bzw. davon ausgehend anderer menschlicher Organe führen. Vor allem bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen sind sie durch ihre Fähigkeit der Biofilmbildung und dem damit verbundenen Schutz vor dem menschlichen Abwehrsystem oder Antibiotika ein gefürchteter Erreger.

Diese Dissertation soll daher die Familie der Staphylokokken auf der Haut von Früh- und Neugeborenen näher charakterisieren und potenziell virulentere Arten von *Staphylococcus epidermidis* in ein schon bekanntes Zugehörigkeitsmuster einordnen.

1.1. Die mikrobielle Hautbesiedlung bei Neugeborenen

Die Besiedlung der sterilen Haut von Neugeborenen beginnt mit der Geburt innerhalb der ersten Lebenstage bzw. bereits im Kontakt zum Geburtskanal (Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Sarkany und Gaylarde, 1967, 1968).

Mit diesem Übergang von einem sterilen und geschützten, zu einem sich ständig variierenden und mikrobiologischer Interaktion unterworfenem Milieu, entwickelt sich auch die Neugeborenenhaut bzgl. der Thermo- und Wasserregulation, Zellproliferation oder Schutzfunktion bis zum Ende des ersten Lebensjahres ständig weiter und unterscheidet sich auf diese Weise elementar von der stabilen Erwachsenenhaut (Chiou und Blume-Peytavi, 2004; Nikolovski *et al.*, 2008; Stamatas *et al.*, 2010, 2011; Telofski *et al.*, 2012).

Das menschliche Mikrobiom, als die Gesamtheit der ökologischen Gemeinschaft kommensaler, symbiotischer und pathogener Mikroorganismen, die unseren gesamten Körper bevölkern (Lederberg und McCray, 2001), ist in den letzten Jahren verstärkt in das wissenschaftliche Interesse gerückt und 2012 erstmals systematisch durch neuere Sequenzierungsmethoden analysiert worden (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012a, 2012b; *The NIH HMP Working Group et al.*, 2009). Neben vielen anderen interessanten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* bei Erwachsenen auf der gesamten Haut und in der Nase zu 93 % vorkommt (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012b). In den letzten Jahren haben sich viele Forscher bei Neugeborenen hauptsächlich mit dem Thema der intestinalen Besiedlung beschäftigt und so bleiben trotz der Multisequenzierungsstudien von Dominguez-Bello *et al.* 2010 und Capone *et al.* 2011 noch viele Fragen zur Klärung der frühen Hautkolonisation oder eines lebenslangen Verlaufs offen.

Direkt nach der Geburt ähnelt das Bakterienspektrum des Neugeborenen der spezifischen Vaginalflora der Mutter mit vor allem *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* und *Sneathia spp.* oder bei Kaiserschnitt der unspezifischen Hautflora mit *Staphylococcus*, *Corynebacterium* und *Propionibacterium spp.* (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Über 80 % der Hautflora, beginnend mit der dritten Lebenswoche bis zum sechsten Lebensmonat, wird alleine durch 25 verschiedene Bakteriengattungen mit einem Populationsanteil von größer einem Prozent geprägt, wovon etwa 40 % Staphylokokken und Streptokokken sind (Capone *et al.*, 2011) (Abbildung 1-1).

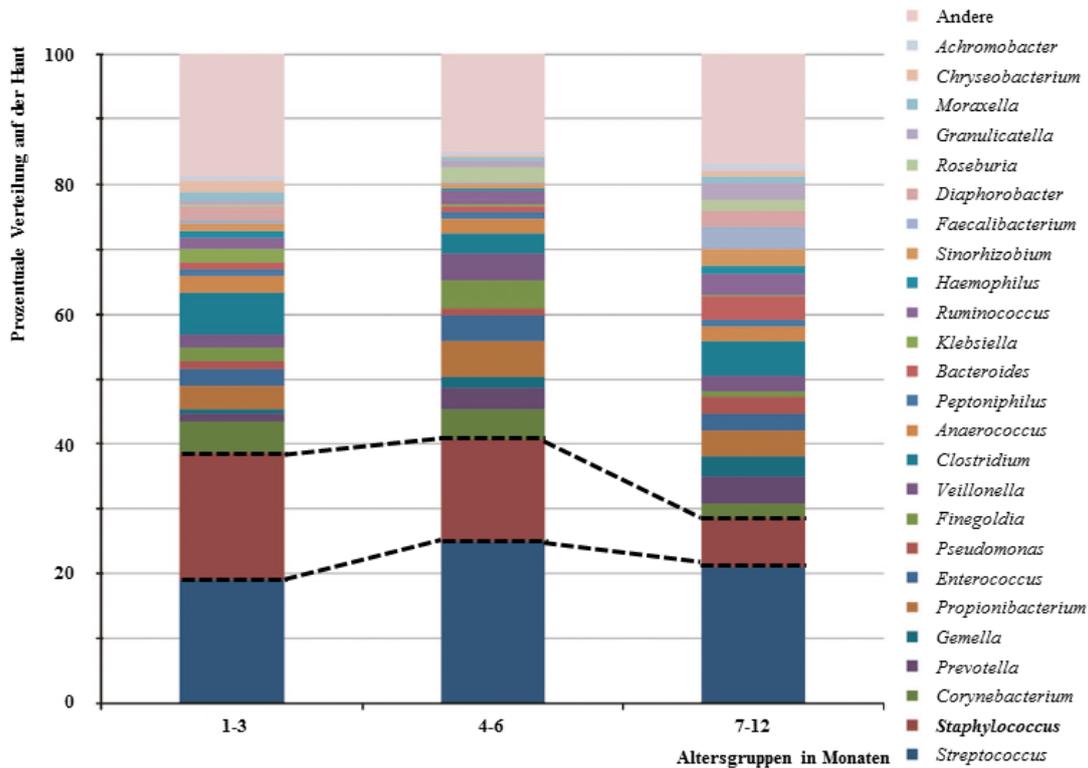


Abbildung 1-1: Die bakterielle Hautflora bei Säuglingen (nach Capone, 2011)

Streptokokken und Staphylokokken sind die Bakteriengattungen mit dem höchsten prozentualen Anteil an der Neugeborenenhaut im Rahmen einer Mikrobiomstudie und unterliegen geringen prozentualen Schwankungen innerhalb des ersten Lebensjahres.

Diese Diversität der Hautbakterien nimmt in den nächsten sechs Monaten zu und eine lokalisationspezifische Entwicklung scheint, im Gegensatz zu kurz nach der Geburt (Dominguez-Bello *et al.*, 2010), erst mit drei Monaten zu beginnen (Capone *et al.*, 2011). Zudem kommt es zu einer Verschiebung der Bakterienfamilien während der physischen Entwicklung des Menschen von *Firmicutes* (*Streptococcaceae*), *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* im präpubertären Tannerstadium 1 zu einer *Corynebacteriaceae* und *Propionibacteriaceae* geprägten Hautbesiedlung im letzten Entwicklungsstadium der Pubertät, dem Tannerstadium 5 (Oh *et al.*, 2012). Unterschiede und Zunahmen in den Abstrichregionen und der Populationsdichte können Indizien für ein instabiles Mikrobiom mit der Möglichkeit einer aberranten Hautentwicklung sein (Capone *et al.*, 2011). Erwachsene besitzen dagegen ein stabileres Mikrobiom (Gao *et al.*, 2007; Grice *et al.*, 2009; *The Human Microbiome Project Consortium*, 2012b).

Die Besiedlung der Haut wird allgemein in transiente, d.h. temporär und exogen hinzugekommene Mikroorganismen, und ständig auf der Haut und apathogen residenten

Mikroorganismen unterschieden (Price, 1938), die die Hautabwehr gegenüber pathogenen Organismen unterstützen können (Roth und James, 1988). Zur normalen Hautflora gehören zum Beispiel, die durch traditionelle Kulturmethode anzüchtbaren Bakterien, wie *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Actinobacter* oder *Pseudomonas* (Chiller *et al.*, 2001; Cogen *et al.*, 2008; Dekio *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007).

Die vornehmliche Funktion der Haut ist, eine physikalische, biochemische und immunologische Barriere zwischen dem inneren Organismus und der äußeren Umwelt zu bilden (Proksch *et al.*, 2008) und das Neugeborene vor lebensgefährlichen Bakterieninfektionen zu schützen (Larson und Dinulos, 2005).

1.2. Das Genus *Staphylococcus*

Staphylokokken sind gram-positive, 0,5 bis 1,5 µm im Durchmesser große, unbewegliche, nicht sporenbildende, Katalase-positive, mit wenigen Ausnahmen fakultativ anaerob lebende, unbekapselte Bakterien (Bannerman und Peacock, 2007).

Erstmalig verwendete Alexander Ogston 1882 den Begriff *Staphylococcus* für aus Abszessen isolierte und im mikroskopischen Präparat traubenförmig erscheinende Bakterien (Ogston, 1882). Friedrich Julius Rosenbach adaptierte zwei Jahre später den Begriff als eine Gruppe mit erstmalig zwei verschiedenen Einzelarten, einem goldgelben, undurchsichtigen *S. flavus*/*S. aureus* und einer zweiten weißen, undurchsichtigen Kultur mit dem Namen *S. albus* (Rosenbach, 1884). 1891 erfolgte die Umbenennung in *Staphylococcus epidermidis albus*, weil er hauptsächlich als Einwohner der Haut zu finden war (Welch, 1891). 1908 bzw. 1924 fand er seinen endgültigen Namen als *S. epidermidis* (Evans, 1916; Winslow und Winslow, 1908). Heutzutage zählen zur Gattung der Staphylokokken 49 Spezies mit insgesamt 27 Subspezies (Euzéby, 1997; www.bacterio.net, 2015).

Staphylokokken werden durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase in Koagulase-positive, speziell beim Menschen mit humanpathogener Relevanz der *S. aureus*, oder Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) mit zum Beispiel *S. epidermidis* unterteilt (Chapman *et al.*, 1934; Loeb, 1903; Much, 1908; Sperber und Tatini, 1975).

S. aureus ist für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich, als Toxinbildner kann er bei Kindern und Neugeborenen das sehr imprägnante *Toxic shock syndrome* und

Staphylococcal scalded skin syndrome verursachen (Chuang *et al.*, 2005; Ladhani, 2001; Ladhani *et al.*, 1999). Außerdem kann er in unterschiedlicher Häufigkeit Erreger zum Beispiel einer Pustulosis, Zellulitis, Omphalitis, Funisitis, Pneumonie, Osteomyelitis oder Mastitis sein, sowie zu Augen-, Ohren-, Nasen- oder Halsinfektionen, zu Haut- bzw.- Brustabszessen oder wie auch *S. epidermidis* zu einer Endokarditis, ZNS-Infektion und vor allem Bakteriämie der Blutbahn führen (Nizet und Bradley, 2010).

Deutlich seltener und teilweise nischenspezifischer kommen auf der Haut von Menschen ebenfalls auch andere KNS wie zum Beispiel *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. horninis*, *S. pasteurii*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri* oder *S. xylosus* vor (Chesneau *et al.*, 1993; Freney *et al.*, 1988; Kloos und Bannerman, 1994; Kloos und Schleifer, 1975, 1983; Schleifer und Kloos, 1975).

Die beiden medizinisch relevantesten und am besten erforschten Staphylokokken sind *S. aureus* und *S. epidermidis*. Zweiter galt lange Zeit als harmloser, kommensaler Hautkeim, muss aber zusehends, neben seinem „böseren“ und deutlich virulenteren Cousin *S. aureus*, bei abwehrgeschwächter Lage oder Verletzung der Hautbarriere als „akzidenteller“, opportunistischer Krankheitserreger gesehen werden (Otto, 2009). Hier sind speziell künstlich eingebrachte Fremdkörper wie zum Beispiel Katheter oder Implantate eine ernstzunehmende Infektionsquelle (Fleer *et al.*, 1986; von Eiff *et al.*, 2005).

1.3. Klinische Relevanz von Koagulase-negativen Staphylokokken bei Neugeborenen

Schon 1967 wiesen Pulverer und Halswick darauf hin, „daß auch coagulase-negative Staphylokokken als Krankheitserreger in Erscheinung treten können“ (Pulverer und Halswick, 1967), aber erst in den ´80er und ´90er Jahren wurde mit der zunehmenden Beobachtung von resistenten, nosokomialen Erregern und des Fortschreitens von transienten oder permanenten medizinischen Hilfsmitteln, wie zum Beispiel Kathetern oder Prothesen, auch KNS als opportunistische Erreger verstärkt beachtet (Kloos und Bannerman, 1994). Heutzutage ist besonders *S. epidermidis* als Erreger für Katheter- und Fremdkörper-assoziierte Infektion gefürchtet (Guggenbichler *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2009; Rupp und Archer, 1994; Uçkay *et al.*, 2009).

Koagulase-negative Staphylokokken sind die am häufigsten isolierten, pathogenen Keime einer neonatologischen Intensivstation (NITS) und sind vor allem bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von < 1500 g (= *very low birth weight infants* = VLBW) der häufigste Erreger einer Infektion der Blutbahn (Härtel *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2012; Stoll *et al.*, 1996, 2002). Infektionen mit *S. epidermidis*, dem Hauptvertreter der KNS und zahlreichstem Bewohner der menschlichen Haut, werden am häufigsten beobachtet. Über Infektionen mit anderen KNS, die in Einzelfällen auch sporadisch auftreten können, wird nur zeitweise berichtet. So wurden zum Beispiel mehrfach Infektionen, speziell der Blutbahn, mit *S. capitis* bei Neugeborenen beschrieben (Cui *et al.*, 2012; Van Der Zwet *et al.*, 2002; Guen *et al.*, 2007; Rasigade *et al.*, 2012), aber auch *S. hominis* (Chaves *et al.*, 2005), *S. caprae* (Ross *et al.*, 2005) oder *S. warneri* (Center *et al.*, 2003; Cimiotti *et al.*, 2007) können endemisch als Sepsisverursacher auf einer NITS vorkommen.

1.4. Die neonatale Sepsis als Fremdkörper-assoziierte Infektion durch Koagulase-negative Staphylokokken

Sieben bis elf Prozent der Neugeborenen einer Intensivstation in Europa und den USA erleiden im Verlaufe ihres Aufenthaltes eine nosokomiale Infektion, die mit 70 %iger Wahrscheinlichkeit eine Bakteriämie der Blutbahn nach der 72. Lebensstunde ist (Raymond und Aujard, 2000; Sohn *et al.*, 2001). Etwa zur Hälfte wird diese Infektion durch KNS und als deren Hauptvertreter durch *S. epidermidis* verursacht (Verstraete *et al.*, 2014).

Die Infektionen sind vorwiegend Fremdkörper-assoziiert, beispielsweise durch eine Kontamination der Einstichstelle bzw. des Katheters und einer hauptsächlich intraluminalen Immigration der Bakterien in den Blutstrom (Garland *et al.*, 2008). Eine Infektionsquelle ist hierbei unter anderem durch das medizinische Personal einer NITS und einer damit verbundenen Neo-Kolonisation und sekundär endogenen Infektion gegeben. Verschiedenste Studien zeigen übereinstimmende Klonalitätsmuster zwischen der Handflora und dem Infektionsisolat (Bahr und Knobloch, 2014; Cimiotti *et al.*, 2007; Hira *et al.*, 2010).

Eine mögliche Penetration über die muköse Darmwand wird immer wieder kritisch in Betracht gezogen, konnte aber bisher nicht vollständig geklärt werden (Costa *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen bei Frühgeborenen beweisen, dass die entsprechenden KNS einer

neonatalen Sepsis vorher Bestandteil der Darmflora sein können (Soeorg *et al.*, 2013), die natürlich ebenfalls durch den Erstkontakt geprägt worden ist.

Die neonatale Sepsis ist eine schwerwiegende Komplikation für ein Neugeborenes und wird durch die Trennlinie von 72 Lebensstunden in eine *Early-Onset-Sepsis* (EOS) und eine *Late-Onset-Sepsis* (LOS) unterteilt (DGPI, 2013). Klinische Frühsymptome, wie zum Beispiel Atemstörungen, Temperaturunregelmäßigkeiten, Apathie oder Hyperexzitabilität, Trinkunlust, Gedeihstörung, aufgetriebenes Abdomen, Dyspepsie, Erbrechen, blassgraues Hautkolorit, Marmorierung, kalte Extremitäten, verlängerte Rekapillarisierungszeit, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Petechien, Purpura, Blutungsneigung oder Exsikkose, sind häufig sehr unspezifisch, daher ist das „wichtigste Frühsymptom einer beginnenden Sepsis (...) das von einer erfahrenen Kinderkrankenschwester gemeldete ‚schlechte Aussehen‘ des Neugeborenen“ (Maier *et al.*, 2011). Zur Vereinfachung der schwierigen Diagnosefindung und –sicherung lässt sich die Definition des Surveillance-Protokoll NEO-KISS des Robert Koch Instituts (RKI) verwenden (Tabelle Anhang-1). Vorrausschauend für eine LOS scheinen die vier Faktoren einer zusätzlich benötigten Atmungsunterstützung, eine verlängerte Rekapillarisierungszeit, ein graues bzw. blasses Hautkolorit und ein liegender zentraler Venenkatheter (ZVK) mit dieser zu assoziieren (Bekhof *et al.*, 2013).

Eine Infektion der Blutbahn mit KNS ist nahezu zwingend von einem Fremdkörper abhängig, um eine Überwindung der Hautbarriere zu ermöglichen und ist daher eher zu den nosokomialen LOS zu zählen. Eine Studie, die nur Bakteriämien mit KNS bei Neugeborenen analysierte, beobachtete ebenfalls allgemeine Symptome wie Apnoe, Bradykardie und bei über $\frac{3}{4}$ der Frühgeborenen einen erhöhten Sauerstoffbedarf oder sogar benötigte Beatmungsunterstützung, zudem waren als Laborparameter eine Leukopenie ($< 5.000 \text{ Zellen/mm}^3$) bei 12 %, eine Leukozytose ($> 30.000 \text{ Zellen/mm}^3$) bei 39 % und eine Thrombozytopenie ($150.000/\text{mm}^3$) bei 25 % der Kinder auffällig (Maayan-Metzger *et al.*, 2000).

Frühgeburtlichkeit, sehr geringes Geburtsgewicht (VLBW), das Vorhandensein eines ZVK oder parenterale Ernährung sind große Risikofaktoren für eine Sepsis (Perlman *et al.*, 2007; Raymond und Aujard, 2000; Sohn *et al.*, 2001; Stoll *et al.*, 2002). Persönliche Faktoren, wie das mütterliche Alter, der Ehestatus, die Schwangerschaftsfürsorge, die Anzahl der Geburten, Hypertension oder Präeklampsie, die Dauer der Membranruptur, Laborparameter, Geburtsart, vorherige Antibiotikagabe oder eine Steroidtherapie korrelieren dafür nicht mit dem Risiko. Einzig und allein das Geburtsgewicht und das

Gestationsalter haben Einfluss auf eine Infektion (Jean-Baptiste *et al.*, 2011; Stoll *et al.*, 2002). Neugeborene mit einem späteren Geburtstermin zwischen der 37.-42. Schwangerschaftswoche (SS) scheinen in diesen Fällen aufgrund ernsthafterer Komplikationen ebenfalls eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine KNS Infektion aufzuweisen, als eine Geburt zwischen der 34.-36. SS (Jean-Baptiste *et al.*, 2011). Insgesamt hat die LOS mit KNS eine sehr geringe Morbidität und Mortalität von etwa 1,9 bis 9 %, im Gegensatz zu Infektionen mit gram-negativen Bakterien oder Pilzen mit Mortalitätsraten bis in den hohen zweistelligen Prozentbereich (Isaacs, 2003; Makhoul *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2002). Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1.500 g oder Neugeborenen mit einem Geburtstermin unter der 29. Schwangerschaftswoche scheint die kindliche Entwicklung dann trotzdem mit einer schlechteren neurologischen Entwicklung assoziiert zu sein (Alshaikh *et al.*, 2014; Hentges *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2008; Stoll, 2004). Als weitere Morbidität können KNS bei persistierender Bakteriämie in bestimmten Fällen und auch ohne ZVK Versorgung eine transfusionsbedingte Thrombozytopenie auslösen (Khashu *et al.*, 2006). Außerdem gibt es Vermutungen und erste Beobachtungen, dass eine KNS-Sepsis bzw. Kolonisierung zwischen Chorion- und Amnionmembran zu einem erhöhtem Vorkommen von Bronchopulmonaler Dysplasie bzw. Infantiler Zerebralparese führen könnte (Liljedahl *et al.*, 2004; Mittendorf *et al.*, 1999, 2001).

Eine Sepsis hat zudem einschneidenden ökonomischen Einfluss auf das Gesundheitssystem. So verursachen Kinder mit einer Sepsis alleine in den USA Kosten von etwa \$ 1,7 bis \$ 4,8 Milliarden pro Jahr und sind besonders als Neugeborenes mit einem durchschnittlichen Aufenthalt von 43 Tagen und etwa \$ 75.000 für den extrem hohen Ressourcenverbrauch in der Gesundheitsversorgung verantwortlich, dieser steigt bei VLBW sogar noch auf 74 Tage und über \$ 116.000 an (Hartman *et al.*, 2013; Watson und Carcillo, 2005). Payne *et al.* berechneten für VLBW, dass eine Sepsis die Krankenhauskosten verdoppelt und bei einer LOS noch zusätzliche Kosten von \$ 12.4800 verursacht. Eine Infektion mit KNS kostet durchschnittlich \$ 102.150 und bedeutet eine Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes um vier bis sieben Tage (Payne *et al.*, 2004). Nach Schätzung ergeben sich daraus nur für die Behandlung nosokomialer Blutstrom Infektionen Ausgaben von 100 Millionen Dollar pro Jahr, dieses zeigt ein enormes Einsparpotential im Gesundheitssektor durch marginale Senkung der Infektionsrate (Payne *et al.*, 2004). Johnson *et al.* publizierten 2013 vergleichbare zusätzliche Kosten, die durch eine LOS zusätzlich verursacht werden können, von durchschnittlich \$ 10.055 bei VLBW,

die in der Gruppe der Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht <750 g sogar \$ 23.317 betragen kann (vergleichend zum Umrechnungskurs von 2009 und von Payne *et al.* ermittelten 16.068 Dollar) (Johnson *et al.*, 2013).

Besorgniserregend ist die immer stärker zunehmende Anzahl von antibiotikaresistenten Bakterien in den letzten Jahren, die eine Therapie zusätzlich erschweren. Von besonderer Gefahr für ein Krankenhaus und speziell einer NITS sind epidemische Ausbrüche nosokomialer Infektionen. Bei Staphylokokken werden diese häufig durch Verwendung von Antibiotika und deren Selektion oder durch Persistenz eines multiresistenten Klons hervorgerufen, die wahrscheinlich auch über Jahre bestehen bleiben können (Carlos *et al.*, 1991; Huebner *et al.*, 1994; Krediet *et al.*, 2004; Lyytikäinen *et al.*, 1995; Raimundo *et al.*, 2002; Villari *et al.*, 2000).

Die Therapie und Behandlung einer Sepsis bei Früh- und Neugeborenen ist aufgrund ihrer noch natürlichen Fragilität extrem vielschichtig und „hängt stark mit der speziellen ‚lokalen Flora‘ der jeweiligen Klinik zusammen, so dass bei der Auswahl einer empirischen antibiotischen Therapie sowohl die individuelle Besiedlung des Kindes als auch die in der Klinik häufig auftretende Flora einbezogen werden muss“ (Faust *et al.*, 2011).

Eine ZVK Infektion, wie auch die in der Neonatologie häufig verwendeten peripheren ZVKs, erfordert meistens das Wechseln bzw. Entfernen des Fremdkörpers (Tsai *et al.*, 2012). Verhinderung und Prophylaxe von nosokomialen Infektionen ist folglich der Anfang, gleichzeitig aber auch ein komplexes Ziel, dass häufig durch einfache Regeln wie zum Beispiel der Händedesinfektion, Einführung von Checklisten oder ähnlichen Maßnahmen zu erreichen ist (Newby, 2008; O’Grady *et al.*, 2011; Polin *et al.*, 2012; Schulman *et al.*, 2011; Suresh und Edwards, 2012).

1.5. Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika

Die bedeutendste Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken ist gegenüber den β -Laktam-Antibiotika. Bei einer Resistenz gegenüber Methicillin sind daher auf Grund der Kreuzresistenzen alle Antibiotika dieser Gruppe ebenfalls als resistent zu bewerten. In Deutschland ist anstelle von Methicillin das vergleichbare Isoxazolylpenicillin Oxacillin zugelassen. Ein resistentes Staphylokokken-Isolat gegenüber Methicillin bzw. Oxacillin

wird dementsprechend MRSE oder ORSE bezeichnet (= Methicillin- bzw. Oxacillin-resistenter *S. epidermidis*).

Mittlerweile sind über 74 % der weltweiten Infektionsisolate von KNS gegenüber Methicillin unempfindlich (Diekema *et al.*, 2001; Farrell *et al.*, 2011). Als Verursacher einer neonatalen Sepsis sind sogar zwischen 81 % und 95 % der KNS resistent (Widerström *et al.*, 2012a) und bei 70-92 % der Blutkulturisolate und bei 88 % der Kolonisationsisolate konnte ein molekularbiologischer Resistenznachweis mittels des *mecA* Gens nachgewiesen werden (Hira *et al.*, 2007; Krediet *et al.*, 2001, 2004).

Verantwortlich für die Resistenz ist das sogenannte *mecA* Gen, das für ein Penicillin Bindungsprotein (PBP2a) mit erniedrigter Affinität gegenüber β -Laktam-Antibiotika kodiert (Chambers *et al.*, 1985; Hartman und Tomasz, 1984). Dieses befindet sich auf einem mobilen, genetischen Chromosomenabschnitt, der so genannten *staphylococcal chromosome cassette mec* (*SCCmec*) (Katayama *et al.*, 2000). Bei *S. epidermidis* sind mittlerweile über 10 verschiedene *SCCmec* Strukturen bekannt, die häufigste und kleinste ist *SCCmec* Typ IV (Jamaluddin *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2002; Miragaia *et al.*, 2005; Rolo *et al.*, 2012). Sie enthält nur Resistenz gegenüber β -Laktamen und nicht gegenüber anderen Antibiotika und stellt daher auch keinen Fitnessvorteil für das Bakterium dar (Diep *et al.*, 2008). Verwandte Stämme können interessanterweise verschiedene *SCCmec* Typen haben, welches dafür spricht, dass *S. epidermidis* oftmals das *SCCmec* Element verlieren oder erwerben kann (Miragaia *et al.*, 2005).

SCCmec kann auch ein *PSM-mec* (*phenol soluble modulin*) Gen mit den typischen, proinflammatorischen, chemischen, und zytolytischen Eigenschaften der PSM Familie enthalten und damit Antibiotikaresistenz und Virulenzeigenschaften erstmalig kombinieren und horizontal gentransferieren (Queck *et al.*, 2009).

Der nur einseitige Weg des Austauschs von mobilen genetische Elementen wie zum Beispiel der *SCCmec* Kasette von *S. epidermidis* zu *S. aureus* (Diep *et al.*, 2006; Hanssen *et al.*, 2004) lässt sich vermutlich auf das Vorhandensein von CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Jansen *et al.*, 2002) in *S. epidermidis* (Marraffini und Sontheimer, 2008) und dem Fehlen in *S. aureus* zurückführen (Otto, 2009). CRISPR sind Abschnitte sich wiederholender DNA von 23-47 Basenpaaren, die im Erbgut von vielen Bakterien und Archaeen zu etwa 48 % bzw. 86 % zu finden sind (Grissa *et al.*, 2007; <http://crispr.u-psud.fr/>, 2012). Sie bilden einen Mechanismus, der Resistenz

gegen das Eindringen von fremdem Erbgut durch Viren oder Plasmide verschafft und sind hierdurch vergleichbar mit dem Immunsystem von Prokaryoten (Barrangou *et al.*, 2007).

1.6. Epidemiologie von *S. epidermidis*

Eine kleine klonale Gruppe von hauptsächlich methicillinresistenten KNS ist wahrscheinlich für die Mehrheit der Bakteriämien bei Neugeborenen ursächlich und deren Verteilung über Neugeborene, Personal oder Objekten des Behandlungsraumes lassen eine Kreuzkontamination vermuten (Carlos *et al.*, 1991; Huebner *et al.*, 1994; Krediet *et al.*, 2001, 2004; Lyytikäinen *et al.*, 1995; Raimundo *et al.*, 2002; Villari *et al.*, 2000). Die Herkunft dieser klonalen Linien ist größtenteils immer noch ungeklärt. Es scheint aber Unterschiede in der Kolonisierung von Patienten eines Krankenhauses im Gegensatz zu gesunden Personen zu geben (Rohde *et al.*, 2004). Zudem sind vermutlich eine begrenzte Anzahl von Klone für eine Vielzahl von Fremdkörper-assoziierten Infektionen verantwortlich (Kozitskaya *et al.*, 2005). Diese speziell adaptierten Stämme sind selten außerhalb des Krankenhauses zu finden und können vermutlich Patienten direkt nach Krankenhausaufnahme kolonisieren und ggf. zu einem späteren Zeitpunkt zur einer Infektion führen (Kozitskaya *et al.*, 2005).

Bestimmte Klone von *S. epidermidis* sind also geographisch übergreifend in Krankenhäusern als nosokomiale Erreger, aber teilweise auch in der Gesellschaft ohne Kontakt zur medizinischen Versorgung, zu finden (Miragaia *et al.*, 2002; Rolo *et al.*, 2012) und werden ggf. gegenseitig übertragen oder wahrscheinlich durch das Krankenhaus selektioniert. Eine Studie über Umwelt- und Krankenhausisolate der Arbeitsgruppe von Prof. Knobloch konnte ebenfalls den Nachweis von Krankenhaus-assoziierten Klonen bei KNS erbringen (Hercun, 2011).

Verschiedenste Methoden sind zur Untersuchung der Klonalität bei KNS bekannt (Widerström *et al.*, 2012b). Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gilt als Goldstandard und ist die Methode mit der größten Sensitivität. Mit einer Diversitätserkennung von 89,7 % und am besten geeignet zur Untersuchung und Vergleichbarkeit der weltweiten Klonalität von *S. epidermidis* ist aber das *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) (Miragaia *et al.*, 2007, 2008). Hierbei werden sieben verschiedene und essentielle Genloci mit jeweils einer Länge von 450-500 Basenpaaren des Bakteriums sequenziert, mit der MLST-Datenbank abgeglichen und aufgrund der ermittelten Sequenznummer der

unterschiedlichen Allele ein Sequenztyp (ST) zum Vergleich ermittelt (Maiden *et al.*, 1998). Für *S. epidermidis* werden heutzutage die Genorte *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyR*, *tpi* und *yqiL* verwendet (Thomas *et al.*, 2007).

Miragaia *et al.* postulierten 2007, dass *S. epidermidis* wahrscheinlich vergleichbar zu *S. aureus* (Oliveira *et al.*, 2002) eine charakteristische Epidemiologie hat und nach damaligen Kenntnisstand neun prädominante Klone (ST 2, 59, 23, 10, 22, 40, 5, 20, 89) durch Rekombination von genetischen Elementen durch horizontalen Gentransfer wohl prädisponieren (Miragaia *et al.*, 2007).

Mittlerweile sind punktuell verschiedene *S. epidermidis* Isolate als direkte Infektionserreger analysiert worden und es scheinen in bestimmten Krankenhäusern zum Beispiel in Australien die multiresistenten ST 2 zu 85,2 %, ST 5 und ST 23 zu je 7,4 % (Widerström *et al.*, 2012a), in Nordeuropa ST 2 und ST 215 (Widerström *et al.*, 2009) oder in den USA ST 5 zu 21,1 % und ST 2 zu 16,9 % (Mendes *et al.*, 2012) zu prädisponieren (genauere Informationen siehe MLST Datenbank (www.mlst.net, 2014)). Eine systematische und spezifische Untersuchung für Bakterien in einer neonatologischen Umgebung ist bisher nicht erfolgt.

1.7. Virulenzfaktoren von Koagulase-negativen Staphylokokken

Für das bivalente Verhalten von *S. epidermidis* als harmloser Hautkeim oder andererseits als Fremdkörper-assoziiierendes Bakterium werden unterschiedlichste Begabungen der Anpassung und Interaktion gegenüber der Umwelt und dem eigenen menschlichen Körper benötigt, ein Beispiel hierfür ist, die Fähigkeit Biofilme bilden zu können.

1.7.1. Biofilmbildung

Biofilme sind von Bakterien gebildete, auf Oberflächen anhaftende, und in eine extrazelluläre Matrix eingebettete Konglomerate, die Schutz vor Antibiotika und Mechanismen des eigenen, abwehrenden Immunsystems bieten können (Costerton *et al.*, 1995, 1999). Dieses Wachstumsverhalten wurde erstmalig von Arthur T. Henrici 1933 anhand nicht planktonischer, sondern an Oberflächen gebundener, wachsender Wasserbakterien beobachtet und beschrieben (Henrici, 1933). Die Biofilmbildung ist ein einzigartiges und integrales Charakteristikum von vielen verschiedenen Prokaryonten

(Hall-Stoodley *et al.*, 2004) und konnte schon an über 3,2 Mrd. Jahren hydrothermalisch alten Formationen in Afrika nachgewiesen werden (Westall *et al.*, 2001).

Der Ablauf einer Biofilmbildung wird in drei Phasen eingeteilt (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). In der ersten Phase kommt es zur Anheftung von planktonischen Bakterien an eine Oberfläche, die sich im zweiten Schritt zu mehreren Schichten anlagern und so eine Reifung zum Biofilm erfolgen kann. Diese morphologische Veränderung wird auch in der Struktur, vergleichbar mit einem „Schwamm/ Pilz“ oder „Standbild“, sichtbar (Mack *et al.*, 2007). Anschließend erfolgt in der letzten Phase die Auslösung einzelner Bakterien und Zellen des Biofilms in das Umfeld und der ganze Zyklus kann von vorne beginnen (Abbildung 1-2).

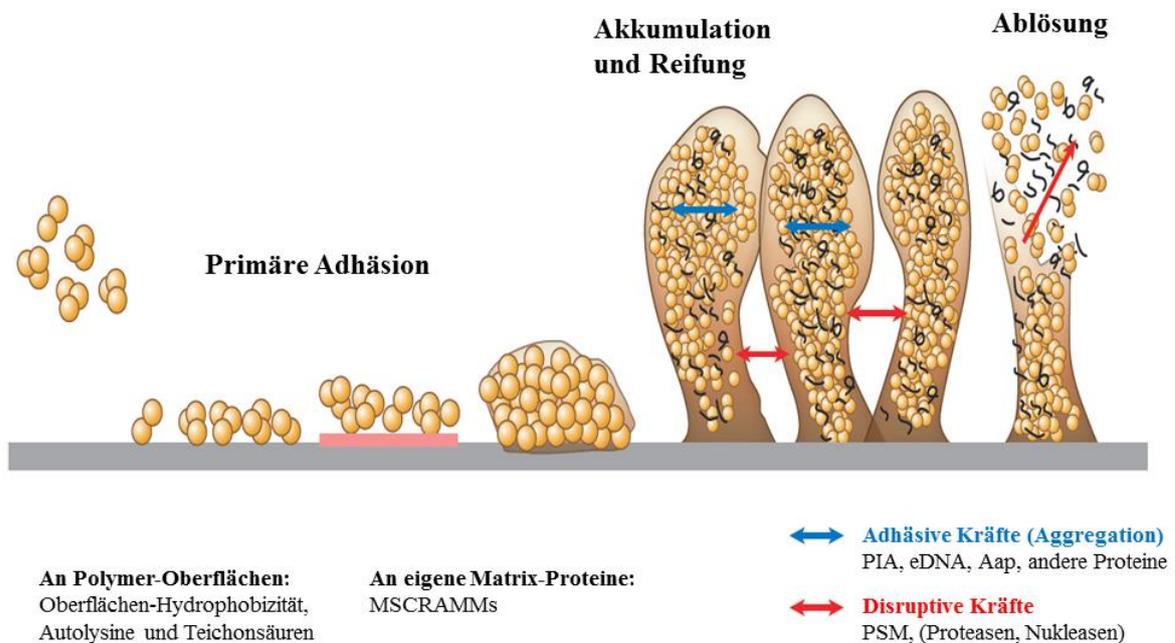


Abbildung 1-2: Phasen der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (nach Otto, 2013)

Die Biofilmbildung ist in die drei Phasen der Primären Adhäsion, der Akkumulation und Reifung sowie der Ablösung eingeteilt und von verschiedenen Faktoren, Proteinen oder Kräften abhängig.

1.7.1.1. Primäre Adhäsion

Biofilme benötigen Fähigkeiten der Anhaftung an abiotische Oberflächen wie zum Beispiel an Katheter oder für die eigene Zell-Zell-Interaktion im Biofilm. Die Anheftung an Oberflächen ist durch die Oberflächenhydrophobizität bedingt (Vacheethasane *et al.*, 1998) und wird durch Oberflächenproteine wie AtIE (Heilmann *et al.*, 1997) und Bap

(Tormo *et al.*, 2005), die vermutlich zur Hydrophobizität beitragen (Otto, 2009), unterstützt. Aap kann zudem über seine terminale A Domäne direkt an Korneozyten der Haut binden (Macintosh *et al.*, 2009).

S. epidermidis besitzt viele weitere Oberflächenproteine, den *MSCRAMMs* (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Patti *et al.*, 1994), die mit Matrixproteinen wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, etc. oder direkt über Sortase A (SrtA und/ oder SrtC) (Mazmanian *et al.*, 1999; Sibbald *et al.*, 2012) mit der Bakterienoberfläche oder teilweise noch ungeklärt über Teichonsäuren der Bakterienzellwand (Navarre und Schneewind, 1999) interagieren können (Tabelle 1-1). Viele sind bisher in ihrer Funktion noch nicht vollständig verstanden und erforscht worden.

Tabelle 1-1: Extrazelluläre Matrix bindende Oberflächenproteine bei *S. epidermidis*

Adhäsionsmolekül	Bindungspartner	Referenz
AtIE AAe	Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen und abiotische Oberflächen	Heilmann <i>et al.</i> , 1997 Heilmann <i>et al.</i> , 2003
SdrG, vorher Fibrinogen- bindendes Protein (Fbe)	Fibrinogen	Hartford <i>et al.</i> , 2001; Nilsson <i>et al.</i> , 1998
SdrF	Kollagen	Arrecubieta <i>et al.</i> , 2007; McCrea <i>et al.</i> , 2000
SdrH		McCrea <i>et al.</i> , 2000
Embp	Fibronectin	Williams <i>et al.</i> , 2002
GehD	Kollagen	Bowden <i>et al.</i> , 2002
Teichonsäure	Fibronectin und abiotische Oberflächen	Hussain <i>et al.</i> , 2001

1.7.1.2. Akkumulation und Reifung

Die Aggregation des Biofilms geschieht durch Oberflächenproteine wie beispielsweise Aap (Banner *et al.*, 2007; Conrady *et al.*, 2008; Rohde *et al.*, 2005) und unter Zuhilfenahme von Teichonsäuren (Holland *et al.*, 2011; Sadovskaya *et al.*, 2005) und extrazellulärer DNA (eDNA) (Qin *et al.*, 2007). Viele *S. epidermidis* Stämme produzieren ein *poly-N-acetyl glucosamine* (PNAG), oder auch *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) genannt, das *S. epidermidis* Zellen umgibt und verbindet (Mack *et al.*, 1996).

Kodiert wird dieses durch das *intercellular adhesion* Operon (*ica* Operon) (Heilmann *et al.*, 1996). *IcaA* und *IcaD* produzieren eine Kette von aktivierten N-acetylglucosamin Monomeren, die durch einen *IcaC* abhängigen Transporter nach außen transportiert werden (Gerke *et al.*, 1998). *IcaB* vermittelt nach Ausschleusung aus dem Zellinneren eine Deacetylation, die für die biologische Form der Biofilmformation und Immunevasion wesentlich ist (Vuong *et al.*, 2004a). Die Reifung des Biofilms geschieht dann durch Zusammenlagerung mehrerer dieser Schichten und ist ebenso wie die Produktion von PIA von einer Vielzahl von Virulenzregulatoren abhängig und teilweise noch unverstanden (Cue *et al.*, 2012).

Es hat sich gezeigt, dass PIA nicht der einzige Weg der Biofilmmakkumulation ist (Kogan *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2005). In einigen Fällen wird die Biofilmbildung durch die Oberflächenproteine Aap (Rohde *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005) oder Embp (Christner *et al.*, 2010) vermittelt. Vermutlich sind beide Wege bei der Biofilmbildung von *S. epidermidis* beteiligt, wobei die Protein vermittelte Biofilmbildung ohne PIA-Beteiligung schwächer zu sein scheint (Rohde *et al.*, 2007).

1.7.1.3. Ablösung

Der Prozess der Ablösung ist noch weitgehend unerforscht. Vermutlich ist aber das *quorum sensing system agr* (*accessory gene regulator*) von *S. epidermidis* in der Ablösungsphase von großer Bedeutung (Vuong *et al.*, 2003, 2004b, 2004c). Es werden zwei verschiedene Prozesse der Biofilmbilösung vermutet: Einerseits ein enzymatischer Abbau und andererseits eine Spaltung der nicht-kovalenten Verbindungen durch ein Detergenzmolekül (Otto, 2009), wie zum Beispiel durch die *phenol-soluble modulins* (PSMs) (Kong *et al.*, 2006; Mehlin *et al.*, 1999). Enzymatische Ablösungen und Biofilmbeteiligung wurden bisher nur für Proteasen oder Nukleasen *in vitro* für *S. aureus* beschrieben (Beenken *et al.*, 2012; Boles und Horswill, 2008; Kiedrowski *et al.*, 2011) und haben wahrscheinlich *in vivo* keine Relevanz und Beteiligung (Otto, 2013). Für die grenzflächenaktiven Substanzen der PSM-Familie, die *agr* vermittelt reguliert werden (Vuong *et al.*, 2004b), konnte dagegen bei *S. epidermidis* durch PSM β eine direkte Beteiligung an der Biofilmbilösung nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2011). PSM β ist der bisher einzige *in vitro* nachgewiesene Faktor, der an Ablösung und Verbreitung vom *S. epidermidis*-Biofilmkomplex beteiligt ist und dessen Familie wahrscheinlich noch an vielen weiteren Prozessen der Biofilmbildung oder Staphylokokkenphysiologie teilnimmt

(Otto, 2013). Neben der Streuung von Bakterien im Rahmen des Ablösungsprozesses können Mikroorganismen auch kontinuierlich aus dem Biofilm in den Blutkreislauf abgegeben werden und zu einer chronischen Septikämie und Infektion von weiteren Organen oder medizinischen Fremdkörpern führen (Mack *et al.*, 2007).

