

Aus der Klinik für Pädiatrie und Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Michael Zemlin

**Einfluss von biologischen Merkmalen, Ernährung und  
Antibiotika auf die adaptiven Immunantwort Frühgeborener  
gegen hexavalenten-Impfstoff im ersten Lebensjahr**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von:  
Mara Lea Wuhrmann  
geb. am: 29.03.1990

Tag der Promotion: 04.02.2026

Dekan: Prof. Dr. M. Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Zemlin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Sester

Für Anouk und meine Mama

**„Wenn du fliegen willst, musst du die Sachen loslassen, die dich runterziehen“**

(Toni Morrison)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Frühgeburlichkeit und seine Herausforderungen .....	1
1.1.1. Antigenpräsentierende Zellen und Pattern-Recognition-Receptoren .....	3
1.1.2. T- Zellen und der Toll-like-receptor.....	4
1.1.3. B-Zellen und Interleukin-10 .....	4
1.2. Der Nestschutz .....	5
1.2.1. Maternale Serum IgG .....	5
1.2.2. Maternale IgA-Antikörper in der Muttermilch.....	6
1.2.3. Blunting .....	6
1.3. Muttermilch und das Mikrobiom des Neugeborenen.....	7
1.3.1. Human Milk Oligosaccherides und Short Chain Fatty Acids .....	7
1.3.2. Das Mikrobiom des Neugeborenen.....	8
1.4. Auswirkungen von Antibiotika auf das frühkindliche Mikrobiom .....	9
1.5. Die PRIMAL-Studie.....	10
1.6. Impfschema .....	10
1.7. Impfstoff.....	11
1.8. Ziele der Arbeit .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
2.1. Material .....	13
2.1.1. Geräte .....	13
2.1.2. Chemikalien.....	13
2.2. Methoden.....	14
2.2.1. Studiendesign des PRIMAL Subprojekts 5 in Homburg.....	14
2.2.2. Ethikantrag .....	16
2.2.3. Blutentnahmen und Separation von Plasma .....	16
2.2.4. ELISA.....	16
2.2.5. Interpretation der Ergebnisse und Empfehlungen [IU/mL] des Herstellers Tecan IBL Germany .....	18
2.2.6. Case Report Files.....	19

2.2.7.	Telefoninterviews, Vervollständigung und Re-evaluation klinischer Angaben zum Impfstatus .....	20
2.2.8.	Statistik .....	21
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>22</b>
3.1.	Probanden-Demographie.....	22
3.2.	Analyse der Plasma-IgG-Antikörperkonzentrationen .....	26
3.2.1.	Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener in den ersten Lebenstagen .....	26
3.2.2.	Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener nach Vollendung des ersten Lebensjahres (LT 365).....	27
3.2.3.	Plasma-Antikörperspiegel am 1. und 365. Lebenstag von FG in der Gestationsaltersklasse GA1 .....	29
3.2.4.	Plasma-Antikörperspiegel am ersten und am 365. Lebenstag von FG in der Gestationsaltersklasse GA2 .....	30
3.2.5.	Plasma-Antikörperspiegel weiblicher und männlicher FG in den ersten Lebentagen .....	32
3.2.6.	Plasma-Antikörperspiegel weiblicher und männlicher FG zu Beginn des zweiten Lebensjahres.....	33
3.2.7.	Plasma-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 1.....	35
3.2.8.	Plasma-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 365.....	36
3.2.9.	Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener nach unterschiedlichen antibiotischen Therapien.....	38
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>40</b>
4.1.	Einfluss des Gestationsalters auf die Plasma-Antikörperspiegel am 1. und 365. Lebenstag 40	
4.1.1.	Plasma-Antikörperspiegel beider Altersgruppen GA1 und GA2 am ersten Lebenstag .....	41
4.1.2.	Plasma-Antikörperspiegel beider Altersgruppen am 365. Lebenstag .....	43
4.2.	Einfluss des Geschlechts auf die Ausbildung einer Antikörperreaktion innerhalb des ersten Lebensjahres.....	46
4.3.	Einfluss des Stillens auf die IgG-Plasma-Antikörperverläufe im ersten Lebensjahr .....	47
4.4.	Einfluss der antibiotischen Wirkstoffkombination von Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam auf die Plasma-Antikörperentwicklung von Frühgeborenen innerhalb des ersten Lebensjahres.....	51
4.5.	Schwächen und Stärken der Arbeit .....	52
4.6.	Schlussfolgerungen .....	54
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIII</b>
	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>XVIII</b>

**DANKSAGUNG** ..... **XIX**  
**LEBENS LAUF** .....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

---

## Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AK	Antikörper
APC	Antigen presenting cells
BCR	B cell receptor / B-Zell-Rezeptor
BREG	Regulatory B cell
CRF	Case report form (Erhebungsbogen für klinische Studien)
C-section	Sectio Caesarea / Kaiserschnitt
DAMPs	Damage associated molecular patterns
EONS	Early onset Sepsis
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FG	Frühgeborene
GA	Gestationsalter
HMOs	Human milk oligosaccherides
IgA	Antikörper vom Immunglobulin Typ A
IgG	Antikörper vom Immunglobulin Typ G
IL	Interleukin
LONs	Late Onset Sepsis
LT	Lebenstag
MDOR+	Multidrug-resistant organism (multiresistenter Keim)
NG	Neugeborene
NK	Natürliche Killerzellen
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PRIMAL	PRimal IMMunity At the beginning of Life Studie
PRR	Pattern recognition receptors
RTE	Recent thymic emigrant
RG	Reifgeborene
SCFAs	Short chain fatty acids
Spp.	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche
STIKO	Ständige Impfkommission in Deutschland
TCR	T cell receptor
TLR	Toll-like receptor
WHO	World Health Organisation

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Blutentnahmen und Impfungen Frühgeborener im ersten Lebensjahr .....	15
Abbildung 2: Flußdiagramm zum Ablauf der Rekrutierung der Probanden für die vorliegende Arbeit	23
Abbildung 4: Plasma-IgG-Antikörperspiegel in den ersten Lebenstagen Frühgeborener mit unterschiedlichem Gestationsalter.....	27
Abbildung 5: Plasma-IgG-Antikörperspiegel am 365. Lebenstag Frühgeborener mit unterschiedlichem Gestationsalter.....	28
Abbildung 6: Plasma-IgG-Antikörperspiegel an LT 1 und LT 365 von FG der GA1. ....	30
Abbildung 7: Plasma-IgG-Antikörperspiegel an LT 1 und LT 365 von FG der GA2. ....	31
Abbildung 8: Plasma-IgG-Antikörperspiegel männlicher und weiblicher FG an LT 1. ....	33
Abbildung 9: Plasma-IgG-Antikörperspiegel männlicher und weiblicher FG an LT 365. ....	34
Abbildung 10: Plasma-IgG-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 1. ....	36
Abbildung 11: Plasma-IgG-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 365. ....	37

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und genutzte Software.....	13
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und ELISA-Kits.....	14
Tabelle 3: Tetanus toxin 5S IgG plus ELISA.....	18
Tabelle 4: Diphtheria toxin 5S IgG plus ELISA .....	18
Tabelle 5: Haemophilus influenzae B IgG ELISA.....	19
Tabelle 6: Demographie der Frühgeborenen.....	24
Tabelle 7: Plasma-IgG-Antikörperspiegel in [IU/ml] an LT 365 von Frühgeborenen entsprechend der antibiotischen Wirkstoffkombination, die sie in den ersten Lebenstagen erhalten haben.....	38

## Zusammenfassung

Das Immunsystem von Frühgeborenen muss die Etablierung eines Mikrobioms kontrollieren und potenzielle Krankheitserreger abwehren, obwohl es auf die keimfreie intrauterine Umgebung ausgelegt ist. Das erhöhte Infektionsrisiko bei Frühgeborenen beruht unter anderem auf schwachen unspezifischen und adaptiven Immunantworten und auf dem noch unvollständigen mütterlichen „Nestschutz“. Impfungen tragen wesentlich zur Prophylaxe schwerer Infektionen bei Frühgeborenen bei. Viele Frühgeborene werden nicht entsprechend den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission geimpft und sind daher unzureichend gegen impfpräventable Erkrankungen geschützt. Gründe für die mangelnde Adhärenz an die Impf-Empfehlungen ist die Angst vor Impfkomplicationen und die Sorge, dass Frühgeborene keine ausreichende Impfantwort etablieren könnten. Zahlreiche Studien belegen, dass Impfungen bei Frühgeborenen effizient sind und ein positives Nutzen-Risikoprofil haben. In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir den Einfluss von Gestationsalter, Geschlecht, Ernährung und Antibiotikagaben auf die Impfantwort im ersten Lebensjahr. Im Plasma von 38 Frühgeborenen wurden vor der ersten Impfung und zu Beginn des zweiten Lebensjahres mittels ELISA die Konzentrationen spezifischer IgG-Antikörper gegen Tetanus Toxin-, Diphtherie Toxin-, Poliomyelitis- und Haemophilus influenzae gemessen. Es war kein Einfluss des Gestationsalters, der Ernährung mit Muttermilch, des Geschlechts oder der Antibiotikatherapie auf die Höhe der Antikörperkonzentrationen im Plasma nachweisbar. Protektive Antikörperkonzentrationen im Plasma gegen Tetanus wurden von circa 84% der Frühgeborenen bei der Einjahresuntersuchung erreicht. Für Polio lag dieser Anteil bei circa 76%, für Diphtherie bei circa 63% und für HiB bei circa 58%. Entsprechend erreichten 16% der Kinder keine protektiven Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus, 24% keine protektiven Antikörperkonzentrationen gegen Polio, 37% keine protektiven Antikörperkonzentrationen gegen Diphtherie und 42% keine protektiven Antikörperkonzentrationen gegen HiB in der Einjahresuntersuchung. Weitere Untersuchungen sind nötig, um mögliche Einflussfaktoren auf die Impfantwort bei Frühgeborenen besser zu verstehen. Die Aufklärung über Effizienz und Verträglichkeit von Impfungen bei Frühgeborenen sollte bei Eltern und Behandlern verstärkt werden.

## Abstract

The immune system of preterm infants must control the establishment of a microbiome and fend off potential pathogens, although it is adapted to the sterile intrauterine environment. The increased risk of infection in preterm infants is due, among other factors, to weak nonspecific and adaptive immune responses and an incomplete maternal "nest protection." Vaccinations greatly contribute to the prophylaxis of severe infections in preterm infants. Many preterm infants are not vaccinated according to the recommendations of the Standing Committee on Vaccination and are therefore insufficiently protected against vaccine-preventable diseases. Reasons for the lack of adherence to vaccination recommendations include fear of vaccination complications and concerns that preterm infants might not establish an adequate immune response. Numerous studies demonstrate that vaccinations in preterm infants are effective and have a favorable benefit-risk profile. This study, we examine the influence of gestational, nutrition, and antibiotic administration on the immune response within the first year of life. Specific IgG antibody concentrations against Tetanus Toxin, Diphtheria Toxin, Poliomyelitis, and Haemophilus influenzae were measured in the plasma of 38 preterm infants before the first vaccination and at the beginning of the second year of life using ELISA. No influence of gestational age, breastfeeding, gender, or antibiotic therapy on antibody concentrations in plasma was detectable. Protective antibody concentrations against Tetanus were achieved in approximately 84% of preterm infants at the one-year follow-up. For Polio, this proportion was about 76%, for Diphtheria about 63%, and for HiB about 58%. Accordingly, 16% of the children did not have protective antibody concentrations against Tetanus, 24% against Polio, 37% against Diphtheria, and 42% against HiB at the one-year assessment. Further studies are necessary to better understand possible factors influencing the vaccine response in preterm infants. Education about the effectiveness and tolerability of vaccinations in preterm infants should be intensified among parents and healthcare providers.

# 1. Einleitung

## 1.1. Frühgeburtlichkeit und seine Herausforderungen

Frühgeburtlichkeit wird unterteilt in die „späte“ (34.- 36. Schwangerschaftswoche), „moderate“ (32.- 33. Schwangerschaftswoche), „sehr frühe“ (vor Vollendung der 32. Schwangerschaftswoche) und „extreme“ Frühgeburtlichkeit (vor Vollendung der 28. Schwangerschaftswoche) (1) und gilt als Hauptrisikofaktoren für das Versterben von Säuglingen in der Neonatalperiode (d.h. innerhalb der ersten 7 Lebensstage) aufgrund der mit ihr assoziierten Komplikationen (2,3). Unter diesen ist das hohe Risiko einer Infektion für das Neugeborenen hervorzuheben. Pro Jahr sind ca. 7 Millionen solcher Fälle zu verzeichnen, von denen 700 000 im Verlauf zum Tod des Neugeborenen führen (5). Das Risiko für eines fulminanten Verlauf einer Infektion, verhält sich umgekehrt proportional zu einem niedrigen Geburtsgewicht und -alter (4,5). Zudem erstreckt sich die, mit der Frühgeburtlichkeit assoziierte Morbidität über die Dauer des gesamten Lebens, wobei insbesondere das Risiko einer infektionsbedingten Rehospitalisierung um das 1,5-fache erhöht ist (6). Die Gründe für - durch Immunisierungen - potenziell abwendbarer infektionsbedingter Komplikationen bei Frühgeborenen, werden auf ein Zusammenspiel unterschiedlicher intrinsischer und extrinsischer Faktoren zurückgeführt. Die intrinsischen Faktoren ergeben sich allen voran aus der physiologischen Unreife des Immunsystems. Bezeichnend sind die Naivität der B-Zellen der spezifischen Immunantwort, die Verschiebung der unspezifischen Immunabwehr zugunsten antiinflammatorischer Prozesse (7–10) und erniedrigte Plasmakonzentrationen maternaler Antikörper bedingt durch den Zeitpunkt der Geburt, der vor oder innerhalb des Zeitraumes des aktiven Antikörpertransfers liegt (11). Zu den extrinsischen Faktoren zählen, die klassischerweise mit der Frühgeburtlichkeit assoziierten, medizinischen Verfahrensweisen in der neonatalen Intensivmedizin, sowie verlängerte stationäre Aufenthalte in einem stark keimbesiedelten Umfeld, zu dessen Spektrum typischerweise auch resistente Keime gehören (2). Die Entbindung durch den Kaiserschnitt hat Auswirkungen auf das Mikrobiom der Haut und die Schleimhäute in Gastrointestinal- und Nasopharyngealtrakt (7,12), zumal invasive Verfahren eine zusätzliche Eintrittspforte für Pathogene darstellen. Auch die Verabreichung von Steroiden und oftmals (Breitband-) Antibiotika können sich ebenfalls auf die bakterielle Kolonisierung des Gastrointestinaltrakts niederschlagen. Eine weitere Gefahr birgt die Durchbrechung natürlicher Schutzbarrieren, beispielsweise durch Rupturen und Läsionen im Bereich der Haut und des Respirationstraktes. Nicht zuletzt wirkt sich auch die parenterale Ernährung und vor allem das Nicht-Stillen auf das Mikrobiom des NG aus, da dem Neugeborenen protektive Faktoren aus der Muttermilch vorenthalten werden, welche zum Teil mit immunmodulatorischen Effekten hinsichtlich einer positiven Beeinflussung des Darmmikrobioms assoziiert sind (5,6,13). Zu den negativen Langzeitauswirkungen von Dysbiosen bei Frühgeborenen gehören unter anderem: Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC), verschiedene intestinale Erkrankungen, „late onset sepsis“ (LONS), Übergewichtigkeit im Kindesalter,

Ekzempneigung, Asthma, etc. (12). Aktuelle Studien, darunter die PRIMAL-Studie („*PRiming Immunity At the beginning of Life*“), eine multizentrische, randomisierte und doppelt verblindete Studie betreibt Forschung hinsichtlich der Möglichkeit der Verhinderung von Darmdysbiosen durch die Verabreichung von Probiotika innerhalb der ersten Lebenstage und die allgemein positiven Effekte von Probiotika auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems bei Frühgeborenen.

Ein weiterer extrinsischer Faktor, der trotz verfügbarer, etablierter und empfohlener Impfstoffe auch in der heutigen Zeit noch zum Versterben von immer Kinder an Infektionskrankheiten führt, deren Ausbrechen und Verlauf hätten verhindert oder abgemildert werden können, ist eine verspätete Erstimmunisierung (4). Diese wird bei medizinischem Personal und Familienangehörigen oftmals mit der Sorge um das Kind, bzw. Bedenken hinsichtlich von Komplikationen und Sicherheit des Impfstoffes begründet und geht oft mit der Skepsis gegenüber der Ausbildung einer adäquaten Immunantwort bei Frühgeborenen einher (4). Eine hohe Immunogenität korreliert mit der Stärke des gesetzten Reizes für das Immunsystem, im vorliegenden Fall mit der Konzentration der zu verabreichenden Impfantigene. Für die Wirkweise und Wirksamkeit von Impfstoffen bedeutet dies einerseits dem Stadium der Unreife und der daraus resultierenden Schutzbedürftigkeit hinsichtlich immunologisch getriggerte fulminante Verläufe gerecht zu werden. Und andererseits dem Bestreben nach zwar möglichst niedrigen, aber dennoch ausreichend hohen Konzentrationen von Impfantigenen zur Auslösung einer adäquaten Immunreaktion Rechnung zu tragen. Dieses Spannungsfeld beschäftigt auch die aktuelle Forschung. Ansätze sind u.a. die Zusammensetzung der Impfstoffe und einzelne Komponenten, sowie sog. „Impfregime“, d.h. die Zeitabstände und Booster-, bzw. „Auffrisch-Schemata“. Auch wenn jedes Individuum spezifisch auf ein Impfantigen reagiert (14) und insbesondere das Zustandekommen der Immunantwort bei Frühgeborenen noch nicht gänzlich verstanden ist (11,13,14), teilen zahlreiche Studien die Ansicht, dass das unreife Immunsystem sehr wohl fähig ist auf den Großteil der aktuell verfügbaren Impfstoffe derart mit einer Im-Immunantwort zu reagieren, dass protektive Antikörperkonzentrationen erreicht werden (5,11). Die Niederlande, die American Academy of Pediatrics Committee on infectious Disease in den USA und die Ständige Impfkommission (STIKO) in Deutschland empfehlen daher ein einheitliches Impfregime für Früh- und Reifgeborene, basierend auf der Annahme, dass die Fähigkeit zur Ausbildung einer Immunantwort bei Früh- und Reifgeborenen vergleichbar ist. Eine Vielzahl aktueller Studien spricht sich entsprechend für das Impfen nach chronologischem Alter bei Frühgeborenen aus und sieht hierin die Chance das Risiko lebensbedrohlicher Komplikationen minimieren (5,11). Das angeborene Immunsystem von Frühgeborenen

Sowohl die unspezifische, als auch die adaptive Immunität des angeborenen Immunsystem von Frühgeborenen (FG) unterscheidet sich zum Zeitpunkt der Geburt von dem Immunsystem des späteren Lebens (15). Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist seine Unreife, die sich beispielsweise durch quantitativ- und/oder funktional defiziente Antigen-präsentierende Zellen (13), eine vermehrte Aktivierung von Th1-, statt Th2-Helferzellen (16) und eine geringe Produktion von pro-

inflammatorischen Zytokinen, bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an anti-inflammatorischen Zytokinen auszeichnet (15). Auch noch nach etwa acht Wochen, zum Zeitpunkt der ersten Grundimmunisierung, finden sich bei FG verglichen mit Reifgeborenen (RG) eine verminderte absolute Anzahl an Lymphozyten, T-Zellen, B-Zellen, Th-Helferzellen und eine erniedrigte CD4/CD8-Ratio (5,17,18). Dieser anti-inflammatorische, tolerante Status (13,15) geht mit Fortschreiten des Reifungsprozesses des neugeborenen Immunsystems in einen kontrolliert-inflammatorischen Status über. In der Literatur wird dieser initial tolerante Status damit begründet, dass hierdurch sowohl die Abstoßung mütterlicher Alloantigene verhindert wird, wodurch eine physiologische Keimbildung der Haut und im Gastrointestinaltrakt des Neugeborenen ermöglicht wird und zugleich überschießende und in der Konsequenz möglicherweise schädigende Immunreaktionen verhindert (19). Zugleich führt die Dominanz der Th1-gewichteten toleranten Immunreaktion zu einer erhöhten Vulnerabilität mit Blick auf das Risiko für Infektionen und einer verminderten Impfreaktion (16).

### **1.1.1. Antigenpräsentierende Zellen und Pattern-Recognition-Rezeptoren**

Das angeborene Immunsystem stellt die unspezifische „*first line of defence*“ des neugeborenen Organismus gegen ein breites Spektrum diverser Pathogene dar (19). Charles Janeway Jr. beschrieb 1989 erstmals das Zusammenspiel zwischen der angeborenen- und der adaptiven Immunität (20). Obwohl ein detailliertes Verständnis hinsichtlich der genauen zellulären und molekularen Mechanismen immer noch aussteht (13,20), herrscht Einigkeit dahingehend, dass die Zellen des unspezifischen Immunsystems, sogenannte *Antigen presenting cells* (APCs), namentlich Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen- aufgrund ihres Reifegrades- eine verminderte Funktionalität aufweisen und zu einer suboptimalen Interaktion zwischen APCs und T-Zellen führt (15). Als unbestritten gilt mittlerweile auch, dass die angeborene Immunität die Fähigkeit der rezeptorvermittelten Detektion von Pathogenen besitzt, die zur Einleitung einer unspezifischen Abwehrreaktion führt, in deren Folge die Stimulation des adaptiven Immunsystems instruiert wird (20). Die besagten Rezeptoren werden *Pattern recognition receptors* (PRRs) genannt und von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen verschiedener Gewebetypen exprimiert (20). PRRs spielen eine zentrale Rolle für die angeborene Immunität, da ihre Hauptfunktion in der Detektion, Phagozytose und Einleitung einer schnellen, antigenunabhängigen, inflammatorischen Signalkaskade liegt (8). Sie können extrazellulär, intrazellulär oder im Zytosol gelöst vorliegen, und erkennen und binden sowohl molekulare Strukturen von Pathogenen, die sogenannten *pathogen associated patterns* (PAMPs), als auch körpereigene Moleküle, die im Rahmen von Zellschädigungen entstehen, die sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs) (8). Beide Klassen führen zur Ausschüttung von Zytokinen und Interferonen und sind in der Art ihrer Ausprägung charakteristisch für das angeborene Immunsystem.

### 1.1.2. T- Zellen und der Toll-like-receptor

Die charakteristische Besonderheit der bereits vorangehend beschriebenen rezeptorvermittelten Abwehrreaktion besteht darin, dass die neonatale Immunantwort eine Gewichtung hin zu einer antiinflammatorischen Th2-Immunantwort zeigt (7,13,19,21). Die über den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelte, „tolerante“ T-Zellantwort ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die unreifen T-Zellen sich an ihre, im steten Wandel begriffene Umwelt, anpassen müssen (22). Ihr Fokus liegt auf dem Aufbau einer stabilen (T-Zell-)Population, auf deren Grundlage im späteren Verlauf die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses erfolgen soll. Zu diesem Zweck gilt es einerseits autoaggressive T-Zellen auszusortieren und im Thymus zu eliminieren, und zum anderen zwischen körpereigenen Kommensalen, des sich ausbildenden Mikrobioms, Pathogenen und Autoantigenen unterscheiden zu lernen (19,23). Im Gegensatz hierzu spielt bei den PRRs die Untergruppe der *Toll-like receptors* (TLRs) eine entscheidende Rolle in der Einleitung einer schnellen und effektiven proinflammatorischen Th1-Zellantwort. TLRs werden auf- oder in den Zellen des blutbildenden Systems, besonders auf *recent thymic emigrants* (RTEs) exprimiert und benötigen weder eine Prozessierung noch ein Priming zur Auslösung einer Abwehrfunktion, dafür mangelt es bei dieser Art der Abwehr an der Ausbildung eines Gedächtniseffektes (19). Demnach ist die TCR-vermittelte Th2-Zellantwort entgegen der Annahme einer rein reifungsbedingt defizitären Immunreaktion als ein intrinsischer Schutzmechanismus zur Prävention von Selbstschädigungen zu werten und die direkte TLR-vermittelte, proinflammatorische Immunantwort, als eine kurzfristige und effektive Gefahrenabwehr im Zuge einer sich noch in der Entwicklung befindlichen adaptiven Immunität (13,19).

### 1.1.3. B-Zellen und Interleukin-10

Ebenso wie die T-Zellen, als Zellen der spezifischen Immunität, unterliegen auch die neonatalen B-Zellen einer Regulierung durch das angeborene Immunsystem. Die B-Zellen von Frühgeborenen liegen meist in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen vor und zeichnen sich durch eine verminderte Interaktion mit T-Zellen, sowie einen schnellen Abfall aus (15). Ein unzureichender Reifungs- und Differenzierungsprozess und ein defizitäres Priming werden mitunter als Ursache für Kurzlebigkeit neonataler Plasma- und B-Gedächtniszellen angeführt (19,24). Insbesondere die Differenzierung des B-Zell-Rezeptors ist erst mit Ende des dritten Trimesters abgeschlossen (5), so dass bei Frühgeborenen mit einer verminderten Detektionsfähigkeit von Antigen auszugehen ist (17). Weiterhin zeichnen sich neonatale Antikörper dadurch aus, dass sie, im Vergleich zu adulten, in niedrigeren Serumkonzentrationen vorliegen und besonders schnell wieder abfallen. Hierbei wird der Gruppe der regulatorischen B-Zellen (Bregs) ein großer Einfluss zugeschrieben. Bregs machen in den ersten vier Lebenswochen einen großen Anteil der neonatalen B-Zell-Population im peripheren Blut aus, vergleicht man ihren Anteil am Gesamtanteil nach der Vollendung des ersten Lebensjahres und im Erwachsenenalter. Sie führen zu einer Ausschüttung von antiinflammatorischen Interleukinen (IL-2, IL-

4, IL-9), in besonderem Maße von IL-10 (19). IL-10 wird neben eines hemmenden Einflusses auf gewisse T-Zell-Subpopulationen, eine entsprechende Wirkung auf das, über dendritische Zellen vermittelten Priming von Th1-Immunezellen, zugeschrieben (19,24). Auch hieran lässt sich die Ausreifung der spezifischen Immunität vom toleranten, angeborenen- hinzu einem kontrolliert proinflammatorischen System abbilden (19).

