

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Carl-Thiem-Klinikum Cottbus
akademisches Lehrkrankenhaus
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Infektionsprophylaxe mit *Escherichia coli*
Stamm Nissle 1917 bei Frühgeborenen
unter 1500 g – eine Pilotstudie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Blümlein

aus Berlin

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr. med. habil. Th. Erler
2. Prof. Dr. med. G. Gaedicke
3. Prof. Dr. med. G. Jorch

Datum der Promotion: 03.06.2012

1	Einleitung	6
1.1	Probiotika	6
1.1.1	Aktuelle Anwendungen von Probiotika in der Pädiatrie.....	9
1.1.1.1	Allergische Erkrankungen.....	9
1.1.1.2	Gastrointestinale Erkrankungen	10
1.1.2	Probiotika in der Neonatologie	11
1.2	<i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917	16
1.2.1	Charakteristik <i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917.....	16
1.2.1.1	Wechselwirkungen mit pathogenen Keimen.....	17
1.2.1.2	Antiinflammatorische Effekte	17
1.2.1.3	Immunmodulatorische Wirkungen.....	18
1.2.2	<i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917 in der Pädiatrie	18
1.2.3	<i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917 in der Neonatologie.....	18
2	Aufgabenstellung	20
3	Methoden.....	21
3.1	Bearbeitung der Patientenakten.....	21
3.2	Datenmaske	21
3.2.1	EcN-Gruppe	21
3.2.2	Exposition.....	22
3.2.2.1	Variablen zur Geburt.....	22
3.2.2.2	Diagnosen des Frühgeborenen	23
3.2.2.3	Laborwerte zur Geburt	25
3.2.2.4	Antibiotikatherapie von Frühinfektionen	27
3.2.2.5	Ärztliche Maßnahmen	28
3.2.2.6	Ernährung	28
3.2.2.7	Mikrobiologie.....	29
3.2.2.8	Parameter der Mutter.....	30
3.2.3	Outcome	30
3.2.3.1	Spätinfektion	30
3.2.3.2	Laborwerte	30
3.2.3.3	Gewichtsentwicklung.....	31
3.2.3.4	Liegedauer.....	31
3.2.3.5	Antibiotikatherapie von Spätinfektionen	32
3.3	Statistische Methoden	32

3.3.1	Definition von Exposition und Outcome	32
3.3.2	Berechnung der deskriptiven Statistiken.....	33
3.3.3	Endpunkt Spätinfektion.....	33
3.3.4	Endpunkt Interleukin-6	34
3.3.5	Endpunkt Gewichtsentwicklung	35
3.3.6	Endpunkt Liegedauer	35
3.3.7	Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen.....	36
3.3.8	Propensity Score.....	36
4	Ergebnisse	39
4.1	Deskriptive Statistiken der EcN- und der Kontrollgruppe	39
4.1.1	Stichprobenumfang	39
4.1.2	Charakteristik für Schwangerschaftswoche und Geburtsgewicht.....	41
4.1.3	Vorauswahl der Confounder	41
4.2	Applikation von <i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917	42
4.3	Endpunkt Spätinfektion.....	42
4.4	Endpunkt Interleukin-6	43
4.5	Endpunkt Gewichtsentwicklung	44
4.6	Endpunkt Liegedauer	47
4.7	Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen.....	48
4.8	Propensity Score.....	50
4.8.1	Charakteristik des Propensity Scores	50
4.8.2	Genauigkeit des Propensity Scores	52
4.8.3	Propensity Score Matchen mit und ohne Zurücklegen	52
4.8.4	Propensity Score Matchen für den Endpunkt Spätinfektion	55
4.8.5	Propensity Score Matchen für den Endpunkt Antibiotikatherapie.....	57
4.9	Mögliche nachteilige Effekte von EcN	58
4.9.1	Nachweis von <i>E. coli</i> im Trachealsekret.....	58
4.9.2	Nachweis von <i>E. coli</i> in der Blutkultur	58
5	Diskussion	59
5.1	Eigenschaften der EcN- und Kontrollgruppe	59
5.2	<i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917	59
5.3	Endpunkt Spätinfektion.....	59
5.4	Endpunkt Interleukin-6	61
5.5	Endpunkt Gewichtsentwicklung	62

5.6	Endpunkt Liegedauer	63
5.7	Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen.....	64
5.8	Nekrotisierende Enterokolitis.....	64
5.9	Propensity Score.....	65
5.9.1	Propensity Score für den Endpunkt Spätinfektion	66
5.9.2	Propensity Score für den Endpunkt Antibiotikatherapie.....	66
5.10	Mögliche nachteilige Effekte von EcN	67
5.10.1	Nachweis von <i>E. coli</i> im Trachealsekret.....	67
5.10.2	Nachweis von <i>E. coli</i> in der Blutkultur	68
6	Zusammenfassung.....	70
	Abkürzungsverzeichnis	72
	Lebenslauf	73
	Abstract GNPI 2007	74
	Danksagung.....	75
	Erklärung.....	76
	Literaturverzeichnis.....	77

1 Einleitung

1.1 Probiotika

Bereits 1877 beobachteten Pasteur und Joubert, dass „normale Bakterien“ das Wachstum von *Bacillus anthracis* (Erreger des Milzbrandes) hemmen können, und sahen darin die Möglichkeit eines neuen medizinischen Therapeutikums [Schulze, 2008: 44].

Weitere Untersuchungen zu den gegenseitigen Wechselwirkungen von Bakterien und der Zusammensetzung der Darmflora ergaben, dass Darmkeime u. a. Eiweiße zersetzen können und bei diesem Prozess toxische Metaboliten entstehen. Daraus entwickelte sich die Vorstellung der „intestinalen Autointoxikation“, welcher laut Metchnikoff durch den prophylaktischen Einsatz von Milchsäurebakterien entgegengewirkt werden kann. Die Laktobazillen sollten die schädlichen Darmkeime verdrängen und zu einer Verlängerung der Lebensdauer führen [Metchnikoff, 1907]. Aufgrund dieser Überlegungen gilt Metchnikoff heute als „Vater des probiotischen Gedankens“. Unter modernen Gesichtspunkten steht jedoch eine Schädigung des Organismus durch erhöhte Translokation bakterieller Bestandteile pathogener Keime gegenüber der Bildung toxischer Abbauprodukte im Vordergrund.

Mit dem Beginn des Antibiotika-Zeitalters (1928 Penicillin, Alexander Fleming) gerieten Probiotika zunächst in Vergessenheit. Durch die zunehmende Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Antibiotika erfuhr das Konzept der Probiotika in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine Renaissance, was an der Zunahme wissenschaftlicher Publikationen zu diesem Thema erkennbar ist. So werden aktuell verschiedene probiotische Keime (Laktobazillen, Bifidobakterien, apathogene *Escherichia coli*, Enterokokken, Hefen) für unterschiedlichste Indikationen untersucht [Schulze, 2008: 44-50]. Die Lebensmittelindustrie vermarktet Probiotika bereits als attraktive Werbeträger zum Einsatz gegen zahlreiche Befindlichkeitsstörungen [Lentze, 2008]. Im medizinischen Bereich erstreckt sich der Einsatz von Probiotika bisher z. B. auf die Anwendung bei akuter Diarrhö sowie bei Colitis ulcerosa und Obstipation im Erwachsenenalter.

Nach der aktuellen WHO-Definition sind **Probiotika lebende Mikroorganismen**, welche, wenn sie in **ausreichender Menge aufgenommen** wurden, die **Gesundheit des Patienten fördern** [WHO, 2002].

Davon abzugrenzen ist der Begriff der **Prebiotika**: Dies sind Substanzen, die, oral verabreicht, das Wachstum mikroökologisch erwünschter Mikroorganismen (Säuerungsflora) im Dickdarm fördern und das Wachstum unerwünschter Organismen (Fäulnisflora) unterdrücken. Prebiotika sind überwiegend Poly- oder Oligosaccharide, die ähnlich wie die in der Nahrung vorkommenden komplexen Kohlenhydrate (Ballaststoffe) im menschlichen

Dünndarm nicht gespalten werden können und daher im Dickdarm dem Stoffwechsel der Darmflora zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zu vielen Ballaststoffen, die generell das Mikrobewachstum im Kolon stimulieren, fördern Prebiotika vor allem die Vermehrung von Milchsäurebakterien wie Bifidobakterien und Laktobazillen. Prebiotika werden überwiegend als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt und sind meist Pektine, Inuline oder Inulin-Abkömmlinge, z. B. Fruktooligosaccharide (FOS). **Synbiotika** sind Kombinationen aus einem oder mehreren probiotischen Mikroorganismen und prebiotischen Kohlenhydratpolymeren [Schulze, 2008: 43].

Gesundheitsfördernde Wirkungen probiotischer Mikroorganismen werden durch folgende bisher bekannte Mechanismen begründet: Besetzung von Bindungsstellen auf der Magen-Darm-Schleimhaut durch Probiotika zur Hemmung der Ansiedlung von Pathogenen; Freisetzung antibakteriell wirksamer Fermentations- und Stoffwechselprodukte wie Milchsäure, kurzkettige Fettsäuren und Wasserstoffperoxid zur pH-Senkung im Darm [Mohan et al., 2008]; Absorption und Verstoffwechslung gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte im Darm; mögliche Verstärkung der Barrierewirkung der Darmwand zur Hemmung der Ausbreitung pathogener Mikroorganismen im Körper, immunmodulatorische Wirkung durch direkte Interaktion mit dem darmassoziierten Immunsystem (GALT) [de Vrese, 2008].

Die **Sicherheit von Probiotika** ist insbesondere bei der Verwendung für immunsupprimierte Patientengruppen (Frühgeborene, onkologische Patienten unter Chemotherapie, operierte Patienten) entscheidend: In experimentellen Studien sollte das Vorhandensein von Virulenzfaktoren, das Vorliegen von Enzymen, welche Prokanzerogene in Kanzerogene umwandeln können, die mögliche Übertragung von Resistenzgenen, die Möglichkeit einer Infektion des Patienten und die Produktion gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte geprüft und ausgeschlossen worden sein. Die verwendeten Mikroorganismen sollten molekularbiologisch eindeutig zuzuordnen sein, um auch bei Komplikationen den ursächlichen Keim eindeutig zu identifizieren [Borriello et al., 2003; de Vrese, 2008; Snyderman, 2008].

Die Wirkung und Sicherheit eines Synbiotikums (aus mehreren verschiedenen Laktobazillensstämmen und Prebiotika) wurde in zwei Pilotstudien an **Patienten mit schwerer akuter Pancreatitis** untersucht: Die Verumgruppe der ersten Studie zeigte eine signifikant geringere Inzidenz von SIRS (kurz für: Systemic Inflammatory Response Syndrome) und Multiorganversagen, weniger Patienten waren von Komplikationen betroffen und erlitten deutlich seltener ein spätes Organversagen [Olah et al., 2007]. Die zweite Studie, eine Metaanalyse zum Einsatz von Probiotika bei Intensivpatienten, nach großen Abdominaloperationen, nach

Lebertransplantation, schweren Polytraumen oder schwerer Pankreatitis ergab einen signifikanten Rückgang der infektiösen Komplikationen (9 von 14 Studien) nach probiotischer Therapie [van Santvoort et al., 2008]. Eine weitere randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde klinische Studie zum präventiven Einsatz eines probiotischen Präparats (mehrere verschiedene Stämme: Bifidobakterien, Laktobazillen, Laktokokken) bei 298 Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis zeigte dagegen eine **fast identische Häufigkeit von infektiösen Komplikationen in beiden** Gruppen. Zusätzlich traten in der **Verumgruppe signifikant mehr Todesfälle** auf als in der Kontrollgruppe [Besselink et al., 2008]. Es ist zu erwähnen, dass in den Gewebeproben der von Infektionen betroffenen Patienten keine Bakterien nachgewiesen wurden, die im verwendeten Mischpräparat enthalten waren. Trotz Randomisierung war die Häufigkeit von Pankreasparenchymnekrosen in der Verumgruppe schon zu Studienbeginn erhöht. Es war jedoch vor Studienbeginn keine eingehende Sicherheitsprüfung des probiotischen Präparates erfolgt. Dies war möglicherweise dadurch begründet, dass nicht alle Probiotika als Arzneimittel, sondern als Nahrungsergänzungsmittel gelten. Deshalb sollte der Einsatz von Probiotika auch innerhalb klinischer Studien erst nach Arzneimittelprüfung und Untersuchung an Gesunden erfolgen. Für die Verwendung von Probiotika bei Pankreatitis sind weitere Studien erforderlich, da die bisherigen Ergebnisse Widersprüche aufzeigten. Zur Frage, ob **Probiotika nach oraler Applikation** in den Blutkreislauf gelangen und **septische Krankheitsbilder** verursachen können, existieren Untersuchungen für einige Stämme. Die bakterielle Translokation durch die Darmschleimhaut und Invasion des Blutkreislaufes ist auch vom Zustand des Wirtsorganismus abhängig: Verletzungen des Darms, Infektionen und Immundefizienz schwächen die Barrierefunktion der Darmschleimhaut [de Vrese, 2008]. Eine Studie in Finnland untersuchte 3317 Blutkulturen der Region Südfinnland über einen Zeitraum von vier Jahren auf Laktobazillen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war der orale Konsum von Laktobazillen über fermentierte Milchprodukte in der finnischen Bevölkerung weit verbreitet. Die Studie ergab einen Nachweis von Laktobazillen in 0,24 % der angelegten Blutkulturen. Von diesen acht Patienten hatten fünf schwerwiegende Grunderkrankungen, welche sie für Bakteriämien prädisponierten. Es gab keine Hinweise, dass die nachgewiesenen Laktobazillen ursächlich für Infektionen waren, jedoch konnten selten Assoziationen des Nachweises von Laktobazillen mit septischen Infektionen festgestellt werden [Saxelin et al., 1996]. Für *Lactobacillus rhamnosus* GG (im weiteren LGG) wurden ebenfalls selten Septikämien [Land et al., 2005; Salminen et al., 2004] beschrieben. Trotz zunehmendem Einsatz von Laktobazillen als Probiotikum ist es jedoch in Finnland nicht zu einem Anstieg der Inzidenz von LGG-Septikämien gekommen [Salminen et

al., 2002].

Im Zusammenhang mit der Infektion eines zentralen Venenkatheters wurde bei einem zwei Monate alten ehemaligen **Frühgeborenen eine Sepsis** durch *Lactobacillus acidophilus* beschrieben [Thompson et al., 2001]. In einer anderen Falldarstellung wird von einem Patienten mit AIDS und Hodgkin-Lymphom berichtet, welcher nach Einnahme eines Probiotikums mit *Lactobacillus acidophilus* an einer septischen Lungenembolie verstarb. Im Thrombus sei *Lactobacillus acidophilus* nachweisbar gewesen. Dennoch steht nicht fest, ob das Probiotikum als ursächlich für die Entstehung der Lungenembolie zu betrachten war. Es sind bei sehr verbreiteter Verwendung dieses Präparats keine weiteren Fälle von septischer Lungenembolie bekannt [Ledoux et al., 2006].

Für *Saccharomyces boulardii* wurden u. a. für zwei Neugeborene Septikämien beschrieben. Dabei wurde ein Kind selbst nicht probiotisch mit *Saccharomyces* behandelt und erlitt die Infektion durch Übertragung vom zweiten Patienten [Perapoch et al., 2000].

Zusammenfassende **Beurteilungen** der Sicherheit von **Laktobazillen und Bifidobakterien verneinen** aktuell hinsichtlich der bisher verwendeten probiotischen Laktobazillen und Bifidobakterien eine **Gefahr für alle Altersgruppen und auch immunkompromittierte Patienten**. Es wird darauf hingewiesen, dass weiterhin Aufmerksamkeit hinsichtlich des seltenen Auftretens von Infektionen, die durch Probiotika verursacht wurden, geboten ist. In klinischen Studien sollte die Sicherheit neuer Probiotika kritisch geprüft werden [Borriello et al., 2003; Snyderman, 2008].

1.1.1 Aktuelle Anwendungen von Probiotika in der Pädiatrie

Zur medizinischen Anwendung von Probiotika ist festzustellen, dass sich die zahlreichen verschiedenen Probiotika in ihren Wirkungen auf den menschlichen Organismus zum Teil erheblich unterscheiden. Dies kann auch für verschiedene Spezies der gleichen Gattung gelten [Kopp, 2008]. Daher sind die genannten wissenschaftlichen Erkenntnisse immer auf die betreffenden Mikroorganismen zu beziehen [Deshpande et al., 2010].

1.1.1.1 Allergische Erkrankungen

Nach aktuellen Erkenntnissen können Probiotika nicht als Primärprävention oder Therapie für atopische Erkrankungen empfohlen werden [Prescott und Bjorksten, 2007], da die vorliegenden Studien keine eindeutig präventiven Effekte zeigten oder positive Effekte in Folgestudien nicht mehr nachweisbar waren. So konnte der therapeutische Effekt von *Lactobacillus GG* und *Bifidobacterium lactis Bb-12* bezüglich der **atopischen Dermatitis** [Isolauri et al., 2000] in den nachfolgenden klinischen Untersuchungen nicht reproduziert werden [Kopp et al., 2008]. Zusätzlich wurden in den bisherigen Studien auch nachteilige

Effekte der Behandlung mit Probiotika festgestellt, wie z. B. eine signifikant häufigere Sensibilisierung gegen Kuhmilchprotein nach Gabe von *Lactobacillus acidophilus* in den ersten sechs Lebensmonaten [Taylor et al., 2007]. Auch diese Erkenntnisse müssen in Folgestudien validiert werden. Die vergleichende Beurteilung wird bisher durch die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Probiotikum und Immunsystem, die Übertragbarkeit experimenteller Erkenntnisse auf den klinischen Einsatz sowie die Vielzahl unterschiedlicher Probiotika erschwert [Prescott und Bjorksten, 2007].

1.1.1.2 Gastrointestinale Erkrankungen

Der Einsatz von Probiotika bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erschien aufgrund der antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte vielversprechend: In mehreren randomisierten kontrollierten Studien wurde eine vergleichbare Wirksamkeit von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 (im Weiteren abgekürzt als EcN) und 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin) zur Remissionserhaltung bei erwachsenen Colitis-ulcerosa-Patienten festgestellt [Kruis et al., 2004; Rembacken et al., 1999]. Eine italienische Studie untersuchte den Remissionserhalt bei neu diagnostizierter **Colitis ulcerosa** an 29 pädiatrischen Patienten: Das probiotische Kombinationspräparat VSL#3® (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) [Actial Farmaceutica 2009] wurde zusätzlich zur Standardtherapie verabreicht. 92,8 % der probiotisch behandelten Patienten erreichten die Remission, im Unterschied zu nur 36,4 % in der Placebogruppe ($p < 0,001$). Auch Rückfälle kamen in der Probiotikagruppe seltener vor [Miele et al., 2009]. Zur Prophylaxe einer Pouchitis nach totaler Kolektomie bei Colitis ulcerosa gibt es keine Studien für pädiatrische Patienten. In einer randomisierten kontrollierten Studie zur Remissionserhaltung bei **Morbus Crohn** im Kindesalter konnte LGG, zusätzlich zur Standardtherapie gegeben, keine Verlängerung der Remission bewirken [Bousvaros et al., 2005]. Eine australische Studie ergab andererseits, dass 78 % der Kinder mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung bereits Probiotika einnehmen. Es wird vermutet, dass Eltern auf der Suche nach nebenwirkungsarmen alternativen Therapien auch Probiotika einsetzen [Day et al., 2004].

Die Verwendung von Probiotika bei **akuten infektiösen Durchfallerkrankungen** basiert auf dem Modell der Verdrängung von pathogenen Mikroorganismen durch die probiotischen Bakterien und auf gesundheitsfördernden Effekten der Probiotika im Darm: Eine große europäische Multicenterstudie stellte nach oraler Gabe von LGG eine signifikant kürzere Dauer der Gastroenteritis (14 Stunden) sowie kürzere Dauer (3,3 Tage vs. 4 Tage) eines

assoziierten stationären Aufenthaltes fest [Guandalini et al., 2000]. Es scheint eine Dosisabhängigkeit der probiotischen Wirkung von Laktobazillen zu bestehen: die orale Applikation von $> 10^{10}$ bis 10^{11} CFU (colony forming units) in den ersten 48 Stunden war am effektivsten [Fang et al., 2009; Van Niel et al., 2002]. Trotz methodischer Unterschiede und der verschiedenen verwendeten probiotischen Mikroorganismen stellten mehrere Metaanalysen eine signifikante Verringerung der mittleren Durchfalldauer (im Mittel um einen Tag) nach Einsatz von Probiotika fest [Allen et al., 2010; Szajewska et al., 2007; Van Niel et al., 2002]. LGG wurde in diesen Studien am häufigsten als Probiotikum eingesetzt, ohne dass bei immunkompetenten Patienten Nebenwirkungen beschrieben wurden.

Infektiöse Durchfallerkrankungen sind nach Pneumonien die weltweit zweithäufigste Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren. 80 % der Todesfälle im Zusammenhang mit Gastroenteritis entfallen auf Afrika und Südostasien: Daher ist der präventive und therapeutische **Einsatz von Probiotika in Entwicklungsländern** eine aussichtsreiche Möglichkeit, die Inzidenz dieser Erkrankung zu reduzieren. Bisherige Studien ergaben widersprüchliche Ergebnisse: Indische Kinder, die präventiv *Lactobacillus casei Shirota* erhalten hatten, erkrankten signifikant seltener an Diarrhö [Sur et al., 2011]. Bei der Therapie indischer und peruanischer Kinder mit akuter Diarrhö konnte LGG jedoch keine signifikanten Effekte erzielen [Basu et al., 2007; Salazar-Lindo et al., 2004].

Zusammenfassend kann von einer **moderaten therapeutischen Wirkung von Probiotika bei akuten infektiösen Gastroenteritiden** ausgegangen werden. Zur möglichen prophylaktischen Wirkung sind weitere Untersuchungen erforderlich [Liptay und Burdach, 2008]. Der Einsatz von Probiotika zur **Prophylaxe der antibiotikaassoziierten Diarrhö** kann bei noch uneinheitlichen Studienergebnissen **nicht empfohlen** werden, es gibt jedoch Hinweise für die mögliche Wirkung von z. B. hoch dosiertem LGG [Johnston et al., 2007].

Im Unterschied zu Untersuchungen an Erwachsenen konnte bei pädiatrischen Patienten bisher keine Wirksamkeit von Probiotika (LGG) bei der Behandlung von **funktionellen Bauchschmerzkrankungen** [Bausserman und Michail, 2005] oder **funktioneller Obstipation** [Banaszkiewicz und Szajewska, 2005] nachgewiesen werden.

1.1.2 Probiotika in der Neonatologie

Extrem unreife Frühgeborene haben im Gegensatz zu den meisten reifen Kindern frühen Kontakt zu pathogenen Bakterien der Krankenhausflora. Die Besiedlung des zur Geburt sterilen Gastrointestinaltraktes unterscheidet sich durch den unreifebedingt verzögerten Nahrungsaufbau von reifen Neugeborenen und wird durch antibiotische Therapien gestört. Die **frühe Kolonisation des Darms mit pathogenen Keimen** ist möglicherweise ein Faktor

für die Entwicklung einer **nekrotisierenden Enterokolitis** (im Weiteren NEC), welche mit einer hohen Mortalität und Einschränkung der weiteren Lebensqualität einhergeht. Zusätzliche Faktoren, welche die Entwicklung einer NEC vermutlich beeinflussen, sind strukturelle Unreife, verminderte Immunkompetenz, Mucosaschaden (z. B. durch übermäßigen Proteingehalt der enteralen Nahrung, Medikamente) und Hypoperfusion des Gastrointestinaltraktes (z. B. durch Asphyxie, offenen Ductus arteriosus) [Obladen et al., 2006: 313-314]. Durch eine gezielte Besiedlung des Magen-Darm-Traktes mit gesundheitsfördernden probiotischen Bakterien in den ersten Lebensstagen soll die Häufigkeit der NEC und anderer systemischer Infektionen reduziert werden.

Es existieren bereits zahlreiche Studien zu dieser Fragestellung: **Problematisch** für den **Vergleich** einzelner Untersuchungen ist, dass sich die **verwendeten Probiotika unterscheiden** (Stamm, Dosierung, Therapiedauer), sodass nur Vergleiche zumindest verwandter Stämme bei identischen Studienbedingungen (z. B. Ernährungsregime) und Patientenkollektiven (z. B. Gestationsalter) sinnvoll sind. Weiterhin stellt sich nach den aktuellen Berichten über mögliche Sepsisfälle durch Probiotika die Frage nach der Sicherheit von probiotischen Präparaten.

Einige Studien zeigten, verglichen mit bekannten Werten, eine deutlich abweichende Mortalität und NEC-Inzidenz der Stichprobe, wodurch Verzerrungseffekte hinsichtlich der Wirksamkeit der Therapie entstehen können. Im Hinblick auf die relativ **geringe aktuelle Inzidenz der NEC in Deutschland** von 3,15 % [Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, 2009] sind große Patientengruppen erforderlich, um signifikante Effekte darzustellen. Bei einer angenommenen Reduktion der NEC-Inzidenz um 50 % durch das Probiotikum sind bei einer durchschnittlichen NEC-Inzidenz von 5 % für eine entsprechende Studie jeweils 792 Patienten in der Verum- und Placebogruppe erforderlich [Mihatsch und Pohlandt, 2010]. Dies konnte bisher nicht realisiert werden, da Frühgeborene unter 1500 g in den meisten Zentren eine kleine Patientengruppe darstellen. In Multicenterstudien können größere Fallzahlen erreicht werden. Dies würde jedoch Unterschiede der lokalen Bedingungen (Mitarbeiter, Ausstattung, Labormethoden, Therapiestandards) der einzelnen Zentren bedeuten.

Die aktuelle **Metaanalyse von Guthmann** [Guthmann et al., 2010] berücksichtigte insgesamt 2193 Frühgeborene (davon erhielten 1117 Probiotika) mit einem Gestationsalter von maximal 36 6/7 Wochen und ergab eine signifikante Reduktion des relativen Risikos einer NEC (Bell-Stadium ≥ 2) auf 0,35 (95 % CI 0,23 – 0,55) sowie der Mortalität auf 0,41 (95 % CI 0,28 – 0,60) für die Verumgruppen. Hervorzuheben ist, dass bei 70 % der berücksichtigten Studien das mittlere Geburtsgewicht unter 1250 g lag. Es wurde ein **Vorteil für die Behandlung mit**

Kombinationspräparaten gegenüber Monopräparaten sowohl für die Reduktion der NEC-Inzidenz als auch der Mortalität festgestellt. Zur Vermeidung einer NEC mussten 16 Patienten (Gruppe A: aktuellste zwei Studien), 26 Patienten (Gruppe B: drei in allen bisherigen Metaanalysen berücksichtigte Studien) bzw. 61 Patienten (Gruppe C: Zusammenfassung von sechs Studien mit vermutlich schwacher Aussagekraft) prophylaktisch probiotisch behandelt werden. Die „Number needed to treat“ (im Weiteren NNT) zur Vermeidung von Todesfällen war in allen drei Untergruppen ähnlich mit 18 (A), 19 (B) und 21 (C) Patienten. In den einzelnen Studien wurden unterschiedliche Probiotika verwendet. *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 wurde in keiner Studie dieser Metaanalyse eingesetzt. Das in den Studien der Metaanalyse am häufigsten verwendete Mischpräparat aus *Bifidusbacterium spp.* und *Lactobacillus acidophilus* ergab in einer gesonderten Analyse ebenfalls eine Reduktion der NEC-Inzidenz (0,29, 95 % CI 0,15 – 0,56) und der Mortalität (0,31, 95 % CI 0,17 – 0,57). Für die probiotisch behandelten Patienten dieser Metaanalyse wurden keine Nebenwirkungen beschrieben, es wurden **keine Septikämien** festgestellt. Daher wird der prophylaktische Einsatz von Probiotika als sicher und wirksam für Frühgeborene unter 1500 g erachtet. Bei **niedrigen NNTs für Reduktion der NEC-Inzidenz und Mortalität** sollte der Beginn einer prophylaktischen Probiotikatherapie aller Frühgeborenen von der lokalen NEC-Inzidenz und Mortalität dieser Patienten abhängig gemacht werden.