1.7.2. Bedeutung der Biofilmbildung

Biofilme schützen Bakterien, vergleichbar mit einem wasserabweisenden Regenmantel, vor dem menschlichen Immunsystem oder Antibiotika und können so Inflammation und Phagozytose verringern (Thurlow *et al.*, 2011). Je nach Beschaffenheit kann dieser aber auch anfällig und durchlässig gegenüber Leukozyten und deren Phagozytose sein (Günther *et al.*, 2009; Leid *et al.*, 2002). Die Diffusion von bestimmten Antibiotika in einen Biofilm kann ebenfalls erschwert sein (Mah und O’Toole, 2001), so dass zum Beispiel Rifampicin, die Chinolone und je nach Studienlage Vancomycin, Daptomicin oder die Aminoglykoside sehr gut, im Gegensatz zu den β -Laktam-Antibiotika wie Oxacillin oder Cefotaxim, in einen Biofilm hineindiffundieren und diesen zersetzen können (Dunne *et al.*, 1993; Knobloch *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2010).

Wenn nicht alle Bakterien in einem Biofilm durch eine Antibiotikatherapie vollständig eliminiert werden können, (Lin *et al.*, 2013) sind übriggebliebene bzw. persistierende Bakterien eine weitere Gefahr und ein Hauptgrund für ein erneutes Aufflammen von chronischen Infektionen (Lewis, 2010). Sie werden als Persister bezeichnet und sind multiresistente Bakterien, die Schutz gegenüber Antibiotika nicht durch Expression oder Benutzung von Resistenzmechanismen, sondern eine hohe Toleranz durch den ruhenden und nicht proliferativen Zustand aufweisen können (Lewis, 2007).

Das Phänomen der Persistenz wurde erstmalig 1944 von Joseph Bigger bei *S. aureus* beschrieben (Bigger, 1944). Heutzutage ist bekannt, dass viele Bakterien oder Pilze wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* oder eben *S. aureus* die Fähigkeit der Persistenzbildung mit teilweiser direkter Krankheitsmanifestation besitzen (Brooun *et al.*, 2000; Keren *et al.*, 2004a, 2004b, 2011; LaFleur *et al.*, 2006; LaFleur *et al.*, 2010; Moyed und Bertrand, 1983; Mulcahy *et al.*, 2010; Spoering und Lewis, 2001). 2011 wurde experimentell die Existenz von Persister bei *S. epidermidis* für Vancomycin und Levofloxacin nachgewiesen (Shapiro *et al.*, 2011), die aber grundsätzlich für alle anderen Antibiotika ebenfalls zu gelten scheint

(Lewis, 2010). Schematisch vorgestellt, werden hierbei die Bakterien innerhalb des Biofilms durch Antibiotikagabe und außerhalb ergänzend durch das Immunsystem eliminiert. Nur eine kleine Zellpopulation überlebt im Biofilm und kann bei Absinken der Antibiotikakonzentration zu einer erneuten Vermehrung und Infektion führen (Lewis, 2010) (Abbildung 1-3).

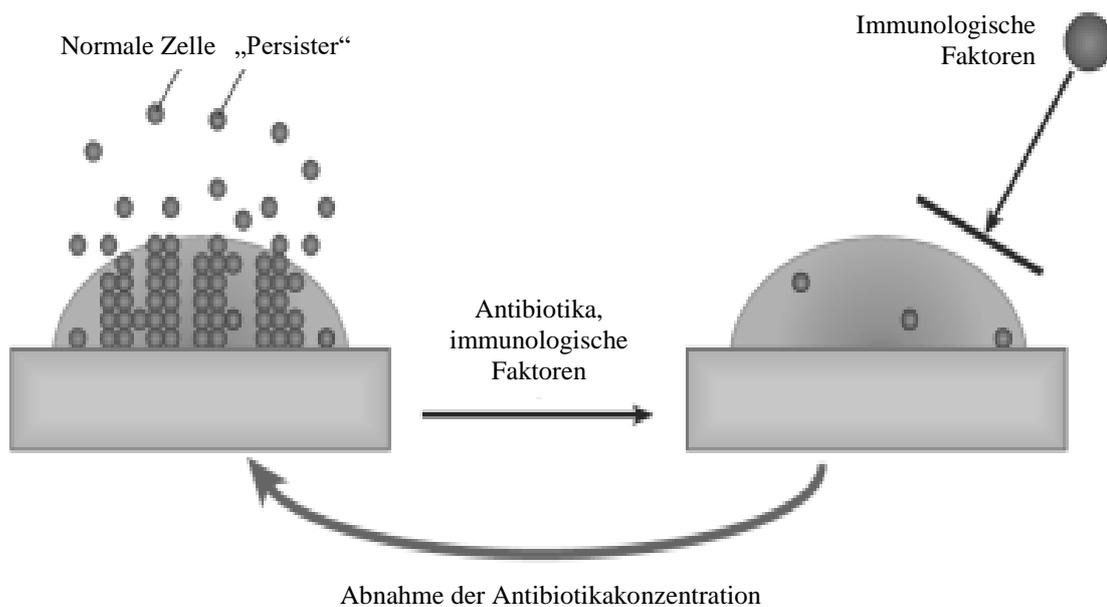


Abbildung 1-3: Schema einer Persister-Infektion (nach Lewis, 2010)

Der Biofilm dient als Schutzfunktion vor Antibiotika und dem Immunsystem und verhindert eine vollständige Elimination aller Bakterien, so dass übriggebliebene bzw. persistierende Bakterien nach einem Absinken der Antibiotikakonzentration sich erneut vermehren und zu einer Infektion führen können.

Bei Chinolonen hat sich für *S. epidermidis* gezeigt, eine Persisterbildung ist schon durch die alleinige Adhärenz an Oberflächen, ebenso wie bei planktonischen Zellen, auch ohne nachfolgende Biofilmbildung möglich (Knobloch *et al.*, 2008). Eine einfachere, alternative Theorie wäre also, dass *in vivo* eine kleine Anzahl von Bakterien nicht eliminiert werden kann (Lewis, 2010). Persister entstehen wahrscheinlich durch eine Vielzahl unabhängiger und parallellaufender Mechanismen, die größtenteils noch unverstanden sind (Lewis, 2010).

Zusätzlich können von *S. epidermidis* gebildete Biofilme durch eine Veränderung der Gen-Expression ihren Stoffwechsel oder andere Zellprozesse herunterregulieren und auf diese

Weise Schutz vor Antibiotika und dem Immunsystem bewirken, aber dementsprechend auch eine persistierende und chronische Infektion ermöglichen (Yao *et al.*, 2005). Andererseits werden zur Anpassung von den Bakterien des Biofilms vorhandene Kanäle und Transportsysteme gegen erhöhte Salzkonzentrationen der Haut oder osmotischen Drucks stärker expremiert (Gill *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). Das biofilmbildende *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) hat bei *S. epidermidis* zusätzlich zur Funktion der Bildung einer extrazellulären Matrix auch die Fähigkeit als Exopolymer vor Neutrophilen durch Beeinflussung der Komplementablagerung von C3b und Immunglobulin G (IgG) auf der Bakterienoberfläche oder vor antimikrobiellen Peptiden (AMPs) zu schützen (Kristian *et al.*, 2008; Vuong *et al.*, 2004d).

1.7.3. Interaktionen von *S. epidermidis* mit dem menschlichen Immunsystem und der menschlichen Haut

1.7.3.1. Abwehrmechanismen der Haut gegenüber *S. epidermidis* durch antimikrobielle Peptide

Die oberste Hautschicht mit den Keratozyten überwacht durch *pattern recognition receptors* (PRRs) permanent die Oberfläche und erkennt *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), bestimmte charakteristische Bestandteile von Mikroorganismen wie zum Beispiel Pektidoglykane oder Lipoteichonsäuren bei grampositiven Bakterien. Die Aktivierung von PRRs bewirkt eine Aktivierung des Immunsystems und eine Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), Zytokinen und Chemokinen (Grice und Segre, 2011). AMPs sind gewöhnlich aus 10-50 Aminosäurenresten bestehende, keine biologische Aktivität mehr besitzende, aber über positive Ladung verfügende Peptide, die eine relative Hydrophobizität und amphipatische Struktur haben und darüber ihre spezifische Wirkung ausüben können (Nakatsuji und Gallo, 2011). Sie können nach Versagen der physikalischen Hautschicht Bakterien, Pilze oder Viren direkt töten oder in der lokalen Entzündungsantwort interagieren und zelluläre und angepasste Mechanismen des Immunsystems aktivieren (Braff *et al.*, 2005). Aber erst bei einer Penetration der epidermalen Barriere kann *S. epidermidis* im Gegensatz zu *S. aureus* eine Inflammation der Keratinozyten auslösen (Duckney *et al.*, 2013). Es ist immer noch unklar, wie genau die AMPs Mikroorganismen attackieren und töten können, vermutlich geschieht dieses unter anderem durch eine zytolytische Porenbildung der Zellmembran (Brogden, 2005;

Wimley, 2010). Die erste Beschreibung, dass der Körper Substanzen produziert, die eine antimikrobielle Wirkung haben, ist über 90 Jahre her. Alexander Flemming konnte 1922 nachweisen, dass Schleim aus der Nase von verschnupften Menschen, Bakterienwachstum hemmt. Diese Substanzen, die er Lysozym nannte, konnte er auch in anderen Körperflüssigkeiten, Geweben von Tieren und Pflanzen und vor allem Eiweiß nachweisen (Fleming, 1922). Zurzeit kennt man über 2.000 verschiedene AMPs von Tieren, Menschen, Pflanzen, Bakterien, Pilzen oder synthetisch hergestellten Peptiden (Wang und Wang, 2004; Wang *et al.*, 2009). Die Hoffnung der nächsten Jahre ist, AMPs als therapeutisches Medikament zur Behandlung von Infektionskrankheiten und als Antibiotikaalternative nutzen zu können (Brogden und Brogden, 2011).

1.7.3.2. Abwehrmechanismen von *S. epidermidis* gegenüber antimikrobieller Einflüsse der Haut

Auch Bakterien und besonders *S. epidermidis* können AMP ähnliche Substanzen, so genannte Bakteriozine, bilden, die hemmend gegenüber ähnlichen Mikroorganismen wirken (Christensen und Brüggemann, 2013; Cotter *et al.*, 2013). Durch *S. epidermidis* produzierte Bakteriozine können zum Beispiel eine Adhäsion an Kathetern vermindern oder haben eine hemmende Aktivität gegenüber anderen *S. epidermidis*-, multiresistenten *S. aureus*-Stämmen oder Vancomycin-resistenten Enterokokken (Fontana *et al.*, 2006; Sandiford und Upton, 2012).

S. epidermidis kann außerdem wie *S. aureus* ein äußerst starkes, zytolytisches PSM δ produzieren, weist aber im Gegensatz zu *S. aureus* nur äußerst schwache Fähigkeiten der Zytolyse von menschlichen Neutrophilen auf, zudem haben PSMs und speziell PSM δ die Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren (Cheung *et al.*, 2010, 2012). Einige PSMs wie PSM δ und PSM γ zeigen mit AMPs vergleichende Interaktionen und können so direkt Einfluss auf die Hautkolonisation nehmen (Cogen *et al.*, 2010a). δ -Toxin von PSM γ kooperiert sogar mit AMPs und fördert Neutrophile bzw. deren bakterio-statische Wirkung im Blut, um andere Bakterien wie zum Beispiel explizit *Streptococcus A* zu töten (Cogen *et al.*, 2010b). Ferner besitzt *S. epidermidis* wohl die Fähigkeit durch Glycerolfermentation Einfluss auf die Kolonisation mit *Propionibacterium acnes* und damit auf die Aknebildung ausüben zu können (Wang *et al.*, 2014).

Die Abwehr von AMPs durch *S. epidermidis* geschieht unter anderem durch das drei Komponenten Sensor/Regulator System *apsRSX* (*antimicrobial peptide sensor*), das eine schützende negative Ladung durch Teichonsäuren und Phospholipiden der Zellmembran und ein Transportmechanismus gegen AMPs aufrecht erhält (Li *et al.*, 2007). Genauso kann das Exoenzym *SepA* von *S. epidermidis* AMPs (Dermcidin) proteolytisch abbauen (Lai *et al.*, 2007). Andererseits kann *S. epidermidis* im Gegensatz zu anderen Bakterien über ein Lipopeptid (LP01) und den Toll-like-Rezeptor 2 (TLR) die Produktion von AMPs der Keratinozyten steigern und auf diese Weise die Hautkolonisation zum Beispiel durch *S. aureus* oder *Streptococcus A* beeinflussen (Lai *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Außerdem trägt es zur Heilung bei Hautverletzungen bei, indem es durch Lipoteichonsäuren über eine negative Regulation mittels TLR-2, den für die Inflammation verantwortlichen TLR-3 von Keratinozyten herunterregulieren kann (Lai *et al.*, 2009). Esp als weiteres Exoenzym hat ebenfalls die Fähigkeit Fibrinogen, Komplementfaktor C5 oder andere Proteine abzubauen, *in vivo* die Biofilmbildung von *S. aureus* zu verhindern bzw. zu zerstören, sowie seine Empfindlichkeit gegenüber dem Immunsystem zu erhöhen, so dass letztendlich eine nasale *S. aureus* Kolonisation verhindert werden kann (Dubin *et al.*, 2001; Iwase *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2001; Sugimoto *et al.*, 2013). Das Komplementsystem selber scheint eine genregulatorische Rolle auf das Mikrobiom der Haut auszuüben. Eine Inhibition des C5a Rezeptors führt zu einer Veränderung und Diversitätsreduzierung der Mikrobiomzusammensetzung und Reduzierung eines proinflammatorischen Effektes und Zellzusammensetzung, wie einer Runterregulierung von AMPs, Cytokinen, Chemokinen und PRRs (Chehoud *et al.*, 2013).

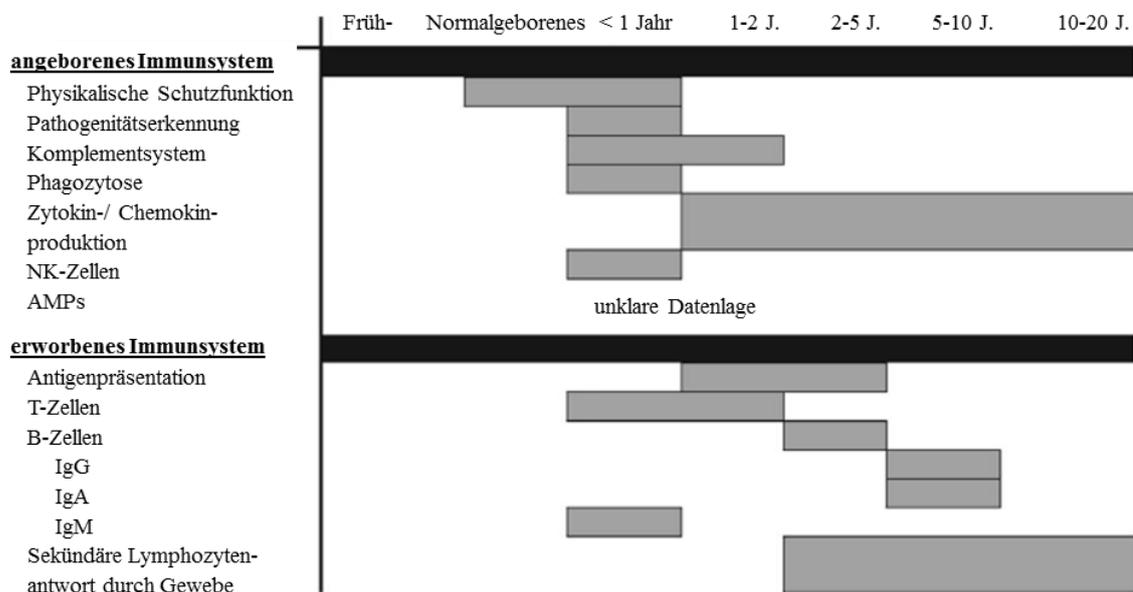
Neben PIA ist *poly-γ-DL-glutamic acid* (PGA) ein zweites Exopolymer, dass von *S. epidermidis* in nur sehr geringen Mengen gebildet werden kann und vor AMPs, neutrophiler Phagozytose und hohen Salzkonzentrationen der Haut schützen kann (Kocianova *et al.*, 2005). Obwohl PGA nicht mit der Biofilmbildung direkt zusammenhängt, wird es bei dieser durch Gen-Expression des *Cap*-Gens hochreguliert (Kocianova *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005).

1.7.3.3. Abwehrmechanismen des Immunsystems von Neugeborenen gegenüber *S. epidermidis*

Das angeborene Immunsystem mit dem (Haut-) Epithel, den Immunzellen und deren produzierten Chemokinen ist die erste Instanz bei der Abwehr von Mikroorganismen.

Sollte ein Bakterium die Hautbarriere überwinden, wird es meistens von Gewebsmakrophagen erkannt und phagozytiert, zudem wird eine kaskadenartige Produktion von Zytokinen ausgelöst. Anschließend wandern als zweite große Zellgruppe der angeborenen Immunantwort neutrophile Granulozyten aus der Blutzirkulation an den Ort des Geschehens und unterstützen die Infektionsabwehr (Mahlke *et al.*, 2009).

Neugeborene und insbesondere Frühgeborene haben ein größtenteils unausgereiftes Immunsystem, das nach der Geburt erst eine altersabhängige und äußerst komplexe Entwicklung durchlaufen muss (Abbildung 1-4) (Levy, 2007). Sie sind dementsprechend besonders anfällig für Infektionen.



Grau hinterlegt sind die Zeitpunkte, der vermuteten, vollständig erreichten Funktionsfähigkeit der dargestellten Komponenten im Vergleich zu einem Erwachsenen.

Abbildung 1-4: Entwicklung des Immunsystems beim Neugeborenen (nach Wynn, 2010)

Das angeborene und erworbene Immunsystem ist bzgl. der Funktionsfähigkeit bei Neu- und speziell Frühgeborenen noch unvollständig ausgeprägt und für Infektionen besonders anfällig. Erst im Laufe der Kindheit wird die vollständige Funktionsfähigkeit erreicht.

Chemokine und AMPs können eine wegweisende Verbindung zwischen angeborenen und angepassten Immunsystem sein (Levy, 2007). Die Käseschmiere bei Neugeborenen, die bei Frühgeborenen vermindert ist, und damit eine verringerte protektive Wirkung hat, enthält viele schützende und miteinander interagierende AMPs, Lipide und zahlreiche

andere Peptide gegen pathogene Mikroorganismen (Marchini *et al.*, 2002; Tollin *et al.*, 2005, 2006; Yoshio *et al.*, 2003). In den ersten Lebenstagen zeigt die Produktion von AMPs zusätzlich eine erhöhte Expression und ist damit mutmaßlich ein Kompensationsmechanismus während der Entwicklung des angepassten Immunsystems (Dorschner *et al.*, 2003)

Das häufig gebildete Neugeborenenexanthem (Harris und Schick, 1956) ist wahrscheinlich ein erstes sichtbares Zeichen einer Immunantwort auf die Kolonisation und Penetration von gram-positiven Bakterien wie KNS der Haarfollikel und Neugeborenenhaut (Marchini *et al.*, 2005). Eine solche Penetration kann zu einer Makrophageninfiltration, -aktivierung und -produktion von Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 führen, die normal ebenfalls verstärkt mit TNF α kurz nach Geburt beobachtet wird (Angelone *et al.*, 2006; Marchini *et al.*, 2000, 2001)

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Neugeborene aufgrund ihrer Unreife keine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Heutzutage ist bekannt, dass sie in der Lage sind, entzündungsfördernde Interleukine wie IL-6 und IL-8 zu produzieren (Schultz *et al.*, 2002). Diese erhöhte entzündungsfördernde Wirkung im Sinne eines *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) steht einer verminderten, entzündungshemmenden Wirkung entgegen und kann vermutlich zu schweren Krankheitsverläufen beitragen (Schultz *et al.*, 2004, 2007) oder auch eine infantile Zerebralparese verursachen (Yoon *et al.*, 2003). *S. epidermidis* verursacht *in vitro* nachgewiesen, ebenfalls eine gestationsaltersabhängige, proinflammatorische Immunantwort von IL-6 und TNF α , im Gegensatz zum anti-inflammatorischem IL-10 und TGF β (Härtel *et al.*, 2008). Normalgeborene Kinder zeigen eine zu Erwachsenen vergleichbare Immunantwort. Biofilmbildende, *ica* positive Biofilmisolate verursachen eine geringere IL-6 Antwort (Härtel *et al.*, 2008), was vermutlich auf die biofilmprotektiven Eigenschaften und damit deren möglichen Chronifizierung zurückzuführen ist. Vergleichbar zu Erwachsenen zeigen Neugeborene aber insgesamt eine schwächere Komplementaktivierung und damit eine eingeschränktere Abwehrmöglichkeit gegenüber der Biofilmbildung durch *S. epidermidis* (Otto, 2013).

Beim Erkennen und Beseitigen von *S. epidermidis* im Rahmen einer Infektion der Blutbahn ist unter anderem der TLR-2 mit einem Anstieg des IL-6 und TNF α und einer daraus resultierenden erhöhten Expression beteiligt (Kronforst *et al.*, 2012; Strunk *et al.*, 2010; Viemann *et al.*, 2005). Dessen Expression, Phagozytosekapazität und die

Möglichkeit der Bakterienelimination ist vergleichbar mit der von Erwachsenen, wohingegen die Zytokinantwort wieder vom Gestationsalter abhängig ist (Otto, 2013). Allgemein scheinen Immunzellen von Neugeborenen, zu Ungunsten des angepassten Immunsystems, qualitativ eine geringere Anzahl von Zytokinen zu produzieren, um quantitativ Abwehrmechanismen gegen extrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel AMPs besser unterstützen zu können (Kollmann *et al.*, 2009). Im Lungengewebe führt *S. epidermidis* im Gegensatz zu *S. aureus* sogar zu einer höheren IL-8 Expression und ist damit wahrscheinlich mitverantwortlich für die Bronchopulmonale Dysplasie (Ivarsson *et al.*, 2013).

Die Neutrophilen von Frühgeborenen haben außerdem eine reduzierte Fähigkeit KNS zu eliminieren (Schutze *et al.*, 1991) und deren oxidativen Burst an die Intensivität einer Bakterienstimulation anzupassen (Björkqvist *et al.*, 2004). Neuere Erkenntnisse belegen, dass bei ihnen wohl eine reduzierte Anzahl von Neutrophilen und Monozyten vorliegt, stattdessen aber eine höhere Phagozytosekapazität möglich ist und deren Immunschwäche mit noch weiteren Ursachen des inneren Immunsystems assoziiert sein muss (Prosser *et al.*, 2013). Das Immunsystem mit Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen besonders von Frühgeborenen kann dosisabhängig durch Lipide der parenteralen Ernährung und durch Bildung von Sauerstoffradikalen bei deren Akkumulation stark geschädigt werden (Andrew *et al.*, 1976; Avula *et al.*, 1999; Calder, 1997; Calviello *et al.*, 1999; Sweeney *et al.*, 2001, 2005; Wu *et al.*, 1999) und eventuell entzündungsfördernd durch Glukose und Lipide im Rahmen einer *S. epidermidis* Sepsis beeinflusst werden (Haase *et al.*, 2011).

1.8. Ableitung der Fragestellung

Die Epidemiologie der Hautkolonisation mit *S. epidermidis* und anderen KNS ist bisher unzureichend erforscht worden, obwohl sie eine riesige Eintrittspforte für einen Großteil der Fremdkörper-assoziierten Infektionen sein kann. Bestimmte Staphylokokken-Isolate sind hierfür aufgrund ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung besonders gefährlich.

Intensiv-medizinisch betreute Neugeborene haben ein besonders hohes Risiko zur Entwicklung von Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Die Tatsache, dass Neugeborene bei Geburt eine sterile Hautflora besitzen und die Erstkolonisation mit den ersten Lebenstagen beginnt, wirft viele Fragen über die unterschiedliche Kolonisation zwischen intensiv-medizinisch und direkt von den Müttern versorgten Neugeborenen, dem unterschiedlich pathogenen Potential der erstkolonisierenden Hautbesiedlung oder einer möglichen Dynamik in der Kolonisation auf.

Diese Dissertation versucht die Hautkolonisation mit Staphylokokken von Früh- und Neugeborenen in den ersten Lebenswochen zu erfassen, deren Pathogenitätsfaktoren und deren möglichen Klonalität zu beschreiben und diese in den zurzeit weltweit erforschten Komplex einzuordnen.

Folgende Hauptfragestellung sollte letztendlich mit dieser Dissertation gelöst werden:

Ist die Kolonisation ausgewählter pathogener *S. epidermidis* Isolate bei Früh- und Neugeborenen auch Teil der zurzeit bekannten und weltweit übergreifenden klonalen Verwandtschaften?

Zur Klärung dieser Thematik wurden schrittweise erstmalig die Fragestellungen und Problematiken zur Prävalenz der Kolonisation analysiert, bevor ausgewählte „pathogene“ *S. epidermidis* Isolate auf deren Klonalität untersucht werden konnten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Tabelle 2-1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Verwendung/ relevante Charakteristika	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Standard MALDI-TOF	Hanahan, 1985
<i>S. aureus</i> RN 4220	Standard PFGE	Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983
<i>S. aureus</i> (laboreigenes <i>mecA</i> positives Isolat U1341)	Standard <i>mecA</i> -PCR	
<i>S. epidermidis</i> B5800	Positives Blutkulturisolat vom Neugeborenen (Proband R) mit LOS vom 22.09.2010	
<i>S. epidermidis</i> 1457	Standard <i>icaA</i> -PCR	Mack <i>et al.</i> , 1992

Alle weiteren Bakterienisolate sind im Rahmen der Dissertation durch die Hautabstriche gesammelt worden und werden wegen der großen Anzahl nicht separat aufgezählt.

2.1.2. Antibiotika und Enzyme

Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika und Enzyme

Antibiotika und Enzyme	Konzentration	Hersteller
<u>Antibiotika:</u>		
Oxacillin Natriumsalz Hydrat VETRENAL		Sigma-Aldrich
<u>Restriktionsenzyme und -puffer:</u>		
<i>Sma</i> I und 10* Puffer Tango	10U/ μ l	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific
<u>weitere Enzyme:</u>		
Lysostaphin	1500 U/ ml	genmedics

Lysozym	≥ 40.000 U/ mg	Sigma-Aldrich
Proteinase K	20 µg/ µl	Invitrogen
10* DreamTaq DNA Polymerase, 10* DreamTaq Green Buffer und dNTP Mix, je 10mM	5 U/ µl	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific
AmpliTaq DNA Polymerase und 10* MgCl ₂ -Puffer 15 mM	5 U/ µl	Roche

2.1.3. Oligonukleotide

Tabelle 2-3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Referenz
<i>icaA</i> (U43336)	Forward: TCG ATG CGA TTT GTT CAA ACA T Reverse: CTG TTT CAT GGA AAC TCC	Rohde <i>et al.</i> , 2004
<i>mecA</i> (X52592)	Forward: GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT Reverse: GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT	
<i>Shikimate dehydrogenase</i> (<i>aroE</i>)	Forward: CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC Reverse: CAAGCGAAATCTGTTGGGG	
<i>Carbamate Kinase (arcC)</i>	Forward: TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG Reverse: TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	
<i>ABC transporter (gtr)</i>	Forward-3: CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT Reverse-3: GTGATTAAGGTATTGATTTGAAT	Thomas <i>et al.</i> , 2007
<i>DNA mismatch repair</i> <i>protein (mutS)</i>	Forward: GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA Reverse: GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	
<i>Pyrimidine operon</i> <i>regulatory protein (pyrR)</i>	Forward-2: GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT Reverse-4: GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	
<i>Triosephosphate isomerase</i> (<i>tpiA</i>)	Forward-2: ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC Reverse-2: TTAATGATGCGCCACCTACA	
<i>Acetyl coenzyme A</i> <i>acetyltransferase (yqiL)</i>	Forward-2: CACGCATAGTATTAGCTGAAG Reverse-2: CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon/ MWG-Biotec AG bezogen.

2.1.4. Kits

Tabelle 2-4: Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Diversilab <i>Recommendations for Mo Bio Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit</i>	DNA Isolation	bioMérieux
Diversilab <i>Staphylococcus Kit</i>	Amplifikation von DNA Fragmenten (rep-PCR)	bioMérieux
Diversilab <i>Lab Chip Devices</i>	Elektrophorese	Diversilab bioMérieux

2.1.5. Chemikalien und Medien

Tabelle 2-5: Verwendete Chemikalien und Medien

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Ameisensäure 70 %	Merck
<i>Aqua ad iniectabilia</i> , pH 5,0-7,0	Laboratori Diaco Biomedicali
Bacto Agar	BD (Becton-Dickinson)
Blutagarplatten: Columbia-Agar + 5% Schafblut	bioMérieux
Borsäure	Merck
CaCl ₂ (2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Merck
Casein	Merck
Cystein	Merck
DPBS <i>no Calcium, no Magnesium</i> (Gibco)	Invitrogen
EDTA <i>disodium salt</i>	Merck
Ethanol <i>absolute</i>	Geyer
Ethidiumbromid 1 %	Roth bzw. Fluka/ Sigma-Aldrich
Gentianaviolettlösung (Kristallviolett)	Medion Diagnostics
Glycerin 99,5 %	Carl Roth

Glycin	AppliChem
Isopropanol 70 %	Geyer
<i>Ladder Gel GeneRuler (1kb Plus DNA Ladder)</i>	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific
<i>Low Melt-Agarose peqGOLD</i>	peqlab
MgCl ₂ (6H ₂ O)	Merck
Mueller Hinton Agar Dicfo	BD
Na Desoxycholat	Merck
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	Merck
NaCl	Carl Roth
N-Lauroylsarkosin <i>Sodium Salt</i> 97%	Sigma-Aldrich
<i>pulsedField</i> Agarose peqGOLD	peqlab
Salzsäure 36,5 - 38 %	Sigma
TFA	Merck
Trismabase mind. 99,9% titration	Merck
TSB	BD
<i>Ultra Pure Water</i>	Biochrom
<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>	Fluka/ Sigma-Aldrich

Alle weiteren Chemikalien, Salze und Nährstoffe wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, von den Unternehmen Sigma, Merck, Carl Roth oder Fluka bezogen.

2.1.6. Einwegartikel und Verbrauchsmittel

Tabelle 2-6: Verwendete Einwegartikel und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
12 <i>well</i> Zellkultur Multiwell Platten <i>Cellstar</i>	Greiner Bio-One
96 <i>well</i> NunclonTMA Mikrotiterplatte	Nunc/ Thermo Fisher Scientific
Drigalski-Glas-Spatel	Carl Roth
Einmallösen 1 µl und 10 µl	Greiner Bio-One

Eppendorf Deepwell Plate 96/500µl	Eppendorf
Klebefolie	Neschen
Kryoröhrchen	Mast Diagnostica
Petrischale, quadratisch 120/120/17mm	Greiner Bio-One
Sigma-Transwab <i>Single</i> MW 176S (Abstrichtupfer)	Medical Wire & Equipment
Uvette	Eppendorf
Zapfenplatte (<i>Nunc Immuno TSP Polysorp</i>)	Nunc/ Thermo Fisher Scientific

2.1.7. Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2-7: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Brutschränke: Heraeus 25° und 56°C	Heraeus Binder
Brutschüttelschrank SM-30	Edmund Bühler
Diversilab	Agilent Bioanalyzer
Easy Step	Tri-Continent Scientific
Elektrophoresekammer	peqlab
Elektrophoresis <i>Power Supply</i> EV233	peqlab
Feinwaage AT261 Delta Range	Mettler Toledo
FlexCycler	Analytik jena
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C, <i>infinite M200 Microplate Reader</i>	Sanyo Tecan
Kühlschrank 4-8°C	Liebherr
Magnetrührer RMH	Gerhardt
MALDI-TOF-Metalltarget: <i>MSP 96 target polished steel</i>	Bruker Daltonics
MALDI-TOF MS <i>Microflex</i> LT	Bruker Daltonics
Mikrowelle	Bosch

NanoDrop	Thermo Fisher Scientific
NanoPhotometer P330	Implen
NucliSENS easyMAG plus Reagenzien EasyMAG <i>Magnetic Silica, Disposables, Lysis Buffer, Wash Buffers 1, 2 and 3, Biohit Pipette Tips</i>	bioMérieux
PFGE:	
Agaroseblockgießvorrichtung und Kamm: 15-Well Comb und Casting Stand	jeweils Bio-Rad
Gerät, Kammer und Kühlpumpe: CHEF DR® III Drive Module CHEF Electrophoresis Cell Kühlpumpe 1000 Mini Chiller	
pH Meter MP 200	Mettler Toledo
Präzisionswaage GJ	Kern
Precellys 24	peqlab
Ritips 5ml	Ritter
Schütteltische: KS 260 basic Polymax 1040KS 260	IKA Heidolph
Schüttelwasserbad 1083	GFL
SmartSpecPlus Spektrophotometer	Bio-Rad
Thermomixer comfort (1,5ml und MTP Aufsatz)	Eppendorf
Ultraschallbad Transsonic T460/H	Elma
UV Kamera System	Intas
UV Transilluminator: Fusion Fx7	Vilber Lourmat
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Vortex 3	IKA
Vortex Genie2	Scientific Industries
Vortex MS 3 basic	IKA
Zentrifugen: Biofuge pico	Heraeus

Eppendorf Zentrifuge 5418	Eppendorf
Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific

2.1.8. Lösungen und Puffer

Tabelle 2-8: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
ES-Lösung (pH 9,0)	0,5 M EDTA 10 % Laurylsarkosin
LMP Agarose	1,6% LMP in SE Puffer Aufkochen und einfrieren bzw. im Kühlschrank aufbewahren
Lysis-Lösung I	6 mM Tris-HCl (pH, 7,6) 1 M NaCl 100 mM EDTA (pH 7,5) 0,2 % Na-Desoxycholat 1 % Na-Lauroylsarkosin
MALDI-TOF-Matrix (gesättigte und im Ultraschallbad gelöste α -cyano-4- <i>hydroxycinnamic</i> Säurelösung)	α -Cyano-4-hydroxycinnamic-Säure 2,5 % TFA 50 % Acetonitril
PBS Puffer (pH 7,4)	136,89 mM NaCl ₂ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 2,68 mM KCl 6,46 mM Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)
DPBS	2,67 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,93 mM NaCl 8,08 mM Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O
SE-Puffer (pH 7,5)	75 mM NaCl 25 mM EDTA
TBE	90 mM Tris 90 mM Borsäure

	20 mM EDTA
TE-Puffer (pH 7,5)	10 mM Tris
	10 mM Na-EDTA

2.1.9. Nährmedien

Tabelle 2-9: Verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Casein Agar	Bacto-Agar 30 g/l TSB 60 g/l CaCl ₂ (2 H ₂ O) 1,47 g/l Cystein 0,242 g/l <i>Aqua dest.</i> ad 1L 20g Casein wurden in 1 Liter Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 8-10 eingestellt. Die Lösungen wurden separat sterilisiert. Anschließend wurde das Casein ca. 15 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend mit der anderen Lösung zusammengefügt.
Oxacillin-Screening Agar	Müller-Hinton Agar 38 g/l NaCl 40 g/l MgCl ₂ (6 H ₂ O) 0,21 g/l CaCl ₂ (2 H ₂ O) 0,18 g/l Nach 10 minütigem Quellen wurde die Lösung bei 121°C 15 Minuten autoklaviert und anschließend bei 50°C mit 6 µg/ml Oxacillin versetzt.
<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	TSB 30 g/l
TSA-Platten	TSB 30 g/l Bacto-Agar 15 g/l

2.1.10. Programme

Tabelle 2-10: Verwendete Programme/ Software

Programm/ Software	Hersteller
Diversilab <i>Web-Software Strain typing</i>	bioMérieux
i-control (1.8)	Tecan
Maldi Biotyper <i>flexControl-microflex</i> , <i>Biotyper Automation Control und Database</i> (ergänzend laboreigene Stammsammlung)	Bruker Daltonics
R - <i>A language and environment for statistical computing</i>	R Foundation for Statistical Computing
Vektor NTI	invitrogen
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation

2.2. Methoden

Für die Studie der Hautflorakolonisierung bei Neugeborenen im Krankenhaus wurden Staphylokokken mittels Hautabstrichen gewonnen und phänotypisch nach ihren Pathogenitätsfaktoren der Biofilmbildung und Oxacillinresistenz gescreent.

Ausgewählte *S. epidermidis* Isolate wurden anschließend durch Pulsfeldgelelektrophorese, der DiversiLab Methode oder durch MLST-Sequenzierung bzgl. ihrer Klonalität spezifischer untersucht.

2.2.1. Methodik des Hautkolonisationscreenings

Insgesamt wurde die bakterielle Kolonisation bei 71 Neugeborenen zwischen November 2009 und März 2011 untersucht (Abbildung Anhang-1). Alle Neugeborenen waren Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die Eltern wurden ärztlicherseits über die Studie aufgeklärt bzw. informiert. Es hat keine Ablehnung zur Teilnahme an der Studie gegeben. Die Ethikkommission der Universität zu Lübeck hat dieser Studie zugestimmt (Akten-Nr.: 12-134A, Klonale Analyse von *Staphylococcus epidermidis*).

Die Abstriche erfolgten zwischen der 60. Lebensstunde und dem fünften Tag nach der Geburt. 30 Neugeborene waren Patienten auf der Neugeborenenstation (16a) mit direktem Elternbezug und ohne längeren oder bedeutungswürdigen Kontakt zur Intensivstation. Hier wurden die Proben meistens im Rahmen der U2-Untersuchung genommen. Zum Vergleich wurde die Haut von 41 Früh- und Neugeborenen der Intensivstation (12n oder 49i) gescreent. Von der Auswertung wurden ausgeschlossen, Bakterien die nicht zur Familie der Staphylokokken gehörten oder Proben von Neugeborenen die weniger als 50 KNS-Isolate auf der Haut hatten. Die Abstrichregionen der Ellenbeuge und des Knöchels wurden zusammengezählt. Der Ausschluss erfolgte zur statistischen Korrektur der Gesamtanalyse, um den Einfluss der geringen und nicht repräsentativen Anzahl von zu wenigen Hautisolaten eines Kindes zu verringern.

Um die zeitliche Dynamik der Kolonisation zu erfassen, wurden zehn Neugeborene der Intensivstation wöchentlich bis zur Entlassung abgestrichen. Ab der achten Woche erfolgten die Abstriche im zwei und ab der zwölften Woche im vierwöchentlichen Rhythmus. Aufgrund dieser langen Zeitperiode wurden speziell Frühgeborene mit einer längeren Verweildauer im Krankenhaus ausgewählt, die zu Beginn auf der Intensivstation

und am Ende ihres Aufenthaltes meistens auf einer Neu- und Frühgeborenenstation (49f) betreut wurden.

2.2.1.1. Gewinnung und Anzucht der Bakterien

Die Hautbakterien wurden durch leichtes Drehen eines watteartigen Tupfers (Sigma-Transwab) von einem 2*2 cm großen Hautareal aus der Ellenbeuge und von der Knöchelinnenseite gewonnen. Die Materialgewinnung erfolgte gegenseitig zu ggf. liegenden medizinischen Zugängen oder ähnlichem und wurde nur bei adäquatem klinischem Gesamtgesundheitszustand des Kindes genommen. Nach Möglichkeit wurden kontralaterale Areale bevorzugt, bei den Langzeituntersuchungen wurde versucht, die gleiche Seitenlokalisation im Verlauf beizubehalten. Die Abstriche wurden durch meine Person oder nach mündlicher Einweisung durch Pflegepersonal, Ärzte oder in Ausnahmefällen den Eltern gewonnen. Zusätzlich wurde im Verlauf der Studie eine Kurzanleitung bzgl. der korrekten Abnahme beigelegt.

Bei kurzem Zeitverzug bis zur Weiterverarbeitung wurden die Tupfer im Transportröhrchen im Kühlschrank bei 4-8°C zwischengelagert.

Das gesamte Transportröhrchen mit Tupfer und Nährmedium wurde anschließend gevortext und die Flüssigkeit mit den gelösten Bakterien teilweise in Verdünnungsstufen bis 10^{-6} (Verwendung von 0,85 %iger NaCl-Lösung) auf Blutagarplatten ausgestrichen. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ über Nacht.

2.2.1.2. Isolierung der Bakterien

Von den Blutagarplatten wurden pro Abstrichregion mithilfe von 1 µl Einmalösen zufällig 120 einzelstehende Kolonien auf TSA-Platten isoliert. Bei weniger als 120 einzelstehenden Kolonien wurde die maximal vorhandene Anzahl gepickt. Die TSA-Platten wurden wie am Vortag über Nacht bebrütet.

2.2.1.3. Identifizierung der Bakterien

Die maximalen 240 Reinkulturen pro Abstrichzeitpunkt, jeweils maximal 120 Isolate aus der Ellenbeuge und von der Knöchelinnenseite, wurden mithilfe des MALDI-TOF Biotyper Systems bis zur Systematik des Artnamens identifiziert. Hierfür wurden sie mit

Einmalösen auf ein MALDI-TOF-Metalltarget gestrichen und mit 1 µl MALDI-TOF-Matrix übergossen. Zur Verbesserung der Identifizierung wurde teilweise 70 %ige Ameisensäure hinzugefügt. Als Referenz wurde standardmäßig der *E. coli* DH5α mitgeführt.

Pro Abstrichregion wurden maximal 96 zufällige KNS-Isolate phänotypisch weiteranalysiert, ggf. wurde zur Zielwerterreichung nachisoliert und -identifiziert. Aufgrund der besonderen klinischen Charakteristik wurden zufällig gefundene *S. aureus* Isolate mit in die Studie einbezogen.

2.2.1.4. Kultivierung der Bakterien in Flüssigkultur

Die jeweiligen maximalen 96 Staphylokokken pro Abstrichregion wurden in je 400 µl TSB Flüssigkultur einer 96er Eppendorf Deepwell-Platte überimpft und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für eine spätere erneute Untersuchung der analysierten Bakterien wurden diese bei -80°C kultiviert. Hierfür wurden die jeweiligen, restlichen 200 µl Flüssigkulturen der 96er Eppendorf-Deepwell-Platten mit jeweils 250 µl 60 %igem Glycerin vermischt, die Platte mit Plastikfolie abgeklebt und bei -80°C eingefroren. Das Auftauen erfolgte nach mikrobiologischen Standardkulturbedingungen mittels einer heißen Öse aus gefrorenem Zustand auf Blutagarplatten.

Für Proben mit häufigerem Gebrauch wurde im Verlauf die Langzeitstammerhaltung der Kryoröhrchen verwendet.

2.2.1.5. Biofilmtestung

Die Quantifizierung der Biofilmbildung wurde nach geringer Modifizierung nach der von Christensen 1985 beschriebenen Methode zur semiquantitativen Bestimmung der Adhärenz von Bakterien an Plastikoberflächen vorgenommen (Christensen *et al.*, 1985; Knobloch *et al.*, 2001).