## **1.2. Der Nestschutz**

Der Nestschutz, vermittelt durch übertragene mütterliche Antikörper, gewährleistet in Form einer passiven Immunität einen überbrückenden Schutz für das, sich zum Zeitpunkt der Geburt in Reifung begriffenen Immunsystem des Frühgeborenen, in Exposition mit der Außenwelt. Der sogenannte horizontale Transfer findet in utero diaplazentar und post partum über die Muttermilch statt.

### **1.2.1. Maternale Serum IgG**

Während der Schwangerschaft ist der Fötus über die natürliche Barrierefunktion der mütterlichen Plazenta vor potenziell schädlichen Einflüssen geschützt. In Vorbereitung auf die Konfrontation des unreifen Immunsystems des Kindes mit der Außenwelt beginnt bereits zwischen der 17. und 18. Schwangerschaftswoche ein aktiver, horizontaler Transfer mütterlicher IgG-Plasma-Antikörper auf das Ungeborene (15,25). Dieser steigt im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich an (17,25) und erreicht seinen Höhepunkt -je nach Autor in der Literatur- nach der vollendeten 32. SSW oder innerhalb der letzten vier Schwangerschaftswochen, um post partum im sogenannten „Nestschutz“, einem Zustand passiver Immunität zu gipfeln (16,18,25,26). Zu diesem Zweck ist ein Mechanismus erforderlich, der es erlaubt die Barrierefunktion der Plazenta aktiv zu überwinden. Die Schlüsselrolle kommt hierbei dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zu (16,27). Er wird in unterschiedlichen Geweben, vor allem aber in den Synziotrophoblasten der Plazenta exprimiert und bindet spezifisch an die Fc-Fragmente von IgG-Plasma-Antikörper, um sie dann zu transferieren (25). Die im maternalen Kreislauf zirkulierenden IgG werden von den Synziotrophoblasten auf mütterlicher Seite aufgenommen und in graduell angesäuerten Endosome verpackt, da das Bindungsverhalten des FcRn stark von dem in der Umgebung vorherrschenden pH-Wert abhängig ist. Ein saures Milieu erhöht die Bindungsaffinität, wohingegen physiologische pH-Werte zu einer Senkung der Bindungsverhaltens führen (16,25). Die angesäuerten Endosome gewährleisten somit eine möglichst hohe Bindungsaffinität zwischen Antikörper und neugeborenen FcRn, wodurch die Barriere einer polarisierten Membran entgegen einem Konzentrationsgefälle mittels Transzytose überwunden werden kann. Auf fetaler Seite verschmilzt das Endosom mit der Zellmembran, der Fc-Rezeptor gibt den Antikörper aufgrund des physiologischen pH von 7.4 in den fetalen Kreislauf frei und steht einem Recyclings Prozess zur Verfügung (16). Es wird angenommen, dass die Menge an übertragenen Antikörpern einerseits von der Konzentration mütterlicher Antikörper zum Zeitpunkt der Schwangerschaft (25) und andererseits mit dem Geburtsalter des Kindes zusammenhängen (11,28).

### **1.2.2. Maternale IgA-Antikörper in der Muttermilch**

Auch der in Muttermilch finden sich neben maternalen Immunzellen, wie B- und CD4-Zellen, eine beachtliche Konzentration von Antikörpern der Klasse IgA. Diese werden von B- Zellen in den mütterlichen Brustdrüsen, oder in den Schleimhäuten anderer Gewebe gebildet. Die bei Menschen vorkommenden IgA-Antikörper unterteilen sich in IgA1-Antikörpern, welche sich hauptsächlich auf Schleimhäuten, beispielsweise im Respirationstrakt, auf der Haut, sowie in Serum und Speichel finden, wohingegen IgA2-Antikörper vor allem im Intestinum sezerniert werden. Hervorzuheben ist die Annahme, dass sie dort nicht absorbiert werden, sondern das Intestinum auskleiden (25). Hierdurch treten sie über die Dauer des gesamten Verdauungsprozesses mit Pathogenen in Kontakt (28,29). Obwohl die wissenschaftliche Evidenz noch nicht gegeben ist, bestätigen die einigen wenigen diesbezüglichen Studien die Annahme, dass maternalen IgA-Antikörpern eine direkte, protektive Wirkung hinsichtlich der Abwendung des Auftretens von Nahrungsmittelallergien (29) und der Ausbildung einer Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) zugeschrieben werden könnte (25). Die Wirkung wird hierbei auf den Trinkprozess des Neugeborenen zurückgeführt, in Zuge dessen es zum Verschlucken und Inhalieren kleinster Mengen von Muttermilch kommen kann, wodurch geringe Mengen an Antikörpern (IgA und IgG) bspw. in den Respirationstrakt gelangen können (28). Ob und inwieweit auch pathogenspezifische IgG-Antikörper aus der Muttermilch über das Intestinum aufgenommen werden können, bleibt zu erforschen (28). Einige Studien vermuten sowohl einen Zusammenhang zwischen vorausgegangenen Infekten der werdenden Mutter und der Menge an nachgewiesenen IgA-Antikörpern im Kolostrum von Frühgeborenen (25) und diskutieren, ob auch Immunisierungen während der Schwangerschaft nicht nur zu erhöhten IgA-Plasmaspiegeln, sondern auch zu erhöhten Konzentrationen von IgA-Antikörperkonzentrationen in der Muttermilch führen könnten (28). Ob die protektiven Effekte grundsätzlich spezifisch auf Antikörper aus der Muttermilch oder aus dem Serum zurückzuführen sind, ist kaum nachweisbar (25), insbesondere da Untersuchungen hinsichtlich der Überdauerung des Verdauungsprozesses von Antikörpern noch ausstehen (28).

### **1.2.3. Blunting**

Die Frage, ob und zu welchem Grad mütterliche Antikörper mit zukünftigen Immunisierungen interferieren, wird in der Forschung kontrovers diskutiert (24). Die mütterlichen Antikörper fallen innerhalb der ersten sechs Lebensmonate zügig ab (30), zeitgleich durchläuft das neugeborene Immunsystem (innerhalb der ersten drei Lebensmonate) einen erheblichen Reifungsprozess (24). Zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung mit etwa zwei Lebensmonaten ist demnach von einem ausgeprägten Nestschutz auszugehen. Folgt man der Annahme, dass die „passive Immunität“ von Neugeborenen einen suppressiven Effekt auf zukünftige Immunisierung hat, ist dieser abhängig von dem Verhältnis zirkulierender Antikörper und der Konzentration verabreichter Impfantigene (18,24). Den Grund hierfür liefert eine Kreuzreaktion zwischen dem Fc- und Bc-Rezeptoren, welche beide auf den neugeborenen

Plasmazellen exprimiert werden. Bindet ein Bc-Rezeptor ein Antigen, welches wiederum mit einem mütterlichen Antikörper markiert ist, kann dieser Antikörper wiederum über das FcR- Fragment an dieselbe Plasmazelle binden und es kommt es zu einer Blockade statt einer Stimulation der Plasmazelle (18,25). Dieser Prozess wird als *Blunting* bezeichnet (24,25). Der Mechanismus ist allgemein Gegenstand aktueller Forschung und soll auch in dieser Arbeit insofern berücksichtigt werden, als dass ein Zusammenhang zwischen dem Status des Frühgeborenen mit anzunehmenden niedrigen Antikörperkonzentrationen und in der Folge höheren Impftitern und dem vergleichsweise Reifgeborenen, mit ausgeprägterem Nestschutz und in der Konsequenz einem schlechteren Ansprechen auf die Impfstoffe zu diskutieren ist (11).

### **1.3. Muttermilch und das Mikrobiom des Neugeborenen**

Abgesehen von den vorangehend beschriebenen immunologisch bedeutsamen Einflüssen der Muttermilch für das neugeborene Kind, ist diese mitunter für die Entwicklung einer physiologischen Darmflora ausschlaggebend (9,31–33). Das sogenannte Mikrobiom hat einen entscheidenden Einfluss hinsichtlich des Risikos der Entwicklung von Erkrankungen wie Adipositas, IgE-assoziierte Ekzeme (12,33), Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn und Diabetes Mellitus Typ 1 (12) und Asthma (29,33). In der Forschung stehen aktuell daher die, in der Muttermilch enthaltenen *Human Milk Oligosaccherides* (HMOs) im Fokus, welchen eine entscheidende Rolle für die Zusammensetzung einer physiologischen Darmflora und mitunter in Folge dessen, auch eine immunregulierende und protektive Funktion zugesprochen wird (12,33). Daneben gelten mitunter die Art der Entbindung, eine Ernährung mit Formula Nahrung, sowie die Zufuhr von Antibiotika in der Neugeborenenperiode zu nennen, als weitere das Mikrobiom beeinflussende Faktoren (23).

#### **1.3.1. Human Milk Oligosaccherides und Short Chain Fatty Acids**

Muttermilch setzt sich anteilig aus unterschiedlichen Komponenten zusammen, von denen die Humanen Milk Oligosaccheride unter den festen Bestandteilen, neben den Lipiden und der Laktose, in etwa ein Drittel ausmachen. Es handelt sich hierbei um in der Brustdrüse gebildete, komplexe Kohlenstoffe, welche resistent gegenüber den kindlichen Verdauungsenzyme sind und wodurch sie zu über 90 % unverdaut bis in den Darm gelangen (33), wo sie ihre modulierende Wirkung entfalten. Sie dienen einigen Darmbakterien, überwiegend den, als physiologisch betrachteten, Bifidobacteriaceae, als Energiequelle und führen zu deren Expansion innerhalb des sich ausbildenden frühkindlichen Mikrobioms (9,33). Bifidobacteriaceae haben neben der Fähigkeit HMOs zu verstoffwechseln, auch die Möglichkeit diese extrazellulär in Metabolite umzusetzen, die wiederum von anderen physiologischen Darmbakterien zu sogenannten „*short chain fatty acids*“ (SCFAs) verstoffwechselt werden können (7,9,33). SCFAs ihrerseits können Immunreaktionen generieren, indem sie durch Interaktion mit den Darmepithelien zu einer vermehrten Muzinsekretion und damit zu einer Absenkung des Darm-pH, und zu einer gesteigerten Durchblutung der Schleimhautzellen führen. In der Folge wird die Adhäsion und

damit das Eindringen von Pathogenen in den kindlichen Organismus erschwert (7,9,33). Auch HMOs selbst besitzen die Fähigkeit zur Initiierung epithelialer Abwehrmechanismen und können vermittelt über Genexpression zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine beitragen (31). Über die G-Protein-Rezeptor vermittelte Expression von Tight-junction-Proteinen kann die Permeabilität und somit die Barrierefunktion der intestinalen Epithelien moduliert werden (33). Außerdem können sie als freie, lösliche Köder für Pathogene, Viren, Parasiten und gewisse Bakterien fungieren, die normalerweise über die Oberflächenrezeptoren der intestinalen Epithelien in den Wirtsorganismus eindringen (33).

### **1.3.2. Das Mikrobiom des Neugeborenen**

Neben der Art der Ernährung, beziehungsweise der Zufuhr von Muttermilch, wird die Kolonisation des kindlichen Darmes von einer Fülle weiterer Faktoren, wie der Frühgeburtlichkeit, der Art der Entbindung und der Antibiotikazufuhr bei Mutter und Kind beeinflusst (12,34–37). Zum Zeitpunkt der Geburt spielt für die Kolonisation des relativ sterilen Darmes (33) maßgeblich die Art der Entbindung eine Rolle (7,12). Mit der Frühgeburtlichkeit geht regelmäßig die Entbindung mittels C-Sektion und die Zufuhr von Antibiotika zur Prophylaxe von Komplikationen, maßgeblich einer Early Onset Sepsis (EONS) einher (35). Durch C-Sektion geborene Kinder sind hauptsächlich mit fakultativen Anaerobiern wie Streptokokken, Staphylokokken und Propionibakterien besiedelt, wohingegen vaginal geborene Kinder eine der Vaginalflora der Mutter entsprechend große Fülle an *Lactobacillus* spp. aufweisen (7,34). Es gibt die Annahme, dass das Mikrobiom frühgeborene Kinder sich initial wenig von dem Reifgeborener (RG) unterscheidet und die Art der Entbindung eine untergeordnete Rolle spielt. Demnach bewirken die mehrheitlich mit der Frühgeburtlichkeit assoziierten intensivmedizinischen Behandlungsmaßnahmen im Vergleich eine deutlich größerer Beeinflussung des frühkindlichen Mikrobioms, die sich mitunter in einer Besiedlung des GI-Traktes mit klassischen Oberflächenmikroben des Krankenhauses widerspiegelt (34). Als gesichert gilt, dass FG in den ersten Lebensmonaten eine verstärkte Besiedlung mit Proteobakterien aufweisen, wohingegen bei RG innerhalb der ersten sechs Lebensmonate ein deutlicher Anstieg der Familien der Bifidobacteriaceae und Bacteroides zu verzeichnen ist (34). Diese Bakterienfamilien besitzen die Fähigkeit im Rahmen der sogenannten „*colonisation resistance*“ eine Kolonisation mit pathogenen Bakterien zu verhindern (38). Die expansive Kolonisation mit Bifidobacteriaceae und Bacteroides, ist bei gestillten Kindern hauptsächlich die auf die Zufuhr von HMOs zurückzuführen und führt zur Ausbildung eines immunregulatorischen, antiinflammatorischen Phänotypen, der sich durch hohe Konzentrationen von regulatorischen T-Zellen und IL-10 und IL-27 auszeichnet (32). Eine geringe Fülle dieser Bakterienstämme führt hingegen zu einer proinflammatorischen Gewichtung, mit erhöhten Konzentrationen von IL-1, IL-13, IL-17A und TNF (Tumornekrosefaktor) (32). In Kombination mit mütterlichen HMOs ergeben sich durch eine Darmbesiedlung mit B.-Stämmen zusätzliche immunmodulatorische, vorteilhafte Eigenschaften (1.3.1). Das kindliche Mikrobiom beginnt sich während des ersten Lebensjahres an das von Adulten anzugleichen und gilt je nach Literatur nach zwei bis drei Jahren (34), oder drei bis vier Jahren als

ausgereift (36). Da Eubiose und die Funktion des Mikrobioms im Hinblick auf Gesundheit und Krankheitsentstehung, sowie das Immunsystem eine maßgebliche Rolle spielen, wird deutlich wie wichtig eine ungestörte Etablierung und Reifung insbesondere im frühen Lebensalter ist (34,37). In Übereinstimmung hiermit belegen Van Rossum et al. im Rahmen der PRIMAL-Studie den förderlichen Effekt von Probiotika (*Bifidobacterium longum subsp infantis*, *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (BB-12), and *Lactobacillus acidophilus* (La-5) *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*) innerhalb der ersten 48 Lebensstunden im Sinne einer Eubiose des frühkindlichen Mikrobioms (39).

#### **1.4. Auswirkungen von Antibiotika auf das frühkindliche Mikrobiom**

Das kindliche Mikrobiom gilt in den ersten drei Lebensjahren als „dynamisch“ (35). Nichtsdestotrotz sind aktuellen Studien zufolge die ersten Wochen im Leben eines Neugeborenen für die Entwicklung und Reifung des frühkindlichen Mikrobioms maßgeblich (37). Störungen innerhalb dieser Periode können zu intestinalen Dysbiosen, die mit einer Dauer von 12 Monaten (37) bis zu zwei Jahren einhergehen, nachgewiesen werden (36) und außerdem zu einem gesteigerten Langzeitrisiko für entzündliche Prozesse führen. Als ursächlich für die Entstehung solcher Dysbiosen wird maßgeblich eine frühzeitige Antibiotikazufuhr betrachtet (35–37). Eine große Herausforderung stellt, insbesondere in der vulnerablen Gruppe der FG, aber auch generell für reifgeborene Kinder, die antibiotische Verhinderung einer *Early Onset Sepsis* dar (EONS). Ungefähr 10 % aller Neugeborenen werden aufgrund einer vermuteten Early Onset Sepsis innerhalb der ersten 48 Lebensstunden antibiotisch abgedeckt (37). In Anbetracht der routinemäßigen Verwendung von Breitbandantibiotikakombinationen wie Amoxicillin und Cefotaxim, oder Ampicillin und Gentamycin wirken die Kombinationen jeweils effektiv gegen das Erregerspektrum der EONS, unterscheiden sich aber in ihrer jeweiligen Auswirkung auf das Mikrobiom. Entscheidend sind hierbei nicht nur die direkten Veränderungen innerhalb der Kolonisation, sondern auch deren potenzielle Folgen. Es gibt Studien, die eine Verbindung zwischen der Aufnahme von Amoxicillin und einer Vermehrung Beta-Laktamase-produzierender Bakterienstämme, wie den Klebsiellen herstellen konnten (37). Verabreichte Antibiotika (AB) könnten demzufolge neue Resistenzverhalten von Bakterienstämmen triggern und in der Konsequenz zu schwerer behandelbaren Erkrankungen im weiteren Verlauf des Lebens führen (36). Andere Studien sehen Hinweise darauf, dass AB in den ersten Lebenstagen mit dem Auftreten einer „Late Onset Sepsis“ (LONS) assoziiert sein können (35). Zudem gibt es Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Antibiose-induzierten Veränderungen innerhalb des Darmmilieus. Die Kombination aus Penicillin und Gentamycin gilt hierbei als diejenige, welche die vergleichsweise moderatsten Veränderungen des Mikrobioms nach sich zieht (34,37). Einer bemerkenswerten These zufolge könnte das frühkindliche Mikrobiom nach frühzeitiger Antibiose derart in seiner Zusammensetzung verändert sein, dass eine „Erholung“ beziehungsweise eine Rückkehr zum Ausgangszustand nicht mehr möglich ist, womit in der besagten Studie begründet wird, dass keine positiven, kompensatorischen Effekte der Muttermilch auf das Darmmilieu der untersuchten Kinder zu beobachten waren (37). Es wird deutlich, dass es

hinsichtlich der genauen Zusammenhänge, sowie den Kurz- und Langzeitnebenwirkungen einer Antibiose in den ersten Lebenstagen noch Forschungsbedarf gibt, wenngleich die Beeinflussung der Kolonisation Mikrobioms durch Antibiotika als unbestritten gilt (34–37).

## 1.5. Die PRIMAL-Studie

Das PRIMAL-Konsortium (PRimal IMMunity At the beginning of Life bzw. Prägung der Immunabwehr am Lebensbeginn) ist ein Zusammenschluss aus 18 Kinder- und Jugendkliniken in Deutschland. Der Verbund verfolgt einen translationalen Forschungsansatz, worunter ein Vorgehen verstanden wurde, welches Ergebnisse aus der Grundlagenforschung mit klinischen Erkenntnissen verknüpft, um perspektivisch im klinischen Setting langfristige und individuelle Strategien zur Vermeidung von Darm-Dysbiosen bei Frühgeborenen etablieren zu können. Die Grundlage hierfür ist die abgeschlossene PRIMAL-Studie als das Kernstück der Forschungsinitiative (39). Hervorzuheben ist an dieser randomisiert und doppelt verblindeten Studie, dass sie multizentrisch, d.h. an verschiedenen Zentren in Deutschland durchgeführt wurde. Die eingeschlossenen Frühgeborenen wurden dahingehend untersucht, ob und wie sich die Verabreichung von Probiotika (*Bifidobacterium longum subsp infantis*, *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (BB-12), and *Lactobacillus acidophilus* (La-5)) oder Placebo innerhalb der ersten 48 Lebensstunden auf die Zusammensetzung des Mikrobioms am Ende des ersten Lebensmonates auswirken (40). Die Analysen der PRIMAL-Studie kommen zu den Ergebnissen, dass die Verabreichung von Probiotika nicht nachweislich zu einer Reduktion der Anzahl von multiresistenten Keimen (MDOR+) in der frühkindlichen Darmflora führt. Es konnte auch keine signifikante Verbesserung des klinischen Outcomes im Hinblick auf Senkung des Risikos für das Auftreten einer Sepsis oder GI-Komplikationen oder ein positiver Einfluss auf die Gewichtszunahme bei den Frühgeborenen der Probiotika-Gruppe festgestellt werden. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die frühzeitige Verabreichung von Probiotika am Ende des ersten Lebensmonates das Mikrobiom eines Frühgeborenen positiv dahingehend beeinflusst, dass es sich in seiner Komposition der Eubiose eines reifgeborenen Kindes angleicht (39). Im Rahmen der Studie werden weitere Fragestellungen untersucht, unter anderem in Freiburg, Heidelberg, Homburg, Mainz, Memmingen und Würzburg. Bei unterschiedlicher Schwerpunktsetzung und entsprechend unterschiedlichen Verfahren (Immunmetabolismus, Mikrobiom, Granulozyten, B-Zellen, MDSC und Chipzytometrie) ist ihnen allen gemein, dass sie darauf abzielen, das Potential von Probiotika hinsichtlich einer gesunden Besiedlung der Darmflora oder der positiven Beeinflussung der Entwicklung des Immunsystems bei Frühgeborenen zu erfassen. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der PRIMAL-Studie durchgeführt.

## 1.6. Impfschema

In Deutschland gilt seit 2020 eine aktualisierte Impfempfehlung der ständigen Impfkommission (STIKO) für die Grundimmunisierung (gegen Tetanus, Poliomyelitis, Diphtherie, Hepatitis B,

Haemophilus influenzae Typ b und Pertussis) von Säuglingen. Diese empfiehlt nach dem reduzierten 2 + 1 Schema zu impfen, welches eine Impfung im 2., 4. und 11. Lebensmonat vorsieht. Für FG hat hingegen weiterhin das 3 + 1 Schema, mit Impfungen im 2., 3., 4. und 11. Lebensmonat Bestand (41).

## **1.7. Impfstoff**

Grundsätzlich können Impfungen einzeln oder kombiniert verabreicht werden. In Deutschland wird für die Grundimmunisierung von Säuglingen die sechsfach-Impfung empfohlen (41), wodurch mit der Verabreichung einer Impfdosis, ein partieller Impfschutz gegen sechs potenzielle Infektionserkrankungen vermittelt werden kann (ein vollständiger Impfschutz wird nach drei, bzw. vier Impfdosen-Gaben entsprechend dem STIKO-Schema angenommen). In Deutschland zugelassen sind laut Paul Ehrlich Institut hierfür die folgenden Impfstoffe: Hexacima (Sanofi Winthrop Industrie), Hexyon (Sanofi Winthrop Industrie), Infanrix Hexa (GlaxoSmithKline Biologicals s.a.), Vaxelis (MCM Vaccine B.V.) (42). In der vorliegenden Studie kamen zwei Impfstoffpräparate der Hersteller GlaxoSmithKline Biologicals s.a. und Sanofi Pasteur Europe zum Tragen. Beides sind Kombinationspräparate und schützen vor einer Erkrankung an Tetanus, Poliomyelitis, Diphtherie, Hepatitis B, Haemophilus influenzae B und Pertussis und unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Zusammensetzung. Hexyon von Sanofi Pasteur Europe enthält azelluläre Komponenten von Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani und Bordetella pertussis, rDNA von Hepatitis B Viren, inaktivierte Poliomyelitis Viren und konjugierten Adsorbatimpfstoff von Haemophilus influenzae. Er ist zugelassen für Säuglinge ab der sechsten Lebenswoche (43). Der Kombinationsimpfstoff Infanrix von GlaxoSmithKline Biologicals s.a. ist zugelassen für Kinder ab der sechsten Lebenswoche und setzt sich zusammen aus: Diphtherie-, Tetanus-, azellulären Pertussis-, rekombinanten Hepatitis B (adsorbiert), inaktivierten Poliomyelitis-, und adsorbierten konjugierten Haemophilus-influenzae-Typ b-Komponenten (44).

## **1.8. Ziele der Arbeit**

Die Ausbildung und Entwicklung des frühkindlichen Immunsystems beginnt bereits im Mutterleib und ist beeinflusst von endogenen und exogenen Einflussfaktoren vor-, während und nach der Geburt. Eine ungestörte immunologische Entwicklung mit Ausbildung eines physiologischen Mikrobioms gilt als Voraussetzung für eine gute immunologische Weiterentwicklung und als präventiver Faktor gegenüber ernsthafter Erkrankung, im Kindes-, Erwachsenen-, vor allem aber im Neugeborenenalter. Frühgeborene haben aufgrund ihrer entwicklungsbedingten „Unreife“ einen besonders vulnerablen Sonderstatus, der frühzeitige Immunisierungen zur Reduktion des Risikos für das Auftreten von Infektionserkrankungen mit potenziell schweren Verläufen begründet. Das Impfschema mit Immunisierungen im 2., 3., 4., und 11. Lebensmonat wird in Deutschland von der STIKO empfohlen

und hat sich bewährt, somit gilt die Annahme, dass regelrecht durchgeführte Immunisierungen zu erwartbaren Antikörperspiegeln führen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist anhand der klinischen Daten, die über den Zeitraum des ersten Lebensjahres gesammelt wurden und der Verläufe der Plasma-IgG-Antikörperkonzentrationen zum Zeitpunkt der Geburt und zu Beginn des zweiten Lebensjahres, folgende Fragestellung zu klären:

1. Lässt sich nach Erhalt von drei Dosen eines Konjugatimpfstoffes im Rahmen der Grundimmunisierung innerhalb des ersten Lebensjahres ein Unterschied in der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres bei Frühgeborenen im Alter von 28 + 0 SSW bis zur 30 + 6 SSW (im Folgenden betitelt als Gestationsklasse 1 (GA1)) und Frühgeborenen im Alter der 31 + 0 SSW bis zur 32 + 6 SSW (im Folgenden betitelt als Gestationsklasse 2 (GA2)) feststellen?
2. Lässt sich nach Erhalt von drei Dosen eines Konjugatimpfstoffes im Rahmen der Grundimmunisierung innerhalb des ersten Lebensjahres ein Unterschied in der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen feststellen?
3. Lässt sich nach Erhalt von drei Dosen eines Konjugatimpfstoffes im Rahmen der Grundimmunisierung innerhalb des ersten Lebensjahres ein Unterschied in der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres zwischen Frühgeborenen feststellen, die über eine Dauer von drei, sechs oder zwölf Monaten innerhalb des ersten Lebensjahres gestillt wurden und ungestillten Kindern?
4. Lässt sich nach Erhalt von drei Dosen eines Konjugatimpfstoffes im Rahmen der Grundimmunisierung innerhalb des ersten Lebensjahres ein Unterschied in der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres zwischen Frühgeborenen, die eine Antibiotika-Kombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam, oder eine abweichende Antibiotikatherapie bzw. keine Antibiotikagabe erhalten haben, feststellen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

In Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und genutzte Software aufgelistet.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und genutzte Software**

<b>Hersteller</b>	<b>Gerät</b>
<b>Brandt GmbH + Co KG, Wertheim</b>	Einkanal-Mikroliterpipette Transferpette® 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL
<b>Eppendorf SE, Hamburg/Hummelsbüttel</b>	Centrifuge 5415R
	Centrifuge 5427R
	Mehrkanalpipette Xplorer 50-120 Mikroliter
	ThermoMixer® C
<b>Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen</b>	Zentrifugenröhrchen 15ml
	Zentrifugenröhrchen 20ml
<b>Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen</b>	96 Well Cell Culture Plate/Zellkulturschalen Cellstar®
<b>IBL Germany GmbH, Hamburg</b>	Selbstklebende Abdeckfolie
<b>SARSTEDT AG &amp; Co, Nürnberg</b>	Pipettenspitzen
	Reaktionsgefäße
<b>Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz</b>	Infinite® 200 Pro Plate Reader
<b>Graphpad Software Inc., Boston</b>	GraphPad Prism 10
<b>Microsoft Corporation Redmond, USA</b>	Microsoft Office 2016 (Excel, Word)
<b>neoLab® Migge GmbH, Heidelberg</b>	Sunlab® Mini Vortex Mixer (SU1900), 3000 UpM

#### 2.1.2. Chemikalien

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und ELISA-Kits aufgelistet.