Die aktualisierte **Metaanalyse von Deshpande** [Deshpande et al., 2010] betrachtete insgesamt 2176 Frühgeborene unter 1500 g (11 Studien) und zeigte eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz (0,35, 95 % CI 0,23 – 0,55) und der Mortalität (neun Studien: 0,42, 95 % CI 0,29 – 0,62) nach Applikation von Probiotika. Die NNT zur Verhinderung einer NEC betrug 25, zur Verhinderung eines Todesfalls 20 Patienten. Für das **Risiko des Auftretens einer Spätinfektion** (10 Studien) konnten **keine signifikanten Unterschiede** (0,98, 95 % CI 0,81 – 1,18) zwischen Verum- und Kontrollgruppe gefunden werden. Die Studien waren diesbezüglich allerdings signifikant heterogen. Die Zeit bis zum Erreichen vollständiger enteraler Ernährung (fünf Studien: 120 – 150 ml/ kg/ d) war nach Behandlung mit Probiotika signifikant kürzer (-5,03 Tage, 95 % CI -5,62 – - 4,44) als in der Kontrollgruppe. Die Studien waren dahingehend ebenfalls signifikant heterogen. In dieser Metaanalyse wurden als Probiotika hauptsächlich Laktobazillen und Bifidusbakterien sowie in einer Studie *Saccharomyces boulardii*, in einer weiteren Studie *Streptococcus thermophilus* verwendet. *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 wurde in keiner Studie dieser Metaanalyse eingesetzt. Es konnten keinerlei Nebenwirkungen und **insbesondere keine Septikämien durch Probiotika** in den berücksichtigten Studien festgestellt werden. Aufgrund der geringen

NNTs für die Reduktion der NEC-Inzidenz und Mortalität betrachten die Autoren es als unethisch, in einer erneuten placebokontrollierten Studie (bei einem bereits untersuchten Probiotikum) der Placebogruppe die Vorteile des Probiotikums vorzuenthalten. Die Autoren schlussfolgern, dass eine **routinemäßige Therapie mit Probiotika bei Frühgeborenen unter 1500 g begonnen werden kann**. Dabei sollten sichere und geeignete probiotische Präparate verwendet werden. Ein engmaschiges Monitoring sollte Nebenwirkungen und nachteilige Effekte erfassen. Dazu muss das Probiotikum eindeutig identifizierbar sein. Dennoch sind für die Anwendung von Probiotika bei ELBW (extreme low birthweight infants: < 1000 g Geburtsgewicht) - Patienten und das Langzeitoutcome (u. a. neurologische Entwicklung) weitere Daten erforderlich.

Die **Metaanalyse von AlFaleh** [Alfaleh und Bassler, 2008] berücksichtigte 1425 Frühgeborene unter 2500 g (neun Studien). Die orale Gabe von Probiotika bewirkte eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz (0,32, 95 % CI 0,17 – 0,60) und der Mortalität (0,43, 95 % CI 0,25 – 0,75). Es konnte **kein signifikanter Effekt für das Auftreten einer nosokomialen Sepsis** festgestellt werden (0,93, 95 % CI 0,73 – 1,19). **Systemische Infektionen** mit den verwendeten **Probiotika wurden für keinen Patienten** beschrieben. Als Probiotika wurden in dieser Metaanalyse hauptsächlich Laktobazillen und Bifidusbakterien sowie in einer Studie *Saccharomyces boulardii*, in einer weiteren Studie *Streptococcus thermophilus* verwendet. *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 wurde in keiner Studie dieser Metaanalyse eingesetzt. Die NNT zur Verhinderung eines Todesfalls, wie auch zur Verhinderung einer NEC, betrug jeweils 25 Patienten. Hinsichtlich der neurologischen Entwicklung der Kinder waren keine Daten erhoben worden. Eine gesonderte Betrachtung von ELBW-Patienten der einbezogenen Studien war nicht möglich. Die Autoren schlussfolgern, dass Folgestudien die weitere Entwicklung der Patienten hinsichtlich später Effekte der Probiotika z. B. auf das Immunsystem und die neurologische Entwicklung untersuchen sollten. Nebenwirkungen, wie Infektionen durch probiotische Mikroorganismen bei Risikopatienten, seien noch nicht ausreichend untersucht. Daher kann zum **Einsatz von Probiotika bei ELBW-Patienten keine Aussage getroffen** werden.

Die **Metaanalyse von Mihatsch** [Mihatsch, 2008] verglich je nach Zielkriterium zwei bis fünf Studien mit maximal 1375 Frühgeborenen (< 1500 g oder < 30 Schwangerschaftswochen). Die orale Gabe von probiotischen Mono- oder Kombinationspräparaten aus Laktobazillen, Bifidusbakterien und *Streptococcus thermophilus* konnte eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz (fünf Studien: 0,32, 95 % CI 0,16 – 0,66), eine signifikante Verringerung der Mortalität (vier Studien: 0,49, 95 % CI 0,31 – 0,77), jedoch **keinen signifikanten Effekt**

hinsichtlich der Sepsisinzidenz mit positiver Blutkultur (fünf Studien: 0,83, 95 % CI 0,64 – 1,07) feststellen. *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 wurde in keiner Studie dieser Metaanalyse eingesetzt. Die NNT zur Verhinderung einer NEC betrug 28, zur Vermeidung eines Todesfalls 21 Patienten. Zur Geschwindigkeit des enteralen Nahrungsaufbaus konnten nur zwei Studien verglichen werden: Tendenziell ergab sich eine nicht signifikante Verkürzung der Zeitdauer bis zur vollständigen enteralen Ernährung in den Probiotikagruppen (-2,45 Tage, 95 % CI -5,08 – 0,18). Die Autoren stellten fest, dass die **Probandenzahlen** der einzelnen Studien im **Hinblick auf die NEC-Inzidenz** (Bell-Stadium ≥ 2) **zu gering** waren, sodass **keine der Arbeiten eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz** durch das verwendete Probiotikum **beweisen** kann. Aufgrund der vielfältigen Ursachen für eine neonatale Sepsis erachten die Autoren es als plausibel, dass Probiotika die Sepsisinzidenz nicht beeinflussen. In **keiner der Studien** dieser Metaanalyse wurden **negative Effekte der probiotischen Präparate** beschrieben. Dennoch sollten Probiotika erst nach separater Prüfung der Sicherheit jedes einzelnen Stammes, auch im Hinblick auf Langzeiteffekte, als Standardtherapie bei Frühgeborenen verwendet werden. Daher kann zum Zeitpunkt dieser Metaanalyse (2008) **keine Empfehlung zur routinemäßigen Verwendung** eines bestimmten Probiotikums gegeben werden.

Die **aktualisierte Metaanalyse von Mihatsch und Pohlandt** [Mihatsch und Pohlandt, 2010] verglich 10 Studien (2208 Patienten) zum Einsatz von Probiotika bei Frühgeborenen unter 37 Schwangerschaftswochen (zwei Studien) bzw. unter 1500 g (acht Studien). Lediglich zwei Studien [Mihatsch et al., 2010; Rouge et al., 2009] erfüllten alle methodischen Kriterien für eine gut geplante randomisierte kontrollierte Studie. Beide konnten keine signifikant positiven Effekte des Probiotikums nachweisen. Wie in der Metaanalyse von 2008 ergeben sich insgesamt eine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz (0,34, 95 % CI 0,21 – 0,55), eine signifikante Reduktion der Mortalität (0,46, 95% CI 0,32 – 0,66), **kein signifikanter Effekt hinsichtlich der Inzidenz der Sepsis** mit positiver Blutkultur (neun Studien) und der Geschwindigkeit des Nahrungsaufbaus (fünf Studien). Neu war in dieser Metaanalyse die gesonderte Betrachtung von Studien mit Monopräparaten gegenüber denen mit Kombinationspräparaten (jeweils fünf Studien): Beide hatten einen signifikanten Effekt auf die Reduktion der NEC-Inzidenz, jedoch bewirkten nur die **Kombinationspräparate eine signifikante Reduktion der Mortalität**. Die getrennte Betrachtung von Studien mit *Lactobacillus rhamnosus GG* (zwei Studien) und *Bifidobacterium lactis Bb12* (drei Studien) ergab jeweils keine signifikante Reduktion der NEC-Inzidenz. In **keiner der Studien** der aktualisierten Metaanalyse wurden **negative Effekte der Probiotika** beschrieben.

1.2 *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917

Escherichia coli Stamm Nissle 1917 wurde im Jahr 1917 durch den Freiburger Hygieniker und Bakteriologen Prof. Dr. med. Alfred Nissle entdeckt [Schulze et al., 2006]. Er untersuchte die Wechselwirkungen physiologischer Darmbakterien mit bakteriellen Infektionserregern in dem von ihm entwickelten Antagonismus-Test [Nissle, 1916]: Dabei wurden Reinkulturen der beiden Erregerstämme gemeinsam in Flüssigkultur gezüchtet. Anschließend wurden die Proben auf Festnährböden übertragen und die Keimzahlen der beiden Erregerstämme bestimmt. Die Stärke der „antagonistischen Aktivität“ des physiologischen Darmbakterienstammes ergab sich aus der Fähigkeit, das Wachstum des pathogenen Darmbakteriums zu hemmen. Nissle entwickelte einen Index, der einen Vergleich der antagonistischen Aktivität verschiedener Stämme ermöglichte: Im Rahmen dieser Untersuchungen **isolierte er einen *E. coli* Stamm von „ausgeprägter antagonistischer Stärke“** aus den Fäzes eines Unteroffiziers des ersten Weltkrieges: Dieser habe „im Gegensatz zur großen Mehrzahl seiner Kameraden weder an Ruhr noch an anderen Darmkrankheiten gelitten“ [Nissle, 1925]. Nach Selbstversuchen und Tests an gesunden Personen therapierte Nissle versuchsweise Patienten mit infektiöser Diarrhöe (z. B. Shigellen-Ruhr), postdysenterischen Darmfunktionsstörungen und chronischer habitueller Obstipation. Nissle war nach diesen Einzelfallversuchen von der klinischen Wirksamkeit der Kolikulturen überzeugt: Er züchtete aus der Stammkultur auf Festagarplatten Bakterien und füllte diese in Hartgelatine kapseln. Unter dem Namen Mutaflor® wurde das neue Arzneimittel 1917 als Warenzeichen geschützt. Der enthaltene *Escherichia coli*-Stamm erhielt später die Bezeichnung *E. coli* Stamm Nissle 1917.

1.2.1 Charakteristik *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917

Escherichia coli Stamm Nissle 1917 gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Serotyp O6:K5:H1). Die Analyse der Genomstruktur und der Vergleich mit anderen apathogenen und pathogenen *E. coli*-Stämmen ergab das **Fehlen von Virulenzfaktoren** (genetische Stabilität, stammtypische stabile [Hawkey und Snelling, 1998], nicht übertragbare Plasmide ohne Antibiotikaresistenzgene [Blum-Oehler G, 2001: 23-31], keine Produktion von Enterotoxinen, Hämolytinen, Invasinen oder Zytotoxinen, keine P-Fimbrien, Serumsensitivität [Grozdanov et al., 2002]) in Verbindung mit **mehreren Fitnessfaktoren** (Eisenaufnahmesysteme, Fähigkeit bei 37°C Biofilme [Hancock et al., 2010] zu bilden, Bildung von Mikrozininen), welche die erfolgreiche Besiedlung des Gastrointestinaltraktes ermöglichen [Grozdanov et al., 2004; Schulze et al., 2006].

Untersuchungen von spezifischen EcN-Mutanten hinsichtlich der **Bildung von Biofilmen** und Persistenz im Magen-Darm-Trakt [Lasaro et al., 2009] haben jedoch auch ergeben, dass dieser

Stamm **F1C-Fimbrien** ausbildet, welche für dessen dauerhafte Kolonisation des Intestinaltraktes und Biofilmbildung entscheidend sind. F1C-Fimbrien sind neben anderen pathogen-spezifischen Fimbrien bekannte Pathogenitätsfaktoren der uropathogenen *E. coli*-Stämme (im Weiteren abgekürzt als UPEC). Ein Vergleich der genetischen Profile von EcN mit dem UPEC Stamm CFT073 ergab eine enge Verwandtschaft zwischen Pathogen und Probiotikum bei identischem Mechanismus der Biofilmbildung [Hancock et al., 2010]. Anhand dieser Erkenntnisse kann neben der probiotischen Wirksamkeit eine **zumindest potentielle Pathogenität nicht ausgeschlossen** werden. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit dem Nachweis von *E. coli* in Blutkulturen und Trachealsekret in der vorliegenden Studie von Bedeutung (5.10).

Als probiotischer Keim sollte EcN die Gesundheit des besiedelten Organismus fördern. Zu den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen auf das Immunsystem und pathogene Keime gibt es zahlreiche experimentelle und klinische Studien, wie im Folgenden ausgeführt wird.

1.2.1.1 Wechselwirkungen mit pathogenen Keimen

Frühere Studien hatten ergeben, dass *E. coli* das Wachstum pathogener Keime in vitro [Sonnenborn und Greinwald, 1991: 59-109] als auch im gnotobiotischen Tiermodell [Schulze et al., 1992] signifikant hemmen kann.

In aktuellen Experimenten an mit EcN kolonisierten Mäusen wurde das Wachstum eines nachträglich applizierten pathogenen EHEC-Stammes (Abkürzung für: enterohämorrhagische *Escherichia coli* mit der Fähigkeit Shigatoxine zu bilden) bis zur Elimination dieses Stammes gehemmt, während es bei Mäusen, die mit anderen *E. coli*-Stämmen kolonisiert worden waren, teilweise sogar gefördert wurde [Leatham et al., 2009].

Untersuchungen von mit EHEC-Erregern angereicherten Stuhlproben zeigten, dass EcN das EHEC-Wachstum und die Produktion des Shigatoxins deutlich einschränkte. Diese Effekte konnte man in Experimenten mit anderen Probiotika (*Bacillus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*) nicht beobachten [Reissbrodt et al., 2009]. In der Zellkultur humaner intestinaler Epithelzellen bewirkte EcN eine Reduktion der Invasion verschiedener enteroinvasiver Bakterien [Altenhoefer et al., 2004]. Somit kann **ein präventiver Effekt von EcN gegenüber pathogenen Bakterien vermutet** werden.

1.2.1.2 Antiinflammatorische Effekte

In experimentellen Studien an Mäusen konnte die **lokale und systemische antiinflammatorische Wirkung** von oral appliziertem EcN festgestellt werden [Arribas et al., 2009]. Weiterhin konnte im Mausmodell sowohl für die akute als auch chronische Inflammation ein

präventiver Effekt von oral applizierten, vitalen EcN gezeigt werden. Diese Effekte waren jedoch auch in vergleichenden Untersuchungen mit avitalen EcN bzw. EcN-DNA nachweisbar [Kamada et al., 2005]. Die antientzündlichen Effekte von EcN werden bereits therapeutisch bei „leichter bis mittelgradiger Aktivität der Colitis ulcerosa“ bei Erwachsenen eingesetzt [Riemann, 2004, in Überarbeitung]. Eine randomisierte Studie ergab die vergleichbare Wirksamkeit von EcN gegenüber Mesalazin hinsichtlich des Remissionserhalts [Rembacken et al., 1999].

1.2.1.3 Immunmodulatorische Wirkungen

Nach oraler Kolonisation von Früh- und Neugeborenen mit EcN wurden signifikant höhere Spiegel von spezifischem IgA und IgM im Serum im Vergleich zur Placebogruppe gemessen [Lodinová-Žadniková et al., 1992]. Weitere Studien zeigten, dass EcN das Immunsystem bei Früh- und Neugeborenen beeinflusst (Abschnitt 1.2.3). Zum Nachweis einer protektiven oder immunstimulatorischen Wirkung sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Damit erfüllt EcN die WHO-Kriterien für ein probiotisches Bakterium [WHO, 2002].

1.2.2 *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 in der Pädiatrie

Im Rahmen der Therapie der **akuten Diarrhö** (Dauer zu Therapiebeginn < drei Tage) konnte EcN die Durchfalldauer bei 113 Kleinkindern (Alter: 2 – 47 Monate) im Vergleich zu Placebo signifikant um 2,3 Tage verkürzen [Henker et al., 2007]. Auch bei der protrahierten Diarrhö (Dauer zu Therapiebeginn 4-14 Tage) konnte für EcN bei 151 Kleinkindern (Alter: 1 – 47 Monate) eine signifikant überlegene (an Tag 14 und 21) Reduktion der Stuhlfrequenz gemessen werden [Henker et al., 2008].

Eine Pilotstudie zum Remissionserhalt bei **Colitis ulcerosa** an 35 Kindern (Alter: 11-18 Jahre) ergab Hinweise, dass unter EcN vergleichbare Rückfallquoten, wie bei der Erhaltungstherapie mit Mesalazin, auftreten [Henker et al., 2008].

1.2.3 *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 in der Neonatologie

In der Neonatologie wird EcN gemäß der Fachinformation [Ardeypharm, 2008] zur „Kolonisationsprophylaxe bei Früh- und Reifgeborenen“ und zur „Steigerung der postnatalen Immunkompetenz bei Früh- und Reifgeborenen“ eingesetzt. Die Verwendung für sehr unreife Frühgeborene (VLBW) wird aktuell nicht mehr empfohlen, da es in dieser Patientengruppe vereinzelt Sepsisfälle [Guenther et al., 2010] gab.

Bereits 1992 hatte Frau **Lodinová-Žadniková** die **Effekte von EcN auf das Immunsystem** Früh- und Reifgeborener untersucht: 22 Reif- und neun Frühgeborene erhielten in den ersten fünf Lebenstagen einmal täglich oral EcN-Suspension. Die Kontrollgruppe bildeten neun Frühgeborene. EcN konnte ab dem dritten Behandlungstag über den gesamten Studienverlauf

(21 Tage) im Stuhl der Kinder nachgewiesen werden. Die EcN-kolonisierten Patienten hatten signifikant höhere, für EcN spezifische IgM- und IgA-Titer im Stuhl und im Serum als in der Kontrollgruppe. Reife Kinder hatten höhere IgM- und IgA-Titer im Stuhl als Frühgeborene. Die spezifische Immunantwort hinsichtlich EcN war ausgeprägter als gegen einen Kontroll-*E. coli*-Stamm [Lodinová-Žadniková et al., 1992].

In einer **1997** veröffentlichten **Kolonisationsstudie** [Lodinová-Žadniková und Sonnenborn, 1997] an 54 Neugeborenen konnten nach oraler Gabe von EcN in den ersten fünf Lebenstagen im Vergleich zur Placebogruppe signifikant weniger pathogene Keime im Stuhl festgestellt werden: Nach fünf Tagen war EcN bei 93 % der behandelten Kinder im Stuhl nachweisbar. Am dritten und fünften Tag sowie nach sechs Monaten waren in der Placebogruppe bei signifikant mehr Kindern pathogene Keime im Stuhl nachgewiesen worden als in der EcN-Gruppe. Weiterhin zeigte sich, dass EcN eine ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonisation des Darms besitzt, da EcN noch sechs Monate nach Beendigung der Therapie bei 94 % der kolonisierten Kinder im Stuhl nachweisbar war. Möglicherweise aufgrund dieser starken Kolonisationsfähigkeit waren sechs Patienten der Placebogruppe mit EcN kontaminiert worden, da Neugeborene beider Gruppen in gemeinsamen Zimmern untergebracht waren. Nach sechs Monaten konnte EcN noch bei vier von fünf kontaminierten Patienten im Stuhl nachgewiesen werden. Es wurden keine nachteiligen Effekte von EcN festgestellt.

In einer Folgestudie wurde **2003** mithilfe eines Fragebogens und Messungen des spezifischen IgE die Häufigkeit der **Entwicklung von Allergien und Infektionen** bei 77 ehemaligen Frühgeborenen und 150 Neugeborenen untersucht, die postnatal mit EcN kolonisiert worden waren: Es konnten in der Verumgruppe nach 10 und 20 Jahren signifikant geringere Inzidenzen für Allergien, für Infektionen nur nach 10 Jahren festgestellt werden [Lodinová-Žadniková et al., 2003].

Eine randomisierte, placebokontrollierte, geblindete Studie untersuchte **2002** die **Proliferation von Blutzellen** als Reaktion auf bakterielle Antigene von EcN und einem anderen *E. coli*-Stamm im Vollblut nach **Kolonisation mit EcN** bei 61 Frühgeborenen. Die EcN-Gruppe zeigte eine signifikant stärkere Proliferation, sowohl nach Inkubation mit EcN-Antigen als auch mit dem fremden *E. coli*-Stamm, höhere Titer für EcN-spezifisches IgA und unspezifisches IgM im Blut als die Kontrollgruppe [Cukrowska et al., 2002].

2 Aufgabenstellung

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist, insbesondere bei Frühgeborenen unter 1500 g, eine gefährliche und potentiell lebensbedrohliche Erkrankung. Die postnatale Fehlbesiedlung des Darms mit pathogenen Bakterien kann eine Ursache für das Auftreten gastrointestinaler Infektionen mit der Folge einer NEC sein. Experimentelle und klinische Studien haben Hinweise ergeben, dass EcN das Immunsystem und die Darmflora auf mehreren Wegen beeinflusst. Unter anderem soll die präventive orale Applikation von EcN die Produktion von Antikörpern steigern und das Wachstum darmpathogener Keime hemmen.

1. Es stellt sich die Frage, ob die **Inzidenz der NEC** bei Frühgeborenen unter 1500 g nach präventiver Behandlung mit EcN sinkt.
2. Weiterhin soll festgestellt werden, ob die **Häufigkeit von Spätinfektionen** bei Frühgeborenen unter 1500 g durch die prophylaktische Behandlung mit EcN reduziert werden kann.
3. Zusätzlich ist zu prüfen, ob mit EcN probiotisch behandelte Frühgeborene unter 1500 g im Vergleich zu unbehandelten Patienten insgesamt besser **gedeihen, seltener eine antibiotische Therapie** benötigen und **kürzere Zeit stationär behandelt** werden müssen.
4. Abschließend soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß bei Frühgeborenen unter 1500 g **nachteilige Wirkungen von EcN** festgestellt werden können.

3 Methoden

3.1 Bearbeitung der Patientenakten

Der Ethikantrag mit der Nummer: S12/ 2008 erhielt von der Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg ein positives Votum. Nach Bewilligung des Datennutzungsantrages (Februar 2007) konnten mit Hilfe der Behandlungsstatistik der Kinderklinik die Patientencodes, Namen und Geburtsdaten aller **Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g aus den Jahren 2005 bis 2007** zusammengestellt werden. Die Bearbeitung der Patientenakten des ersten Krankenhausaufenthaltes erfolgte zwischen März 2007 und April 2008 im Krankenhausarchiv des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus. Bei fehlenden Informationen wurden für vier Patienten auch die Unterlagen der Mutter in die Auswertung einbezogen. Mögliche Namenswechsel der Kinder während des Erstaufenthaltes (z. B. durch Heirat der Eltern) mussten bei der Datenidentifikation Berücksichtigung finden.

3.2 Datenmaske

Die Datenmaske wurde vor der Datenerfassung als Excel-Tabelle (Microsoft® Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, Washington) erstellt. Diese enthält für jede zu erfassende Variable eine Spalte. Die Zeilen der Tabelle stehen für jeweils einen Patienten. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Anonymisierung der Daten.

3.2.1 EcN-Gruppe

In der EcN-Gruppe wurde die Therapie mit *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 durch drei Variablen charakterisiert: Der erste Parameter bezieht sich auf die Einhaltung der empfohlenen **Dosierung**: Ein Teil der Patienten erhielt zu Beginn der Therapie oder generell 0,5 ml Suspension pro Tag (empfohlene Standarddosierung: 1 ml Suspension pro Tag). Dies erklärte sich durch die Überlegung, dass einige Patienten ein sehr niedriges Geburtsgewicht hatten und die Menge von 1 ml Suspension teilweise einer kompletten Mahlzeit entsprach. Zur Vorbeugung einer möglichen Überdosierung haben diese Patienten in den ersten Lebenstagen oft nur 0,5 ml EcN pro Tag erhalten. Die zweite Hälfte der Lösung wurde entweder für ein anderes Kind verwendet oder im Kühlschrank für den nächsten Tag aufbewahrt. Im weiteren Verlauf und teilweise von Geburt an erhielten einige Patienten zweimal am Tag je 0,5 ml EcN. Auf diese Weise wurde die empfohlene Tagesdosierung auf zwei Medikamentengaben verteilt. Diese Praxis wurde trotz der Empfehlungen für die Kolonisation von Frühgeborenen mit EcN fortgesetzt, da sich im Verlauf der Anwendung der Verdacht auf mögliche Aspirationen von EcN ergab. Die gestaffelte oder reduzierte Applikation sollte diesem Problem vorbeugen. Es wurde erfasst, an welchem Lebenstag die Patienten welche Dosierung der EcN-Suspension erhalten hatten. Insbesondere in den ersten

Lebenstag wurde die EcN-Suspension zusammen mit der Nahrung per Magensonde verabreicht. Zweitens wurde dokumentiert, ob mindestens zweimal nach der letzten **Antibiotikatherapie** die Gabe von je 1 ml Suspension erfolgte. Traf dies nicht zu, so wurde der Name des oder der antibiotischen Präparate aufgenommen. Da EcN für zahlreiche Breitspektrumantibiotika sensibel ist, muss in diesen Fällen von einer reduzierten Wirksamkeit ausgegangen werden. Die dritte Variable beschreibt den Zeitpunkt des **Beginns der EcN-Therapie**, da ein Teil der Patienten das Medikament erstmalig nach dem fünften Lebenstag erhielt. Als Standardtherapie galt in dieser Studie die orale Applikation von je 1 ml EcN-Suspension vom ersten bis fünften Lebenstag.

3.2.2 Exposition

3.2.2.1 Variablen zur Geburt

In der Reihenfolge der Auswertung erhielt jeder Patient eine Bearbeitungsnummer, um eine Identifikation nach der Anonymisierung zu ermöglichen und gegebenenfalls Fehler bei der Datenexploration zurückverfolgen zu können. Weiterhin wurde das **Geburtsjahr**, der **Patientencode**, **Vor- und Nachname**, **Geburtsdatum**, **Geburtszeit**, **Geschlecht** und der Status „**Ein- oder Mehrling**“ erfasst. Letztere Angabe bezieht sich auf die Geburt und nicht auf die Anlage der Schwangerschaft. Ebenfalls dokumentiert wurden **Geburtsort**, **Geburtsgewicht**, **Geburtskopfumfang**, **Geburtslänge** und **Nabelschnur-pH-Wert** zur Geburt. Bis auf zwei Patienten, die man innerhalb der ersten 12 Lebensstunden nach Cottbus verlegt hatte, wurden alle Kinder im Carl-Thiem-Klinikum Cottbus geboren.

Da sich die Angaben zu den **APGAR**-Werten und der **Schwangerschaftswoche** zum Zeitpunkt der Geburt im Geburtsprotokoll und der Epikrise teilweise unterschieden, wurden die Werte im Geburtsprotokoll als maßgeblich betrachtet. Bei seltenen Fehlern, die aus dem Kontext erkennbar waren, wurde die wahrscheinlichere Angabe erfasst. Für die Datenanalyse musste die übliche Angabe von „Schwangerschaftswochen plus Tage“ in Dezimalzahlen umgewandelt werden. Dabei entspricht ein Tag 1/7 Woche.

Die Fragestellung, ob ein **vorzeitiger Blasensprung** vorlag, konnte zunächst nach zwei Kriterien beantwortet werden: Anhand der Zeit des Blasensprungs und der Geburtszeit wurde entschieden, ob der Blasensprung über 24 Stunden vor der Geburt erfolgte. Diese Angabe entspricht der Definition eines vorzeitigen Blasensprungs in Bezug auf die Infektionsgefährdung [Handrick et al., 1991: 244; Obladen et al., 2006: 522] und wurde für die Auswertung herangezogen. Laut Geburtsblatt stellte man jedoch auch häufig die Diagnose „vorzeitiger Blasensprung“, wenn er zwischen 15 Minuten und 24 Stunden vor der Geburt erfolgte. Diese Variable ist wegen der breiten Streuung und dem fehlendem Hintergrund der

Infektionsgefährdung in der Auswertung vernachlässigt worden. Als **Geburtsmodi** wurden „Spontangeburt“ und „Sectio caesarea“ unterschieden. Das Vorliegen eines **Amnioninfektionssyndroms** wurde dokumentiert, wenn es als Diagnose in der Epikrise oder dem Geburtsblatt aufgeführt war. Die Erwähnung einer parenteralen oder oralen **Tokolyse** in der Anamnese der Mutter wurde erfasst. Weiterhin wurde die **Fruchtwasserfarbe** nach den Kriterien „klar“, „grün“ oder „blutig“ unterschieden.

3.2.2.2 Diagnosen des Frühgeborenen

Fehlbildungen und angeborene Anomalien, die man im Verlauf des ersten Krankenhausaufenthaltes diagnostiziert hatte, wurden aufgenommen. Wegen der großen Varianz dieser Angaben und der sehr unterschiedlichen Beeinflussung des Gedeihens erfolgte hier keine statistische Analyse.