Im Rahmen der **Screening-Methode** wurden 200 µl der über Nacht inkubierten Bakterienansätze in eine 96well Mikrotiterplatte (NunclonΔ) überführt. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Überimpfen (≈ 3 µl Bakterienansatz) unter Verwendung einer

Zapfenplatte (Nunc Immuno™ TSP Polysorp™) in die Testansätze mit jeweils 200 µl TSB oder 200 µl TSB_{EtOH}.

Nach Inkubation der ungeschüttelten Platten für 18 ± 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden die Biofilmansätze aus der Platte herausgeschlagen, jedes *well* viermalig mit 200 µl PBS-Puffer (bzw. DPBS) gewaschen und die Platte im Brutschrank getrocknet. Die angehafteten Bakterienfilme wurden für 5-10 Minuten mit 50 µl/ *well* Gentianaviolett angefärbt, die Farblösung unter fließendem Wasser abgespült und die Platte erneut getrocknet.

Die Absorption der angefärbten Biofilme wurde nach Homogenisierung für 10 Minuten in 70 %igem Isopropanol (50 µl/ *well*) am infinite M200 bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen. Ein Messwert größer oder gleich 0,1 wurde als biofilmbildend definiert. Eine Überschreitung des Messbereichs mit der Bezeichnung „over“ bei sehr stark biofilmbildenden Isolaten wurde mit dem Grenzwert von vier gewertet.

Für das **standardisierte Testverfahren** wurden Vorkulturen der Teststämme 1:100 in TSB verdünnt und jeweils in vier Wells einer 96*well* Mikrotiterplatte (NunclonΔ) mit je 200 µl TSB oder TSB_{EtOH} Flüssigmedium gefüllt. Die Versuchsansätze in den Platten wurden mit Folie abgeklebt, um eine Kontamination oder ein Verflüchtigen des Ethanol zu verhindern. Es erfolgte die Inkubierung der Platten ungeschüttelt für 17 – 18 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂). Die anschließende Biofilmtestung lief analog zur Screening-Methode.

Um eine qualitative Aussage zu erhalten, wurde die Biofilmtestung dreimalig wiederholt und die gemessenen Werte gemittelt.

2.2.1.6. Methicillin-Screening

Die Resistenzlage gegenüber Methicillin wurde durch einen Oxacillin-Screening Agar mit 6 µg/ ml Oxacillin nach einer mindestens 15 – 24 stündigen Bebrütung (35°C ± 2°C, 5 % CO₂) bewertet.

Das Beimpfen des Agars erfolgte durch einmaliges Einstechen, der mit Flüssigkultur leicht benetzten Pipettenspitzen. Ein phänotypisches Wachstum im Umfeld des Einstichkanals wurde als Oxacillinresistenz definiert.

2.2.1.7. Bestimmung der Proteaseexpression

Zum Screening einer möglichen Proteaseexpression als zusätzliches phänotypisches Unterscheidungsmerkmal wurde ein Casein-Agar benutzt.

Mit Hilfe dieser Methode kann optisch die denaturierende oder lysierende Proteaseaktivität von Bakterien erkannt und unterschieden werden. Denaturierende Proteasen zersetzen das im Agar eingegossene Casein und bilden einen weißen Hof um die Bakterienkolonie, im Gegensatz zu lysierenden Proteasen, die Casein vollständig umsetzen und einen hellen, durchscheinenden Hof erzeugen. Durch Zugabe von 36,5 - 38 %iger Salzsäure wurde das Casein denaturiert und speziell die deutlicher sichtbaren, lysierenden Proteasen mit ihrem caseinfreien Hof konnten ein zweites Mal phänotypisch beurteilt werden (Kneschke, 2011).

Im Rahmen der Studie und zur Unterscheidung möglicher Klonalität interessierte vornehmlich nur das dichotome Merkmal des Vorhandenseins oder Fehlens einer Proteaseaktivität. Vergleichbar abgelesene Stämme wurden durch eine subjektive Klassifikation des Fehlens oder einer schwachen, stärkeren und sehr starken Proteaseexpression unterschieden.

2.2.2. Pulsfeldgelelektrophorese

Das PFGE-Protokoll wurde größtenteils im Rahmen dieser Doktorarbeit in Anlehnung an das am Hamburger Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene schon vorhandene Verfahren (vgl. Scherpe, 2008) für unsere Zwecke der *S. epidermidis* Diskrimination weiterentwickelt, modifiziert und neu etabliert. Im Verlauf wurde, um mehr DNA vom Bakterium gewinnen zu können, der Flüssigkultur im ersten Schritt noch Glycin hinzugefügt, eine größere Menge Bakteriensuspension verwendet und dementsprechend die Enzymmengen angepasst (alte Werte in Klammern).

Die Methode wurde zur Auffindung von Übereinstimmung bzw. Klonalität zwischen dem positiven Blutkulturisolat und den entsprechenden Hautbakterien eines der Langzeitkinder benutzt. Hierfür wurden einzelne, repräsentative und phänotypisch verschiedene *S. epidermidis* Stämme über den gesammelten Zeitraum verglichen.

Ausgewählte *S. epidermidis* Stämme wurden aus den Stammhaltungsmedien auf Blutagarplatte bei 37°C und 5 % CO₂ über Nacht im Brutschrank rekultiviert. Darauffolgend wurden Flüssigkulturen von 5 ml TSB supplementiert mit 1 % Glycin mit dem frisch kultivierten Isolat angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelinkubiert. Die Übernachtskultur wurde gevortext, 1,6 ml (800 µl) in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt und fünf Minuten bei 14.000 s⁻¹ zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils zweimal in 1 ml SE-Puffer gewaschen und zentrifugiert und zum Schluss in 500 µl SE-Puffer resuspendiert.

Das Einbetten der Bakterien in die Agarose-Blöckchen und das in-situ Lysieren und Entproteinisieren dienten der vereinfachten Handhabung und dem Schutz der großen DNA-Moleküle vor Zerstörung durch Scherkräfte.

1 ml im Heizblock bei 60°C warmgehaltene 1,6 %ige *low melting point* Agarose wurde mit einer großen Spatelspitze Lysozym (5 mg; ≥ 40.000 U/ mg) und 2,6 µl (1,3 µl) Lysostaphin (1500U/ ml) vermischt und in gleichem Anteil zusammen mit 125 µl der vorgewärmten Bakteriensuspension zügig ohne Blasenbildung in den Gießblock pipettiert. Gießblock und Blöckchen wurde zum Aushärten mindestens 20 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die Bakterienblöckchen in 12 *well* Zellkulturplatten überführt.

Für die erste Lyse wurden pro Blöckchen 1 ml Lysis-Lösung I plus 5 mg Lysozym (≥ 40.000 U/ mg) verwendet und unter leichtem Schwenken bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgendem Tag wurde Lysislösung I durch 1 ml ES-Lösung und 4 µl (2 µl) Proteinase K (20 µg/ µl) ersetzt und erneut bei 56°C über Nacht inkubiert. Nach erfolgter Lyse wurde jedes Blöckchen viermal für je eine halbe Stunde in jeweils 1 ml TE-Puffer gewaschen und ggf. bei 4°C in TE-Puffer gelagert.

Die Blöckchen wurden für die Restriktion auf Geltaschengröße (ca. 0,5*0,5 cm) zurechtgeschnitten, mit 1:10 verdünntem 200 µl Restriktionspuffer (Tango, Fermentas/ Thermo Fisher Scientific) bedeckt und etwa eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionspuffer durch 100 µl neuen und 1 µl des Restriktionsenzym *Sma*I (10 U/ µl) ersetzt und über Nacht bei 25°C im Brutschrank inkubiert.

Für das Pulsfeldgel wurden 1,4 g *pulsedField* Agarose mit 140 ml 0,5 x TBE aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt und in die Gießvorrichtung gegeben. 2-4 ml Agarose wurden zum Verschließen der Geltaschen zurückbehalten und bei 60°C zur späteren Verwendung

aufbewahrt. Nach etwa zwanzigminütiger Aushärtung des Gels wurden die Blöckchen mit Hilfe eines Spatels in die Geltaschen überführt und diese endgültig verschlossen.

Bedingungen für den PFGE-Lauf mit ausgewählten *S. epidermidis* Stämmen:

Laufzeit:	20 Stunden (einmalig 18 Std.)
Initial time:	5 Sekunden
Final time:	50 Sekunden
Spannung:	6 V/ cm
Winkel:	120°
Agarose:	1 %
Puffer:	2L 0,5x TBE
Temperatur:	14°C

Als Standard wurde bei jedem Lauf *S. aureus* RN 4220 benutzt.

Nach Ende der Laufzeit wurde das Gel in 200 ml *Aqua dest.* und 10 µl 1%igem Ethidiumbromid eine Stunde unter leichtem Schwenken inkubiert und nachfolgend die gleiche Zeit in *Aqua dest.* entfärbt. Nach 30 Minuten erfolgte beim Entfärben ein Wasseraustausch. Das gefärbte Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und nach den Tenover-Kriterien ausgewertet (Tenover *et al.*, 1995).

2.2.3. DiversiLab

Die DiversiLab Methode ist ein genetisches Fingerabdruck- und Analysegerät zur Untersuchung der Klonalität von Bakterien. Es basiert auf der Sequenzierung und dem Vergleich von sich charakteristisch wiederholenden, nicht kodierenden DNA Abschnitten.

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem „Diversilab *Recommendations for Mo Bio Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit*“ von bioMérieux.

Einige Kolonien von einer frischen Reinkultur ausgewählter *S. epidermidis* Stämme wurden in einem MicroBead Röhrchen mit 300 µl MicroBead-Lösung suspendiert. 50 µl MD1-Lösung hinzugefügt und bei maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten gevortext. Im Verlaufe der Versuche wurde zur besseren DNA Ausbeute diese Zeit auf bis

zu 20-30 Minuten vergleichbar zu Mykobakterien und Pilzen erhöht bzw. ersatzweise der Homogenisator Precellys von peqlab ausprobiert (4 Durchgänge mit 5 Minuten Pause je 2x 15 Sekunden mit 30 Sekunden Pause bei 6.500 s^{-1}). Das Röhrchen wurde bei 14.000 s^{-1} , wie im gesamten Verlauf der Extraktion, für 30 Sekunden herunterzentrifugiert und der gesamte Überstand mit 100 μl MD2-Lösung (Acetatpuffer) in ein neues Röhrchen überführt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proteine bei 15-minütigem Kühlen im Kühl- oder Gefrierschrank ausgefällt. Es folgte erneutes Zentrifugieren und Überführung von 200 μl Überstand in 450 μl MD3-Lösung (Guanidinhydrochlorid) zur Erhöhung der Salzkonzentration.

Wiederholt wurde die Flüssigkeit mit DNA gevortext und zentrifugiert, um anschließend komplett auf ein Filtrerröhrchen aufgetragen zu werden. 30 Sekunden und danach einminütiges Zentrifugieren mit 300 μl MD4-Lösung trennten DNA und restliche Flüssigkeitsbestandteile. Zum Schluss wurde die im Filter befindliche DNA mittels 35 μl MD5-Lösung, zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugieren wieder heruntergelöst. Die Nukleinsäurenkonzentrationsmessung wurde im zeitlichen Verlauf mit Hilfe eines Spektrophotometers, Nanodrops oder einem Nanophotometer gemessen.

Die gewonnene DNA wurde durch die Verwendung spezieller Primer und dNTPs (Primer Mix LL und Rep-PCR MM1) des „Diversilab *Staphylococcus Kit*“ amplifiziert. DNA höherer Konzentration von 35ng/ μl wurde auf diesen Wert angeglichen.

Zusammensetzung des jeweiligen Mastermix: (Probe mit 25 μl PCR Ansatz)

Rep-PCR MM1	18 μl
GeneAmp 10x PCR Buffer	2,5 μl
Primer Mix LL	2 μl
AmpliTaq DNA Polymerase	0, 5 μl

Zu jeweils 23 μl Mastermix wurden 2 μl DNA-Template hinzugegeben

Die Amplifikation erfolgte im 94°C erwärmten Thermocycler nach dem vorgegebenen Rep-PCR-Protokoll Schema (repPCR45) von bioMérieux:

Initiierung	a.	94°C (2 min)	} Mit jeweils 35 Zyklen
Denaturierung	b.	94°C (30 sec)	
Primerhybridisierung	c.	45°C (30 sec)	
Elongation	d.	70°C (90 sec)	
Finale Elongation	e.	70°C (3 min)	
Halte-/ Kühlphase	f.	4°C	

Die Aufschlüsselung erfolgte im Chip-Lesegerät unter Zuhilfenahme des „Diversilab *Lab Chip Devices*“. Für eine Auswertung steht die hauseigene Diversilab-Software von bioMérieux zur Verfügung.

Die Bestimmung und Analyse des genetischen Fingerabdrucks wurde in Form einer chipbasierten Gelelektrophorese und der Diversilab Web-Software durchgeführt.

Das fertige PCR-Produkt wurde zusammen mit einer speziellen Gelmixtur und Markern zur Identifizierung des zu analysierenden Abschnittes auf den Chip aufgetragen und gelelektrophoretisch im Chip-Lesegerät etwa eine Stunde mittels der voreingestellten Diversilab-Software automatisch gemessen und bewertet. (Zur genaueren Beschreibung der Beladung des Chips und dessen dazu verwendeter Inhaltsstoffe und Zusammensetzung siehe Handbuch des Diversilab *Lab Chip Devices*.)

Genauer analysiert und ausgewertet wurden die erzeugten Ergebnisse unter Verwendung der dafür vorgesehenen, webbasierten Diversilab Software *Strain typing* von bioMérieux. Für die automatisch algorithmusgenerierte Verarbeitung der Verwandtschaftsverhältnisse der zu untersuchenden *S. epidermidis* wurde stets die Auswertung nach Kullback-Leibler im Gegensatz zu der Pearson Korrelation oder der Auswertung nach Extended Jaccard gewählt. Eine Übereinstimmung der Stämme von $\geq 97\%$ wurde als identisch definiert.

2.2.4. Multi Locus Sequence Typing

Die Nukleinsäureextraktion für MLST erfolgte automatisiert mit dem NucliSENS easyMAG. Im Gegensatz zu säulenbasierten Nukleinsäureextraktionsverfahren erfolgt hier die Auftrennung über kleine, kugelige, metallbeschichtete Silika. Für die Gewinnung von 50 µl DNA-Eluatvolumen wurden einige Kolonien einer frischen Reinkultur von Blutagarplatte in 250 µl 1xPBS Puffer suspendiert. Nach dessen Einsetzung von 200 µl erfolgte eine kurze automatisierte Vorlyse, bevor 100 µl Silika je Probe zugegeben werden musste. Die Silika wurden vorher mit 600 µl *Ultra Pure Water* angesetzt. Die weitere Extraktion erfolgte automatisch.

Der benötigte MLST-Sequenzierungsansatz wurde durch PCR hergestellt. Für die jeweiligen charakteristischen Genabschnitte wurden die spezifischen Primer *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpiA* und *yqiL* verwendet (Thomas et al., 2007).

Zusammensetzung des jeweiligen Mastermix: (Probe mit 25 µl PCR Ansatz)

jeweiliger reverse und forward Primer	1 µl
dNTPs	0,5 µl
Dream-Taq Puffer	2,5 µl
H ₂ O	17,75 µl
Polymerase	0,25 µl

Zu jeweils 23 µl Mastermix wurden 2 µl DNA-Template hinzugegeben

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Schema:

Initiierung	a.	94°C (5 min)	} mit jeweils 30 Zyklen
Denaturierung	b.	94°C (30 sec)	
Primerhybridisierung	c.	50°C (1 min)	
Elongation	d.	72°C (1 min)	
Finale Elongation	e.	72°C (5 min)	
Halte-/ Kühlphase	f.	4°C	

Der Amplifikationserfolg wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Hierfür wurde ein 1,2%iges (w/v) Agarosegel (1,8 g Agarose in 150 ml 0,5xTBE-Puffer) mit 6 µl Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V, 300 mA und 300 W über einen Zeitraum von einer Stunde.

Die Sequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte wurde nach Sanger am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt. Die anschließende Auswertung der DNA Sequenzen erfolgte mit den Programmen Vektor NTI und für die Typisierung und e-Burst Darstellung mittels der Web-Software für MLST-Sequenzierung (www.mlst.net, 2014).

2.2.5. Bestimmung der Virulenz-assoziierten Gene *icaA* und *mecA*

Bei den sequenzierten Stämmen wurden ergänzend noch die Gennachweise für *mecA* und *icaA* bestimmt. Mit den jeweiligen spezifischen Primern wurde daher die untersuchte DNA per PCR amplifiziert. Der PCR Ansatz erfolgte vergleichend zur MLST-PCR.

Der Nachweis oder Ausschluss wurde anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Als Standard diente ein *mecA* positiver Hausstamm und für *icaA* der *S. epidermidis* Stamm 1457.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler für *mecA* nach folgendem Schema:

Initiierung	a.	94°C (5 min)	} mit jeweils 30 Zyklen
Denaturierung	b.	94°C (30 sec)	
Primerhybridisierung	c.	55°C (30 sec)	
Elongation	d.	72°C (30 sec)	
Finale Elongation	e.	72°C (4 min)	
Halte-/ Kühlphase	f.	4°C	

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler für *icaA* nach folgendem Schema:

Initiierung	a.	94°C (5 min)	} mit jeweils 30 Zyklen
Denaturierung	b.	95°C (30 sec)	
Primerhybridisierung	c.	50°C (30 sec)	
Elongation	d.	72°C (90 sec)	
Finale Elongation	e.	72°C (4 min)	
Halte-/ Kühlphase	f.	4°C	

2.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (*Microsoft Corporation*) und des Statistikprogramms R (*R Foundation for Statistical Computing*) unter Verwendung entsprechender statistischer Grundlagen für eine deskriptive Auswertung. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde unter anderem der Chi-Quadrat- bzw. Fischer-Test angewendet. Die Konfidenzintervalle der angegebenen Prävalenzen wurden nach Wilson mit einer Fehlerabweichung von 5 % berechnet.

Bei der Diversilab-Methode wurde zur Analyse aufgrund der geringen Intensitätsdarstellung/ Peakhöhe und -anzahl von KNS der empfohlene und vordefinierte Auswertungsalgorithmus nach Kullback-Leibler verwendet.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Kolonisation der Hautflora bei Früh- und Neugeborenen wurden insgesamt 15.936 Staphylokokken-Isolate analysiert und eine vielfach größere Anzahl vorher gesammelt, isoliert und charakterisiert. Hierfür wurden 71 Neugeborene auf deren bakterielle Hautkolonisation untersucht. 30 Neugeborene waren Patienten der Neugeborenenstation (NGS) und 41 einer neonatologischen Intensivstation (NITS). Von den 41 Neugeborenen der NITS wurden zehn Neugeborene anschließend im wöchentlichen Verlauf auf die Dynamik ihrer Hautkolonisation untersucht. Letztendlich wurden die Isolate von 18 Neugeborenen der NGS (n=2.000), 23 Neugeborenen der NITS (n=3.181) und von den zehn zusätzlichen Neugeborenen der NITS (n=10.755) eingeschlossen. So konnte einerseits die Epidemiologie der Hautkolonisation bei Neugeborenen in der ersten Lebenswoche zwischen einer Intensiv- und einer normalen Neugeborenenstation und andererseits auch speziell die Dynamik der Hautkolonisation bei Neugeborenen mit einem längeren Krankenhausaufenthalt analysiert werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte *S. epidermidis* als spezifischer Verursacher einer Sepsis bei Proband R und dessen Hautkolonisation in Bezug auf die unterschiedliche phänotypische Klonalität näher untersucht werden. Diese klonale Verwandtschaft konnte anschließend für ausgewählte Isolate aller Probanden mit molekularbiologischen Methoden bestätigt und in den weltweiten Gesamtkontext eingeordnet werden.

3.1. Kolonisation mit Staphylokokken in den ersten Lebenstagen

Die unterschiedliche Hautkolonisation in der ersten Lebenswoche konnte anhand von 6.389 Staphylokokken-Isolaten von 18 Neugeborenen der NGS und 33 Neugeborenen der NITS charakterisiert werden. Die Proben von 20 Neugeborenen konnten hierbei wegen der Einschlusskriterien nicht berücksichtigt werden (Abbildung 3-1).

S. epidermidis war mit 74,7 % (Konfidenzintervall [0,728 | 0,765]) der Isolate der NGS (n=1.494/ 2.000) und 84,4 % [0,834 | 0,854] der Isolate der NITS (n=3.705/ 4.389) die am häufigsten isolierte Staphylokokken-Spezies (Tabelle 3-1) und war bei allen Neugeborenen der NGS (n=18/ 18) und fast allen Neugeborenen der NITS (n=32/ 33) auf der Haut vorhanden. Außerdem fanden sich bei Neugeborenen der NITS noch *S. aureus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. warneri*.

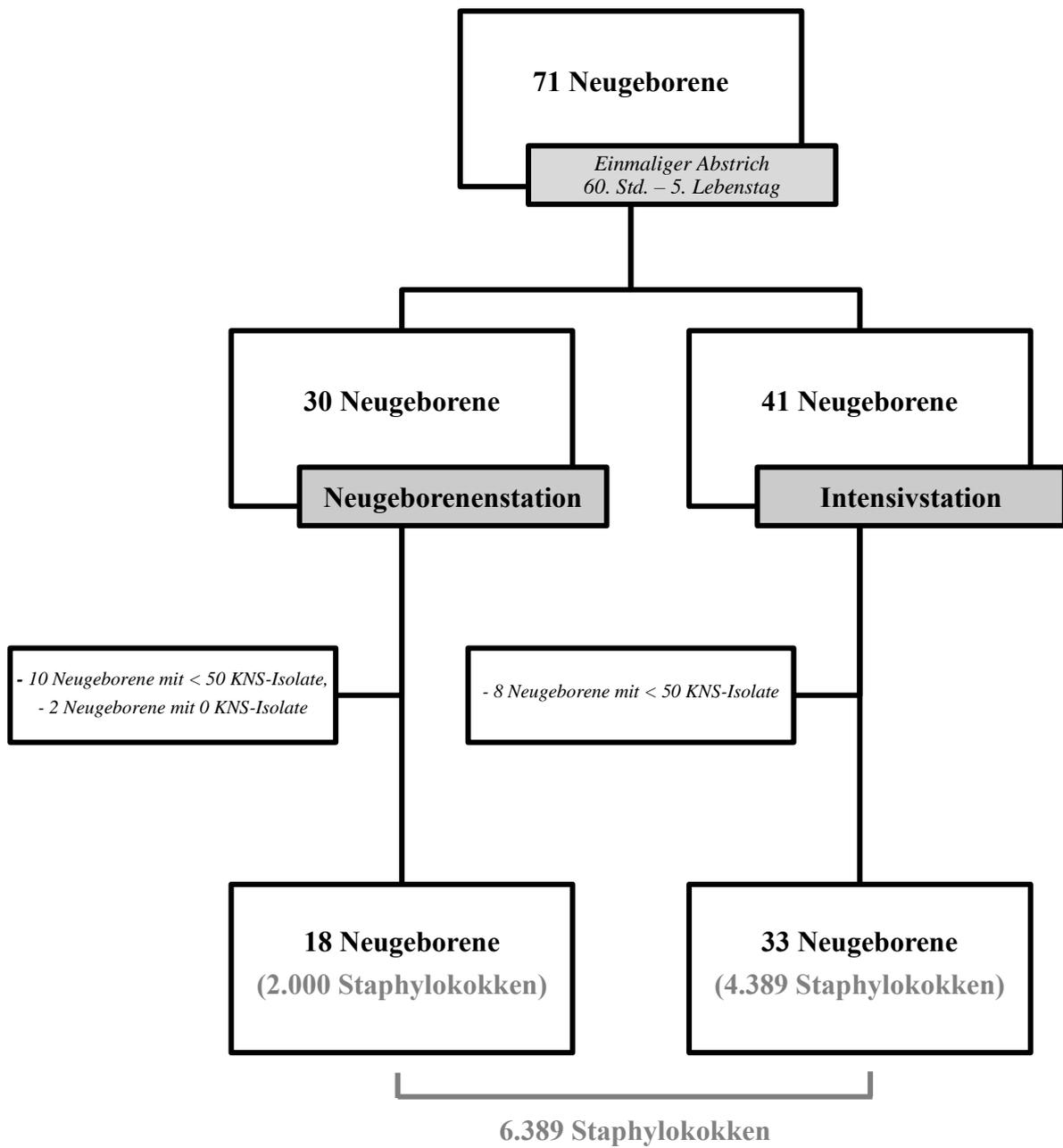


Abbildung 3-1: Schema der eingeschlossenen Neugeborenen und Isolate der ersten Lebenswoche

Für die Untersuchung der Hautkolonisation der ersten Lebenswoche wurden insgesamt 71 Neugeborene abgestrichen und 18 Neugeborene der Neugeborenenstation und 33 Neugeborenen der Intensivstation in die Analyse eingeschlossen. Alle Neugeborenen mit weniger als 50 Koagulase-negativen Staphylokokken Isolaten auf der Haut wurden nicht berücksichtigt.

Die Neugeborenen der NGS wiesen mit den zusätzlich vorkommenden *S. cohnii*, *S. lugdunensis* und *S. pasteurii* eine größere Diversität der Spezies auf. Im Median waren die

Neugeborenen beider Stationen mit zwei verschiedenen Staphylokokkenspezies kolonisiert, wobei auf der NITS bei neun Neugeborenen eine (27,3 %), bei 19 Neugeborenen zwei (57,6 %) und bei fünf Neugeborenen drei verschiedene Staphylokokkenspezies (15,2 %) auf der Haut gefunden wurden. Dagegen war nur ein Neugeborenes der NGS mit nur einer Staphylokokken-Spezies (5,6 %) kolonisiert sowie neun mit zwei (50,0 %), vier mit drei (22,2 %) und jeweils zwei mit vier oder fünf verschiedenen Spezies (je 11,1 %).

Tabelle 3-1: Anzahl der Staphylokokken-Isolate der ersten Lebenswoche

Organismus	Neugeborenenstation* (Probanden, n=18)	Intensivstation* (Probanden, n=33)
<i>S. aureus</i>	4 (0,2 %) (n=2)	50 (1,6 %) (n=1)
<i>S. capitis</i>	6 (0,3 %) (n=3)	1 (< 0,1 %) (n=1)
<i>S. cohnii</i>	1 (0,1%) (n=1)	
<i>S. epidermidis</i>	1.494 (74,7 %) (n=18)	3.705 (84,4 %) (n=32)
<i>S. haemolyticus</i>	44 (2,2 %) (n=7)	527 (12,0 %) (n=16)
<i>S. hominis</i>	353 (17,7 %) (n=12)	70 (1,6 %) (n=8)
<i>S. lugdunensis</i>	2 (0,1 %) (n=2)	
<i>S. pasteurii</i>	1 (0,1 %) (n=1)	
<i>S. warneri</i>	95 (4,8 %) (n=3)	36 (0,8 %) (n=4)
	2.000	4.389

*Anzahl der Isolate/ Anzahl der Isolate in %/ Anzahl der kolonisierten Probanden

Die Hautkolonisation mit Staphylokokken war für jeden Probanden sehr individuell (Abbildung 3-2, Abbildung Anhang-3, Abbildung Anhang-4), trotzdem war bei der Mehrzahl der Neugeborenen der NITS (n=29/ 33) und der NGS (n=15/ 18) *S. epidermidis* die am häufigsten isolierte Spezies. Eine Kolonisation mit *S. aureus* war in der ersten Lebenswoche nur bei zwei Neugeborenen der NGS (*S. aureus* Isolate jeweils n=2, Anteil an der jeweiligen Hautflora 2 %) und bei nur einem Neugeborenen der NITS (*S. aureus* Isolate n=50, Anteil an der Hautflora 26,2 %). Die dominante Hautkolonisation war in

diesen Fällen immer durch *S. epidermidis* (NGS n=94/ 99 (94,9 %) bzw. n=79/ 102 (77,5 %), NITS n=141/ 149 (73,8 %)) und ggf. anderen KNS gegeben. Fast alle dieser Isolate der NGS (n=4/ 4) und der NITS (n=49/ 50) waren im initialen Screening Oxacillinempfindlich.

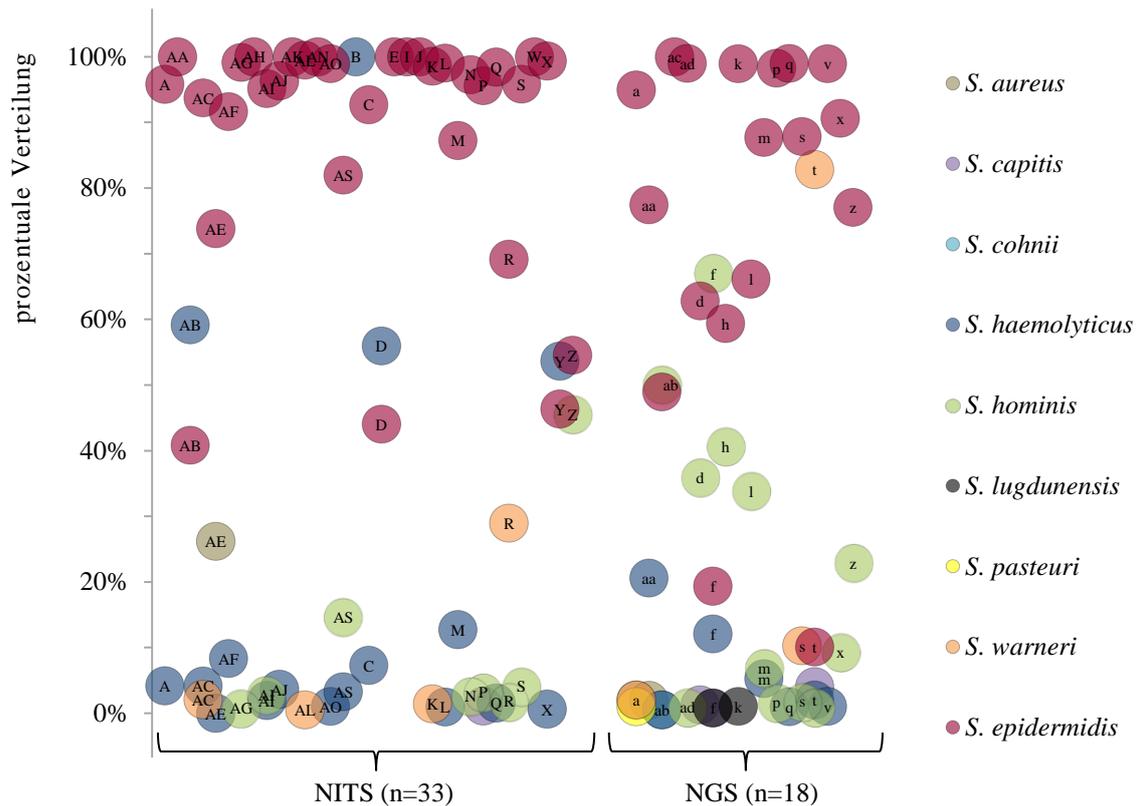


Abbildung 3-2: Prozentuale Verteilung der Staphylokokkenisolate pro Proband

Die unterschiedliche Anzahl der verschiedenen Staphylokokkenspezies war teilweise sehr individuell für ein Neugeborenes, trotzdem war die Mehrzahl der Neugeborenen beider Stationen hauptsächlich mit *S. epidermidis* (rote Kreise) kolonisiert.

Insgesamt waren 70,9 % [0,698 | 0,720] der gesamten Isolate der ersten Lebenswoche Oxacillin-resistent (n=4.531/ 6.389). Bei den Staphylokokken ohne den Hauptvertreter *S. epidermidis* waren 81,7 % [0,787 | 0,844] und 32,6 % [0,287 | 0,368] der Isolate der NITS bzw. NGS resistent (p < 0,001). Bei Betrachtung der Virulenzeigenschaften für *S. epidermidis* zeigte sich ebenfalls ein hoher Unterschied in der Oxacillinresistenz und der Biofilmbildung. 43 % [0,406 | 0,455] der *S. epidermidis* Isolate von Neugeborenen der NGS waren gegenüber Oxacillin resistent (n=643/ 1.494) und 82,4 % [0,804 | 0,842] der

Isolate hatte die Fähigkeit einen Biofilm zu bilden (n=1.231/ 1.494). Auf der NITS waren dagegen 85,4 % [0,843 | 0,864] der *S. epidermidis* Isolate Oxacillin-resistent (n=3.164/ 3.705), aber nur 66,6 % [0,651 | 0,680] waren biofilmbildend (n=2.467/ 3.705) (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Anzahl der Staphylokokken-Isolate der ersten Lebenswoche bzgl. der Oxacillinresistenz und der Fähigkeit zur Biofilmbildung

	Neugeborenenstation* (Probanden, n=18)	Intensivstation* (Probanden, n=33, n=32)
Staphylokokken ohne <i>S. epidermidis</i>:		
Oxacillin resistent ^A	165 (32,6 %)	559 (81,7 %)
Oxacillin sensibel ^A	341 (67,4 %)	125 (18,3 %)
	506	684
<i>S. epidermidis</i>:		
Oxacillin resistent: ^B	643 (43,0 %)	3.164 (85,4 %)
- biofilmbildend ^{C, E}	493 (33,0 %)	2.192 (59,2 %)
- nicht biofilmbildend ^{C, F}	150 (10,0 %)	972 (26,2 %)
Oxacillin sensibel: ^B	851 (57,0 %)	541 (14,6 %)
- biofilmbildend ^{D, E}	738 (49,4 %)	275 (7,4 %)
- nicht biofilmbildend ^{D, F}	113 (7,6 %)	266 (7,2 %)
	1.494	3.705

*Anzahl der Isolate/ Anzahl der Isolate in %, ^{A-F} Signifikanz p-Wert jeweils < 0,001

3.2. Kolonisation mit Staphylokokken in den ersten drei Lebensmonaten

Bei zehn Neugeborenen der Intensivstation wurden zusätzlich zur Punktprävalenzstudie während der ersten Lebenswoche weitere wöchentliche Abstriche über mindestens sechs Wochen gesammelt. Die Hautkolonisation mit Staphylokokken von vier Neugeborenen konnte sogar bis zur zwölften Lebenswoche beobachtet werden. Insgesamt konnten so weitere 9.547 Staphylokokken-Isolate gewonnen und analysiert werden (Abbildung 3-3).

S. epidermidis war über die ersten zehn Wochen die am häufigsten isolierte Staphylokokkenspezies mit einem 74,3 %igen Anteil [0,718 | 0,766] in der ersten Lebenswoche (n=897/ 1.208) und über 80 % in der zweiten bis fünften Lebenswoche. Als zweithäufigster Mikroorganismus fand sich *S. haemolyticus* mit abnehmender Tendenz von 22,5 % [0,203 | 0,249] in der ersten (n=272/ 1.208) und bis zu 11,6 % [0,101 | 0,132] in der vierten Woche (n=183/ 1.578) (Tabelle 3-3). Ein Neugeborenes hatte in der ersten Woche eine reine *S. haemolyticus* Kolonisierung. Die prozentuale Anzahl der gefundenen *S. epidermidis* Isolate von 74,3 % war damit bei den Langzeitkindern (n=10) geringer als bei der Betrachtung aller Probanden der NITS mit 84,4 %, im Gegensatz zu *S. haemolyticus* mit 22,5 % zu 12,0 %.

S. aureus Isolate fanden sich nur einmalig bei Abstrichen eines Neugeborenen (Proband B) in der zweiten (n=17/ 124) und dritten Lebenswoche (n=7/ 191) und nur mit einem geringen prozentualen Anteil von 13,7 bzw. 3,7 % an der vorkommenden Hautflora der Staphylokokken. Alle Isolate waren Oxacillin-sensibel. In beiden Wochen war *S. epidermidis* mit 65,3 % bzw. 80,1 % (n=81/ 124 bzw. n=153/ 191) oder andere Staphylokokken wie *S. haemolyticus* (n=26/ 124 bzw. n=8/ 191) und *S. hominis* (n=0/ 124 bzw. n=23/ 191) prädominant.

In der fünften Woche gab es einen Umbruch in der Hautbesiedlung mit Staphylokokken. Erstens reduzierte sich der prozentuale Anteil der gefundenen *S. epidermidis* Isolate von der sechsten bis zur zwölften Woche von 65,4 % (n=740/ 1.131) auf 43,8 % (n=78/ 178) und zweitens nahm der Anteil von *S. hominis* in der fünften bis siebten Woche als zweitgrößte Population zu (5. Woche 11,3 %, 6. Woche 22,8 % und 7. Woche 23,6 %). Anschließend fand sich wieder vermehrt *S. haemolyticus* mit 17,1 % in der achten (n=137/ 803), 31,2 % in der zehnten (n=92/ 295) und 50,0 % in der zwölften Woche (n=89/ 178).

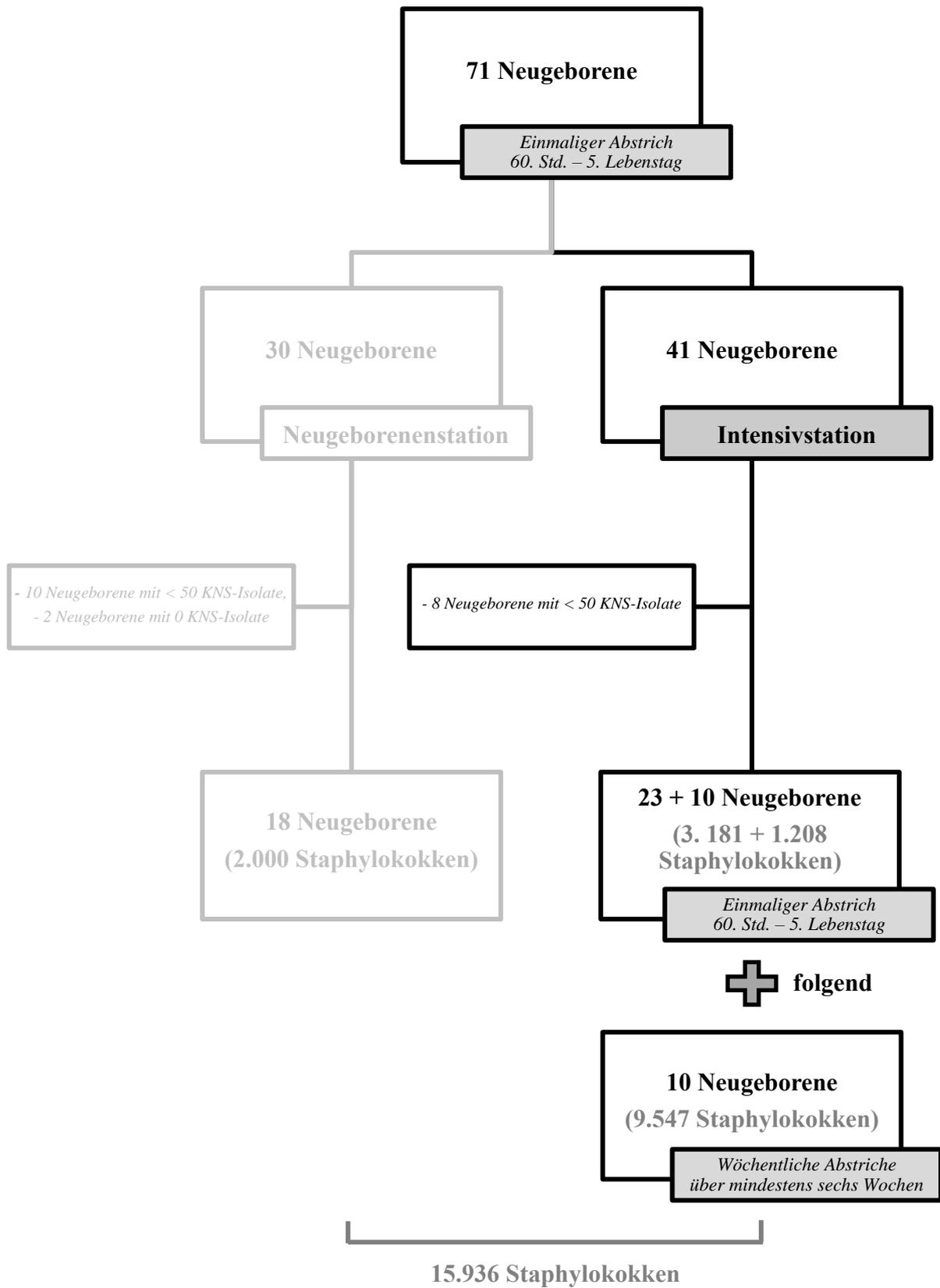


Abbildung 3-3: Schema der eingeschlossenen Neugeborenen und Isolate bzgl. der Langzeitbeobachtung

Zehn Frühgeborene der neonatologischen konnten mit weiteren 9.547 Staphylokokken-Isolaten über mindestens sechs weitere Lebenswochen bzgl. deren Hautkolonisation analysiert werden.

Generell erhöhte sich die Diversität der Untergattungen der Staphylokokken- von der sechsten bis zur zwölften Woche mit einem vermehrten Auftreten von *S. capitis* (Tabelle 3-3, Abbildung 3-4). Bei genauerer Betrachtung der *S. epidermidis* Stämme ist auffällig, dass eine annähernd durchgehende Oxacillinresistenz von über 80 %, in einigen Wochen sogar von fast 98 % bestand. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Oxacillinresistenz der Isolate ebenfalls ab der sechsten Lebenswoche, wie auch die durchschnittliche prozentuale Anzahl der „virulenteren“ Oxacillin-resistenten, biofilmbildenden *S. epidermidis* Isolate auf der Haut abnimmt. Diese Dynamik ist nicht generell für alle Probanden zutreffend, sondern nur ein prozentualer Querschnitt. Bei genauerer Betrachtung des individuellen Neugeborenen wird aber ersichtlich, dass jedes Neugeborene im Laufe seines Aufenthalts mit Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten kolonisiert wurde (Abbildung 3-5). Die Probanden AA, AG und N wurden ab der fünften, der Proband D ab der zwölften und der Proband R ab der achten Lebenswoche signifikant mit einem immer höheren Anteil von Oxacillin-sensiblen Staphylokokken kolonisiert. Bei Proband C fanden sich in der ersten Lebenswoche nur Oxacillin-sensible *S. epidermidis* Isolate (n=89/ 96), die in der zweiten Woche nicht mehr nachweisbar waren und durch Oxacillin-resistente *S. epidermidis* Isolate (n=93/ 98) ersetzt worden sind. Proband B war in der ersten Lebenswoche nur mit einem Oxacillin-resistenten *S. haemolyticus* Stamm (n=192/ 192) und in der zweiten Woche nur mit einem Oxacillin-resistenten *S. haemolyticus* (n=26/ 124), einem Oxacillin empfindlichen *S. epidermidis* (n=81/ 124) und einem Oxacillin empfindlichen *S. aureus* (n=17/ 124) Stamm besiedelt, bevor erst in der dritten Woche eine Kolonisierung mit einem Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolat stattfand (n=85/ 191). *S. haemolyticus* fand sich außer in der vierten und zehnten Woche immer in Anteilen an der Hautflora von Proband B, der sogar mit 90,8 % (n=89/ 98) in der zwölften Lebenswoche wieder überwog. Außer bei Proband R und N konnte bei allen Kindern in der Langzeitbeobachtung *S. haemolyticus* nachgewiesen werden, bei Proband AG war dieser in der vierten (n=85/ 104) und achten (n=70/ 76) Lebenswoche und bei Proband D in der ersten (n=61/ 109) und zehnten Lebenswoche (n=92/ 96) in einem besonders hohen Anteil vertreten. Interessanterweise waren bei Proband AG zwischen der fünften und siebten Lebenswoche Oxacillin-empfindliche *S. hominis* Isolate (n=57/ 123, n=80/ 98 und n=180/ 192) anzahlmäßig in der Mehrheit, bevor wieder Oxacillin-resistentere Staphylokokken dominierten. Bei Proband D fand sich einmalig in der sechsten Lebenswoche eine reine Kolonisierung nur mit Oxacillin-sensiblen

S. hominis Isolaten (n=15/ 15), die sonst in den vorherigen und nachfolgenden Woche durch eine Oxacillin-resistente *S. epidermidis* Besiedlung geprägt war.