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und ELISA-Kits**

<b>Hersteller</b>	<b>Artikel</b>
<b>BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching</b>	FicoLite-H
<b>IBL Germany GmbH, Hamburg</b>	Clostridium tetani toxin 5S IgG plus ELISA
<b>IBL Germany GmbH, Hamburg</b>	Haemophilus influenzae B IgG ELISA
<b>IBL Germany GmbH, Hamburg</b>	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA
<b>IBL Germany GmbH, Hamburg</b>	Poliovirus IgG ELISA
<b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</b>	Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Studiendesign des PRIMAL Subprojekts 5 in Homburg

Die multizentrische PRIMAL-Studie hat sich zum Ziel gesetzt, die positiven Langzeiteffekte einer Probiotikatherapie auf die Entwicklung einer gesunden Darmflora und die damit einhergehenden förderlichen Effekte auf die immunologische Entwicklung bei FG darzustellen (Abschnitt 1.5). Die Universität des Saarlandes in Homburg ist Teil des PRIMAL-Konsortiums. Basierend auf Blutproben von Frühgeborenen aus der Probandenkohorte der PRIMAL-Studie am Studienzentrum der Universität in Homburg wurde die frühkindliche Immunantwort im Sinne der B-Zell Reaktion mit Ausbildung spezifischer Antikörper auf einen Immunstimulus (hier sechsfach Konjugatimpfstoff: Infanrix hexa von GlaxoSmithKline und Hexyon von Sanofi Pasteur) charakterisiert. Hierzu wurde die akute, unspezifische Reaktion von Frühgeborenen innerhalb der ersten drei Lebensstage (LT) und die langfristige, adaptive Immunantwort zu Beginn des zweiten Lebensjahres (LT 365) nach Erhalt von drei Impfdosen im Sinne der Grundimmunisierung untersucht und analysiert.

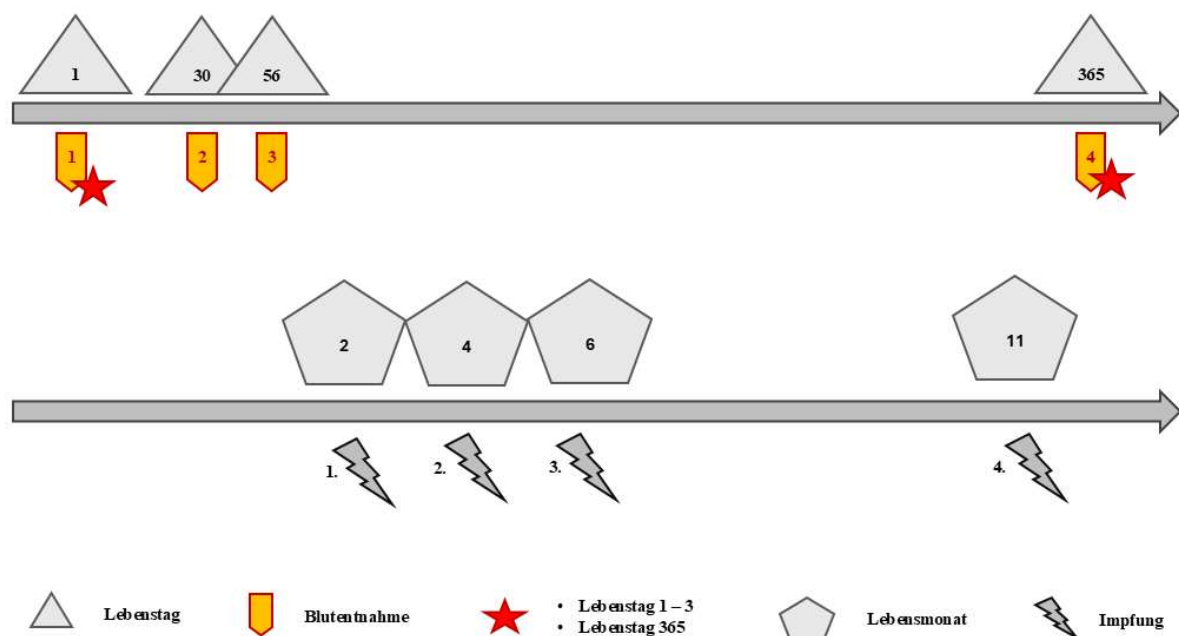
Folgende Einschlusskriterien mussten erfüllt sein:

- Kein kritischer Allgemeinzustand, keine gastrointestinalen Fehlbildungen, Impffähigkeit
- Alter von 28 + 0 Schwangerschaftswoche (SSW) – 32 + 6 Schwangerschaftswoche (SSW)
- Nach Einschluss in die Studie: Orale Verabreichung von Probiotika (Bifidobacterium (B.) animalis subsp. lactis =BB-12, B. longum subsp. infantis, Lactobacillus acidophilus = La-5; 5x10<sup>9</sup> CFUs/strain) oder Placebo innerhalb der ersten 48 Lebensstunden, danach einmal täglich für 28 Tage

- Entnahme der Blutproben am Tag des Einschlusses, am 30. Lebenstag (LT 30) und im korrigierten Alter von einem Jahr (LT 365)

Das Screening erfolgte innerhalb der ersten 48 Lebensstunden. Die Probanden wurden in die folgenden zwei Gruppen unterteilt: "Frühe" FG (Gestationsklasse GA1), d.h. im Alter zwischen der 28 + 0 SSW bis zur 30 + 6 SSW und "späte" FG (Gestationsklasse GA2) im Alter zwischen der 31 + 0 SSW bis zur 32 + 6 SSW.

Im Rahmen der PRIMAL-Studie wurden außerdem Blutproben von Kindern aus dem Studienzentrum Homburg zu den Zeitpunkten LT 1 und LT 365 genommen und ein möglicher Einfluss von Gestationsalter, Geschlecht, die Ernährung mit Muttermilch und die Verabreichung von Antibiotika auf die adaptive Immunität von Frühgeborenen untersucht.



#### Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Blutentnahmen und Impfungen Frühgeborener im ersten Lebensjahr

Die Blutentnahmen 1-4 (gelbe Wimpel) zur Bestimmung der Plasma-Antikörperspiegel mittels ELISA innerhalb des ersten Lebensjahres (oberer Pfeil) erfolgten zu folgenden Zeitpunkten: Lebenstag (LT) 1, 30, 56 und 365 (graue Dreiecke).

LT 1 entspricht hierbei dem Zeitraum der ersten Lebenstage nach Einschluss in die Studie, LT 365 entspricht dem korrigierten Alter von 12 Lebensmonaten +/- 2 Lebensmonate. Der untere Pfeil stellt die vier sechsmonatigen Impfungen (graue Blitze) innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate nach dem, von der STIKO für Frühgeborene empfohlenen Impfschema, im 2., 4., 6. Und 11. Lebensmonat (graue Fünfecke) dar.

Das der Studie zugrundeliegende Untersuchungsprotokoll, einschließlich der Nachuntersuchung im Alter von 12 Monaten, der Methoden zur Probenentnahme und der Datenanalyse, sowie die Begleitstudien wurden von der zuständigen Ethikkommission der teilnehmenden Partnerinstitutionen des PRIMAL-Konsortiums (Universitätskliniken Freiburg, Heidelberg, Homburg, Lübeck, Mainz und Tübingen), und den weiteren an der multizentrischen Studie teilnehmenden Kliniken und Laboren

geprüft und zustimmend bewertet. Die Sorgeberechtigten der Probanden gaben zum Zeitpunkt des Einschlusses ihr schriftliches Einverständnis für folgende Prozeduren:

- Körperliche Nachuntersuchung im Alter von 12 Monaten (zur Evaluation langfristiger Effekte im Rahmen der Studie voraussichtlich zusätzlich im Alter von 5 und 10 Jahren).
- Drei Blutentnahmen zu definierten Zeitpunkten, Kryokonservierung der Blutproben zur späteren Verwendung.
- Ausfüllen von CRF-Bögen zu drei definierten Zeitpunkten innerhalb des ersten Lebensjahres.
- Erfassung des Impfstatus und Führen eines Elterntagebuches.
- Zeitlich unbegrenzte Verwendung von Blutprobenresten (ausschließlich im Rahmen der Studie).

### **2.2.2. Ethikantrag**

Die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 17\_130) hat am 07.07.2017, die Ethikkommission bei der Ärztekammer des Saarlandes (Aktenzeichen 275\_17) hat am 22.12.2017 der Studie mit Votum zugestimmt.

### **2.2.3. Blutentnahmen und Separation von Plasma**

Die Blutplasmaproben, die für diese Arbeit analysiert wurden, wurden den Probanden der fortlaufenden PRIMAL-Studie entnommen, an welcher die Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie der Universität des Saarlandes seit April 2018 partizipiert. Durch geschultes Personal wurden die Blutplasmaproben im Rahmen medizinisch notwendiger Entnahmen / stationären Routinelabors mittels standardisierten Verfahrens zur venösen Blutentnahme gewonnenen.

Die Plasmaproben von maximal 1,5ml wurden in EDTA-Röhrchen entnommen und anschließend im Verhältnis 1:1 mit einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung verdünnt und auf ein Medium zur Isolierung von Lymphozyten aufgetragen (FicoLite-H, Linaris biological products, Dossenheim, Germany). Dieses Medium wurde bei 300 x g für 15 Minuten zentrifugiert, um die festen-, von den flüssigen Blutbestandteilen zu trennen und als Resultat das flüssige Plasma unmittelbar bei -80°C bis zur weiteren Verwendung einzufrieren.

### **2.2.4. ELISA**

Die Blutplasmaproben wurden zu den Zeitpunkten LT 1 und LT 365 entnommen. Hierdurch sollen die Plasma-Antikörperkonzentrationen zum Zeitpunkt der Geburt und nach dem ersten Lebensjahr, d.h. nach der Verabreichung mehrfacher Impfdosen abgebildet werden. Die über die Dauer des Rekrutierungszeitraumes entnommenen Proben konnten durch das Verfahren der Kryokonservierung erhalten werden und waren somit für Messungen im Kontext dieser Arbeit auch zu einem späteren Zeitpunkt noch repräsentativ.

Das gängige Verfahren des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) basiert auf dem Prinzip der Komplexbildung zwischen in Proben enthaltenen Antikörpern und zuvor auf einer Mikrotiterplatte aufgebrachtten Antigenen. Es gibt verschiedene ELISA-Verfahren, im vorliegenden Fall wurden indirekte ELISAs verwendet. Bei diesem Verfahren wird zunächst- wie bei einer direkten ELISA- ein primärer Antikörper einer Antigen-enthaltenden Probe, die auf eine Microwellplatte immobilisiert wurde, zugegeben. Die Antikörper binden an die Antigene und es kommt zu einer Komplexbildung. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper bzw. ein Konjugatstoff hinzugegeben, der ebenfalls an den Komplex aus Antigen und Primär-AK bindet und ihn hierdurch markiert. Die Konzentration der AK wird dann mittels Extinktionsmessung und Standardkurve quantifiziert. Bei der Testdurchführung wurden die Arbeitsschritte gemäß der Arbeitsanleitung des Herstellers IBL International GmbH, Hamburg, Germany durchgeführt und werden folgend zusammengefasst beschrieben:

Die kryokonservierten Proben werden auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1: 100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Anschließend werden je 100 µL des Standards in die Wells der antigenbeschichtete MTB (Mikrotiterplatte) gemäß Plattenbelegungsplan pipettiert, wobei Substratleerwert, Standard und Kontrollen parallel erfasst werden. Die Proben werden abgedeckt bei 37 +/- 1°C für 60 min inkubiert und dann dreimal mit 300 µL Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss werden 100 µL Konjugat in jedes Wells, außer dem zur Leerwertbestimmung, gegeben und es erfolgen weitere drei Waschschrte. Hiernach werden 100 µL TMB-Substratlösung in alle Wells pipettiert und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubiert. Hierbei findet unter enzymatischer Reaktion eine Blaufärbung statt. Nach Ablauf der 15 Minuten werden 100 µL Stopplösung, in der gleichen Pipettierreihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe der TMB-Substratlösung, in die Wells gegeben, wodurch ein Farbwechsel von blau nach gelb stattfindet. Die Extinktion der Lösung eines jedem Wells wird bei 450/620 nm mittels Tecan 200 Pro M Plex Multimode-Platten-Reader / Infinite M Plex® (Tecan Austria GmbH; Grödig, Austria) gemessen. Hierfür wird mithilfe des Substratleerwertes der Nullabgleich vorgenommen. Nach der Kalibrierung wird die Extinktion aller Kavitäten bei 420 nm gemessen. Aus den drei technischen Replikaten wird der Mittelwert der Extinktionswerte berechnet. Zur Quantifizierung der Messergebnisse wird eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Extinktionswerte der Standards gegen ihre entsprechende Konzentration aufgetragen werden. Die hierdurch ermittelten Antikörperkonzentrationen wurden mit den vom Testhersteller angegebenen, protektiven Schwellenwerten im Sinne einer verlässlichen Immunität verglichen. Messfehler durch einen Verdünnungseffekt der Blutproben im Rahmen des Plasmafällverfahrens konnten durch Gegenproben mit adäquaten Vergleichswerten und Messergebnissen nach ausgeschlossen werden.

## 2.2.5. Interpretation der Ergebnisse und Empfehlungen [IU/mL] des Herstellers Tecan IBL Germany

### Grenzwerte Tetanus Toxin

**Tabelle 3: Tetanus toxin 5S IgG plus ELISA**

Tecan Arbeitsanleitung Tetanus toxin 5S IgG plus ELISA (45)

< 0,01 IU/mL	kein Schutz, keine Immunität
0,01- 0,1 IU/mL	Kein Antikörperspiegel oder kein verlässlicher Schutz vor Infektion! Grundimmunisierung oder Auffrischimpfung und Kontrolle des Antikörperspiegels nach 4 - 6 Wochen empfohlen.
0,11 – 0,5 IU/mL	Verlässlicher Schutz vor Infektion! Auffrischimpfung und Kontrolle der Antikörperspiegel nach 4 – 6 Wochen empfohlen.
0,51 – 1,0 IU/mL	Verlässlicher Schutz vor Infektion! Antikörperspiegel nach 2 Jahren erneut kontrollieren, Auffrischimpfung nicht erforderlich. Hinweis: Auffrischimpfungen bei einer Antikörperkonzentration > 0,5 IU/mL können zu Nebenwirkungen führen.
1,1 – 5,0 IU/mL	Bereich des Langzeitschutzes! Kontrolle nach 5 – 10 Jahren.
> 5,0 IU/mL	Bereich des Langzeitschutzes! Kontrolle nach 10 Jahren empfohlen.

### Grenzwerte Diphtherie Toxin

**Tabelle 4: Diphtheria toxin 5S IgG plus ELISA**

Tecan Arbeitsanleitung Diphtheria toxin 5S IgG plus ELISA (46)

< 0,01 IU/mL	Kein protektiver Antikörperspiegel! Grundimmunisierung empfohlen!
0,01 – 0,09 IU/mL	Kein verlässlicher Schutz vor Infektion! Auffrischimpfung empfohlen!
0,1 – 1,0 IU/mL	Verlässlicher Schutz vor Infektion!

> 1,0 IU/mL	<p>Verlässlicher Langzeitschutz!</p> <p>10 Jahren nach der letzten Impfung wird eine Kontrolle und Auffrischungsimpfung empfohlen.</p> <p>Es wird empfohlen sowohl die Basis- als auch die Auffrischimpfung 4 bis 6 Wochen nach der Impfung zu kontrollieren und die Ergebnisse im Impfpass zu vermerken.</p>
-------------	---

### **Grenzwerte Haemophilus influenzae**

**Tabelle 5: Haemophilus influenzae B IgG ELISA**

Tecan Arbeitsanleitung Haemophilus influenzae B IgG ELISA (47)

> 1.0 µg/mL	Ausreichend natürlicher oder nach der 3. Impfung erworbene Immunität
0.15 und 1.0 µg/mL	Nachgewiesener Kontakt mit dem Keim
< 0.15 µg/mL	Kein ausreichender Schutz gegen Haemophilus influenzae Typ B

### **Quantitative Auswertung Poliomyelitis Virus IgG**

Tecan Arbeitsanleitung Poliovirus IgG ELISA (48):

In der Gebrauchsanleitung des Herstellers IBL finden sich für das Poliomyelitis Virus IgG ELISA Kit keine vergleichbaren Angaben. Der Hersteller benennt einen Wert von 10 IU/ml als sog. „Cut-Off“. Bereiche von +/- 20 % um diesen Wert stellen laut Hersteller einen Graubereich dar, das heißt Werte zwischen 8-12 IU/ml werden als grenzwertig hinsichtlich eines bestehenden Impfschutzes definiert.

#### **2.2.6. Case Report Files**

Zur Einordnung und Auswertung der experimentellen Daten wurden zusätzlich klinische Daten erhoben und analysiert. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der PRIMAL Studie standardisierte Case Report Files (CRF- Bögen) konzipiert. Diese ermöglichen den zuständigen Studienärzten zu den Zeitpunkten: LT 1, LT 30 und zum Zeitpunkt der Entlassung, die, innerhalb des entsprechenden Zeitraumes für die Studie bedeutsamen Daten zu erfassen. Die Daten des CRF für LT 365 sind in eine körperliche Untersuchung und ein elterliches Interview gegliedert. Für das Interview war ein telefonisches Gespräch mit einem der Studienärzte oder das eigenständige Ausfüllen durch einen Elternteil und die postalische Zusendung an das Zentrum für Pädiatrie und Neonatologie des Universitätsklinikums vorgesehen. Der Kopf der CRF-Bögen ist den Kontaktdaten von Kind und Sorgeberechtigten vorenthalten und weist den Zeitpunkt der Erfassung, das Geburtsdatum, die ID des Zentrums innerhalb dessen das Kind eingeschlossen wurde und die anonymisierte Probanden-ID aus. Die siebenstelligen IDs setzen sich aus einer zufälligen Durchnummerierung der Probanden zusammen und kodieren mitunter für das Geschlecht (zweite Ziffer: 1 für männliches FG, 2 für weibliches FG) und die Gestationsklasse (dritte

Ziffer: 7 „frühes“ FG, 8 „spätes“ FG). Der „Baseline-CRF“ um LT 1 und der CRF-Bogen zum primären Endpunkt bestätigen, dass die Einschlusskriterien erfüllt sind, die Biosamplings der Studienproben erfolgt sind und die Studienpräparate verabreicht wurden. Allen Bögen ist die Erfassung von Größe und Gewicht der Probanden gemein, wohingegen sich die sonstigen klinischen Fragestellungen am zeitlichen Verlauf und entsprechend der Entwicklung des Kindes orientieren. Demnach konzentriert sich der erste CRF-Bogen auf Angaben zu Mutter und Geburt, beispielsweise, ob eine Mehrlingsgeburt vorlag, die Art der Entbindung und ob prä- oder peripartal Komplikationen vorlagen, während mithilfe des zweiten CRF- Bogens, zum primären Endpunkt der Studie, hauptsächlich Angaben zur (intensiv-) medizinischen Versorgung während des stationären Klinikaufenthaltes erfasst wurden. Zu nennen wäre hier exemplarisch: Das zum Tragen kommen invasiver Verfahren und/oder antibiotischer Therapien, sowie nutritiver Aspekte, im Hinblick darauf, ob die Probanden Muttermilch oder Formula Nahrung erhielten. Aspekte der parenteralen Ernährung oder des Sondierens wurden nicht erfasst. Für den Zeitpunkt LT 365 war ein elterliches Interview vorgesehen, welches mithilfe des vorbereiteten Fragebogens eigenständig ausgefüllt oder in einem Interview mit einem Studienarzt beantwortet werden konnte. Zusätzlich fand eine körperliche Untersuchung durch den Studienarzt statt. Insbesondere in der Auseinandersetzung mit den Fragestellungen dieser Arbeit, ist die Einordnung der experimentellen Daten in den, durch die klinischen Daten des Interviews zum Zeitpunkt LT 365 konzipierten Gesamtkontext, von großer Bedeutung. Neben der Erfragung, ob für den Zeitpunkt des sekundären Endpunktes der Studie eine Blutprobe vorlag, wurde der allgemeine klinische Verlauf des Kindes in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres, mitunter Infekthäufigkeit, Medikamenteneinnahme, Krankenhausaufenthalte, Allergien und allgemein gesundheitsassoziierte Lebensumstände dokumentiert. Weiterhin wurde erfasst welche Impfungen zwischen dem sechsten und zwölften Lebensmonat verabreicht wurden. Hierbei ist zu betonen, dass sich in dem Interview im Abschnitt der Impfdatenerfassung die Formulierung „gemäß STIKO“ findet. Im Laufe der Datenauswertung stellte sich diesbezüglich heraus, dass eine gesonderte Überprüfung der angegebenen Impfdaten nötig war, um diese folgerichtig einordnen zu können (Abschnitt 2.2.7). Im Rahmen der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war die Analyse und Interpretation der experimentellen Daten im Verlauf des ersten Lebensjahres in der Zusammenschau mit den klinischen Daten zu: Impfangaben, Erhalt einer antibiotischer Therapie(n), verwendete Antibiose(n), Art der Nutrition und deren Dauer von Interesse, um Aussagen zu bestehenden Wechselwirkungen zwischen den genannten Faktoren und der immunologischen Ausreifung- im Sinne der Immunantwort -zum Ende des ersten Lebensjahres- treffen zu können.

### **2.2.7. Telefoninterviews, Vervollständigung und Re-evaluation klinischer Angaben zum Impfstatus**

Während des Auswahlprozesses der, in dieser Arbeit zu analysierenden klinischen Daten, aus der Gesamtheit der Datensätze der PRIMAL-Studie, wurde ersichtlich, dass der Beantwortung der

Fragestellungen dieser Arbeit, eine Vervollständigung der bereits vorliegenden Impfdaten durch die Erhebung zusätzlicher Angaben zuträglich wäre. Dazu wurden die bereits erhobenen Daten mithilfe von Detailangaben zu: Anzahl der Impfungen im ersten Lebensjahr, exakte Zeitpunkte der Immunisierungen und verwendete Impfstoffe vervollständigt. Zu diesem Zweck erfolgte meinerseits eine telefonische Abfrage der Eltern hinsichtlich ihrer Bereitschaft und dem Einverständnis der Zusendung einer Fotokopie des Impfpasses ihres/r Kinder an das Zentrum in Homburg. Die Fotokopien der Impfässe wurden anonymisiert und die neuen Daten dokumentiert, eingeordnet und in die laufende Analyse eingebunden.