Hirnblutungen wurden einerseits als dichotomer Parameter nach dem Vorhandensein und andererseits nach dem vorliegenden Grad nach Papile (1-4) unterschieden. Fragliche Hirnblutungen mit der Differenzialdiagnose Plexuszyste wurden nicht als Hirnblutung erfasst. Ein **Atemnotsyndrom** wurde zunächst nach dem Vorhandensein als dichotomer Parameter und anhand des Thoraxröntgenbefundes vom Tag der Geburt nach Grad 1-4 klassifiziert. Wenn im Befund keine Zuordnung zum Grad des Atemnotsyndroms angegeben war, wurde diese nach der Stadieneinteilung des Atemnotsyndroms [Obladen et al., 2006: 180] vorgenommen: Von einem erstgradigen Atemnotsyndrom ist beim Vorliegen eines „feingranulären Lungenmusters“ auszugehen. Ein „über die Herzkonturen hinausreichendes Aerobronchogramm“ charakterisiert ein Atemnotsyndrom zweiten Grades. Unschärfe oder partielle Auslöschung der Herz- und Zwerchfellkonturen sind für ein drittgradiges Atemnotsyndrom typisch. Eine „weiße Lunge“ liegt bei einem Atemnotsyndrom vierten Grades vor. Die Diagnose „Atemnotsymptomatik“ ohne Thoraxröntgenbefund wurde nicht als Atemnotsyndrom dokumentiert. Wenn kein konkreter Grad, sondern ein Übergang (z. B. Grad 2-3) angegeben war, wurde der Wert als Zwischenstufe (z. B. hier Grad 2,5) für die Analyse aufgenommen. Ein Atemnotsyndrom ersten oder zweiten Grades erfordert in der Regel keine Intubation und Beatmung, wohingegen dies bei Grad drei und vier häufiger notwendig ist. Deshalb wurde in der Analyse unterschieden, ob kein Atemnotsyndrom vorlag, ob es Grad 1-2 oder Grad 2,5 bis 4 zuzuordnen war.

Die Diagnose **bronchopulmonale Dysplasie** (abgekürzt: BPD) wurde dokumentiert, wenn sie in der Epikrise aufgeführt war. Die NIH-Definition (National Institutes of Health, U. S. Department of Health and Human Services) besagt [Jobe und Bancalari, 2001], dass eine Einteilung der BPD nach der Behandlung mit mehr als 21 %igem Sauerstoff über 28 Tage,

bei Frühgeborenen unter 32 Schwangerschaftswochen zum Lebensalter von 36 Wochen oder zur Entlassung bzw. bei Frühgeborenen über oder gleich 32 Schwangerschaftswochen im Zeitraum zwischen dem 29. und dem 55. Lebenstag oder zur Entlassung erfolgt. Diese Erkrankung kann folglich nicht als Expositionsfaktor betrachtet werden, da sie erst lange Zeit nach dem angenommenen Wirkungsbeginn von EcN diagnostizierbar ist. Aus diesem Grund und dem geringen zu erwartenden Zusammenhang zu unserer Fragestellung wurde die Variable nicht in die Analyse einbezogen.

Apnoen und **Temperaturregulationsstörungen** wurden dokumentiert, wenn sie an mindestens einem Tag auftraten oder wenn sie als Diagnosen in der Epikrise aufgeführt worden waren. Zusätzlich definierten wir Temperaturregulationsstörungen als eine Schwankung der Inkubatortemperatur im Laufe des Tages um mehr als 2 °C als Reaktion auf die Körpertemperatur des Kindes. Durch die Vielzahl an Variablen wurden diese unspezifischen Parameter schließlich nicht zur Auswertung herangezogen.

Das Vorliegen einer **Retinopathia praematurorum** (abgekürzt: ROP) und ihr Ausprägungsgrad wurden erfasst. Aufgrund des geringen zu erwartenden Zusammenhangs zu unserer Fragestellung, wurde dieses Charakteristikum nicht weiter analysiert.

Ebenfalls als Parameter erfasst wurden die Diagnosen **nekrotisierende Enterokolitis** (NEC) oder beginnende nekrotisierende Enterokolitis. Dieses schwere Krankheitsbild des Frühgeborenen wird anhand der Einteilung nach Bell in drei Stadien untergliedert. Die Einteilung wurde von Walsh und Kliegman modifiziert: Dabei entspricht die Einschätzung „beginnende NEC“ dem Stadium Ia. In diesem Stadium liegen unspezifische Zeichen einer systemischen Infektion vor, es gibt Anhalt für Verdauungsstörungen bei geringgradiger abdomineller Distension mit noch regelrechtem oder unspezifischem radiologischem Befund. Stadium Ib entspricht weitgehend Ia, zusätzlich treten makroskopisch blutige Stühle auf. Stadium II bezeichnet die definitive NEC: IIa ist zusätzlich zu den Merkmalen von Ib durch fehlende Peristaltik und radiologisch Pneumatosis intestinalis gekennzeichnet. Das Abdomen ist eindeutig schmerzempfindlich. IIb zeigt zusätzlich eine metabolische Azidose, Thrombozytopenie, eventuell ein Erythem der Bauchwand sowie radiologisch portalvenöse Gasansammlung. Stadium III bezeichnet die fortgeschrittene NEC: IIIa mit intaktem Darm, Zeichen einer Sepsis, disseminierter intravasaler Koagulation, generalisierter Peritonitis, hochgradiger abdomineller Distension, Resistenz im rechten Unterbauch, radiologisch Aszites. IIIb mit Perforation, zusätzlich zu IIIa besteht ein Pneumoperitoneum. Die NEC betrifft in erster Linie Frühgeborene unter 1500 g Geburtsgewicht. Pathogenetisch wird ein Zusammentreffen von intestinaler Ischämie, Besiedlung mit pathogenen Keimen, intraluminalen Faktoren und

unzureichender lokaler Abwehr angenommen [Jorch und Arenz, 2010: 344-345].

Bei den Variablen Hirnblutung, Atemnotsyndrom, ROP und NEC wurde jeweils der maximale Ausprägungsgrad im Laufe des Erstaufenthaltes aufgenommen.

3.2.2.3 Laborwerte zur Geburt

Laboruntersuchungen sind ein wichtiges Hilfsmittel bei der Einschätzung neonataler Infektionen. Zusätzlich gibt der klinische Zustand des Kindes und die Anamnese wichtige Anhaltspunkte. Da Laborwerte allein nicht immer sichere Rückschlüsse erlauben, ob eine Infektion vorliegt bzw. ob man sie ausschließen kann, wurden zusätzlich die Parameter **Verdacht auf Frühinfektion** und **erwiesene Frühinfektion** aufgenommen. Unter einer Frühinfektion versteht man eine angeborene Infektion, welche im Mutterleib erworben wurde und in der Regel bis zum vierten Lebenstag symptomatisch wird [Handrick et al., 1991: 106-107]. Ein Verdacht auf Frühinfektion wurde angenommen, wenn das Kind aufgrund dieser Verdachtsdiagnose in den ersten vier Lebenstagen antibiotisch behandelt wurde. Eine erwiesene Frühinfektion wurde dokumentiert, wenn von den vier möglichen Parametern: Erregernachweis, pathologische Entzündungsparameter (Interleukin-6 = IL-6, CrP, Leukozyten), klinische Hinweise für eine Infektion, Diagnose in der Epikrise mindestens zwei erfüllt wurden. Zur Geburt wurden als Laborparameter erfasst: IL-6, CrP, Leukozyten, Thrombozyten.

Das **Interleukin-6** zur Geburt wurde einerseits als kontinuierlicher, andererseits als dichotomer Parameter $>$ oder $<$ 50 pg/ ml erfasst. Ein Interleukin-6 $>$ **50 pg/ ml** wurde als Infektionshinweis gedeutet. Diese Unterscheidung von IL-6-Werten kleiner und größer 50 pg/ ml orientiert sich an den Empfehlungen des klinisch-chemischen Labors des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus für die Anwendung dieses Parameters bei einem Infektionsverdacht. Diese Einteilung wird aktuell in der Neonatologie unseres Klinikums nicht mehr verwendet, da in Abstimmung mit dem Hersteller des Analysegerätes für IL-6 neue Referenzbereiche erstellt wurden: Dabei gilt ein **IL-6 $<$ 50 pg/ ml** als **praktisch sicherer Entzündungsausschluss** bei negativem CrP. Ein **IL-6 $<$ 150 pg/ ml** zeigt an, dass eine **Infektion unwahrscheinlich** ist, wenn das CrP negativ ist. Falls zusätzlich klinischer Anhalt für eine Infektion besteht, sollten Kontrolluntersuchungen erfolgen. Ein **Interleukin-6** im Bereich zwischen **150 und 300 pg/ ml** zeigt eine **mögliche Infektion** an, wenn zusätzlich klinische Symptome bestehen. Bei einem **IL-6 $>$ 300 pg/ ml** gilt eine **therapiebedürftige Infektion** als **sehr wahrscheinlich**. Interleukin-6 ist ein Zytokin, welches als physiologischer Hauptmediator der Akute-Phase-Reaktion u. a. stimulierend auf B-Zellen, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und Fibroblasten wirkt. Dieses Zytokin erreicht im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion nach

etwa zwei bis drei Stunden sein Maximum. Die biologische Halbwertszeit beträgt etwa eine Stunde. In weniger als vier Stunden ist es abgebaut [Biermann, 2006]. Aus diesem kurzen Zeitfenster ergibt sich die Möglichkeit, dass trotz des Vorliegens einer Infektion das IL-6 bereits wieder abgefallen ist und somit negativ erscheint. Daher müssen der klinische Zustand und das CrP (mit langsamerer Kinetik) mitberücksichtigt werden. Die Sensitivität von IL-6 für die Diagnose einer neonatalen Sepsis liegt zwischen 70 und 80 % [Jorch und Arenz, 2010: 535].

CrP-Werte zur Geburt wurden als kontinuierlicher sowie als dichotomer Parameter größer oder kleiner **5 mg/l** erfasst. Auch diese Unterscheidung orientiert sich an den Empfehlungen des klinisch-chemischen Labors des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus. Im klinischen Alltag wird in der Neonatologie unseres Klinikums bei Neugeborenen etwa ab einem CrP von **20 mg/l** von einer **therapiebedürftigen Infektion** ausgegangen [Roos, 2006]. Eine Studie zur seriellen CrP-Bestimmung bei neonatalen Infektionen [Benitz et al., 1998] zeigte, dass CrP-Folgeuntersuchungen mit einem Abstand von 24 Stunden, 8 - 48 Stunden nach der Erstvorstellung mit großer Sicherheit den Ausschluss einer Infektion ermöglichen, wenn die CrP-Werte < 10 mg/l betragen. Ein normales CrP bei der Erstvorstellung hat im Unterschied zu den seriellen Untersuchungen kaum eine Aussagekraft. Bei CrP-Werten von > 20 mg/l sahen die Autoren das Risiko einer tatsächlichen oder möglichen Sepsis bei > 25 %. Nach Meinung der Autoren ist bei einem **CrP bis 20 mg/l nicht unbedingt eine antibiotische Therapie indiziert**, bei höheren Werten sollte diese jedoch bis zum Ausschluss einer Infektion verabreicht werden.

Das CrP ist ein **Akute-Phase-Protein**, welches jedoch auch bei anderen neonatologischen Krankheitsbildern (z. B. Asphyxie, Mekoniumaspiration, Atemnotsyndrom oder Hirnblutungen [Jorch und Arenz, 2010: 534]) ansteigen kann. Die Kinetik des CrPs ist langsamer als beim IL-6. Mit einem Anstieg ist erst 8 - 12 Stunden nach Beginn der klinischen Symptomatik zu rechnen. Dies ist bei der häufig fulminant verlaufenden neonatalen Frühinfektion unter Umständen zu spät, sodass das CrP nicht als einziges Kriterium für die Einschätzung einer Infektion dienen kann. Im Gegensatz zum IL-6 kann durch serielle Messungen des CrPs im Verlauf beurteilt werden, ob z. B. eine antibiotische Therapie wirksam ist. Die anfangs niedrige Sensitivität und Spezifität des CrPs steigt bei seriellen Messungen deutlich an [Jorch und Arenz, 2010: 534-535].

Die **Leukozytenzahlen zur Geburt** wurden nicht als allein stehender Parameter ausgewertet, jedoch bei der Entscheidung, ob eine Frühinfektion vorlag, mitberücksichtigt. Dieser Parameter ist bei der großen Bandbreite der Leukozytenzahlen des Neugeborenen für die

Diagnose einer konnatalen Sepsis nur von eingeschränkter Bedeutung.

Die **Thrombozytenzahlen zur Geburt** waren als kontinuierlicher Parameter dokumentiert worden. Eine ungeklärte Thrombozytopenie ist ein insensitiver, nicht spezifischer und eher später Hinweis für eine neonatale bakterielle Infektion [Jorch und Arenz, 2010: 534]. Daher wurde dieser Marker nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

Mögliche **klinische Hinweise** für eine Infektion beim Neugeborenen sind Temperaturregulationsstörungen, Tachykardie, Tachypnoe, Zunahme von Apnoen/ Bradykardien, gastrointestinale Probleme, steigender Sauerstoffbedarf, steigender Beatmungsaufwand, Veränderungen des Hautkolorits, Hyperexzitabilität, Lethargie, Hypotonie und verlängerte periphere Rekapillarisationszeit. Studien ergaben eine Sensitivität von 70 % und Spezifität von 83 % für klinische Anhaltspunkte einer Infektion [Jorch und Arenz, 2010: 533; Roos, 2006].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zur **Diagnostik einer neonatalen Infektion mehrere Parameter erforderlich** sind: Schon die Kombination von IL-6 und CrP zum Zeitpunkt des Infektionsverdachts und 48 Stunden später hat eine gemeinsame Sensitivität von 98 % und Spezifität von 91 %. **Wichtig** ist jedoch auch der **klinische Eindruck**: Bei einem begründeten klinischen Infektionsverdacht mit negativen Infektionsparametern wird der Beginn einer antibiotischen Therapie empfohlen [Jorch und Arenz, 2010: 535].

3.2.2.4 Antibiotikatherapie von Frühinfektionen

Konnatale Infektionen sind eine häufige Ursache von Frühgeburtlichkeit. Aufgrund ihres unreifen Immunsystems sind Frühgeborene durch Infektionen besonders gefährdet. Im Rahmen einer solchen angeborenen Infektion ist meist eine antibiotische Therapie erforderlich. Der **Wirkungsbeginn von EcN** in dieser Studie wird für den **fünften Lebensstag** angenommen (Abschnitt 3.3.1) [Lodinová-Žadníková und Sonnenborn, 1997]. Frühinfektionen können nach dieser Definition durch EcN nicht beeinflusst werden. Dies gilt auch für die Notwendigkeit einer antibiotischen Behandlung. Daher ist eine antibiotische Therapie in den ersten vier Lebensstagen als expositioneller Faktor zu betrachten, der die spätere Wirkung des Probiotikums beeinflussen kann.

Für alle Patienten wurde als kontinuierlicher Parameter dokumentiert, wie lange (in **Tagen**) und mit welcher Anzahl **Zyklen** eine **Frühinfektion** therapiert wurde. Dabei war die Indikationsstellung der Antibiose im Rahmen der Frühinfektion entscheidend, die Therapiedauer reichte meist über den vierten Lebensstag hinaus, da konnatale Infektionen durchschnittlich über sieben Tage behandelt werden. Für jedes verwendete Antibiotikum wurde die Therapiedauer in Tagen erfasst. Dies gilt auch für Virustatika und Antimykotika, diese wurden bei den Variablen Antibiotikazyklen/ Therapietage nicht mitgezählt. Eine

Auswertung letzterer Daten war aufgrund der zahlreichen verschiedenen Präparate mit unterschiedlichen Indikationen und Therapiezeitpunkten nicht möglich.

Wenn aus den Patientendokumenten sicher hervorging, dass ein **Antibiotikum prophylaktisch verabreicht** wurde, ohne dass aktuell ein Anhalt für eine Infektion bestand, wurden diese Therapietage/ dieser Zyklus **nicht berücksichtigt**. Dies war häufig bei neurochirurgischen Operationen (z. B. Anlage eines ventrikuloperitonealen Shunts) der Fall. Als **ein Antibiotikazyklus** betrachtet wurde die **Therapie im Verlauf einer Infektion**, auch wenn das antibiotische Präparat im Laufe der Therapie z. B. aufgrund von Resistenzen geändert wurde. Dosisänderungen wurden bei physiologischen Gewichtsänderungen im Laufe des Aufenthaltes nicht erfasst. Topische Antibiotika (antibiotische Augentropfen oder Nasensalbe) wurden nicht berücksichtigt. Wenn sich jedoch **zwei verschiedene Infektionen überlagerten**, wurden die gleichzeitig erfolgten Therapiezyklen als **zwei Therapiezyklen** gezählt. Diese Unterscheidung war nicht immer eindeutig möglich. Teilweise bestand einerseits eine Infektion (z. B. eine Ventrikulitis), die antibiotisch behandelt wurde, und es war gleichzeitig eine Operation erforderlich (z. B. Entfernung des ventrikuloperitonealen Shunts), die eine antibiotische Prophylaxe erfordert hätte. In diesem Fall wurde die Antibiose bei Therapietagen und Zyklen mitgezählt, obwohl sie die perioperative Prophylaxe miterfüllte. Diese Prinzipien wurden für die Erfassung der Therapie von Spätinfektionen ebenso angewandt (Abschnitt 3.2.3.5).

3.2.2.5 *Ärztliche Maßnahmen*

Die Anlage eines **Nabelvenenkatheters** und/ oder **Nabelarterienkatheters** sowie die **endotracheale Intubation** als mögliche Infektionsquellen wurden erfasst. Diese Maßnahmen beziehen sich auf die ersten vier Lebenstage und sind damit Expositionsfaktoren. Die Entfernung von Nabelkathetern erst nach dem vierten Lebenstag und späte Intubationen nach diesem Zeitraum blieben dabei unberücksichtigt. Zusätzlich dokumentiert, jedoch nicht ausgewertet wurden die Anlage von Magensonden, Blasenkathetern, ZVKs, periphervenösen Kathetern, Einschwemmkathetern, Einläufen und durchgeführte Operationen mit Indikationen.

3.2.2.6 *Ernährung*

Die Ernährung des Frühgeborenen mit **Muttermilch ist ein möglicher protektiver Faktor** für die **Entwicklung einer NEC** [Jorch und Arenz, 2010: 347]. Daher wurden die Patienten nach **Art der Nahrung** (Mutter-/ Frauenmilch, Formulanahrung oder keine enterale Nahrung) sowie nach der **Fütterungsmethode** (enteral oder teil-/ vollparenteral) unterschieden. Diese

Einteilung bezieht sich auf die Ernährung vom Geburtstag bis einschließlich zum vierten Lebenstag. Von einer teilparenteralen Ernährung wurde ausgegangen, sobald eine Mischinfusion zugeführt wurde. Im Unterschied dazu wurde die ausschließliche Infusion von Glucose mit paralleler Sondierung von Nahrung als enterale Ernährung gewertet. Zusätzlich wurde erfasst, ob im Laufe des stationären Aufenthaltes der Nahrung **Muttermilchverstärker** (Fortifier) zugesetzt wurden, da ein Einfluss dieses Parameters auf die spätere Gewichtsentwicklung angenommen werden kann. Diese Maßnahme erfolgte jedoch nach den ersten Lebenswochen, sodass ein Zusammenhang zur probiotischen Behandlung unwahrscheinlich ist. Aufgrund der Vielzahl an Faktoren wurde dieser Parameter nicht in die Auswertung einbezogen.

3.2.2.7 Mikrobiologie

Während der Datenaufnahme wurden zunächst **alle kulturell nachgewiesenen Erreger** aus Neugeborenenhautabstrichen, Blutkulturen, Trachealsekret, Katheterabstrichen, Urinuntersuchungen und intraoperativen Abstrichen aufgenommen. Aufgrund der Komplexität und Inhomogenität dieser Daten wurde bei mangelnder Vergleichbarkeit, z. B. durch unterschiedliche Häufigkeit und zeitliche Abfolge dieser Untersuchungen, auf eine allgemeine Auswertung verzichtet.

Anhand der Dokumentation aller Erreger (mit genauer Bezeichnung, bei *E. coli* auch Unterscheidung nach Resistenzspektrum in „mögliche EcN“ und „andere *E. coli*“) konnte der **Nachweis von „möglichen EcN“** u. a. **im Trachealsekret und der Blutkultur** für die vorliegenden Patienten genau erfasst werden. Einschränkungen in der Beurteilung ergeben sich durch die **sehr unpräzise Identifikation von EcN anhand des Resistenzspektrums**. In Folgestudien sollte daher eine sichere mikrobiologische Identifikation von EcN erfolgen. Dies wäre z. B. mittels PCR im Stuhl zeitnah und präzise möglich [Blum-Oehler et al., 2003]. Mit dieser Methode könnten Kolonisationsuntersuchungen, aber auch die Identifikation von EcN als möglicher Erreger einer Sepsis bei probiotisch behandelten Patienten durchgeführt werden. Für letztere wäre die Anwendung dieser Methode für Blutkulturen zu prüfen. Diese Möglichkeit war in der vorliegenden Pilotstudie jedoch nicht verfügbar, sodass im klinischen Alltag versucht wurde, EcN über die Resistenzspektren von pathogenen *E. coli* zu differenzieren. Da **EcN keine Resistenzen** aufweist [Blum-Oehler G, 2001] wurden *E. coli* mit einem solchen Resistenzspektrum bei probiotisch behandelten Patienten als EcN identifiziert. Dieser Schluss ist jedoch unpräzise, da es durchaus *E. coli* der Standortflora gibt, welche nicht mit EcN identisch sind, aber auch keine Resistenzen aufweisen. Studien haben ergeben, dass Antibiotikaresistenzen bei *E. coli* in Deutschland im internationalen Vergleich eher selten

vorkommen [Erb et al., 2007]. Die **häufigsten Resistenzen in Deutschland** betreffen **Ampicillin** mit 16,7 % Resistenzen bei asymptomatischen Patienten [Marre et al., 2002] und 35,8 % Resistenzen bei symptomatischen hospitalisierten Patienten [Kresken und Hafner, 1999]. Es gibt also durchaus Infektionen mit nicht-antibiotikaresistenten *E. coli*. Weiterhin ist es problematisch, von dem Vorhandensein von Resistenzen auf die Pathogenität eines Bakteriums zu schließen, da es bei *E. coli* zahlreiche verschiedene Pathogenitätsfaktoren gibt, welche unabhängig von Resistenzen auftreten (Abschnitt 1.2.1). Damit wird deutlich, dass eine sichere Identifikation von EcN für Folgestudien unabdingbar ist. Die **Identifikation von EcN anhand des Resistenzspektrums ist als ungeeignet** zu beurteilen.

3.2.2.8 Parameter der Mutter

Zur Anamnese der Kindesmutter wurden das **Alter** (in Jahren), der Status **Erstgebärende** oder Mehrgebärende sowie das Vorliegen eines **Nikotinabusus** in der Schwangerschaft, Durchführung einer **präpartalen Antibiose** (innerhalb 24 Stunden vor der Geburt) und erhöhte **Infektionsparameter** (CrP, Leukozyten, Fieber) der Mutter zur Geburt erfasst. Diese Parameter können Risikofaktoren für Frühgeburtlichkeit und neonatale Infektionen darstellen.

3.2.3 Outcome

3.2.3.1 Spätinfektion

Unter einer **Spätinfektion** versteht man eine Infektion, welche ab dem fünften Lebenstag symptomatisch wird und die meist postpartal von der Mutter oder aus dem Klinikmilieu erworben wurde [Handrick et al., 1991: 107-108]. Ein **Verdacht auf Spätinfektion** wurde angenommen, wenn das Kind aufgrund dieser Verdachtsdiagnose ab dem fünften Lebenstag antibiotisch behandelt wurde. Eine **erwiesene Spätinfektion** wurde dokumentiert, wenn von den vier möglichen Parametern (Erregernachweis, pathologische Entzündungsparameter, klinische Hinweise für eine Infektion, Diagnose in der Epikrise) mindestens zwei erfüllt wurden.

3.2.3.2 Laborwerte

Als Laborparameter im Verlauf ab dem fünften Lebenstag erfasst wurden: maximales IL-6, maximales CrP, maximale Leukozyten, minimaler Hb, maximales Gesamtbilirubin. Weiterhin wurde dokumentiert, ob im Verlauf des Aufenthaltes Erythrozytentransfusionen bzw. die Substitution von FFP (fresh frozen plasma), Thrombozytenkonzentrat, Humanalbumin oder Antithrombin III erfolgte. Da sich die **Referenzbereiche** für einige dieser Parameter **je nach Gestationsalter zur Geburt und Lebensalter** (z. B. Leukozyten, Hb, Gesamtbilirubin)

deutlich unterscheiden, war eine vergleichende Untersuchung bei unterschiedlichen Bestimmungszeitpunkten nicht möglich. Auch die Zeitpunkte und Indikationen der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten und weiteren Blutprodukten unterschieden sich im Laufe der meist langen Aufenthaltsdauer der Patienten und waren nicht immer mit dem Vorliegen einer Infektion assoziiert. Als **vergleichender labordiagnostischer Parameter für eine Spätinfektion** wurde daher in der Analyse **nur das maximale IL-6** verwendet. Die Sensitivität dieses Parameters für neonatale Infektionen am Tag des Infektionsverdachts liegt bei 86 %, die Spezifität bei 83 % [Jorch und Arenz, 2010: 535].

3.2.3.3 *Gewichtsentwicklung*

Die Gewichtsentwicklung eines Frühgeborenen kann als **indirekter Marker** für die **Verträglichkeit der Nahrung und den Allgemeinzustand** des Patienten gewertet werden. Um festzustellen, ob EcN durch probiotische Effekte ein besseres Gedeihen ermöglicht, wurden neben dem Geburtsgewicht und Entlassungsgewicht (mit Lebenstag) das Gewicht an den Lebenstagen 10, 20, 30, 40, 50 und 60 erfasst, sofern die Patienten zu diesen Zeitpunkten noch stationär behandelt wurden. Weiterhin wurde dokumentiert, **an welchem Lebenstag** die Kinder ein **Gewicht von ≥ 1800 g** erreichten sowie **an welchem Lebenstag** das **Geburtsgewicht verdoppelt** wurde. In der Auswertung wurden die Gewichte am 10., 20. und 30. Lebenstag, die Gewichtsänderung (in Gramm) zwischen 10. und 20. und zwischen 20. und 30. Lebenstag verglichen. Für die Lebenstage 40, 50, 60 und die zusätzlichen Parameter zur Gewichtsentwicklung lagen leider nur von einem kleineren Anteil der Ausgangsstichprobe Daten vor, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war. Dies war auch dadurch bedingt, dass viele Kinder bereits vor dem 60. Lebenstag entlassen worden waren.

3.2.3.4 *Liegedauer*

Um zu untersuchen, ob sich die **probiotische Wirkung von EcN** im Sinne eines **stabileren klinischen Verlaufs** auswirkt (seltener Komplikationen wie Infektionen, Gedeihstörungen), wurden die Behandlungszeiten (in Tagen) bis zur ersten Entlassung aus der stationären Betreuung nach Hause erfasst. Die nachstationäre Weiterbetreuung wurde nicht berücksichtigt. Der **Aufenthalt auf der neonatologischen Intensivstation** und der gesamte **Erstaufenthalt von der Geburt bis zur Entlassung** wurden jeweils als kontinuierliche Parameter dokumentiert. Zur Vermeidung von späteren Fehlinterpretationen wurde vermerkt, ob Patienten im Rahmen des ersten Aufenthaltes verstorben sind. Diese Patienten wurden mit einem speziellen statistischen Verfahren (Berücksichtigung zensierter Beobachtungen Abschnitt 3.3.6) in die statistische Analyse einbezogen. Aus unterschiedlichen Gründen

wurden manche Patienten nicht auf die Normalstation der Neonatologie verlegt und direkt von der Intensivstation nach Hause entlassen. Ursachen dafür waren z. B. ein posthämorrhagischer Hydrocephalus mit der Notwendigkeit von Operationen (externe Ventrikeldrainage, ventrikuloperitonealer Shunt) und Laser-Operationen bei Retinopathie. Das bedeutet, dass ein langer Aufenthalt auf der Intensivstation nicht immer mit einer größeren Anzahl infektiöser Komplikationen assoziiert war. Das Gestationsalter zur Geburt wirkte sich indirekt auf die stationäre Liegedauer aus.