Insgesamt wird die Kolonisierung von Neugeborenen in der ersten und auch in den nachfolgenden Lebenswochen von Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten geprägt, die sich noch in verschiedene phänotypisch charakterisierte Muster unterteilen lassen und deren Anzahl im Verlauf der Wochen abnimmt. Mehrere phänotypische Muster scheinen parallel vorkommen zu können, wobei meistens eines der Muster trotzdem eine anzahlmäßig vorherrschende Rolle einnimmt. Die Häufigkeit der verschiedenen phänotypischen Muster ist prozentualen Schwankungen unterworfen, wobei in allen Wochen ein Oxacillin-resistenter und Protease positiver Stamm überwiegte.

Bei der Betrachtung dieser Daten ist zu beachten, dass die Studienteilnehmer anfänglich auf einer Intensivstation versorgt worden sind und im unterschiedlichen Verlauf ihrer Behandlung über diesen Zeitraum entweder entlassen oder auf eine Normalstation für Neugeborene verlegt worden sind.

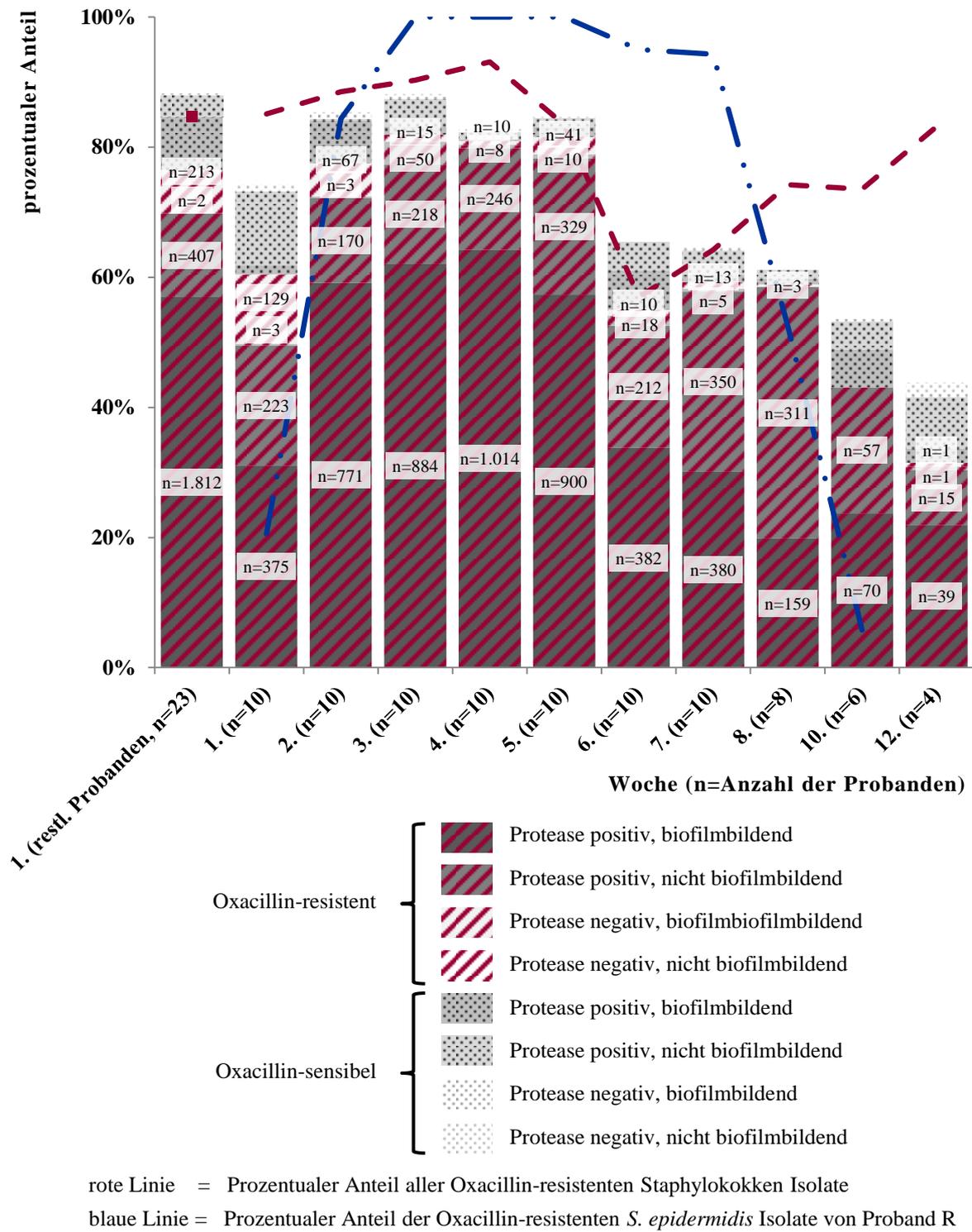


Abbildung 3-4: Prävalenz phänotypischer *S. epidermidis* Muster bei Neugeborenen einer Intensivstation über zwölf Wochen

Besonders die Anzahl der Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolate (rot schraffiert) nahm in den ersten Lebenswochen zu, bevor ab der sechsten Lebenswoche wieder eine Abnahme zu erkennen war.

Tabelle 3-3: Anzahl der Staphylokokken-Isolate im zeitlichen Verlauf über zwölf Wochen

Organismus/ Woche [#]	1.* (n=10)	2.* (n=10)	3.* (n=10)	4.* (n=10)	5.* (n=10)	6.* (n=10)	7.* (n=10)	8.* (n=8)	10.* (n=6)	12.* (n=4)
Gesamt	1.208	1.304	1.425	1.578	1.570	1.131	1.263	803	295	178
Oxacillin-resistent	1.028 (85,1 %)	1.154 (88,5 %)	1.287 (90,3 %)	1.469 (93,1 %)	1.310 (83,4 %)	644 (56,9 %)	811 (64,2 %)	596 (74,2 %)	217 (73,6 %)	148 (83,1 %)
Oxacillin-sensibel	180 (14,9 %)	150 (11,5 %)	138 (9,7 %)	109 (6,9 %)	260 (16,6 %)	487 (43,1 %)	452 (35,8 %)	207 (25,8 %)	78 (26,4 %)	30 (16,9 %)
<i>S. aureus</i>		17 (1,3 %)	7 (0,5 %)							
<i>S. capitis</i>		13 (1,0 %)	1 (0,1 %)	7 (0,4 %)	46 (2,9 %)	121 (10,7 %)	86 (6,8 %)	92 (11,5 %)	37 (12,5 %)	2 (1,1 %)
<i>S. epidermidis</i>	897 (74,3 %)	1.113 (85,4 %)	1.256 (88,1 %)	1.306 (82,8 %)	1.329 (84,6 %)	740 (65,4 %)	816 (64,6 %)	492 (61,3 %)	158 (53,6 %)	78 (43,8 %)
Oxacillin-resistent	730 (81,4 %)	1.011 (90,8 %)	1.167 (92,9 %)	1.278 (97,9 %)	1.280 (96,3 %)	622 (84,1 %)	748 (91,7 %)	473 (96,1 %)	127 (80,4 %)	56 (71,8 %)
Oxacillin-sensibel	167 (18,6 %)	102 (9,2 %)	89 (7,1 %)	28 (2,1 %)	49 (3,7 %)	118 (15,9 %)	68 (8,3 %)	19 (3,9 %)	31 (19,6 %)	22 (28,2 %)
<i>S. haemolyticus</i>	272 (22,5%)	108 (8,3 %)	113 (7,9 %)	183 (11,6 %)	17 (1,1 %)	12 (1,1 %)	61 (4,8 %)	137 (17,1%)	92 (31,2 %)	89 (50,0 %)
<i>S. hominis</i>	6 (0,5 %)	52 (4,0 %)	48 (3,4 %)	81 (5,1 %)	178 (11,3 %)	258 (22,8 %)	298 (23,6 %)	82 (10,2 %)	4 (1,4 %)	7 (3,9 %)
<i>S. lugdunensis</i>							1 (0,1 %)			
<i>S. warneri</i>	33 (2,7 %)	1 (0,1 %)		1 (0,1 %)			1 (0,1 %)		4 (1,4 %)	2 (1,1 %)

[#] Erster Abstrich nach der 60. Lebensstunde bis zum 5. Lebenstag, anschließend im wöchentlichen Rhythmus

* Anzahl der Isolate/ Anzahl der Isolate in %

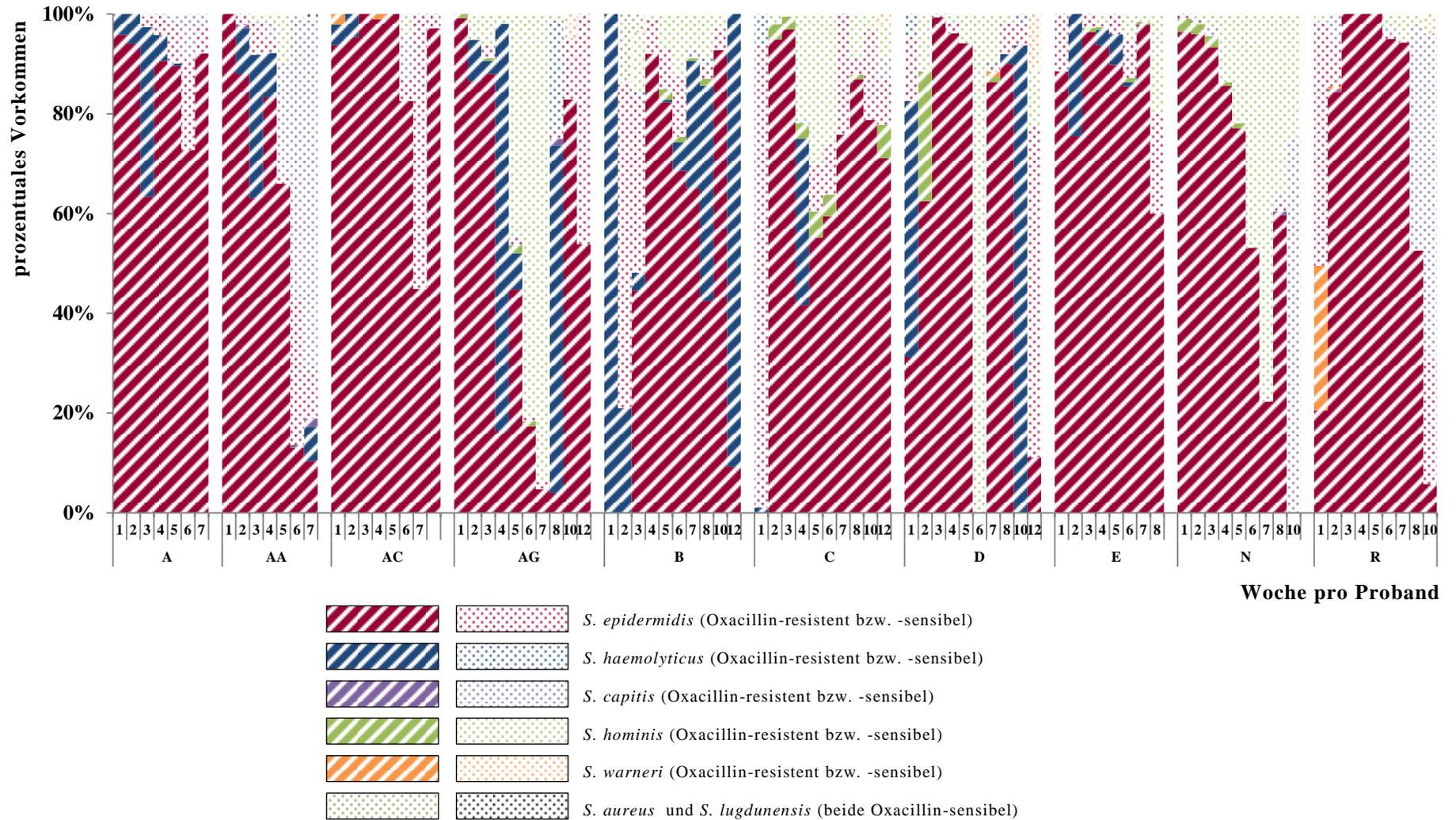


Abbildung 3-5: Prozentuales Vorkommen der Staphylokokken-Isolate bei Neugeborenen der Langzeitbeobachtung

Die Mehrzahl der Neugeborenen waren mit Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten kolonisiert, obwohl bestimmte Wochen phasenweise auch durch andere und/ oder Oxacillin-sensible Staphylokokkenspezies geprägt waren.

3.3. *S. epidermidis* als Hautkolonisateur und Verursacher einer Sepsis

Eines der untersuchten Langzeitkinder (Proband R) entwickelte bei seinem Aufenthalt auf der Intensivstation eine klinische Sepsis. Eine abgenommene Blutkultur zwischen dem neunten und zehnten Lebenstag, dessen positiver Keimnachweis am 12./ 13. Lebenstag und die nachfolgende mikrobiologische Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKSH, Campus Lübeck, erwiesen letztendlich einen *S. epidermidis* als Erreger der Sepsis. Die Abnahme der Blutkultur erfolgte also zwischen den Hautabstrichen der ersten und zweiten Lebenswoche. Dieses Isolat wurde in der Routine als resistent gegenüber Oxacillin beschrieben und durch eine spätere molekularbiologische Untersuchung als *mecA* positiv bestätigt. In der anschließenden Testung war er Protease-positiv, nicht biofilmbildend und *icaA* negativ. Trotz schwerwiegender Erkrankung konnte bei diesem Neugeborenen bis zu seiner Entlassung Abstriche der Hautflora gewonnen werden. Insgesamt konnten so 1.352 Isolate über zehn Wochen näher analysiert werden. In jedem Abstrich konnte *S. epidermidis* nachgewiesen werden, teilweise fanden sich noch zusätzlich *S. capitis*, *S. hominis* und *S. warneri* (Tabelle 3-4). *S. epidermidis* war im Gegensatz zu den anderen KNS in den ersten acht Wochen prädominant und zwischen der dritten und fünften Lebenswoche auch die einzige Spezies aus der Familie der Staphylokokken. In der achten und zehnten Woche wurde in höherer Anzahl auch *S. capitis* Isolate nachgewiesen (n=87/ 192 bzw. n=34/ 52) und der Anteil von *S. epidermidis* nahm deutlich ab (n=101/ 192 bzw. n=16/52). Alle *S. capitis* Isolate der achten und zehnten Woche waren Oxacillin-sensibel. Insgesamt waren 80,2 % [0,783 | 0,824] der *S. epidermidis* Isolate Oxacillin-resistent (n=1.088/ 1.352) und zwischen der zweiten und achten Woche sogar zwischen 90,5 % und 100 %. Nur in der ersten Woche fand sich noch ein hoher Anteil Oxacillin-sensibler *S. epidermidis* Isolate von 70,3 % (n=52/ 74), dagegen waren alle *S. warneri* Isolate (n=31) Oxacillin-resistent.

Die gewonnenen und die über mehrere Wochen phänotypisch charakterisierten Hautfloraisolate von Proband R, sowie dessen positive Blutkultur führten zu einer genaueren molekularbiologischen Betrachtung, um eine mögliche gemeinsame Klonalität zwischen Blutkulturisolat und Hautkolonisation zu finden. Andererseits konnte ggf. anhand dieser Ergebnisse erstmals eine Abschätzung über die Zuverlässigkeit der Konkordanz zwischen molekulargenetischer Klonalität und der für diese Studie vorgenommenen, phänotypischen Einteilung anhand von Pathogenitätsfaktoren gewonnen werden. Vom besonderen Interesse waren hierbei die ersten beiden Wochen der

Hautkolonisation mit der großen Verschiebung von Oxacillin-sensiblen zu Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten, sowie einer anfangs großen Diversität an unterschiedlichen phänotypisch charakterisierten Klonalitätsmustern und Staphylokokken-Spezies, die in den nachfolgenden Wochen abnahm. So waren in der ersten Woche noch drei verschiedene Staphylokokken-Spezies und sechs unterschiedliche, phänotypische Muster, in der zweiten Woche noch zwei bzw. vier und in der dritten Woche letztendlich nur noch ein Oxacillin resistenter, biofilmbildender bzw. nicht biofilmbildender *S. epidermidis* Stamm zu finden (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Anzahl der Staphylokokken-Isolate bei Proband R

Woche	<i>S. epidermidis</i> *		<i>S. capitis</i> *		<i>S. hominis</i> *		<i>S. warneri</i> *	
		Oxacillin-resistent	Oxacillin-sensibel					
1.	74 (69,2 %)	22 (29,7 %)	52 (70,3 %)		2 (1,9 %)		31 (29,0 %)	
2.	179 (93,2 %)	162 (90,5 %)	17 (9,5 %)	12 (6,3 %)			1 (0,5 %)	
3.	133 (100 %)	133 (100 %)						
4.	192 (100 %)	192 (100 %)						
5.	192 (100 %)	192 (100 %)						
6.	96 (96 %)	95 (99,0 %)	1 (1,0 %)	1 (1,0 %)	3 (3,0 %)			
7.	181 (94,3 %)	181 (94,3 %)		1 (0,5 %)	10 (5,2 %)			
8.	101 (52,6 %)	101 (52,6 %)		87 (45,3 %)	4 (2,1 %)			
10.	16 (30,8 %)	3 (18,7 %)	13 (81,3 %)	34 (65,4 %)			2 (3,8 %)	

* Anzahl der Isolate/ Anzahl der Isolate in %

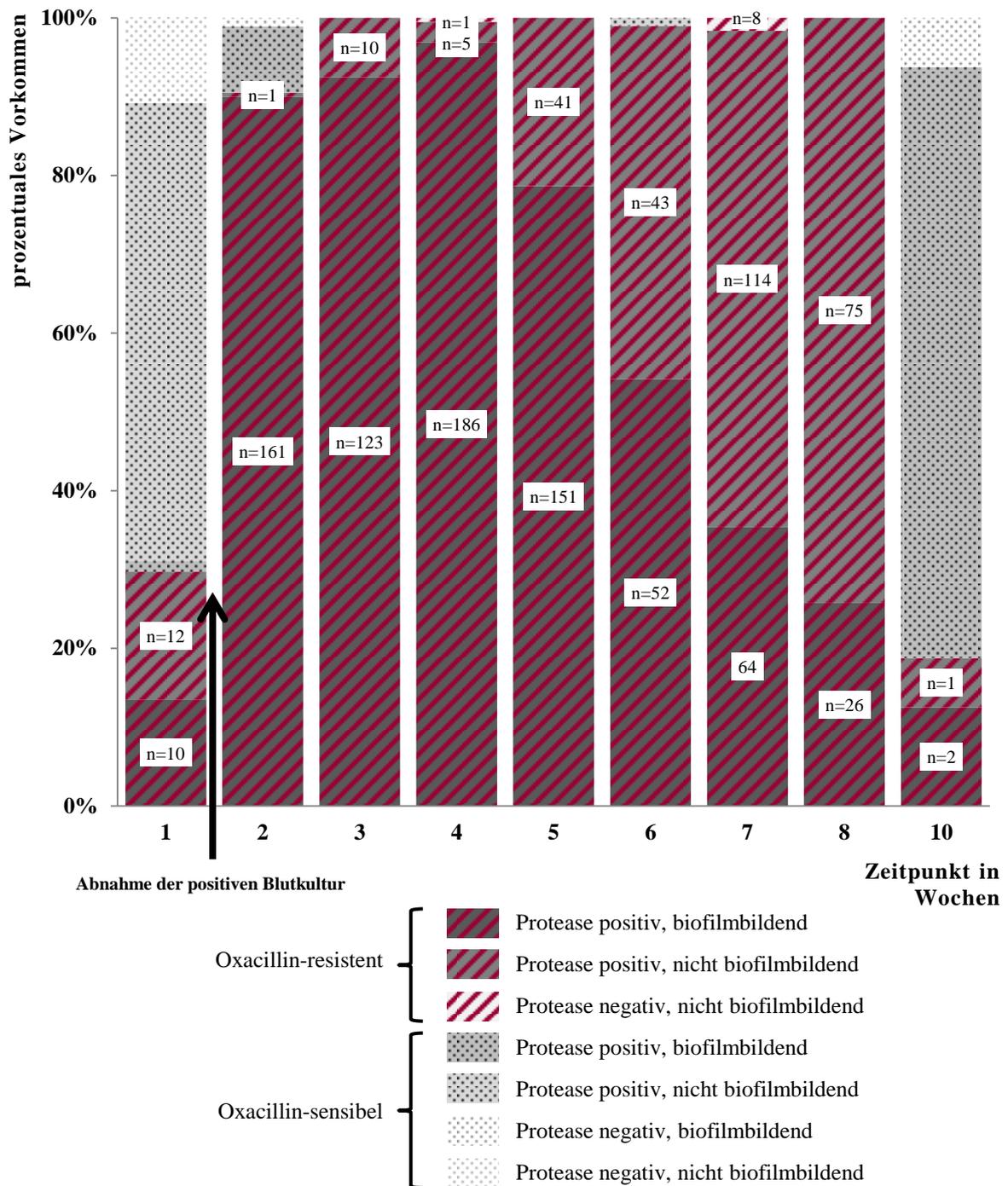


Abbildung 3-6: Prävalenz phänotypischer *S. epidermidis* Muster bei Proband R

Proband R war in der ersten Lebenswoche hauptsächlich mit Oxacillin-sensiblen *S. epidermidis* Isolaten kolonisiert (70,3 %). Nach dem Ereignis der klinischen Sepsis zwischen den Hautabstrichen der ersten und zweiten Woche war die Hautflora hauptsächlich von Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten (rot schraffiert) dominiert.

Mithilfe des Goldstandards der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurden deshalb 68 *S. epidermidis* Hautisolat des entsprechenden Neugeborenen aus zehn Lebenswochen mit dem Blutkulturisolat (PFGE-Muster A) verglichen. Die Auswahl der Isolate erfolgte wochenweise nach der phänotypischen Unterscheidung, wobei möglichst ein Isolat pro Gruppe bzw. mehrere Isolate bei geringerer Gruppenanzahl für einen Vergleich herangezogen worden sind (Tabelle Anhang-3). Die vordefinierte Auswahl ergab zwölf verschiedene Bandenmuster, in der eine mehrfache Übereinstimmung zwischen dem Blutkulturisolat (PFGE-Muster A) und mehreren Hautisolaten (n=16) der ersten sieben Wochen zu finden gewesen ist (Daten nur auszugsweise, Abbildung 3-7). Die PFGE-Muster A, B, C, I und J wiesen hierbei verschiedene Muster des phänotypischen Screenings der Hautisolat auf (Tabelle 3-5, Abbildung 3-7, Tabelle Anhang-3).

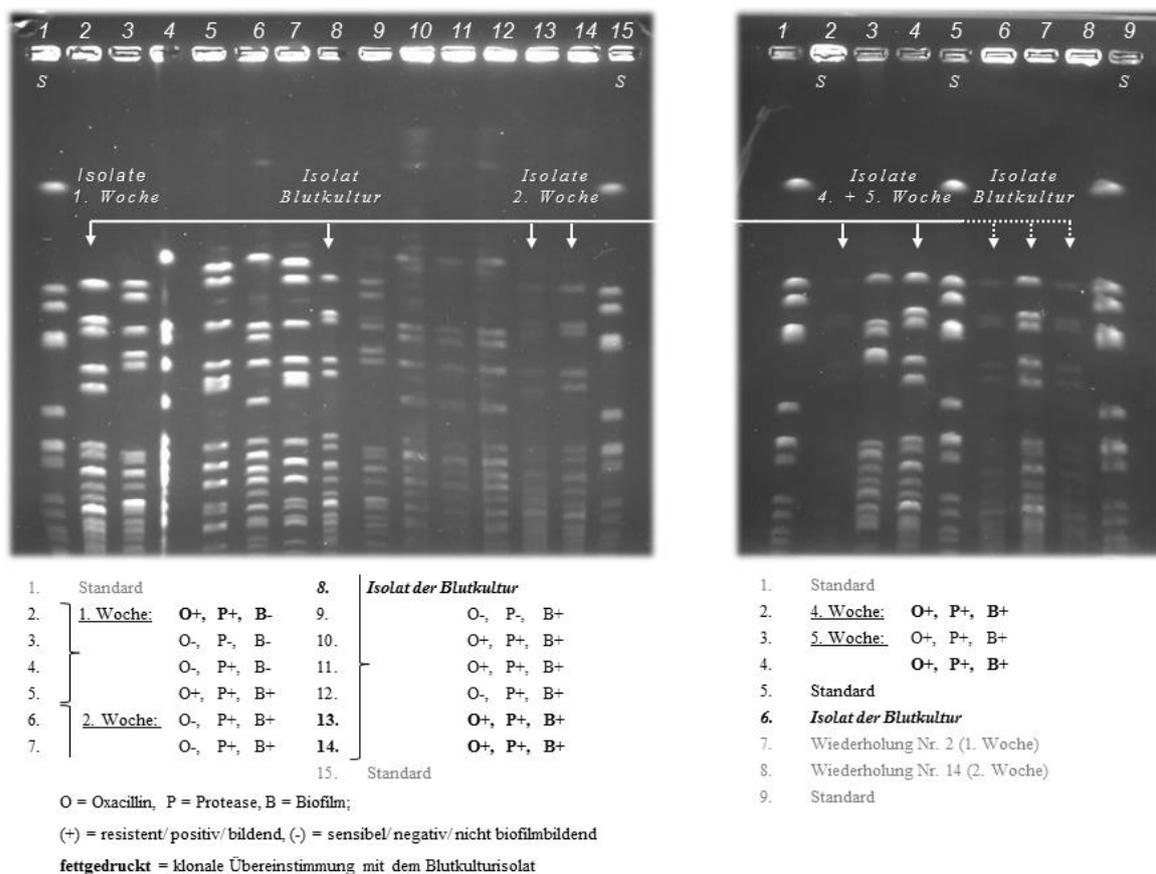


Abbildung 3-7: Molekularbiologische Verwandtschaft ausgewählter *S. epidermidis*

Isolate des Probanden R mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Ausschnitt)

Verschiedene Hautisolat der ersten sowie der nachfolgenden Wochen wiesen das gleiche PFGE-Bandenmuster wie das Blutkulturisolat des Probanden auf. Außerdem präsentierten gleiche phänotypische Muster der Isolate unterschiedliche PFGE-Muster.

Tabelle 3-5: Vergleich des PFGE-Musters und des phänotypischen Screenings ausgewählter Isolate

Anzahl der Isolate		Oxacillin-resistent				Oxacillin-sensibel			
		Protease +		Protease -		Protease +		Protease -	
PFGE-Muster	MLST-ST	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -
A (n=16)	5 (n=5)	14 ^a	1 ^b		1				
B (n=2)	494(n=2)							1 ^c	1 ^d
C (n=10)	2 (n=1)	7				2	1 ^e		
D (n=11)	81 (n=2)	11 ^f							
E (n=1)			1						
F (n=1)			1						
G (n=8)	22 (n=1)	8 ^g							
H (n=2)			2						
I (n=12)		1	9		2				
J (n=3)	59 (n=1)	2 ^h	1						
K (n=1)						1			
L (n=1)		1							

^a MLST ST 5 n=4 (2.,4.,5. u. 7. Woche), ^b MLST ST 5 n=1 (1. Woche) (alle Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^c MLST ST 494 n=1 (1. Woche), ^d MLST ST 494 n=1 (2. Woche) (beide Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^e MLST ST 2 n=1 (1. Woche)

^f MLST ST81 n=2 (1. und 4. Woche) (beide Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^g MLST ST 22 n=1 (5. Woche)

^h MLST ST 59 n=1 (8. Woche)

Das Isolat der positiven Blutkultur, zwölf mit der PFGE charakterisierte Isolate und drei zusätzliche Hautisolate wurden ebenfalls mit MLST typisiert, um eine noch detailliertere klonale Unterscheidung zu erreichen. Hierfür wurden alle vier phänotypisch unterschiedlichen Isolate der ersten Lebenswoche, je ein Oxacillin resistentes bzw. sensibles Isolat aus den dominierenden Gruppen der zweiten Woche, sowie weitere sechs andere Hautisolate mit dem dominierenden Muster einer Oxacillinresistenz und einer positiven Proteasebildung aus der vierten (n=2), fünften (n=2), siebten (n=1) und achten Woche (n=1) eingeschlossen. Zusätzlich wurden noch drei weitere Isolate aus der ersten (n=1) und zweiten Woche (n=1), die ein ähnliches phänotypisches Muster (Oxacillin-resistent, Protease positiv und biofilmbildend) wie das Blutkulturisolat aufwiesen und nicht durch PFGE charakterisiert worden sind, untersucht. Einerseits sollte

so der interessante Übergang zwischen der ersten und zweiten Woche anhand schon vordefinierter Isolate verglichen, eine mögliche Klonalität zwischen positiven Haut- und Blutkulturisolat mittels MLST näher eruiert und andererseits die Stärken und Methodik des MLST in Bezug auf die Fragestellungen einer phänotypischen Klonalitätseinteilung ergänzt werden.

Das positive Blutkulturisolat konnte ebenfalls in Übereinstimmung mit dem PFGE-Muster A als Sequenztyp (ST) Nr. 5 typisiert werden. Alle MLST sequenzierten Isolate deckten sich mit den Ergebnissen der PFGE, Abweichungen in der Fähigkeit zur Biofilmbildung wurden in der Wiederholung nicht bestätigt. Die drei zusätzlichen Hautisolate gehörten in der ersten Woche zum ST 2 und ST 5, sowie in der zweiten Woche ebenso zum ST 5. Auf Grundlage dieser Auswahl konnten damit bei Proband R sechs verschiedene MLST-Sequenztypen (ST 2 n=3, ST 5 n=6, ST 22 n=1, ST 59 n=1, ST 81 n=2, ST 494 n=2) nachgewiesen und teilweise mit bestimmten PFGE-Mustern assoziiert werden (Tabelle 3-5, Tabelle Anhang-3).

Die Methoden der PFGE und MLST sind sehr teuer, arbeits- und zeitaufwendig, dementsprechend wurde als Alternative die Diversilab-Methode zur schnelleren Untersuchung von molekularen Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Bakterien-Isolaten in Bezug auf unsere Studie ausprobiert. Sieben exemplarische und mittels MLST oder PFGE vorcharakterisierte Isolate wurden hierfür von Proband R untersucht. Für einen umfassenden Vergleich wurden folglich drei Isolate mit dem ST 5 aus der ersten, zweiten und vierten Lebenswoche, das Blutkulturisolat und im Unterschied dazu das Oxacillin-sensible Hautisolat mit dem ST 494 aus der zweiten Lebenswoche ausgewählt. Additiv wurden noch drei weitere Isolate der ST 2, 81 und 22 aus der zweiten, vierten und fünften Lebenswoche hinzugenommen. Bei der Durchführung wurde das Isolat der Blutkultur und ein Hautisolat mit dem ST 5 mehrfach mit eingeschlossen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bewerten zu können. Alle Isolate mit dem ST 5 zeigten mittels Diversilab-Methode und dem Software unterstütztem Algorithmus nach Kullback-Leibler ein vergleichbares Verwandtschaftsverhältnis, wobei das Cluster im Zusammenhang mit diesen ausgewählten Isolaten und bzgl. der Reproduzierbarkeit deutliche Abstufungen offenbarte. Im Vergleich ist das Oxacillin-sensible Isolat mit dem ST 494 ebenfalls nicht methodisch abzugrenzen (Abbildung 3-8). Die Abgrenzung zu den anderen MLST typisierten Isolaten ist methodisch (< 97 % Ähnlichkeit) ausreichend.

Bei genauerer Betrachtung der Isolate von ST 5 und ST 494 wird deutlich, dass der molekulare Unterschied bzgl. MLST nur in einer Gensequenz von *gtr* ist. Ein größerer verwandtschaftlicher Unterschied ist aber wiederum in der PFGE in mindestens vier Banden begründet. Vergleichend zur PFGE und MLST ist auch bei der Diversilab-Methode ein unterschiedliches Cluster von phänotypisch ähnlichen Mustern gegeben.

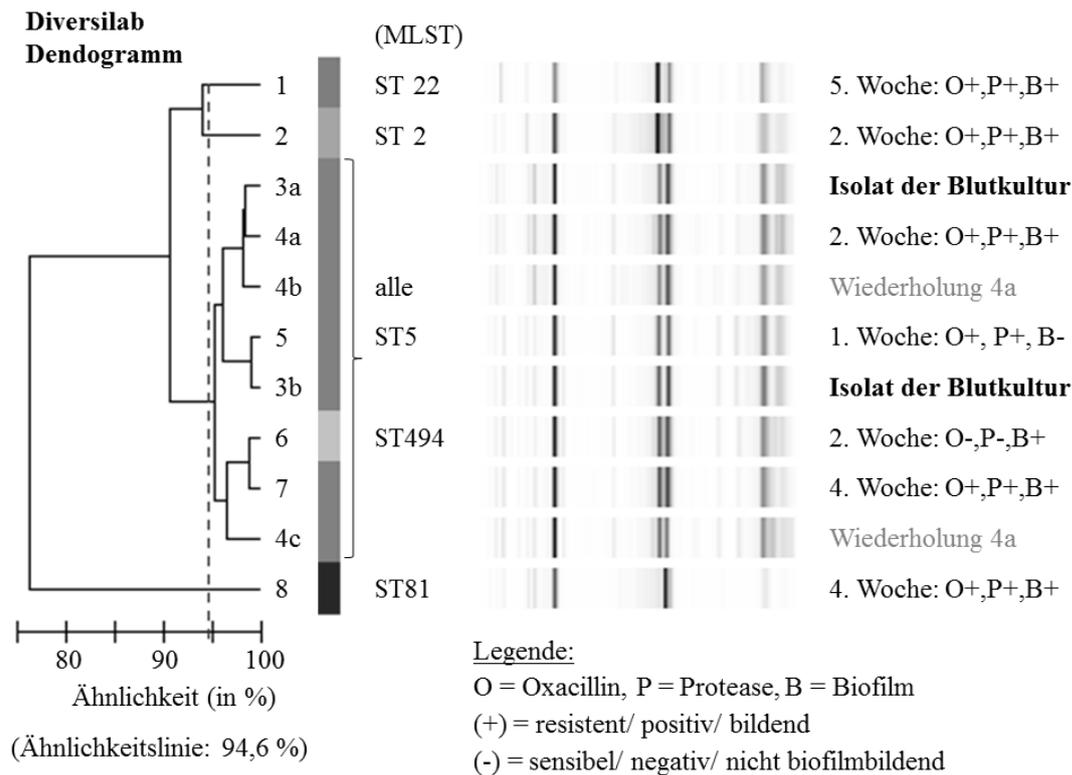


Abbildung 3-8: Molekularbiologische Verwandtschaft ausgewählter *S. epidermidis* Isolate des Probanden R mittels der Diversilab-Methode

Alle Isolate mit dem MLST ST 5 zeigten mittels Diversilab-Methode und dem Software unterstütztem Algorithmus nach Kullback-Leibler ein vergleichbares Verwandtschaftsverhältnis, bzgl. der Reproduzierbarkeit (vgl. Wiederholungen) sowie der methodischen Abgrenzbarkeit (vgl. ST 494) offenbarten sich gewisse Schwächen.

3.4. Klonale Verwandtschaft der *S. epidermidis* Stämme

Auf der Grundlage der charakterisierten Stammsammlung und des bekannten Sepsis-Isolats wurden von jedem Probanden möglichst zwei zufällig ausgewählte *S. epidermidis* Isolate molekularbiologisch weiter charakterisiert. Die Auswahl erfolgte erstens nach der Oxacillinresistenz, zweitens einer möglichst unterschiedlichen Proteaseaktivität und drittens einer evtl. Biofilmbildung.

Durch molekulare Typisierung repräsentativer Isolate (n=96) der ersten Lebenswochen von 16 Neugeborenen der NGS (n=32) und 31 Neugeborenen der NITS (n=64) sollte die Diversität innerhalb der nachgewiesenen *S. epidermidis* Isolate sowie die Frequenz des Vorkommens des Sequenztyps ST 5 mittels MLST untersucht werden. Von allen Isolaten wurde hierbei die phänotypische Biofilmbildung in einem qualitativen Ansatz wiederholt und das Vorhandensein des *mecA* und *icaA* Gens geprüft (Tabelle Anhang-3).

Insgesamt konnten 21 verschiedene Sequenztypen gefunden werden, wobei Isolate mit dem ST 5 auf der NITS (n=30/ 64) und Isolate mit dem ST 89 auf der NGS (n=6/ 32) am häufigsten vorkamen. Bei Betrachtung aller in die Studie eingeschlossenen Probanden waren damit 60,6 % der Neugeborenen der NITS (n=20/ 33) und 27,8 % der Neugeborenen der NGS mit dem ST 5 kolonisiert. Weitere häufig vorkommende Sequenztypen waren noch ST 89 (n=16), ST 2 (n=11), ST 59 (n=6) oder ST 81 (n=5) (Tabelle 3-6).

Die MLST sequenzierten Stämme wurden zusätzlich qualitativ auf ihre Biofilmbildung untersucht. Hierbei wurden einige Stämme nachträglich als biofilmbildend charakterisiert (ST 5 n=9, ST 89 n=9, ST 59 n=3, ST 81 n=2, ST 2 n=2, ST 21, ST 88, ST 327 und ST 22 je n=1). Nur dreimal konnte ein Biofilm-positiver Phänotyp im initialen Screening nicht bestätigt werden (ST 5 n=2, ST 81 n=1). Ein positiver molekularbiologischer Nachweis des *icaA*-Gens wurde bei 12 Isolaten der NITS (ST 2 n=8, ST 22, ST 35, ST 54 und ST 142 je n=1) und 5 Isolaten der NGS (ST 2 n=4, ST NEW n=1) geführt. Alle Isolate waren in der phänotypischen Testung ebenfalls biofilmbildend. Isolate mit den Sequenztypen 5, 59 und 81 wurden zudem mit einem Protease positiven oder negativen Phänotyp nachgewiesen (Tabelle Anhang-3).

Tabelle 3-6: Anzahl der gefundenen MLST Sequenztypen in der ersten Lebenswoche

ST	NITS* (Proband, n=31)	NGS* (Proband, n=16)	Gesamt*
5	30 (46,9 %) (n=20)	6 (18,8 %) (n=5)	36 (37,9 %) (n=25)
89	8 (12,5 %) (n=6)	8 (25,0 %) (n=6)	16 (16,8 %) (n=12)
2	8 (12,5 %) (n=7)	4 (12,5 %) (n=3)	11 (12,6 %) (n=10)
59	3 (4,7 %) (n=3)	3 (9,4 %) (n=2)	6 (6,3 %) (n=5)
81	5 (7,8 %) (n=3)		5 (5,3 %) (n=3)
22	2 (3,1 %) (n=1)		2 (2,1 %) (n=1)
88		2 (6,3 %) (n=1)	2 (2,1 %) (n=2)
130		2 (6,3 %) (n=2)	2 (2,1 %) (n=2)
327		2 (6,3 %) (n=1)	2 (2,1 %) (n=1)
Sequenztyp 21, 35, 54, 66, 142, 454 bzw. 6, 190, 496 und 497 wurden jeweils nur einmal bei jeweils einem Probanden der NITS bzw. der NGS nachgewiesen. Auf beiden Stationen wurde jeweils ein neuer und noch nicht näher beschriebener Sequenztyp gefunden			
	64	32	96

* Anzahl der Isolate/ Anzahl der Isolate in %/ Anzahl der kolonisierten Probanden

Zurzeit sind 552 verschiedene MLST Sequenztypen von *S. epidermidis* bekannt. Diese lassen sich in 20 verschiedene Gruppen mit neun verschiedenen Klonalen-Komplexen (CC) einteilen (CC5, 365, 547, 193, 171, 19, 33, 490, 72 und 10 Gruppen ohne Zuordnung zu einem Klonalen-Komplex, sowie 128 einzelne STs ohne Gruppenzugehörigkeit). Die verwandtschaftliche Zuordnung und Einteilung in Klonale-Komplexe beruht auf der Ähnlichkeit und den Abweichungen in den unterschiedlich untersuchten Allelen. Die Sequenztypen werden hierbei algorithmisch anhand der Abweichungen angeordnet.

Alle gefundenen Sequenztypen der NITS und der NGS sind bis auf ST 66 im Klonalen-Komplex 5 beheimatet und mit entsprechender klonalen Zugehörigkeit im „Population Snapshot“ in Abbildung 3-9 dargestellt. ST 5 ist gleichzeitig der „primary

founder“, d.h. der Sequenztyp mit den meisten *single-locus-variants (SLV)*, also den meisten Sequenztypen, die in der Übereinstimmung in nur einem Allel abweichen.