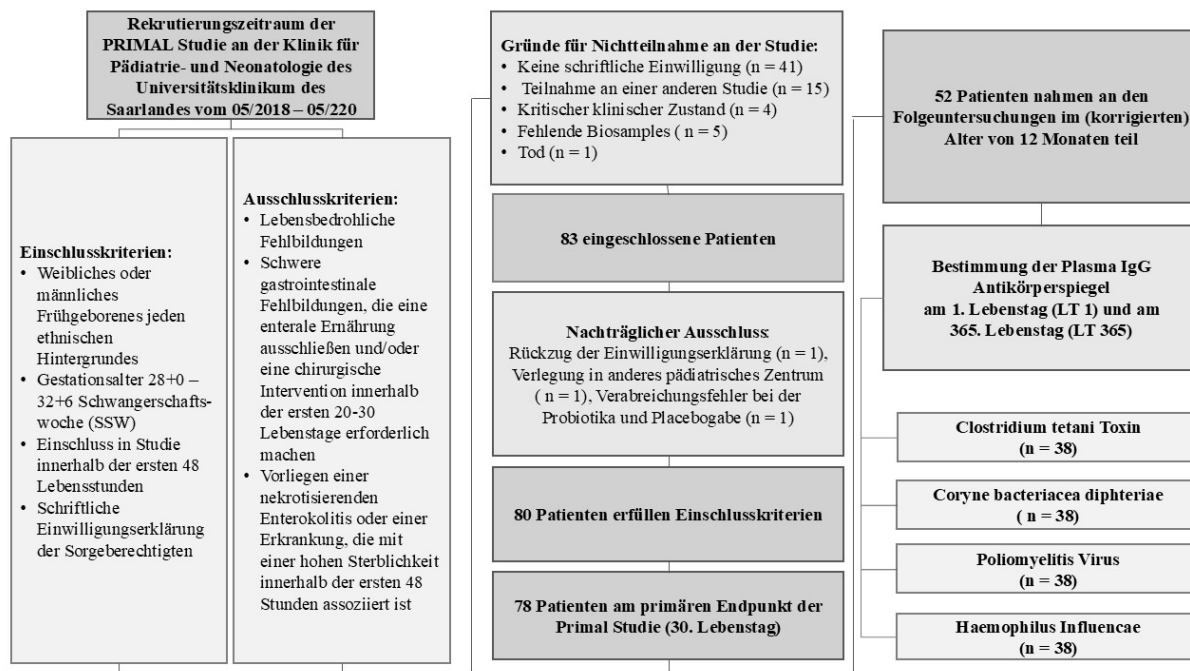
### **2.2.8. Statistik**

Unverbundene Daten wurden mittels Mann-Whitney-U Test verglichen, verbundene Daten mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  lag bei 5%. Asteriske in den Abbildungen indizieren Signifikanzen wie folgt: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,01$ . Bei Stichprobengrößen  $n \leq 9$  wurde auf eine schließende Statistikverfahren verzichtet. Zentralmaße zeigen den Median, welcher sofern nicht explizit erwähnt, zur Datenbeschreibung herangezogen wird.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Probanden-Demographie

Die PRIMAL-Studie wurde vorangehend bereits hinsichtlich ihrer Zielsetzung und des Studiendesigns beschrieben (1.5). Der Rekrutierung der Probanden lag ein Auswahlverfahren zugrunde, welches die Erfüllung spezifischer Einschlusskriterien erforderte. Maßgeblich war ein Gestationsalter zwischen der 28 + 0 – 32 + 6 Schwangerschaftswochen (SSW), ein Einschluss innerhalb der ersten 48 Lebensstunden und die Einwilligung der Sorgeberechtigten. Ausgeschlossen wurden schwerstkranke Frühgeborene (FG) mit, oder ohne gastrointestinale Fehlbildungen, der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention und/oder Vorliegen einer Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC). Hieraus resultierte ein Pool an 622 Probanden deutschlandweit. 83 der 622 Probanden wurden im Studienzentrum der Klinik für Pädiatrie und Neonatologie der Universität des Saarlandes eingeschlossen (Abbildung 2). Es kam aus unterschiedlichen Gründen (Verlegung in ein anderes pädiatisches Zentrum, Verabreichungsfehler der Probiotika/Placebos und Rückzug der Einwilligung) zum nachträglichen Ausschluss drei weiterer FG. Zum primären Endpunkt an Lebenstag 30 (LT) reduziert sich die Probandenanzahl um zwei weitere FG, zum Zeitpunkt des sekundären Endpunktes an LT 365 nehmen 52 FG an den vorgegebenen Folgeuntersuchungen teil. Die Forschung in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie der Universität des Saarlandes am Standort Homburg ist Teil der multizentrischen PRIMAL-Studie und untersucht schwerpunktmäßig die B-Zellreaktion Frühgeborener auf die Grundimmunisierung (Konjugatimpfstoffe gegen Tetanus, Polio, Diphtherie, HiB und Pertussis und Hepatitis B) vor dem Hintergrund einer Probiotika- oder Placebo Behandlung. Hierfür wurden die akute, unspezifische Immunantwort an LT 1 und die längerfristige adaptive Immunantwort an LT 365 charakterisiert. Die vorliegende Arbeit analysiert die mittels ELISA gemessenen IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen vor dem Hintergrund des Einflusses des Gestationsalters, des Geschlechts und des Stillens. Durch nachträglich nicht mehr verwertbare Blutproben, sowie nicht mehr feststellbarer klinische Daten und ungeimpfte Probanden reduziert sich die finale Anzahl an Probanden für die Analysen dieser Arbeit auf 39 Frühgeborene (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Flußdiagramm zum Ablauf der Rekrutierung der Probanden für die vorliegende Arbeit**

Dargestellt ist das Auswahlverfahren, die die Einschlusskriterien, sowie Angaben zum nachträglichen Ausschluss für die Frühgeborenen in der Probandenkohorte. Aus dem ursprünglich übergeordneten Probandenpool nach den Kriterien der PRIMAL-Studie wurde unter Berücksichtigung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit eine Untergruppe aussortiert. Die Probandenanzahl dieser Untergruppe wurde reduziert um die Anzahl derjenigen Probanden, für welche bei Erfüllung der Einschlusskriterien, entweder nicht drei Immunisierungen bis zum LT 365 erfolgt waren und/oder keine verwertbaren Blutproben und deren Plasma-Antikörperbestimmung zu den definierten Zeitpunkten Lebenstag 1 und Lebenstag 365 vorlagen.

Das Probandenscreening erfolgte innerhalb der ersten 48 Lebensstunden. Die Geschlechterverteilung war nahezu ausgewogen mit 19 männlichen und 20 weiblichen FG (Tabelle 6). Es erfolgte eine Unterteilung der Probanden in “frühe” FG der Gestationsklasse 1 (GA1), d.h. im Alter zwischen der 28 + 0 SSW bis zur 30 + 6 SSW und “späten” FG der Gestationsklasse 2 (GA2) im Alter zwischen der 31 + 0 SSW bis zur 32 + 6 SSW. Hierbei lag das Verhältnis von FG der GA1 zu FG der GA2 bei 24:15 (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Innerhalb der Gestationsklassen lag das Verhältnis von männlichen zu weiblichen FG in der GA1 bei 1:1 in der GA2 bei 3:5. Weiterhin wurde zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern unterschieden, hierbei lag das Verhältnis bei zwölf gestillten zu neun nicht gestillten Kindern. Bei sieben Kindern waren keine ausreichenden Angaben zum Stillverhalten der Mutter zu eruieren. In der Gruppe der gestillten Kinder lag das Geschlechterverhältnis zwischen männlichen und weibliche FG bei 6:5. Innerhalb dieser Gruppe wurde eine weitere Differenzierung anhand der Stilldauer vorgenommen: Zwölf der 22 FG wurden ab dem ersten Lebenstag gestillt, zehn Kinder wurden bis zum dritten, bzw. sechsten Lebensmonat gestillt, bis zum zwölften Lebensmonat wurden zwei Kinder gestillt.

**Tabelle 6: Demographie der Frühgeborenen**

Dargestellt ist die Zusammensetzung der Probanden, aufgeschlüsselt nach Geschlecht, Gestationsalter zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen an Lebenstag 1 und Lebenstag 365, der zugeordneten Gestationsklasse, der Stilldauer innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate, sowie die zeitlichen Abstände zwischen den ersten drei Grundimmunisierungen und Aspekte der postpartalen Antibiose-Therapie.

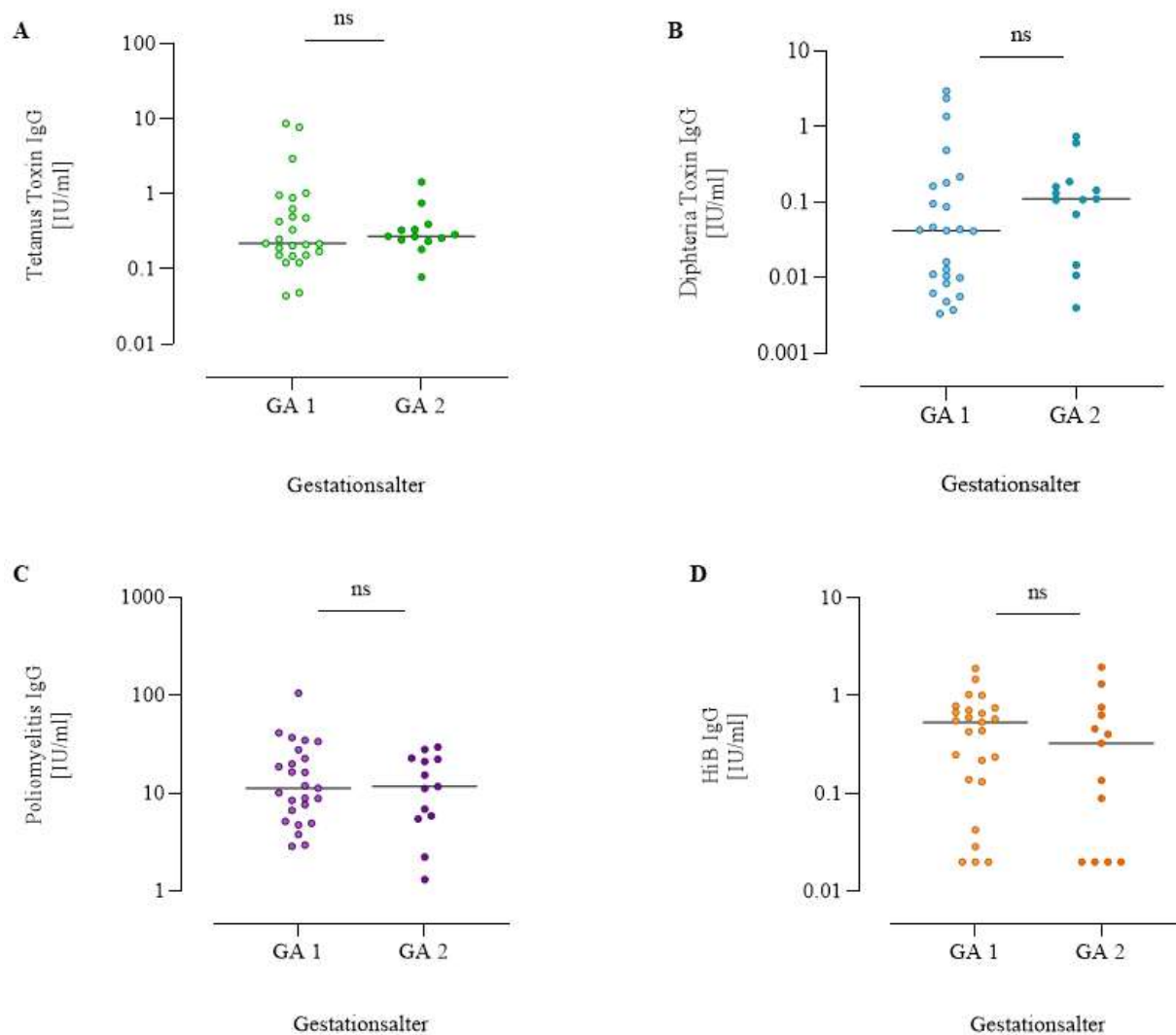
Demographie		Total	Männlich	Weiblich
[absolute Anzahl]		38	18	20
Gestationsalter am 1. Lebenstag [Tage]	Minimum	197	204	197
	Maximum	230	230	228
	Median	213.5	217	212.5
Gestationsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme (BE) am 365. Lebenstag [Tage]	Minimum	410	410	417
	Maximum	505	472	505
	Median	457	441	461
Gestationsklasse [SSW, Schwangerschaftswoche]	GA 1 [28+0 - 30+6 SSW]	24	12	12
	GA 2 [31+0 - 32+6 SSW]	15	6	10
Gestillte Frühgeborene [absolute Anzahl]		22	12	10
Stilldauer [absolute Anzahl]	Muttermilch ab dem 1. Lebenstag	12	5	7
	Muttermilch bis zum 3. Lebensmonat	10	7	3
	Muttermilch bis zum 6. Lebensmonat	10	3	7
	Muttermilch bis zum 12. Lebensmonat	2	2	0
	Ungestillte Frühgeborene	9	4	5
	Keine Angaben zum Stillverhalten	7	2	5

Zeitliche Abstände zwischen 1., 2. und 3. Grundimmunisierung [absolute Anzahl]		38	18	20
	1 Monat, 1 Monat	10	6	4
	1 Monat, 2 Monate	4	1	3
	2 Monate, 1 Monat	11	5	6
	2 Monate, 2 Monate	3	2	1
	Andere	9	4	5
	Keine Angaben	1	0	1
Postpartale Antibiotikatherapie [absolute Anzahl]		38	18	20
	Antibiosekombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam	26	13	13
	Antibiosekombination aus Gentamycin, Ampicillin/Sulbactam und zusätzlicher Antibiose	7	2	5
	Antibiosekombination Gentamycin und Alternativantibiose	5	3	2

## 3.2. Analyse der Plasma-IgG-Antikörperkonzentrationen

### 3.2.1. Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener in den ersten Lebenstagen

Es wurden die Plasma-Antikörperspiegel der Kinder in Gestationsklassen GA1 (GA1: 28 + 0 – 30 + 6 SSW) mit denen der Kinder in GA2 (GA2: 31 + 0 – 32 + 6 SSW) an LT 1 verglichen, um Abweichungen festzustellen, welche auf die mit der Dauer der Schwangerschaft ansteigende Höhe mütterlicher IgG-Plasma-Antikörper (AK) zurückgeführt werden können (Abbildung 3). Die Plasma-Antikörperspiegel gegen das Tetanus Toxin (Abbildung 3A) unterschieden sich in den beiden Gestationsgruppen nicht signifikant voneinander. Für die jüngere Altersgruppe (GA1) lag der Median bei 0,218 IU/ml und für die ältere Altersgruppe (GA2) bei 0,273 IU/ml. Kinder der GA1 lagen im Bereich der Minimal- und Maximalwerte jeweils unter, bzw. über den Plasma-Antikörperspiegeln in der GA2. Für die Antikörperkonzentrationen gegen das *Corynebacterium diphteriae* (Diphtherie) Toxin zeigten Frühgeborene (FG) der GA1 sowohl niedrigere Minimal-, als auch höhere Maximalwerte (Abbildung 3B). Die Mediane der Werte wichen deutlicher auseinander und lagen in der GA 1 bei 0,042 IU/ml und in der GA2 bei 0,111 IU/ml Auch die Plasma-Antikörperspiegel gegen Poliomyelitis Antigene wurden für beide Gestationsklassen/Altersgruppen fast auf demselben Niveau gemessen (Median GA1: 11,25 IU/ml; Median GA2: 11,68 IU/ml) (Abbildung 3C). Die Werte verteilten sich ähnlichen über die 25. bis 75. Perzentile. Deutlichere Abweichungen fanden sich im Bereich der Minimal- und vor allem der Maximalwerte, für die in der GA1 jeweils höhere Werte gemessen wurden als in der GA2. Die Plasma-Antikörperspiegel gegen *Haemophilus influenzae* B (HiB) Antigene unterschieden sich im Median in der GA1 mit einem Wert von 0,536 IU/ml um 0,2092 von dem Medianwert in der GA2 0,326 IU/ml (Abbildung 3D).



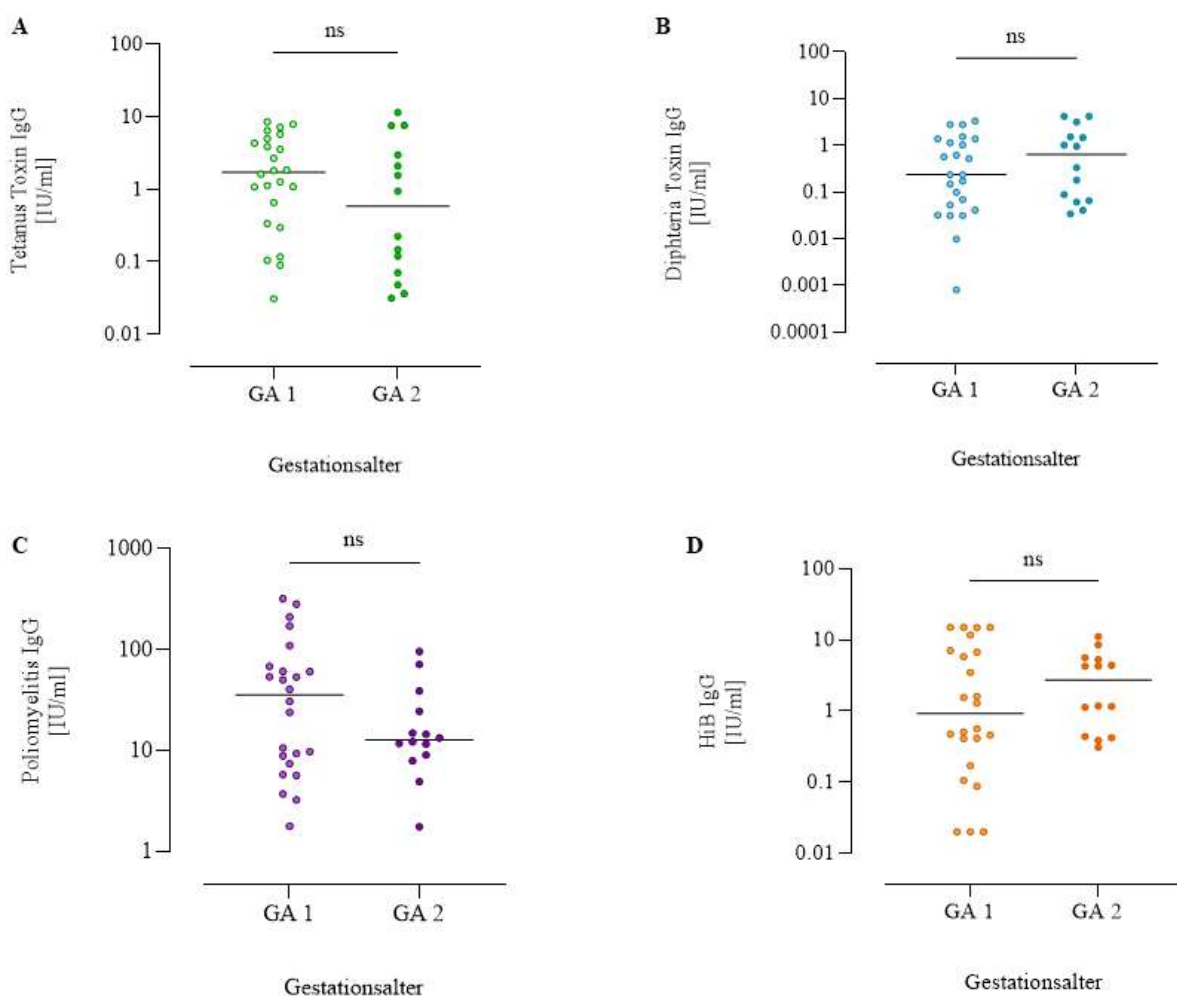
**Abbildung 3: Plasma-IgG-Antikörperspiegel in den ersten Lebensstagen Frühgeborener mit unterschiedlichem Gestationsalter.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diphtheriae* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend bei Frühgeborenen mit Gestationsalter 28 + 0 – 30 + 6 SSW (GA1, n = 25) und Gestationsalter 31 + 0 – 32 + 6 SSW (GA2, n = 13) im Plasma bestimmt. Gestationsaltersklassen (GA1; GA2) geben die Dauer der Schwangerschaft in Schwangerschaftswochen (SSW) an. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.

### 3.2.2. Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener nach Vollendung des ersten Lebensjahres (LT 365)

Es wurden die Plasma-Antikörperspiegel der Kinder in Gestationsklassen GA1 (GA1: 28 + 0 – 30 + 6 SSW) mit denen der Kinder in GA2 (GA2: 31 + 0 – 32 + 6 SSW) an LT 365 verglichen, um zu untersuchen, ob sich etwaige Unterschiede in der Ausbildung der Immunantwort beispielsweise aufgrund unterschiedlich hoher Ausgangskonzentrationen maternaler Antikörper (AK) oder mit dem Geschlecht assoziierten, verlangsamter Reifungsprozesse einzelner Immunzellen abbilden ließen

(Abbildung 4). Frühgeborene (FG) der GA1 erreichten gegen Tetanus höhere Plasma-Antikörperspiegel als in der Vergleichsgruppe GA2 (Abbildung 4A). Die gemessenen Plasma-IgG-Antikörperkonzentrationen (AK) waren in beiden Gruppen ähnlich verteilt. Gegen Diphtherie wurden in der GA2 höhere Werte erreicht als in der GA1 (Abbildung 4B). Auch hier lag in beiden Altersgruppen eine ähnliche Streuung der Antikörper vor, mit einem deutlich niedrigeren Minimalwert in der GA1 als in der GA2. Die IgG-Antikörperkonzentrationen gegen Polio zeigten in beiden Altersgruppen ähnlich niedrige Minimalwerte (Abbildung 4C). Insgesamt erreichten FG der GA1 zum Teil um ein Vielfaches höhere AK-Konzentrationen, als FG der GA 2. Kinder der GA2 erreichten höhere Plasma-AK gegen HiB als FG der GA1 (Abbildung 4D), wobei die niedrigsten Minimal- und höchsten Maximalwerte in der GA1 gemessen wurden.

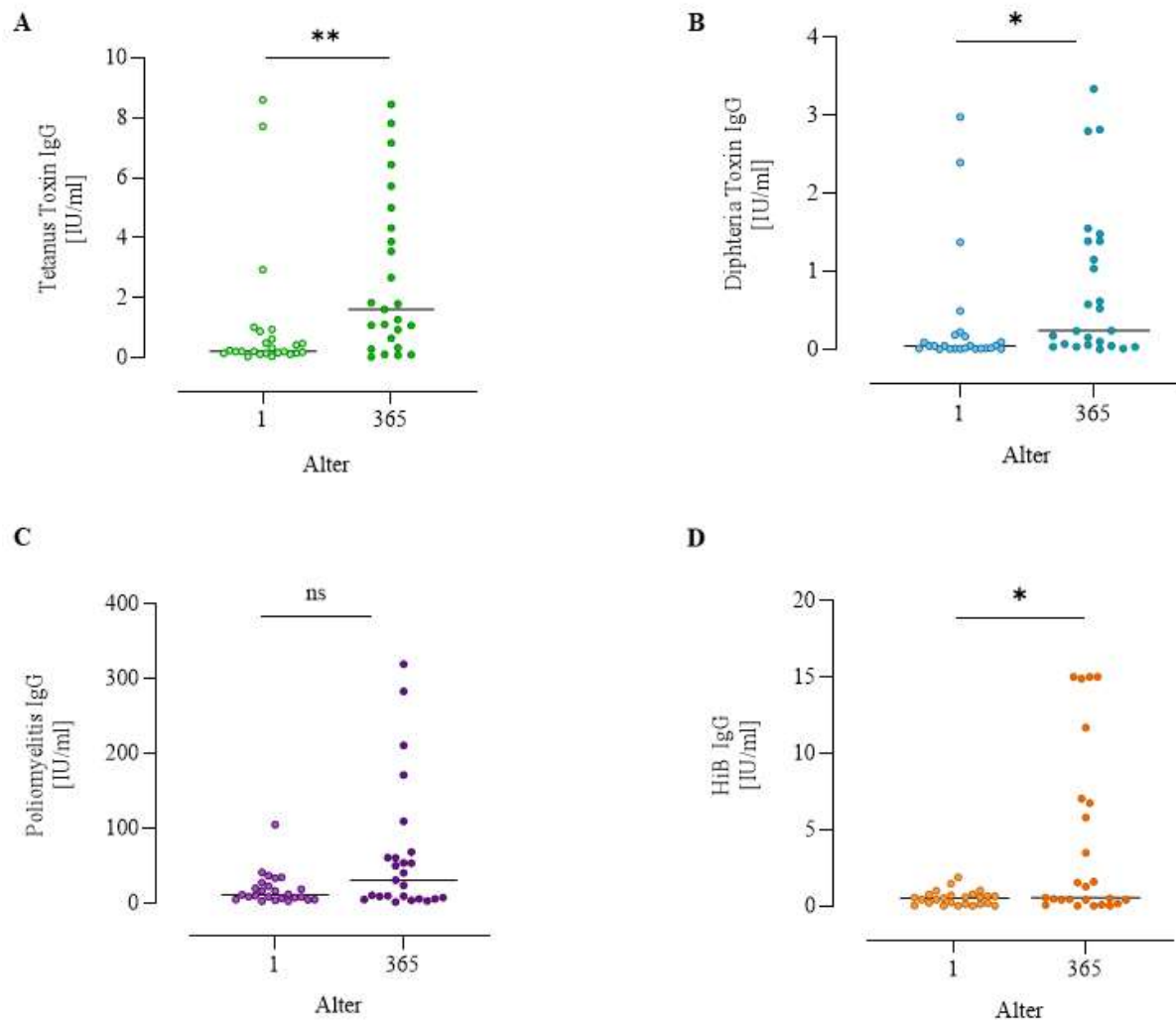


**Abbildung 4: Plasma-IgG-Antikörperspiegel am 365. Lebenstag Frühgeborener mit unterschiedlichem Gestationsalter.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) Corynebacterium diphtheria toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) Haemophilus influenzae (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend bei Frühgeborenen mit Gestationsalter 28 + 0 – 30 + 6 SSW (GA1, n = 25) und Gestationsalter 31 + 0 – 32 + 6 SSW (GA2, n = 13) im Plasma bestimmt. Gestationsaltersklassen (GA1; GA2) geben die Dauer der Schwangerschaft in Schwangerschaftswochen (SSW) an. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.

### 3.2.3. Plasma-Antikörperspiegel am 1. und 365. Lebenstag von FG in der Gestationsaltersklasse GA1

Es werden die IgG-Plasma-Antikörperspiegel (AK) der Frühgeborenen (FG) mit niedrigerem Gestationsalter (GA1) an LT 1 und LT 365 betrachtet. Über den Zeitraum des ersten Lebensjahres werden in diesen beiden Altersgruppen die Immunantwort auf mehrfache Immunstimuli -in Form der Verabreichung von mindestens zwei Dosen der sechsfach Grundimmunisierung- anhand des Verlaufes der Plasma-Antikörperspiegel innerhalb des ersten Lebensjahres dargestellt (Abbildung 5). Die Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus stiegen innerhalb des ersten Lebensjahres signifikant an ( $p = 0,008$ ) (Abbildung 5A). Die Minimalwerte der gemessenen AK-Konzentrationen gegen die Diphterie lagen für die beiden betrachteten Zeitpunkte LT 1 und LT 365 auf einem vergleichbaren Niveau (Abbildung 5B), darüber hinaus erreichten die FG auch hier signifikant höhere Plasma-Antikörperkonzentrationen an LT 365 ( $p < 0,05$ ). Die AK-Konzentrationen gegen Polio von LT 1 zu LT 365 zeigten nahezu eine Verdreifachung der Werte auf den Perzentilen 50 und 100, in der Gesamtauswertung unterschieden sich die IgG-Titer dennoch nicht signifikant voneinander (Abbildung 5C). Die Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen HiB lagen für beide betrachteten Zeitpunkte hinsichtlich ihrer Minimalwerte und auf der 50. Perzentile auf einem sehr ähnlichen Niveau (Abbildung 5D), über die 75. und 100. Perzentile lagen die Plasma-AK an LT 365 deutlich über den Werten von LT 1 ( $p < 0,05$ ).