3.2.3.5 Antibiotikatherapie von Spätinfektionen

Ähnlich wie bei der Therapie konnataler Infektionen (Abschnitt 3.2.2.4) wurden **Therapie-tage mit Antibiotika und Therapiezyklen** bis zur ersten Entlassung aus der stationären Betreuung erfasst. Dabei blieben Antibiotikagaben im Rahmen einer Frühinfektion unberücksichtigt, auch wenn diese über den vierten Lebenstag hinaus erfolgten. Entscheidend war der Zeitpunkt der Indikationsstellung zur antibiotischen Therapie für eine **Infektion, die erst ab dem fünften Lebenstag symptomatisch wurde**.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Patienten wurden bis einschließlich zum erstmaligen **Erreichen eines Gewichtes von 1800 g Therapietage mit Antibiose und Antibiotika-zyklen** gesondert dokumentiert. Dieser Parameter orientiert sich an einer Variablen, die auch bei NEO-KISS (Surveillance System nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen) abgefragt wird. Damit soll eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Pilotstudie mit den Daten anderer Kinderkliniken erreicht werden.

3.3 Statistische Methoden

3.3.1 Definition von Exposition und Outcome

Nach dem empfohlenen Therapieschema wurde täglich 1 ml EcN-Suspension in den ersten fünf Lebenstagen oral verabreicht. Eine Studie zur Kolonisation mit EcN [Lodinová-Žadníková und Sonnenborn, 1997] ergab, dass **am fünften Lebenstag bei 93 % der Patienten eine Besiedlung mit *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917** erfolgt ist. Da wir in der vorliegenden Pilotstudie keine Kolonisationsuntersuchungen durchgeführt haben, wurde der wahrscheinlichste Wirkungsbeginn von EcN für den fünften Lebenstag festgesetzt. Deshalb beziehen sich die Endpunktanalysen immer auf einen Effekt ab diesem Zeitpunkt. Es wurden alle Patienten ausgeschlossen, welche die Einschlusskriterien nicht erfüllten (Abschnitt 4.1.1). Als **Signifikanzniveau** wurde in dieser Studie ein **p-Wert von 0,05** definiert, Abweichungen wurden gesondert gekennzeichnet.

3.3.2 Berechnung der deskriptiven Statistiken

Die deskriptiven Statistiken für die **Eigenschaften** der EcN- und Kontrollgruppe wurden mit SPSS 16.0. (SPSS Inc., Chicago, Illinois) erstellt. Dabei wurde für kontinuierliche Variablen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dichotome und kategoriale Parameter wurden mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht.

3.3.3 Endpunkt Spätinfektion

Eine Spätinfektion ist definiert als eine **Infektion nach dem vierten bis fünften Lebenstag** [Handrick et al., 1991: 107-108]. Im Hinblick auf den Wirkungsbeginn von EcN wurden Spätinfektionen vereinfachend als solche angenommen, die ab dem fünften Lebenstag auftraten. Im Unterschied zu Frühinfektionen sind diese nicht angeboren.

Da es sich um einen **dichotomen Endpunkt** handelt, wurde die **logistische Regression** verwendet, während man die Methode der linearen Regression für kontinuierliche Variablen einsetzt. Mit diesem statistischen Verfahren wurde ein Variablenmodell erstellt, das Confounder für die mögliche Beziehung zwischen **Exposition (Behandlung mit EcN)** und **Outcome (Auftreten von Spätinfektionen)** erfassen soll. Dazu wurden zunächst alle Variablen in Abhängigkeit vom Endpunkt „erwiesene Spätinfektion“ auf ihre **Confoundereigenschaften** hin untersucht. Confounding tritt auf, wenn zwei Faktoren miteinander assoziiert sind und der Effekt des einen Faktors mit dem des anderen vermischt wird oder durch den Effekt des anderen verzerrt wird. Ein Beispiel für Confounding: Die Parameter Schwangerschaftswoche und Amnioninfektionssyndrom sind beides mögliche Risikofaktoren für das Auftreten neonataler Infektionen. Es gibt jedoch auch eine Assoziation von Amnioninfektionssyndrom und Frühgeburtslichkeit. Bei der Fragestellung, ob ein Amnioninfektionssyndrom ein eigenständiger Risikofaktor einer Frühinfektion sein kann, ist das Schwangerschaftsalter zur Geburt ein Confounder [Fletcher et al., 1999: 10-13].

Nach einer **statistischen Empfehlung (10er-Regel)** darf das Modell zum Endpunkt Spätinfektion nicht mehr als eine Variable für zehn Ereignisse enthalten [Peduzzi et al., 1996]. Eine erwiesene Spätinfektion hatten insgesamt 24 Patienten, das entspricht 24 Ereignissen. Folglich darf das Modell eigentlich nur aus zwei Variablen bestehen. Da auch die Zuordnung zur EcN- oder Kontrollgruppe eine Variable ist, könnte man einen Confounder aufnehmen. Außerdem müssen für kategoriale Variablen mit mindestens drei Kategorien so genannte Dummy-Variablen erstellt werden. Die Anzahl der benötigten Dummy-Variablen berechnet sich aus der Kategorienanzahl vermindert um eins. In dieser Studie sind einige kategoriale Parameter (z. B. Hirnblutung und Atemnotsyndrom) wichtige Confounder, was die Anzahl von Variablen in den Modellen weiter verringern würde.

In einer Simulationsstudie [Vittinghoff und McCulloch, 2007] wurde jedoch festgestellt, dass man diese **statistische Regel für Risikomodelle** auch **weniger streng** anwenden kann: Das gilt insbesondere für die Demonstration einer adäquaten Confounderkontrolle in Sensitivitätsanalysen, wie wir sie für unsere Ergebnisse durchgeführt haben. Demnach ist es besonders bei statistisch signifikanten Zusammenhängen gerechtfertigt, Modelle mit fünf bis neun Ereignissen pro Variable zu verwenden, da die auftretenden Verzerrungseffekte nicht gravierend und vergleichbar mit denen sind, die bei Modellen mit 10 Ereignissen pro Variable auftreten. Überträgt man das auf unser Modell, sind nun bis zu fünf Variablen (24 Ereignisse) möglich. Von Bedeutung ist, dass aus statistischen Gründen nicht mehr Faktoren aufgenommen werden können, auch wenn es weitere Confounder gibt.

Deshalb wurden **verschiedene Zusammenstellungen von starken, validen Confoundern** erstellt, um den Einfluss auf die Änderung der Odds Ratio zu prüfen. Dabei sollte eine Confoundervariable die Odds Ratio um mindestens 10 % verstärken oder vermindern [Rothman, 2002: 181-197]. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften und der Modellgüte des Hosmer-Lemeshow-Tests [Hosmer und Lemeshow, 1989: 140-145] wurde das endgültige Modell konstruiert.

Der **Hosmer-Lemeshow-Test** in der logistischen Regression dient dazu, eine Aussage über die „Güte der Anpassung“ des Modells zu treffen. Wenn eine adäquate, plausible Modellbeschreibung vorliegt, sollte der p-Wert des Hosmer-Lemeshow-Tests idealerweise bei Werten größer 0,3 und möglichst nicht unter 0,05 liegen [Hosmer und Lemeshow, 1989: 147-156]. Für kleine Stichproben ($n < 400$) hat dieser Test nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

3.3.4 Endpunkt Interleukin-6

Analog zum Vorgehen beim Endpunkt Spätinfektion wurde mit der Methode der **logistischen Regression** ein Variablenmodell erstellt. Berücksichtigung fanden **maximale Interleukin-6-Werte** über 50 pg/ ml ab dem fünften Lebenstag nach Gabe von EcN vom ersten bis fünften Lebenstag. Ein Teil der Patienten, der am späten Abend geboren wurde, erhielt EcN vom zweiten bis sechsten Lebenstag, wobei sich durch die Verkürzung des ersten Lebenstages vergleichbare Zeitpunkte der Applikation (in Lebensstunden) mit den anderen Patienten ergaben. Bei diesen Kindern wurden die maximalen Interleukin-6-Werte ab dem sechsten Lebenstag aufgenommen. In der Kontrollgruppe erfolgte die Dokumentation generell ab dem fünften Lebenstag.

Nach der **weniger strengen Auslegung der 10er-Regel** [Vittinghoff und McCulloch, 2007] darf dieses Modell drei Variablen enthalten. Parameter, die sich auf das Interleukin-6 oder CrP zur Geburt und nach dem fünften Lebenstag beziehen, wurden bei diesem Endpunkt

vernachlässigt, um einen „**horse racing effect**“ [Peto, 1981] zu vermeiden. Dieser Effekt entspricht der Korrelation eines Absolutwertes mit der Änderungsrate dieses Parameters und kann am Beispiel eines schnellen Rennpferdes, das nach der halben Rennstrecke in Führung liegt, verdeutlicht werden: Die schnellere Durchschnittsgeschwindigkeit des Pferdes erlaubt die Schlussfolgerung, dass es früher als ein langsames Pferd ins Ziel kommen wird. Parameter, die zusammen ein Modell bilden, sollten jedoch nicht korrelieren, da sich sonst Verzerrungen im Einfluss der einzelnen Variablen auf das Gesamtmodell ergeben. Zusätzlich zu diesen Überlegungen wurden die Modelle auf Korrelationen $> 0,5$ geprüft und diese gegebenenfalls beseitigt.

3.3.5 Endpunkt Gewichtsentwicklung

Im Unterschied zur logistischen Regression erlaubt das statistische Verfahren der **linearen Regression** grundsätzlich **beliebig viele Variablen**, die ein stabiles Modell ergeben. Die 10er-Regel gilt nicht. Andererseits besteht bei der unkritischen Auswahl einer relativ zum Stichprobenumfang großen Anzahl von Variablen die Gefahr der **Überadjustierung** (Overadjustment): Das bedeutet, dass die Parameter durch statistische Zusammenhänge untereinander Zwischenstufen in der Kausalkette von Exposition und Outcome bilden können [de Croon, 2006]. Dies verletzt ein wichtiges Kriterium für Confounder [Rothman und Greenland, 1998: 122-125]. Außerdem geht der Effekt einer Variablen auf diese Weise mehrfach in die Adjustierung ein, was zu einer Verfälschung des Koeffizienten führt. Daher wurden die **Parameter** für die Modelle der linearen Regression **möglichst aus verschiedenen Bereichen ausgewählt**, wenn sie die **Voraussetzungen für einen Confounder** erfüllten. Für den Endpunkt Gewichtsentwicklung wurden die **Gewichtsänderungen** zwischen dem 10. und 20. sowie zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr untersucht. Die Auswahl dieser Zeitintervalle geschah im Hinblick auf die erfolgte Kolonisation und Wirkung von EcN und die Tatsache, dass bis zum 30. Lebensjahr nur ein Patient bereits entlassen worden war.

3.3.6 Endpunkt Liegedauer

In diesem Modell wurde die Liegedauer auf der **Intensivstation** in Tagen als Endpunkt untersucht. Zusätzlich war bei der Datenerfassung die **Gesamtliegedauer** im Krankenhaus erfasst worden. Im Vergleich zum Aufenthalt auf der Intensivstation ist dieser Parameter jedoch als weniger spezifisch zu betrachten, da sich eine Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes z. B. auch durch die längere Therapiebedürftigkeit eines Zwillingsgeschwisterkindes (in geringem Maße) ergab oder durch nicht ausschließlich infektionsassoziierte Erkrankungen, wie Frühgeborenenapnoen oder Ernährungsstörungen, begründet war. Die Behandlungsdauer auf der Intensivstation steht dagegen in einem engeren

Zusammenhang zum Vorliegen von Infektionserkrankungen.

Mit STATA/SE 10.0 (StataCorp LP, College Station, Texas) wurde eine **lineare Regression** unter **Berücksichtigung zensierter Beobachtungen** (fünf rechtszensierte Beobachtungen für alle Variablen dieses Modells) durchgeführt. Damit wurde die Lebensdauer von fünf Patienten, welche im Laufe des Erstaufenthaltes verstorben waren, gegen unendlich gesetzt, sodass diese in die Berechnung der Liegedauer einbezogen werden konnten. Wäre die kürzere Liegedauer verstorbener Patienten ohne Zensierung aufgenommen worden (Beispiel Tabelle 8), hätten sich die berechneten Werte der Liegedauer im Modell zu kürzeren Zeiträumen verfälscht.

3.3.7 Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen

Dieser Endpunkt wurde mit der Methode der **linearen Regression** nach zwei Kriterien untersucht: In einem Modell wurde mit der Antibiotikatherapie in Tagen ab dem fünften Lebenstag **bis zur Entlassung** gerechnet, in einem weiteren wurde die Antibiotikatherapie in Tagen **bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g** als Endpunkt festgesetzt. Bei der Datenerfassung war zusätzlich die Anzahl von **Antibiotikazyklen** bis zur Entlassung und bis zu einem Gewicht von 1800 g erfasst worden. Diese Variable führt jedoch durch die kleinen Zahlenwerte im Modell zur Ungenauigkeit der Ergebnisse. Deshalb wurde die Angabe in Tagen als Endpunkt bevorzugt. Der Parameter „Antibiotikazyklen“ wurde jedoch als Confounder berücksichtigt.

3.3.8 Propensity Score

Zur Schätzung eines Behandlungseffektes stellt die randomisierte kontrollierte klinische Studie die ideale Methode dar. Eine fehlende Randomisierung bei Beobachtungsstudien kann für wichtige Merkmale zu großen Unterschieden zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe führen. Diese Unterschiede können einen möglichen Behandlungseffekt verdecken. Um bei Beobachtungsstudien Unterschiede in wichtigen Merkmalen zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe auszugleichen, werden vor allem zwei statistische Verfahren angewandt [D'Agostino und D'Agostino, 2007; Sturmer et al., 2006]: **1. die Adjustierung** nach diesen Merkmalen, wie in den Abschnitten 4.3 bis 4.7 präsentiert wird, und **2. Propensity Score-Methoden** (Abschnitt 4.8), wodurch eine Quasi-Randomisierung vorgenommen wird. Diese zwei Methoden verhalten sich komplementär zueinander und sollten nicht einzeln betrachtet werden [D'Agostino und D'Agostino, 2007]. Für einen binären Endpunkt mit einer geringen Anzahl an Ereignissen wie in der vorliegenden Studie gelten Propensity Score-Methoden der Adjustierung mittels logistischer Regression als überlegen [Cepeda et al., 2003].

Der Propensity Score einer Person ist die **Wahrscheinlichkeit, aufgrund seiner Merkmale behandelt zu werden**. Der Erfolg eines Propensity Score-Modells hängt davon ab, inwiefern nach Anwendung einer Propensity Score-Methode die Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe verringert werden. Es sollten die Merkmale bzw. Variablen in den Propensity Score aufgenommen werden, die die größten Risikofaktoren für den Endpunkt darstellen. Die Aufnahme von solchen Variablen, die mit der Behandlung, aber nicht mit dem Endpunkt assoziiert sind, ist ungünstig [Brookhart et al., 2006].

Für die **Variablenauswahl** zur Berechnung des Propensity Scores spielt das Ausmaß der **Beeinflussung des Outcomes durch den Parameter** eine bedeutende Rolle: Wenn sich eine Variable in der EcN- und Kontrollgruppe stark unterscheidet, aber nur einen geringen Effekt auf den Endpunkt hat, dann ergibt sich nur eine geringfügige Confounderwirkung. Andererseits können kleine Unterschiede eines Parameters in der EcN- und Kontrollgruppe, die einen starken Einfluss auf das Outcome aufweisen, zu deutlichem Confounding führen. [Rothman, 2002: 198-211]. Wie in Abschnitt 4.1.3 erwähnt, hat das **Geburtsjahr auf keinen Endpunkt einen Einfluss** und wurde daher bei der Berechnung des Propensity Scores nicht berücksichtigt, obwohl sich die Verteilung der Patienten der EcN- und Kontrollgruppe auf die einzelnen Jahre unterscheidet.

Unter den Propensity Score-Methoden wird das **Propensity Score-Matchen** empfohlen [Austin, 2007], insbesondere für Anwender mit geringer Erfahrung [Oakes und Kaufman, 2006]. Dabei werden Personen mit ähnlichem Propensity Score zueinander gematcht. Die Ähnlichkeit kann verschieden definiert werden. Bei einer Zuordnung mit einem maximalen Unterschied von 0,05 in der Wahrscheinlichkeit des Propensity Scores spricht man von einer „**caliper width**“, was hier mit Matchbereich übersetzt wird, von 0,05. Es ist üblich, die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Matchbereich zu überprüfen [Oakes und Kaufman, 2006]. Neben einem Wert von 0,05 werden in der vorliegenden Studie Matchbereiche von 0,025 und 0,01 analysiert. Wird eine unbehandelte Person mehreren behandelten Personen zugeordnet, spricht man vom **Matchen mit Zurücklegen**, ansonsten vom **Matchen ohne Zurücklegen**. Beide Methoden werden hier unter STATA/SE Version 10.0 (StataCorp LP, College Station, Texas) mit den Zusatzmodulen „psmatch2“, „pstest“ und „psgraph“ (Edwin Leuven, Department of Economics, University of Amsterdam; Barbara Sianesi, Institute for Fiscal Studies, London, UK) angewandt. Es sei darauf hingewiesen, dass das Matchen mit Zurücklegen nicht im Widerspruch zur Theorie über Propensity Score-Methoden steht [Oakes und Kaufman, 2006]. Stets wird hier 1-1 gematcht und bei der Auswertung werden Methoden für abhängige Beobachtungen, aber nicht die Methoden des Moduls „pstest“ angewendet: der

3. Methoden

t-Test für abhängige (gepaarte) Beobachtungen bei einem kontinuierlichen Endpunkt und die konditionale logistische Regression bei einem binären Endpunkt. Entsprechend der Empfehlung, statistische Methoden nur allgemein in Material und Methoden zu beschreiben, Details aber gegebenenfalls im Ergebnisteil zu präsentieren [Bailar und Mosteller, 1988], werden weitere Informationen in Kapitel 4 gegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistiken der EcN- und der Kontrollgruppe

4.1.1 Stichprobenumfang

In diese nicht-randomisierte klinische Pilotstudie wurden alle frühgeborenen Kinder mit einem **Geburtsgewicht unter 1500 g** aufgenommen, welche zwischen dem 01.01.2005 und dem 31.12.2007 am Carl-Thiem-Klinikum Cottbus lebend geboren wurden. Diese bilden eine Gruppe von 111 Patienten, deren Krankenakten in die statistische Auswertung eingingen. Im Verlauf des Erstaufenthaltes verstarben 14 Patienten. Sieben Kinder mit einer Lebensdauer unter fünf Tagen wurden vor der Analyse ausgeschlossen, da das Outcome am fünften Lebenstag begann. Ein weiterer Patient verstarb am 17. Lebenstag und hatte bis dahin keine Infektion erlitten. Im Unterschied zu fünf anderen Patienten, die vor ihrem Tod an einer Infektion erkrankt waren, konnte dieser Patient nicht in die Analyse einbezogen werden, da nicht einzuschätzen war, ob bei einem längeren Überleben eine Infektion aufgetreten wäre. Ein weiterer Patient verstarb am 28. Lebenstag und war bereits ausgeschlossen worden, da er EcN abweichend vom Therapieschema erhalten hatte.

Die Datenexploration ergab, dass neun Patienten EcN erstmals nach dem fünften Lebenstag erhalten hatten. Davon erhielten sechs Kinder EcN vor dem 50. Lebenstag (8., 13., 18., 19., 31., 49.), zwei Kinder erstmals am 85. und ein Kind am 91. Lebenstag. In diesen Fällen wurde das **empfohlene Therapieschema** nicht eingehalten, sodass eine Erstbesiedlung des Darms mit eventuell pathogenen Keimen oder anderen Bakterien als EcN möglich ist. Daher wurden diese Patienten nicht in die Analyse einbezogen. Die untersuchte Stichprobe besteht folglich aus **94 Patienten**, von denen 45 der EcN- und 49 der Kontrollgruppe angehören.

Tabelle 1: Deskriptive Statistiken der EcN- (*Escherichia coli* Stamm Nissle 1917) und Kontrollgruppe, wenn nicht anders angegeben n=94, Angabe in % (Anzahl) bzw. Mittelwert \pm Standardabweichung

Parameter	EcN		p-Wert
	nein	ja	
Geschlecht (weiblich)	40,8 % (20)	48,9 % (22)	0,534
Mehrling	34,7 % (17)	35,6 % (16)	1,000
Geburtsgewicht [g]	1271 \pm 161	1051 \pm 283	< 0,001
Nabelschnur-pH zur Geburt (n=93)	7,29 \pm 0,07	7,30 \pm 0,10	0,204
APGAR nach 1. Minute	7,4 \pm 1,5	7,0 \pm 1,8	0,238
APGAR nach 5. Minute	8,7 \pm 1,1	8,5 \pm 1,3	0,411
APGAR nach 10. Minute (n=93)	9,2 \pm 0,8	9,0 \pm 0,9	0,606
Schwangerschaftswoche	30,6 \pm 2,2	28,3 \pm 2,6	< 0,001
Blasensprung > 24 h vor Geburt (n=92)	0 % (0)	4,7 % (2)	0,216
Geburtsmodus (Sectio)	95,9 % (47)	97,8 % (44)	1,000
Amnioninfektionssyndrom (n=92)	2,1 % (1)	6,8 % (3)	0,346
Tokolyse (n=93)	34,7 % (17)	52,3 % (23)	0,098

4. Ergebnisse

Hirnblutung (dichotom)	16,3 % (8)	46,7 % (21)	0,002
Hirnblutung (ordinal)			0,002
keine	83,7 % (41)	53,3 % (24)	
Grad 1	6,1 % (3)	13,3 % (6)	
Grad 2	2,0 % (1)	8,9 % (4)	
Grad 3	8,2 % (4)	8,9 % (4)	
Grad 4	0 % (0)	15,6 % (7)	
Atemnotsyndrom (dichotom)	69,4 % (34)	88,9 % (40)	0,025
Atemnotsyndrom (ordinal)			0,057
kein	30,6 % (15)	11,1 % (5)	
Grad 1-2	34,7 % (17)	37,8 % (17)	
Grad 2,5-4	34,7 % (17)	51,1 % (23)	
nekrotisierende Enterokolitis	0 % (0)	8,9 % (4)	0,049
Verdacht auf Frühinfektion	61,2 % (30)	97,8 % (44)	< 0,001
erwiesene Frühinfektion	38,8 % (19)	60,0 % (27)	0,063
Interleukin-6 zur Geburt [pg/ ml] (n=93)	61,9 ± 228,9	73,9 ± 240,3	0,516
Interleukin-6 zur Geburt > 50 pg/ ml (n=93)	14,6 % (7)	11,1 % (5)	0,760
CrP zur Geburt [mg/ l] (n=93)	5,2 ± 5,1	4,8 ± 9,8	0,001
CrP zur Geburt > 5 mg/ l (n= 93)	12,5 % (6)	2,2 % (1)	0,112
Antibiotikatherapie Frühinfektion [d]	2,8 ± 2,7	4,8 ± 1,6	< 0,001
Antibiotikatherapie Frühinfektion [Zyklen]	0,6 ± 0,5	1,0 ± 0,2	< 0,001
Nabelvenenkatheter	30,6 % (15)	82,2 % (37)	< 0,001
Nabelarterienkatheter	0 % (0)	24,4 % (11)	< 0,001
Intubation	51,0 % (25)	80,0 % (36)	0,005
Nahrung			0,303
Frauen-/ Muttermilch	79,6 % (39)	88,9 % (40)	
Formulanahrung	18,4 % (9)	11,1 % (5)	
keine enterale Nahrung	2,0 % (1)	0 % (0)	
Fütterungsmethode			0,005
enteral	40,8 % (20)	13,3 % (6)	
teil-/ vollparenteral	59,2 % (29)	86,7 % (39)	
Alter der Mutter [Jahre]	29,0 ± 5,8	28,2 ± 6,5	0,519
Erstgebärende	44,9 % (22)	73,3 % (33)	0,007
Mutter Raucherin in der Schwangerschaft	26,5 % (13)	28,9 % (13)	0,821
präpartale Antibiose der Mutter (n=85)	42,2 % (19)	32,5 % (13)	0,379
Infektionsparameter der Mutter erhöht (n=68)	58,8 % (20)	61,8 % (21)	1,000

Tabelle 2: Endpunkte der EcN- (*Escherichia coli* Stamm Nissle 1917) und Kontrollgruppe, wenn nicht anders angegeben n=94, Angabe in % (Anzahl) bzw. Mittelwert ± Standardabweichung

Endpunkt	EcN		p-Wert
	nein	ja	
Verdacht auf Spätinfektion	10,2 % (5)	44,4 % (20)	< 0,001
erwiesene Spätinfektion	8,2 % (4)	44,4 % (20)	< 0,001
Interleukin-6 maximal über 50 pg/ ml (n= 76)	7,3 % (3)	40,0 % (14)	0,001
Gewicht am 10. Lebenstag [g]	1268 ± 176	1050 ± 270	< 0,001
Gewicht am 20. Lebenstag [g] (n=92)	1502 ± 212	1246 ± 320	< 0,001
Gewicht am 30. Lebenstag [g] (n=89)	1788 ± 275	1510 ± 386	< 0,001
Gewichtsänderung 10. bis 20. Lebenstag [g] (n=92)	233 ± 80	185 ± 85	0,004
Gewichtsänderung 20. bis 30. Lebenstag [g] (n=89)	294 ± 96	251 ± 97	0,017
Liegedauer Intensivstation [d] (n=89)	18 ± 17	47 ± 45	< 0,001
Liegedauer Krankenhaus [d] (n=89)	50 ± 14	75 ± 34	< 0,001
Antibiotikatherapie Spätinfektion [d]	0,7 ± 2,6	7,5 ± 14,3	< 0,001
Antibiotikatherapie Spätinfektion [Zyklen]	0,1 ± 0,4	1,0 ± 1,4	< 0,001

Antibiotikatherapie Spätinfektion bis 1800 g [d]	0,7 ± 2,6	5,3 ± 7,9	< 0,001
Antibiotikatherapie Spätinfektion bis 1800 g [Zyklen]	0,1 ± 0,4	0,8 ± 1,0	< 0,001

4.1.2 Charakteristik für Schwangerschaftswoche und Geburtsgewicht

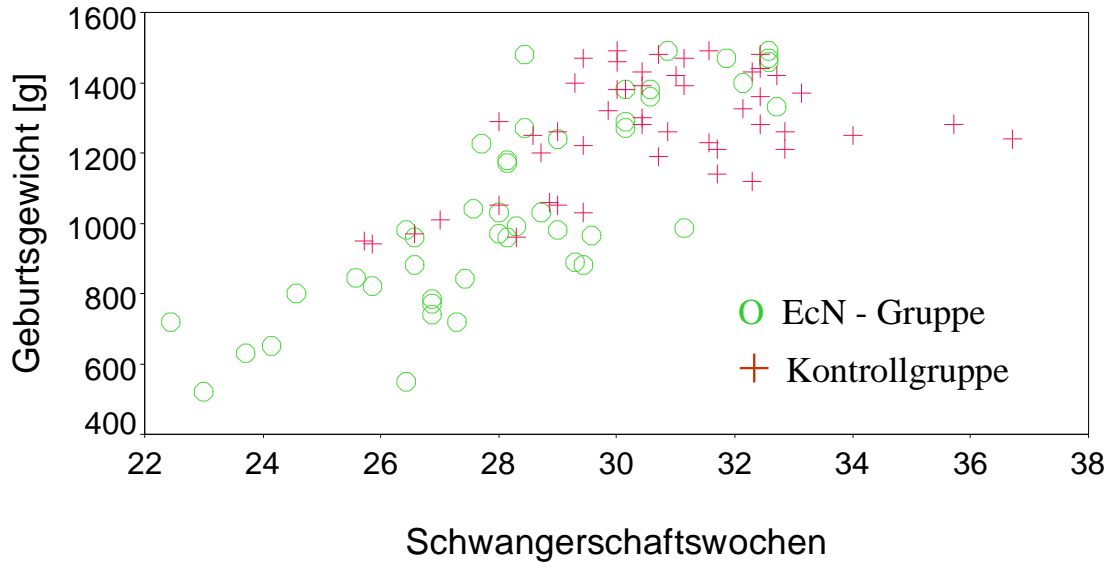


Abbildung 1: Darstellung der EcN- und Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Schwangerschaftswoche und dem Geburtsgewicht

Die **Verteilung der Patienten beider Gruppen** nach Schwangerschaftswoche und Geburtsgewicht ist **ungleichmäßig**. In der EcN-Gruppe überwiegen besonders unreife und geringgewichtige Frühgeborene, während die Kontrollpatienten reifer und höhergewichtiger sind. Zwei Patienten der Kontrollgruppe mit einem relativ hohen Schwangerschaftsalter von 35,7 und 36,7 Wochen sind in der Stichprobe enthalten, da sie in Folge einer Hypotrophie zur Geburt unter 1500 g gewogen haben. Diese Gewichtsgrenze war das Auswahlkriterium für unsere Patienten, weiterhin sind beide mit einem Gestationsalter unterhalb von 37,0 Wochen definitionsgemäß Frühgeborene.