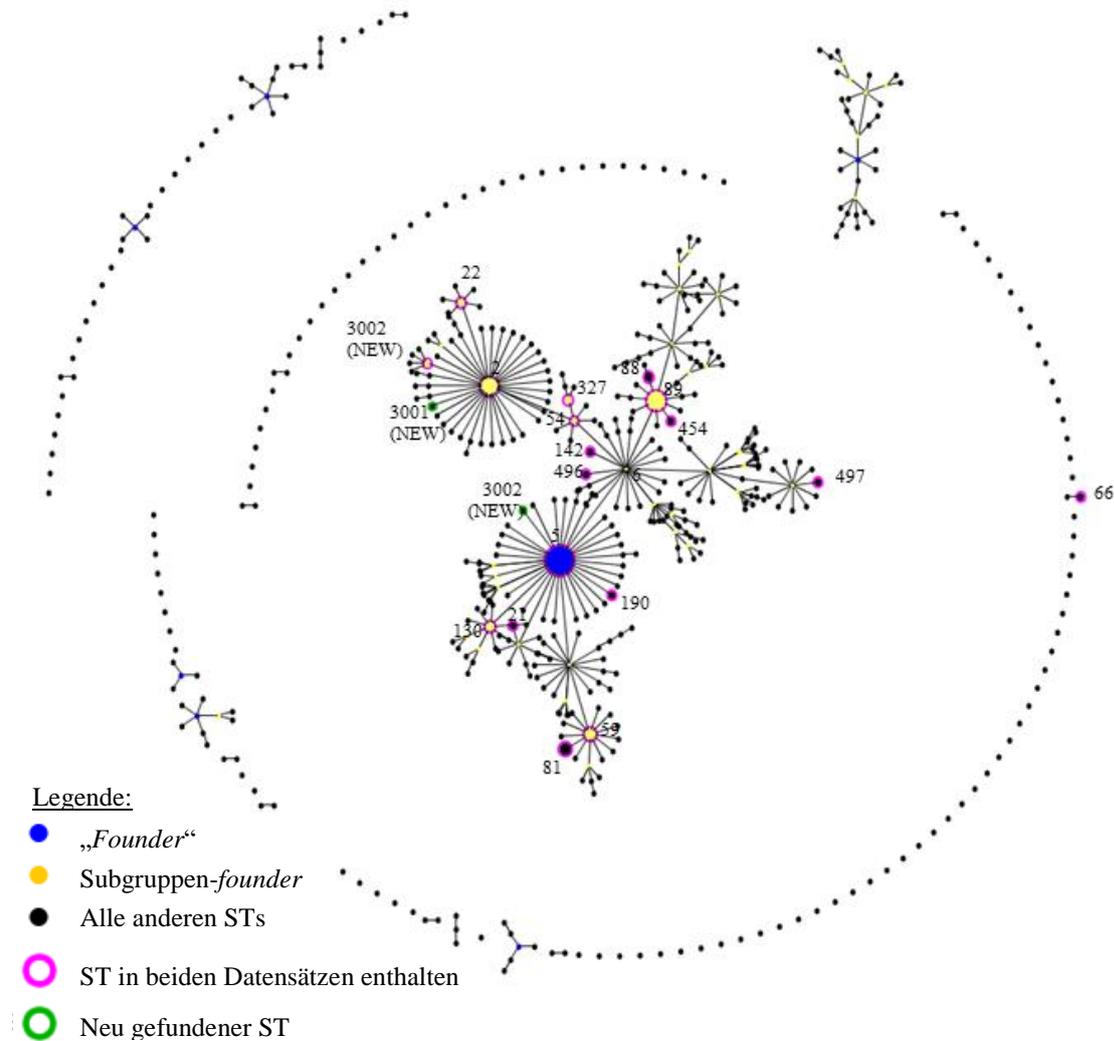


Abbildung 3-9: „Population Snapshot“ der typisierten MLST-Sequenztypen der ersten Lebenswoche

Vergleich aller weltweit bekannten MLST-Sequenztypen zu den typisierten Sequenztypen der *S. epidermidis* Neugeborenenisolate der ersten Lebenswoche. Alle gefundenen Sequenztypen außer ST 66 clustern im Klonalen Komplex 5, zudem sind zwei Sequenztypen (ST 3001 und ST 3002) erstmalig gefunden worden.

Bei alleiniger Betrachtung der gefunden Sequenztypen der ersten Lebenswoche der NITS im Vergleich zur NGS sind drei dominante Gruppen erkennbar (CC2, CC5, CC59) (Abbildung 3-10). Insgesamt wurden 20 verschiedene Sequenztypen gefunden, wobei fünf auf beiden Stationen vorhanden waren (ST 2, 5, 59, 89 und 130), neun nur auf der NITS (ST 21, 22, 35, 54, 66, 81, 142, 454 und ein NEW (3002)) und sechs nur auf der NGS (ST 88, 190, 327, 496, 497 und ein NEW (3001)).

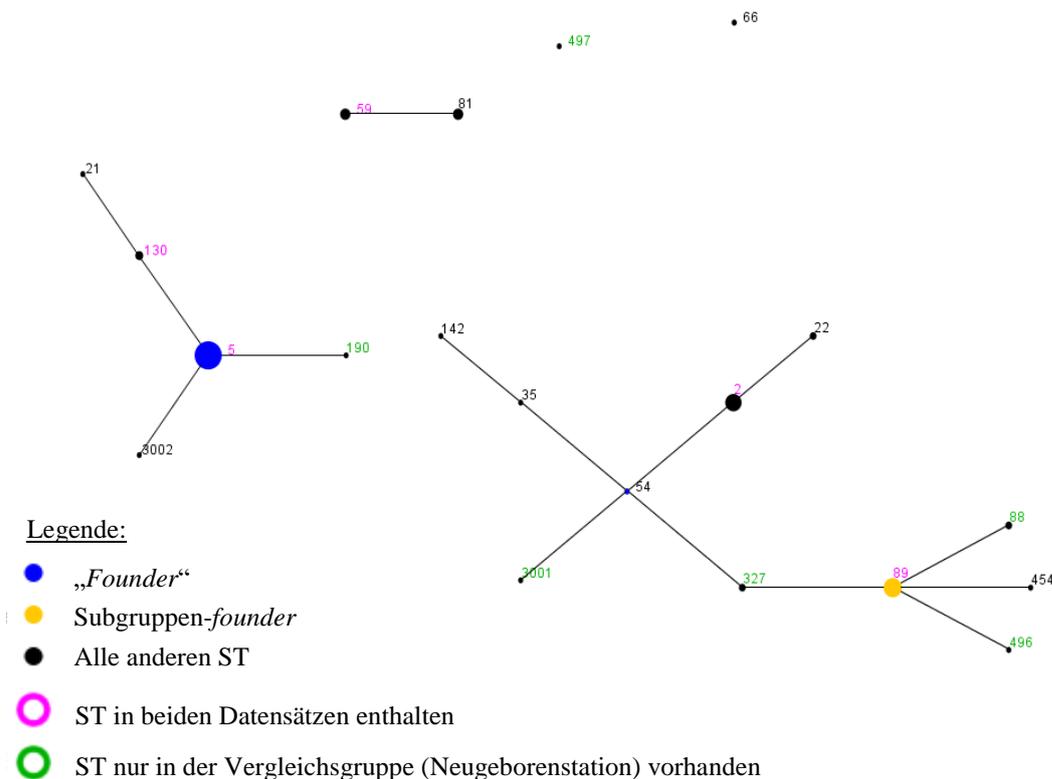


Abbildung 3-10: „Population Snapshot“ der typisierten Sequenztypen der Intensiv- und Neugeborenenstation der ersten Lebenswoche

Vergleich der typisierten *S. epidermidis* MLST-Sequenztypen von Isolaten aus der ersten Lebenswoche der Intensiv- und Neugeborenenstation. Bestimmte Sequenztypen waren stationsabhängig und kamen auf beiden Stationen (schwarze Zahl) oder nur auf der NITS (rosa Zahl) oder der NGS (grüne Zahl) vor.

Die algorithmische Ausrichtung und graphische Darstellung des *primary founders* erfolgt aufgrund der meisten *SLVs*. Eine artifizielle Änderung des *primary founders* zu ST 6 zeigt ebenfalls eine hohe Art von engen Verwandtschaftsbeziehungen der 20 zugehörigen Sequenztypen der gesammelten Isolate entweder durch *single-locus-variants* (n=5/ 20)

oder *double-locus-variants* (n=8/ 20). Der ST 6 gehört zu einem besonderen Isolat von der NGS, das im initialen Screening sowie in der Wiederholung Oxacillin-resistent war, in der molekularbiologischen Analyse aber kein *mecA*-Gen enthielt.

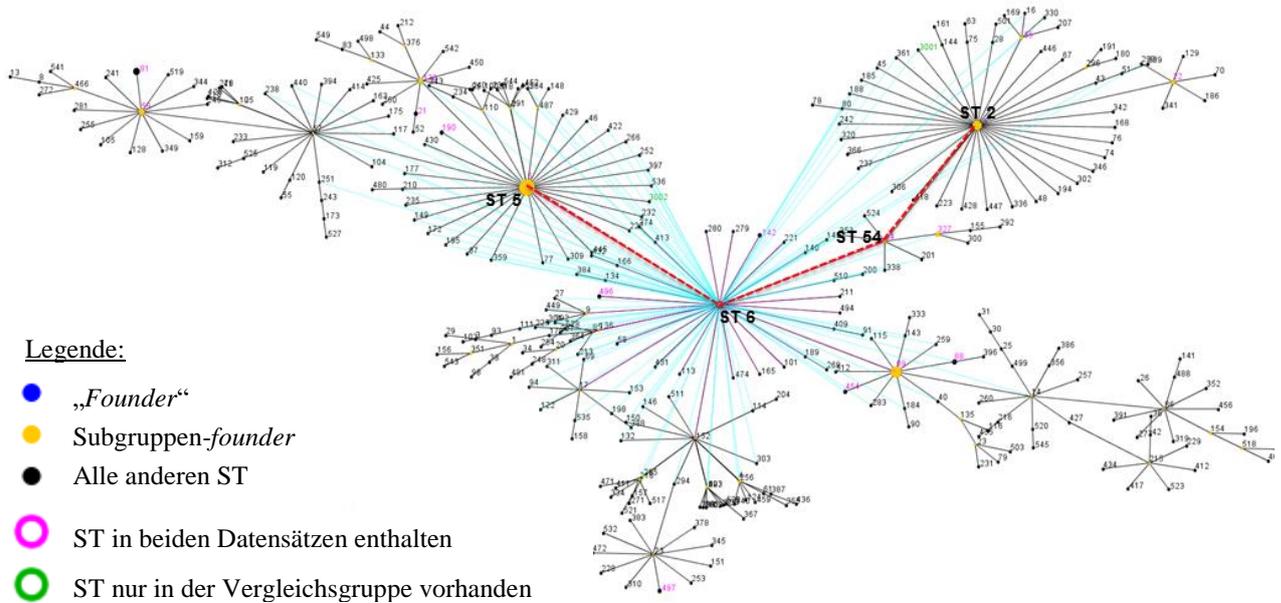


Abbildung 3-11: *eBurst* der typisierten MLST-Sequenztypen der ersten Lebenswoche nach Umstellung des *primary founders* auf den Klonalen-Komplex 6

Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen der typisierten (rosa und grüne Zahl) und aller weltweit bekannten Sequenztypen (schwarze Zahl) zum artifiziiell erzeugten *primary founder* ST 6 (rosa Linien = *single-locus-variants*, türkise Linien = *double-locus-variants*). Hiervon ausgehend mögliche Entwicklungslinie der verschiedenen Klone über die ST 5, 6, 54 und 2 denkbar.

Zu den 96 MLST typisierten Isolaten der ersten Lebenswoche und den acht Isolaten von Proband R aus den nachfolgenden Wochen wurden noch elf weitere Hautisolate mittels MLST und wiederholend auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung analysiert. Drei der Isolate waren Oxacillin-sensible Isolate von Proband R, zwei Oxacillin-sensible Isolate von Neugeborenen der NGS, fünf Oxacillin-resistente Isolate von Proband A aus der dritten bis fünften Lebenswoche, sowie ein Oxacillin-resistentes Isolat von Proband B aus der fünften Woche (Tabelle Anhang-4). Diese Isolate wurden zufällig ausgewählt und für andere, in dieser Dissertation nicht näher erwähnte, Projekte charakterisiert. Ein Isolat mit

dem ST 2 aus der ersten Woche von Proband R war hierbei erstmalig im Oxacillin-Screening sensibel und konnte durch eine negative *mecA*-PCR ebenfalls bestätigt werden.

Infolgedessen konnte bei 115 Isolaten die Biofilmtestung der Screening-Methode und des standardisierten Testverfahrens verglichen werden, wobei 86,1 % der Isolate (n=99/ 115) eine phänotypische Biofilmbildung aufwiesen (Tabelle 3-7). Die Sensitivität war hierbei 68,7 % (n=86/ 99), die Spezifität 31,3 % (n=5/ 16), der positive prädiktive Wert 86,1 % (n=68/ 79) und der negative prädiktive Wert 13,8 % (n=5/ 36). Nur 63,5 % der Isolate (n=73/ 115) wurden demzufolge korrekt klassifiziert.

Tabelle 3-7: Vergleich der Biofilmtestung im Einfach- und Mehrfachansatz

Anzahl der Isolate		Biofilmtestung stand. Testverfahren		
		positiv	negativ	
Biofilmtestung Screening- Methode	positiv	68	11	79
	negativ	31	5	36
		99	16	115

Gleichzeitig konnte in der molekularbiologischen Untersuchung festgestellt werden, dass alle Isolate mit einer vorhandenen *icaA*-Gensequenz in dieser Studie auch biofilmbildend waren (n=24/ 115). Die Mehrzahl der Isolate (n=75/ 115) konnte aber einen *icaA* unabhängigen Biofilm exprimieren (Tabelle 3-8). PIA abhängige Biofilme waren dagegen deutlich stärker in der phänotypischen Expression des Biofilms als nicht-PIA abhängige Biofilme, dieses zeigte sich vor allem im Wachstumsmedium mit TSB_{EtOH} (Abbildung Anhang-2).

Tabelle 3-8: Vergleich des Nachweises des *icaA*-Gens zur Biofilmtestung

Anzahl der Isolate		<i>icaA</i> -PCR		
		positiv	negativ	
Biofilmtestung Screening- Methode	positiv	24	75	99
	TSB	0		
	TSB _{Eth}	3		
	TSB+ TSB _{EIOH}	21		
	negativ	0	16	16
		24	91	115

Das Oxacillin-Screening hatte eine 100 %ige Sensitivität (n=110/ 110) und eine 85,7 %ige Spezifität (n=6/ 7). Nur ein Isolat wurde falsch positiv getestet (n=1/ 100) (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Vergleich des Oxacillin-Screeningagars zur *mecA*-PCR

Anzahl der Isolate		<i>mecA</i> -PCR		
		positiv	negativ	
Oxacillin- Screening	positiv	110	1	111
	negativ	0	6	6
		110	7	117

Von den 115 MLST typisierten Hautisolaten wurden 26 Isolate für einen Vergleich mit dem Diversilab-System ausgewählt. Die bei Proband R schon eingeschlossenen Isolate wurden ebenfalls in dieser Analyse mitverwendet. Zu den drei Hautisolaten von Proband R mit ST 5 wurden acht weitere Isolate mit dem gleichen ST von verschiedenen Neugeborenen zum Vergleich zufällig ausgewählt. Zusätzlich wurden noch drei Isolate von ST 2 und zwei Isolate von ST 498 genommen. Die restlichen zehn Isolate wurden von verschiedensten Sequenztypen gewählt, um eine große unterschiedliche Diversität für eine Evaluierung zwischen MLST, Diversilab und phänotypischem Muster gewährleisten zu

können (Tabelle Anhang-3, Tabelle Anhang-4). Das nachgewiesene Isolat der Blutkultur von Proband R wurde ebenso eingeschlossen, zudem wurden einige Proben wiederholt untersucht. Es wurde der Software unterstützende Algorithmus nach Kullback-Leibler benutzt. Das erzeugte Diversilab-Dendrogramm visualisiert ein vergleichbares Cluster von Verwandtschaftsverhältnissen zu den entsprechenden MLST-Sequenztypen (Abbildung 3-13). Die Gruppen mit mehreren Isolaten einer Sequenzgruppe (ST 2, ST 5 und ST 498) sind zueinander assoziiert, einzelne Sequenztypen sind größtenteils abgrenzbar. Eine sichere Beurteilung der molekularbiologischen Übereinstimmung zwischen Isolaten anhand einer Ähnlichkeit von $> 97\%$ ist aufgrund der hohen Anzahl der Isolate und der Komplexität des Dendogramms nicht möglich. Die Isolate der ST 5, 494 und NEW clustern sehr eng zueinander und unterscheiden sich vom MLST ST 5 nur jeweils in einem Allel der Gensequenz von *gtr* bzw. *tpi*. Dieses Phänomen ist genauso bei ST 2 und ST 22 mit nur einem Allel-Unterschied bei *tpi* erkennbar. Die ST 54 und 89 haben ein sehr enges Verwandtschaftsverhältnis im Diversilab, besitzen in MLST aber Unterschiede in den Genen von *mutS* und *pyr*. Zwei verschiedene Isolate mit dem ST 496 sind einerseits in der Ähnlichkeit mit $< 90\%$ berechnet worden, bei der Wiederholung des einen Isolats aber wiederum zu fast 100% ähnlich. Bei einem Vergleich von 16 Proben nur mit dem ST 5 ist in der Diversilab-Auswertung eine sehr feine Abstufung der einzelnen Proben sichtbar (Abbildung 3-12). Das Isolat von Proband R aus der zweiten Woche clustert in den Probenwiederholungen sehr weit auseinander und die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben ist nur zu $94-95\%$ gegeben, eine direkte Verwandtschaft wäre nach Definition von $> 97\%$ verlangter Ähnlichkeit theoretisch nicht mehr vorliegend.

Zudem wird in beiden Auswertungen erneut deutlich, dass eine Einteilung der Isolate nach den phänotypischen Mustern nicht mit den Clustern des Diversilab-Systems bzw. MLST korreliert.

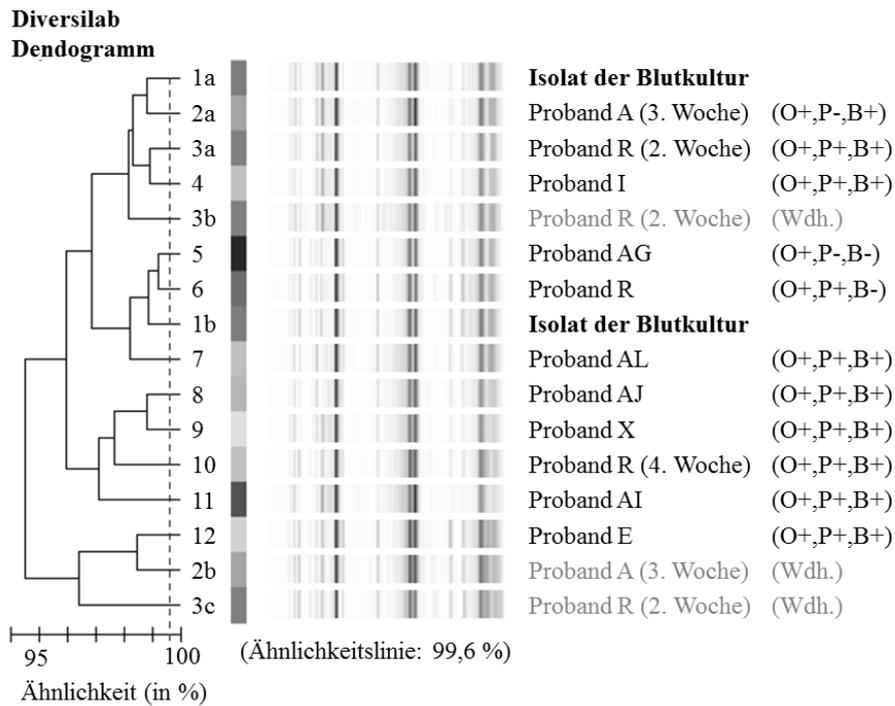


Abbildung 3-12: Vergleich von *S. epidermidis* Isolaten des MLST ST 5 mittels der

Diversilab-Methode

Anhand von 16 Proben vom ST 5 zeigt sich in der Diversilab-Auswertung eine sehr feine Abstufung bzgl. des Clusters der verwandtschaftlichen Beziehung oder der Reproduzierbarkeit, so dass eine sichere methodische Abgrenzbarkeit sowie Beurteilbarkeit der Verwandtschaft nicht gegeben ist.

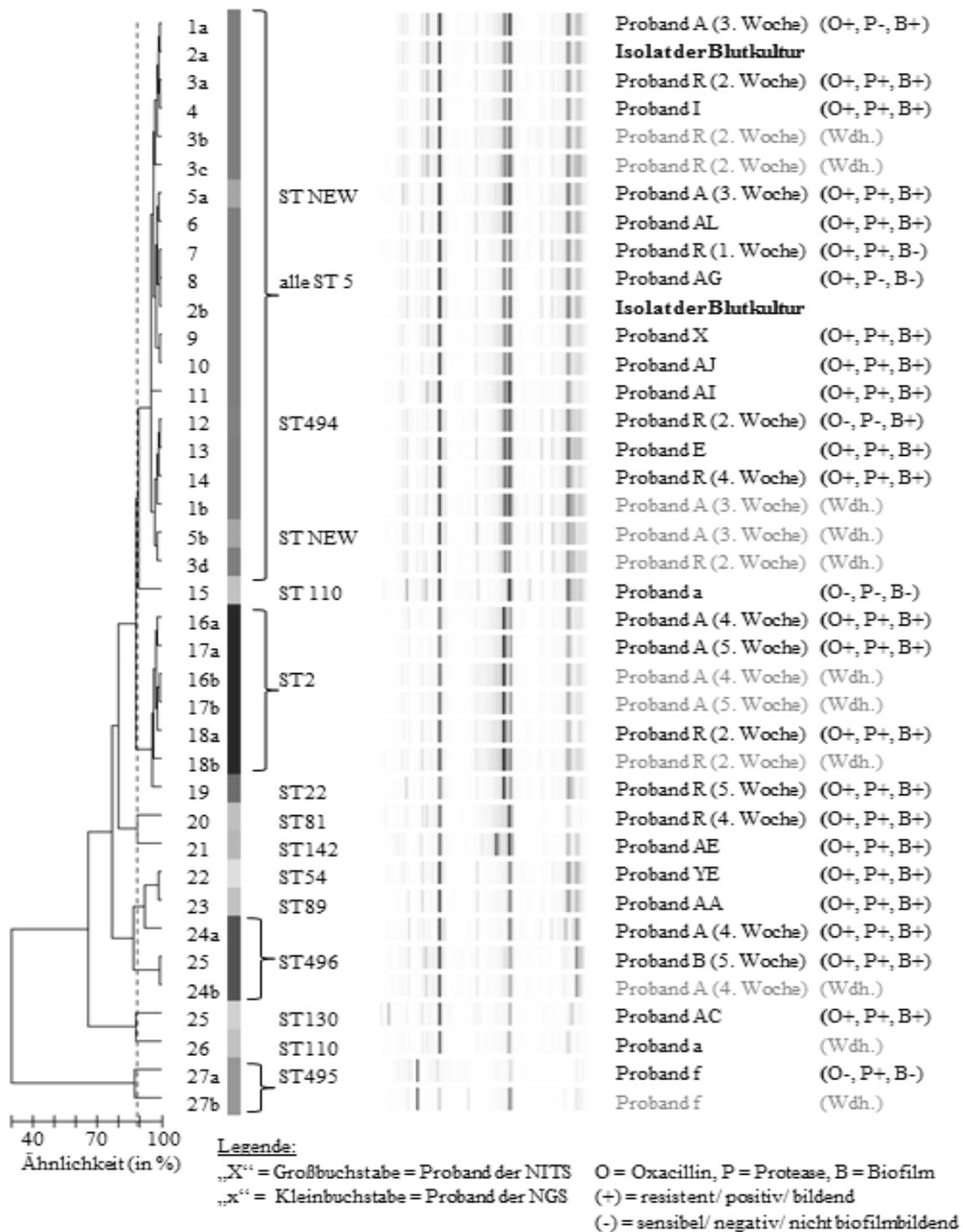


Abbildung 3-13: Klusteranalyse von *S. epidermidis* Isolaten mittels der Diversilab-Methode

Das erzeugte Diversilab-Dendrogramm mit 26 verschiedenen Isolaten visualisiert ein vergleichbares Cluster von Verwandtschaftsverhältnissen zu entsprechenden MLST-Sequenztypen (z.B. ST 2, ST 5 und ST 498), einzelne Sequenztypen sind größtenteils abgrenzbar. Eine sichere Beurteilung der molekularbiologischen Übereinstimmung ist trotzdem nicht sicher möglich.

4. Diskussion

4.1. Erstkolonisation bei Neugeborenen

Die Wandlung der neonatalen Hautkolonisation von einem sterilen zu einem sich ständig und neuer Interaktionen unterworfenen Organismus ist einzigartig und spektakulär (Abschnitt 1.1). Besonders Früh- und Neugeborene sind aufgrund ihres unausgereiften Immunsystems gefährdet und anfällig für Infektionen (Abschnitt 1.7.3.3). Hierbei sind Koagulase-negative Staphylokokken als Bestandteil der neonatalen Hautflora der häufigste Erreger für eine Fremdkörper-assoziierte *Late-Onset*-Sepsis bei Neugeborenen (Abschnitt 1.3 und 1.4). Das Wissen über deren Kolonisation ist daher von hohem Stellenwert, um deren Infektionen besser verstehen und noch aktiver vorbeugen zu können.

Bisherige Studien haben nur eine geringe Anzahl von Staphylokokken der neonatalen Hautflora untersuchen können, so dass ein repräsentativer Überblick über deren Kolonisation nicht gegeben war (Abbildung Anhang-5, Tabelle Anhang-5). Aufgrund dieser bisher unzureichenden Datenlage wurde eine höhere Anzahl von Hautisolaten anhand von phänotypischen Mustern charakterisiert, klassifiziert und analysiert. Spätere molekularbiologische Untersuchungen sollten bei ausgewählten Isolaten die Gruppenbildung anhand der phänotypischen Charakteristika näher untersuchen und die gefundenen Ergebnisse in den international bekannten Kontext einordnen.

Die medizinische und stationäre Versorgung von Neugeborenen, die eine intensivmedizinische Betreuung nach der Geburt benötigen, unterscheidet sich signifikant von Neugeborenen ohne große medizinische Komplikationen, die meistens zusammen mit der Mutter auf einer Normalstation versorgt werden und innerhalb der ersten Lebensstage das Krankenhaus auch wieder verlassen können. Besonders Intensivstationen sind ein Schlachtfeld für die Entwicklung und gegenseitige Transmission von resistenten Bakterien (Maseda *et al.*, 2013) und problematisch für Neugeborene mit der Notwendigkeit einer erhöhten medizinischen Zuwendung (Pong und Bradley, 2004).

Dementsprechend wurde die Hautkolonisation von 41 Neugeborenen einer neonatologischen Intensivstation (NITS) und 30 Neugeborenen einer Neugeborenenstation (NGS) zur Untersuchung ausgewählt. Zwölf Proben von Neugeborenen der NGS und zehn Proben von Neugeborenen der NITS mussten leider wegen fehlender Einschlusskriterien unberücksichtigt bleiben. Der Ausschluss von Patientenproben mit weniger als 50 Isolaten

sollte einen möglicherweise falschen statistischen Einfluss einer zu geringen Anzahl von Isolaten minimieren. Zudem wird deutlich, dass die Erstkolonisation mit Staphylokokken innerhalb der ersten Lebenstage beginnt und teilweise noch eine sterile Hautkolonisation bei Neugeborenen zu finden war. Zwei Neugeborene der Neugeborenenstation waren an den untersuchten Abstrichregionen noch vollständig steril. Obwohl Mikrobiomstudien heutzutage den kulturellen Nachweis ersetzen und die gesamte bakterielle Hautflora nachweisen können, vermitteln sie zurzeit noch keinen vollständigen Einblick in spezifische Pathogenitätsfaktoren der Mikroorganismen. Klassische Kulturbakterien wie Staphylokokken können trotzdem mit vergleichbaren Ergebnissen zu Mikrobiomverfahren kultiviert werden (Dekio *et al.*, 2005).

Die Probengewinnung zwischen der 60. Lebensstunde und dem fünften Lebenstag ist aufgrund von logistischen und koordinativen Gegebenheiten nicht anders möglich gewesen. Eine frühere Probengewinnung war durch Vorversuche als nicht praktikabel erprobt worden, da keine höhere Anzahl von Hautisolaten gewonnen werden konnte. Diese Ergebnisse fanden in dieser Dissertation keine Berücksichtigung und wurden daher nicht dargestellt. Die Proben von Neugeborenen der NGS sind dementsprechend in den meisten Fällen kurz vor deren Entlassung im Rahmen der U2-Untersuchung am dritten Lebenstag gewonnen worden. Zukünftige Studien sollten zur besseren Vergleichbarkeit den ersten Zeitpunkt der Probengewinnung enger definieren oder die Abnahmezeitpunkte zwischen den zu vergleichenden Stationen randomisieren sowie vorherige Manipulationen an der neonatalen Hautflora durch medizinische bzw. personenbezogene Versorgung des Neugeborenen miteinbeziehen.

Die Unterscheidung zwischen den Proben von Neugeborenen einer NITS und NGS zeigte, dass die Erstkolonisation mit Staphylokokken von der Station, auf der das Neugeborene versorgt wird, abhängig ist. So waren innerhalb der ersten fünf Tage nach der Geburt 87,7 % der Isolate der NITS (n=3848/ 4389), aber nur 40,4 % der Isolate der NGS (n=808/ 2000) Oxacillin-resistent (Tabelle 3-2). Die erhobenen Ergebnisse mit dem hohen Anteil von 85,4 % Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten auf der NITS (Tabelle 3-2) sind vergleichbar zu ähnlichen Studien von D'Angio 1989 oder Nyström 1992 (D'Angio *et al.*, 1989; Nyström *et al.*, 1992). Die hohe Anzahl von Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Isolaten sollte aufmerksam beobachtet werden, da sie ein Genpool für neue *SCCmec* Typen und möglicherweise Ursprung und Reservoir für *S. aureus* sein könnten (Ziebuhr *et al.*, 2006). Die Neugeborenen der NGS wiesen mit neun verschiedenen Staphylokokkenspezies

und seltener zu findenden Staphylokokken wie *S. cohnii*, *S. lugdunensis* oder *S. pasteurii* eine insgesamt größere Anzahl als die Neugeborenen der NITS auf. Eine denkbare Erklärung für die höhere Diversität der Staphylokokkenspezies bei Neugeborenen der NGS wäre die Möglichkeit eines erhöhten Personen- und Umweltkontaktes, die bei Neugeborenen einer NITS durch die intensivmedizinische Versorgung stark eingeschränkt ist.

Vielfache Studien konnten die Transmission von Bakterien(klonen) zwischen den Neugeborenen, dem Personal, den Eltern und der Umwelt, sowie die Veränderung des dermalen Mikrobioms durch Manipulation, belegen (Carr und Kloos, 1977; Dominguez-Bello *et al.*, 2010; Eastick *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1990a; Keyworth *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 1991; Nyström *et al.*, 1992; Sarkany und Gaylarde, 1967, 1968). Inwieweit die Beeinflussung der Hautkolonisation durch die bakterielle Transmission während des Geburtsvorganges oder durch die spätere Versorgung des Neugeborenen stattfindet, müsste im Detail noch genauer analysiert werden. Untersuchungen der Hautkolonisation bei den Müttern bzgl. des Transmissions- und des Resistenzprofils wären daher ebenfalls sinnvoll, da gerade eine aktuelle Studie eine geringe Antibiotikaresistenz bei Müttern beschreibt (Hira *et al.*, 2013). Entscheidend und auch durch diese Studie nicht endgültig lösbar, bleibt die Frage, ob die Mütter oder andere Personen ein Risikofaktor für die Übertragung von Antibiotika-resistenten Staphylokokken sind oder diese durch das unbelebte Umfeld akquiriert bzw. „hochgezüchtet“ werden.

Im Rahmen der Screening-Methode besaßen 82,4 % der *S. epidermidis* Isolate der NGS (n=1.231/ 1.494), aber nur 66,6 % der Isolate der NITS (n=2.467/ 3.705), die Fähigkeit einen phänotypischen Biofilm zu bilden (Tabelle 3-2). Andere Studien mit Hautisolaten von Neugeborenen beschrieben eine standardisiert gemessene Biofilmbildung, die sich aber ebenfalls an der von Christensen beschriebenen Methode orientierte (Christensen *et al.*, 1985), bei etwa 40-45 % (Hall *et al.*, 1990a; Mehta *et al.*, 1991) bzw. 63-68 % der untersuchten Isolate (D'Angio *et al.*, 1989; Hell *et al.*, 2013), die bei einem stationären Aufenthalt sogar bis 95 % biofilmbildender Isolate ansteigen konnte (D'Angio *et al.*, 1989). Leider sind die Ergebnisse zur Messung der Biofilmbildung größtenteils uneinheitlich und in der detaillierten Durchführung bzw. der genauen Grenzwertdefinition einer Biofilmbildung nicht definiert, so dass meistens ein genauer Vergleich nicht möglich ist und genaue Leitlinien zur Messung einer Biofilmbildung wünschenswert sind. Die überraschenderweise höhere Prävalenz biofilmbildender Isolate

auf der NGS deckt sich mit Untersuchungen von Hell *et al.*, die bei invasiven Blutkulturkeimen im Gegensatz zu normalen Hautisolaten proportional zu einer höheren Antibiotikaresistenz eine niedrigere Biofilmbildung gefunden haben (Hell *et al.*, 2013). Im Vergleich beobachtete eine englische Arbeitsgruppe, dass die Biofilmbildung bei Haut- und Blutkulturisolaten von jeweils septischen Neugeborenen gegenüberstellend zu einer gesunden Kontrollgruppe mit Hautabstrichen erhöht war, aber keine *ica* abhängige Assoziation bestand (de Silva *et al.*, 2002). Erstaunlicherweise waren die gesammelten Isolate bei dem Kind mit der Sepsis nach der Infektion ebenfalls deutlich resistenter und mit Beginn der dritten Lebenswoche waren für die folgenden drei Wochen nur noch *S. epidermidis* Stämme auf der Haut zu finden (Tabelle 3-4). Ein *icaA* abhängige Biofilmbildung scheint also für bestimmte Gegebenheiten, wie ggf. der Notwendigkeit einer schnellen Adaptierung an rasch ändernde „Umweltbedingungen“ in Form einer Intensivstation oder einer Blutstrominfektion, nicht unbedingt ein Vorteil zu sein. Vermutlich ist die Bildung von Biofilmen stark assoziiert mit dem individuellen „Fitnessvorteil“ des Bakteriums in der jeweiligen Situation. Hier könnte eine genauere stationsabhängige und qualitative Betrachtung der Biofilmbildung interessant sein. Weitere Forschung ist notwendig, um die Bedeutung und die Mechanismen der Biofilmbildung in nicht Fremdkörper-assoziierten Infektionen zu verstehen.

4.2. Dynamik der Kolonisation bei Frühgeborenen einer Intensivstation

Von den 41 Neugeborenen der NITS konnten zehn Neugeborene über maximal zwölf Lebenswochen weiter auf ihre Hautkolonisation mit Staphylokokken untersucht werden. Alle Probanden waren Frühgeborene, so dass ein längerer Krankenhausaufenthalt für die Probensammlung zu erwarten war.

Im Langzeitverlauf waren *S. epidermidis* sowie mit deutlich geringerer Anzahl folgend *S. haemolyticus* bzw. zwischen der fünften und achten Woche *S. hominis* die am häufigsten isolierten Staphylokokkenspezies (Tabelle 3-3). Die Oxacillinresistenz aller Staphylokokken-Isolate war anfänglich mit 85,1 % (n=1.028/ 1.208) und 74,3 % der *S. epidermidis* Isolate (n=897/ 1.208) vergleichbar zu den 23 einmalig untersuchten Neugeborenen der NITS (alle Staphylokokken n=2.695/ 3.181 (84,7 %), *S. epidermidis* n=2.434/ 2.808 (86,6 %)). Einen Anstieg der Oxacillinresistenz zwischen Aufnahme und Entlassung, wie Ternes bei Koagulase-negativen Staphylokokken bereits beobachtet hatte

(Ternes *et al.*, 2013), konnte auch in dieser Studie für *S. epidermidis* erfasst werden. Die Oxacillinresistenz für alle Staphylokokken war in der ersten und zweiten Woche fast gleichbleibend mit 85,1 % bzw. 88,5 %. Stattdessen waren die *S. epidermidis* Isolate in der ersten Woche zu 74,3 % Oxacillin-resistent, welche in der zweiten Woche noch um 11,1 % auf 85,4 % zunahm. Diese hohe Oxacillinresistenz hielt bis zur fünften Lebenswoche an. Parallel war auch ein Anstieg in der Anzahl der biofilmbildenden Isolate zu erkennen. Einschränkung muss erwähnt werden, dass in den späteren Wochen der Langzeituntersuchung die Oxacillinresistenz auch wieder unter den Aufnahmewert absank (Tabelle 3-3). Zu diesen Zeitpunkten waren die Neugeborenen häufig auf eine Normalstation verlegt worden oder teilweise auch schon entlassen worden. Einen Anstieg der Antibiotikaresistenz konnte auch eine weitere neonatologische Studie beobachten (Hira *et al.*, 2013), ergänzend beschrieben sie eine signifikante Verschiebung der Staphylokokkenspezies von *S. epidermidis* und *S. warneri* zu einem vermehrten Vorkommen von *S. haemolyticus* zwischen dem siebten und 21. Lebenstag. Eine vergleichende Dynamik in der Veränderung der KNS-Verteilung war in diesen Daten erst ab der fünften bzw. sechsten Lebenswoche zu beobachten. Eine Zunahme von *S. haemolyticus* deutete sich in dieser Untersuchung speziell in der zehnten und zwölften Lebenswoche an.

Interessanterweise akquirierte jedes Neugeborene der Intensivstation einen Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Stamm im Verlaufe seines Aufenthaltes, trotzdem war die Kolonisation teilweise sehr individuell (Abbildung 3-5). Die Anzahl der unterschiedlichen Staphylokokkenspezies nahm gegen Ende des Krankenhausaufenthaltes tendenziell zu und die Oxacillinresistenz ab (Tabelle 3-3, Abbildung 3-4).

Eine nur für zwei Wochen vorkommende, transiente *S. aureus* Kolonisation bei einem der Neugeborenen, eine unterschiedliche Prävalenz der Oxacillinresistenz oder eine Verschiebung der unterschiedlich charakterisierten Staphylokokkenmuster scheinen Ausdruck einer aktiven Regulierung der Hautflora zu sein. So ist die Kolonisation der Hautflora wahrscheinlich ein hochkomplexes Zusammenspiel der verschiedenen Mikroorganismen und der menschlichen Haut, die in Bezug auf die Bedeutung der Hautkolonisation bisher nur ansatzweise verstanden worden ist (Abschnitt 1.7.3.1 und 1.7.3.2). Andererseits könnten auch externe Gegebenheiten wie die tägliche Versorgung mit Waschungen und Ähnlichem zu diesem Wandel geführt haben, wobei das Kolonisationsmuster mutmaßlich nicht durch Hygieneroutinemaßnahmen beeinflusst wird

(Eriksson *et al.*, 1982). Einschränkend muss außerdem berücksichtigt werden, dass Variablen wie klinischer Verlauf, genauere Stationsverlegungen, Antibiotikagaben, Besonderheiten der Pflege oder Personal- und Familienkontakte bewusst aufgrund der Informationsfülle und -verarbeitung nicht berücksichtigt und korreliert worden sind. Nachfolgende Untersuchungen sollten daher vor allem die familiären Kontakte näher analysieren.

Die teilweise sehr unterschiedlichen phänotypischen Muster der verschiedenen Isolate (Tabelle 3-3) verdeutlichen ein variables und instabiles bzw. vermutlich eher lokalisationsunabhängiges und schwankungsunterworfenes Mikrobiom der Neugeborenenhaut, welches Keyworth, Eastick oder auch Capone schon beschrieben und vermuteten (Capone *et al.*, 2011; Eastick *et al.*, 1996; Keyworth *et al.*, 1992). Die gemeinsame Auswertung der Isolate von der Ellenbeuge- und des Knöchels der Neugeborenen ist daher keine statistische Schwäche, sondern sogar sinnvoll gewesen.

Weil besonders Frühgeborene immunologische Schwächen bzgl. der immunologischen Hautentwicklung und gegenüber Staphylokokkeninfektionen haben (Abschnitt 1.7.3.3), wäre eine genaue Assoziation der zeitlichen Frühgeburtlichkeit mit der jeweiligen, individuellen Hautkolonisation und deren Virulenzfaktoren interessant. Dieses konnte leider im Rahmen dieser Pilotstudie nicht gewährleistet werden.

4.3. Klonale Analyse ausgewählter Isolate

Eines der untersuchten Frühgeborenen entwickelte im Verlauf seines Aufenthalts auf der NITS eine Sepsis mit einem *S. epidermidis* Isolat (Abschnitt 3.3). Durch die wöchentliche Gewinnung von Hautisolaten konnte eindeutig der Sepsis verursachende *S. epidermidis* Klon vor und nach der Infektion auf der Haut mittels MLST, PFGE oder der Diversilab-Methode nachgewiesen werden (Tabelle 3-5). Die Untersuchung der Isolate erfolgte initial mittels PFGE, dem Goldstandard zur klonalen Analyse von Isolaten, um mit bestmöglicher Diskrimination lokal zwischen den verschiedenen Hautisolaten und dem Blutkulturisolat vergleichen und die Übereinstimmung beweisen zu können (Tabelle 3-5, Abbildung 3-7). Anschließend wurde das Isolat der Blutkultur noch mit MLST typisiert. Dessen spezifischer Sequenztyp 5 ist ein sehr häufiger kolonisations- und weltweit infektionsverursachender Klon und mittlerweile der entscheidende Angelpunkt in der Betrachtung der klonalen Zusammenhänge bei MLST (Rolo *et al.*, 2012). Die sehr häufig

vorkommenden ST 2 und ST 5 sind teilweise mit einer hohen Antibiotikaresistenz assoziiert, die einschließlich Reserveantibiotika wie Linezolid umfassen (Mendes *et al.*, 2012).

Anschließend wurden exemplarisch repräsentative Isolate von Neugeborenen der NITS und der NGS, die ein phänotypisch ähnliches Muster zum Blutkulturisolat aufwiesen, mittels MLST typisiert. Dadurch wurde bei 20 Neugeborenen der NITS und fünf Neugeborenen der NGS ebenfalls der ST 5 nachgewiesen (Tabelle 3-6). Grundsätzlich sind damit infektionsverursachende Isolate normaler Bestandteil der residenten Hautflora und können bei Überwindung der Hautbarriere eine Infektion verursachen. Aufgrund des phänotypischen Musters von ST 5 und dessen nachgewiesener Hautkolonisation bei 25 verschiedenen Neugeborenen sind vermutlich viele Neugeborene und Patienten eines Krankenhauses mit diesem Isolat besiedelt bzw. können durch nosokomiale Transmission kolonisiert werden.