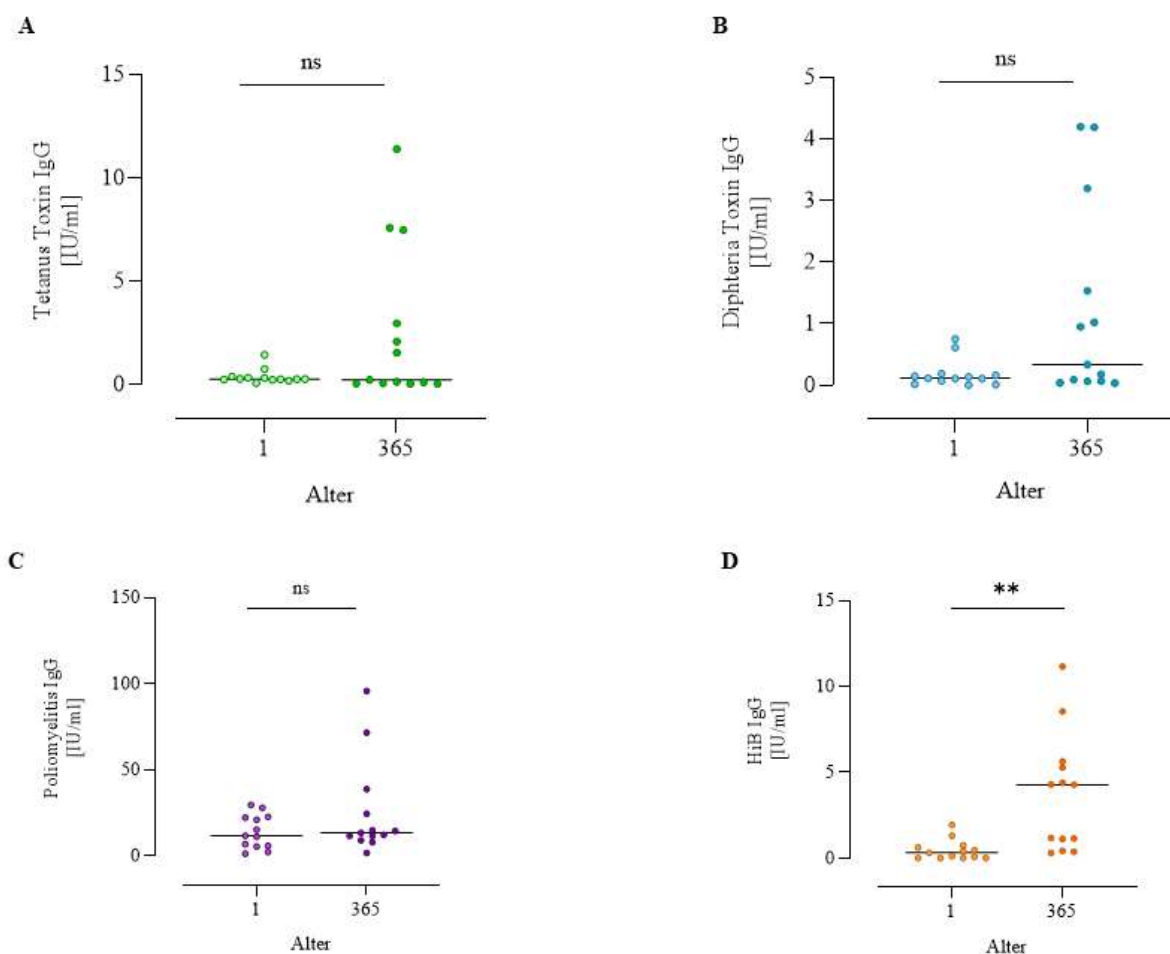
**Abbildung 5: Plasma-IgG-Antikörperspiegel an LT 1 und LT 365 von FG der GA1.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diphtheria* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für LT 1 und LT 365 bei Frühgeborenen mit Gestationsalter  $28 + 0 - 30 + 6$  SSW (GA1,  $n = 25$ ) im Plasma bestimmt. Gestationsaltersklassen (GA1; GA2) geben die Dauer der Schwangerschaft in Schwangerschaftswochen (SSW) an. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.

### 3.2.4. Plasma-Antikörperspiegel am ersten und am 365. Lebenstag von FG in der Gestationsaltersklasse GA2

Um eine Beurteilung der Immunantwort der Frühgeborenen (FG) aus der älteren Vergleichsgruppe (GA2) auf mehrere Immunstimuli (hier in Form einer mehrfachen Verabreichung des sechsfachen Impfstoffes zur Grundimmunisierung) innerhalb des ersten Lebensjahres zu ermöglichen, wurden die die IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen (AK) an LT 1 und LT 365 verglichen (Abbildung 6). Zu beiden Zeitpunkten verteilte sich der Großteil der gemessenen Plasma-AK-Konzentrationen gegen Tetanus auf einem ähnlich niedrigen Niveau, an LT 365 lagen die Konzentrationen leicht unter den

Werten von LT 1 (Abbildung 6A). Vereinzelt waren deutlich höhere Werte als an LT 1 feststellbar. Die erreichten AK-Konzentrationen gegen Diphterie verteilten sich zu den betrachteten Zeitpunkten auf einem ähnlichen hohen Niveau, an LT 365 lag dieses über dem von LT 1 (Abbildung 6B). Vereinzelt wurden nach dem ersten Lebensjahr deutlich höhere Werte erreicht, in der Gesamtanalyse lag kein signifikanter Unterschied zwischen LT 1 und LT 365 vor. Der Anstieg in den Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen Polio von LT 1 zu LT 365 war unwesentlich (Abbildung 6C). Bei starker Streuung der Daten lagen die Antikörperkonzentrationen an LT 1 im Median bei 11,68 IU/ml und an LT 365 bei 13,38 IU/ml. Die Entwicklung der Plasma-AK gegen HiB zeigte einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ) von LT 1 zu LT 365 (Abbildung 6D). Die maximal erreichten Werte an LT 1 lagen unter der 50. Perzentile, der an LT 365 gemessenen Werte.

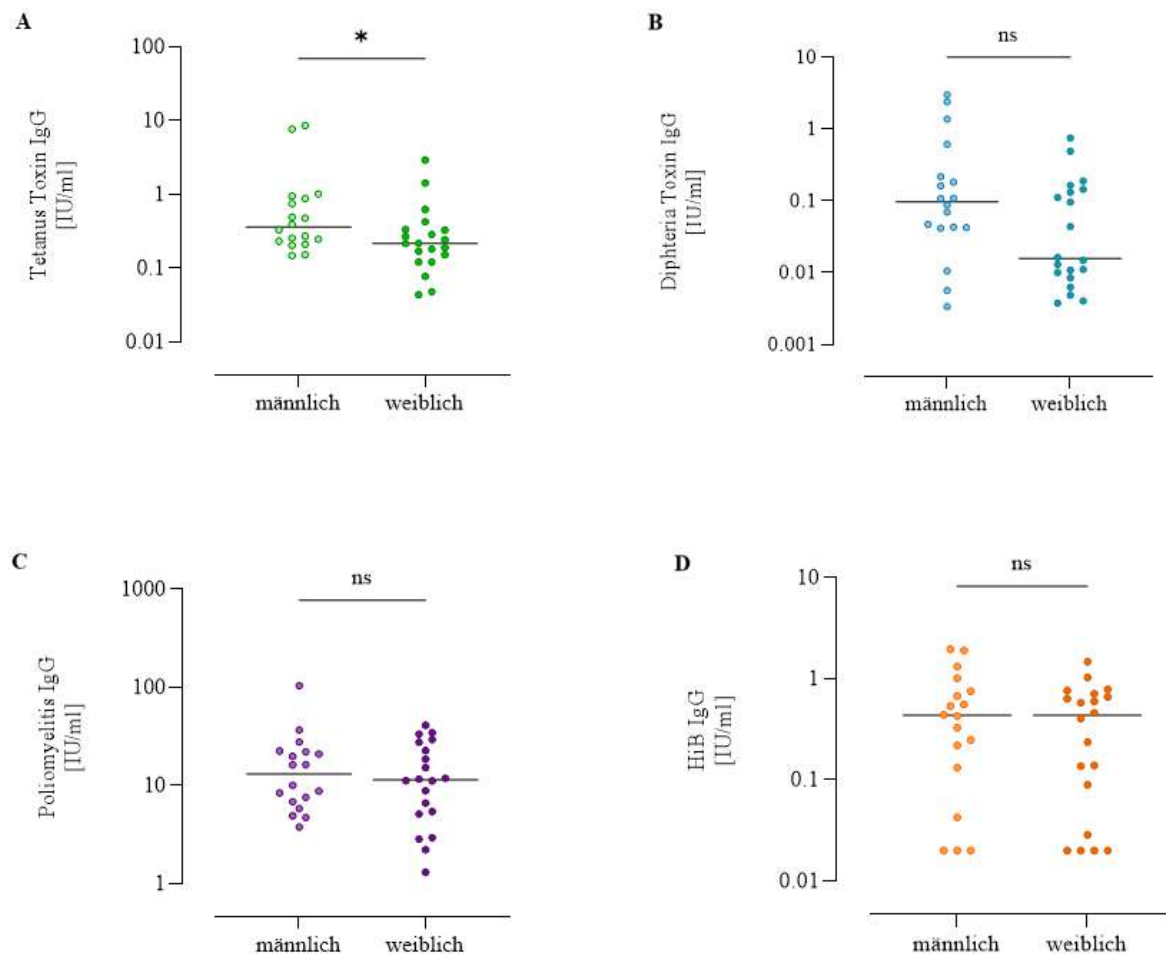


**Abbildung 6: Plasma-IgG-Antikörperspiegel an LT 1 und LT 365 von FG der GA2.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diphteria* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomylitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für LT 1 und LT 365 bei Frühgeborenen mit Gestationsalter 31 + 0 – 32 + 6 SSW (GA2, n = 13) im Plasma bestimmt. Gestationsaltersklassen (GA1; GA2) geben die Dauer der Schwangerschaft in Schwangerschaftswochen (SSW) an. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$ ), ns = nicht signifikant.

### **3.2.5. Plasma-Antikörperspiegel weiblicher und männlicher FG in den ersten Lebentagen**

Um beurteilen zu können, ob eine Assoziation zwischen biologischem Geschlecht und der Art der Ausbildung der Immunantwort festgestellt werden kann, wurden die IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen (AK) der Frühgeborenen (FG) beider Altersklassen an LT 1 (Abbildung 7) und LT 365 (Abbildung 8) in Abhängigkeit des vorliegenden Geschlechts verglichen. Im Folgenden wurden die Daten für die Plasma-Antikörperkonzentrationen am ersten Lebenstag vergleichend betrachtet. Für weibliche FG ließen sich an LT 1 signifikant niedrigere Plasma-AK-Konzentrationen gegen Tetanus feststellen als in der männlichen Vergleichsgruppe (Abbildung 7A). Die IgG-Konzentrationen weiblicher FG auf der 75. Perzentile lagen unterhalb der Konzentrationen männlicher FG auf der 50. Perzentile. Die Plasma-AK-Konzentrationen gegen Diphtherie unterschieden sich zum betrachteten Zeitpunkt nicht signifikant zwischen den Vergleichsgruppen (Abbildung 7B). Männliche FG zeigten in der Gesamtanalyse etwas höhere IgG-Konzentrationen als die weiblichen FG, die Verteilung der Einzelwerte stellte sich ähnlich dar. Für die Plasma-AK gegen Polio weiblicher und männlicher FG an LT 1 ließen sich bei sehr ähnlichem Verteilungsmuster der Einzelwerte zwischen den Vergleichsgruppen dezent höhere Werte bei den männlichen FG feststellen (Abbildung 7C). Männliche und weibliche FG unterschieden sich an LT 1 nicht hinsichtlich ihrer Plasma-AK-Konzentrationen gegen HiB (Abbildung 7D). Diese zeigten ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, die Minimalwerte und Mediane lagen fast auf demselben Niveau.



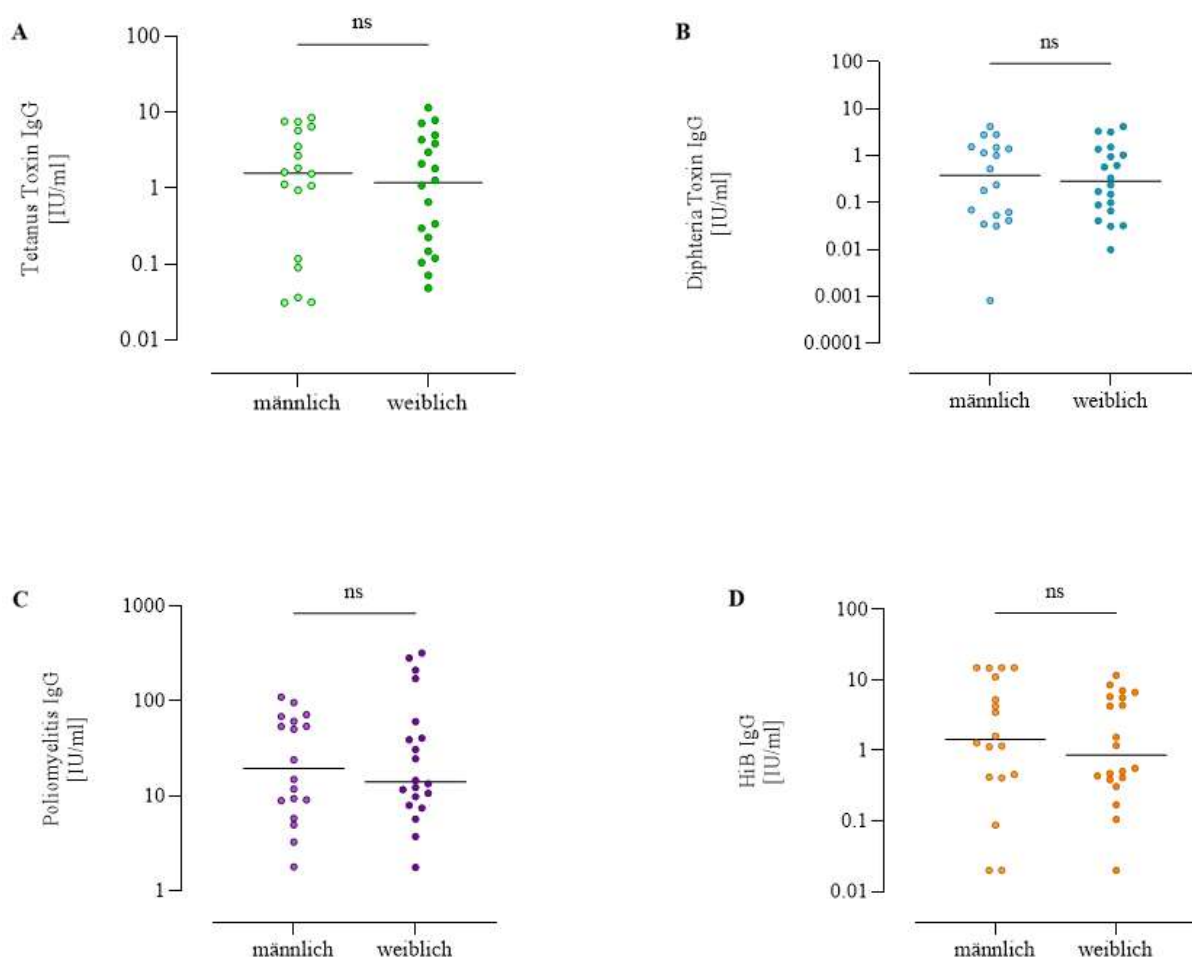
**Abbildung 7: Plasma-IgG-Antikörperspiegel männlicher und weiblicher FG an LT 1.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diphtheria* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für männliche und weibliche FG beider Altersklassen an LT 1 bestimmt. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.  $n(\text{Gesamt}) = 38$ ,  $n(\text{weiblich}) = 20$ ,  $n(\text{männlich}) = 18$ .

### 3.2.6. Plasma-Antikörperspiegel weiblicher und männlicher FG zu Beginn des zweiten Lebensjahres

Um beurteilen zu können, ob sich eine Assoziation zwischen biologischem Geschlecht und der Art der Ausbildung der Immunantwort abbilden lassen, wurden die IgG- Plasma- Antikörperkonzentrationen (AK) der Frühgeborenen (FG) beider Altersklassen an LT 1 (Abbildung 7) und LT 365 (Abbildung 8) in Abhängigkeit des vorliegenden Geschlechts verglichen. Im Folgenden wurden die Daten für die Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres vergleichend betrachtet. Männliche FG lagen an LT 365 sowohl bei den niedrigsten erreichten Plasma-Antikörperspiegeln als auch bei den maximal erreichten Werten unterhalb der IgG-Konzentrationen weiblicher FG. Auf der 50. Perzentile lagen die erreichten IgG-Konzentrationen der männliche FG höher als in der weiblichen

Vergleichsgruppe (Abbildung 8A). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Plasma-Antikörperspiegel von weiblichen und männlichen FG gegen Diphtherie festgestellt werden. Bei einem insgesamt sehr ähnlichen Verteilungsmuster der Werte, lagen die IgG-Konzentrationen der weiblichen FG nur leicht unterhalb der Konzentrationen der männlichen FG (Abbildung 8B). Von einigen weiblichen FG wurden an LT 365 deutlich höhere Maximalwerte gegen Polio erreicht als in der männlichen Vergleichsgruppe (Abbildung 8C). In der Gesamtauswertung lagen die Plasma-Antikörperspiegel weiblicher FG unterhalb der IgG-Konzentrationen in der männlichen Vergleichsgruppe. Weibliche FG zeigten im Vergleich zu männlichen FG niedrigere Plasma-AK-Konzentrationen gegen HiB an LT 365, die Werte unterschieden sich mit  $p = 0,5530$  nicht signifikant voneinander (Abbildung 8D).

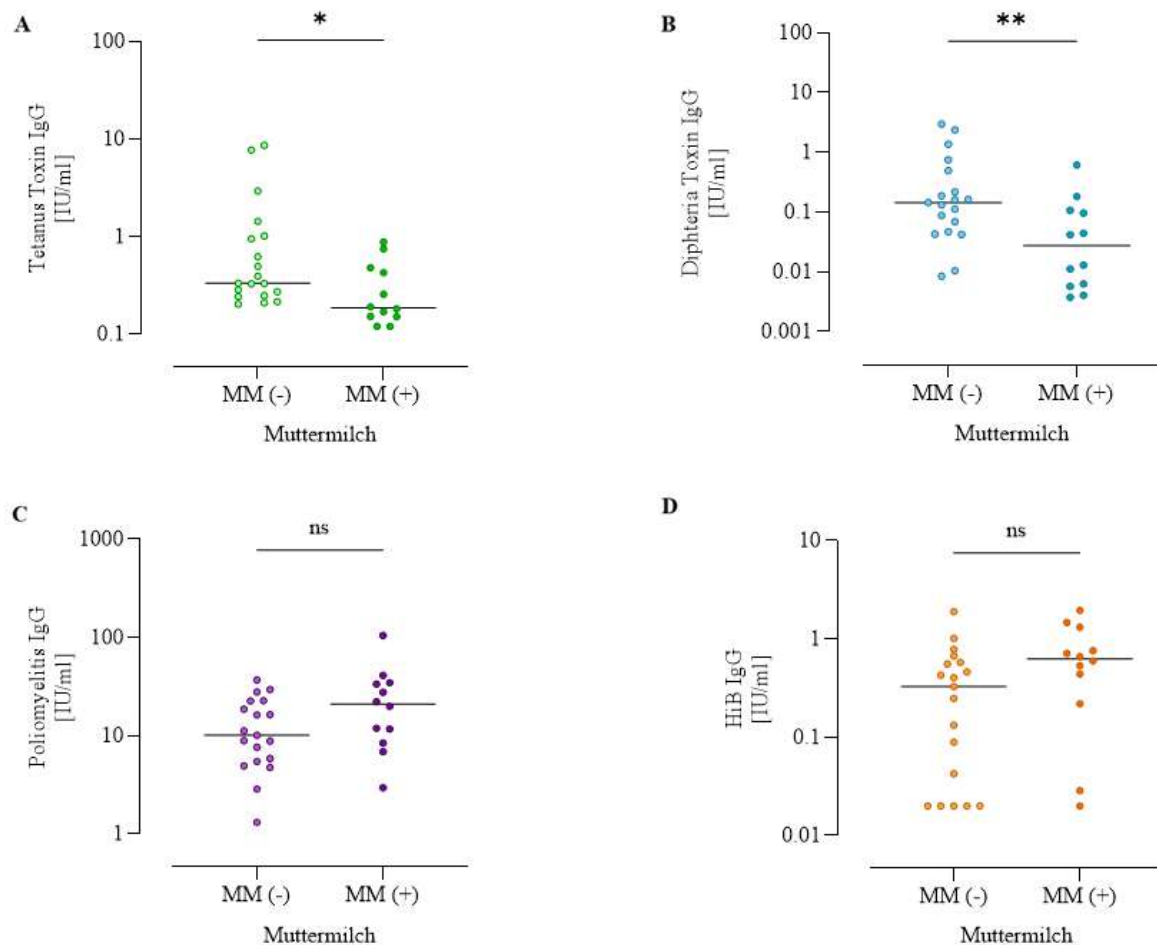


**Abbildung 8: Plasma-IgG-Antikörperspiegel männlicher und weiblicher FG an LT 365.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diphtheria* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für weibliche und männliche FG beider Altersklassen an LT 365 bestimmt. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$ ), ns = nicht signifikant.  $n(\text{Gesamt}) = 38$ ,  $n(\text{weiblich}) = 20$ ,  $n(\text{männlich}) = 18$ .

### 3.2.7. Plasma-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 1

Um eine Einschätzung hinsichtlich der immunmodulatorischen Wirkung von Muttermilch auf das Immunsystem Frühgeborenen (FG) treffen zu können, bspw. durch den mütterlichen Impfstatus und dem damit verbundenen Vorliegen maternaler Antikörper und Immunzellen, die durch die Muttermilch auf das FG übertragen werden, wurden die IgG-Plasma-Antikörperspiegel (AK) gestillter und ungestillter Kinder zum Zeitpunkt LT 1 (Abbildung 9) verglichen. Bei ungestillten FG konnten an LT 1 signifikant höhere Plasma-AK-Konzentrationen gegen Tetanus gemessen werden, als in der Vergleichsgruppe der gestillten Kinder ( $p = 0,0125$ ) (Abbildung 9A). Die niedrigsten IgG-Konzentrationen ungestillter FG lagen leicht über dem Niveau der 50. Perzentile für die Plasma-Antikörperkonzentrationen, die gestillte Kinder an LT 1 erreichten. Die IgG-Konzentrationen gegen Diphtherie zeigten bei gestillten und ungestillten Kindern eine weite Streuung der Werte, diese lag in der Gruppe der ungestillten Kinder auf einem deutlichen höheren Niveau, so dass mit  $p = 0,0097$  ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Plasma-Antikörperkonzentrationen zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden konnte (Abbildung 9B). Gestillte und ungestillte Kinder zeigten eine ähnliche Verteilung der Plasma-AK gegen Polio an LT 1 (Abbildung 9C). Höhere IgG-Konzentrationen wurden hier in der Gruppe der gestillten Kinder festgestellt, der Unterschied war aber nicht signifikant. Es waren ähnliche Minimal- und Maximalwerte für die Plasma-Antikörperspiegel gegen HiB in beiden Gruppen zu verzeichnen, in der Gesamtauswertung lagen die IgG-Konzentrationen der gestillten Kinder oberhalb der Werte, der ungestillten Kinder (Abbildung 9D).



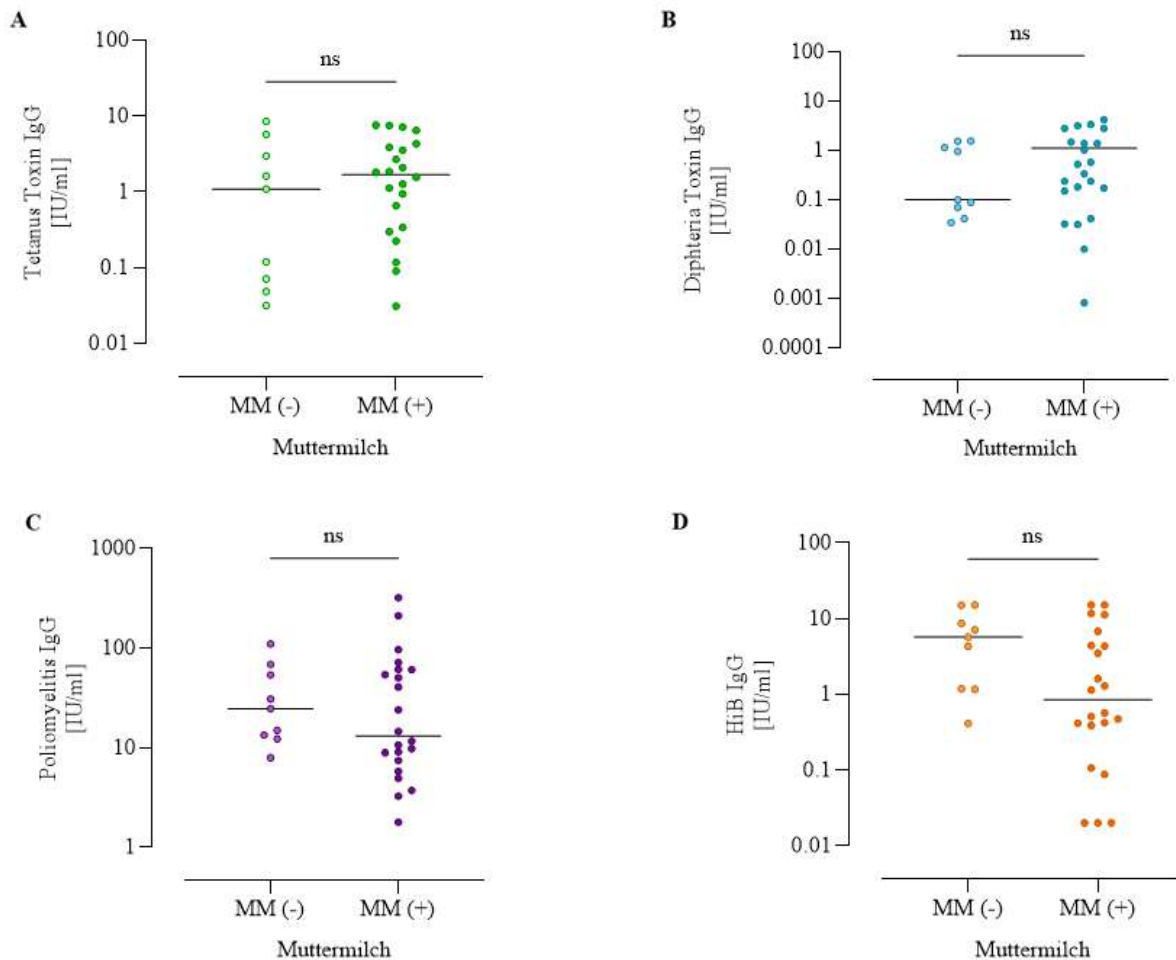
**Abbildung 9: Plasma-IgG-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 1.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) Coryne bacteriumdiphtheria toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) Haemophilus influenzae (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für gestillte und ungestillte FG beider Altersklassen an LT 1 und LT 365 bestimmt. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant. n(Gesamt) = 31, n(MM (+)) = 12, n(MM (-)) = 19.