4.1.3 Vorauswahl der Confounder

Für die verschiedenen Endpunkte wurden zunächst die erfassten Variablen in Sensitivitätsanalysen auf ihre Confoundereigenschaften hin untersucht. Die stärksten plausiblen Confoundervariablen wurden zur Adjustierung mittels linearer oder logistischer Regression eingesetzt. In den Sensitivitätsanalysen hatte z. B. der Parameter **Geburtsjahr** rechnerisch gesehen in wenigen Modellen **Confoundereigenschaften**. Diese liegen jedoch nah unter der 10 % - Änderungsgrenze der Koeffizienten [Rothman, 2002: 181-197]. Laut Definition muss ein Confounder ein eigenständiger Risikofaktor sein und er muss mit der Exposition statistisch assoziiert sein [Fletcher et al., 1999: 10-13]. Die erste Bedingung wird für das Geburtsjahr nicht erfüllt, da es in **keinem Zusammenhang zu den einzelnen**

Endpunkten steht. Durch den Ausschluss von Patienten nach der Datenexploration konnten für das Jahr 2005 ausschließlich Kontrollpatienten erfasst werden. Ursprünglich hatten in diesem Jahr acht Kinder EcN erhalten, weshalb das Jahr 2005 in die Studie aufgenommen worden war.

4.2 Applikation von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917

Alle 45 EcN-Patienten, die in die Analyse eingeschlossen wurden, erhielten das Medikament erstmalig vor dem **fünften Lebensstag**. Von diesen Kindern haben 26,7 % (12) **nach der letzten Antibiotikatherapie** nicht mindestens zweimal je 1 ml Suspension erhalten. Dies kann sich auf die Kolonisation mit EcN auswirken. Insbesondere Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g erhielten innerhalb der ersten Lebenswochen häufig nur **0,5 ml EcN-Suspension** pro Tag, da eine Überdosierung bei niedrigem Körpergewicht und eine leichtere Aspiration befürchtet wurde. Dies begründet sich durch den Nachweis von *E. coli* im Trachealsekret der Patienten (Abschnitt 4.9.1). Mindestens einmalig haben 24 Kinder diese halbierte Dosis erhalten (53,3 % der EcN-Patienten). Ausschließlich mit der halbierten Dosis wurden 19 Kinder behandelt (42,2 % der EcN-Patienten).

4.3 Endpunkt Spätinfektion

Dieses Modell stellt den Einfluss der Confounder auf die Beziehung zwischen **Exposition mit EcN und dem Auftreten einer Spätinfektion** dar. Es liegen deutliche Korrelationen zwischen der Schwangerschaftswoche, dem Geburtsgewicht, dem Geburtskopfumfang und der Geburtslänge vor, sodass nur eine von diesen Variablen in das Modell aufgenommen werden sollte. Der Confounder **Geburtsgewicht**, unterteilt in drei Kategorien: < 750g, 750 – 999 g, ≥ 1000 g, wurde aus zwei Gründen als am besten geeigneter Parameter ausgewählt: Erstens wurden für die Schwangerschaftswoche keine wissenschaftlich definierten Punkte zur Bildung von Kategorien gefunden und ein Sprung in der Verteilung auf die einzelnen Wochen festgestellt. Zweitens erscheint im Hinblick auf die Messgenauigkeit das Geburtsgewicht im Vergleich zu Geburtslänge und -kopfumfang als am präzisesten bestimmbar. In den deskriptiven Statistiken ist erkennbar, dass sich die Variablen Geburtsgewicht und Diagnose Hirnblutung zwischen EcN- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterscheiden. Neben diesen Variablen gehört der Confounder CrP zur Geburt > 5 mg/ l zum Modell. Die **Stichprobengröße** von 93 Patienten erklärt sich durch das Fehlen eines Wertes für diesen Confounder. Die **Auswahl der Parameter** erfolgte bei allen Modellen im Hinblick auf die Validität der Variable sowie der Effektstärke und Stabilität als Confounder in den Sensitivitätsanalysen. Korrelationen mit einem Wert > 0,5 wurden vermieden.

4. Ergebnisse

Tabelle 3: Endpunkt Spätinfektion (n=93), logistische Regression, die Odds Ratio bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, 3. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht und Hirnblutung (dichotom), 4. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, Hirnblutung (dichotom) und CrP zur Geburt > 5mg/l

Modell	Odds Ratio	95 %-Konfidenzintervall		p-Wert
		untere Grenze	obere Grenze	
1. EcN (unadjustiert)	8,8	2,7	28,6	< 0,001
2. adjustiert nach: Geburtsgewicht	4,8	1,3	17,6	0,017
3. + Hirnblutung (dichotom)	4,2	1,1	16,3	0,035
4. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	7,7	1,4	43,4	0,020

Dieses **Endmodell (Tabelle 3)** ergibt eine statistisch signifikante Odds Ratio, jedoch mit einem weiten Konfidenzintervall. Der Hosmer-Lemeshow-Test charakterisiert das Modell als plausibel. Durch die Zählung der Dummy-Variablen für das Geburtsgewicht und die Wertung der Zugehörigkeit zur EcN- oder Kontrollgruppe als Variable ergeben sich für das Modell in Tabelle 3 fünf Parameter. Damit wird die weniger strenge Auslegung der 10er-Regel befolgt. Demnach können keine weiteren Confounder eingeschlossen werden. Die erhöhte Odds Ratio deutet darauf hin, dass die Patienten der **EcN-Gruppe häufiger an Spätinfektionen erkrankten** als die Kontrollpatienten. Aufgrund der Zahlenwerte der Odds Ratio erlauben die Modelle (Tabellen 3 - 11) **keine Aussagen zu Einzelpersonen**, sondern nur zu den beiden Gruppen (EcN- und Kontrollgruppe).

4.4 Endpunkt Interleukin-6

Dieses Modell beschreibt die Beziehung der Confounder zur Messung **erhöhter Interleukin-6-Werte (über 50 pg/ ml) als Infektionsmarker nach Exposition mit EcN**. Das Geburtsgewicht korreliert in diesem Modell mit der Schwangerschaftswoche, dem Geburtskopfumfang und der Geburtslänge. Aus den in Abschnitt 4.3 genannten Gründen wurde das kategorisierte Geburtsgewicht, neben der Zugehörigkeit zur EcN- oder Kontrollgruppe, als Variable ausgewählt. In Bezug auf das Geburtsgewicht unterscheiden sich die EcN- und Kontrollgruppe statistisch signifikant (Tabelle 1). Die **Stichprobe** beinhaltet in diesem Fall 76 Patienten. Dies begründet sich dadurch, dass bei der Datenerfassung für jedes Kind der maximale Interleukin-6-Wert dokumentiert wurde. Wenn der Maximalwert vor dem fünften Lebensstag erreicht wurde oder seit diesem Zeitpunkt nicht mehr bestimmt wurde, fehlt eine Angabe für das Outcome.

Tabelle 4: Endpunkt Interleukin-6 > 50 pg/ ml ab 5. Lebensstag oder nach EcN (n=76), logistische Regression, die Odds Ratio bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell unadjustiert, 2. Modell adjustiert nach Geburtsgewicht

Modell	Odds Ratio	95 %-Konfidenzintervall		p-Wert
		untere Grenze	obere Grenze	
1. EcN (unadjustiert)	8,4	2,2	32,8	0,002
2. adjustiert nach: Geburtsgewicht	5,1	1,1	23,3	0,034

Dieses **Endmodell** (Tabelle 4) ergibt eine statistisch signifikante Odds Ratio mit einem relativ engen Konfidenzintervall und wird durch den Hosmer-Lemeshow-Test als adäquat beschrieben. Durch die Berücksichtigung einer Dummy-Variablen für das Geburtsgewicht besteht das Modell aus drei Variablen. Es wird deutlich, dass der Confounder „Geburtsgewicht“ die Odds Ratio um ca. 40 % reduziert. Dennoch weist das Ergebnis nach Adjustierung auf eine möglicherweise **häufigere Interleukin-6-Erhöhung ab dem fünften Lebensstag** bei den EcN-Patienten hin.

4.5 Endpunkt Gewichtsentwicklung

Das **erste Modell** (Tabelle 5) kennzeichnet den Einfluss von Confoundern auf die Gewichtsentwicklung vom **10. zum 20. Lebensstag**. Zur Vermeidung des „horse racing effect“ (siehe Abschnitt 3.3.4) dürfen die Parameter Schwangerschaftswoche, Geburtskopfumfang und Geburtslänge nicht in die Modelle zur Gewichtsentwicklung aufgenommen werden, da sie mit dem Geburtsgewicht korrelieren. Dieses steht statistisch im Zusammenhang zur Gewichtsänderung. In den deskriptiven Statistiken (Tabelle 1) wird deutlich, dass sich die Variablen Grad einer Hirnblutung, Nabelvenenkatheter, Nabelarterienkatheter, Fütterungsmethode und Antibiotikatherapie von Frühinfektionen [d] statistisch signifikant zwischen EcN- und Kontrollgruppe unterscheiden. Weiterhin gehört der Parameter Grad des Atemnotsyndroms zum Modell. Insgesamt enthält das Modell acht Variablen. Die **Stichprobengröße** von 92 Patienten ergibt sich durch fehlende Gewichtsbestimmungen bei zwei Patienten am 20. Lebensstag. Instabile Patienten wurden nach den Maßgaben des „minimal Handling“ [Obladen et al., 2006: 16-17] nicht täglich gewogen, um Stress und Infektionsgefahr zu mindern.

Tabelle 5: Endpunkt Gewichtsänderung 10. bis 20. Lebensstag [g] (n=92), lineare Regression, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), 3. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal) und Atemnotsyndrom (ordinal), 4. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal) und Nabelvenenkatheter, 5. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter und Nabelarterienkatheter, 6. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter, Nabelarterienkatheter und Fütterungsmethode, 7. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter, Nabelarterienkatheter, Fütterungsmethode und Antibiotikatherapie von Frühinfektionen [d]

4. Ergebnisse

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	- 48,5	17,3	0,006
2. adjustiert nach: Hirnblutung (ordinal)	- 28,9	16,8	0,088
3. + Atemnotsyndrom (ordinal)	- 20,9	15,8	0,191
4. + Nabelvenenkatheter	- 12,5	17,5	0,476
5. + Nabelarterienkatheter	- 9,4	18,4	0,610
6. + Fütterungsmethode	- 6,4	17,7	0,718
7. + Antibiotikatherapie Frühinfektion [d]	- 3,8	18,6	0,838

Das erste **Endmodell** (Tabelle 5) zeigt, dass die EcN-Patienten zwischen dem 10. und 20. Lebenstag 3,8 g weniger an Gewicht zugenommen haben als die Kontrollgruppe. Vor der Adjustierung ergab sich für die EcN-Gruppe eine um 48,5 g geringere Gewichtszunahme innerhalb dieses Zeitraums. Das Ergebnis des Endmodells ist mit einem p-Wert von 0,838 nicht statistisch signifikant. Die Residuen sind normalverteilt. Dennoch ist die Tendenz erkennbar, dass sich die **beiden Gruppen** nach Adjustierung in Bezug auf die **Gewichtszunahme** vom 10. auf den 20. Lebenstag auch in Anbetracht der großen Standardfehler **kaum unterscheiden**.

Das **zweite Modell** (Tabelle 6) veranschaulicht den Einfluss von Confoundern auf die Gewichtsentwicklung vom **20. zum 30. Lebenstag**. Die deskriptiven Statistiken (Tabelle 1) zeigen, dass sich die Variablen Grad einer Hirnblutung, Nabelvenenkatheter, Intubation und Antibiotikatherapie von Frühinfektionen [Zyklen] statistisch signifikant zwischen EcN- und Kontrollgruppe unterscheiden. Mit dem Parameter Grad des Atemnotsyndroms enthält das Modell acht Variablen. Die **Stichprobengröße** von 88 Patienten begründet sich durch das Fehlen von Gewichtsbestimmungen am 30. Lebenstag, die durch eine Entlassung am 26. Lebenstag und „minimal handling“ bei vier Kindern bedingt sind. Der Confounder CrP zur Geburt > 5 pg/ ml beschränkt die Ausgangsstichprobe auf 93 Kinder.

Der Parameter Verdacht auf Frühinfektion korreliert in diesem Modell stark mit der Variablen Antibiotikatherapie von Frühinfektionen [Zyklen]. Dies wird auch anhand der **Kollinearitätsstatistik** deutlich: Durch die Korrelation läge der „variance inflation factor“ (VIF) bei Einschluss des Verdachts auf Frühinfektion bei 9,7. Der VIF sollte jedoch deutlich weniger als 10 betragen [Kleinbaum, 1998]. Deshalb wurde der Parameter Verdacht auf Frühinfektion nicht in dieses Modell einbezogen. Analog wurden die anderen Variablen auf Korrelationen geprüft und diese vermieden.

4. Ergebnisse

Tabelle 6: Endpunkt Gewichtsänderung 20. bis 30. Lebenstag [g] (n=88), lineare Regression, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), 3. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal) und Atemnotsyndrom (ordinal), 4. Modell: adjustiert nach Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal) und Nabelvenenkatheter, 5. Modell: adjustiert nach: Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter und CrP zur Geburt > 5mg/ l, 6. Modell: adjustiert nach: Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter, CrP zur Geburt > 5mg/ l und Intubation, 7. Modell: adjustiert nach: Hirnblutung (ordinal), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter, CrP zur Geburt > 5mg/ l, Intubation und Antibiotikatherapie von Frühinfektionen [Zyklen]

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	- 42,3	20,7	0,044
2. adjustiert nach: Hirnblutung (ordinal)	- 18,3	19,8	0,357
3. + Atemnotsyndrom (ordinal)	- 9,9	19,6	0,614
4. + Nabelvenenkatheter	9,1	21,6	0,675
5. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	- 12,5	20,5	0,544
6. + Intubation	- 14,3	20,3	0,482
7. + Antibiotikatherapie Frühinfektion [Zyklen]	- 8,5	22,6	0,709

Im zweiten **Endmodell** (Tabelle 6) wird deutlich, dass die EcN-Patienten zwischen dem 20. und 30. Lebenstag 8,5 g weniger an Gewicht zugenommen haben als die Kontrollgruppe. Vor der Adjustierung ergab sich für die EcN-Gruppe eine um 42,3 g geringere Gewichtszunahme innerhalb dieses Zeitraums. Das Ergebnis des Endmodells ist mit einem p-Wert von 0,709 nicht statistisch signifikant. Die Residuen sind normalverteilt. Dennoch ist die Tendenz erkennbar, dass sich die **beiden Gruppen** nach Adjustierung in Bezug auf die **Gewichtszunahme** vom 20. auf den 30. Lebenstag **kaum unterscheiden**.

In diesem **Zeitraum von je 10 Lebenstagen** sollten Frühgeborene je nach Geburtsgewicht (500 g bis 1500 g) etwa **21 - 18 g/ kg/ d** zunehmen [Jorch und Arenz, 2010: 151]. Vor der Adjustierung ergibt sich für beide Zeiträume eine geringere Gewichtszunahme der EcN-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe von im Mittel 45 g. Die umgerechnete Gewichtszunahme pro Tag wäre für EcN-Patienten 4,5 g geringer. In einer orientierenden Rechnung unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Geburtsgewichtes in dieser Studie von 1050 g in der EcN-Gruppe und 1270 g in der Kontrollgruppe würde dies einen **Anteil von 23 % (EcN)** bzw. 20 % (Kontrolle) an der **täglich zu erwartenden Gewichtszunahme** bedeuten. Nach der Adjustierung beträgt die **geringere tägliche Gewichtszunahme** der **EcN-Patienten** nur noch 0,38 g bzw. 0,85 g. Dies entspricht **2 % bzw. 4,3 %** der täglich zu erwartenden Gewichtszunahme der EcN-Patienten.

4.6 Endpunkt Liegedauer

Dieses Modell beschreibt die Beziehung der Confounder zur **Liegedauer auf der Intensivstation**. Das Geburtsgewicht unterscheidet sich statistisch signifikant zwischen den beiden Gruppen und korreliert mit der Schwangerschaftswoche, dem Geburtskopfumfang und der Geburtslänge. Wie in Abschnitt 4.3 erklärt, wurde das kategorisierte Geburtsgewicht neben der Zugehörigkeit zur EcN- oder Kontrollgruppe als Variable ausgewählt. Weitere Parameter dieses Modells sind Grad einer Hirnblutung, Verdacht auf Frühinfektion und Nabelvenenkatheter, die sich ebenfalls statistisch signifikant zwischen der EcN- und Kontrollgruppe unterscheiden. Mit den Variablen Grad des Atemnotsyndroms und CrP zur Geburt $> 5 \text{ mg/l}$ ergeben sich neun Variablen. Die **Stichprobengröße** von 93 Patienten erklärt sich durch einen fehlenden Wert für den Parameter CrP zur Geburt $> 5 \text{ mg/l}$.

Tabelle 7: Endpunkt Liegedauer [d] auf der Intensivstation (n=93), lineare Regression, Berücksichtigung zensierter Beobachtungen, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, 3. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht und Hirnblutung (ordinal), 4. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, Hirnblutung (ordinal) und Verdacht auf Frühinfektion, 5. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, Hirnblutung (ordinal), Verdacht auf Frühinfektion und Atemnotsyndrom (ordinal), 6. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, Hirnblutung (ordinal), Verdacht auf Frühinfektion, Atemnotsyndrom (ordinal) und Nabelvenenkatheter, 7. Modell: adjustiert nach Geburtsgewicht, Hirnblutung (ordinal), Verdacht auf Frühinfektion, Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter und CrP zur Geburt $> 5 \text{ mg/l}$

Modell	Koeffizient	robuster Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	30,2	7,4	$< 0,001$
2. adjustiert nach: Geburtsgewicht	14,3	7,6	0,061
3. + Hirnblutung (ordinal)	10,7	6,0	0,077
4. + Verdacht auf Frühinfektion	6,9	5,9	0,248
5. + Atemnotsyndrom (ordinal)	9,0	6,1	0,144
6. + Nabelvenenkatheter	7,4	6,2	0,236
7. + CrP zur Geburt $> 5 \text{ mg/l}$	8,6	6,2	0,170

Das **Endmodell** (Tabelle 7) zeigt, dass die Kinder der EcN-Gruppe 8,6 Tage länger auf der Intensivstation behandelt wurden als die Kontrollpatienten. Unadjustiert ergibt sich eine um 30,2 Tage längere Liegedauer auf der Intensivstation für die EcN-Patienten. Das Ergebnis des Endmodells ist mit einem p-Wert von 0,170 nicht statistisch signifikant. Die Residuen sind normalverteilt. Es wird deutlich, dass die Berücksichtigung der Confounder die Liegedauer auf der Intensivstation stark reduziert. Die Tendenz einer **längeren Liegedauer auf der Intensivstation bei EcN-Patienten** ist jedoch nach Adjustierung noch vorhanden.

4. Ergebnisse

Tabelle 8: Endpunkt Liegedauer auf der Intensivstation [d] (n=93), lineare Regression, zensierte Beobachtungen unberücksichtigt, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, der Aufbau der Modelle entspricht Tabelle 7

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	26,1	6,7	< 0,001
2. adjustiert nach: Geburtsgewicht	13,2	7,2	0,071
3. + Hirnblutung (ordinal)	10,2	7,0	0,148
4. + Verdacht auf Frühinfektion	5,1	7,5	0,499
5. + Atemnotsyndrom (ordinal)	6,4	7,6	0,396
6. + Nabelvenenkatheter	3,7	7,7	0,635
7. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	6,5	8,3	0,434

Im Vergleich zur Berücksichtigung zensierter Beobachtungen im Endmodell ist hier das **Modell ohne Zensierung** (Tabelle 8) aufgeführt: Der Koeffizient verfälscht sich zu kürzeren Zeiträumen.

Tabelle 9: Endpunkt logarithmierte Liegedauer [d] (n=93), lineare Regression, Berücksichtigung zensierter Beobachtungen, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, der Aufbau der Modelle entspricht Tabelle 7

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	0,80	0,19	< 0,001
2. adjustiert nach: Geburtsgewicht	0,36	0,20	0,069
3. + Hirnblutung (ordinal)	0,27	0,19	0,151
4. + Verdacht auf Frühinfektion	0,01	0,19	0,959
5. + Atemnotsyndrom (ordinal)	0,06	0,19	0,776
6. + Nabelvenenkatheter	0,08	0,19	0,683
7. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	0,05	0,20	0,812

Zur Kontrolle der Residuen und der Validität des Modells wurde zusätzlich mit der **logarithmierten Liegedauer** (Tabelle 9) gerechnet, was die Ergebnisse bestätigte.

4.7 Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen

Das **erste Modell** (Tabelle 10) stellt den Einfluss der Confounder auf die Dauer der **Antibiotikatherapie von Spätinfektionen [d]** während des Erstaufenthaltes im Krankenhaus dar. Die Variablen Geburtsgewicht, Schwangerschaftswoche, Geburtskopfumfang und Geburtslänge korrelieren untereinander. In diesem Modell hat das Geburtsgewicht jedoch keine Confoundereigenschaften. Deshalb wurde die Schwangerschaftswoche als Modellvariable ausgewählt. Durch die Korrelationen können der Geburtskopfumfang und die Geburtslänge nicht aufgenommen werden. Weitere Parameter im Modell sind Grad des Atemnotsyndroms, Grad der Hirnblutung und CrP zur Geburt > 5 mg/l. So ergeben sich sechs Modellvariablen. In Bezug auf die Parameter Schwangerschaftswoche und Grad der

4. Ergebnisse

Hirnblutung unterscheiden sich EcN- und Kontrollgruppe statistisch signifikant. Die **Stichprobengröße** von 93 Kindern erklärt sich durch einen fehlenden Wert für den Parameter CrP zur Geburt > 5 mg/l.

Tabelle 10: Endpunkt Antibiotikatherapie Spätinfektion [d] (n=93), lineare Regression, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, 3. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche und Atemnotsyndrom (ordinal), 4. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, Atemnotsyndrom (ordinal) und Hirnblutung (ordinal), 5. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, Atemnotsyndrom (ordinal), Hirnblutung (ordinal) und CrP zur Geburt > 5 mg/l

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	6,8	2,1	0,002
2. adjustiert nach: Schwangerschaftswoche	3,7	2,2	0,098
3. + Atemnotsyndrom (ordinal)	4,1	2,2	0,064
4. + Hirnblutung (ordinal)	3,6	2,2	0,100
5. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	4,4	2,3	0,064

Im **ersten Endmodell** (Tabelle 10) wird deutlich, dass Spätinfektionen bei EcN-Patienten 4,4 Tage länger als bei Kontrollpatienten behandelt wurden. Vor der Adjustierung ergab sich eine längere Therapiedauer von 6,8 Tagen. Das Ergebnis des Endmodells ist mit einem p-Wert von 0,064 nicht statistisch signifikant. Tendenziell benötigen die **EcN-Patienten** jedoch eine **längere Antibiotikatherapie bei Spätinfektionen** als die Patienten der Kontrollgruppe. Das **zweite Modell** (Tabelle 11) veranschaulicht den Einfluss der Confounder auf die Dauer der **Antibiotikatherapie von Spätinfektionen [d] bis zu einem Gewicht von 1800 g**. Es setzt sich aus den Variablen Schwangerschaftswoche, Grad des Atemnotsyndroms, Grad der Hirnblutung, CrP zur Geburt > 5 mg/l und dem Status Erstgebärende oder Mehrgebärende zusammen. Damit ergeben sich sieben Variablen. Das Geburtsgewicht hat in diesem Modell ebenfalls keine Confoundereigenschaften. In Bezug auf die Parameter Schwangerschaftswoche und Grad der Hirnblutung unterscheiden sich EcN- und Kontrollgruppe statistisch signifikant. Die **Stichprobengröße** von 93 Kindern erklärt sich durch einen fehlenden Wert für den Parameter CrP zur Geburt > 5 mg/l.

Tabelle 11: Endpunkt Antibiotikatherapie Spätinfektion bis 1800 g [d] (n=93), lineare Regression, der Koeffizient bezieht sich auf die EcN-Gruppe mit der Kontrollgruppe als Referenz, 1. Modell: unadjustiert, 2. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, 3. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche und Atemnotsyndrom (ordinal), 4. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, Atemnotsyndrom (ordinal) und Hirnblutung (ordinal), 5. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, Atemnotsyndrom (ordinal), Hirnblutung (ordinal) und CrP zur Geburt > 5 mg/l, 6. Modell: adjustiert nach Schwangerschaftswoche, Atemnotsyndrom (ordinal), Hirnblutung (ordinal), CrP zur Geburt > 5 mg/l und Erstgebärende

4. Ergebnisse

Modell	Koeffizient	Standardfehler	p-Wert
1. EcN (unadjustiert)	4,6	1,2	< 0,001
2. adjustiert nach: Schwangerschaftswoche	1,9	1,2	0,102
3. + Atemnotsyndrom (ordinal)	2,2	1,2	0,058
4. + Hirnblutung (ordinal)	2,0	1,2	0,088
5. + CrP zur Geburt > 5 mg/l	3,0	1,2	0,015
6. + Erstgebärende	2,4	1,2	0,052

Im **zweiten Endmodell** (Tabelle 11) wird deutlich, dass Spätinfektionen bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g bei EcN-Patienten 2,4 Tage länger als bei Kontrollpatienten behandelt wurden. Unadjustiert ergab sich eine längere Therapiedauer von 4,6 Tagen. Das Ergebnis des Endmodells ist mit einem p-Wert von 0,052 nicht statistisch signifikant. Es zeigt jedoch die Tendenz, dass **EcN-Patienten bis zum Gewicht von 1800 g eine längere Antibiotikatherapie bei Spätinfektionen** benötigen als die Patienten der Kontrollgruppe.

Die **Residuenzuverlässigkeit** weicht in **beiden Modellen** von der Normalverteilung ab. Daher müssen die Modelle zur Antibiotikatherapie im Vergleich zu den Modellen der anderen Endpunkte als weniger zuverlässig beurteilt werden.

4.8 Propensity Score

4.8.1 Charakteristik des Propensity Scores

Die Bildung des Propensity Scores erfolgte durch eine **logistische Regression** mit den Variablen Geburtsgewicht, Hirnblutung, Atemnotsyndrom, Nabelvenenkatheter, CrP zur Geburt > 5 mg/l und Verdacht auf Frühinfektion zur **Vorhersage (a posteriori) der Behandlung mit EcN**.

Die 27 Patienten mit dem höchsten Propensity Score sind in Abbildung 2 aufgelistet. Ein **hoher Propensity Score** bedeutet hier, dass **der Patient aufgrund seiner Merkmale mit einer hohen Wahrscheinlichkeit EcN erhalten hätte**.

Unter den Patienten der Kontrollgruppe lag der Maximalwert bei 0,91 (Identifizier = ID 48). Bei einem Matchbereich von 0,05 konnten damit keine Patienten der EcN-Gruppe mit einem Propensity Score größer als 0,96 zugeordnet werden. Zehn Patienten der EcN-Gruppe hatten einen Propensity Score größer 0,96. Da der Kontrollpatient mit dem zweitgrößten Propensity Score einen Wert von 0,81 (ID 47) aufwies, wurde beim Matchen mit Zurücklegen der Patient ID 48 der Kontrollgruppe gleich 13 Patienten der EcN-Gruppe zugeordnet. Beim Matchen ohne Zurücklegen wurde der Patient ID 48 der Kontrollgruppe nur dem Patienten ID 74 der EcN-Gruppe zugeordnet; die anderen zwölf Patienten der EcN-Gruppe blieben in diesem Fall ohne Zuordnung.