Die molekulare Typisierung per MLST diene ferner der Charakterisierung und Einordnung der ausgewählten *S. epidermidis* Isolate in den weltweit bekannten klonalen Zusammenhang. Fast alle Isolate, ausgenommen ST 66, gehörten zum Klonalen-Komplex 5 (Abbildung 3-9) und sind typischerweise als nosokomiale Klone bekannt (Cherifi *et al.*, 2013; Hercun, 2011; Miragaia *et al.*, 2002; Rolo *et al.*, 2012). Eine belgische Studie mit Isolaten von erwachsenen Personen konnte im vorletzten Jahr die Tatsache von krankenhausedaptierten und Antibiotika-resistenten Klonen im Gegensatz zu normal beim Menschen vorkommenden Antibiotika-sensiblen Isolaten unterstützen und deren Vorkommen besonders den MLST ST 2 und ST 54 zuordnen (Cherifi *et al.*, 2013). Die Tatsache von lokal bestehenden, sowie geographisch übergreifenden, als auch gemeinsamen und nur einzeln vorkommenden Umwelt- und Krankenhaus-assoziierten Klonen, konnten mehrere Studien der letzten Jahre nachweisen (Miragaia *et al.*, 2002; Rolo *et al.*, 2012) (Abschnitt 1.6) und auch speziell für das UKSH, Campus Lübeck, bewiesen werden (Hercun, 2011). Von den 20 gefundenen Sequenztypen waren fünf auf beiden Stationen vorhanden, neun nur auf der NITS und sechs nur auf der NGS (Tabelle 3-6). Beim direkten Vergleich beider Stationen waren drei dominante Gruppen um die Sequenztypen 2, 5 und 59 erkennbar, die auf beiden Stationen gefunden werden konnten und als nosokomiale Klone bekannt sind (Abbildung 3-10). Das alleinige Vorkommen einiger Sequenztypen auf der NGS oder NITS könnten Indiz für stationsabhängige

S. epidermidis Klone sein, dieses müsste aber durch eine höhere Anzahl von analysierten Isolaten noch eingehender untersucht werden.

Bisher wurden vornehmlich allein Stämme von Erwachsenen typisiert. Nur Soeorg *et al.* haben bislang nosokomiale *S. epidermidis* Isolate aus dem Stuhl oder dem Blut von Frühgeborenen per MLST typisiert. In 19 Proben wurden ST 2, ST 5, ST 20 (nur im Stuhl) oder ST 418 gefunden (Soeorg *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Dissertation konnten die virulenteren ST 2, ST 5 und ST 54 ebenfalls nachgewiesen werden. Vorausblickend stellt sich die Frage, wie die Entwicklungslinien für die unterschiedliche Klonalitäten sind und welches Isolat den Ursprung bildet. Eine japanische Studie unter gesunden Kindergartenkindern konnte für (ambulante) Isolate keinen einheitlichen Transmissionsklon finden, sondern nur die große Vielfalt belegen (Jamaluddin *et al.*, 2008). Eine Bedeutung in der Entwicklung der Klonalitätslinien könnte den häufig vorkommenden, nosokomialen sowie eng verwandten Klonen mit den ST 2, ST 5, ST 6 und ST 54 zukommen. Im Gegensatz zu den anderen Isolaten war ST 6 hierbei einmalig bei einem Neugeborenen der NGS zu finden gewesen, im Oxacillin-Screening positiv, aber in der *mecA*-PCR negativ und hat ebenso wie die anderen Sequenztypen vielfache Verknüpfung durch *single* und *double locus variants* zu anderen und im Rahmen dieser Studie typisierten Sequenztypen (Abbildung 3-11). Da verwandte Stämme interessanterweise verschiedene *SCCmec* Typen haben und diese auch oftmals verlieren oder erwerben können (Miragaia *et al.*, 2005), könnten genau solche Oxacillinsgrenzwertigen Isolate mutmaßlich die Schlüsselstelle zwischen den verschiedenen Klonalitätslinien darstellen. Schlussfolgernd müssten vorkommende *S. epidermidis* Klone charakteristische Eigenschaften für die jeweiligen Umwelt- und Hauthabitate besitzen. Zur Aufklärung möglicher Entwicklungsketten in der *S. epidermidis* Kolonisation wären daher die weitere molekularbiologische Charakterisierung von „nosokomialen“ als auch „ambulanten“ Isolaten, die zusätzliche MLST-Typsierung von umwelt- und personenbezogenen Isolaten sowie darauf aufbauend eine detaillierte Gegenüberstellung der weltweit bekannten Sequenztypen und deren zugehörigen Phäno- bzw. Genotypen enorm hilfreich und interessant.

Für dieses wissenschaftliche Projekt wurden erstmalig Staphylokokken nach dem phänotypischen Muster einer Proteaseexpression sowie der Fähigkeit zur Biofilmbildung klassifiziert. Die hohe Anzahl der untersuchten Isolate war vor allem durch die neuartige

Möglichkeit der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur zeitlich schnellen, ökonomisch günstigen und methodisch verlässlichen Identifizierung von verschiedenen Bakterienspezies gegeben. Anschließend konnten die Staphylokokken weiter phänotypisch analysiert werden. Die molekularbiologischen Nachuntersuchungen waren wegen hoher Kosten nur für ausgewählte Isolate möglich.

Die Bestimmung der Oxacillinresistenz erfolgte mit Hilfe eines Screening-Agars. Die Selektionskonzentration von 6 µg/ml entspricht den gängigen Standards zum Nachweis einer Methicillinresistenz und der sicheren Detektierung einer *mecA* vermittelten PBP2a-Resistenz (Becker und Peters, 2009). Eine Flüssigkulturmethode wurde aufgrund der gleichfalls problembehafteten, phänotypischen Auswertung nach kurzen Testversuchen zu Gunsten des Screening-Agars nicht weiter benutzt (nicht dargestellte Ergebnisse). Phänotypische Resistenzbestimmungen bergen durch die benutzerabhängige Auswertung und vor allem durch grenzwertige MHKs einzelner Stämme, im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden, die Gefahr der falsch positiven bzw. negativen Detektierung einer Resistenz. Gleichzeitig können molekularbiologische Verfahren das Vorhandensein eines Genortes detektieren, aber nicht unbedingt die Expression des Genproduktes nachweisen. Ausgewählte Isolate wurden daher auch durch den Nachweis des *mecA* Gens charakterisiert. Ein späterer Vergleich bei größtenteils ausgewählten Oxacillin-resistenten Stämmen zeigte eine 100 %ige Sensitivität und eine 85,7 %ige Spezifität durch den Screening-Agar (Tabelle 3-9). York *et al.* konnten 1996 für diese Methode eine 70 %ige Sensitivität nach 24 Stunden und eine 100 %ige Sensitivität nach 48 Stunden sowie eine Spezifität von 100 % nachweisen (York *et al.*, 1996). Alle *mecA* überprüften sensiblen Isolate des Oxacillinagars waren ebenfalls negativ. Dieser gute negativ prädiktive Wert zeigt, dass die Wahl einer etwas höheren Konzentration von Oxacillin für den Screeningagar sinnvoll gewählt worden ist und keine falsch negativen Ergebnisse hatte. Bei dem einzigen falsch positiven Isolat müsste in weiteren Testungen noch geklärt werden, ob die Spezifität des Oxacillin-Screeningagars nicht ausreichend war bzw. andere Resistenzmechanismen verantwortlich gewesen sein könnten. Denkbare Alternativen wären ein *mecA*-Genhomolog, wie zum Beispiel eine *mecC*-Resistenz bei *S. aureus*, oder eine Überproduktion einer Typ-A-β-Laktamase, die zum Phänomen der Borderlinerresistenz bei *S. aureus* führt und eine *mecA* basierte Methicillinresistenz vortäuschen kann (Becker, 2013; Becker und Peters, 2009; Shore und Coleman, 2013). Zusammenfassend eignet sich der Oxacillinagar mit einem positiv prädiktiven Wert

von 99,1 % sehr gut zur Detektierung von *mecA* positiven Isolaten. Bezugnehmend auf das Erkennen von resistenten Stämmen erwies sich das einmalige Ablesen nach 24 Stunden Bebrütung als ausreichend. Ein punktuelles Überprüfen der Ablesung nach erneuten 24 Stunden erbrachte keinen weiteren Erkenntnisgewinn.

In der Methodik des Nachweises der Biofilmbildung im Screening-Verfahren zeigten sich große Schwächen (Tabelle 3-7). Die Sensitivität und Spezifität der Screening-Methode betrug im Gegensatz zur standardisierten Testung nur 68,0 % bzw. 31,3 %. Im Vergleich zur standardisierten Testung ergaben sich deutliche Abweichungen, so dass eine Auswertung der Biofilmbildung für die Screening-Methode nur eingeschränkt und unter Vorbehalt erfolgen konnte. In der Mehrheit waren erstmalig negativ gescreente Isolate in einer anschließenden standardisierten Wiederholung der Testung doch biofilmbildend. Der negativ prädiktive Wert lag damit nur bei 13,8 % der untersuchten Isolate. Aufgrund dieses Sachverhalts wurde größtenteils auf eine noch genauere Auswertung unter dem Parameter der Biofilmbildung verzichtet. Eine Weiterempfehlung dieser Screening-Methode ist daher nicht zu befürworten.

Dreiviertel der nachgetesteten biofilmbildenden Isolate hatten kein *icaA* Gen (n=75/ 99) (Tabelle 3-8) und der Biofilm wurde damit wahrscheinlich PIA unabhängig, Proteinvermittelt, gebildet (Kogan *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2005). Die *icaA* negativen Isolate waren in der Biofilmbildung deutlich schwächer als die *icaA* positiven Isolate (Abbildung Anhang-2), welches mit der Vermutung von Rohde, einer schwächeren Protein vermittelte Biofilmbildung ohne PIA-Beteiligung, deckungsgleich ist (Rohde *et al.*, 2007). Dieser Unterschied war vornehmlich für das Kulturmedium mit TSB_{EtOH} erkennbar (Abbildung Anhang-2) und belegt die Bedeutung, die Biofilmbildung auch in unterschiedlichen Kulturmedien zu testen. Eine mögliche Erklärung für die proteinabhängige Biofilmbildung wäre durch das Protein Embp, das durch eine Erhöhung des osmotischen Drucks hochreguliert wird (Linnes *et al.*, 2013). Eine solche Umgebung ist unter anderem auf der salzhaltigen Haut zu finden, welche die hohe Anzahl biofilmbildender und *icaA* negativer Isolate erklären könnte. Vergleichbar zur Oxacillinresistenz ist vermutlich auch der Biofilmmechanismus eines Isolats stark von der Umgebung und Umwelt abhängig und kann unter Umständen spontan geändert werden. Die Möglichkeit eines solchen spontanen Wechsel zwischen PIA-abhängiger und PIA-unabhängiger Form konnten Hennig *et al.* für *icaA* positive *S. epidermidis* Isolate 2007 beweisen (Hennig *et al.*, 2007). Weitere

Forschung ist notwendig, um die Biofilmbildung im Zusammenhang mit dem Lebensumfeld speziell bei der Hautkolonisierung und deren *in vitro* Testung zu verstehen.

Eines der Frühgeborenen aus der untersuchten Langzeitkohorte entwickelte im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes eine Sepsis. Glücklicherweise konnte ebenfalls ein positives Blutkulturisolat gewonnen und anschließend mit den Hautisolaten dieser Studie verglichen werden (Abschnitt 3.3). Durch Zuhilfenahme der PFGE konnte bewiesen werden, dass der *S. epidermidis* Stamm der Blutkultur auch in den Isolaten der Hautflora vor und nach dem Ereignis zu finden gewesen war. Der Nachweis war bis zur siebten Lebenswoche möglich. Gleichzeitig konnte anhand der Auswahl von 68 untersuchten Hautisolaten aus den verschiedenen Lebenswochen die Existenz von mindestens weiteren zwölf verschiedenen *S. epidermidis* Klonen geführt werden. Aufgrund der sehr guten Diskriminierungsstärke zwischen den verschiedenen Isolaten war die PFGE für die Suche und Unterscheidung der Klonalität die Methode der Wahl (Goering, 2010). Leider eignet sich die PFGE nicht für einen Labor übergreifenden Vergleich, so dass die MLST-Methode mit der heutzutage besten weltweiten Vergleichbarkeit zur Identifizierung und Charakterisierung von *S. epidermidis* Isolaten zusätzlich genutzt worden ist. Beide Methoden der PFGE und des MLSTs haben hohe Diskriminierungsraten von 99 % bzw. 90 %, korrelieren aber in ihrer Vergleichbarkeit miteinander nur sehr schwach (Miragaia *et al.*, 2008). Bei der Untersuchung von klonalen Komplexen eignet sich daher die Bestimmung mittels MLST oder einer Kombination von PFGE und *SCCmec*-Kassette (Miragaia *et al.*, 2008). Diese sehr geringe Konkordanz konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden, die für MLST und PFGE typisierten Isolate korrelierten vollständig (Tabelle 3-5). Einschränkend für diesen Vergleich waren die geringe Probenanzahl von nur neun verschiedenen Isolaten mit drei unterschiedlichen Sequenztypen (MLST ST 5 n=5, ST 492 und ST 81 jeweils n=2), sowie die lokale Auswahl der Isolate. Mithilfe der MLST-Methode konnte aber letztendlich bewiesen werden, dass das Blutkulturisolate sowie Hautisolate mindestens aus der ersten, zweiten, vierten, fünften und siebten Lebenswoche zum ST 5, einem international bekannten, nosokomial und Infektions-assoziiertem Klon, gehörten.

Aufgrund des sehr zeitintensiven Sequenzierens wurde zusätzlich die diskriminatorische Stärke des Diversilab-Systems im Vergleich zu MLST als schneller durchführbare Methode untersucht. Die schnelle Handhabung innerhalb eines Tages, die virtuelle, computerprogrammassistierte Auswertung und der nicht vorhandene Kontakt mit giftigen

Substanzen sind große Vorteile dieser Methode. Anhand von acht Isolaten von Proband R konnte gezeigt werden, dass eine feststellbare Unterscheidung der Isolate mit dem Sequenztyp 5 zu den Sequenztypen 2, 81 und 22 möglich gewesen, eine Abgrenzung zum ST 494 wiederum nicht gegeben war (Abbildung 3-8). In einer anschließenden Gegenüberstellung von 15 verschiedenen MLST-Sequenztypen von 26 Isolaten unterschiedlicher Neugeborener war die sichere Beurteilung der molekularbiologischen Verwandtschaft der Isolate bzw. genaue Korrelierung zur MLST-Typisierung teilweise nicht mehr vorliegend (Abbildung 3-13). Ein Vergleich von 16 Proben des ST 5 offenbarte die Schwäche der computerprogrammassistierten Auswertung des Diversilab-Systems, die feinste Abstufungen gleicher bzw. ähnlicher Proben algorithmisch in einen prozentualen Unterschied umrechnet, und so die Ähnlichkeit der Proben sehr weit auseinanderclustern ließ und damit die eigentlich direkten Verwandtschaftsverhältnisse ausschließen würde (Abbildung 3-12). Leider ist die Möglichkeit der Verwendung selbstdefinierter Auswertungsalgorithmen nicht vorhanden und auch ein Abgleich der Proben mit anderen Laboratorien ist nicht vorgesehen. Eine entsprechende individuelle Bewertung der Ergebnisse ist daher immer noch unerlässlich. Die teilweise eingeschränkte Anwendbarkeit der Diversilab-Methode zur Untersuchung und Diskrimination von Klonalitäten bei Staphylokokken wurde für *S. aureus* schon seit 2009 berichtet (Babouee *et al.*, 2011; Tenover *et al.*, 2009; Te Witt *et al.*, 2009) und konnte jetzt erstmals auch für *S. epidermidis* bewiesen werden.

Gleichzeitig konnten durch die molekularbiologischen Untersuchungen bewiesen werden, dass durch Einteilung der Isolate in phänotypische Gruppen, ausgehend von der Charakteristik aus Oxacillinresistenz, Protease-Expression und der Fähigkeit zur Biofilmbildung, ein Bezug zu molekularbiologischen klonalen Linien nicht möglich ist. Ein phänotypisches Muster bildet eine Vielzahl von unterschiedlichen klonalen Zusammenhängen ab (Tabelle 3-5, Tabelle Anhang-2). Andersherum waren auch die molekularbiologischen Methoden nicht in der Lage, unterschiedliche phänotypische Muster zu unterscheiden. Aufgrund ihrer Methodik ist der Vergleich nur auf vordefinierte Abschnitte des Isolats beschränkt. Zur endgültigen Unterscheidung von Klonalitätslinien ist wahrscheinlich nur eine vollständige Sequenzierung sinnvoll oder eine Kombination von verschiedensten Methoden.

Viele Studien untersuchten eine sehr kleine Anzahl von Isolaten, teilweise sogar nur ein repräsentatives Isolat pro Probe. Die Betrachtung mehrerer Isolate aus einer Probe ist aber

von elementarer Bedeutung, da die Daten eine Kolonisation mit unterschiedlichen phänotypischen Mustern und Klonalitätslinien von *S. epidermidis* auf der menschlichen Haut beweisen. Diese Studie beschränkt sich auf den alleinigen Einschluss von Neugeborenen mit Krankenhauskontakt. Durch einen Einschluss von Neugeborenen ohne Bezug zu einem krankenhäuslichen Milieu, wie zum Beispiel bei einer Hausgeburt, könnten weitere, interessante wissenschaftliche Daten erhoben werden. Eine längerfristige Betrachtung, über den Krankenhausaufenthalt hinausgehend, wäre ebenfalls aufschlussreich für die Epidemiologie der Oxacillinresistenz und der Fähigkeit zur Biofilmbildung. Bestimmte phänotypische Muster waren immer wieder überproportional auf der Haut zu finden und bei Proband R konnte die Persistenz eines bestimmten Klons (ST 5 bzw. PFGE-Muster A) über mehrere Wochen nachgewiesen werden. Dieser ließ sich dann auch bei anderen Neugeborenen, vornehmlich der NITS, nachweisen (Tabelle 3-6). Zusammenfassend waren die Staphylokokken von Neugeborenen der NITS doppelt so häufig gegen Oxacillin-resistent (84,8 %, n=4389/ 5723) als die Isolate von Neugeborenen der NGS (40,4 %, n=808/ 2000) (Tabelle 3-2). Eigenschaften wie die Spezies, ein bestimmter Biotyp, multiple Antibiotikaresistenzen oder die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurden bisher als ein Selektionsvorteil für die Haut eines Neugeborenen einer NITS vermutet (D'Angio *et al.*, 1989). Dennoch ist noch immer die genaue Pathogenese unklar, warum gerade bestimmte Isolate bzw. klonale Linien einen Selektionsvorteil bei einem Krankenhausaufenthalt haben und warum diese bei einer umweltbedingten Veränderung einem Wandel zu anderen Klonen unterlegen sind.

Das menschliche Hautmikrobiom und besonders *S. epidermidis* ist elementar für eine gesunde Hautkolonisation und deren Regulation (Naik *et al.*, 2012) (Abschnitt 1.7.3), trotzdem ist *S. epidermidis* einer der wichtigsten nosokomialen Infektionserreger. Vielfache Forschungsansätze wie zum Beispiel die Entwicklung von Impfungen gegenüber Staphylokokken-Infektionen, der Einsatz von Bakteriophagen oder die Verwendung von Antibiotika oder anderen inhibitorischen Substanzen versuchen daher eine Infektion größtenteils vorher zu verhindern (Gomes *et al.*, 2014). Immunmodulatorisch wird ebenfalls bei VLBW versucht, durch eine prophylaktische, medikamentöse Gabe von Pagibaximab, einem monoklonalen Antikörper, eine Staphylokokkensepsis zu verhindern, sowie Staphylokokken induzierten Zytokine im Blut zu verringern (Weisman *et al.*, 2009, 2011). Eine vollständige Eradizierung der Bakterien am Katheter und damit Verhinderung

einer Katheter-assoziierten Sepsis ist aber auch mit Antikörpern nicht zu verhindern. Ein anderer Ansatz wäre die Verwendung des antimikrobiellen Peptides Epidermicin NI01 von *S. epidermidis*, dessen inhibitorische Effekte gegenüber gram-positiven Bakterien wirkt und dessen erstmalige Klonierung im Jahr 2012 eine therapeutische Vervielfältigung ermöglicht (Sandiford und Upton, 2012). Ungeklärt bleibt ebenfalls, ob die prophylaktische Gabe von Antibiotika nach dem Entfernen von peripheren Kathetern eine anschließende Infektion verhindern kann (Casner *et al.*, 2014).

Eine Reduzierung und Einbringung von exogenen Umgebungskeimen wäre eine weitere Möglichkeit der Infektionsverhinderung. So beherbergen neonatologische Intensivstationen eine Vielzahl von menschlich-assoziierten Bakterien, speziell von Hautkeimen wie *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* oder *Streptococcus* (Hewitt *et al.*, 2013). Durch eine normale Routinereinigung kann eine deutliche Reduzierung, vor allem von *Staphylococcus* und *Streptococcus*, im NITS Umfeld erreicht werden (Bokulich *et al.*, 2013). Die Hände von Krankenschwestern weisen natürlicherweise vergleichende infektionsassoziierte *S. epidermidis* Isolate auf (Milisavljevic *et al.*, 2005), die wahrscheinlich auch durch normale Händehygiene nur erschwerend zu eradizieren sind (Bahr und Knobloch, 2014). Daher ist vor allem der richtige Umgang und das entsprechende Management beim Legen von intravenösen Zugängen zur Reduzierung von Katheter assoziierten Infektionen bedeutend (Helder *et al.*, 2013). Eine entsprechende Schulung sollte gleichzeitig auch die korrekte und standardisierte Abnahme von Blutkulturen einschließen, um Kontaminationen und damit zusätzlich entstehende Kosten zu reduzieren (Hall 2013).

Schließlich bleibt aber die Frage, ob die Hautflora eines Neugeborenen, das durch die Erstkolonisation mit nosokomial „pathogenen“ Staphylokokken kolonisiert worden ist, nicht bewusst wieder verändert werden kann. Eine künstliche Reduzierung würde vermutlich Probleme verursachen und keine effektive Reduzierung von Sepsis oder fremdkörperassoziierten Infektionen bewirken, sondern wahrscheinlich die Regulation der „gesunden“ Hautkolonisation durch *S. epidermidis* verhindern und eine Überbesiedlung durch pathogene Mikroorganismen wie *S. aureus* verursachen. Zur Vermeidung von Infektionen bleibt daher vorerst nur eine konsequente Umsetzung der Hygienerichtlinien beim Umgang mit dem Neugeborenen und eine Verringerung von „gefährlichen“ Umgebungskeimen. Andererseits kommunizieren und interagieren die Mikroorganismen des menschlichen Mikrobioms untereinander, so dass *S. epidermidis* unterdrückende

Effekte auf andere hautbesiedelnde Mikroorganismen ausüben kann (Abschnitt 1.7.3). Außerdem belegten Daten dieser Dissertation, dass in der Langzeitbetrachtung die Oxacillinresistenz, wie auch die Speziesverteilung der Staphylokokken, abnehmen bzw. sich verändern konnte (Abschnitt 4.2). Wenn also die nosokomialen Staphylokokken-Stämme typischerweise in einem normalen Umfeld dem Wettbewerb mit anderen „harmlosen“ Koagulase-negativen Staphylokokken unterliegen, wäre eine bewusste, frühzeitige Besiedelung mit einem „probiotischen“ *S. epidermidis* Stamm eine sinnvolle Präventionsmöglichkeit (Shinefield *et al.*, 1971).

Weitere Studien werden benötigt, um die normale menschliche Hautflora, deren Kolonisations- und Klonalitätsentwicklung bzw. deren Interaktion mit der Umgebung besser verstehen und derartige Fragen genauer beantworten zu können.

5. Schlussbetrachtung und Ausblick

Die mikrobiologische Kolonisation der Hautflora ist vielseitig und vielschichtig und in ihrer Entwicklung und Interaktion größtenteils noch unverstanden. Wahrscheinlich ist sie mit einem Schlachtfeld vergleichbar, auf dem die beteiligten Bakterien jeden Tag einen Kleinkrieg um die Vorherrschaft bestreiten.

Diese Dissertation konnte die Hautkolonisation bei Früh- und Neugeborenen einer Intensiv- und Neugeborenenstation mit Staphylokokken innerhalb der ersten Lebenswoche vergleichen sowie deren Dynamik über die nachfolgenden Wochen bei Frühgeborenen einer Intensivstation verfolgen. Ausgewählte Isolate wurden molekularbiologisch weiter charakterisiert und typisiert und weltweit bekannte klonale Zusammenhänge gefunden.

Analysen der Isolate der ersten Lebenswoche konnten stationsabhängige Unterschiede detektieren, so bestehen wesentliche Unterschiede in der Diversität, dem Auftreten und der Häufigkeit der verschiedenen Staphylokokkenarten der Hautflora eines Neugeborenen einer Intensiv- oder Normalstation. Die Diversität ist auf der Normalstation mannigfaltiger, im Gegensatz ist das Auftreten von virulenteren Isolaten bzgl. der Oxacillinresistenz mit der neonatologischen Intensivstation assoziiert.

Im zeitlichen Verlauf war zu beobachten, dass ein längerer Krankenhausaufenthalt auf einer Intensivstation mit einer Zunahme von antibiotikaresistenten Hautstämmen verbunden ist. Diese Entwicklung scheint im zeitlichen Verlauf umkehrbar zu sein. Im Rahmen der Hautkolonisation befinden sich außerdem Isolate auf der Haut, die nachgewiesen zu nosokomialen Infektionen bei Neugeborenen führen können und gleichzeitig auch weltweit zu finden sind.

Aufgrund dieser Daten kann abgeleitet werden, dass nicht „der hypervirulente Infektionsklon“ einer Intensivstation (de Silva *et al.*, 2001) existiert, sondern eine große Anzahl von potentiell pathogenen Stämmen. Vermutlich können viele oder sogar alle Hautklone der Staphylokokken eine Infektion oder Sepsis verursachen. Daher sollten deren genauere Klonalitäten, assoziierten Eigenschaften und Pathogenitätsfaktoren sowie deren Regulationsmechanismen verstärkt erforscht werden. Zudem ist eine Einteilung in unterschiedliche Klonalitätslinien nicht anhand von einfachen phänotypischen Unterschieden in der Oxacillinresistenz, der Proteaseexpression und der Fähigkeit zur Biofilmbildung bei *S. epidermidis* möglich.

6. Zusammenfassung

Mit dem Beginn der Geburt wird die sterile Haut von Neugeborenen innerhalb der ersten Lebensstunden erstmalig mit Mikroorganismen kolonisiert. Staphylokokken und speziell *S. epidermidis* sind hierbei wichtige Vertreter der menschlichen Hautflora und für eine gesunde Immunregulation verantwortlich. Gleichzeitig sind diese im Rahmen einer Fremdkörper-assoziierten Infektion bei der neonatalen Sepsis gefürchtet.

Durch Abnahme von Hautabstrichen bei insgesamt 71 Früh- und Neugeborenen einer neonatologischen Intensiv- (NITS) (n=41) und Neugeborenenstation (NGS) (n=31) innerhalb der ersten Lebenswoche konnten insgesamt 6.389 Staphylokokken Isolate gewonnen, identifiziert und phänotypisch nach der Oxacillinresistenz, der Proteaseaktivität sowie der Fähigkeit zur Biofilmbildung charakterisiert und klassifiziert werden. Von zehn Frühgeborenen der NITS konnten anschließend weitere 9.547 Isolate aus mindestens sechs weiteren Lebenswochen isoliert und analysiert werden. Mittels molekularbiologischen Methoden wie der Pulsfeldgelelektrophorese, dem DiversilabSystem oder MLST konnten ausgewählte Isolate auf deren molekularbiologische Verwandtschaft untersucht und mit den weltweit schon bekannten klonalen Zusammenhängen verglichen werden.

Insgesamt waren 70,9 % der gesamten Isolate der ersten Lebenswoche Oxacillin-resistent. *S. epidermidis* war mit 74,7 % der Isolate der NGS und 84,4 % der Isolate der NITS die am häufigsten isolierte Staphylokokken-Spezies und zu 43,0 % bzw. 85,4 % Oxacillin-resistent ($p < 0,001$). Diese hohe Oxacillinresistenz war bei zehn Frühgeborenen der NITS bis zur fünften Lebenswoche zu beobachten, bevor sie anschließend kontinuierlich abnahm. Jedes Neugeborene der NITS akquirierte im Verlauf seines Aufenthalts einen Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Stamm. Die Diversität der Staphylokokkenspezies war dagegen auf der NGS höher als auf der NITS. Durch molekularbiologische Analyse ausgewählter *S. epidermidis* Isolate konnte der MLST ST 5 als häufiger und weltweit verbreiteter nosokomialer Erreger auf der Haut vieler Neugeborenen der NITS- und in geringerer Anzahl auch auf der Haut der Neugeborenen der NGS gefunden werden, sowie als Sepsisverursacher bei einem der Neugeborenen identifiziert werden. Leider erwies sich die Einteilung von Staphylokokken nach phänotypischen Pathogenitätsfaktoren als nicht geeignet, um zwischen verschiedenen Klonalitäten zu unterscheiden. Letztendlich zeigen die Daten, dass der Aufenthalt auf einer Intensivstation mit einem höheren Risiko für den Erwerb von Oxacillin-resistenten Staphylokokken assoziiert ist und die Hautflora eines Neugeborenen innerhalb weniger Tage mit verschiedenen und weltweit vorkommenden Staphylokokken-Klonen kolonisiert wird, sowie einem ständigen Wandel ausgesetzt ist.

Literaturverzeichnis

- Alshaikh, B., Yee, W., Lodha, A., Henderson, E., Yusuf, K., und Sauve, R.** (2014). Coagulase-negative *staphylococcus* sepsis in preterm infants and long-term neurodevelopmental outcome. *J Perinatol.* 34, 125–129.
- Andrew, G., Chan, G., und Schiff, D.** (1976). Lipid metabolism in the neonate. I. The effects of Intralipid infusion on plasma triglyceride and free fatty acid concentrations in the neonate. *J. Pediatr.* 88, 273–278.
- Angelone, D.F., Wessels, M.R., Coughlin, M., Suter, E.E., Valentini, P., Kalish, L.A., und Levy, O.** (2006). Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production *in vitro* and *in vivo*. *Pediatr. Res.* 60, 205–209.
- Arrecubieta, C., Lee, M.-H., Macey, A., Foster, T.J., und Lowy, F.D.** (2007). SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J. Biol. Chem.* 282, 18767–18776.
- Avula, C.P.R., Zaman, A.K., Lawrence, R., und Fernandes, G.** (1999). Induction of apoptosis and apoptotic mediators in balb/C splenic lymphocytes by dietary n-3 and n-6 fatty acids. *Lipids* 34, 921–927.
- Babouee, B., Frei, R., Schultheiss, E., Widmer, A.F., und Goldenberger, D.** (2011). Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1549–1555.
- Bahr, C., und Knobloch, J.K.-M.** (2014). noch unpublizierte Daten.
- Banner, M.A., Cunniffe, J.G., Macintosh, R.L., Foster, T.J., Rohde, H., Mack, D., Hoyes, E., Derrick, J., Upton, M., und Handley, P.S.** (2007). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J. Bacteriol.* 189, 2793–2804.
- Bannerman, T.L., und Peacock, S.J.** (2007). Gram-Positive Cocci - *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. In *Manual of Clinical Microbiology*, 2 Vols., P.R. Murray, E.J. Baron, und J.H. Jorgensen, eds. (*American Society for Microbiology*), pp. 390–411.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., und Horvath, P.** (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Becker, K.** (2013). Genhomologe des *mecA*-Gens - Vorkommen und Bedeutung für die MRSA-Diagnostik. *Der Mikrobiologe* 97–102.
- Becker, K., und Peters, G.** (2009). Resistenzen bei Staphylokokken (PRSA, MRSA, VISA, VRSA). In *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*, (Stuttgart; New York: Thieme), pp. 276–280.
- Beenken, K.E., Spencer, H., Griffin, L.M., und Smeltzer, M.S.** (2012). Impact of extracellular nuclease production on the biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus* under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Infect. Immun.* 80, 1634–1638.

- Bekhof, J., Reitsma, J.B., Kok, J.H., und Van Straaten, I.H.L.M.** (2013). Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. *Eur. J. Pediatr.* 172, 501–508.
- Bigger, J.** (1944). Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* 244, 497–500.
- Björkqvist, M., Jurstrand, M., Bodin, L., Fredlund, H., und Schollin, J.** (2004). Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci. *Pediatr. Res.* 55, 966–971.
- Boles, B.R., und Horswill, A.R.** (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4, e1000052.
- Bowden, M.G., Visai, L., Longshaw, C.M., Holland, K.T., Speziale, P., und Hook, M.** (2002). Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J. Biol. Chem.* 277, 43017–43023.
- Braff, M.H., Bardan, A., Nizet, V., und Gallo, R.L.** (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.* 125, 9–13.
- Brogden, K.A.** (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
- Brogden, N.K., und Brogden, K.A.** (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 217–225
- Brooun, A., Liu, S., und Lewis, K.** (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 640–646.
- Calder, P.C.** (1997). N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv. Enzyme Regul.* 37, 197–237.
- Calviello, G., Palozza, P., Maggiano, N., Piccioni, E., Franceschelli, P., Frattucci, A., Nicuolo, F.D., und Bartoh, G.M.** (1999). Cell proliferation' differentiation' and apoptosis are modified by n-3 polyunsaturated fatty acids in normal colonic mucosa. *Lipids* 34, 599–604.
- Capone, K.A., Dowd, S.E., Stamatias, G.N., und Nikolovski, J.** (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2026–2032.
- Carlos, C.C., Ringertz, S., Rylander, M., Huovinen, P., und Faxelius, G.** (1991). Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* septicaemia among very low birth weight neonates in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 19, 201–207.
- Carr, D.L., und Kloos, W.E.** (1977). Temporal study of the staphylococci and micrococci of normal infant skin. *Appl Environ Microbiol* 34, 673–680.
- Casner, M., Hoesli, S.J., Slaughter, J.C., Hill, M., und Weitkamp, J.-H.** (2014). Incidence of catheter-related bloodstream infections in neonates following removal of peripherally inserted central venous catheters. *Pediatr Crit Care Med* 15, 42–48.

- Center, K.J., Reboli, A.C., Hubler, R., Rodgers, G.L., und Long, S.S.** (2003). Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4660–4665.
- Chambers, H.F., Hartman, B.J., und Tomasz, A.** (1985). Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J. Clin. Invest.* 76, 325–331.
- Chang, C.T., Glass, L., Evans, H.E., und Pierog, S.H.** (1977). Bacterial colonization of infants raised in incubators and under radiant heaters. *Arch. Dis. Child.* 52, 507–509.
- Chapman, G.H., Berens, C., Peters, A., und Curcio, L.** (1934). Coagulase and Hemolysin Tests as Measures of the Pathogenicity of Staphylococci 1. *J. Bacteriol* 28, 343–363.
- Chaves, F., García-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C., und Otero, J.R.** (2005). Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4877–4879.
- Chehoud, C., Rafail, S., Tyldsley, A.S., Seykora, J.T., Lambris, J.D., und Grice, E.A.** (2013). Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 15061–15066.
- Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O., und Hallin, M.** (2013). Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1541–1547.
- Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H., und Solh, N.E.** (1993). *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., Isolated from Human, Animal, and Food Specimens. *Int J Syst Bacteriol* 43, 237–244.
- Cheung, G.Y.C., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R., und Otto, M.** (2010). *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog.* 6, e1001133.
- Cheung, G.Y.C., Duong, A.C., und Otto, M.** (2012). Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect.* 14, 380–386.
- Chiller, K., Selkin, B.A., und Murakawa, G.J.** (2001). Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 6, 170.
- Chiou, Y.B., und Blume-Peytavi, U.** (2004). Stratum corneum maturation. A review of neonatal skin function. *Skin Pharmacol Physiol* 17, 57–66.
- Christensen, G.J.M., und Brüggemann, H.** (2013). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes* 1–15.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., und Beachey, E.H.** (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol* 22, 996–1006.

- Christner, M., Franke, G.C., Schommer, N.N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., *et al.* (2010). The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.* 75, 187–207.
- Chuang, Y.-Y., Huang, Y.-C., and Lin, T.-Y. (2005). Toxic shock syndrome in children: epidemiology, pathogenesis, and management. *Paediatr Drugs* 7, 11–25.
- Cimiotti, J.P., Haas, J.P., Della-Latta, P., Wu, F., Saiman, L., and Larson, E.L. (2007). Prevalence and clinical relevance of *Staphylococcus warneri* in the neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28, 326–330.
- Cogen, A.L., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158, 442–455.
- Cogen, A.L., Yamasaki, K., Sanchez, K.M., Dorschner, R.A., Lai, Y., MacLeod, D.T., Torpey, J.W., Otto, M., Nizet, V., Kim, J.E., *et al.* (2010a). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 130, 192–200.
- Cogen, A.L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K.M., Crotty Alexander, L., Tanios, J., Lai, Y., Kim, J.E., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2010b). *Staphylococcus epidermidis* antimicrobial delta-toxin (phenol-soluble modulin-gamma) cooperates with host antimicrobial peptides to kill group A *Streptococcus*. *PLoS ONE* 5, e8557.
- Conrady, D.G., Brescia, C.C., Horii, K., Weiss, A.A., Hassett, D.J., and Herr, A.B. (2008). A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 19456–19461.
- Costa, S.F., Miceli, M.H., and Anaissie, E.J. (2004). Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis* 4, 278–286.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Micro* 11, 95–105.
- Cue, D., Lei, M.G., and Lee, C.Y. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 38.
- Cui, B., Smooker, P.M., Rouch, D.A., Daley, A.J., and Deighton, M.A. (2012). Differences between two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies revealed by biofilm, antibiotic resistance and PFGE profiling. *J. Clin. Microbiol.*
- D'Angio, C.T., McGowan, K.L., Baumgart, S., St Geme, J., and Harris, M.C. (1989). Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J. Pediatr* 114, 1029–1034.

- Dekio, I., Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Nishikawa, T., Suematsu, M., und Benno, Y.** (2005). Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. *J. Med. Microbiol.* 54, 1231–1238.
- Van Der Zwet, W.C., Debets-Ossenkopp, Y.J., Reinders, E., Kapi, M., Savelkoul, P.H.M., Van Elburg, R.M., Hiramatsu, K., und Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E.** (2002). Nosocomial Spread of a *Staphylococcus capitis* Strain with Heteroresistance to Vancomycin in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2520–2525.
- DGPI** (2013). DGPI Handbuch: Infektionen bei Kindern und Jugendlichen (Georg Thieme Verlag).
- Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., und Beach, M.** (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32 Suppl 2, S114–S132.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., et al.** (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367, 731–739.
- Diep, B.A., Stone, G.G., Basuino, L., Graber, C.J., Miller, A., des Etages, S.-A., Jones, A., Palazzolo-Ballance, A.M., Perdreau-Remington, F., Sensabaugh, G.F., et al.** (2008). The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 197, 1523–1530.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., und Knight, R.** (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11971–11975.
- Dorschner, R.A., Lin, K.H., Murakami, M., und Gallo, R.L.** (2003). Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr. Res.* 53, 566–572.
- Dubin, G., Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., und Dubin, A.** (2001). Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* 382, 1575–1582.
- Duckney, P., Wong, H.K., Serrano, J., Yaradou, D., Oddos, T., und Stamatas, G.N.** (2013). The role of the skin barrier in modulating the effects of common skin microbial species on the inflammation, differentiation and proliferation status of epidermal keratinocytes. *BMC Res Notes* 6, 474.
- Dunne, W.M., Jr, Mason, E.O., Jr, und Kaplan, S.L.** (1993). Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2522–2526.
- Eastick, K., Leeming, J.P., Bennett, D., und Millar, M.R.** (1996). Reservoirs of coagulase negative staphylococci in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal* Ed. 74, F99–F104.

- Von Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W., und Becker, K.** (2005). Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65, 179–214.
- Eriksson, M., Melén, B., Myrbäck, K.E., Winbladh, B., und Zetterström, R.** (1982). Bacterial colonization of newborn infants in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr Scand* 71, 779–783.
- Euzéby, J.P.** (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47, 590–592.
- Evans, A.C.** (1916). The Bacteria of Milk Freshly Drawn from Normal Udders. *The Journal of Infectious Diseases* 18, 437–476.
- Evans, H.E., Akpata, S.O., und Baki, A.** (1970). Factors influencing the establishment of the neonatal bacterial flora. I. The role of host factors. *Arch. Environ. Health* 21, 514–519.
- Farrell, D.J., Mendes, R.E., Ross, J.E., Sader, H.S., und Jones, R.N.** (2011). LEADER Program Results for 2009: an Activity and Spectrum Analysis of Linezolid Using 6,414 Clinical Isolates from 56 Medical Centers in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 3684–3690.
- Faust, K., Göpel, W., Egbert, H., und Härtel, C.** (2011). Sepsis bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht - Epidemiologie, Risikofaktoren und Präventionsstrategien. *CTJ* 20, 1–8.
- Fleer, A., Verhoef, J., und Pascual Hernandez, A.** (1986). Coagulase-negative staphylococci as nosocomial pathogens in neonates. The role of host defense, artificial devices, and bacterial hydrophobicity. *Am. J. Med.* 80, 161–165.
- Fleming, A.** (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 93, 306–317.
- Fontana, M.B.C., de Bastos, M. do C.F., und Brandelli, A.** (2006). Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Curr. Microbiol.* 52, 350–353.
- Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Nervi, C., und Fleurette, J.** (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens. *Int J Syst Bacteriol* 38, 168–172.
- Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z., und Blaser, M.J.** (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2927–2932.
- Garland, J.S., Alex, C.P., Sevallius, J.M., Murphy, D.M., Good, M.J., Volberding, A.M., Hofer, L.L., Gordon, B.J., und Maki, D.G.** (2008). Cohort study of the pathogenesis and molecular epidemiology of catheter-related bloodstream infection in neonates with peripherally inserted central venous catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 243–249.
- Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., und Götz, F.** (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273, 18586–18593.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., et al.** (2005). 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, 2426–2438.
- Goering, R.V.** (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 866–875.
- Gomes, F., Teixeira, P., und Oliveira, R.** (2014). Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling* 30, 131–141.
- Grice, E.A., und Segre, J.A.** (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 9, 244.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., et al.** (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190–1192.
- Grissa, I., Vergnaud, G., und Pourcel, C.** (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 8, 172.
- Guen, C.G.-L., Fournier, S., Andre-Richet, B., Caillon, J., Chamoux, C., Espaze, E., Richet, H., Roze, J.C., und Lepelletier, D.** (2007). Almond oil implicated in a *Staphylococcus capitis* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 27, 713–717.
- Guggenbichler, J.P., Assadian, O., Boeswald, M., und Kramer, A.** (2011). Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 6, Doc18.
- Günther, F., Wabnitz, G.H., Stroh, P., Prior, B., Obst, U., Samstag, Y., Wagner, C., und Hänsch, G.M.** (2009). Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol. Immunol.* 46, 1805–1813.
- Haase, B., Faust, K., Heidemann, M., Scholz, T., Demmert, M., Tröger, B., Herz, A., und Härtel, C.** (2011). The modulatory effect of lipids and glucose on the neonatal immune response induced by *Staphylococcus epidermidis*. *Inflamm. Res.* 60, 227–232.
- Hall, S.L., Hall, R.T., Barnes, W.G., Riddell, S.W., Meng, L., Parisi, J.T., Kilbride, H.W., und Maulik, D.** (1990a). Relationship of maternal to neonatal colonization with coagulase-negative staphylococci. *Am J Perinatol* 7, 384–388.
- Hall, S.L., Riddell, S.W., Barnes, W.G., Meng, L., und Hall, R.T.** (1990b). Evaluation of coagulase-negative staphylococcal isolates from serial nasopharyngeal cultures of premature infants. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 13, 17–23.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., und Stoodley, P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA Cloning: A Practical Approach, D.M. Glover, ed. (Washington, DC: IRL Press), pp. 109–135.
- Hanssen, A.-M., Kjeldsen, G., und Sollid, J.U.E.** (2004). 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, 285–296.