### 3.2.8. Plasma-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 365

Um eine Einschätzung hinsichtlich einer Interferenz, der durch das Stillen übertragenen mütterlichen IgG-Plasma-Antikörper (AK) mit den Antigenen der, innerhalb des ersten Lebensjahres verabreichten Impfstoffen einschätzen zu können, wurden die AK-Spiegel gestillter und ungestillter Kinder nach der Vollendung des ersten Lebensjahres verglichen (Abbildung 10). Gestillte und ungestillte FG erreichten hier ähnlich hohe Plasma-Antikörperspiegel gegen Tetanus (Abbildung 11A). Die IgG-Konzentrationen gegen Diphtherie verteilen sich in der Gruppe der gestillten FG auf einem höheren Niveau als in der Vergleichsgruppe der ungestillten Kinder, die erreichten Werte unterschieden sich in der Zusammenschau dennoch nicht signifikant voneinander (Abbildung 11B). Gestillte FG zeigten lagen mit den Minimalwerten deutlich unter- und mit den Maximalwerten deutlich über den IgG-Konzentrationen der ungestillten Kinder. Insgesamt erreichten die ungestillten Kinder höhere Plasma-

Antikörperkonzentrationen (Abbildung 11C). Ungestellte FG erreichten im Vergleich zu gestillten FG nach Vollendung des ersten Lebensjahres keine signifikant höheren Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen HiB mit  $p = 0,0854$  (Abbildung 9D). Hierbei lagen die Werte auf der 50. Perzentile der ungestellten Kinder oberhalb der Werte, die gestillte Kinder auf der 75. Perzentile erreichten.



**Abbildung 10: Plasma-IgG-Antikörperspiegel gestillter und ungestillter FG an LT 365.**

Plasma-Antikörperkonzentrationen von (A) Tetanus Toxin (Tetanus, grün), (B) *Corynebacterium diptheria* toxin (Diphtherie, blau), (C) Poliomyelitis Virus (Polio, lila) und (D) *Haemophilus influenzae* (HiB, orange) wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie mittels ELISA vergleichend für gestillte und ungestillte FG beider Altersklassen an LT 1 und LT 365 bestimmt. Der Plasmaüberstand wurde aus EDTA-Blutproben nach Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Punkte zeigen individuelle Daten, Balken innerhalb der Punktwolken zeigen den Median. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben (Signifikanzniveau  $\alpha < 0.05$ ), ns = nicht signifikant.  $n(\text{Gesamt}) = 31$ ,  $n(\text{MM} (+)) = 22$ ,  $n(\text{MM} (-)) = 9$ .

### 3.2.9. Plasma-Antikörperspiegel Frühgeborener nach unterschiedlichen antibiotischen Therapien

Die Auswertung in Abhängigkeit verabreichter antibiotischer Wirkstoffkombinationen erfolgte aufgrund der geringen Stichprobenzahl deskriptiv an LT 365 (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Plasma-IgG-Antikörperspiegel in [IU/ml] an LT 365 von Frühgeborenen entsprechend der antibiotischen Wirkstoffkombination, die sie in den ersten Lebenstagen erhalten haben.**

			Plasma-IgG-Antikörperkonzentrationen [IU/ml]			
			Tetanus	Diphtherie	Poliomyelitis	HiB
Verabreichte Antibiose (Wirkstoff- kombinationen)	Gentamycin + Ampicillin/Sulbactam (n = 26)	Minimum	0.043	0.004	2.232	0.020
		Median	0.252	0.056	10.65	0.288
		Maximum	8.598	2.980	36.99	1.958
	Gentamycin – Ampicillin/Sulbactam (n = 5)	Minimum	0.121	0.003	3.796	0.440
		Median	0.152	0.004	16.44	0.753
		Maximum	0.495	0.046	41.20	1.029
	Gentamycin+ Ampicillin/Sulbactam + zusätzlicher Wirkstoff (n = 7)	Minimum	0.121	0.006	1.312	0.020
		Median	0.427	0.182	22.76	0.404
		Maximum	2.941	1.372	104.9	1.477

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Effekte einer antibiotischen Therapie aus den genannten Wirkstoffkombinationen in den ersten Lebenstagen der Frühgeborenen auf die Höhe ihrer Plasma-Antikörperkonzentrationen zu Beginn des zweiten Lebensjahres (LT 365) untersucht. Aufgrund der geringen Menge zu diesem Zweck verfügbarer Daten, wurde auf eine abschließende Statistik verzichtet und stattdessen eine Beschreibung der Ergebnisse anhand einer deskriptiven Statistik vorgenommen (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, Tabelle 7). In der untersuchten Kohorte mit n=38 FG erhielten 26 der FG die Wirkstoffkombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam zur antibiotischen Abdeckung innerhalb der ersten Lebenstage. Es ergibt sich ein Verhältnis von circa 3:2. Eine Kombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam mit einem zusätzlichen Antibiotikum erhielten 7 FG (n = 7, Verhältnis circa 1:5). Eine alternative Wirkstoffkombination ohne Ampicillin/Sulbactam wurde 5 FG verabreicht (n=5, Verhältnis circa 1:7). In der Gegenüberstellung der Wirkstoffkombination von Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam +/- zusätzlicher Wirkstoff (n = 33) zu einer antibiotischen Wirkstoffkombination ohne Ampicillin/Sulbactam (n = 5) zeigen sich an LT 365 tendenziell höhere Plasma-Antikörperspiegel gegen Tetanus und Diphtherie bei den FG, die eine Therapie mit Ampicillin/Sulbactam erhalten haben. Im Gegensatz dazu zeigen FG, die Ampicillin/Sulbactam erhalten haben, tendenziell niedrigere Plasma-Antikörperspiegel gegen Polio und HiB. Für eine genauere Beobachtung der Gruppe der Frühgeborenen,

die die Wirkstoffkombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam (n = 26) erhalten haben, wurden diejenigen Kinder separat betrachtet, die zusätzlich ein weiteres Antibiotikum erhalten haben (n = 7). In der Gegenüberstellung dieser Werte waren die niedrigsten Plasma-Antikörperkonzentrationen, abgesehen von den Plasma-Antikörperspiegeln gegen Diphtherie, immer in der Gruppe der Frühgeborenen zu finden, die die Wirkstoffkombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam erhalten hatten (Tabelle 7).

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss des Gestationsalters auf die Plasma-Antikörperspiegel am 1. und 365. Lebenstag

Die Effektivität immunologischer Prozesse im Sinne einer adäquaten Immunantwort, zum Beispiel auf eine Impfung, korreliert mit der Höhe des Gestationsalters (49,50) und dem damit einhergehenden fortgeschritteneren Reifungsstatus des kindlichen Immunsystems (13). Das unreife Immunsystem zeichnet sich durch eine sogenannte „*hyporesponsivness*“ (13). Dieser Zustand ist charakteristisch für den natürlichen Grad an Unausgereiftheit von Frühgeborenen. Er trägt einerseits zu einer verminderten Fähigkeit zur effektiven Immunabwehr des frühkindlichen Immunsystems bei, andererseits verhindert er überschießende Autoimmunreaktionen, sowie Abstoßungsreaktionen zwischen Mutter und Kind. Gleichzeitig können diese funktionell anti-inflammatorisch gewichteten Mechanismen im immunologischen Kontext von Frühgeborenen (FG) auch zu verminderten Impfreaktion führen (16,26). Insbesondere mit Blick auf Immunsierungen sind hierbei die, verglichen mit Reifgeborenen, Kindern und Erwachsenen, niedrigen Populationen an T- und B-Gedächtniszellen anzuführen, die bekanntermaßen mit einer verminderten Fähigkeit des Frühgeborenen einhergehen, ausreichend hohe, bzw. protektive IgG-Antikörperspiegel zu bilden (50). Die physiologischen Hintergründe zum Immunsystem des FG wurden in (Abschnitt 0) bereits detailliert beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und der adaptiven Immunantwort in Form von IgG-Plasma-Antikörpern feststellen lässt. Reifgeborene Kinder werden zwischen der 38 + 0 SSW – 42 + 0 SSW geboren. Unter der Annahme der Geburt nach 40. SSW liegt bei einem Reifgeborenen näherungsweise ein Gestationsalter von 280 Tagen vor. Die Frühgeborenen der betrachteten Kohorte hatten an LT 1 ein Gestationsalter zwischen minimal 197 und maximal 230 Tagen. An LT 365 lag das Gestationsalter des jüngsten Kindes bei 410 Tagen, das des ältesten Kindes bei 505 Tagen. Alle Altersangaben dieser Arbeit bilden das korrigierte Alter der Frühgeborenen ab. Durch die Einschlusskriterien der PRIMAL-Studie wurde eine Altersuntergrenze von 28 + 0 SSW und eine Altershöchstgrenze von 230 Lebenstagen für die einzuschließenden Kinder festgelegt (Abbildung 3). Das vorliegende Altersspektrum der Probanden wurde für eine differenzierte Betrachtung in zwei Gestationsklassen (GA1: 28 + 0 – 30 + 6; GA2: 31 + 0 – 32 + 6 SSW) unterteilt. Hierbei zeigte sich folgende Verteilung: GA1 mit n = 25 und GA2 mit n = 13 (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Im Rahmen der Forschungsarbeiten der Universität des Saarlandes in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie am Campus Homburg wurde untersucht, ob die Gabe von Probiotika in den ersten Lebenstagen zu einer derart vorteilhaften Beeinflussung des frühkindlichen Mikrobioms führt, dass sich dieser positive Effekt in höheren IgG-Plasma-Antikörperspiegeln an LT 365 in der Verum- gegenüber der Placebogruppe niederschlägt. Die Gruppenbildung ermöglichte in Bezug auf die gegebene Fragestellung, den Vergleich zwischen „jüngeren“ (GA1) und „älteren“ (GA) Frühgeborenen. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit

wurde diese Einteilung übernommen, um neben der allgemeinen Beurteilung des Gestationsalters als Einflussfaktor auf die adaptive Immunität, auch potenzielle Unterschiede zwischen den vorliegenden Altersgruppen eruieren zu können.

#### **4.1.1. Plasma-Antikörperspiegel beider Altersgruppen GA1 und GA2 am ersten Lebenstag**

In den ersten Lebenstagen (LT 1) unterscheiden sich die Daten der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen (AK) gegen Tetanus, Polio, Diphtherie und HiB nicht signifikant zwischen Frühgeborenen mit höherem oder niedrigerem Gestationsalter (Abbildung 3). Die Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus im Plasma liegen bei 33 der 38 FG in einem Bereich zwischen 0.01 – 0,5 IU/ml. Damit sind die Antikörperspiegel laut Herstellerangaben der ELISA-Kits (Tabelle 3) ausreichend hoch, um kurzfristig eine Infektion verhindern zu können. Antikörperkonzentrationen im Bereich eines Langzeitschutzes gegen Tetanus werden nur bei zwei FG gemessen. Bei 15 FG kann kein verlässlicher Schutz vor einer Infektion mit Diphtherie festgestellt werden. Ein kurzfristiger Schutz mit Plasma-Antikörperspiegeln zwischen 0.1 – 1.0 IU/ml wird bei 16 FG erreicht. Von diesen ist für 14 FG mit Antikörperspiegeln über 1 IU/ml ein Langzeitschutz anzunehmen (Tabelle 4). Für Polio muss bei 13 der FG mit Plasma-Antikörperkonzentrationen unter 8 IU/ml von einem unzureichenden Schutz ausgegangen werden. Im Grauzonenbereich von 8 – 12 IU/ml liegen die Antikörperspiegel von 8 FG. Bei 12 FG werden Antikörperkonzentrationen über 12 IU/ml gemessen, so dass für diese Kinder ein verlässlicher Schutz angenommen werden darf. Für HiB werden bei 13 FG geringere Antikörperkonzentrationen als 0.15 µg/ml gemessen, es liegt kein ausreichender Impfschutz vor. 19 FG liegen mit Werten zwischen 0.15 – 1µg/ml im Bereich eines nachgewiesenen Keimkontaktes und bei 6 FG ist mit Antikörperkonzentrationen über 1 µg/ml von einer ausreichenden natürlichen Immunität auszugehen (Tabelle 5). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einzelner Betrachtung der erreichten Antikörperspiegel im Plasma an LT 1 gegen Polio, Diphtherie und HiB für circa die Hälfte der Kinder beider Altersgruppen (GA1 und GA2) ausreichend hohe Antikörperkonzentrationen messbar waren, so dass von einem kurzfristigen Schutz vor Infektion ausgegangen werden kann. Die Ausprägung des passiv erworbenen, sogenannten Nestschutzes ist abhängig von der Menge transferierter mütterlicher Antikörper. Diese hängt maßgeblich mit dem Gestationsalter des Kindes zusammen, da die höchsten Transferraten in den letzten Wochen der Schwangerschaft zu verzeichnen sind (16,26). Daneben gelten u.a. die Serum-Antikörperspiegel der Mutter (16,51), ein regelrechten Impfstatus der Mutter (25), die plazentare FcR-Rezeptor Expression der Synzyotrophoblasten zur Ermöglichung eines rezeptorvermittelten Antikörpertransfers (16,52) (Abschnitt 1.2.1) und das männliche Geschlecht (25) als positiv prädiktive Faktoren für einen effektiven Antikörpertransfer (25). Klinische Daten und Plasmaproben der Mütter der Probanden, die Aufschluss über Einflussfaktoren, die die mütterlichen Plasma-Antikörperkonzentrationen direkt beeinflussen, wie bspw. der mütterliche Impfstatus oder ein Infektgeschehen kurz vor der Geburt und/oder mütterliche chronische systemische Erkrankungen, etc.,

wurden im Rahmen der PRIMAL-Studie nicht erfasst. Dementsprechend wird in dieser Arbeit lediglich das Gestationsalter als Einflussfaktor auf die Ausprägung des Nestschutzes, beziehungsweise die Höhe der maternalen Plasma-Antikörperspiegel zum Zeitpunkt der Geburt untersucht und auf eine Analyse der vorgeburtlichen mütterlichen Plasma-Antikörperkonzentrationen oder eine Gegenüberstellung präpartaler mütterlicher und postpartaler kindlicher Antikörperkonzentrationen verzichtet. Der Transfer mütterlicher Antikörper während der Schwangerschaft beginnt zwischen der 17. SSW und 18. SSW und steigt im Verlauf kontinuierlich an (16,25,26,51). Zwischen der 28. und 32. SSW liegen die fetalen IgG-Konzentrationen bei ca. 50% der maternalen Antikörperkonzentrationen (15), wobei es nach der 36. SSW zu einem starken Anstieg der Antikörperkonzentrationen im Nabelschnurblut kommt und die höchsten fetalen IgG-Konzentrationen in den letzten vier SSW erreicht werden (16,25). Demnach ist mit Fortschreiten des Gestationsalters mit höheren Spiegeln übertragener mütterlicher Antikörper im Plasma des Foetus zu rechnen (25). Die Prüfung der Gültigkeit dieser Annahme in Bezug auf die vorliegende Probandenkohorte ist nur bedingt möglich, da selbst die ältesten Probanden mit einem Gestationsalter von maximal 32 + 6 SSW nicht in die Phase der Schwangerschaft eintreten (33 + 0 SSW bzw. 35 + 1 SSW bis Entbindung), innerhalb welcher die höchsten Transferraten maternaler Antikörper beobachtet werden (25). Demnach kann keine Gegenüberstellung der IgG-Plasma-Antikörperspiegel vor-, beziehungsweise nach dem maßgeblichen Zeitraum des aktiven maternalen Antikörpertransfers erfolgen. Die vorliegenden Ergebnisse führen daher zu der Beobachtung, für einige FG der untersuchten Kohorte bereits vor dem Ende der 32. SSW einzelne Plasma-Antikörperspiegel gegen Tetanus, Polio, Diphtherie oder HiB im Bereich eines kurzfristigen, aber verlässlichen Schutzes vor Infektion liegen. In der Literatur wird der Zeitraum um die 30. SSW (28. SSW – 32. SSW) als derjenige angegeben, in dem bereits 50% der maternalen Antikörper auf den Fötus transferiert wurden (15,16,18). Da die Serum-Antikörperkonzentrationen der Mütter die diaplazentaren Transferraten mitbeeinflussen, könnte das Erreichen protektiver fetaler Antikörperspiegel hohe Konzentrationen mütterlicher Antikörper vermuten lassen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der plazentare FcR-Transfer ein sättigungsabhängiger Prozess ist und ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der Höhe mütterlicher Antikörper und der Menge transferierter Antikörper besteht (25). Das Sättigungsverhalten des Rezeptors führt bei der Überschreitung einer definierten IgG-Konzentration von 15g/l aller mütterlichen IgG-Subklassen zu einer Stagnation und in deren Folge zum Abbau der ungebunden AK in den Lysosomen (16,25). Da wie bereits erwähnt weder Impfstatus, noch chronische oder akute Infekte der Mütter der Probanden im Rahmen der PRIMAL-Studie erfasst wurden, können in der vorliegenden Arbeit mangels Referenzwerte und klinischer Daten von Seiten der Mütter, keine fundierten Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern beispielsweise ein positiver Impfstatus mit hohen Antikörpertitern bei der Mutter, bereits vor dem Zeitpunkt des maximalen Antikörpertransfers während der Schwangerschaft, zu einem fetalen Antikörperkonzentrationen im Bereich eines kurzfristigen Schutzes führen. Die Abwesenheit und der fehlende Miteinbezug klinischer und immunologischer Daten der Mütter stellt eine Schwäche der Arbeit dar. Immunisierungen von Müttern vor oder während der Schwangerschaft werden schon länger

empfohlen. Entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, erscheint eine tiefergehende Untersuchung inwiefern sich der immunologische Status der Mutter auf die Menge intrauterin transferierten Antikörperspiegel bis zum Beginn des dritten Trimenon auf die postnatalen fetalen Antikörperspiegel auswirken lohnend. Da Frühgeborene oftmals vor dem Zeitpunkt des maximalen maternalen Antikörpertransfers entbunden werden, ist der immunologische Status der Mutter gegebenenfalls als ein Faktor zur Optimierung der immunologischen Ausgangslage der Frühgeborenen in Erwägung zu ziehen.

#### **4.1.2. Plasma-Antikörperspiegel beider Altersgruppen am 365. Lebenstag**

Ein verlässlicher Schutz vor Infektion liegt laut Herstellerangaben der verwendeten ELISA-Kits (Abschnitt 2.2.5) ab folgender Antikörperkonzentrationen vor: Tetanus: 0,1 IU/ml – 0,5 IU/ml (Tabelle 3), Diphtherie: 0,1 IU/ml – 1 IU/ml (Tabelle 4), Polio: 8 IU/ml – 12 IU/ml (Abschnitt 2.2.5) und HiB: > 1 µg/ml (Tabelle 5). Der Anteil der Frühgeborenen beider Altersklassen, deren Antikörperkonzentrationen im Plasma den Schwellenwert für protektive Antikörperspiegel erreichen, liegt an LT 365 für Tetanus bei 32 aus 38 FG, für Diphtherie bei 24 aus 38 FG, für Polio bei 29 aus 38 FG und für HiB bei 22 aus 38 FG. Damit erreicht an LT 365 verglichen mit den Daten von LT 1 ein deutlich höherer Anteil der Frühgeborenenkohorte Antikörperkonzentrationen im Plasma gegen Tetanus, Polio, Diphtherie und HiB, die im Bereich eines verlässlichen Schutzes vor Infektion liegen (Abschnitt 4.1.1). Ein Langzeitschutz vor Infektion liegt laut Herstellerangaben der verwendeten ELISA-Kits ab folgenden Antikörperkonzentrationen vor (Abschnitt 2.2.5): Tetanus: > 5 IU/ml (Tabelle 3), Diphtherie: > 1 IU/ml (Tabelle 4), Polio: > 12 IU/ml und HiB: > 1 µg/ml (Tabelle 5). Der Anteil an Frühgeborenen aus beiden Altersklassen (GA1 und GA2), deren Antikörperkonzentrationen im Plasma an LT 365 nach drei Impfdosen im Rahmen der Grundimmunisierung im Bereich des Langzeitschutzes liegen beträgt für: Tetanus: 21 von 38 FG (54 %), Diphtherie 14 von 38 FG (39 %), Polio: 22 von 38 FG (58 %) und für HiB 22 von 38 FG (58 %). In der Gruppe der jüngeren Frühgeborenen lassen sich mit Ausnahme von Polio signifikante Unterschiede in der Entwicklung der Plasma-Antikörperspiegel von LT 1 zu LT 365 feststellen (Abbildung 5). Ältere Frühgeborene (GA2) weisen nur in der Entwicklung der Antikörperspiegel gegen HiB einen signifikanten Anstieg von LT 1 zu LT 365 auf (Abbildung 6). Diese Konstellation könnte sich wie folgt interpretieren lassen: Frühgeborene mit einem niedrigeren Gestationsalter (GA1) profitieren stärker von dem 3 + 1 Impfschema der STIKO als die älteren Kinder der Vergleichsgruppe (GA2), für deren Antikörperentwicklung sich kein signifikanter Anstieg von LT 1 zu LT 365 eruieren lässt (Abbildung 6). Betrachtet man ungeachtet ihres Verlaufs innerhalb des ersten Lebensjahres die Antikörperkonzentrationen der älteren, mit denen der jüngeren Frühgeborenen (GA1 und GA2) zum Zeitpunkt LT 365, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der beiden Altersgruppen feststellen (Abbildung 4). Zusammengefasst heißt das, dass die Anzahl der Frühgeborenen mit einem zuverlässigen Kurzzeitschutz von LT 1 nach drei erfolgten Grundimmunisierungen zu LT 365 gruppenübergreifend angestiegen ist. Hinsichtlich des Erreichens von

Antikörperspiegeln im Bereich des Langzeitschutzes, lässt sich im Vergleich von LT 1 zu LT 365 ebenfalls ein deutlicher Anstieg feststellen. An LT 1 erreichten für Tetanus 2 FG, für Diphtherie 14 FG, für Polio 17 FG und für HiB 6 FG Antikörperkonzentrationen im Bereich des Langzeitschutzes. An LT 365 waren es für Tetanus 9 FG, für Diphtherie 24 FG, für Polio 22 und für HiB 22. Dieses Ergebnis spricht für eine sich positiv entwickelnde Immunreaktion, die auf eine Triggerung der adaptiven Immunität durch die drei Grundimmunisierungen zurückzuführen sein könnte. Die vorliegende Arbeit ist limitiert durch die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen zu nur zwei Zeitpunkten LT 1 und LT 365. Da keine weiteren Referenzwerte durch zusätzliche Antikörperbestimmungen im Laufe des ersten Lebensjahres vorgenommen wurden, kann der exakte Verlauf der Antikörperentwicklung im Rahmen dieser Arbeit nicht abgebildet werden. Hierunter fiel die Beobachtung wie sich die Antikörperentwicklung in den Wochen nach den Immunsierungen verhält, ebenso ob, wie in einigen Forschungsarbeiten beschrieben, eine allgemeine Tendenz zu vermehrt auftretenden, schnellen und frühzeitigen Abfällen der Antikörperkonzentrationen bei Frühgeborenen zu beobachten ist. Unter der Annahme, dass diese Abfälle innerhalb des ersten Lebensjahres bestehen, kann der Anstieg des Anteils der Kinder von LT 1 zu LT 365, der mehrheitlich protektive Antikörperkonzentrationen im Bereich des Langzeitschutzes erreicht, für eine „Boosterfunktion“ der Grundimmunisierungen nach dem 3+1 STIKO-Schema auf die Immunfunktion sprechen. Obwohl zu Beginn des zweiten Lebensjahres bei den meisten Kindern protektive Antikörperkonzentrationen verzeichnet werden, unterscheidet sich die Höhe der gemessenen Antikörperkonzentrationen in den betrachteten Gruppen an LT 1 und LT 365 statistisch nicht signifikant (Abbildung 4). Die Gründe für den geringen Anstieg der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen (welcher für die betrachteten Probanden dennoch im Bereich protektiver Plasma-Antikörperkonzentrationen resultiert), werden in der Literatur übereinstimmend auf die Unreife des Immunsystems von FG zurückgeführt. Sowohl das angeborene als auch des adaptive Immunsystem unterscheiden sich von dem Immunsystem des späteren Lebens, insbesondere dadurch, dass sich das unreife Immunsystem des FG eher durch einen anti-inflammatorischen Status auszeichnet, welcher die Ausbildung einer adäquaten Immunantwort erschwert (15,18,24,53) (Abschnitt 0). Auf Basis der Literatur kann angenommen werden, dass dieser Status auch noch zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung, der in etwa bei acht Wochen liegt, besteht und FG zu dieser Zeit, verglichen mit Reifgeborenen, immer noch eine verminderte absolute Anzahl an Lymphozyten, T-Zellen, B-Zellen, Th-Helferzellen und eine erniedrigte CD4/CD8-Ratio aufweisen (5,18,26,53). Bei den vorhandenen B-Zellen überwiegen die naiven Zellen über die B-Gedächtniszellen. Deren Stimulation führt zu einer verringerten Bildung von antikörperproduzierenden Plasmazellen (15,24). Zudem erkennen die vorliegenden B-Zellen nur eine geringe Anzahl an Antigenen, da die Differenzierung des B-Zellrezeptors nicht vor dem dritten Trimester abgeschlossen ist (5,18,26). Dieser Umstand wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Einerseits stehen die negativen Folgen einer unzureichenden B-Zelldifferenzierung im Vordergrund. Diese gehen mit einer verringerten Sekretion von Antikörpern, sprich, einer verringerten Immunantwort einher (24) und führen zu einem schnelleren Abfall der IgG-