4. Ergebnisse

Geburts- gewicht [g]	CRP zur Geburt > 5 mg/l	Hirn- blutung	Atemnot- syndrom	Nabel- venen- katheter	Verdacht auf Früh- infektion	Propensity Score	Mutaflor	ID des nächsten Nachbarn	Identifizier (ID)
1190	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.806	nein	69	47
1180	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.814	ja	47	69
1490	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.843	ja	47	70
820	nein	ja	Grad 2,5 - 4	nein	ja	.895	ja	48	71
1030	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.902	ja	48	72
1380	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.907	ja	48	73
1030	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.908	ja	48	74
1010	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.911	nein	74	48
1360	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.915	ja	48	75
650	nein	nein	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.916	ja	48	76
985	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.926	ja	48	77
970	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.927	ja	48	78
980	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.928	ja	48	79
965	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.929	ja	48	80
960	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.930	ja	48	81
550	nein	nein	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.949	ja	48	82
880	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.954	ja	48	83
845	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.961	ja		84
800	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.969	ja		85
785	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.972	ja		86
770	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.974	ja		87
740	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.979	ja		88
720	nein	ja	Grad 2,5 - 4	ja	ja	.980	ja		89
720	nein	nein	Grad 1 - 2	ja	ja	.981	ja		90
990	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.988	ja		91
960	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.989	ja		92
842	nein	ja	Grad 1 - 2	ja	ja	.994	ja		93
27	27	27	27	27	27	27	27	17	27

Abbildung 2: Tabelle zur Berechnung des Propensity Scores; Zuordnung beim 1-1 Matchen mit Zurücklegen bei einem Matchbereich von 0,05 für die 27 Personen mit dem höchsten Propensity Score

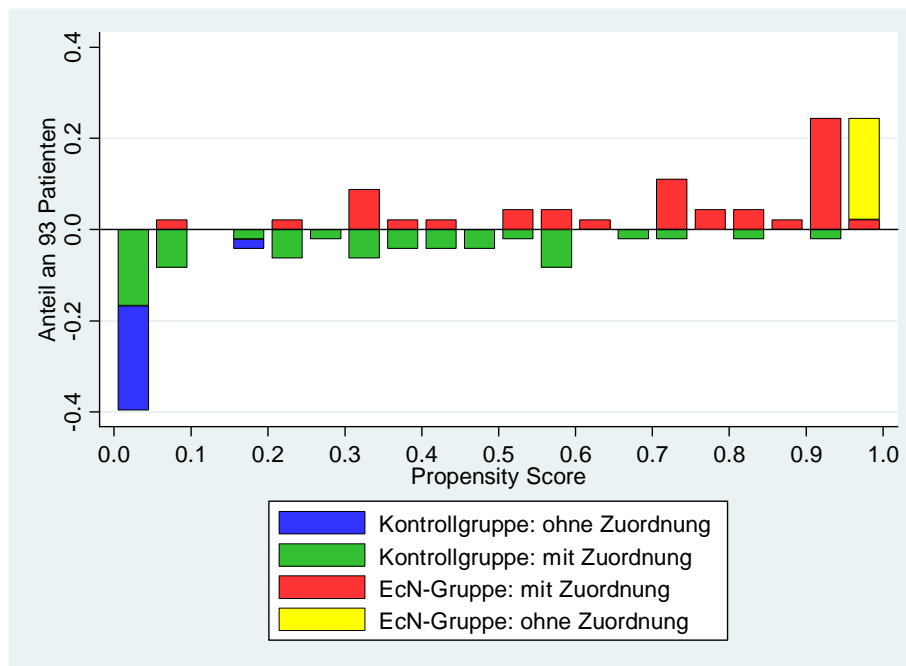


Abbildung 3: Vergleich der Propensity Scores aller Patienten; n=93

So gering war die Überschneidung der Patienten der EcN- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Propensity Scores nur in den **Randbereichen** (siehe Abbildung 3). In der Mitte der Verteilung war eine Zuordnung besser möglich.

4.8.2 Genauigkeit des Propensity Scores

ROC-Kurven (kurz für receiver operating curve) drücken die Beziehungen zwischen Sensitivität und Spezifität für einen bestimmten Test aus. Die **Gesamtgenauigkeit eines Tests** kann als **Fläche unter der ROC-Kurve** beschrieben werden. Je größer die Fläche ist, desto genauer ist der Test. Die Diagonale in der ROC-Grafik kennzeichnet den Verlauf einer möglichen ROC-Kurve für einen Test, der keine Informationen liefert [Fletcher et al., 1999: 69-72]. Für die **Berechnung des Propensity Scores** in der vorliegenden Studie betrug die Fläche unter der ROC-Kurve 0,91. Aufgrund eines fehlenden CrP-Wertes zur Geburt konnten statt von 94 Personen, wie in den deskriptiven Statistiken (Tabelle 1), nur von 93 Personen der Propensity Score ermittelt werden.

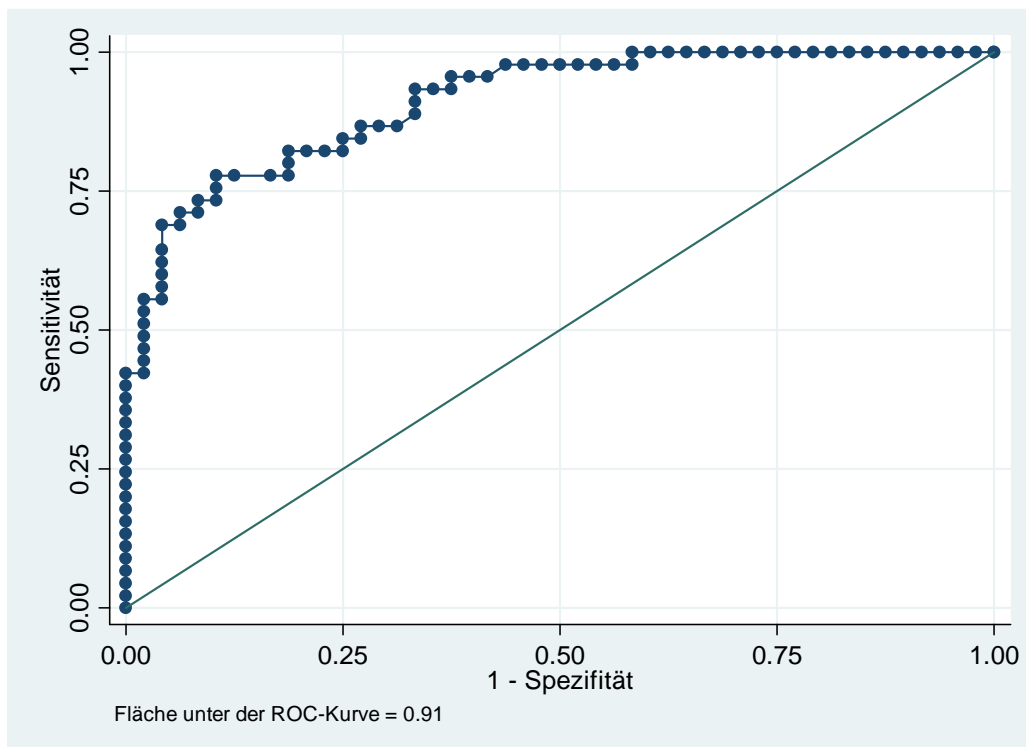


Abbildung 4: ROC-Kurve für den Propensity Score; n=93; logistische Regression mit den Variablen Geburtsgewicht, Hirnblutung (dichotom), Atemnotsyndrom (ordinal), Nabelvenenkatheter, CrP zur Geburt > 5 mg/l und Verdacht auf Frühinfektion zur Vorhersage der Behandlung mit EcN

4.8.3 Propensity Score Matchen mit und ohne Zurücklegen

Beim **Matchen mit Zurücklegen** konnten für die Matchbereiche (= Caliperweite des Propensity Scores) von **0,05; 0,025 bzw. 0,01** Unterschied in den Wahrscheinlichkeiten des Propensity Scores **35, 30 bzw. 17 Paare** gebildet werden, beim **Matchen ohne Zurücklegen**

4. Ergebnisse

waren es **16, 15 bzw. 10 Paare**.

Um die **Unterschiede zwischen der EcN- und Kontrollgruppe vor und nach dem Matchen** zu vergleichen, wird mit der Änderung in der Differenz, aber nicht mit der Änderung in den p-Werten argumentiert. Dafür gibt es drei Gründe: **1.** Zwei p-Werte lassen sich nicht vergleichen, weil in den p-Wert zwei Größen einfließen: Stichprobenumfang und Genauigkeit [Rothman, 2002]. **2.** Der Stichprobenumfang ist verschieden ($n = 94$ vor dem Matchen, $n \leq 70$ nach dem Matchen). **3.** Generell ist ein Vergleich zweier Tests problematisch und durch einen neuen Test zu ersetzen.

Die Differenzen zwischen der EcN- und der Kontrollgruppe nach dem Propensity Score-Matchen sind für das **Matchen mit Zurücklegen** und **Matchbereiche von 0,05 und 0,01** in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Deskriptive Statistiken der EcN- und Kontrollgruppe für verschiedene Matchbereiche nach Propensity Score Matchen mit Zurücklegen, Angabe in %, Variablen des Propensity Scores grau hinterlegt

Parameter	Matchbereich = 0,05 mit Zurücklegen			Matchbereich = 0,01 mit Zurücklegen		
	EcN-Gruppe		p-Wert	EcN-Gruppe		p-Wert
	nein (n=35)	ja (n=35)		nein (n=17)	ja (n=17)	
Geschlecht (weiblich)	14,3 %	42,9 %	0,747	23,5 %	29,4 %	0,596
Mehrling	45,7 %	34,3 %	0,142	41,2 %	47,1 %	0,796
Geburtsgewicht [g]	1167	1118	0,388	1203	1211	0,358
Nabelschnur-pH zur Geburt	7,26	7,31	0,004	7,28	7,31	0,059
APGAR nach 5. Minute	8,6	8,5	0,900	8,8	8,6	0,445
Schwangerschaftswoche	28,7	28,9	0,279	28,8	29,2	0,180
Blasensprung > 24 h vor Geburt	0 %	2,9 %	---	0 %	0 %	(1)
Geburtsmodus (Sectio)	100 %	100 %	(1)	100 %	100 %	(1)
Amnioninfektionssyndrom	0 %	8,6 %	0,040	0 %	11,8 %	0,260
Tokolyse	42,9 %	60,0 %	0,015	41,2 %	70,6 %	0,136
Hirnblutung (dichotom)	60,0 %	37,1 %	< 0,001	47,1 %	23,5 %	0,019
Atemnotsyndrom (ordinal)						
kein (Referenz)	11,4 %	14,3 %		17,7 %	17,6 %	
Grad 1-2	22,9 %	34,3 %	1,000	29,4 %	47,1 %	0,363
Grad 2,5-4	65,7 %	51,4 %	0,806	52,9 %	35,3 %	0,239
Verdacht auf Frühinfektion	100 %	97,1 %	0,321	100 %	100 %	(1)
erwiesene Frühinfektion	80,0 %	65,7 %	0,533	64,7 %	64,7 %	0,236
CrP zur Geburt > 5 mg/ l	2,9 %	2,9 %	0,169	5,9 %	5,9 %	0,850
Antibiotikatherapie Frühinfektion						
[Tage]	5,6	4,9	0,729	4,8	5,5	0,187
[Zyklen]	1,0	1,0	0,321	1,0	1,0	---
Nabelvenenkatheter	71,4 %	77,1 %	0,008	58,8 %	70,6 %	0,285
Nabelarterienkatheter	0 %	17,1 %	0,020	0 %	11,8 %	0,260
Intubation	88,6 %	77,1 %	0,042	88,2 %	64,7 %	0,012
Nahrung						
Frauen-/ Muttermilch (Ref.)	94,3 %	85,7 %		88,2 %	70,6 %	
Formulanahrung	0 %	14,3 %	< 0,001	0 %	29,4 %	< 0,001
keine enterale Nahrung	5,7 %	0 %	0,156	11,8 %	0 %	0,214

4. Ergebnisse

Alter der Mutter [Jahre]	30,2	28,2	0,119	29,0	29,7	0,365
Erstgebärende	60,0 %	71,4 %	0,006	70,6 %	70,6 %	0,150
Mutter Raucherin in der Schwangerschaft	5,7 %	31,4 %	< 0,001	11,8 %	23,5 %	0,428

Bei einem **Matchbereich von 0,05** hat sich im Vergleich zu den deskriptiven Statistiken (Tabelle 1; Abschnitt 4.1.1) die Differenz verringert: Diese beträgt für das Geburtsgewicht nach dem Matchen 49 g statt 220 g vor dem Matchen. Auch für die anderen Variablen des Propensity Scores ist der Unterschied geringer. Aufgrund der statistischen Abhängigkeiten zwischen den Unterschieden vor und nach dem Matchen wird zusätzlich statt eines Tests das **Bias** [Rosenbaum und Rubin, 1985] zur Einschätzung herangezogen, wie sich beide **Gruppen vor und nach dem Matchen unterscheiden**. Dabei bedeuten große Werte einen großen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Insgesamt konnte für die **Variablen des Propensity Score-Matchens** eine **deutliche Verringerung des Bias** von 67,4 % vor dem Matchen auf 21,6 % nach dem Matchen festgestellt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: standardisiertes Bias für den Unterschied zwischen EcN- und Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Match-Methode und der Auswahl an Variablen

berücksichtigte Variablen	Match-Bereich	Median der Verteilung des Absolutwertes des standardisierten Bias [%]	
		vor dem Matchen	nach dem Matchen
<i>Matchen mit Zurücklegen</i>			
Variablen des Propensity Scores	0,05	67,4	21,6
	0,025	67,4	15,5
	0,01	67,4	27,4
Variablen aus Tabelle 12	0,05	32,9	26,5
	0,025	32,9	25,1
	0,01	32,9	20,3
<i>Matchen ohne Zurücklegen</i>			
Variablen des Propensity Scores	0,05	67,4	19,7
	0,025	67,4	20,0
	0,01	67,4	12,9
Variablen aus Tabelle 12	0,05	32,9	23,7
	0,025	32,9	26,4
	0,01	32,9	21,3

Für Variablen, die **nicht in den Propensity Score aufgenommen** wurden, haben sich die Unterschiede teils ebenfalls verringert (Schwangerschaftswoche, Blasensprung > 24 h vor Geburt, Intubation, Nabelarterienkatheter, erwiesene Frühinfektion, Antibiotikatherapie

Frühinfektion [d], Erstgebärende), teils aber auch vergrößert (Geschlecht, Mehrling, Nabelschnur-pH zur Geburt, Amnioninfektionssyndrom, Formulanahrung, keine enterale Nahrung, Rauchen in der Schwangerschaft).

Durch das Matchen wurde das Bias bei allen in Tabelle 12 aufgeführten Variablen im Median von 32,9 % auf unter 30 % gesenkt. Den **geringsten Unterschied zwischen EcN- und Kontrollgruppe** bei den wichtigsten Variablen (denen des Propensity Scores) ergab das **Matchen ohne Zurücklegen im Bereich von 0,01**.

Unterschiede zwischen verschiedenen Matchbereichen sind aus Tabelle 12 zu ersehen. Der engere Matchbereich von 0,01 führte zur Auswahl schwererer Frühgeborener, in beiden Gruppen war das männliche Geschlecht überrepräsentiert. Hirnblutungen waren nach dem Matchen in der Kontrollgruppe häufiger.

4.8.4 Propensity Score Matchen für den Endpunkt Spätinfektion

Nach Bildung des Propensity Scores und Matchen der Patienten von EcN- und Kontrollgruppe ist eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Gruppen gegeben. Die **Häufigkeit** des Auftretens von **Spätinfektionen** kann nun in **Abhängigkeit des Matchverfahrens** und der **Größe des Matchbereiches** verglichen werden: Dabei ist anzumerken, dass das Matchen ohne Zurücklegen und die Wahl eines engen Matchbereiches zu einer deutlichen Reduktion der Stichprobe führen (im Extremfall Stichprobengröße von insgesamt 20 Patienten). Dies schränkt die Repräsentativität der Ergebnisse ein.

Tabelle 14: Anteil an Spätinfektionen in der EcN- und der Kontrollgruppe sowie Odds Ratios (95 %-Konfidenzintervalle) für unabhängige (ungematchte Beobachtungen) bzw. abhängige (gematchte Beobachtungen) Stichproben

Match-Methode	Match-Bereich	n	EcN-Gruppe	Kontrollgruppe	Odds Ratio	p-Wert
ungematcht		93	44,4 %	8,3 %	8,8 (2,7 – 28,6)	< 0.001
1:1 mit Zurücklegen	0,05	35 Paare	42,9 %	45,7 %	0,9 (0,3 – 2,4)	0,796
	0,025	30 Paare	40,0 %	46,7 %	0,7 (0,2 – 2,3)	0,566
	0,01	17 Paare	41,2 %	47,1 %	0,7 (0,1 – 4,0)	0,657
1:1 ohne Zurücklegen	0,05	16 Paare	37,5 %	18,8 %	2,5 (0,5 – 12,9)	0,273
	0,025	15 Paare	26,7 %	20,0 %	1,5 (0,3 – 9,0)	0,657
	0,01	10 Paare	20,0 %	30,0 %	0,5 (0,05 – 5,5)	0,571

Im Vergleich zur Ausgangssituation ist jedoch nach dem Matchen anhand des Propensity Scores ein **Trend der Angleichung der Rate von Spätinfektionen** in beiden Gruppen zu erkennen. Die Odds Ratio für Spätinfektionen in der EcN-Gruppe sinkt deutlich ab.

Die Abbildungen 5 und 6 veranschaulichen diesen Zusammenhang grafisch: Ein indifferenter

bzw. leicht protektiver Effekt von EcN hinsichtlich des Auftretens einer Spätinfektion ist bei der Wahl eines engen Matchbereiches und Matchen ohne Zurücklegen am deutlichsten zu erkennen.

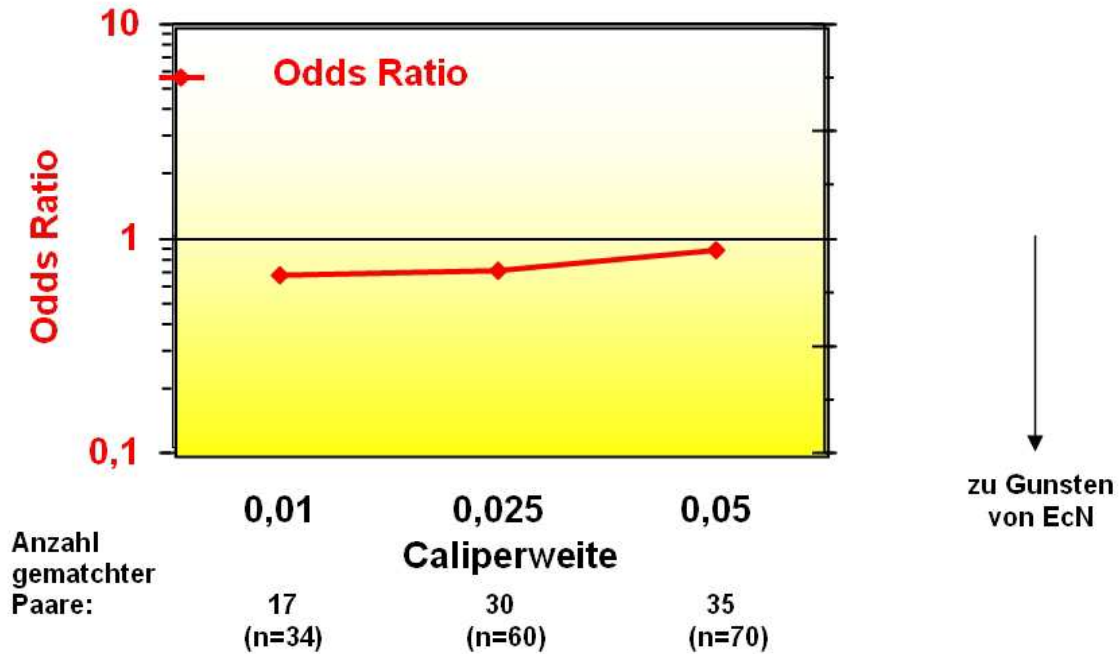


Abbildung 5: Effektschätzer für Spätinfektionen als Funktion der Caliperweite; 1:1 Matchen mit Zurücklegen

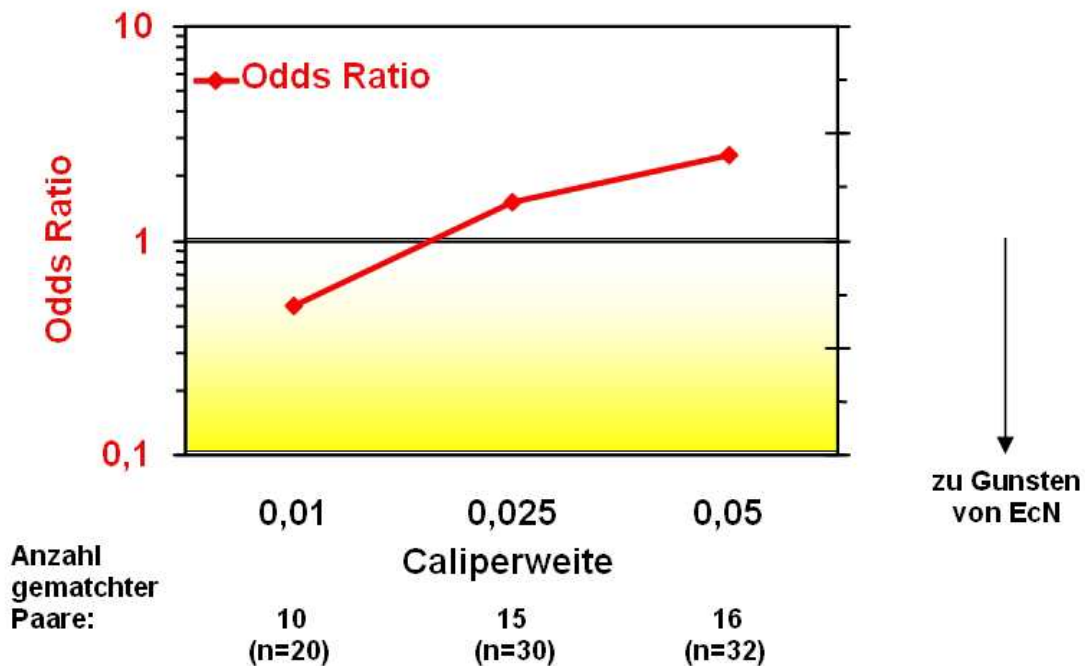


Abbildung 6: Effektschätzer für Spätinfektionen als Funktion der Caliperweite; 1:1 Matchen ohne Zurücklegen

4.8.5 Propensity Score Matchen für den Endpunkt Antibiotikatherapie

Analog zum Endpunkt Spätinfektion kann die **Notwendigkeit der antibiotischen Therapie von Spätinfektionen** nach dem Matchen anhand des Propensity Scores in der EcN- und Kontrollgruppe verglichen werden: Es zeigt sich ein **Trend zu einer kürzeren Behandlungsdauer in der EcN-Gruppe** und einer **zunehmenden Behandlungsdauer in der Kontrollgruppe** (Tabelle 15). So ergibt sich ein geringerer Unterschied der Dauer einer antibiotischen Therapie von Spätinfektionen. Dennoch ist die Therapiedauer nach dem Matchen in der EcN-Gruppe deutlich länger als in der Kontrollgruppe. Es scheint also in der **EcN-Gruppe** eine längere **antibiotische Behandlung von Spätinfektionen** erforderlich zu sein.

Tabelle 15: Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen [d]; Mittelwert \pm Standardabweichung sowie p-Wert des t-Tests für unabhängige (ungematchte Beobachtungen) bzw. abhängige (gematchte Beobachtungen) Stichproben

Match-Methode	Match-Bereich	n	EcN-Gruppe	Kontrollgruppe	p-Wert
ungematcht		93	7,5 \pm 14,3	0,7 \pm 2,6	0,002
1:1 mit Zurücklegen	0,05	35 Paare	5,9 \pm 8,9	2,4 \pm 2,6	0,028
	0,025	30 Paare	5,6 \pm 9,3	2,4 \pm 2,7	0,072
	0,01	17 Paare	5,6 \pm 9,9	2,5 \pm 2,8	0,193
1:1 ohne Zurücklegen	0,05	16 Paare	6,0 \pm 10,2	1,1 \pm 2,3	0,090
	0,025	15 Paare	4,3 \pm 9,8	1,1 \pm 2,4	0,253
	0,01	10 Paare	3,2 \pm 6,7	1,7 \pm 2,8	0,508

Bei der Betrachtung des Endpunktes **antibiotische Therapie von Spätinfektionen bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g** (Tabelle 16) ergeben sich ähnliche Trends wie in Tabelle 15. Für den kleinsten Matchbereich beim Matchen ohne Zurücklegen ist jedoch **kaum noch ein Unterschied der Dauer der Antibiotikatherapie in beiden Gruppen** festzustellen. Vorbehaltlich der kleinen Stichprobengröße in diesem Beispiel kann vermutet werden, dass **EcN einen indifferenten Effekt** auf die **Notwendigkeit antibiotischer Therapie von Spätinfektionen** haben könnte.

Tabelle 16: Endpunkt Antibiotikatherapie Spätinfektion bis 1800 g [d]; Mittelwert \pm Standardabweichung sowie p-Wert des t-Tests für unabhängige (ungematchte Beobachtungen) bzw. abhängige (gematchte Beobachtungen) Stichproben

4. Ergebnisse

Match-Methode	Match-Bereich	n	EcN-Gruppe	Kontrollgruppe	p-Wert
ungematcht		93	5,3 ± 7,9	0,7 ± 2,6	< 0,001
1:1 mit Zurücklegen	0,05	35 Paare	5,0 ± 7,8	2,4 ± 2,6	0,060
	0,025	30 Paare	4,5 ± 8,0	2,4 ± 2,7	0,158
	0,01	17 Paare	4,3 ± 8,9	2,5 ± 2,8	0,392
1:1 ohne Zurücklegen	0,05	16 Paare	5,4 ± 9,8	1,1 ± 2,3	0,117
	0,025	15 Paare	3,7 ± 9,3	1,1 ± 2,4	0,324
	0,01	10 Paare	1,8 ± 3,9	1,7 ± 2,8	0,941

4.9 Mögliche nachteilige Effekte von EcN

4.9.1 Nachweis von *E. coli* im Trachealsekret

Während der Durchführung dieser Pilotstudie war den behandelnden Ärzten aufgefallen, dass im Unterschied zu den Erfahrungen vor der Verwendung von EcN häufiger *Escherichia coli* im Trachealsekret der Patienten nachgewiesen wurde. Da alle nachgewiesenen Keime erfasst worden waren, wurde diese Analyse durchgeführt, um einen Hinweis auf die **Nachweis-häufigkeit von EcN im Trachealsekret der EcN-Patienten** zu erhalten. Die Auswertung (Tabelle 17) erfolgte für 39 Patienten, bei denen diese mikrobiologische Untersuchung durchgeführt worden war. Eine Voraussetzung für die Abnahme des Trachealsekrets war die Intubation des Patienten. Anhand des Resistenzspektrums kann EcN jedoch nicht identifiziert werden (Abschnitt 3.2.2.7).

Tabelle 17: Untersuchung von Trachealsekret und Nachweis von *E. coli*, Angabe in % (Anzahl)

Parameter zum Trachealsekret	EcN		p-Wert
	nein	ja	
Untersuchung des Trachealsekrets (n=94)	26,5 % (13)	57,8 % (26)	0,003
Keimnachweis im Trachealsekret (n=39)	76,9 % (10)	73,1 % (19)	1,000
Nachweis von <i>E. coli</i> im Trachealsekret (n=39)	7,7 % (1)	53,8 % (14)	0,006

4.9.2 Nachweis von *E. coli* in der Blutkultur

Im Rahmen der Studie wurde bei **einem von 94 Patienten** in der anaeroben Blutkultur ein *Escherichia coli* Stamm nachgewiesen, dessen Resistenzspektrum dem von EcN entspricht. Der betroffene Patient war ein Frühgeborenes der 27+5 SSW, welches seit dem zweiten Lebenstag mit EcN behandelt worden war. Blutkulturen am Tag der Geburt und am 11. Lebenstag waren steril. Es wurde ein maximaler Anstieg der Entzündungswerte (IL-6 > 3000 pg/ ml) am 14. Lebenstag festgestellt. Der Nachweis des *E. coli* in der Blutkultur erfolgte am 15. Lebenstag. Am 21. Lebenstag wurde *Enterococcus faecium* in der Blutkultur nachgewiesen. Unter einer kalkulierten antibiotischen Therapie stabilisierte sich dieser Patient.

5 Diskussion

5.1 **Eigenschaften der EcN- und Kontrollgruppe**

Die deskriptiven Statistiken zeigen, dass sich die **EcN- und Kontrollgruppe in wichtigen Eigenschaften relevant unterscheiden**. Ursächlich dafür ist möglicherweise die fehlende Randomisierung dieser klinischen Pilotstudie. Erschwerend kommt hinzu, dass die Unterschiede fast ausschließlich den Nachteil der EcN-Gruppe bedeuten, was einen nachteiligen Einfluss des Medikaments vermuten ließe. Es ist jedoch anzunehmen, dass bevorzugt Patienten EcN erhalten haben, die z. B. durch Unreife, sehr niedriges Geburtsgewicht und bereits vorliegende Frühinfektionen stark infektionsgefährdet waren. Das Medikament wurde **ohne Randomisierung und Verblindung zur Infektionsprotektion** verordnet. In Abbildung 1 wird deutlich, dass ein Großteil der besonders unreifen und geringgewichtigen Frühgeborenen EcN erhalten hat, während bei den reiferen und höhergewichtigen Kindern die Kontrollpatienten überwiegen.