- Harris, J.R., und Schick, B.** (1956). Erythema neonatorum. *AMA J Dis Child* 92, 27–33.
- Härtel, C., Osthues, I., Rupp, J., Haase, B., Röder, K., Göpel, W., Herting, E., und Schultz, C.** (2008). Characterisation of the host inflammatory response to *Staphylococcus epidermidis* in neonatal whole blood. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal* Ed. 93, F140–F145.
- Härtel, C., Faust, K., Avenarius, S., Bohnhorst, B., Emeis, M., Gebauer, C., Groneck, P., Heitmann, F., Hoehn, T., Hubert, M., et al.** (2012). Epidemic Microclusters of Blood-Culture Proven Sepsis in Very-Low-Birth Weight Infants: Experience of the German Neonatal Network. *PLoS One* 7.
- Hartford, O., O'Brien, L., Schofield, K., Wells, J., und Foster, T.J.** (2001). The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 2545–2552.
- Hartman, B.J., und Tomasz, A.** (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158, 513–516.
- Hartman, M.E., Linde-Zwirble, W.T., Angus, D.C., und Watson, R.S.** (2013). Trends in the Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis. *Pediatr Crit Care Med.*
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., und Götz, F.** (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20, 1083–1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., und Götz, F.** (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24, 1013–1024.
- Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G.S., Hartleib, J., Uekötter, A., und Peters, G.** (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2769–2778.
- Helder, O., van den Hoogen, A., de Boer, C., van Goudoever, J., Verboon-Macielek, M., und Kornelisse, R.** (2013). Effectiveness of non-pharmacological interventions for the prevention of bloodstream infections in infants admitted to a neonatal intensive care unit: A systematic review. *Int J Nurs Stud* 50, 819–831.
- Hell, E., Giske, C.G., Hultenby, K., Danielsson, K.G., und Marchini, G.** (2013). Attachment and Biofilm Forming Capabilities of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Preterm Infants. *Curr. Microbiol.*, 67, 712–717.
- Hennig, S., Nyunt Wai, S., und Ziebuhr, W.** (2007). Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 117–122.
- Henrici, A.T.** (1933). Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol.* 25, 277–287.
- Hentges, C.R., Silveira, R. de C., Procianoy, R.S., Carvalho, C.G., Filipouski, G.R., Fuentefria, R.N., Marquezotti, F., und Terrazan, A.C.** (2013). Association of late neonatal sepsis with delayed neurodevelopment in the first two years of life of very low birth weight preterm newborns. *J Pediatr (Rio J).*

- Hercun, M.** (2011). Epidemiologie, Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene und klonale Verwandtschaften von *S. epidermidis*. Med. Diss. Universität zu Lübeck..
- Hewitt, K.M., Mannino, F.L., Gonzalez, A., Chase, J.H., Caporaso, J.G., Knight, R., und Kelley, S.T.** (2013). Bacterial diversity in two Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *PLoS ONE* 8, e54703.
- Hira, V., Sluijter, M., Estevão, S., Horst-Kreft, D., Ott, A., de Groot, R., Hermans, P.W.M., und Kornelisse, R.F.** (2007). Clinical and molecular epidemiologic characteristics of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infections in intensive care neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26, 607–612.
- Hira, V., Sluijter, M., Goessens, W.H.F., Ott, A., de Groot, R., Hermans, P.W.M., und Kornelisse, R.F.** (2010). Coagulase-negative staphylococcal skin carriage among neonatal intensive care unit personnel: from population to infection. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3876–3881.
- Hira, V., Kornelisse, R.F., Sluijter, M., Kamerbeek, A., Goessens, W.H.F., de Groot, R., und Hermans, P.W.M.** (2013). Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in neonates. *J. Clin. Microbiol.* 51, 595–597.
- Holland, L.M., Conlon, B., und O’Gara, J.P.** (2011). Mutation of *tagO* reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology (Reading, Engl.)* 157, 408–418.
- <http://crispr.u-psud.fr/> (2012). CRISPRs web server. Letzter Zugriff 18.12.2012.
- Huebner, J., Pier, G.B., Maslow, J.N., Muller, E., Shiro, H., Parent, M., Kropec, A., Arbeit, R.D., und Goldmann, D.A.** (1994). Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years. *J. Infect. Dis.* 169, 526–531.
- Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G., und Herrmann, M.** (2001). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb. Pathog.* 31, 261–270.
- Isaacs, D.** (2003). A ten year, multicentre study of coagulase negative staphylococcal infections in Australasian neonatal units. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 88, 89F – 93.
- Ivarsson, M., Schollin, J., und Björkqvist, M.** (2013). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* trigger different interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 in lung cells: implications for inflammatory complications following neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 102, 1010–1016.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., und Mizunoe, Y.** (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346–349.
- Jamaluddin, T.Z.M.T., Kuwahara-Arai, K., Hisata, K., Terasawa, M., Cui, L., Baba, T., Sotozono, C., Kinoshita, S., Ito, T., und Hiramatsu, K.** (2008). Extreme genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains disseminated among healthy Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3778–3783.
- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gastra, W., und Schouls, L.M.** (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575.

- Jean-Baptiste, N., Benjamin, D.K., Jr, Cohen-Wolkowicz, M., Fowler, V.G., Jr, Laughon, M., Clark, R.H., und Smith, P.B.** (2011). Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32, 679–686.
- Johnson, T.J., Patel, A.L., Jegier, B.J., Engstrom, J.L., und Meier, P.P.** (2013). Cost of Morbidities in Very Low Birth Weight Infants. *J. Pediatr.* 162, 243–249.e1.
- Katayama, Y., Ito, T., und Hiramatsu, K.** (2000). A new class of genetic element, *staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1549–1555.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., und Lewis, K.** (2004a). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 13–18.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., und Lewis, K.** (2004b). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172–8180.
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., und Lewis, K.** (2011). Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio* 2, e00100–e00111.
- Keyworth, N., Millar, M.R., und Holland, K.T.** (1992). Development of cutaneous microflora in premature neonates. *Archives of Disease in Childhood* 67, 797–801.
- Khashu, M., Osiovich, H., Henry, D., Khotani, A.A., Solimano, A., und Speert, D.P.** (2006). Persistent Bacteremia and Severe Thrombocytopenia Caused by Coagulase-Negative *Staphylococcus* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatrics* 117, 340–348.
- Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., und Horswill, A.R.** (2011). Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 6, e26714.
- Kloos, W.E., und Bannerman, T.L.** (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 117–140.
- Kloos, W.E., und Schleifer, K.H.** (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 25, 62–79.
- Kloos, W.E., und Schleifer, K.H.** (1983). *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an Inhabitant of the Human External Ear. *Int J Syst Bacteriol* 33, 9–14.
- Kneschke, J.-C.** (2011). Vergleich von extrazellulären Proteinen Biofilm-positiver *Staphylococcus epidermidis* Stämme mit ihren isogenen *sB* Mutanten im Phänotyp, auf aktivitäts- und transkriptioneller Ebene. Med. Diss. Universität zu Lübeck.
- Knobloch, J.K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., und Mack, D.** (2001). 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, 2624–2633.

- Knobloch, J.K.-M., Von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., und Mack, D.** (2008). Biofilm formation is not necessary for development of quinolone-resistant “persister” cells in an attached *Staphylococcus epidermidis* population. *Int J Artif Organs* 31, 752–760.
- Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J.M., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., und Otto, M.** (2005). Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.* 115, 688–694.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., und Jabbouri, S.** (2006). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 11–16.
- Kollmann, T.R., Crabtree, J., Rein-Weston, A., Blimkie, D., Thommai, F., Wang, X.Y., Lavoie, P.M., Furlong, J., Fortuno, E.S., 3rd, Hajjar, A.M., et al.** (2009). Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J. Immunol.* 183, 7150–7160.
- Kong, K.-F., Vuong, C., und Otto, M.** (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 133–139.
- Kozitskaya, S., Olson, M.E., Fey, P.D., Witte, W., Ohlsen, K., und Ziebuhr, W.** (2005). Clonal Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Isolates Carrying or Lacking Biofilm-Mediating Genes by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4751–4757.
- Krediet, T.G., Jones, M.E., Janssen, K., Gerards, L.J., und Fleer, A.** (2001). Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3376–3378.
- Krediet, T.G., Mascini, E.M., van Rooij, E., Vlooswijk, J., Paauw, A., Gerards, L.J., und Fleer, A.** (2004). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42, 992–995.
- Kreiswirth, B.N., Löfdahl, S., Betley, M.J., O’Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., und Novick, R.P.** (1983). The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305, 709–712.
- Kristian, S.A., Birkenstock, T.A., Sauder, U., Mack, D., Götz, F., und Landmann, R.** (2008). Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J. Infect. Dis.* 197, 1028–1035.
- Kronforst, K.D., Mancuso, C.J., Pettengill, M., Ninkovic, J., Power Coombs, M.R., Stevens, C., Otto, M., Mallard, C., Wang, X., Goldmann, D., et al.** (2012). A Neonatal Model of Intravenous *Staphylococcus epidermidis* Infection in Mice <24 h Old Enables Characterization of Early Innate Immune Responses. *PLoS ONE* 7, e43897.
- Ladhani, S.** (2001). Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 301–307.
- Ladhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W., und Poston, S.M.** (1999). Clinical, Microbial, and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 224.

- LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., und Lewis, K.** (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3839–3846.
- LaFleur, M.D., Qi, Q., und Lewis, K.** (2010). Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 39–44.
- Lai, Y., Villaruz, A.E., Li, M., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., und Otto, M.** (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.* 63, 497–506.
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L.V., Schmidt, R.R., von Aulock, S., et al.** (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat. Med.* 15, 1377–1382.
- Lai, Y., Cogen, A.L., Radek, K.A., Park, H.J., Macleod, D.T., Leichtle, A., Ryan, A.F., Di Nardo, A., und Gallo, R.L.** (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2211–2221.
- Larson, A.A., und Dinulos, J.G.H.** (2005). Cutaneous bacterial infections in the newborn. *Curr. Opin. Pediatr.* 17, 481–485.
- Lederberg, J., und McCray, A.T.** (2001). 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 15.
- Leid, J.G., Shirliff, M.E., Costerton, J.W., und Stoodley, P.** (2002). Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun.* 70, 6339–6345.
- Leite, B., Gomes, F., Teixeira, P., Souza, C., Pizzolitto, E., und Oliveira, R.** (2011). *In vitro* activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr. Microbiol.* 63, 313–317.
- Levy, O.** (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 379–390.
- Lewis, K.** (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48–56.
- Lewis, K.** (2010). Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.
- Li, D., Lei, H., Li, Z., Li, H., Wang, Y., und Lai, Y.** (2013). A novel lipopeptide from skin commensal activates TLR2/CD36-p38 MAPK signaling to increase antibacterial defense against bacterial infection. *PLoS ONE* 8, e58288.
- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A.E., Cha, D.J., Sturdevant, D.E., und Otto, M.** (2007). Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9469–9474.
- Liljedahl, M., Bodin, L., und Schollin, J.** (2004). Coagulase-negative staphylococcal sepsis as a predictor of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* 93, 211–215.
- Lim, W.H., Lien, R., Huang, Y.-C., Chiang, M.-C., Fu, R.-H., Chu, S.-M., Hsu, J.-F., und Yang, P.-H.** (2012). Prevalence and pathogen distribution of neonatal sepsis among very-low-birth-weight infants. *Pediatr Neonatol* 53, 228–234.

- Loeb, L.** (1903). The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. *The Journal of Medical Research* 10, 407.
- Lyytikäinen, O., Saxén, H., Ryhänen, R., Vaara, M., und Vuopio-Varkila, J.** (1995). Persistence of a multiresistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive-care unit for a four-year period. *Clin. Infect. Dis* 20, 24–29.
- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., und Hiramatsu, K.** (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1147–1152.
- Maayan-Metzger, A., Linder, N., Marom, D., Vishne, T., Ashkenazi, S., und Sirota, L.** (2000). Clinical and laboratory impact of coagulase-negative staphylococci bacteremia in preterm infants. *Acta Paediatr.* 89, 690–693.
- Macintosh, R.L., Brittan, J.L., Bhattacharya, R., Jenkinson, H.F., Derrick, J., Upton, M., und Handley, P.S.** (2009). The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J. Bacteriol.* 191, 7007–7016.
- Mack, D., Siemssen, N., und Laufs, R.** (1992). 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, 2048–2057.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., und Laufs, R.** (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178, 175–183.
- Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Rohde, H., Horstkotte, M.A., und Knobloch, J.K.-M.** (2007). Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem* 387, 399–408.
- Mah, T.F., und O’Toole, G.A.** (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–39.
- Mahlke, K., Murphy, K.M., Travers, P., und Walport, M.** (2009). *Janeway Immunologie* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., et al.** (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3140–3145.
- Maier, R.F., Obladen, M., Stiller, B., und Bahr, M.** (2011). *Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung* (Springer Berlin Heidelberg).
- Makhoul, I.R., Sujoy, P., Smolkin, T., Lusky, A., und Reichman, B.** (2005). Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey. *Clin. Infect. Dis.* 40, 218–224.

- Marchini, G., Berggren, V., Djilali-Merzoug, R., and Hansson, L.O.** (2000). The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatr.* 89, 1082–1086.
- Marchini, G., Ulfgren, A.K., Loré, K., Ståbi, B., Berggren, V., and Lonne-Rahm, S.** (2001). Erythema toxicum neonatorum: an immunohistochemical analysis. *Pediatr Dermatol* 18, 177–187.
- Marchini, G., Lindow, S., Brismar, H., Ståbi, B., Berggren, V., Ulfgren, A.-K., Lonne-Rahm, S., Agerberth, B., and Gudmundsson, G.H.** (2002). The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br. J. Dermatol.* 147, 1127–1134.
- Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J.** (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843–1845.
- Maseda, E., Mensa, J., Valía, J.-C., Gomez-Herrerias, J.-I., Ramasco, F., Samsó, E., Chiveli, M.-A., Pereira, J., González, R., Aguilar, G., et al.** (2013). Bugs, hosts and ICU environment: countering pan-resistance in nosocomial microbiota and treating bacterial infections in the critical care setting. *Rev Esp Quimioter* 26, 312–331.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O.** (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285, 760–763.
- McCrea, K.W., Hartford, O., Davis, S., Eidhin, D.N., Lina, G., Speziale, P., Foster, T.J., and Höök, M.** (2000). The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 (Pt 7), 1535–1546.
- Mehlin, C., Headley, C.M., and Klebanoff, S.J.** (1999). An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 189, 907–918.
- Mehta, G., Singh, S., and Kumari, S.** (1991). Observations on coagulase-negative staphylococci in a neonatal unit in India. *J. Hosp. Infect.* 19, 273–281.
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Costello, A.J., and Farrell, D.J.** (2012). Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4656–4661.
- Milisavljevic, V., Wu, F., Cimmotti, J., Haas, J., Della-Latta, P., Larson, E., and Saiman, L.** (2005). Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 33, 341–347.
- Miragaia, M., Couto, I., Pereira, S.F.F., Kristinsson, K.G., Westh, H., Jarlöv, J.O., Carriço, J., Almeida, J., Santos-Sanches, I., and de Lencastre, H.** (2002). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J. Clin. Microbiol.* 40, 430–438.
- Miragaia, M., Couto, I., and de Lencastre, H.** (2005). Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb. Drug Resist.* 11, 83–93.
- Miragaia, M., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C., and de Lencastre, H.** (2007). Inferring a Population Structure for *Staphylococcus epidermidis* from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology* 189, 2540–2552.

- Miragaia, M., Carriço, J.A., Thomas, J.C., Couto, I., Enright, M.C., und de Lencastre, H.** (2008). Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J. Clin. Microbiol.* 46, 118–129.
- Mittendorf, R., Roizen, N., Moawad, A., Khoshnood, B., und Lee, K.S.** (1999). Association between cerebral palsy and coagulase-negative staphylococci. *Lancet* 354, 1875–1876.
- Mittendorf, R., Covert, R., Kohn, J., Roizen, N., Khoshnood, B., und Lee, K.S.** (2001). The association of coagulase-negative staphylococci isolated from the chorioamnion at delivery and subsequent development of cerebral palsy. *J Perinatol* 21, 3–8.
- Moon, J.L., Banbula, A., Oleksy, A., Mayo, J.A., und Travis, J.** (2001). Isolation and characterization of a highly specific serine endopeptidase from an oral strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* 382, 1095–1099.
- Moyed, H.S., und Bertrand, K.P.** (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* 155, 768–775.
- Much, H.** (1908). Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*. *Biochemische Zeitschrift* 14, 143–155.
- Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., und Lewis, K.** (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Bacteriology* 192, 6191–6199.
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., et al.** (2012). Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science* 337, 1115–1119.
- Nakatsuji, T., und Gallo, R.L.** (2011). Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 887–895.
- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen**, Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin (2009). Protokoll Surveillance nosokomialer Infektionen bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1.500g. KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, NEO-KISS.
- Navarre, W.W., und Schneewind, O.** (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174–229.
- Nelson-Filho, P., Borba, I.G., Mesquita, K.S.F. de, Silva, R.A.B., Queiroz, A.M. de, und Silva, L.A.B.** (2013). Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. *Braz Dent J* 24, 415–419.
- Newby, J.** (2008). Nosocomial infection in neonates: inevitable or preventable? *J Perinat Neonatal Nurs* 22, 221–227; quiz 228–229.
- Nikolovski, J., Stamatias, G.N., Kollias, N., und Wiegand, B.C.** (2008). Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1728–1736.
- Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., und Guss, B.** (1998). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66, 2666–2673.

- Nizet, V., und Bradley, J.S.** (2010). Staphylococcal Infections. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn: Expert Consult*, J.S. Remington, J.O. Klein, C.B. Wilson, V. Nizet, and Y. Maldonado, eds. (Saunders), pp. 489–515.
- Nyström, B., Ransjö, U., Ringertz, S., Faxelius, G., Tunell, R., Ohman, G., Wilton, J., und Pfaller, M.A.** (1992). Colonization with coagulase-negative staphylococci in two neonatal units. *J. Hosp. Infect* 22, 287–298.
- O’Grady, N.P., Alexander, M., Burns, L.A., Dellinger, E.P., Garland, J., Heard, S.O., Lipsett, P.A., Masur, H., Mermel, L.A., Pearson, M.L., et al.** (2011). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin. Infect. Dis.* 52, e162–e193.
- Ogston, A.** (1882). *Micrococcus* Poisoning. *J Anat Physiol* 16, 526–567.
- Oh, J., Conlan, S., Polley, E., Segre, J.A., und Kong, H.H.** (2012). Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med* 4, 77.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A., und de Lencastre, H.** (2002). Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2, 180–189.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., und Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- Otto, M.** (2009). *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol* 7, 555–567.
- Otto, M.** (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175–188.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., und Höök, M.** (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 585–617.
- Payne, N.R., Carpenter, J.H., Badger, G.J., Horbar, J.D., und Rogowski, J.** (2004). Marginal Increase in Cost and Excess Length of Stay Associated With Nosocomial Bloodstream Infections in Surviving Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 114, 348–355.
- Perlman, S.E., Saiman, L., und Larson, E.L.** (2007). Risk factors for late-onset health care–associated bloodstream infections in patients in neonatal intensive care units. *American Journal of Infection Control* 35, 177–182.
- Polin, R.A., Denson, S., Brady, M.T., Papile, L.-A., Baley, J.E., Carlo, W.A., Cummings, J.J., Kumar, P., Tan, R.C., Watterberg, K.L., et al.** (2012). Strategies for Prevention of Health Care–Associated Infections in the NICU. *Pediatrics* 129, e1085–e1093.
- Pong, A., und Bradley, J.S.** (2004). Clinical challenges of nosocomial infections caused by antibiotic-resistant pathogens in pediatrics. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15, 21–29.
- Price, P.B.** (1938). The Bacteriology of Normal Skin; A New Quantitative Test Applied to a Study of the Bacterial Flora and the Disinfectant Action of Mechanical Cleansing. *Journal of Infectious Diseases* 63, 301–318.
- Proksch, E., Brandner, J.M., und Jensen, J.-M.** (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

- Prosser, A., Hibbert, J., Strunk, T., Kok, C.H., Simmer, K., Richmond, P., Burgner, D., und Currie, A.** (2013). Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. *Pediatr. Res.* 74, 503–510.
- Pulverer, G., und Halswick, R.** (1967). [Coagulase-negative staphylococci (*Staphylococcus albus*) as pathogens]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 92, 1141–1145.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., und Qu, D.** (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2083–2092.
- Queck, S.Y., Khan, B.A., Wang, R., Bach, T.-H.L., Kretschmer, D., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Peschel, A., Deleo, F.R., und Otto, M.** (2009). Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* 5, e1000533.
- Raimundo, O., Heussler, H., Bruhn, J.B., Suntrarachun, S., Kelly, N., Deighton, M.A., und Garland, S.M.** (2002). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 51, 33–42.
- Rasigade, J.-P., Raulin, O., Picaud, J.-C., Tellini, C., Bes, M., Grando, J., Ben Saïd, M., Claris, O., Etienne, J., Tigaud, S., et al.** (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus capitis* with reduced vancomycin susceptibility causes late-onset sepsis in intensive care neonates. *PLoS ONE* 7, e31548.
- Raymond, J., und Aujard, Y.** (2000). Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21, 260–263.
- Rogers, K., Fey, P., und Rupp, M.** (2009). Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* 23, 73–98.
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Zander, A.R., und Mack, D.** (2004). 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, 5614–5619.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Heilmann, C., Herrmann, M., und Mack, D.** (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55, 1883–1895.
- Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., et al.** (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28, 1711–1720.
- Rolo, J., de Lencastre, H., und Miragaia, M.** (2012). Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of *SCCmec*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 1333–1341.
- Rosenbach, F.J.** (1884). *Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.* (Wiesbaden: Bergmann Verlag).

- Ross, T.L., Fuss, E.P., Harrington, S.M., Cai, M., Perl, T.M., und Merz, W.G. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43, 363–367.
- Roth, R.R., und James, W.D. (1988). Microbial ecology of the skin. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 441–464.
- Rupp, M.E., und Archer, G.L. (1994). Coagulase-Negative Staphylococci: Pathogens Associated with Medical Progress. *Clinical Infectious Diseases* 19, 231–243.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., und Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect. Immun.* 73, 3007–3017.
- Sandiford, S., und Upton, M. (2012). Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1539–1547.
- Sarkany, I., und Gaylarde, C. (1967). Skin flora of the newborn. *The Lancet* 289, 589–590.
- Sarkany, I., und Gaylarde, C.C. (1968). Bacterial colonisation of the skin of the newborn. *J. Pathol Bacteriol* 95, 115–122.
- Savey, A., Fleurette, J., und Salle, B.L. (1992). An analysis of the microbial flora of premature neonates. *J. Hosp. Infect* 21, 275–289.
- Scherpe, S. (2008). Etablierung der Spa-Typisierung zur Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Med. Diss. Universität Hamburg.
- Schleifer, K.H., und Kloos, W.E. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int J Syst Bacteriol* 25, 50–61.
- Schulman, J., Stricof, R., Stevens, T.P., Horgan, M., Gase, K., Holzman, I.R., Koppel, R.I., Nafday, S., Gibbs, K., Angert, R., et al. (2011). Statewide NICU Central-Line-Associated Bloodstream Infection Rates Decline After Bundles and Checklists. *Pediatrics* 127, 436–444.
- Schultz, C., Rott, C., Temming, P., Schlenke, P., Möller, J.C., und Bucsky, P. (2002). Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr. Res.* 51, 317–322.
- Schultz, C., Temming, P., Bucsky, P., Göpel, W., Strunk, T., und Härtel, C. (2004). Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 135, 130–136.
- Schultz, C., Strunk, T., Temming, P., Matzke, N., und Härtel, C. (2007). Reduced IL-10 production and -receptor expression in neonatal T lymphocytes. *Acta Paediatr.* 96, 1122–1125.
- Schutze, G.E., Hall, M.A., Baker, C.J., und Edwards, M.S. (1991). Role of neutrophil receptors in opsonophagocytosis of coagulase-negative staphylococci. *Infect. Immun.* 59, 2573–2578.
- Shah, D.K., Doyle, L.W., Anderson, P.J., Bear, M., Daley, A.J., Hunt, R.W., und Inder, T.E. (2008). Adverse neurodevelopment in preterm infants with postnatal sepsis or necrotizing enterocolitis is mediated by white matter abnormalities on magnetic resonance imaging at term. *J. Pediatr.* 153, 170–175.e1.

- Shapiro, J.A., Nguyen, V.L., and Chamberlain, N.R.** (2011). Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J. Med. Microbiol.* 60, 950–960.
- Shinefield, H.R., Ribble, J.C., and Boris, M.** (1971). Bacterial interference between strains of *Staphylococcus aureus*, 1960 to 1970. *Am. J. Dis. Child.* 121, 148–152.
- Shore, A.C., and Coleman, D.C.** (2013). Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 350–359.
- Sibbald, M.J.J.B., Yang, X.-M., Tsompanidou, E., Qu, D., Hecker, M., Becher, D., Buist, G., and Diji, J.M.** (2012). Partially overlapping substrate specificities of staphylococcal group A sortases. *Proteomics* 12, 3049–3062.
- De Silva, G.D., Justice, A., Wilkinson, A.R., Buttery, J., Herbert, M., Day, N.P., and Peacock, S.J.** (2001). Genetic population structure of coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in preterm infants. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1520–1528.
- De Silva, G.D.I., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R.C., Wilkinson, A.R., Day, N.P.J., and Peacock, S.J.** (2002). The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 40, 382–388.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., and Sharma, M.** (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1955–1958.
- Soeorg, H., Huik, K., Parm, U., Ilmoja, M.-L., Metelskaja, N., Metsvaht, T., and Lutsar, I.** (2013). Genetic relatedness of coagulase-negative Staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32, 389–393.
- Sohn, A.H., Garrett, D.O., Sinkowitz-Cochran, R.L., Grohskopf, L.A., Levine, G.L., Stover, B.H., Siegel, J.D., and Jarvis, W.R.** (2001). Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *J. Pediatr.* 139, 821–827.
- Sperber, W.H., and Tatini, S.R.** (1975). Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* 29, 502.
- Spoering, A.L., and Lewis, K.** (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746–6751.
- Stamatas, G.N., Nikolovski, J., Luedtke, M.A., Kollias, N., and Wiegand, B.C.** (2010). Infant skin microstructure assessed in vivo differs from adult skin in organization and at the cellular level. *Pediatr Dermatol* 27, 125–131.
- Stamatas, G.N., Nikolovski, J., Mack, M.C., and Kollias, N.** (2011). Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. *Int J Cosmet Sci* 33, 17–24.
- Stoll, B.J.** (2004). Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-Birth-Weight Infants With Neonatal Infection. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 292, 2357–2365.
- Stoll, B.J., Gordon, T., Korones, S.B., Shankaran, S., Tyson, J.E., Bauer, C.R., Fanaroff, A.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Oh, W., et al.** (1996). 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, 63–71.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Stark, A.R., Tyson, J.E., et al.** (2002). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110, 285–291.
- Strunk, T., Power Coombs, M.R., Currie, A.J., Richmond, P., Golenbock, D.T., Stoler-Barak, L., Gallington, L.C., Otto, M., Burgner, D., und Levy, O.** (2010). TLR2 mediates recognition of live *Staphylococcus epidermidis* and clearance of bacteremia. *PLoS ONE* 5, e10111.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.-I., Tajima, A., Iwase, T., and Mizunoe, Y.** (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* 195, 1645–1655.
- Sun, D., Accavitti, M.A., und Bryers, J.D.** (2005). Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 93–100.
- Suresh, G.K., und Edwards, W.H.** (2012). Central line-associated bloodstream infections in neonatal intensive care: changing the mental model from inevitability to preventability. *Am J Perinatol* 29, 57–64.
- Sweeney, B., Puri, P., und Reen, D.J.** (2001). Polyunsaturated fatty acids influence neonatal monocyte survival. *Pediatr. Surg. Int.* 17, 254–258.
- Sweeney, B., Puri, P., und Reen, D.J.** (2005). Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids. *Pediatr. Surg. Int.* 21, 335–340.
- Telofski, L.S., Morello, A.P., Mack Correa, M.C., und Stamatias, G.N.** (2012). The Infant Skin Barrier: Can We Preserve, Protect, and Enhance the Barrier? *Dermatology Research and Practice* 2012, 1–18.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., und Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* 33, 2233–2239.
- Tenover, F.C., Gay, E.A., Frye, S., Eells, S.J., Healy, M., und McGowan, J.E., Jr** (2009). Comparison of typing results obtained for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2452–2457.
- Ternes, Y.M., Lamaro-Cardoso, J., André, M.C.P., Pessoa, V.P., Jr, Vieira, M.A. da S., Minamisava, R., Andrade, A.L., und Kipnis, A.** (2013). Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* carriage in neonates admitted to an intensive care unit in Brazil. *BMC Infect. Dis.* 13, 572.
- Te Witt, R., Kanhai, V., und van Leeuwen, W.B.** (2009). Comparison of the DiversiLab system, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Sequence Typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J. Microbiol. Methods* 77, 130–133.
- The Human Microbiome Project Consortium** (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature* 486, 215–221.

- The Human Microbiome Project Consortium** (2012b). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- The NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., et al.** (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research* 19, 2317–2323.
- Thomas, J.C., Vargas, M.R., Miragaia, M., Peacock, S.J., Archer, G.L., und Enright, M.C.** (2007). Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 616–619.
- Thurlow, L.R., Hanke, M.L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S.H., Engebretsen, I.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., und Kielian, T.** (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. *J. Immunol.* 186, 6585–6596.
- Tollin, M., Bergsson, G., Kai-Larsen, Y., Lengqvist, J., Sjövall, J., Griffiths, W., Skúladóttir, G.V., Haraldsson, A., Jörnvall, H., Gudmundsson, G.H., et al.** (2005). Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2390–2399.
- Tollin, M., Jägerbrink, T., Haraldsson, A., Agerberth, B., und Jörnvall, H.** (2006). Proteome analysis of vernix caseosa. *Pediatr. Res.* 60, 430–434.
- Tormo, M.A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., und Penadés, J.R.** (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 2465–2475.
- Tsai, M.-H., Hsu, J.-F., Lien, R., Huang, H.-R., Chiang, C.-C., Chu, S.-M., Liang, H.-F., und Huang, Y.-C.** (2012). Catheter management in neonates with bloodstream infection and a percutaneously inserted central venous catheter in situ: removal or not? *Am J Infect Control* 40, 59–64.
- Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., und Waldvogel, F.** (2009). Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine* 41, 109–119.
- Vacheethasanee, K., Temenoff, J.S., Higashi, J.M., Gary, A., Anderson, J.M., Bayston, R., und Marchant, R.E.** (1998). Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 425–432.
- Verstraete, E., Boelens, J., De Coen, K., Claeys, G., Vogelaers, D., Vanhaesebrouck, P., und Blot, S.** (2014). Healthcare-Associated Bloodstream Infections in a Neonatal Intensive Care Unit over a 20-Year Period (1992-2011): Trends in Incidence, Pathogens, and Mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35, 511–518.
- Viemann, D., Dubbel, G., Schleifenbaum, S., Harms, E., Sorg, C., und Roth, J.** (2005). Expression of toll-like receptors in neonatal sepsis. *Pediatr. Res.* 58, 654–659.
- Villari, P., Sarnataro, C., und Iacuzio, L.** (2000). Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J. Clin. Microbiol* 38, 1740–1746.

- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., und Otto, M.** (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 188, 706–718.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., und Otto, M.** (2004a). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279, 54881–54886.
- Vuong, C., Dürr, M., Carmody, A.B., Peschel, A., Klebanoff, S.J., und Otto, M.** (2004b). Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* 6, 753–759.
- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B., und Otto, M.** (2004c). Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. *J. Infect. Dis.* 190, 1498–1505.
- Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., und Otto, M.** (2004d). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6, 269–275.
- Wang, Z., und Wang, G.** (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, 590D – 592.
- Wang, G., Li, X., und Wang, Z.** (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37, D933–D937.
- Wang, R., Khan, B.A., Cheung, G.Y.C., Bach, T.-H.L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S.Y., und Otto, M.** (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 238–248.
- Wang, Y., Kuo, S., Shu, M., Yu, J., Huang, S., Dai, A., Two, A., Gallo, R.L., und Huang, C.-M.** (2014). *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 411–424.
- Watnick, P., und Kolter, R.** (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679.
- Watson, R.S., und Carcillo, J.A.** (2005). Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 6, S3–S5.
- Weisman, L.E., Thackray, H.M., Garcia-Prats, J.A., Neshin, M., Schneider, J.H., Fretz, J., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., Kramer, W.G., und Fischer, G.W.** (2009). Phase 1/2 double-blind, placebo-controlled, dose escalation, safety, and pharmacokinetic study of pagibaximab (BSYX-A110), an antistaphylococcal monoclonal antibody for the prevention of staphylococcal bloodstream infections, in very-low-birth-weight neonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2879–2886.
- Weisman, L.E., Thackray, H.M., Steinhorn, R.H., Walsh, W.F., Lassiter, H.A., Dhanireddy, R., Brozanski, B.S., Palmer, K.G.H., Trautman, M.S., Escobedo, M., et al.** (2011). A Randomized Study of a Monoclonal Antibody (Pagibaximab) to Prevent Staphylococcal Sepsis. *PEDIATRICS* 128, 271–279.

- Welch, W.H.** (1891). Conditions underlying the infection of wounds. *American Journal of the Medical Sciences* 102, 439–464.
- Westall, F., de Wit, M.J., Dann, J., van der Gaast, S., de Ronde, C.E., und Gerneke, D.** (2001). Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research* 106, 93–116.
- Widerström, M., Monsen, T., Karlsson, C., Edebro, H., Johansson, A., und Wiström, J.** (2009). Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 41, 642–649.
- Widerström, M., McCullough, C.A., Coombs, G.W., Monsen, T., und Christiansen, K.J.** (2012a). A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a Western Australian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2147–2151.
- Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A., und Monsen, T.** (2012b). Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 7–20.
- Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., und Nair, S.P.** (2002). Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 70, 6805–6810.
- Wimley, W.C.** (2010). Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology* 5, 905–917.
- Winslow, C.-E.A., und Winslow, A.R.** (1908). The systematic relationships of the Coccaceae: with a discussion of the principles of bacterial classification (J. Wiley & sons).
- Wu, G.H., Jarstrand, C., und Nordenström, J.** (1999). Phagocyte-induced lipid peroxidation of different intravenous fat emulsions and counteractive effect of vitamin E. *Nutrition* 15, 359–364.
- www.bacterio.net** (2015). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN. Letzter Zugriff 10.03.2015.
- www.mlst.net** (2014). MLST Webseite. Letzter Zugriff 07.11.2014.
- Wynn, J., Cornell, T.T., Wong, H.R., Shanley, T.P., und Wheeler, D.S.** (2010). The host response to sepsis and developmental impact. *Pediatrics* 125, 1031–1041.
- Yao, Y., Sturdevant, D.E., und Otto, M.** (2005). Genomewide Analysis of Gene Expression in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms: Insights into the Pathophysiology of *S. epidermidis* Biofilms and the Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of Biofilms. *The Journal of Infectious Diseases* 191, 289–298.
- Yoon, B.H., Park, C.-W., und Chaiworapongsa, T.** (2003). Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *BJOG* 110 Suppl 20, 124–127.
- York, M.K., Gibbs, L., Chehab, F., und Brooks, G.F.** (1996). Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 34, 249–253.

- Yoshio, H., Tollin, M., Gudmundsson, G.H., Lagercrantz, H., Jornvall, H., Marchini, G., und Agerberth, B.** (2003). Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr. Res.* 53, 211–216.
- Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kränzler, H., Batzilla, C., und Kozitskaya, S.** (2006). Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28, 14–20.

Anhang

Tabelle Anhang-1: Definition der Sepsis bei Früh- und Neugeborenen nach dem Surveillance Protokoll NEO Kiss des RKI

Sepsis	Definition
Klinische Sepsis	<p>Beginn ärztlicher antimikrobieller Sepsistherapie für mind. 5 Tage</p> <p>UND</p> <p>Kein Erregernachweis in der Blutkultur oder nicht getestet</p> <p>UND</p> <p>Keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle</p> <p>UND</p> <p>zwei der folgenden Kriterien (ohne andere erkennbare Ursache) (siehe unten)</p>
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis mit Erregernachweis (kein KNS)	<p>Erreger aus Blut oder Liquor isoliert, der kein KNS ist (Erreger darf mit Infektion an anderer Stelle nicht verwandt sein)</p> <p>UND</p> <p>zwei der folgenden Kriterien (siehe unten)</p>
Mikrobiologisch bestätigte Sepsis mit KNS als alleinigem Erreger	<p>KNS als einziger Erreger aus Blut isoliert</p> <p>UND</p> <p>Einer der folgenden Laborparameter (ohne andere erkennbare Ursache)</p> <ul style="list-style-type: none"> • CRP > 2,0 mg/ dl oder Interleukin 6-8 • Thrombozyten < 100/ nl • I/T-Ratio > 0,2 (unreife Granulozyten/ gesamt Granulozyten) • Leukozyten < 5/ nl (ohne Erythroblasten) <p>UND</p> <p>zwei der folgenden Kriterien (ohne andere erkennbare Ursache) (siehe unten)</p>
<p>Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fieber (> 38°C) oder Temperaturinstabilität (häufiges Nachstellen des Inkubators) oder Hypothermie (< 36.5°C) • Tachykardie (> 200/ min) oder neu/vermehrte Bradykardien (< 80/ min) • Rekapillarierungszeit > 2 s • neu oder vermehrte Apnoe(en) (> 20 s) • unerklärte metabolische Azidose (BE < -10 mval/ l) • neu aufgetretene Hyperglykämie (> 140 mg/ dl) • anderes Sepsiszeichen (Hautkolorit (nur wenn Rekapillarierungszeit nicht verwendet), erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler Allgemeinzustand, Apathie) und bei klinisch und mikrobiologisch bestätigter Sepsis mit Erregernachweis (kein KNS) laborchemische Zeichen (CRP, Interleukin 6-8) 	

(Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2009)

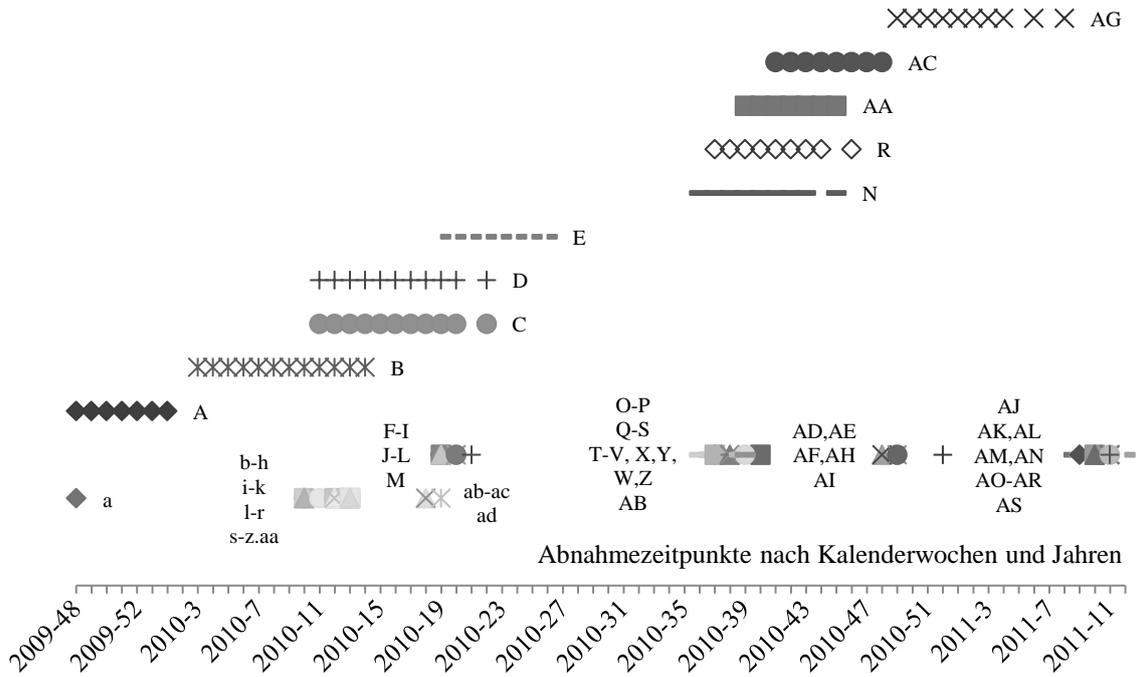


Abbildung Anhang-1: Zeitpunkte der Probengewinnung

Darstellung der unterschiedlichen Zeitpunkte der Probengewinnung bei den Neugeborenen der neonatologischen Intensiv- (Großbuchstaben) und Neugeborenenstation (Kleinbuchstaben) nach Kalenderwochen und Jahren.