Konzentrationen (18). Andererseits wird diskutiert, ob sich die unzureichende B-Zell-Rezeptordifferenzierung auch immunologisch vorteilhaft auswirken könnte. Demnach könnten Immunisierungen von FG die B-Zell-Rezeptordifferenzierung derart beschleunigen, dass FG zum Zeitpunkt des Erreichens des Alters eines reifgeborenen Kindes, ein größeres Repertoire an Antigenen erkennen. In Folge könnte bereits bei frühzeitiger Konfrontation mit Antigenen eine bessere Immunantwort provoziert werden (26). Da alle 38 in dieser Arbeit betrachteten FG vor dem dritten Trimester geboren wurden, ist zum Zeitpunkt der Geburt für beide Altersgruppen ein noch unausgereifter und undifferenzierter B-Zellrezeptorstatus anzunehmen. In Übereinstimmung mit der STIKO-Impfempfehlung (54) fanden die Erstimmunisierungen in der Probandengruppe zum empfohlenen/frühesten Zeitpunkt, das heißt innerhalb des zweiten Lebensmonates der Neugeborenen statt. Demnach lag zu diesem Zeitpunkt eine korrigierte Altersspanne von näherungsweise (28 + 0 SSW + ca. 5 Lebenswochen / 231 Lebenstagen) 33 SSW/ 231 Tagen bis (32 + 6 SSW + ca. 5 Wochen / 265 Lebenstagen) 38 SSW / 266 Tagen vor. Somit kann zumindest für die Kinder in der älteren Vergleichsgruppe GA2 zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung von einem Status fortgeschrittenerer B-Zell-Rezeptordifferenzierung ausgegangen werden, der sich allerdings nicht in signifikant höheren Plasma-Antikörperspiegeln an LT 365 niederschlägt. Die signifikanten IgG-Anstiege in der Gruppe der jüngeren FG (GA1) gegen Tetanus, Diphtherie und HiB könnten die zuvor genannte These bestätigen, dass frühzeitige Immunisierungen nach dem 3 + 1 Schema der STIKO auch bei Vorliegen eines unausgereiften Differenzierungsstatus einen förderlichen und beschleunigenden Effekt auf die Differenzierung der B-Zellrezeptoren haben. Ein weiterer entscheidender Faktor, der mit einem niedrigen Gestationsalter einhergeht, aber als vorteilhaft für die Ausbildung einer IgG-Plasma-Antikörperreaktion bewertet wird, ist die Annahme erniedrigter Spiegel mütterlicher Antikörper beim Neugeborenen (18,25). Mütterliche Antikörper können eine Immunreaktion verhindern, indem sie zeitgleich mit einem gebundenen Antigen sowohl an einen B-Zell-Rezeptor als auch an einen FcR-Rezeptor – beide exprimiert auf der Oberfläche einer B-Zelle- binden. Durch dieses „Crosslinking“ werden widersprüchliche Signale an die B-Zelle vermittelt. Das Binden eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor initiiert eigentlich eine Plasmazelldifferenzierung und Antikörperproduktion. Durch Besetzen des FcR-Rezeptors wird der B-Zelle die Anwesenheit eines für das Antigen spezifischen Antikörpers signalisiert und die Auslösung einer Immunreaktion abgebrochen. Dieser Mechanismus wird als „Blunting“ bzw. „epitope masking“ bezeichnet und kann bei hohen Konzentrationen mütterlicher Antikörper zu einer verminderten Impfreaktion führen (18,24–26). Innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kohorte lässt sich bedingt durch das geringe Gestationsalter ein gruppenübergreifend gering ausgeprägter Nestschutz vermuten. Mangels der Möglichkeit einer Vergleichsgruppenbildung aufgrund der Einschlusskriterien der PRIMAL-Studie, die keine Kinder mit einem Gestationsalter, älter als die 32 + 6 SSW einschließt, ist eine differenzierte Gegenüberstellung von FG, die vor dem Zeitpunkt des aktiven Antikörpertransfers geboren wurden und solchen, die

mindestens nach Vollendung der 33. SSW geboren wurden und demnach in den Zeitraum des höchsten Transfers mütterlicher Antikörper fallen, nicht möglich.

## **4.2. Einfluss des Geschlechts auf die Ausbildung einer Antikörperreaktion innerhalb des ersten Lebensjahres**

In der betrachteten Probandengruppe unterscheiden sich weibliche und männliche FG am ersten Lebenstag nur hinsichtlich der Antikörperkonzentration gegen Tetanus signifikant (Abbildung 7A). Für die IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen Diphtherie, Polio und HiB lassen sich stets etwas höhere Werte in der männlichen Vergleichsgruppe feststellen (Abbildung 7). Dieses Verhältnis findet sich bei im Verlauf insgesamt leicht steigenden Antikörperkonzentrationen, auch an LT 365 wieder (Abbildung 8). Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich weibliche und männliche FG auch nicht mehr hinsichtlich der IgG-Konzentrationen gegen Tetanus (Abbildung 8A). In der Literatur wurden Beobachtungen beschrieben, die eine höhere Anfälligkeit bspw. für die Entwicklung einer Sepsis (55), oder ein schlechteres Outcome in Folge von Infektionen, etc. bei männlichen FG nahe legen (56). Die genauen Hintergründe und der Einfluss des Geschlechts im Neu- bzw. Frühgeborenenalter sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es gibt Ansätze, die Zusammenhänge zwischen x-chromosomal vermittelter Genexpression und TLRs untersuchen (56), wobei zahlreiche Studien sich mit Unterschieden in der Höhe der Konzentrationen von Lymphozytensubpopulationen zwischen männlichen und weiblichen Früh- und Reifgeborenen beschäftigen (57,58), wohingegen andere Studien genau diese Ergebnisse nicht bestätigen, sondern im Gegenteil von ähnlichen Konzentrationen der Lymphozytensubpopulationen für beide Geschlechter ausgehen (59). Eine Metastudie von 2019 erkennt die Einflussgröße „Geschlecht“ in Folge der ausgewerteten Studien übereinstimmend als anerkannten Einflussfaktor für die Entwicklung der B-Zellreaktion an (14). Uneinigkeit herrscht zwischen in dieser Studie in Bezug darauf, welche Arten von Impfungen typischerweise mit höheren Antikörperreaktionen bei weiblichen Frühgeborenen assoziiert sind. Übereinstimmung herrscht zwischen den dort zitierten Autoren dahingehend, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Antikörperreaktion von FG gibt (14). Auch Ashley L. Fink and Sabra L. Klein äußern in ihrem Manuskript aus 2018 die Vermutung eines immunologischen Vorteils weiblicher FG ab dem Zeitpunkt der Geburt. Dieser gründe sich auf höheren Konzentrationen B-Zell-aktivierender Faktoren (BAFF) bei den weiblichen FG im Vergleich zu höheren Konzentrationen nativer CD5+ B-Zellen bei den männlichen FG (60). Die Einordnungen der vorliegenden Arbeit basieren auf den zu den Zeitpunkten LT 1 und LT 365 gemessenen Antikörperkonzentrationen im Plasma und setzen ihren Fokus entsprechend auf die B-Zell-Reaktionen. Aussagen zu chromosomal kodierten-, T-Zell-vermittelten und das Komplement betreffenden Modulationen der Immunantwort Frühgeborenen, die auf das Geschlecht zurückzuführen sind, sind anhand der gegebenen Daten nicht abzudecken. Schnelle Abfälle von zuvor gebildeten Antikörpern im Plasma sind für weibliche Frühgeborene beschrieben worden (14). Aus Mangel an Referenzwerten, die eine Einschätzung des Verlaufs der Antikörperentwicklung im ersten Lebensjahr und insbesondere nach

den Immunisierungen möglich machen würden, kann diese Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert werden. Zudem macht das parallele Vorliegen des niedrigen Gestationsalters, als ein als anerkannt modulierender Einflussfaktor auf die adaptive Immunreaktion FG, eine explizit singuläre Einschätzung zur Bedeutung des fraglichen Einflussfaktors „Geschlecht“ unmöglich. Demzufolge lassen die im Vergleich innerhalb des ersten Lebensjahres stärker ansteigenden und auch absolut höheren Antikörperkonzentrationen der männlichen FG an LT 1 und LT 365 in der untersuchten Kohorte keinen immunologischen Vorteil weiblicher FG erkennen.

### **4.3. Einfluss des Stillens auf die IgG-Plasma-Antikörperverläufe im ersten Lebensjahr**

Die gemessenen Plasma-Antikörperspiegelkonzentrationen am ersten Lebenstag sind für die Einordnung des Einflusses der Muttermilch auf die immunologische Entwicklung der Frühgeborenen nur insofern von Relevanz, als dass sie Ausgangswerte abbilden, mit denen die Werte an Lebenstag 365 verglichen werden können. Aufgrund der Kürze der Zeitspanne zwischen der ersten Blutentnahme und dem ersten Anlegen und Stillen, insbesondere unter Berücksichtigung der geringen Mengen an zugeführter Muttermilch in den ersten Lebenstagen ist keine explizit auf die zugeführte Muttermilch zurückzuführende Stimulation oder Repression der adaptiven Immunreaktion des FG zu erwarten. Diese Einschätzung lässt sich damit begründen, dass innerhalb dieses Zeitraumes von Stunden bis wenigen Tagen per se nur von einer direkten Immunantwort auszugehen ist, und selbst eine hierdurch initiierte adaptive Immunreaktion in Folge der Frühgeburtlichkeit und damit u.a. einhergehenden niedrigeren Konzentrationen an Antigen-präsentierenden Zellen (26,50), eher zu einer verzögerten als zu einem messbarer Antikörperanstieg zu erwarten wäre. Dies trifft auch zu, wenn berücksichtigt wird, dass der Zeitpunkt LT 1, hinsichtlich des Zeitpunktes der ersten Blutentnahme im Rahmen der PRIMAL-Studie einen Zeitraum abdeckt, der sich ab dem Zeitpunkt des Einschlusses noch zusätzlich über mehrere Tage erstrecken konnte. Zum Zeitpunkt LT 1 stellt sich im Vergleich gestillter und ungestillter Frühgeborener folgendes Bild dar: Ungestillte FG liegen mit ihren Plasma-Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus und Diphtherie signifikant höher als gestillte Kinder (Abbildung 9A, B). Die Höhe der IgG-Plasma-Antikörperspiegel gegen Polio und HiB unterscheiden sich nicht signifikant zwischen gestillten und ungestillten Kindern, auch wenn gestillte FG etwas höhere Werte zeigen (Abbildung 9 B, C). Ein möglicher Grund für die z.T. signifikant unterschiedlichen IgG-Konzentrationen ist das Zusammenspiel unterschiedlicher und z.T. bereits diskutierter immunologischer Einflussfaktoren wie das Gestationsalter (Abschnitt 4.1), Geschlecht (Abschnitt 4.2), postnatale Antibiotika (Abschnitt 4.4), etc., welche in unterschiedlichen Plasma-Antikörperspiegeln am ersten Lebenstag resultieren. Diese fallen nun als Ausgangswerte der Fragestellung zufällig zwischen den verglichenen Gruppen als signifikant unterschiedliche Plasma-Antikörperkonzentrationen auf, obwohl kein kausaler Zusammenhang zwischen der Zufuhr oder dem Nichterhalten von Muttermilch am ersten Lebenstag besteht. Daher werden die Ausgangswerte beschrieben, aber auf eine Interpretation verzichtet. Zum Zeitpunkt des

Erreichens des ersten Lebensjahres präsentiert sich folgendes Bild: Grundsätzlich gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen von gestillten und ungestillten Frühgeborenen an LT 365 (Abbildung 10). Im Gegensatz zum ersten Lebenstag liegen gegen Tetanus und Diphtherie die Plasma-Antikörperspiegel gestillter Kinder leicht oberhalb der Werte, die für ungestillte Kinder gemessen wurden (Abbildung 10A, B) und entgegengesetzt verhält es sich bei Polio und HiB (Abbildung 10C, D). Es ist also zu einer, wenn auch statistisch nicht signifikanten Umkehr, der Ausgangslage gekommen. Allgemein gilt zu beachten, dass für diese Fragestellung insgesamt nur für 31 Kinder verwertbare Angaben zu der Art der Ernährung und der Stilldauer zu evaluieren waren. Fehlende, unvollständige oder widersprüchliche Angaben in den CRF-Bögen zu den Zeitpunkten LT 1, 31, 365 konnten nur teilweise über die Patientenakten rekonstruiert werden, so dass für sieben der eingeschlossenen Probanden hinsichtlich der Art der Ernährung und/oder der Stilldauer keine eindeutigen klinischen Angaben feststellen ließen. Vor diesem Hintergrund ergab sich eine Gruppengröße von 31 FG, mit einem Gruppenverhältnis von 9 gestillten, zu 22 ungestillten Kindern am ersten Lebenstag und von 19 gestillten, zu 12 ungestillten Kindern am 365. Lebenstag. Die Tatsache, dass die Anzahl gestillter Kinder an LT 365 höher liegt als die Zahl gestillter Kinder am ersten Lebenstag, obwohl die Länge der Stilldauer innerhalb des ersten Lebensjahres analysiert werden soll, lässt sich durch den klinischen Kontext und die entsprechende Datenerhebung erklären. Zunächst ist festzuhalten, dass das Zeitfenster für die Einführung einer effektiven Stillbeziehung zwischen Mutter und Kind aufgrund physiologischer Mechanismen nur einige Tage beträgt und die (Wieder-)Einführung mit jedem Tag der Unterbrechung oder Verzögerung erschwert bis unmöglich wird. Dieser Aspekt sollte in die Betrachtung der Daten miteinfließen, denn selbst wenn nicht absolut exakte klinische Angaben zu evaluieren waren, ist nicht davon auszugehen, dass einige Kinder erst nach Ablauf mehrerer Wochen Muttermilch erhalten haben. Die klinischen Angaben zur Ernährung der FG wurde für den ersten Lebenstag, meist aus Patientenakten zusammengetragen, oder aus den Angaben der CRF-Bögen entnommen. Die Geburt von Frühgeborenen und die komplikationsbehafteten ersten Tage im Leben des Neugeborenen und der Mutter führen häufig aus medizinischer Sicht zur Notwendigkeit der überbrückenden enteralen Ernährung des FG über eine Sonde und/oder einem verzögerten Stillbeginn oder zum zeitgleichen Praktizieren von Stillen und Zufüttern. Welche Ernährungsform in einer solchen Situation als die überwiegende Ernährungsform dokumentiert wurde, konnte im Rahmen der Datenerhebung für die vorliegende Fragestellung nicht nachvollzogen werden. Auch für den Zeitpunkt LT 365 wurden die klinischen Angaben basierend auf den Angaben der Eltern in den CRF-Bögen erhoben. Entsprechend anfällig sind verwendeten klinischen Daten für Fehlangaben, da sie im Nachhinein nicht objektivierbar nachgeprüft werden konnten. In der Konsequenz ist es möglich, dass ein Teil der Kinder zwischen den ersten 24 – 48 Lebensstunden aus medizinischer Notwendigkeit nicht gestillt werden konnten, oder aufgrund des parallelen Zufütterns als ungestillte Kinder erfasst wurden, wodurch die Anzahl der gestillten Kinder an LT 1 im Vergleich niedriger ausfällt als an LT 365. Die Schwerpunktsetzung richtet sich aus den genannten Gründen daher weniger auf den exakten Beginn des

Stillens innerhalb der ersten Lebenstage, sondern vielmehr darauf, ob die FG überhaupt gestillt wurden und es hierdurch zu einem Unterschied in der Ausbildung der IgG-Plasma-Antikörperreaktion im ersten Lebensjahr gekommen ist. Auf eine Differenzierung hinsichtlich der Verabreichung von Muttermilch und Kolostrum wurde verzichtet.

Muttermilch gilt als wichtige immunologisch supportive Komponente in der Überbrückung des unreifen Immunstatus des NG nach der Geburt, weshalb von der WHO für mindestens 6 Monate das Vollstillen empfohlen wird (25,29). Muttermilch enthält einerseits Immunglobuline, allen voran IgA-Antikörper, aber auch geringere Mengen an IgM-, IgE- und IgG-Antikörpern, sowie Immunzellen, Zytokine, lösliche Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Oligosaccheride (25,29). Diese Faktoren wirken sich auf unterschiedliche Weise auf das Immunsystem des Neu- und auch Frühgeborenen aus. Die Schleimhautepithelien des Gastrointestinaltraktes Neugeborener zeichnen sich in den ersten Lebenstagen und -wochen durch eine geringe Schleimproduktion, erhöhte Permeabilität der Epithelien und eine anti-inflammatorische Ausrichtung der vorhandenen Immunzellen aus (9,29). Dieser für das unreife Immunsystem charakteristischen Mechanismus der Immuntoleranz erlaubt einerseits den Übertritt von Makromolekülen wie bspw. IgG über die Schleimhäute in das kindliche System, so werden Mikroaspirationen während des Stillens als protektive Faktoren hinsichtlich Atemwegsinfektionen diskutiert (28) und fördert zeitgleich auf unterschiedliche Weise eine physiologische Kolonisation des GI-Traktes bspw. in Form der Bereitstellung von HMOs als Substrate für physiologische Kommensalen des Darmes (33). Obwohl IgG-Antikörper, im Gegensatz zu den IgA-Antikörpern, die mit 80 – 90 % den Hauptanteil mütterlicher IgG in der Muttermilch ausmachen, nur einen sehr geringen Anteil an den Immunglobulinen der Muttermilch haben, konnte ihnen eine Bedeutung hinsichtlich der Abwendung des Auftretens von Nahrungsmittelallergien zugeschrieben werden. FcR-Rezeptorvermittelt können maternale IgG-Antigen-Komplexe über FcR-Rezeptoren der Mukosa in den kindlichen Kreislauf geschleust werden. Die Exponierung des frühkindlichen Immunsystems mit IgG-Antigen-Komplexen verhindert im Hinblick auf Nahrungsmittelunverträglichkeiten, eine Ausbildung eben dieser (29). Muttermilch enthält auch Immunzellen, hiervon machen myeloische Leukozyten wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen 80% aus, lymphatische Zellen machen 20 % aus, hauptsächlich handelt es sich hierbei um T-Zellen und wenige NK und B-Zell-Subpopulationen. Die Rollen dieser Zellen ist Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht gänzlich verstanden. Diskutiert werden u.a. Reifungsbeschleunigung des Immunsystems durch Mikrochimärismus (hierunter versteht man das Persistieren einer kleinen Anzahl an vitaler, körperfremder/allogener Zellen in einem Organismus (61)), die Entwicklung IgE-vermittelter Allergien, u.v.m. (29). Während HMOs lange Zeit hauptsächlich als Substrat für physiologische Kommensalen des Gastrointestinaltraktes und damit vor allem die Funktion der Bereitung einer guten Ausgangslage zur Ausbildung eines physiologischen Darmmikrobioms zugeteilt wurde, werden ihnen mittlerweile immunmodulatorische Fähigkeiten, wie bspw. die Fähigkeit zur Beeinflussung der Permeabilität von Epithelien der Mukosa, Interagieren mit Immunzellen und das Besetzen von Rezeptoren der Mukosa zugeschrieben (9,29,62). *Short Chain Fatty Acids*, die wiederum

als Stoffwechselprodukte physiologischer Darmkeime wie z.B. Bifidobacteriaceae entstehen, werden u.a. die Fähigkeit zur Induktion regulatorischer T-Zellen zugeschrieben (9). Unter Berücksichtigung der beschriebenen immunmodulatorischen Wirkweisen von Komponenten der Muttermilch wird deutlich, dass die adaptive Immunität und damit die hier untersuchte B-Zellreaktion in Form der Ausbildung von hohen IgG-Antikörperkonzentrationen nicht direkt oder zentral berührt sind. Reifungsprozesse, die durch Mikrochimärismus ausgelöst werden, sind ein interessanter Ansatz, der Zuspuch in den Ergebnissen der Untersuchung von Allergieprävention, vermittelt durch maternale IgG-Antigen-Komplexe aus der Muttermilch erhält. Nichtsdestotrotz sollten veränderte Plasma-Antikörperentwicklungen in Anbetracht der aktuellen Forschungslage vermutlich eher sekundär als Konsequenz einer primären Beeinflussung bzw. Reifungsinduktion der direkten Immunität, die in der Folge über optimierte Prozesse zu einer verbesserten Interaktion und damit Stimulation der B-Zellen verstanden werden. Diese Einschätzung würde mit den Ergebnissen im Vergleich der Plasma-Antikörper übereinstimmen, die in der betrachteten Kohorte keine Unterschiede zwischen gestillten und ungestillten FG im Verlauf des ersten Lebensjahres zeigen (Abbildung 10). Auch bei der Gegenüberstellung der Daten in Abhängigkeit von der Stilldauer ließ sich kein linearer Zusammenhang zwischen der Stilldauer, beziehungsweise dem Einfluss der Muttermilch auf die Entwicklung der adaptiven Immunität erkennen. Verglichen wurden die Höhe der IgG-Plasma-Antikörperkonzentrationen bei Frühgeborenen, die über die Dauer von mindestens 3 (n= 10), 6 (n = 10) oder 12 (n = 2) Lebensmonaten gestillt wurden (Tabelle 6). In der betrachteten Kohorte zeigte sich für alle vier Antigengruppen (Tetanus, Polio, Diphtherie, HiB) höhere Plasma-Antikörperkonzentrationen für Kinder der Gruppe, die über die Dauer der ersten 3 Lebensmonate Muttermilch erhalten hatten als in der Gruppe der Kinder, die für die ersten 6 Lebensmonate Muttermilch erhalten hatten. Diese Beobachtung entspricht insofern der allgemeinen Forschungslage, als dass IgA-Plasma-Antikörper, Zytokine, lösliche Rezeptoren, Antigene etc. ihre immunmodulatorische Wirkung hauptsächlich über Interaktionen mit den Schleimhautepithelien des GI-Traktes (29) und Respirationstraktes (28,62) entfalten und damit nicht zu einer direkten, sondern sekundär und auf längere Sicht zu einer indirekten Beeinflussung der B-Zell-Reaktion führen können. Zum Teil wird sogar generell eine Beeinflussung von APC- und T-Zellen durch mütterlichen Antikörpern bestritten (24). Die geringen Mengen an vermeintlich über die noch durchlässigen Mukosa ins fetale System übergetretenen IgG-Antikörper der Muttermilch haben vermutlich keinen systemischen „blunting“ Effekt. Zumindest lassen sich auch in der Literatur keine gegensätzlichen Beobachtungen finden. Dennoch bleibt fraglich, ob ihre Wirkung sicher vernachlässigbar ist. Da nur zwei Kinder bis zum zwölften Lebensmonat gestillt wurden, können deren Antikörperkonzentrationen nicht weiter eingeordnet werden.