5.2 ***Escherichia coli* Stamm Nissle 1917**

Im Unterschied zu einigen Laktobazillen und Bifidusbakterien ist EcN bisher nur in **wenigen Studien als Probiotikum beim Frühgeborenen** untersucht worden. Damit ist es grundsätzlich schwer, Vergleiche zu anderen Studien herzustellen, da dort meist andere Bakterien verwendet wurden. Zusätzlich zu den Limitationen durch die fehlende Randomisierung gab es in dieser Pilotstudie keine Kolonisationsuntersuchungen. Dies bedeutet, dass nicht belegt werden kann, welche EcN-Patienten in welchem Zeitabschnitt des stationären Aufenthaltes mit EcN besiedelt waren, insbesondere nach Therapie mit Antibiotika. Dies erklärt sich durch die Empfindlichkeit von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 gegenüber allen Antibiotika, die gegen gramnegative Bakterien gerichtet sind. Dazu zählen insbesondere in der Neonatologie verwendete Breitbandantibiotika. Diese Präparate wurden ohne folgende Gabe von EcN bei einem Teil dieser Patienten eingesetzt. Alle Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen dieser Studie sind daher **vorbehaltlich der unklaren Kolonisation** zu sehen.

5.3 **Endpunkt Spätinfektion**

Auch nach Adjustierung weist die erhöhte Odds Ratio > 1 auf ein **größeres Spätinfektionsrisiko für EcN-Patienten** hin. Bei einem sehr weiten Konfidenzintervall für diese Odds Ratio ist die Aussagekraft jedoch als eingeschränkt zu beurteilen. Für diesen Endpunkt gibt es jedoch weitere Confounder, die durch die begrenzte Anzahl an Variablen nicht in das Modell aufgenommen werden konnten. Zusätzlich liegen starke Imbalancen zwischen der EcN- und Kontrollgruppe vor, wie man an den statistisch signifikanten Unterschieden in den deskriptiven Statistiken erkennen kann. Weiterhin wird deutlich, dass wichtige Confounder,

wie z. B. das Geburtsgewicht einen deutlichen Einfluss auf den Endpunkt haben, da die Adjustierung eine starke Reduktion der Odds Ratio zur Folge hat. Die **Einschätzung einer Spätinfektion**, wie sie in dieser Studie anhand **mehrerer Parameter** (erhöhte Entzündungsparameter, klinische Infektionszeichen, Erregernachweis, Diagnose in der Epikrise) vorgenommen wurde ist nur dann zuverlässig, wenn die **Einzelfaktoren eine hohe Reliabilität, Sensitivität und Spezifität** aufweisen: Das bedeutet z. B., dass sich die Probleme, welche mit der Interpretation von Laborwerten verbunden sind (für das IL-6 Abschnitt 5.4) indirekt auch auf die Zuverlässigkeit der Einschätzung einer Spätinfektion auswirken. Dabei ist zu den **Entzündungsparametern** festzustellen, dass diese nicht in jedem Fall spezifisch für eine Entzündungsreaktion sind. Dies gilt insbesondere für die in der Studie verwendeten Referenzbereiche von IL-6 und CrP, welche nach aktuellen Empfehlungen [Biermann, 2006; Roos, 2006] weniger streng ausgelegt werden. Dies bedingt in der vorliegenden Studie möglicherweise eine häufigere Feststellung von Spätinfektionen, als dies tatsächlich der Fall war. Denn unter Verwendung der „alten“ Referenzbereiche führten geringere Erhöhungen der Entzündungswerte, wie sie postnatal oder im Verlauf der Behandlung ohne Infektionserkrankung (z. B. bei Asphyxie, Atemnotsyndrom, Hirnblutungen [Jorch und Arenz, 2010: 534]) vorkommen, zur Diagnose einer Infektion, welche nach aktuellen Maßstäben nicht als solche diagnostiziert worden wäre. **Klinische Zeichen einer Infektion** sind in der Neonatologie ein wichtiges Hilfsmittel; ihre Reliabilität und Trennschärfe zu nicht infektiösen Erkrankungen ist jedoch von der individuellen Erfahrung und Aufmerksamkeit der behandelnden Ärzte und Schwestern abhängig. Der **Nachweis eines Erregers** im Zusammenhang mit einer neonatalen Früh- oder Spätinfektion ist nicht immer möglich, sodass eine Infektion auch bei negativen mikrobiologischen Untersuchungen vorliegen kann. Durch Verunreinigungen konnten umgekehrt auch Erreger nachgewiesen werden, ohne dass aktuell ein Infektionsgeschehen vorlag. Die **Diagnose in der Epikrise** ist als rückblickende Einschätzung der behandelnden Ärzte ein guter Anhaltspunkt. Dennoch gibt es auch hier individuelle Unterschiede, welche besonders bei Grenzfällen zum Ausdruck kommen. Ideal für eine klinische Studie wäre es, wenn die Einschätzung einer Infektion nach einheitlichen Kriterien durch möglichst wenige Personen erfolgen würde. Dies umzusetzen ist problematisch, da es u. a. keine einheitlichen Richtlinien für diese Einschätzung gibt.

Folgestudien zur Fragestellung der vorliegenden Pilotstudie sollten nach diesen Ergebnissen als **randomisierte, verblindete Multicenterstudie** geplant werden. Eine wesentlich größere Stichprobe sowie die Randomisierung und Verblindung sollten schweres Confounding

verhindern und auch vermeiden, dass stark infektionsgefährdete Patienten bevorzugt EcN erhalten. Bis dahin muss die **Möglichkeit in Betracht gezogen** werden, dass **mit EcN behandelte Patienten häufiger Spätinfektionen** erleiden.

Unter Berücksichtigung aktueller Metaanalysen zum Einsatz von Probiotika in der Neonatologie (Abschnitt 1.1.2) ist zu ergänzen, dass dort **keinerlei Effekte der Probiotika auf das Auftreten von Spätinfektionen** festgestellt werden konnten. Obwohl in diesen Studien andere Probiotika verwendet wurden, kann vermutet werden, dass die Entwicklung einer Spätinfektion von zahlreichen verschiedenen Faktoren abhängig ist und damit nicht allein durch den Einsatz von Probiotika beeinflusst werden kann.

5.4 Endpunkt Interleukin-6

Das Ergebnis des Modells deutet eine möglicherweise **häufigere Interleukin-6-Erhöhung ab dem fünften Lebenstag** bei den **EcN-Patienten** an. Erschwert wurde die Untersuchung dieser Fragestellung durch den kleinen Stichprobenumfang, sodass nur drei Variablen in das Modell einbezogen werden konnten. Diese Beschränkungen bewirken, dass in der Adjustierung **wichtige Confounder fehlen**. Weiterhin wäre es **nicht möglich** gewesen, den vorliegenden Endpunkt als **kontinuierliche Variable** zu untersuchen, da sich die gemessenen maximalen Interleukin-6-Werte ab dem fünften Lebenstag im Bereich von < 2 pg/ ml bis $> 40\,000$ pg/ ml bewegen. Für Folgestudien ist es zu empfehlen, dass der Lebenstag der Interleukin-6-Bestimmung und das Vorliegen einer Kolonisation mit EcN zu diesem Zeitpunkt dokumentiert werden, was bei dieser Studie noch nicht möglich war. Eine **sinnvolle Kategorienbildung** anhand der neuen Referenzbereiche (Abschnitt 3.2.2.3) für die Interpretation des IL-6 sollte die Auswertung in Folgestudien erleichtern. In der vorliegenden Pilotstudie wurde das IL-6 ausschließlich kurz nach der Geburt oder bei klinischem Infektionsverdacht bestimmt, sodass sich die **Häufigkeit und der Zeitpunkt der Untersuchung** dieses Laborwertes bei den einzelnen Patienten **stark unterscheiden**. Bei Anhalt für eine Infektion wurde das IL-6 nicht in jedem Fall bestimmt, sondern insbesondere bei foudroyant verlaufenden Erkrankungen. Dabei ist es als problematisch zu sehen, aus einem nicht gemessenen Wert bei klinischer Unauffälligkeit zu schließen, dass keine Erhöhung des Interleukin-6 vorlag. Deshalb wurden in diese Auswertung nur Patienten einbezogen, bei denen ein IL-6-Wert für das Outcome bekannt war. Dieses Verfahren führt allerdings zur Selektion von Patienten mit Infektionszeichen nach dem fünften Lebenstag. In **Folgestudien** müsste das **IL-6** daher zu **festen Zeitpunkten auch bei klinisch unauffälligen Patienten** bestimmt werden, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Dies würde zusätzliche Blutabnahmen bei Patienten erfordern, die durch ihre geringen Körpermaße und

die Frühgeborenenanämie Blutverluste schlecht kompensieren können. Zusätzliche „diagnostische Blutverluste“ könnten die häufigere Notwendigkeit von Erythrozytentransfusionen bedingen. Deshalb stellt sich grundsätzlich die Frage, ob das IL-6 als alleinstehender Parameter geeignet ist, Spätinfektionen zu identifizieren. Wie in Abschnitt 3.2.2.3 erläutert, besteht für die Feststellung erhöhter IL-6-Werte ein kurzes Zeitfenster, sodass Fehlbestimmungen bei Überschreiten dieses Zeitraumes möglich sind. Daher halten wir die Untersuchung des **CrPs im Verlauf im Zusammenhang mit klinischen Anhaltspunkten einer Infektion** für eine bessere Methode, Spätinfektionen im Rahmen einer solchen Studie zu identifizieren. Für die Untersuchung des CrPs sind ebenfalls „diagnostische Blutverluste“ zu berücksichtigen.

Zur **Aussagekraft des Modells** ist festzustellen, dass der Effekt des Confounders Geburtsgewicht deutlich wird, jedoch die bestehenden starken Imbalancen bei geringem Stichprobenumfang eine Betrachtung aller Confounder verhindern. Damit **kann bei diesem Endpunkt keine angemessene Adjustierung erfolgen**. Die Aussagekraft dieses Modells ist daher als eingeschränkt zu beurteilen.

5.5 Endpunkt Gewichtsentwicklung

Für die Fragestellung der Gewichtsentwicklung ergibt die Analyse, dass sich **die Gewichtszunahme vom 10. auf den 20. und vom 20. auf den 30. Lebensstag nach Adjustierung in beiden Gruppen kaum unterscheidet**.

Eine orientierende Berechnung des Anteils an der täglich zu erwartenden Gewichtszunahme (Abschnitt 4.5) ergibt für die Verhältnisse vor der Adjustierung in der EcN-Gruppe eine als relevant einzuschätzende geringere Gewichtszunahme, welche durch die Adjustierung deutlich reduziert wird. Dabei ist anzumerken, dass die **Gewichte** in unserer Klinik mit einer **Genauigkeit von 5 g-Schritten** angegeben werden. Die Unterschiede nach der Adjustierung befinden sich bereits unterhalb (10. bis 20. Lebensstag) bzw. knapp oberhalb (20. bis 30. Lebensstag) dieser Genauigkeit. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich die **Therapie mit EcN** zumindest in diesem Zeitraum **weder negativ noch positiv auf das Wachstum ausgewirkt hat**.

Es muss jedoch **erstens** berücksichtigt werden, dass die **Reliabilität der Gewichtsbestimmung** in dieser Pilotstudie nicht geprüft wurde: So sollte in Folgestudien zunächst eine Eichung aller verwendeten Waagen erfolgen. In der vorliegenden Studie wurden mit unterschiedlichen Waagen teilweise verschiedene Gewichte gemessen, was den Anmerkungen des Pflegepersonals in den Patientenakten zu entnehmen war. **Zweitens** ist nicht immer nachvollziehbar gewesen, welchen **Anteil medizinische Materialien**, wie z. B. Katheter,

Tube, Gipsverbände oder Stomabeutel, **am gemessenen Körpergewicht** hatten. Es wurde zwar oft dokumentiert, dass solche Materialien mit gewogen wurden, dies sollte jedoch standardisiert für alle Patienten in der gleichen Weise erfolgen bzw. sollte das Gewicht dieser Materialien möglichst abgezogen werden. Bei dem sehr niedrigen Körpergewicht von Frühgeborenen können sich sonst Verfälschungen ergeben. **Drittens** kann eine **Gewichtszunahme** sehr unterschiedliche Hintergründe haben und muss **nicht generell positiv bewertet** werden. So kann ein Ansteigen des Körpergewichts auch durch Ödembildung oder mangelnde Ausscheidung bei einer schweren Infektion des Patienten auftreten. Dies sollte man bei der Wertung der Gewichtsentwicklung berücksichtigen. **Viertens** bedingen die **unterschiedlichen Geburtsgewichte** der Patienten im Zusammenhang mit dem Gestationsalter zur Geburt **verschiedene zu erwartende Gewichtsentwicklungen** (Abschnitt 4.5.). Aufgrund statistischer Maßgaben konnte weder das Geburtsgewicht noch die Schwangerschaftswoche in der Adjustierung berücksichtigt werden, sodass durch die Unterschiede zwischen EcN- und Kontrollgruppe in den deskriptiven Statistiken eine Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten ist.

Für diese Pilotstudie kann die **Tendenz** erkannt werden, dass sich die **Therapie mit EcN nicht auf die Gewichtsentwicklung auswirkt**. Dies sollte jedoch in Folgestudien u. a. nach Optimierung des Studiendesigns (Abschnitte 5.3; 5.4) geprüft werden.

In aktuell vorliegenden Metaanalysen (Abschnitt 1.1.2) ist die Gewichtsentwicklung bisher nicht untersucht worden. Studien zum Nahrungsaufbau bis zum Erreichen vollständiger enteraler Ernährung zeigten jedoch teilweise einen schnelleren enteralen Nahrungsaufbau nach der Behandlung mit Probiotika.

5.6 Endpunkt Liegedauer

Die Untersuchung der Liegedauer auf der **Intensivstation** ergibt, dass **EcN-Patienten nach Adjustierung fast neun Tage länger** intensivmedizinisch betreut wurden als die Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist nicht statistisch signifikant, deutet aber die Erforderlichkeit einer längeren Intensivbehandlung bei EcN-Patienten an. Die Adjustierung bewirkt eine Reduktion der Intensivliegedauer der EcN-Patienten um etwa 70 %. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass durch die Unterschiedlichkeit der Gruppen eventuell weitere Confounder vorliegen, die in der Pilotstudie nicht identifiziert werden konnten. Eine Randomisierung kann dagegen bei einer größeren Stichprobe auch unbekannte Faktoren oder Confounder ausschalten [Fletcher et al., 1999: 179-180; Oakes und Kaufman, 2006: 377-389]. Weiterhin tritt eine verlängerte Intensivliegedauer nicht allein als Folge von Spätinfektionen auf, sondern kann z. B. auch durch nicht infektionsassoziierte respiratorische Erkrankungen des Frühgeborenen bedingt

sein. Der weiterhin vorhandene Unterschied von neun Tagen ist jedoch im Hinblick auf die durchschnittliche Behandlungsdauer auf der Intensivstation als relevant einzuschätzen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die **EcN-Patienten** in der vorliegenden Studie **länger als die Kontrollpatienten intensivmedizinisch betreut** werden mussten.

5.7 Endpunkt Antibiotikatherapie von Spätinfektionen

Die Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie von Spätinfektionen kann als **Anhaltspunkt für die Häufigkeit und Schwere von Spätinfektionen** gewertet werden. Die Adjustierung nach Confoundern ergibt eine Reduktion der Therapiedauer in der EcN-Gruppe. Dennoch ist für die EcN-Gruppe bis zur ersten Entlassung weiterhin eine etwa vier Tage länger dauernde Antibiotikatherapie erforderlich. Auch wenn nur der Zeitraum vom fünften Lebenstag bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g betrachtet wird, müssen die EcN-Patienten etwa zwei Tage länger behandelt werden. Dies ist möglicherweise durch die fehlende Berücksichtigung weiterer Confounder bedingt, da die gezielte Therapie stark infektionsgefährdeter Patienten mit EcN zu einer Selektion solcher Frühgeborener geführt hatte. Bis zur Überprüfung dieses Zusammenhanges in einer randomisierten Folgestudie kann nicht ausgeschlossen werden, dass **Spätinfektionen bei EcN-Patienten länger antibiotisch behandelt** werden müssen.

5.8 Nekrotisierende Enterokolitis

Die Diagnose „nekrotisierende Enterokolitis“ (NEC) wurde in der vorliegenden Studie für alle Patienten erfasst. Insgesamt haben **vier Patienten** der Stichprobe (n=94) diese Erkrankung erlitten. Den deskriptiven Statistiken (Tabelle 1) ist zu entnehmen, dass dies **ausschließlich Patienten der EcN-Gruppe** waren. In dieser nicht randomisierten Pilotstudie ist das sehr wahrscheinlich durch die gezielte Behandlung mit EcN von Patienten mit einem hohen Risiko für eine NEC zu erklären. Unter Berücksichtigung der geringen aktuellen Inzidenz der NEC in Deutschland (Abschnitt 1.1.2) war es mit der vorliegenden Stichprobe **nicht möglich, eine Aussage über die Beeinflussung der NEC-Inzidenz durch EcN** zu treffen.

Im Hinblick auf aktuelle Metaanalysen zum Einsatz von Probiotika in der Neonatologie (Abschnitt 1.1.2) ist das als problematisch zu betrachten, denn diese Studien zeigen an größeren Patientenzahlen überwiegend signifikant positive Effekte der Probiotika, als **Reduktion des Risikos eine NEC zu erleiden**. In diesen Studien wurden jedoch hauptsächlich Laktobazillen und Bifidusbakterien als Probiotika verwendet. EcN war in keiner Studie dieser Metaanalysen eingesetzt worden. Weiterhin war in diesen Studien eine Reduktion der Mortalität festzustellen. Die Beeinflussung der Mortalität wurde in der vorliegenden Studie u. a. aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht untersucht. Für Folgestudien mit EcN wäre es anzustreben, randomisierte, kontrollierte Studien mit größeren

Patientenzahlen durchzuführen, um Aussagen über die Beeinflussung des NEC-Risikos und der Mortalität zu treffen.

5.9 Propensity Score

Die Methode des Matchens anhand des Propensity Scores ist zusätzlich zu den genannten Adjustierungsverfahren eine Möglichkeit, die beiden nicht randomisierten Patientengruppen einander anzupassen. Dabei wird **anhand festgelegter Kriterien rückwirkend eine Randomisierung simuliert**. Eine „echte“ Randomisierung zu Beginn einer Studie ist dem Propensity Score-Matchen jedoch immer überlegen, da dort auch unbekannte Faktoren randomisiert werden. Diese Möglichkeit war in der vorliegenden Studie nicht mehr gegeben, sodass das Propensity Score-Matchen eine Alternative darstellte. Für die Bedingungen der vorliegenden Studie gelten **Propensity Score-Methoden der Adjustierung**, z. B. mittels logistischer Regression, **als überlegen** [Cepeda et al., 2003].

Die Bildung des Propensity Scores für jeden Patienten erfolgte anhand von sechs Variablen, welche vorher als Risikofaktoren für neonatale Infektionen identifiziert worden waren. Aufgrund der Heterogenität der EcN- und Kontrollgruppe waren die Propensity Scores, also die **Wahrscheinlichkeit, dass der Patient aufgrund seiner Merkmale mit EcN behandelt** wurde, in der EcN-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Daher war in den Randbereichen keine Zuordnung anhand des Propensity Scores möglich, sodass diese Patienten aus der Ausgangsstichprobe entfielen. Die **geringsten Verluste der Ausgangsstichprobe** ergaben sich bei einem **weiten Matchbereich** unter **Matchen mit Zurücklegen**. Dieses Verfahren bedingte jedoch auch eine gewisse Ungenauigkeit, da in den Außenbereichen von sehr niedrigem und sehr hohem Propensity Score Patienten mehrfach in die Auswertung eingingen und vom gematchten Partner teilweise stärker abwichen, als es bei einem engen Matchbereich der Fall gewesen wäre. Andererseits wurde die **Stichprobe** beim **Matchen ohne Zurücklegen** und einem **engen Matchbereich stark verkleinert**, sodass trotz der besseren Anpassung der zu matchenden Patienten eine Ungenauigkeit durch den Verlust vieler Patienten der Ausgangsstichprobe befürchtet werden muss. Damit ist die Repräsentativität der Ergebnisse auch hier eingeschränkt. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden.

In Tabelle 12 wird die **Veränderung der deskriptiven Statistiken** nach dem Propensity Score Matchen im Vergleich zur Ausgangsstichprobe (Tabelle 1) dargestellt. Für die vorher festgelegten sechs Variablen ist eine Angleichung zu sehen. Andere Variablen haben sich teilweise ebenfalls angeglichen oder weisen größere Unterschiede auf als in Tabelle 1. Dies unterstreicht die Tatsache, dass es sich nicht um eine echte Randomisierung handelt, da nur

nach bekannten Faktoren randomisiert werden konnte. Als solche ausgewählt wurden jedoch die Faktoren, die den stärksten Einfluss auf das Risiko einer Spätinfektion hatten. Deshalb ist das **vorliegende Propensity Score-Modell** für den gewählten Endpunkt einer Spätinfektion **als repräsentativ** zu betrachten. Zur zusätzlichen Einschätzung der beiden Patientengruppen vor und nach dem Matchen wurde das **standardisierte Bias** verwendet, welches sowohl unter Berücksichtigung der sechs Variablen des Propensity Scores als auch unter Berücksichtigung aller Variablen aus Tabelle 12 **nach dem Matchen** reduziert wurde.

Beim Matchen ohne Zurücklegen mit dem engsten Matchbereich anhand der Variablen des Propensity Scores wurde das geringste standardisierte Bias erreicht. Unter diesen Bedingungen war die Stichprobe mit nur zwanzig Patienten jedoch auch am kleinsten. Daher ist dieses Ergebnis mit Vorsicht zu interpretieren. Nach Bildung des Propensity Scores wurden beide Gruppen für die Endpunkte Spätinfektion und Antibiotikatherapie von Spätinfektionen untersucht.

5.9.1 Propensity Score für den Endpunkt Spätinfektion

Im Unterschied zur Adjustierung mittels logistischer Regression ist beim Matchen anhand des Propensity Scores eine **deutliche Reduktion der Odds Ratio** für das Auftreten einer **Spätinfektion** festzustellen. Beim **Matchen mit Zurücklegen** ist in allen Matchbereichen ein leicht protektiver Effekt (Odds Ratio < 1) der Behandlung mit EcN für das Auftreten von Spätinfektionen im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant. Im Unterschied zur Adjustierung ist die Stichprobe in diesem Fall mit maximal 70 Patienten deutlich kleiner. Dadurch können sich Verzerrungseffekte ergeben. Beim **Matchen ohne Zurücklegen** sind die Odds Ratios für das Auftreten von Spätinfektionen je nach Matchbereich verschieden. Ein protektiver Effekt kann nur für die kleinste Stichprobe mit dem engsten Matchbereich festgestellt werden. Aufgrund der Heterogenität dieser Ergebnisse kann keine **sichere Aussage zu einem protektiven oder negativen Effekt von EcN** für das Auftreten von Spätinfektionen getroffen werden.

5.9.2 Propensity Score für den Endpunkt Antibiotikatherapie

Nach der Adjustierung mittels linearer Regression wurde sowohl für die Antibiotikatherapie von Spätinfektionen bis zur Entlassung als auch bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g eine **zwei bis vier Tage längere Therapiedauer für EcN-Patienten** gefunden. Im Vergleich dazu zeigen sich nach dem Matchen anhand des Propensity Scores weiterhin **längere Behandlungszeiten der EcN-Gruppe** mit zwei bis fünf Tagen je nach Matchmethode und Matchbereich. Auch der Trend zu etwas kürzeren Behandlungszeiten der EcN-Patienten bis zum Erreichen eines Gewichtes von 1800 g, verglichen mit dem

Gesamtaufenthalt, ist hier zu erkennen. Bei der Untersuchung der Behandlungsdauer bis zum Erreichen von 1800 g beim Matchen ohne Zurücklegen mit dem engsten Matchbereich sind die Behandlungszeiträume in EcN- und Kontrollgruppe fast gleich. Diese Stichprobe von 20 Patienten ist jedoch sehr klein und die Ergebnisse sind nicht signifikant. Anhand dieser Ergebnisse ist daher **unklar**, ob die Behandlung mit **EcN mit der Notwendigkeit längerer antibiotischer Therapien von Spätinfektionen** assoziiert ist. Ein indifferenter Effekt von EcN ist möglich, muss jedoch in Folgestudien überprüft werden.

5.10 Mögliche nachteilige Effekte von EcN

Für *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 sind bisher kaum nachteilige Einflüsse auf Patienten beschrieben. In der aktuellen Fachinformation [Ardeypharm, 2008] werden sehr selten **abdominelle Beschwerden** (Blähungen, Durchfall, Erbrechen, abdominelle Schmerzen) als Folge einer Überdosierung sowie sehr selten **allergische Reaktionen** beschrieben. Außerdem wird von vereinzelt aufgetretenen **septischen Infektionen bei sehr unreifen Frühgeborenen** berichtet. Dazu existiert bisher nur ein veröffentlichter Fallbericht [Guenther et al., 2010]. Hinsichtlich einer Besiedlung der **Atemwege durch EcN** gibt es bisher keine Publikationen.

5.10.1 Nachweis von *E. coli* im Trachealsekret

Im Verlauf dieser Pilotstudie war aufgefallen, dass *Escherichia coli* häufiger als vor Studienbeginn im Trachealsekret der Patienten nachgewiesen wurde. Grundsätzlich ist ein Keimnachweis aus dem Trachealsekret als Anhaltspunkt für eine pulmonale Infektion zu sehen, da das Trachealsekret im Normalfall steril ist. Die ungewohnte Häufung dieses Erregernachweises insbesondere bei Patienten, welche zuvor probiotisch mit EcN behandelt worden waren, führte zu der **Vermutung, dass es sich um EcN handeln könnte**. Wie in Abschnitt 3.2.2.7 erklärt, konnte in dieser Pilotstudie jedoch **keine Identifikation von EcN** erfolgen. Eine Untersuchung des Trachealsekrets wurde in der EcN-Gruppe deutlich häufiger vorgenommen als bei den Kontrollpatienten. Dies wird durch eine höhere Intubationsrate in der EcN-Gruppe mitbegründet. Die Häufigkeit eines Keimnachweises im Trachealsekret ist prozentual in beiden Gruppen etwa gleich. *Escherichia coli* wurde jedoch in der EcN-Gruppe signifikant häufiger im Trachealsekret nachgewiesen als in der Kontrollgruppe. Ob es sich bei diesen *E. coli* um EcN handelte, bleibt in dieser Studie ungeklärt.

Weiterhin ist nicht bekannt, warum ***E. coli* derart häufig im Trachealsekret** nachgewiesen werden konnte: Zur Gewinnung des Trachealsekrets wurden **geschlossene Absaugsysteme** verwendet, sodass eine Kontamination durch Kontakt mit dem Nasen-Rachen-Raum der Patienten unwahrscheinlich ist. Die Applikation des Probiotikums erfolgte in den ersten fünf Lebenstagen ausschließlich über die Magensonde, sodass eine Besiedlung des Nasen-Rachen-

Raums nur nach Regurgitation der EcN-Suspension möglich ist. Eine anschließende **Verbreitung der beweglichen Bakterien** (Flagellen [Blum-Oehler G, 2001]) über die **Tubusoberflächen** in die Lunge erscheint zumindest möglich. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, hat EcN eine ausgeprägte Fähigkeit zur **Biofilmbildung**. Weiterhin wäre es denkbar, dass EcN über das Blut in die Lunge gelangen könnte. Dieser Theorie widerspricht jedoch der **seltene Nachweis von *E. coli* in Blutkulturen** in dieser Studie sowie die **Serumsensitivität** des Bakteriums [Grozdanov et al., 2002].

Für die Folgestudie wäre es deshalb erstens zu empfehlen, dass die Keimnachweise im Trachealsekret in Abhängigkeit vom Lebenstag erfasst werden. Zweitens sollte dokumentiert werden, auf welchem Weg die Suspension jeweils appliziert wurde. Drittens sollte die Besiedlung des Darms mit EcN durch Kolonisationsanalysen überprüft und auch zeitlich erfasst werden.