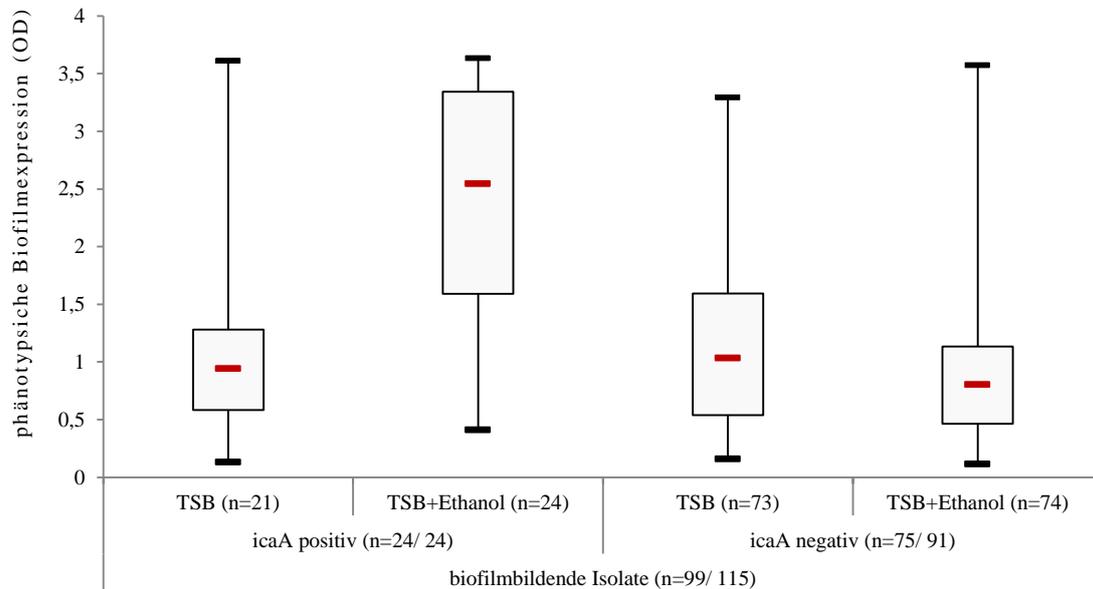


Abbildung Anhang-2: Vergleich der Biofilmbildung ausgewählter Isolate

Vergleich der quantitativen Fähigkeit zur Biofilmbildung im standardisierten Testverfahren bei ausgewählten biofilmbildenden Isolaten. Deutlich erhöhte phänotypische Biofilmexpression bei PIA-abhängigen (*icaA* positiven) Isolaten im TSB_{EtOH} Medium im Gegensatz zu PIA-unabhängigen Isolaten (*icaA* negativ).

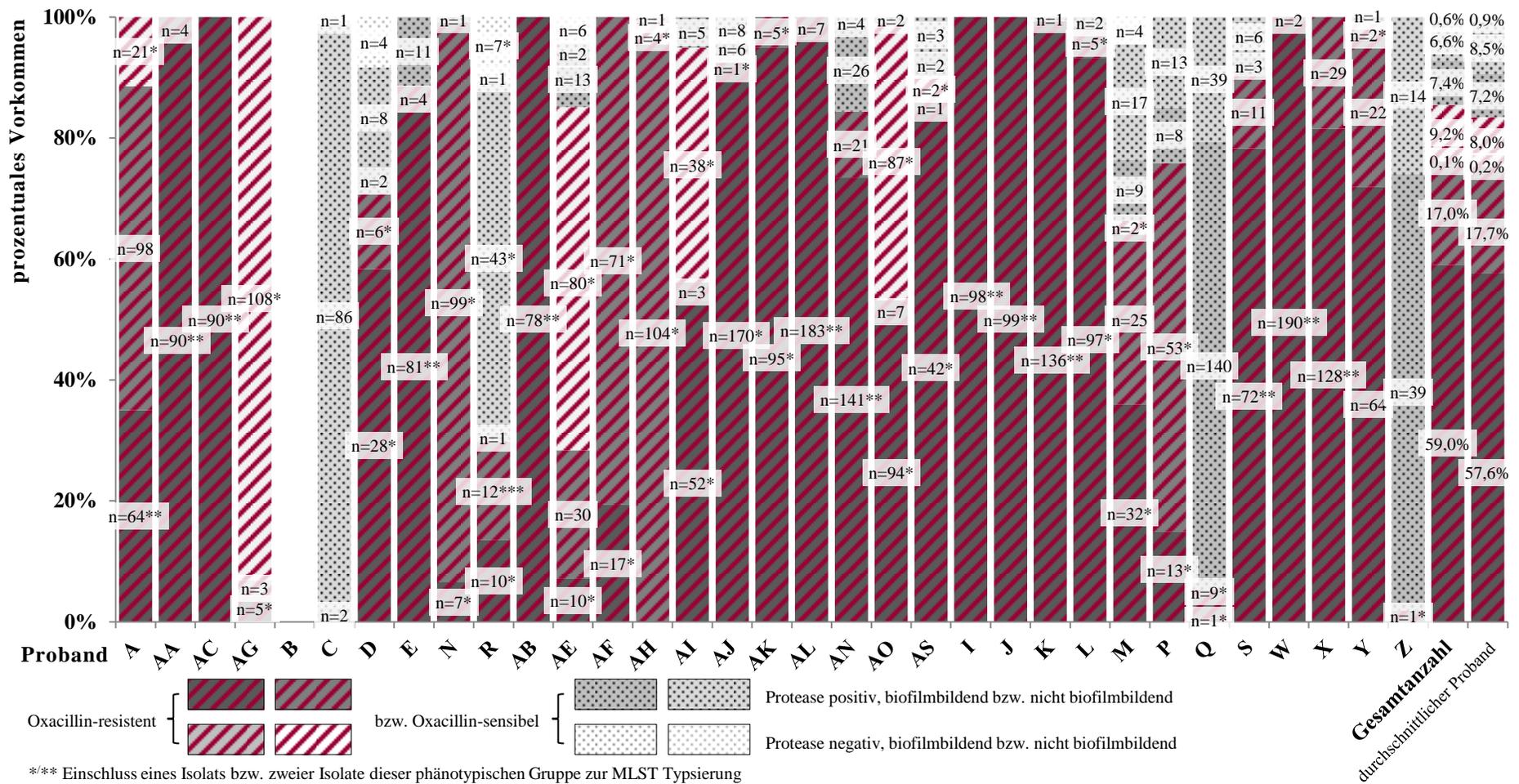
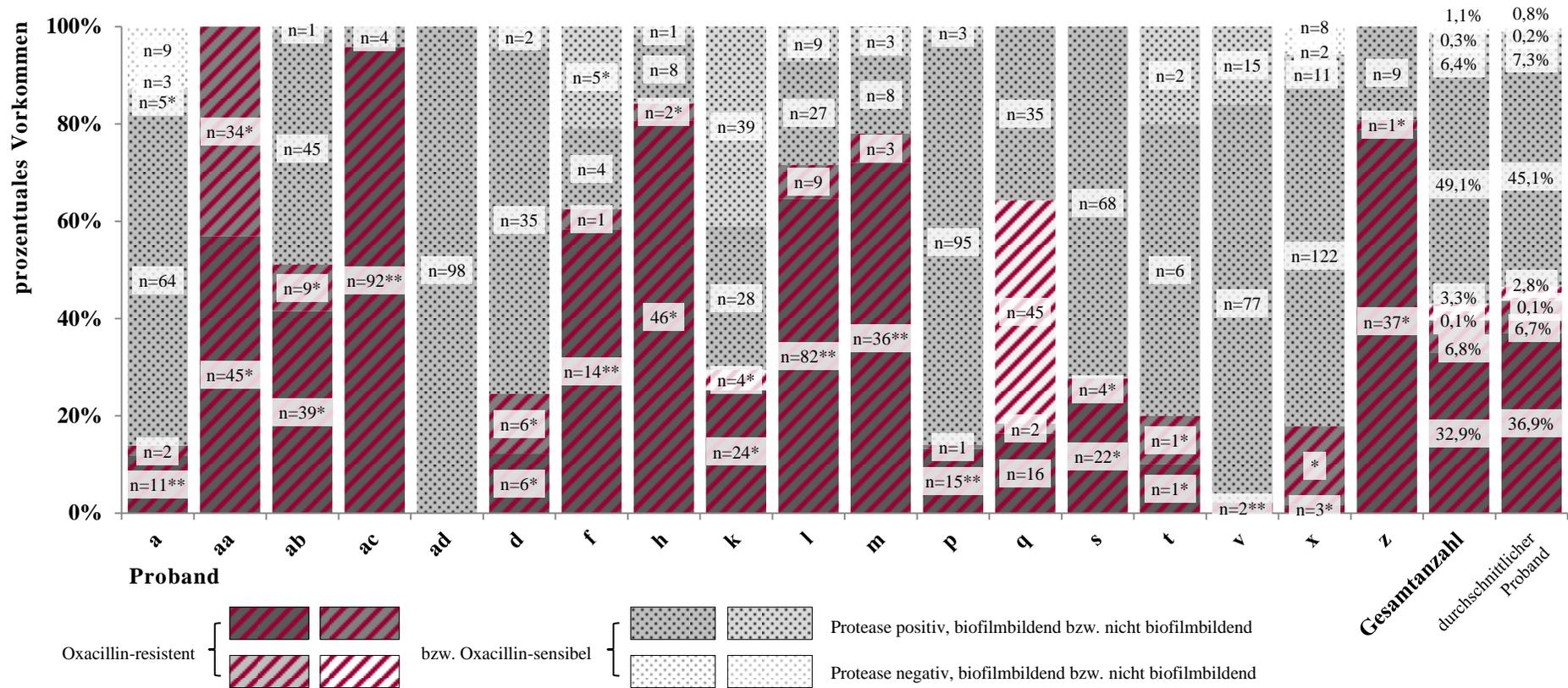


Abbildung Anhang-3: Prozentuales Vorkommen phänotypischer *S. epidermidis* Muster bei Neugeborenen der Intensivstation in der ersten Lebenswoche

Die Mehrzahl der Neugeborenen der Intensivstation waren mit einem Oxacillin-resistenten *S. epidermidis* Stamm kolonisiert (n=31/ 33), wobei das prozentuale Vorkommen und deren Anzahl bzgl. der Oxacillinresistenz (rot schraffiert) und dem phänotypischen Muster teilweise individuell sehr unterschiedlich war. Nur Proband B war in der ersten Lebenswoche nicht mit *S. epidermidis* besiedelt gewesen.



*** Einschluss eines Isolats bzw. zweier Isolate dieser phänotypischen Gruppe zur MLST Typisierung

Abbildung Anhang-4: Prozentuales Vorkommen phänotypischer *S. epidermidis* Muster bei Neugeborenen der Normalstation in der ersten Lebenswoche

Die Neugeborenen der Normalstation waren alle mit *S. epidermidis* Isolaten kolonisiert, die außer bei Proband ad auch in gewisser Anzahl Oxacillin-resistent waren (rot schraffiert). Die Oxacillinresistenz war deutlich geringer ausgeprägt als auf der neonatologischen Intensivstation.

Tabelle Anhang-2: Vergleich zwischen PFGE-Muster und phänotypischem Screening ausgewählter Isolate

Zeitpunkt in Wochen	Oxacillin resistent				Oxacillin sensibel			
	Protease positiv		Protease negativ		Protease positiv		Protease negativ	
	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -
1. (n=4)	D ^d (n=1)	A ^a (n=1)				C ^c (n=1)		B ^b (n=1)
2. (n=9)	A ^a (n=2)				C (n=2)			B ^b (n=1)
	C (n=3)							
	D (n=1)							
3. (n=7)	A (n=1)	F (n=1)						
	C (n=1)							
	D (n=4)							
4. (n=10)	A ^a (n=4)	H (n=1)		A (n=1)				
	C (n=1)	I (n=1)						
	D ^d (n=1)							
	G (n=1)							
5. (n=13)	A ^a (n=4)	E (n=1)						
	C (n=1)	I (n=3)						
	D (n=2)							
	G ^e (n=1)							
6. (n=7)	A (n=1)	H (n=1)						
	G (n=4)	I (n=1)						
7. (n=13)	A ^a (n=2)	I (n=3)		I (n=2)				
	C (n=1)							
	D (n=1)							
	G (n=2)							
	J (n=1)							
8. (n=3)	D (n=1)	I (n=1)						
		J ^f (n=1)						
10. (n=2)	I (n=1)				K (n=1)			

Legende:

farbig markiert = PFGE-Muster mit unterschiedlichem phänotypischen Muster, grau markiert= keine vorhandenen Isolate

Biofilm +/- = biofilmbildend/ nicht biofilmbildend

^a je n=1 MLST ST 5 (alle Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^b je n=1 MLST ST 494 (Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^c je n=1 MLST ST 2 (Isolat in der Wiederholung biofilmbildend)

^d je n=1 MLST ST 81 (beide Isolate in der Wiederholung nicht biofilmbildend)

^e je n=1 MLST ST 22

^f je n=1 MLST ST 59

Tabelle Anhang-3: MLST typisierte *S. epidermidis* Isolate aus der ersten Lebenswoche

Proband	Oxacillin resistent				Oxacillin sensibel			
	Protease positiv		Protease negativ		Protease positiv		Protease negativ	
	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -
Neonatologische Intensivstation: (Oxacillin resistent u. <i>mecA</i> positiv)								
A			5	5				
A	5							
A	5							
AA	89	89						
AA	89							
AB	2							
AB	2							
AC	130							
AC	59							
AE			59	59				
AE	142							
AF	21	21						
AF	5							
AG			5	5				
AG	2							
AH	89	89						
AH			59	59				
AI	5							
AI			5	5				
AJ	5							
AJ	5	5						
AK	89							
AK	89	89						
AL	5							
AL	2							
AN	5							
AN	89							
AO			5	5				
AO	454							
AS			5	5				
AS	2							
D	5	5						
D	5							
E	5							
E	66							
I	5							
I	5							
J	5							
J	5							
K	2							
K	5							
L	5							
L	5	5						
M	81							
M			81	81				
N	89	89						
N	5							
P	5	5						
P	35							
Q	22							

Q	22	22					
<u>R</u>		5					
R	81	81					
<u>R</u>	2						
R	5	5					
S	81						
S	81	81					
W	5						
W	5						
<u>X</u>	5						
X	2						
<u>Y</u>	54						
Y			3002 ¹				
Z	89	89					
Neugeborenenstation: (Oxacillin resistent u. <i>mecA</i> positiv)							
a	190						
a	2	2					
aa	5						
aa	89	89					
ab	89						
ab	89	89					
ac	5						
ac	5						
d	5						
d	89	89					
f	496						
f	89						
h	88						
h	88	88					
k			59	59			
k	59						
l	5						
l	2						
m	130						
m	3001 ¹						
p	2						
p	2	2					
s	59						
s	89	89					
t	327	327					
t	327						
v ²	6						
v	497						
x	89	89					
x	89						
z	5	5					
z	130						

¹ Neu gefundene Sequenztypen, daher vorläufig mit 3001 und 3002 gekennzeichnet.

² Ausnahme: *mecA* negativ, aber im Oxacillin-Screening positiv.

Legende:

xx	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Biofilm-Bestätigungstest
<u>xx</u>	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Biofilm-Bestätigungstest, sowie Nachweis des <i>icaA</i> -Gens.
xx	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Screeningergebnis

Neugeborene der Intensivstation wurden mit Großbuchstaben, der Normalstation mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Langzeitneugeborene sind mit kursiven Buchstaben markiert. Isolate der Probanden mit unterstrichenem Buchstaben sind mit der Diversilab-Methode analysiert worden. + = positiv/ biofilmbildend; - = negativ/ nicht biofilmbildend.

Tabelle Anhang-4: Ergänzung zu den MLST typisierten *S. epidermidis* Isolaten

Proband	Oxacillin resistent				Oxacillin sensibel			
	Protease positiv		Protease negativ		Protease positiv		Protease negativ	
	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -	Biofilm +	Biofilm -
Zeitpunkt 1. Woche								
Sonstige I: (aus Langzeitverlauf: Oxacillin resistent u. mecA positiv)								
<u>A</u> (3. Woche)	NEW							
<u>A</u> (3. Woche)			5	5				
<u>A</u> (4. Woche)	498							
<u>A</u> (4. Woche)	<u>2</u>							
<u>A</u> (5. Woche)	<u>2</u>							
<u>B</u> (5. Woche)	498							
<u>R</u> (2. Woche)	<u>2</u>							
<u>R</u> (2. Woche)	5	5						
<u>R</u> (4. Woche)	5	5						
<u>R</u> (4. Woche)	81	81						
<u>R</u> (5. Woche)	5	5						
<u>R</u> (5. Woche)	<u>22</u>							
<u>R</u> (7. Woche)	5	5						
<u>R</u> (8. Woche)		59						
Sonstige II: (mecA negativ u. Oxacillin negativ)								
<u>R</u>								494
<u>R</u>					<u>2</u>	2		
<u>R</u> (2. Woche)							494	494
<u>a</u>								110
<u>f</u>						495		
Legende:								
xx	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Biofilm-Bestätigungstest							
<u>xx</u>	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Biofilm-Bestätigungstest, sowie Nachweis des <i>icaA</i> -Gens.							
xx	Einordnung des Isolates mit entsprechendem Sequenztyp nach dem Screeningergebnis							
Neugeborene der Intensivstation wurden mit Großbuchstaben, der Normalstation mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Langzeitneugeborene sind mit kursiven Buchstaben markiert. Isolate der Probanden mit unterstrichenem Buchstaben sind mit der Diversilab-Methode analysiert worden. + = positiv/ biofilmbildend; - = negativ/ nicht biofilmbildend.								

Sarkany und Gaylarde, 1967/ 1968:

Untersuchung von 33/ 29 Neugeborenen bei Geburt und 420/ 225 Neugeborenen während der ersten sechs Lebenstage/ 29 Lebensstunden:

- Staphylokokken und Corynebakterien sind predominant auf der Haut.
- Per Kaiserschnitt geborene Neugeborene sind im Gegensatz zur natürlichen Geburt steril.
- Hautkolonisation des Neugeborenen steht in Assoziation zum Geburtskanal bzw. der Vaginalflora der Mutter.
- Normale Routinemanipulation beeinflussen nicht bzw. nur gering die Hautkolonisierung.

Carr und Kloos, 1977:

Untersuchung der Staphylokokken und Mikrokokken von zehn gesunden Neugeborenen vom ersten Lebenstag bis zur 32. Lebenswoche:

- *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* und *S. hominis* predominant und persistierend, Mikrokokken nur gelegentlich.
- 83/ 480 Proben mit *S. epidermidis*.
- Keine spezifische Nischenkolonisation der Neugeborenen im Gegensatz zur Erwachsenenhaut.
- Beeinflussung der Kolonisation durch Umgang mit den Eltern oder anderen Personen.

Eriksson, 1982:

Untersuchung von 85 Neugeborenen während der ersten Lebenswochen:

- Besiedlung bei Aufnahme an mindestens einer Lokalisation und mit potentiell pathogenen Mikroorganismen wie gramnegativen Stäbchen oder *S. aureus* innerhalb der ersten 24 Stunden.
- Keine Unterschiede in der Kolonisierung von schwer- und weniger schwerkranken Neugeborenen, sowie in der Stationsbelegung.
- Keine Beeinflussung des Kolonisationsmusters durch aufwendige Hygieneroutine.

Assoziation der Kolonisierung zwischen Geburtskanal und Neugeborenenhaut

kulturelle Untersuchungen der Hautbesiedlung bei Neugeborenen - Staphylokokken als Hauptkolonisator

1960

1970

1980

Analyse von Virulenzeigenschaften bei

Evans, 1970:

Untersuchung von 1.042 Neu- und 342 Frühgeborenen während der ersten Lebenswochen:

- Besiedlung mit *S. epidermidis*, *E. coli*, *Enterobacter* und anderen *Bazillen* um den Bauchnabel innerhalb der ersten drei Lebenstage höher als in der Nase.
- Größeres Vorkommen von *S. aureus* bei Frühgeborenen zwischen dem fünften und siebten Lebenstag - vermutlich aufgrund der intensiveren Betreuung.
- Besiedlung des Geburtskanals unbedeutend für die des Respirationstraktes, dessen Kolonisierung 20 % geringer am ersten Lebenstag als am Bauchnabel ist.

Chang, 1977:

Untersuchung von 58 Neugeborenen unter einer Heizlampe oder einem Standardinkubator während der ersten drei Lebenstage:

- Keine Infektion aufgetreten, kein Infektionsunterschied erkennbar.
- Auftreten von *S. epidermidis* ab dem ersten Lebenstag, häufigster Kolonisator (17 bis 65 %).
- Im Inkubator schnellere Besiedlung und erhöhtes Kolonisationsrisiko mit *S. aureus*.

D'Angio, 1989:

Untersuchung der KNS von 18 Neugeborenen über vier Wochen:

- *S. epidermidis* nach 7 Tagen mit 100 % predominant.
- Einzelner *S. epidermidis* Biotyp mit anfangs 0 % bis später zu 89 % Prävalenz, dieser war unter den Neugeborenen jeweils gleich, veränderte sich aber mit der Zeit.
- Antibiotikaresistenz: 32 bis 82 %.
- Biofilmbildung: 68 bis 95 %.
- Dreimalige Sepsis mit Hautkeimen.
- Keine Korrelation mit klinischen Faktoren; Spezies/ Biotyp, multiple Antibiotikaresistenzen und Schleimproduktion scheinen ein Selektionsvorteil für die Haut des Neugeborenen auf einer NITS zu sein. Unklar, welche Klone einen Vorteil in der Hautkolonisation haben.

Hall, 1990:

Untersuchung von 28 VLBW mittels nasopharyngealen Abstrich während der ersten Lebenswochen:

- Kolonisierung mit KNS: 12 % bei Aufnahme, 75 % in der zweiten Woche und abnehmend 30 % in der sechsten Woche; 86 % waren irgendwann mindestens einmal mit KNS kolonisiert.
- Kein Unterschied in Spezies, Schleimproduktion oder Antibiotikaresistenz beim Vergleich der Virulenzfaktoren der ersten mit der zehnten Lebenswoche.
- Einzelner Biotyp bei 46 % der Neugeborenen vorhanden, aber nur bei einem Neugeborenen war ein Stamm mit > 70 % dominant.

Savey, 1992:

Untersuchung von zehn Frühgeborenen der NITS auf deren Hautkolonisation:

- 79 % der Proben und 81 % der Neugeborenenhaut mit KNS kolonisiert. 11 % der Proben steril.
- *S. epidermidis* zu etwa 50 % der häufigste KNS Vertreter. 2-5 unterschiedliche KNS pro Neugeborenes. Hohe Antibiotikaresistenz mit 31 % Oxacillinresistenz.
- KNS Verteilung hoch heterogen und ohne spezielle Spezifität für eine bestimmte Lokalität. Quantitative und qualitative Unterschiede abhängig von der Sammlungsmethode oder den verschiedenen Umweltkontakten.

Keyworth, 1992:

Untersuchung von neun Frühgeborenen mit Atemnot einer NITS auf deren Hautkolonisation:

- 92 % der Hautflora KNS, *S. epidermidis* mit 82 % der häufigste Keim.
- Neugeborenenhaut in ihrem Mikrobiom sehr instabil und variabel. Wird durch Händeln des Kindes beeinflusst.
- Antibiotikaresistenz nicht mit dem Gebrauch von Antibiotika assoziiert.
- Transmission der Hautkeime zwischen Neugeborenen und Personal
- Erwerb von antibiotikaresistenten Stämmen aus dem Darm/ Stuhl und/ oder vom Personal.

Mikrobiom des Neugeborenen sehr instabil und variabel

1990

gesammelten Isolaten - Dominanz einzelner Biotypen und teilweise hohe Antibiotikaresistenzen ohne/ mit Korrelanz

Hall, 1990:

Untersuchung der Transmission von KNS von 101 Müttern und Neugeborenen bei Geburt:

- 30 Neugeborene bei Geburt besiedelt. Drei Kinder (5,7 %) mit gleicher Kolonisation wie Mutter, 27 Kinder (26 %) mit Transmission aus der Umwelt.
- 40 % der Stämme biofilmbildend bei Geburt.

Mehta, 1991:

Prospektive Untersuchung von 50 indischen Neugeborenen auf deren Hautkolonisation:

- Kolonisation mit KNS: Erster Lebenstag 18 %, dritter bis fünfter Lebenstag 40 %, siebter Lebenstag 30 %, 14. Lebenstag 25 %; 35 % der Besiedlung mit *S. epidermidis* und 37 % mit *S. haemolyticus*.
- Anstieg der Mehrfachresistenz (≥ 4 Antibiotika) von 37 % am ersten Lebenstag bis zu 100 % nach mehr als 14 Tagen.
- 45 % der Isolate schleim-/ biofilmbildend
- Kein Unterschied der Hautkolonisation in der zeitlichen Entwicklung
- Ein *S. haemolyticus* Kolonisierungstamm für Sepsis verantwortlich.
- Transmission zwischen Isolaten der Neugeborenen und des Personals.

Nyström, 1992:

Untersuchung an 20 Neugeborenen einer NITS Stufe II oder III über die Korrelation der Kolonisation und der antimikrobiellen Resistenz im Vergleich zum Antibiotikaverbrauch:

- *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* häufigsten KNS mit hohen Resistenzen gegen Isoxazolylpenicilline (72/ 86 % bzw. 71/ 94 %).
- Kein quantitativer oder qualitativer Unterschied im Antibiotikaverbrauch reflektiert die Resistenzlage der Isolate
- Besiedlung häufig mit mehr als einem KNS Stamm und Spezies, Transmission zwischen einzelnen Neugeborenen möglich.

Eastick, 1996:

Untersuchung von 20 Frühgeborenen in einer Pilotstudie und zehn Frühgeborenen über einen Zeitraum von sechs Monaten:

- Die Neugeborenenhaut ist in ihrer Kolonisation sehr instabil und variabel, ausgenommen sind hiervon der Stuhl und das Ohr.
- Es scheint ein Austausch der Kolonisator zwischen den verschiedenen Hautarealen zu geben.
- Der Stuhl scheint ein Reservoir für KNS und antibiotikaresistente Isolate zu sein und ist damit eine Gefahr für Kreuzkontaminationen beim Umgang mit den Neugeborenen.

Nelson-Filho, 2013:

Untersuchung der oralen Kolonisierung des Mundraums bei 51 Neugeborenen:

- *S. epidermidis* zwischen zehn Minuten und acht Stunden nach Geburt zu 30,7 %, zwischen acht und 16 Stunden zu 69,5 %, zwischen 16 und 24 Stunden zu 77,8 % und zwischen 24 und 53 Stunden zu 88,9 % des Neugeborenen im Mundraum nachweisbar.
- Ein Drittel der Probanden ebenfalls mit *S. aureus* besiedelt.

Ternes, 2013:

Untersuchung von 392 Nasenabstrichen und deren KNS bei Aufnahme und Entlassung bei brasilianischen Neugeborenen einer Intensivstation:

- *S. haemolyticus* und *S. epidermidis* häufigsten KNS.
- *mecA* Gen bei Entlassung zu 23,6 % häufiger vertreten (n=60/ 83,6 %) als bei Aufnahme.
- Länge des Aufenthaltes mit dem Erwerb einer mehrfachen Antibiotikaresistenz assoziiert.
- Große genetische Diversität unter den *S. haemolyticus* und *S. epidermidis* Isolaten, einzelne Klone persistieren auf der Haut von der Aufnahme bis zur Entlassung.

molekularbiologische Analysen und Mikrobiomstudien zur Haut- und Schleimhautkolonisation bei Neugeborenen

2000

2010

strukturelle Analyse anderer Kolonisationsareale wie beispielsweise Mundflora oder Intestinaltrakt

Dominguez-Bello, 2010:

Untersuchung des gesamten Mikrobioms der Haut durch Gesamtsequenzierung. Klärung der Transmission von Mutter zum Neugeborenen (n=10):

- Neugeborene mit undifferenzierter Kolonisierung, unabhängig von der Geburtsform.
- Kolonisation der Neugeborenen bei natürlicher Geburt mit spezifischer Flora der Mutter, bei Kaiserschnitt mit unspezifischen Gemeinschaft-/ Umgebungskeimen.

Capone 2011:

Untersuchung von 31 gesunden Neugeborenen auf deren Hautmikrobiom mittels PCR:

- Staphylokokken dominieren anfangs trotz großem bakteriellen Reichtums und Diversität anderer Bakterien.
- Stabilisierung des unstabilen Mikrobioms des Neugeborenen ab dem dritten Lebensmonat bis zum Ende des ersten Lebensjahres.

Hell, 2013:

Untersuchung der Charakteristik von zehn LOS-Stämmen und 16 Hautisolaten bei gesunden Neugeborenen:

- Biofilmbildung: 63 % der Hautisolate und 50 % der Blutkulturisolate. 44 bzw. 80 % der gesammelten Isolate *ica* positiv, *in vitro* Bildung von Biofilmen aber nur bei 6/ 7 der Blutkultur- und 5/ 8 der Hautisolate. Jeweils ähnliche Adhäsions- und Biofilmbildungskapazitäten.
- 9/ 10 der Blutkulturisolate Methicillin resistent, im Gegensatz zu den vollständig sensiblen Hautisolaten.
- Blutkulturisolate im Gegensatz zu den Hautisolaten mit höheren Antibiotikaresistenz und invasiveren Gen-Equipment.

Hira, 2013:

Untersuchung der Kolonisationsdynamik
der Haut und des Stuhls bei

40 Frühgeborenen:

- Anstieg der Antibiotikaresistenz während des Aufenthalts.
- Resistenterer und höhere *mecA* Prävalenz bei intestinalen Isolaten.
- Mütterliche Isolate mit geringerer Antibiotikaresistenz und *mecA* Genhäufigkeit.
- Signifikanter Anstieg eines resistenten *S. haemolyticus* Klons auf der Haut ab dem 21. Tag und Rückgang eines sensitiven *S. warneri* Isolats.

**Abbildung Anhang-5: Ähnliche Studien der letzten 50 Jahre zur Hautbesiedlung von Neugeborenen**

Erste Studien in den ´60er Jahren konnten anhand kultureller Untersuchungen eine Assoziation der Kolonisierung zwischen dem Geburtskanal und der Neugeborenenhaut beweisen sowie Staphylokokken als Hauptkolonisator der neonatalen Hautflora aufzeigen. Mit Beginn der ´80er Jahre wurden vermehrt die Virulenzeigenschaften der Isolate untersucht und mit dem Antibiotikaverbrauch oder klinischen Daten versucht zu korrelieren, bevor im neuen Jahrtausend Mikrobiomstudien die gesamte bakterielle Neugeborenenhaut analysieren konnten.

Tabelle Anhang-5: Ergänzende Informationen zur Methodik der Studien in

Abbildung Anhang-5

Autor	Methode/ Abstrichregionen/ zusätzliche Informationen	Zeitraum
Hira <i>et al.</i> , 2013	Kontaktagarplatten Neugeborenes: Stuhl, Fußunterseite Mutter: Daumen 551 Isolate von 40 Frühgeborenen, pro Kultur max. nur drei Isolate weiter differenziert Antibiotikaresistenz mit mecA Nachweis	Neugeborenes: 24, 48, 72 Stunden (\pm Stunden), falls stationärer Aufenthalt sieben, 14 und 21 Tage nach Geburt Mutter: Einmalig innerhalb der ersten drei und anschließend sieben, 14 und 21 Tage nach Geburt
Hell <i>et al.</i> , 2013	Abstrichtupfer Rücken, Brust, Arm, Bein	Zweiter Lebenstag (> 24 Stunden; \leq 48 Stunden)
Ternes <i>et al.</i> , 2013	Abstrichtupfer Nase 392 Isolate von Aufnahme und Entlassung, Untersuchung von einer repräsentativen Kolonie pro Patient	Aufnahme und Entlassung (Einschlussalter nicht publiziert)
Nelson-Filho <i>et al.</i> , 2013	Abstrichtupfer Mundraum 81 Proben von 51 Neugeborenen	Zehn Minuten bis 53 Stunden nach Geburt
Capone <i>et al.</i> , 2011	Abstrichtupfer mit NaCl und Pufferlösung Unterer vorderer Unterarm, Gesäß, Stirn	Dritter bis 52. Lebenswoche
Dominguez-Bello <i>et al.</i> , 2010	Abstrichtupfer Rechter und linker vorderer Unterarm, Stirn, Mundraum direkt bei Geburt, Rektalabstriche nach Mekoniumabgang des Neugeborenen. Bei der Mutter rechter und linker vorderer Unterarm, Mundraum und Vagina eine Stunde vor Geburt Vier Kinder mit natürlicher Geburt und sechs mit Kaiserschnitt	Direkt bei Geburt bzw. nach Abgang von Mekonium < 24 Stunden nach Geburt.
Eastick <i>et al.</i> , 1996	Abstrichtupfer mit Pufferlösung, Plastikbrett für Unterarm/ -bein Pilotsudie: Neun bis 13 von 18 Stellen: hintere und vordere Ohrmuschel, Nasenloch, Nase, Achsel, Bauchnabel, Nacken, Ellenbeuge, Ober-/ Unterarm, Brust, Poplitealgrube, Leistenfalte, innerer und äußerer Oberschenkel, Unterschenkel, Zehenspalte, Stuhl Longitudinalstudie: hintere und vordere Ohrmuschel, Nasenloch, Unterarm/ -schenkel.	Pilotstudie: achter bis 31. Lebenstag Longitudinalstudie: Tag 4, 8, 12, 16, 21, 28, dann monatlich bis zur Entlassung und anschließend ein- bis zwei monatlich bis zum sechsten Monaten.
Keyworth <i>et al.</i> , 1992	Abstrichtupferwaschmethode Stirn, Brust, Bauchnabelregion, Rücken, Ober-/ Unterarm, Ober-/ Unterschenkel 2.548 Staphylokokkenisolate	Innerhalb von sechs Stunden nach Geburt sowie dritter, fünfter und siebter Lebenstag, anschließend wöchentlich
Nyström <i>et al.</i> , 1992	Abstrichtupfer Bauchnabel und Nasenloch 160 Kulturen gesammelt, 88 mit KNS, jeweils zehn Kolonien wurden weiter analysiert.	Am Tag der Geburt, vierter, siebter und zehnter Lebenstag
Savey <i>et al.</i> , 1992	Abstrichtupfer Kopfhaut, Achselhöhle, Nackenfalte, Bauchnabel, Leistenfalte, Analspalte, Lendenbereich, Handfläche, Ellenbogeninnenseite, Fußinnenfläche, Poplitealgrube, äußerer Gehörgang, Nasenhöhle,	Vierter/ fünfter Lebenstag um 8.00 Uhr morgens

	äußere Genitale, Pharynx, Rektal, Stuhl, Magensaft Insgesamt 176 Proben genommen mit 256 KNS-Proben	
Mehta <i>et al.</i> , 1991	Abstrichtupfer mit NaCl Nase, Achsel, Bauchnabel, Ohr,	Erster Lebenstag, dritter/ fünfter Lebenstag, dann wöchentlich. Einschlusskriterien mind. sieben Tage Aufenthalt.
Hall <i>et al.</i> , 1990a	Abstrichtupfer Vaginalabstrich der Mutter, Nasopharyngealabstrich des Neugeborenen Unterscheidung mittels Spezies, Biotyp, Antibiotikaempfindlichkeit, „Schleim-“/ Biofilmbildung, Phagentypisierung, Plasmidanalyse.	Sofort nach vaginaler Geburt.
Hall <i>et al.</i> , 1990b	Abstrichtupfer Nasopharyngeal Zusätzliche Untersuchung Spezies, Biotyp, Antibiotikaempfindlichkeit, „Schleim-“/ Biofilmbildung Insgesamt 222 nasopharyngeale Abstriche, wovon letztendlich 125 Isolate KNS waren (96 Abstriche) und 105 weiter untersucht worden sind. Einschränkung in der Differenzierung mittels morphologischen Aussehens.	Wöchentlich, mind. vier bis 15 Wochen Aufenthalt
D'Angio <i>et al.</i> , 1989	Abstrichtupfer Achsel, hinterm Ohr, Nasopharynx, Rektum Zusätzliche Untersuchung auf Spezies, Biotyp, Antibiotikaeinnahme, Antibiotikaempfindlichkeit, „Schleim-“/ Biofilmbildung 5 unterschiedliche Subkulturen wurden jeweils genommen. 1564 Isolate von KNS, wovon 614 evaluiert worden.	Vier Wochen: Erster Tag, dann zwei Wochen zweimalig und anschließend einmal die Woche.
Eriksson <i>et al.</i> , 1982	Abstrichtupfer Nase, Bauchnabel, Perineum, Stuhl, dritter, siebter Tag und anschließend wöchentlich	Bei Aufnahme, dritter sowie siebter Lebenstag und anschließend wöchentlich
Carr und Kloos, 1977	Abstrichtupfer mit NaCl-Lösung Stirn, Nasenloch, Hals, Oberkörper, Bauchnabel, rechte und linke Achsel, rechter und linker Arm und Bein, rechter obere Fuß Insgesamt 480 Proben	Erster und dritter Lebenstag, sowie 1., 6.-8., 10.-12., 16.-20. und 28.-32. Lebenswoche
Chang <i>et al.</i> , 1977	Abstrichtupfer Nase, Bauchnabel, Leiste	Täglich während der ersten drei Lebenstage
Evans <i>et al.</i> , 1970	Abstrichtupfer Nase, Bauchnabel	Vier bis fünf Morgen jede Woche bis zur Entlassung.
Sarkany und Gaylarde, 1968	1986: Kontaktplatten 1967: Tupfer, Kontaktplatten, Klebeband Kopfscheitel, Schulterregion, Achsel, Bauchnabel, Leistengegend	1968: Abstrich sofort bei Geburt von Kopf und Scheitel, restlichen sofort nach Geburt, dann stündlich für sieben Stunden, zwei-stündlich für zehn Stunden und vier-stündlich bis zur 29. Stunde. Keine Probensammlung während der Nacht.
Sarkany und Gaylarde, 1967	1967: Abstrich sofort bei Geburt, stündlich für sieben Stunden, zwei- stündlich für zehn Stunden, vier-stündlich für zwei Tage und täglich bis zum sechsten Tag. Sowie bei beiden Studien Abstriche des Geburtskanals nach Blasen- sprung. Weitere Abstriche vor und nach dem Waschen des Neugeborenen.	

Anmerkung:

Dank gilt auch dem Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel für die Durchführung der MLST Sequenzierungen, unterstützt durch das Exzellenzcluster der Deutschen Forschungsgemeinschaft „*Inflammation at Interfaces*“ und „*Future Ocean*“, sowie damit verbunden S. Greve, S. Arndt und T. Henke für die technische Unterstützung.

Aufgrund der sehr großen Datenmengen konnten nicht alle zugrundeliegenden Basisdaten in vollem Umfang in dieser Doktorarbeit abgebildet werden. Die zentralsten Ergebnisse sind in den entsprechenden Kapiteln oder im Anhang abgehandelt und dargestellt worden. Eine komplette Übersicht der Rohdaten ist auf Anfrage erhältlich und in entsprechenden Dateiformaten auf Datenträgern gesichert worden.

Danksagung

„Mikrobiologie kann begeistern und erfreuen.“

Für das enthusiastische Vorleben der Begeisterung für die Mikrobiologie möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Johannes Knobloch bedanken. Seine Tür stand für Fragen und neue Ideen immer offen.

Für die Unterstützung seitens der Kinderklinik des UKSH, Campus Lübeck, danke ich Herrn Prof. Dr. med. Christoph Härtel und den Ärzten der Kinderintensivstationen, die immer freundlich, hilfsbereit und interessiert an der gemeinsamen Studie waren (auch wenn man von mir wiederholt „angepiept“ wurde). Besonders möchte ich mich bei den vielen Krankenschwestern der Intensivstationen bedanken, die immer wieder Hautabstriche von den Neugeborenen genommen, und damit zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Vor allem aber herzlichen Dank an alle Eltern und Neugeborenen, die an unserer Studie teilgenommen und letztendlich hauptverantwortlich für die interessanten Ergebnisse sind.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Knobloch, die mich auf dem Weg zur Doktorarbeit begleitet haben, meinen aufrichtigen Dank für die schönen, gemeinsamen letzten Jahre. Ganz besonders möchte ich Frau Justina Bimschas nennen, die mir mit ihrer sonnigen und fröhlichen Art immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Den Ärzten und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck und Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach danke ich für die offene und freundliche Aufnahme und die Möglichkeit der Promotion.

Für die immer wieder aufmunternden Worte und kritischen Anregungen möchte ich mich bei meiner Freundin Frau Clarissa Bahr bedanken. Du bereicherst mein Leben.

Auch danke ich meinen Eltern Heike und Bernd Knaack, die mir jeden Weg ermöglicht und mich immer unterstützt haben, meinen Geschwistern Mareike und Christoph Knaack, die trotz unserer unterschiedlichen Lebenssituationen immer für mich da sind und Familie bedeuten.

Vielen Dank an alle unerwähnten Personen, die mich in meinem bisherigen Leben unterstützt, geprägt oder mir Freude bereitet haben.

Dennis Knaack

Lebenslauf**Dennis Knaack****PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsdatum: 18. März 1985
Geburtsort: Lübeck, Deutschland
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

**BILDUNGSWEG UND PRAXIS- UND BERUFSERFAHRUNG**

Doktorand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Prof. Dr. med. Werner Solbach
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck,
 Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Johannes K.-M. Knobloch
seit Aug 13

Assistenzarzt für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie
 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitäts-
 klinikum Münster, Prof. Dr. med. Georg Peters

Juni 2013 **Approbation als Arzt**

Okt 08 - Juni 2013 **Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck**
 Wahlfach Praktisches Jahr: Medizinische Mikrobiologie
 Auslandserfahrungen in Südkorea, Indien (Famulaturen) und
 China (Praktisches Jahr)

Okt 06 – Sep 08 **Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg**
 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Okt 05 – Sep 06 **Studium der Mathematik und Sozialwissenschaften (2-Fach Bachelor) an der Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg**
 Ziel: *Master of Education* (Lehramt für Gymnasium)

Juli 04 – März 05 **Zivildienst, Christophorushaus Bäk, Ratzeburg**

Aug 95 – Juni 04 **Baltic-Gesamtschule zu Lübeck**
 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Veröffentlichungen

Kongressbeiträge – Abstracts:

D. Knaack*, C. Härtel, J. Knobloch, Primary colonisation with coagulase-negative staphylococci in hospitalised newborns, 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)/ 27th International Congress of Chemotherapy (ICC), Mailand, Italy, 07. - 10. May 2011

D. Knaack*, C. Härtel, J. Knobloch, Welche Bakterien bewohnen zuerst die Haut meines Babys?, Uni im Dialog - Lübecker Doktorandentage, Universität zu Lübeck, Lübeck, 18. Mai 2011

S. Hauswaldt, **D. Knaack**, R. Roseland, W. Solbach, J. Knobloch*, Rep-PCR analysis (DiversiLab) indicates ESBL plasmid transmission from verotoxin producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31. March - 3. April 2012

D. Knaack*, E. A. Idelevich, C. Heilmann, G. Peters, K. Becker, Biofilm production and virulence factors in staphylococcal isolates from orthopaedic vs. non-orthopaedic deep tissue specimens, VAAM-Jahrestagung 2014/ 66. Jahrestagung der DGHM, Dresden, 05. - 08. Oktober 2014

D. Knaack*, E. A. Idelevich, N. Schleimer, A. S. Scherzinger, A. Kriegeskorte, G. Peters, W. Mutter, K. Becker, *In vitro* activity of recombinant chimeric bacteriophage endolysins against *Staphylococcus aureus* under different growth conditions, 25st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark, 25. - 28. April 2015

Auszeichnungen:

Reisekostenzuschuss des „Vereins zur Förderung des Wissens in der Infektiologie e.V.“, Lübeck, in Höhe von 400 Euro für die ECCMID/ ICC 2011 in Mailand

Travel grant for Young Scientists der ESCMID in Höhe von 500 Euro und der Teilnahmegebühr für die ECCMID 2015 in Kopenhagen