#### **4.4. Einfluss der antibiotischen Wirkstoffkombination von Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam auf die Plasma-Antikörperentwicklung von Frühgeborenen innerhalb des ersten Lebensjahres**

Während der Neonatalperiode werden FG regelmäßig Antibiotika zur Prophylaxe schwerwiegender Komplikationen verabreicht (36,63). Antibiotika, auch solche, die der Kindsmutter verabreicht wurden, beeinflussen neben dem niedrigen Gestationsalter, der Art der Entbindung und der Ernährung, die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) (36). Die Besiedlung des kindlichen GI-Traktes mit physiologischen Kommensalen wird mitunter durch den toleranten Status des unreifen Immunsystems ermöglicht. Antibiotika können sich in der Neonatalperiode nachteilig auf die physiologische Zusammensetzung des frühkindlichen Mikrobioms auswirken (35,36,52). Abgesehen von Gentamycin führt der Großteil der regelmäßig verabreichten Standardantibiotika der Kinderintensivstationen bspw. Meropenem und Cefotaxim zu einer Verminderung der Fülle von physiologischen Darmkeimen, ebenso wie die kumulative Gabe von Antibiotika (35,63). Im Kontext mit der Rolle der Muttermilch wurden im vorherigen Abschnitt (Abschnitt 4.3) bereits Wechselwirkungen zwischen Mikrobiom und adaptiver Immunität Frühgeborener erläutert. Mithilfe einer deskriptiven Statistik wurden Daten der vorliegenden Arbeit dahingehend analysiert, ob sich eine Korrelation zwischen der Höhe der Plasma-Antikörperspiegel und einer Antibiotikatherapie mit Ampicillin/Sulbactam beschreiben lässt. Wie die Muttermilch kann auch die Wirkstoffkombination aus Ampicillin/Sulbactam als ein Modulator in der Entwicklung des frühkindlichen Mikrobioms verstanden werden, welcher sich indirekt durch die veränderte Darmflora, eine hieraus resultierende mögliche Induktion proinflammatorischer Prozesse und Veränderungen, mitunter vermittelt durch Zellen der direkten Immunität, die in direkter Wechselwirkung mit den Zellen der erworbenen Immunabwehr stehen. Durch die hierdurch potenziell veränderten Interaktionen zwischen den Zellen der direkten und der adaptiven Immunität könnte diese adaptive Immunantwort entsprechend moduliert sein. Es gilt als gesichert, dass das Mikrobiom eine große Rolle für die immunologische Entwicklung Neugeborener spielt, ebenso gilt, dass die Verabreichung von Antibiotika die Ausbildung einer Dysbiose durch eine Verringerung der Fülle physiologischer Kommensalen zugunsten des vermehrten Auftretens weniger förderlicher Darmkeime begünstigen (9,36,63,64). Beide Faktoren wirken sich nicht direkt auf die adaptive Immunität aus, dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich über mehrere Zwischenschritte ein kausaler Zusammenhang beschreiben ließe: Antibiotikagaben in der Neonatalperiode führen über eine veränderte Keimbildung zu einer Induktion pro-inflammatorischer Prozesse (was eine Modulation der direkten Immunität darstellt), die wiederum das Risiko erhöhen eine NEC zu entwickeln (25). Demnach könnte auch argumentiert werden, dass eine antibiotikabedingte Dysbiose über den Zwischenschritt der proinflammatorischen Modulation der direkten Immunität, ein verändertes Zusammenspiel zwischen den Zellen der direkten und adaptiven Immunität zur Folge haben könnte, welches auch die adaptive Immunreaktion beeinflussen könnte. Diese Frage bzw. eine tiefergehende Untersuchung dieses

Zusammenhangs könnte vor dem Hintergrund der Diskussionen um die bestmöglichen Impfstrategien einschließlich Impfstoffkomponenten, -regimes, -interferenzen etc. möglicherweise von Interesse sein. Die Kombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam stellt mit 26 aus 38 Kindern, die diese Antibiotikakombination erhalten haben, die Standardkombination in der untersuchten Kohorte dar. Da für Gentamycin von den geringsten nachteiligen Effekte auf die Entwicklung des frühkindlichen Mikrobioms ausgegangen wird (36), soll folgend dargelegt werden, inwiefern sich Unterschiede in der Plasma-Antikörperreaktion nachweisen lassen, die sich mit der Verabreichung von Ampicillin/Sulbactam assoziieren lassen. Vorliegend lässt die Gesamtgruppengröße ( $n = 38$ ), mit ihrer Unterteilung nach verabreichter Antibiotikakombination: Reine Standardantibiose aus Ampicillin/Sulbactam und Gentamycin ( $n = 26$ , Verhältnis ca. 2:3), Kombination Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam mit einem zusätzlichen Antibiotikum ( $n = 7$ , Verhältnis ca. 1:5) oder Alternativkombination ohne Ampicillin/Sulbactam ( $n = 5$ , Verhältnis ca. 1:7) keine abschließende Statistik zu (Tabelle 7). Die folgenden Erläuterungen bilden demnach Beobachtungen ab, die möglicherweise zukünftig genauer analysiert werden könnten. In der Gegenüberstellung Antibiotikakombination mit Ampicillin/Sulbactam ( $n = 33$ ) zu Antibiose ohne Ampicillin/Sulbactam ( $n = 5$ ) lassen sich für Tetanus und Diphtherie höhere Plasma-Antikörperspiegel in der Gruppe mit Ampicillin/Sulbactam feststellen (Tabelle 7), bei Polio und HiB verhält es sich umgekehrt. Obwohl sich die Höhen der Antikörper z.T. signifikant unterscheiden, sind diese Unterschiede aufgrund der Gruppengröße nicht repräsentativ. Für eine genauere Beobachtung wurde die Gruppe der Frühgeborenen, die Ampicillin/Sulbactam erhalten haben, weiterunterteilt in die Gruppe derjenigen Kinder, die die Standardkombination aus Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam erhalten ( $n = 26$ ) - und diejenigen, die zur Standardkombination noch ein zusätzliches Antibiotikum erhalten haben ( $n = 7$ ) - unterteilt. In der Gegenüberstellung dieser Werte waren die niedrigsten Plasma-Antikörperkonzentrationen, außer gegen Diphtherie, immer in der Gruppe der Standardantibiose zu finden. Unter den gegebenen Umständen und in der Annahme, dass Gentamycin sich nur geringfügig auf das Mikrobiom auswirkt, könnten sich diese Ergebnisse weitestgehend dahingehend interpretieren lassen, dass die Verabreichung von Ampicillin/Sulbactam in der betrachteten Kohorte möglicherweise eine Dysbiose indizieren, bzw. zu einer Modulation des Mikrobioms führen könnte, welche indirekt bzw. über weitere Zwischenschritte zu einer nachteiligen Beeinflussung der adaptiven Immunantwort führen könnte. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren, ist diese Beobachtung interessant und es lohnt eine Überprüfung der Ergebnisse in einer größeren Kohorte.

#### **4.5. Schwächen und Stärken der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit weist Schwächen und Stärken auf. Die größten Limitationen der Arbeit sind zum einen die geringe Größe der Kohorte von insgesamt maximal 38 Frühgeborenen, die sich in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Schwerpunkt, wie beispielsweise der Anzahl von Kindern mit bestimmten Antibiotikakombinationen weiter reduziert. Die beobachteten Ergebnisse bedürfen

entsprechend einer Re-Evaluation anhand einer größeren Probandenanzahl. Zum anderen basieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit maßgeblich auf den gemessenen Antikörperkonzentrationen im Plasma der Frühgeborenen zum Zeitpunkt LT 1 und LT 365. Diese beiden Zeitpunkte sind ausschlaggebend für den Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen von LT 1 zu LT 365 nach Erhalt der drei Grundimmunisierungen. Dennoch würden Referenzwerte zu weiteren unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe des ersten Lebensjahres, insbesondere wenige Wochen nach den Impfungen, eine detailliertere Einschätzung über den Verlauf der Antikörperentwicklung zulassen und die untersuchten Einflussfaktoren wären möglicherweise besser singular einzuordnen. Auch ein insgesamt weiter gefasstes Altersspektrum mit älteren Kindern, die ein Gestationsalter von mindestens 36 + 1 SSW aufweisen und damit im Bereich der maximalen Transferraten mütterlicher Antikörper liegen, wäre einer differenzierteren Einschätzungen des Einflusses des Gestationsalters und der maternalen Antikörper auf die Entwicklung der Antikörperspiegel zuträglich gewesen. Eine weitere Schwäche liegt in der Abwesenheit klinischer Daten der Mütter der Probanden. Kenntnisse und Vergleich des mütterlichen Immunstatus der Mütter mit der immunologischen Ausgangslage der Kinder und deren immunologischer Entwicklung auf die Immunisierungen übersteigen den Umfang der Arbeit, aber wären wünschenswert gewesen. Eine weitere Schwäche der Arbeit liegt darin, dass die Bestimmung der Höhe der IgG-Plasma-Antikörperspiegel keinerlei Aufschluss über den Reifungs- beziehungsweise Differenzierungsgrad der B-Zell-Rezeptoren zulässt, der sich von Individuum zu Individuum unterscheidet. Da dessen Funktionalität jedoch im Wesentlichen an der Ausbildung der Antikörperreaktion beteiligt ist, stellt die vorgenommene Bewertung der Immunfunktion anhand der Antikörperkonzentrationen eine Einschätzung dar. Die Vernachlässigung der Analyse der T-Zellreaktionen an der Immunantwort, insbesondere da diese der B-Zellreaktion üblicherweise vorausgeht und an ihrer Initiierung beteiligt ist, stellt eine Limitation der Arbeit dar. Für eine fundierte Einschätzung zur Beeinflussung des frühkindlichen Mikrobioms durch Antibiotika in den ersten Lebenstagen und daraus resultierender Folgen für die immunologische Entwicklung, wäre zusätzlich zu den Antikörperspiegeln auch die Untersuchung von Stuhlproben und Antibiotikagaben in der Schwangerschaft zu untersuchen gewesen.

Eine Stärke der Arbeit liegt darin, dass im Rahmen der PRIMAL-Studie erstmals periphere Blutanalysen zur Bestimmung der IgG-Plasma-Antikörperspiegel als Reaktion auf die Verabreichung eines Vierkomponenten-Impfstoffes bei FG im Alter von 28–32 SSW untersucht wurden und eine Folgeuntersuchung nach einem Jahr stattfand. Auch die Untersuchung spezifischer Antibiotikakombinationen, insbesondere der Wirkstoffe Gentamycin und Ampicillin/Sulbactam, auf die immunologische Entwicklung in Folge einer potenziellen Beeinflussung des Mikrobioms ist meines Erachtens ein neuer Ansatz.

## 4.6. Schlussfolgerungen

Die unreife Immunsystem und zahlreiche Einflussfaktoren waren und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Einige Aspekte der immunologischen Entwicklung und Wechselwirkungen dieser mit der Umwelt sind weitestgehend analysiert, andere hingegen noch nicht gänzlich nachzuvollziehen. Während die Charakteristika des frühkindlichen unreifen Immunsystems als gut verstanden gelten, gibt es eine Fülle an Einflussfaktoren, deren Wechselwirkungen und Interferenzen, insbesondere im Zusammenhang mit Impfungen innerhalb des ersten Lebensjahres noch nicht vollständig aufgeklärt sind. In der Literatur fällt auf, dass hierzu vermehrt die direkte Immunität untersucht wird, wohingegen Studien zur Entwicklung der adaptiven Immunität eher selten zu finden sind. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass angenommen wird, dass die adaptive Immunität ausschließlich indirekt, also über die direkte Immunität stimuliert wird. Neu an dieser Arbeit ist daher, einige der bekannten Einflussfaktoren, denen eine immunmodulatorische Fähigkeit sicher nachgesagt wird, auf eine direkte Korrelation mit der Höhe von Plasma-Antikörperspiegeln im ersten Lebensjahr Frühgeborener zu untersuchen. Insgesamt zeigten sich hierbei im Hinblick auf die untersuchten Einflussgrößen: Gestationsalter, Geschlecht, Ernährung mit Muttermilch und verabreichte Antibiotika keine signifikanten Unterschiede. Hier zeigen sich jedoch auch die Limitationen der Arbeit, insbesondere durch die Gesamtgruppengröße sind die Ergebnisse nicht allgemein repräsentativ. Eine klare Separierung und die spezifische Zuordnung beobachteter Einflüsse und deren Konsequenz für das unreife Immunsystem ist nur sehr schwer möglich. Ursächlich hierfür ist das zeitgleiche Vorliegen beziehungsweise Auftreten von einer großen Fülle immunmodulierender Einflussfaktoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Auffassung, dass bei Frühgeborenen trotz ihres unreifen Immunstatus und einer verminderten IgG-Plasmaantikörperreaktion von den drei Grundimmunisierungen profitieren, da diese im Laufe des ersten Lebensjahres zu verlässlich protektiven Antikörperspiegeln und somit zu einem verminderten Risiko für schwere Erkrankungen führen.

Das Fazit dieser Arbeit ist, dass eine separate Untersuchung der Auswirkung einzelner immunologischer Einflussfaktoren auf die adaptive Immunität in Abgrenzung zu deren Auswirkungen auf den immunologischen Reifungsprozess in seiner Gesamtheit kaum realisierbar erscheint. Die Differenzierung der Auswirkungen zeitgleich vorliegende und miteinander wechselwirkender Einflussgrößen, sowie deren primärer Einfluss auf die direkte Immunität, die wiederum die adaptive Immunität beeinflusst, übersteigen den Umfang der vorliegenden Arbeit. Die gemachten Beobachtungen und offen geblieben Fragen könnten dennoch Anlass bieten im Rahmen weiter gefasster Arbeiten untersucht zu werden (18,24).

---

## 5. Literaturverzeichnis

1. Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Seminars in Perinatology*. November 2017;41(7):387–91.
2. the GAPPS Review Group, Lawn JE, Gravett MG, Nunes TM, Rubens CE, Stanton C. Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy Childbirth*. Februar 2010;10(S1):S1.
3. Steiner L, Diesner SC, Voithl P. Risk of infection in the first year of life in preterm children: An Austrian observational study. *Ryckman KK, Herausgeber. PLoS ONE*. 9. Dezember 2019;14(12):e0224766.
4. Miller JE, Hammond GC, Strunk T, Moore HC, Leonard H, Carter KW, u. a. Association of gestational age and growth measures at birth with infection-related admissions to hospital throughout childhood: a population-based, data-linkage study from Western Australia. *The Lancet Infectious Diseases*. August 2016;16(8):952–61.
5. Sadeck L dos SR, Kfoury R de A. An update on vaccination in preterm infants. *J Pediatr (Rio J)*. 3. Januar 2023;99(Suppl 1):S81–6.
6. Fortmann MI, Dirks J, Goedicke-Fritz S, Liese J, Zemlin M, Morbach H, u. a. Immunization of preterm infants: current evidence and future strategies to individualized approaches. *Semin Immunopathol*. November 2022;44(6):767–84.
7. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. Juli 2016;22(7):713–22.
8. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018;18(4):e27.
9. Henrick BM, Rodriguez L, Lakshmikanth T, Pou C, Henckel E, Arzoomand A, u. a. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*. 22. Juli 2021;184(15):3884-3898.e11.
10. Levy O, Wynn JL. A Prime Time for Trained Immunity: Innate Immune Memory in Newborns and Infants. *Neonatology*. 2014;105(2):136–41.
11. Rouers EDM, Bruijning-Verhagen PCJ, Van Gageldonk PGM, Van Dongen JAP, Sanders EAM, Berbers GAM. Association of Routine Infant Vaccinations With Antibody Levels Among Preterm Infants. *JAMA*. 15. September 2020;324(11):1068.
12. Chen X, Shi Y. Determinants of microbial colonization in the premature gut. *Mol Med*. 5. Juli 2023;29(1):90.
13. Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Frontiers in Pediatrics [Internet]*. 2020 [zitiert 18. Dezember 2023];8. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.00005>
14. Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev*. 20. März 2019;32(2):e00084-18.
15. Zimmermann P, Jones CE. Factors That Influence Infant Immunity and Vaccine Responses. *Pediatric Infectious Disease Journal*. Mai 2021;40(5S):S40–6.
16. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:1–13.

17. Sioriki AA, Gkentzi D, Papadimitriou E, Dimitriou G, Karatza A. Vaccinations in Infants Born Preterm: An Update. *CPR*. 1. Juli 2020;16(2):148–55.
18. Bonhoeffer J, Siegrist CA, Heath PT. Immunisation of premature infants. *Archives of Disease in Childhood*. 1. November 2006;91(11):929–35.
19. Pieren DKJ, Boer MC, De Wit J. The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. *Front Immunol*. 17. November 2022;13:1031924.
20. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. April 2015;16(4):343–53.
21. Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol*. Juli 2005;141(1):10–8.
22. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. März 2017;46(3):350–63.
23. Sarfas C, White AD, Sibley L, Morrison AL, Gullick J, Lawrence S, u. a. Characterization of the Infant Immune System and the Influence and Immunogenicity of BCG Vaccination in Infant and Adult Rhesus Macaques. *Front Immunol*. 11. Oktober 2021;12:754589.
24. Saso A, Kampmann B. Vaccine responses in newborns. *Semin Immunopathol*. November 2017;39(6):627–42.
25. Albrecht M, Arck PC. Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators. *Front Immunol*. 31. März 2020;11:555.
26. Sioriki AA, Gkentzi D, Papadimitriou E, Dimitriou G, Karatza A. Vaccinations in Infants Born Preterm: An Update. *CPR*. 1. Juli 2020;16(2):148–55.
27. Dolatshahi S, Butler AL, Pou C, Henckel E, Bernhardsson AK, Gustafsson A, u. a. Selective transfer of maternal antibodies in preterm and fullterm children. *Sci Rep*. 2. September 2022;12(1):14937.
28. Demers-Mathieu V, Huston RK, Markell AM, McCulley EA, Martin RL, Dallas DC. Impact of pertussis-specific IgA, IgM, and IgG antibodies in mother’s own breast milk and donor breast milk during preterm infant digestion. *Pediatr Res*. April 2021;89(5):1136–43.
29. Dawod B, Marshall JS, Azad MB. Breastfeeding and the developmental origins of mucosal immunity: how human milk shapes the innate and adaptive mucosal immune systems. *Current Opinion in Gastroenterology*. November 2021;37(6):547–56.
30. Niewiesk S. Maternal Antibodies: Clinical Significance, Mechanism of Interference with Immune Responses, and Possible Vaccination Strategies. *Front Immunol* [Internet]. 16. September 2014 [zitiert 26. März 2024];5. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00446/abstract>
31. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients*. 8. August 2018;10(8):1038.
32. Spreckels JE, Zhernakova A. Milk and bugs educate infant immune systems. *Immunity*. August 2021;54(8):1633–5.

33. Zhang S, Li T, Xie J, Zhang D, Pi C, Zhou L, u. a. Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microb Cell Fact.* Dezember 2021;20(1):108.
34. Gibson MK, Crofts TS, Dantas G. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome. *Current Opinion in Microbiology.* Oktober 2015;27:51–6.
35. Morowitz MJ, Katheria AC, Polin RA, Pace E, Huang DT, Chang CCH, u. a. The NICU Antibiotics and Outcomes (NANO) trial: a randomized multicenter clinical trial assessing empiric antibiotics and clinical outcomes in newborn preterm infants. *Trials.* Dezember 2022;23(1):428.
36. Patangia DV, Grimaud G, O’Shea CA, Ryan CA, Dempsey E, Stanton C, u. a. Early life exposure of infants to benzylpenicillin and gentamicin is associated with a persistent amplification of the gut resistome. *Microbiome.* 3. Februar 2024;12(1):19.
37. Reyman M, Van Houten MA, Watson RL, Chu MLJN, Arp K, De Waal WJ, u. a. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun.* 16. Februar 2022;13(1):893.
38. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, u. a. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 22. April 2016;352(6284):aaf1098.
39. Van Rossum T, Haiß A, Knoll RL, Marißen J, Podlesny D, Pagel J, u. a. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Probiotics and Gut Dysbiosis in Preterm Infants: The PRIMAL Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* 1. Oktober 2024;178(10):985.
40. Marißen J, Haiß A, Meyer C, Van Rossum T, Bünte LM, Frommhold D, u. a. Efficacy of *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* and *Lactobacillus acidophilus* probiotics to prevent gut dysbiosis in preterm infants of 28+0–32+6 weeks of gestation: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre trial: the PRIMAL Clinical Study protocol. *BMJ Open.* November 2019;9(11):e032617.
41. Ständige Impfkommission: Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2025 [Internet]. 2025 [zitiert 28. Februar 2025]. Verfügbar unter: [https://www.rki.de/DE/Themen/Infektionskrankheiten/Impfen/Staendige-Impfkommission/Empfehlungen-der-STIKO/Empfehlungen/Impfkalender.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=6](https://www.rki.de/DE/Themen/Infektionskrankheiten/Impfen/Staendige-Impfkommission/Empfehlungen-der-STIKO/Empfehlungen/Impfkalender.pdf?__blob=publicationFile&v=6)
42. Paul Ehrlich Institut. Kombinations-Impfstoffe [Internet]. [zitiert 31. Mai 2025]. Verfügbar unter: <https://www.pei.de/DE/Arzneimittel/impfstoffe/kombinationsimpfstoffe/kombinationsimpfstoffe-node.htm>
43. Sanofi Pasteur. Fachinformation Hexyon [Internet]. 2021 [zitiert 15. März 2025]. Verfügbar unter: [https://impfen.sanofi.de/dam/jcr:43c41a3f-4339-4b38-ae2f-7886ca751b08/DE\\_AT\\_SPC\\_Hexyon.pdf](https://impfen.sanofi.de/dam/jcr:43c41a3f-4339-4b38-ae2f-7886ca751b08/DE_AT_SPC_Hexyon.pdf)
44. GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG. Fachinformation Infanrix hexa [Internet]. 2024 [zitiert 15. März 2025]. Verfügbar unter: [https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/de\\_DE/produktinformationen/infanrix-hexa/FI\\_Infanrix\\_hexa.pdf](https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/de_DE/produktinformationen/infanrix-hexa/FI_Infanrix_hexa.pdf)
45. IBL International GmbH. Tetanus toxin 5S IgG plus ELISA Enzymimmunoassay für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Tetanustoxin (*C. tetani*) in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) [Internet]. [zitiert 15. März 2025]. Verfügbar unter: <https://www.ibl->

- international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/3/0/30114074\_ifu\_eu\_de\_tetanus\_t  
oxin\_5s\_igg\_plus\_elisa\_vn-2020-07\_sym9.pdf
46. IBL International GmbH. Diphtheria toxin 5S IgG plus ELISA Enzymimmunoassay für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Corynebacterium diphtheriae* toxin in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin). [zitiert 15. März 2025]; Verfügbar unter: [https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/3/0/30113622\\_ifu\\_eu\\_de\\_diphtheria\\_toxin\\_5s\\_igg\\_plus\\_elisa\\_vn2022-01\\_sym9.pdf](https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/3/0/30113622_ifu_eu_de_diphtheria_toxin_5s_igg_plus_elisa_vn2022-01_sym9.pdf)
47. IBL International GmbH. Haemophilus influenzae B IgG ELISA Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Polyribosylribitolphosphat von Haemophilus influenzae Typ B in humanem Serum und Plasma [Internet]. [zitiert 15. März 2025]. Verfügbar unter: [https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re56351\\_ifu\\_eu\\_de\\_hib\\_igg\\_elisa\\_2015-07\\_\\_01\\_\\_sym9.pdf](https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re56351_ifu_eu_de_hib_igg_elisa_2015-07__01__sym9.pdf)
48. IBL International GmbH. Poliovirus IgG ELISA Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Poliomyelitis Virus in humanem Serum und Plasma (EDTA, Heparin) [Internet]. [zitiert 15. März 2025]. Verfügbar unter: [https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re56921\\_ifu\\_eu\\_de\\_poliomyelitis-virus\\_igg\\_elisa\\_2019-02\\_sym5.pdf](https://www.ibl-international.com/media/mageworx/downloads/attachment/file/r/e/re56921_ifu_eu_de_poliomyelitis-virus_igg_elisa_2019-02_sym5.pdf)
49. Voysey M, Kelly DF, Fanshawe TR, Sadarangani M, O'Brien KL, Perera R, u. a. The Influence of Maternally Derived Antibody and Infant Age at Vaccination on Infant Vaccine Responses: An Individual Participant Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 1. Juli 2017;171(7):637.
50. Pichichero ME. Challenges in vaccination of neonates, infants and young children. *Vaccine.* Juni 2014;32(31):3886–94.
51. Saso A, Kampmann B. Vaccine responses in newborns. *Semin Immunopathol.* November 2017;39(6):627–42.
52. Dolatshahi S, Butler AL, Pou C, Henckel E, Bernhardsson AK, Gustafsson A, u. a. Selective transfer of maternal antibodies in preterm and fullterm children. *Sci Rep.* 2. September 2022;12(1):14937.
53. Qazi KR, Bach Jensen G, Van Der Heiden M, Björkander S, Holmlund U, Haileselassie Y, u. a. Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life. *The Journal of Immunology.* 1. Januar 2020;204(1):68–77.
54. *Epidemiologisches Bulletin* 4/2025. 2025;
55. Murthy S, Godinho MA, Guddattu V, Lewis LES, Nair NS. Risk factors of neonatal sepsis in India: A systematic review and meta-analysis. *Cheungpasitporn W, Herausgeber. PLoS ONE.* 25. April 2019;14(4):e0215683.
56. O'Driscoll DN, De Santi C, McKiernan PJ, McEneaney V, Molloy EJ, Greene CM. Expression of X-linked Toll-like receptor 4 signaling genes in female vs. male neonates. *Pediatr Res.* Mai 2017;81(5):831–7.
57. Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clinical and Experimental Immunology.* 30. März 2005;140(2):289–92.

- 
58. Nikulshin S, Kundzina L, Tolstikova I, Gravele D, Prokofjeva T, Gardovska D. Significant age- and gender-related variability of main lymphocyte subsets in paediatric patients: Latvian data. *Scand J Immunol.* August 2018;88(2):e12696.
  59. McGovern M, Kelly L, Finnegan R, McGrath R, Kelleher J, El-Khuffash A, u. a. Gender and sex hormone effects on neonatal innate immune function. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2. Januar 2024;37(1):2334850.
  60. Fink AL, Klein SL. The evolution of greater humoral immunity in females than males: implications for vaccine efficacy. *Current Opinion in Physiology.* Dezember 2018;6:16–20.
  61. Shrivastava S, Naik R, Suryawanshi H, Gupta N. Microchimerism: A new concept. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(2):311.
  62. Triantis V, Bode L, Van Neerven RJJ. Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Front Pediatr.* 2. Juli 2018;6:190.
  63. Gasparrini AJ, Crofts TS, Gibson MK, Tarr PI, Warner BB, Dantas G. Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. *Gut Microbes.* 2. September 2016;7(5):443–9.
  64. Marchant A, Kollmann TR. Understanding the Ontogeny of the Immune System to Promote Immune-Mediated Health for Life. *Front Immunol [Internet].* 23. Februar 2015 [zitiert 26. März 2024];6. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00077/abstract>

## Publikationen

Elisabeth Kaiser, Regine Weber, Michelle Bous, Mats Ingmar Fortmann, Marie-Theres Dammann, Janina Marißen, Dorothee Viemann, Christoph Derouet, Steve Hein, Nasenien Nourkami-Tutdibi, Erol Tutdibi, Mara Wuhrmann, Muriel Charlotte Hans, Christian Gille, Stephan Gehring, Philipp Henneke, Christoph Härtel, Sybelle Goedicke-Fritz, Michael Zemlin (2025).

Insufficient immune protection in preterm infants due to delayed and incomplete hexavalent vaccination (eingereicht).

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre umfangreiche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben! Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Univ. Prof. Dr. med. Michael Zemlin für die Möglichkeit bedanken im Rahmen der PRIMAL-Studie promovieren zu dürfen. Danke für die Chance zur Mitarbeit an diesem interessanten Projekt.

Mein großer Dank geht an Elisabeth Kaiser und Regine Weber, meine zwei Betreuerinnen, die mich vom ersten bis zum letzten Tag dieser Arbeit auf meinem Weg begleitet haben. Ich danke euch für euer Vertrauen in mich, eure Konstruktivität und vor allem für eure Geduld, Ausdauer und Zuversicht allen Widrigkeiten beziehungsweise allen Wirren -und den damit einhergehenden Verzögerungen- des ganz normalen Lebens zum Trotz. Euer Engagement, insbesondere während der letzten Monate war bei Weitem keine Selbstverständlichkeit und ich bin mir dessen sehr bewusst - Danke dafür!

Ich bedanke mich aus vollem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden, vor allem aber bei meiner Mutter und meinem Mann für die ausdauernde und liebevolle Unterstützung und die Selbstverständlichkeit, mit der ihr mir das Vertrauen in mich, beziehungsweise in das Gelingen und den Abschluss dieser Arbeit, entgegengebracht habt. Danke!

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.