Die vorliegende Studie erlaubt die **Vermutung**, dass die **Kontamination des Trachealsekrets mit *E. coli* durch die Applikation von EcN** bedingt ist. Es stellt sich nun die Frage, ob es sich tatsächlich um EcN handelt, wie es zur Kontamination kommt und auf welche Weise diese verhindert werden kann.

5.10.2 Nachweis von *E. coli* in der Blutkultur

Der Bericht eines Perinatalzentrums von einer Sepsis durch EcN bei einem Frühgeborenen der 28. Schwangerschaftswoche in Folge einer Rota- und Adenovirusinfektion [Guenther et al., 2010] führte zu einer **Einschränkung der Empfehlung** von EcN als Kolonisationsprophylaxe für **sehr unreife Frühgeborene** durch den Hersteller [Ardeypharm, 2008]. In diesem Fall war durch eine Typisierung per Gelelektrophorese nachgewiesen worden, dass der in der Blutkultur nachgewiesene Stamm mit EcN identisch war. Auch dieses Kind war zuvor oral mit EcN behandelt worden. Nach umfangreichen intensivmedizinischen Maßnahmen und Breitbandantibiose stabilisierte sich der Patient.

In der vorliegenden Pilotstudie war im Rahmen der Infektionsdiagnostik bei einem **symptomatischen Frühgeborenen *E. coli* in der Blutkultur** nachgewiesen worden. Dieser Patient war seit dem zweiten Lebenstag mit EcN behandelt worden. Ohne sichere Identifikation von EcN bleibt in diesem Fall ungeklärt, ob es sich um EcN handelte. Die Blutkultur dieses Patienten war zum Zeitpunkt der Auswertung nicht mehr verfügbar, sodass keine Identifikation erfolgen konnte. Da bei vielen Patienten, die mit EcN behandelt worden waren, EcN häufig in Kulturen aus Hautabstrichen nachweisbar war, ist schließlich auch eine Kontamination bei der Abnahme der Blutkultur zu diskutieren.

In den **bisherigen Studien** mit EcN an Früh- und Neugeborenen waren **keine Septikämien**

festgestellt worden. Die Anlage von Blutkulturen wurde nicht explizit berichtet [Cukrowska et al., 2002; Lodinová-Žadniková und Sonnenborn, 1997; Lodinová-Žadniková et al., 1992]. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert, spielt die **Sicherheit von Probiotika** eine entscheidende Rolle, da diese Präparate oft bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt werden. Für die häufiger als Probiotika verwendeten **Laktobazillen** existieren bereits Studien zu Risiken der Verwendung [Snydman, 2008]: LGG habe sich sowohl **in vitro als auch in vivo** (im Tiermodell und in Studien am Menschen) **als sicher** erwiesen. Trotz seltener Fälle von Bakteriämie und Leberabszessen bei Patienten mit Kurzdarmsyndrom sei es zusammenfassend als sicheres Probiotikum zu betrachten. Es gäbe kein anderes Probiotikum (als LGG), dessen Sicherheit in einem vergleichbaren Umfang geprüft wurde. Von anderen Autoren [Salminen et al., 2004] wurden mit LGG ebenfalls selten Septikämien [Land et al., 2005] und zum Teil tödlich verlaufende Infektionen, insbesondere bei immungeschwächten Patienten [Ledoux et al., 2006], beschrieben. Trotz zunehmendem Einsatz als Probiotikum sei es jedoch in Finnland nicht zu einem Anstieg der Inzidenz von LGG-Septikämien gekommen [Salminen et al., 2002]. Für *Saccharomyces boulardii* [Perapoch et al., 2000] und *Lactobacillus acidophilus* [Thompson et al., 2001] sind ebenfalls Septikämien bei probiotisch behandelten Früh- und Neugeborenen beschrieben worden (siehe auch Abschnitt 1.1).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für die Anwendung von EcN bei Früh- und Neugeborenen bisher nur sehr wenige Studien vorliegen, welche kleine Patientengruppen untersucht haben und den **Kriterien einer kontrollierten und randomisierten klinischen Studie nicht genügen**. Da die Relevanz der beschriebenen Sepsisfälle aktuell ungeklärt ist, wäre es ethisch kaum vertretbar neue Studien zu dieser Fragestellung zu veranlassen. Kliniken, die EcN weiterhin bei Neu- und Frühgeborenen einsetzen, sollten beim Auftreten einer *E. coli*-Sepsis eine **sichere Identifikation** durch ein unabhängiges Referenzlabor veranlassen. Für andere Probiotika sind Septikämien anhand der aktuellen Literatur scheinbar sehr seltene Ereignisse. Da sie jedoch bei immunsupprimierten Patienten gehäuft vorkommen, sollte der **Einsatz eines Probiotikums** bei diesen Patienten **individuell indiziert** werden. Bei invasiven Maßnahmen wie Operationen und zentralen Kathetern ist eine Kontamination zu vermeiden.

Da das Risiko für Probiotika-Septikämien insbesondere bei immungeschwächten Patienten und einer unreifen Epithelbarriere im Magen-Darm-Trakt erhöht zu sein scheint, muss der **Einsatz bei Frühgeborenen unter 1500 g kritisch abgewogen** werden. EcN ist für diese Patienten bis zur Klärung der Bedeutung von Septikämien und Besiedlung des Trachealsekrets nicht zu empfehlen.

6 Zusammenfassung

Die Fragestellung, ob die präventive Behandlung Frühgeborener unter 1500 g mit *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 eine Protektion vor infektiösen Ereignissen bewirken kann, ist anhand der vorliegenden Pilotstudie nicht abschließend zu beantworten. Dies begründet sich durch verschiedene Limitationen des Studiendesigns und der Stichprobengröße. Die Studie zeigt jedoch Tendenzen, auf welche Weise EcN das Auftreten von Infektionen und das weitere Gedeihen von Frühgeborenen unter 1500 g beeinflusst: So konnte die Möglichkeit, dass EcN-Patienten häufiger Spätinfektionen erleiden, zunächst nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung des maximalen IL-6 als Endpunkt erlaubte dagegen in dieser Studie keine Aussage zum Outcome. Die Therapie mit EcN scheint sich auf die Gewichtsentwicklung zwischen dem 10. und 30. Lebenstag weder positiv noch negativ auszuwirken. Für EcN-Patienten kann die Notwendigkeit einer längeren Betreuung auf der Intensivstation und einer längeren antibiotischen Behandlung von Spätinfektionen aktuell nicht ausgeschlossen werden. Die Methode des Propensity Score Matchens als überlegenes Verfahren im Vergleich zur Adjustierung mittels Regressionsanalysen zeigte, dass EcN hinsichtlich des Auftretens von Spätinfektionen sowohl protektive als auch negative Einflüsse haben könnte. Zur Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie von Spätinfektionen ergab das Propensity Score Matchen die Möglichkeit, dass sich diese in der EcN- und Kontrollgruppe nicht unterscheiden könnte. Zur Beeinflussung der Mortalität und des Auftretens einer NEC durch EcN erlaubt die vorliegende Studie keine Aussage.

Bezüglich der Sicherheit des Probiotikums EcN ergab diese Studie Hinweise, dass eine atypische Besiedlung des Trachealsekrets und septische Infektionen möglich sind. Es konnte jedoch keine Identifikation dieser *E. coli* als EcN erfolgen. In Anbetracht eines aktuellen Fallberichts zu einer Sepsis durch EcN sollten diese Beobachtungen zu einer genauen Identifikation von Infektionserregern probiotisch behandelter Patienten führen.

Diese Pilotstudie zeigte wichtige Aspekte auf, welche in Folgestudien zur Erhöhung der Repräsentativität der Ergebnisse beitragen können: So ist es zu empfehlen, Folgestudien als randomisierte, kontrollierte, doppelblinde Studien zu planen. Um adäquate Probandenzahlen zu erreichen, wäre eine Multicenterstudie mit vorher angepassten Lokalbedingungen der einzelnen Standorte zu realisieren. Bisher gibt es auch für andere Probiotika kaum Einzelstudien mit ausreichend großen Probandenzahlen, um Aussagen bezüglich der möglichen Prävention einer NEC treffen zu können. Dies ist dadurch bedingt, dass Frühgeborene unter 1500 g in den meisten Perinatalzentren eine kleine Patientengruppe darstellen. Sowohl in Studien als auch in Anwendungsbeobachtungen der Therapie mit EcN

müssen mögliche Infektionen durch das probiotische Bakterium aufmerksam beobachtet und genau identifiziert werden, denn bisher ist die Relevanz der geschilderten Sepsisfälle kaum eindeutig zu beurteilen. Die Durchführung regelmäßiger Kolonisationsanalysen könnte sicherstellen, ob die Patienten intestinal mit EcN besiedelt sind. Variationen des Therapie-schemas innerhalb einer Studie müssten vermieden werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass EcN aktuell für die Anwendung bei Frühgeborenen noch unzureichend untersucht wurde bzw. die Hinweise für mögliche nachteilige Effekte nicht ausreichend überprüft werden konnten. Auch wenn experimentelle Studien Hinweise ergeben haben, dass sich EcN positiv auf das Immunsystem auswirken kann, so muss die Übertragbarkeit auf die Therapie beim Patienten in klinischen Studien geprüft werden. Da nachteilige Effekte auf Frühgeborene unter 1500 g aktuell nicht ausgeschlossen werden können, wäre es empfehlenswert, dass Untersuchungen zur Sicherheit dieses Präparates zunächst bei älteren Kindern erfolgen. Bevor solche Studien jedoch geplant werden, ist die Auswertung von Anwendungsbeobachtungen hinsichtlich septischer Infektionen sinnvoll. Nicht zuletzt gibt es zahlreiche Studien zu anderen Probiotika (z. B. Laktobazillen, Bifidusbakterien). Diese Präparate sollten mit der gleichen Sorgfalt und Aufmerksamkeit verwendet werden. Sie erlauben jedoch aufgrund der Studienlage eine größere Sicherheit für die Anwendung bei Frühgeborenen unter 1500 g. Weiterhin gibt es für diese Probiotika im Unterschied zu EcN konkrete Hinweise, dass sie sich protektiv auf die Entwicklung einer NEC auswirken.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
CFU	colony forming units
CrP	C-reaktives Protein
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Stamm Nissle 1917
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELBW	extreme low birthweight infants: < 1000 g Geburtsgewicht
FFP	fresh frozen plasma
FOS	Fructooligosaccharide
GALT	gut associated lymphoid tissue
Hb	Hämoglobin
ID	Identifizier
IL-6	Interleukin 6
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NEO-KISS	Surveillance System nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen
NIH	National Institutes of Health, U. S. Department of Health and Human Services
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NNT	number needed to treat
PCR	polymerase chain reaction
ROC	receiver operating curve
ROP	Retinopathia praematurorum
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
VIF	variance inflation factor
VLBW	very low birthweight infants: < 1500 g Geburtsgewicht
WHO	world health organization
ZVK	zentraler Venenkatheter

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird in der elektronischen Version der Arbeit aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Abstract GNPI 2007

Infektionsprophylaxe mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 bei Frühgeborenen unter 1500 g

Hintergrund: Gastrointestinale Infektionserkrankungen sind eine wichtige Komplikation bei der Behandlung Frühgeborener unter 1500 g. Sie gefährden die postnatale Reifung und Entwicklung, erfordern oft den Einsatz von Antibiotika und verlängern die Intensivbehandlungsdauer. *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN, Mutaflor®) kann oral als Kapsel oder Suspension eingenommen werden und ist in Deutschland u. a. als Kolonisationsprophylaxe und zur Steigerung der postnatalen Immunkompetenz bei Früh- und Reifgeborenen zugelassen. Nach Kolonisierung Neugeborener mit EcN konnte in klinischen Studien eine signifikante Erhöhung der IgA- und IgM- Spiegel in Stuhlfiltraten und im Blut festgestellt werden (Lodinová-Žádníková et al., 1992). Weiterhin zeigten mit EcN behandelte Frühgeborene im Vollblut auch gegenüber anderen *E. coli*-Typen eine gesteigerte Proliferationsaktivität der Blutleukozyten. Diese verstärkte Aktivität ließ die unbehandelte Kontrollgruppe nicht erkennen (Cukrowska et al., 2002).

Fragestellung: Kann mit einer prophylaktischen Gabe von 1x1ml Mutaflor® pro Tag über 5 Tage die Infektionshäufigkeit und -schwere bei Frühgeborenen unter 1500 g verringert werden?

Material und Methode: In der Kinderklinik des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus wurden in den Jahren 2005 und 2006 ca. 100 Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g geboren. Etwa 80 % von Ihnen erhielten 1x1ml Mutaflor® pro Tag über 5 Tage als Kolonisationsprophylaxe. In einer retrospektiven Studie soll die Infektionshäufigkeit dieser Kinder im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe untersucht werden. Mit Hilfe einer Datenmaske, die u. a. Geburtsgewicht, postnatale Adaptation, Laborparameter im Verlauf, mikrobiologische Untersuchungen von Stuhl, Urin, Magensaft und Hautabstrichen, sowie den Einsatz von Antibiotika erfasst, möchten wir Hinweise auf die Wirkung der Prophylaxe und die Bedeutung von Individualfaktoren erhalten.

Ergebnisse und Diskussion: Aktuell erfolgt die Aufarbeitung der Daten. Im Juni 2007 werden vorläufige Daten für eine Stichprobe von etwa 10 bis 15 Patienten vorliegen.

Schlussfolgerung: Anhand der Stichprobe werden sich eventuell bereits Trends erkennen lassen.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. T. Erler, danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Promotion.

Auch die Mitarbeiter des Krankenblattarchivs, das Pflegepersonal und die Ärzte der Kinderklinik des Carl-Thiem-Klinikums Cottbus haben mit Ihrer gewissenhaften Arbeit sehr positiv zu meiner Promotion beigetragen.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. C. Schwahn für die ausgezeichnete statistische Beratung und die vielen wertvollen Hinweise zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Für die Bereitstellung von Informationsmaterial zu *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 danke ich Herrn Dr. L. Schulze und Frau C. Wolff.

Frau P. Heber danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Opa danken. Ihr habt mich bei Schwierigkeiten stets motiviert und vielfältig unterstützt. Euch widme ich diese Arbeit.

Erklärung

„Ich, Ulrike Blümlein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Infektionsprophylaxe mit Escherichia coli Stamm Nissle 1917 bei Frühgeborenen unter 1500 g – eine Pilotstudie* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

08.09.2011

Literaturverzeichnis

- Actial Farmaceutica (2009): VSL#3® unterstützt Aufbau und Erhalt des mikrobiellen Gleichgewichts im Darm. URL: <http://www.vsl3.de/de/composizione.html>
- Alfaleh, K. und Bassler, D. (2008): Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants, *Cochrane Database Syst Rev* [1], Seite CD005496.
- Allen, S. J.; Martinez, E. G.; Gregorio, G. V. und Dans, L. F. (2010): Probiotics for treating acute infectious diarrhoea, *Cochrane Database Syst Rev* 11, Seite CD003048.
- Altenhoefer, A.; Oswald, S. und Sonnenborn, U. et al. (2004): The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens, *FEMS Immunol Med Microbiol* 40 [3], Seite 223-9.
- Ardeypharm (2008): Fachinformation Mutaflor® Suspension, Rote Liste Service GmbH, FachInfo-Service, Postfach 11 01 71, 10831 Berlin.
- Arribas, B.; Rodriguez-Cabezas, M. E. und Camuesco, D. et al. (2009): A probiotic strain of *Escherichia coli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice, *Br J Pharmacol* 157 [6], Seite 1024-33.
- Austin, P. C. (2007): The performance of different propensity score methods for estimating marginal odds ratios, *Statistics in Medicine* 26 [16], Seite 3078-94.
- Bailar, J. C., 3rd und Mosteller, F. (1988): Guidelines for statistical reporting in articles for medical journals. Amplifications and explanations, *Annals of Internal Medicine* 108 [2], Seite 266-73.
- Banaszkiewicz, A. und Szajewska, H. (2005): Ineffectiveness of *Lactobacillus GG* as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial, *J Pediatr* 146 [3], Seite 364-9.
- Basu, S.; Chatterjee, M.; Ganguly, S. und Chandra, P. K. (2007): Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus GG* in acute watery diarrhoea of Indian children: a randomised controlled trial, *J Paediatr Child Health* 43 [12], Seite 837-42.
- Bausserman, M. und Michail, S. (2005): The use of *Lactobacillus GG* in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial, *J Pediatr* 147 [2], Seite 197-201.
- Benitz, W. E.; Han, M. Y.; Madan, A. und Ramachandra, P. (1998): Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection, *Pediatrics* 102 [4], Seite E41.
- Besselink, M. G.; van Santvoort, H. C. und Buskens, E. et al. (2008): Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 371 [9613], Seite 651-9.
- Biermann, DPC (2006): IL-6 Interpretationshilfe für die Neonatologie.
- Blum-Oehler G, Grozdanov L, Dobrindt U, Agerer F, Nagy G, et al. In: , Hrsg. (2001): Das gläserne Bakterium: Mikrobielle Genomanalyse. Symposiumsband zum 4. Interdisziplinären Symposium „Darmflora in Symbiose und Pathogenität“. Mikrobiologische Grundlagen und klinische Anwendung von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917, Berlin, 10.-11. Nov. 2000., Alfred-Nissle-Gesellschaft, Hagen.
- Blum-Oehler, G.; Oswald, S. und Eiteljorge, K. et al. (2003): Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples, *Res Microbiol* 154 [1], Seite 59-66.

- Borriello, S. P.; Hammes, W. P. und Holzapfel, W. et al. (2003): Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria, *Clin Infect Dis* 36 [6], Seite 775-80.
- Bousvaros, A.; Guandalini, S. und Baldassano, R. N. et al. (2005): A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus GG* versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease, *Inflamm Bowel Dis* 11 [9], Seite 833-9.
- Brookhart, M. A.; Schneeweiss, S.; Rothman, K. J.; Glynn, R. J.; Avorn, J. und Sturmer, T. (2006): Variable selection for propensity score models, *American Journal of Epidemiology* 163 [12], Seite 1149-56.
- Cepeda, M. S.; Boston, R.; Farrar, J. T. und Strom, B. L. (2003): Comparison of logistic regression versus propensity score when the number of events is low and there are multiple confounders, *American Journal of Epidemiology* 158 [3], Seite 280-7.
- Cukrowska, B.; Lodinová-Žadniková, R.; Enders, C.; Sonnenborn, U.; Schulze, J. und Tlaskalova-Hogenova, H. (2002): Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917, *Scand J Immunol* 55 [2], Seite 204-9.
- D'Agostino, R. B., Jr. und D'Agostino, R. B., Sr. (2007): Estimating treatment effects using observational data, *Jama* 297 [3], Seite 314-6.
- Day, A. S.; Whitten, K. E. und Bohane, T. D. (2004): Use of complementary and alternative medicines by children and adolescents with inflammatory bowel disease, *Journal of Paediatrics and Child Health* 40 [12], Seite 681-684.
- de Croon, E. M. (2006): Studies in occupational epidemiology and the risk of overadjustment, *Occup Environ Med* 63 [12], Seite 787.
- de Vrese, M. (2008): Mikrobiologie, Wirkung und Sicherheit von Probiotika, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 [11], Seite 1063-1069.
- Deshpande, G.; Rao, S.; Patole, S. und Bulsara, M. (2010): Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates, *Pediatrics* 125 [5], Seite 921-30.
- Erb, A.; Sturmer, T.; Marre, R. und Brenner, H. (2007): Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26 [2], Seite 83-90.
- Fang, S. B.; Lee, H. C.; Hu, J. J.; Hou, S. Y.; Liu, H. L. und Fang, H. W. (2009): Dose-dependent effect of *Lactobacillus rhamnosus* on quantitative reduction of faecal rotavirus shedding in children, *J Trop Pediatr* 55 [5], Seite 297-301.
- Fletcher, Robert H.; Fletcher, Suzanne W.; Wagner, Edward H.; Haerting, Johannes und Fletcher Fletcher, Wagner (1999): *Klinische Epidemiologie : Grundlagen und Anwendung*, Ullstein Medical, Wiesbaden, ISBN: 3861261472.
- Grozdanov, L.; Raasch, C. und Schulze, J. et al. (2004): Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Journal of Bacteriology* 186 [16], Seite 5432-41.
- Grozdanov, L.; Zahringer, U. und Blum-Oehler, G. et al. (2002): A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Journal of Bacteriology* 184 [21], Seite 5912-25.
- Guandalini, S.; Pensabene, L. und Zikri, M. A. et al. (2000): *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30 [1], Seite 54-60.

- Guenther, K.; Straube, E.; Pfister, W.; Guenther, A. und Huebler, A. (2010): Severe sepsis after probiotic treatment with *Escherichia coli* NISSLE 1917, *Pediatric Infectious Disease Journal* 29 [2], Seite 188-9.
- Guthmann, F.; Kluthe, C. und Buhner, C. (2010): Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis: an updated meta-analysis, *Klin Padiatr* 222 [5], Seite 284-90.
- Hancock, V.; Dahl, M. und Klemm, P. (2010): Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation, *J Med Microbiol* 59 [Pt 4], Seite 392-9.
- Hancock, V.; Vejborg, R. M. und Klemm, P. (2010): Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation, *Mol Genet Genomics* 284 [6], Seite 437-54.
- Handrick, Werner; Roos, Reinhard und Adam, Dieter (1991): *Fetale und neonatale Infektionen : 89 Tabellen*, Hippokrates-Verl, Stuttgart, ISBN: 3777309907.
- Hawkey, P.M. und Snelling, A. M. (1998): Statement regarding the stability of the plasmids of *E. coli* Nissle 1917 (DSM6601, Mutaflor®), Internal Company Report, Pharma-Zentrale GmbH, Herdecke, Germany.
- Henker, J.; Laass, M. und Blokhin, B. M. et al. (2007): The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers, *Eur J Pediatr* 166 [4], Seite 311-8.
- Henker, J.; Laass, M. W. und Blokhin, B. M. et al. (2008): Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers, *Pediatr Infect Dis J* 27 [6], Seite 494-9.
- Henker, J.; Muller, S. und Laass, M. W. et al. (2008): Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study, *Z Gastroenterol* 46 [9], Seite 874-5.
- Hosmer, David W. und Lemeshow, Stanley (1989): *Applied logistic regression*, Wiley, New York, NY [u.a.], ISBN: 0471615536.
- Isolauri, E.; Arvola, T.; Sutas, Y.; Moilanen, E. und Salminen, S. (2000): Probiotics in the management of atopic eczema, *Clin Exp Allergy* 30 [11], Seite 1604-10.
- Jobe, A. H. und Bancalari, E. (2001): Bronchopulmonary dysplasia, *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 163 [7], Seite 1723-9.
- Johnston, B. C.; Supina, A. L.; Ospina, M. und Vohra, S. (2007): Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea, *Cochrane Database Syst Rev* [2], Seite CD004827.
- Jorch, Gerhard und Arenz, Stephan (2010): *Neonatologie : die Medizin des Früh- und Reifgeborenen ; 187 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.], ISBN: 9783131460714 (GB.).
- Kamada, N.; Inoue, N. und Hisamatsu, T. et al. (2005): Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis, *Inflamm Bowel Dis* 11 [5], Seite 455-63.
- Kleinbaum, David G. (1998): *Applied regression analysis and other multivariable methods*, 3. Auflage, Duxbury Press, Pacific Grove [u.a.], ISBN: 0534209106.
- Kopp, M. V. (2008): Probiotika in der Prävention und Therapie von Atopien, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 [11], Seite 1084-1092.
- Kopp, M. V.; Hennemuth, I.; Heinzmann, A. und Urbanek, R. (2008): Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation, *Pediatrics* 121 [4], Seite e850-6.

- Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, KISS (2009): Modul NEO-KISS Berechnungszeitraum: Januar 2005 bis Dezember 2009, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen.
- Kresken, M. und Hafner, D. (1999): Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975-1995. Study Group Bacterial Resistance of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, *Infection* 27 Suppl 2, Seite S2-8.
- Kruis, W.; Fric, P. und Pokrotnieks, J. et al. (2004): Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine, *Gut* 53 [11], Seite 1617-23.
- Land, M. H.; Rouster-Stevens, K.; Woods, C. R.; Cannon, M. L.; Cnota, J. und Shetty, A. K. (2005): *Lactobacillus sepsis* associated with probiotic therapy, *Pediatrics* 115 [1], Seite 178-81.
- Lasaro, M. A.; Salinger, N. und Zhang, J. et al. (2009): F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917, *Appl Environ Microbiol* 75 [1], Seite 246-51.
- Leatham, M. P.; Banerjee, S.; Autieri, S. M.; Mercado-Lubo, R.; Conway, T. und Cohen, P. S. (2009): Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine, *Infect Immun* 77 [7], Seite 2876-86.
- Ledoux, D.; Labombardi, V. J. und Karter, D. (2006): *Lactobacillus acidophilus* bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease, *Int J STD AIDS* 17 [4], Seite 280-2.
- Lentze, M. J. (2008): Probiotika, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 [11], Seite 1061-1062.
- Liptay, S. und Burdach, S. (2008): Probiotika bei Kindern und Jugendlichen mit Darmerkrankung, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 [11], Seite 1076-1083.
- Lodinová-Žadniková, R.; Cukrowska, B. und Tlaskalová-Hogenová, H. (2003): Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years), *Int Arch Allergy Immunol* 131 [3], Seite 209-11.
- Lodinová-Žadniková, R. und Sonnenborn, U. (1997): Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants, *Biol Neonate* 71 [4], Seite 224-32.
- Lodinová-Žadniková, R.; Tlaskalová-Hogenová, H. und Sonnenborn, U. (1992): Local and serum antibody response in full-term and premature infants after artificial colonization of the intestine with *E. coli* strain Nissle 1917 (Mutaflor®), *Pediatric Allergy and Immunology* 3 [1], Seite 43-48.
- Marre, R.; Scheringer, I.; Erb, A.; Zeitler, H. P.; Stürmer, T. und Brenner, H. (2002): Prävalenz der *E.-coli*-Antibiotikaresistenz in der Allgemeinbevölkerung, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 45 [2], Seite 130-137.
- Metchnikoff, E (1907): *The prolongation of life. Optimistic studies.*, Heinemann, London.
- Miele, E.; Pascarella, F.; Giannetti, E.; Quaglietta, L.; Baldassano, R. N. und Staiano, A. (2009): Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis, *Am J Gastroenterol* 104 [2], Seite 437-43.
- Mihatsch, W. A. (2008): Probiotika bei Frühgeborenen, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 156 [11], Seite 1070-1075.

- Mihatsch, W. A.; Vossbeck, S.; Eikmanns, B.; Hoegel, J. und Pohlandt, F. (2010): Effect of *Bifidobacterium lactis* on the incidence of nosocomial infections in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial, *Neonatology* 98 [2], Seite 156-63.
- Mihatsch, W. und Pohlandt, F. (2010): Probiotics - routine therapy for preterm infants? What is the evidence?, *Kinder- und Jugendmedizin* 10 [1], Seite 12.
- Mohan, R.; Koebnick, C.; Schildt, J.; Mueller, M.; Radke, M. und Blaut, M. (2008): Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants, *Pediatr Res* 64 [4], Seite 418-22.
- Nissle, Alfred (1916): Ueber die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora, *Deutsche medizinische Wochenschrift* 42 [39], Seite 1181-1185.
- Nissle, Alfred (1925): Weiteres über die Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung., *Deutsche medizinische Wochenschrift* 51 [44], Seite 1809-1813.
- Oakes, J. Michael und Kaufman, Jay S. (2006): *Methods in social epidemiology*, 1st. Auflage, Jossey-Bass, San Francisco, ISBN: 0787979899 (alk. paper) 9780787979898.
- Obladen, Michael; Maier, Rolf F. und Barthlen, Winfried (2006): *Neugeborenenintensivmedizin : Evidenz und Erfahrung ; mit 108 Tabellen*, 7., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Auflage, Springer Medizin, Heidelberg, ISBN: 3540337377 (Pb.) 9783540337379.
- Olah, A.; Belagyi, T.; Poto, L.; Romics, L., Jr. und Bengmark, S. (2007): Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study, *Hepatogastroenterology* 54 [74], Seite 590-4.
- Peduzzi, P.; Concato, J.; Kemper, E.; Holford, T. R. und Feinstein, A. R. (1996): A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis, *J Clin Epidemiol* 49 [12], Seite 1373-9.
- Perapoch, J.; Planes, A. M. und Querol, A. et al. (2000): Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 19 [6], Seite 468-70.
- Peto, R. (1981): The horse-racing effect, *Lancet* 2 [8244], Seite 467-8.
- Prescott, S. L. und Bjorksten, B. (2007): Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases, *J Allergy Clin Immunol* 120 [2], Seite 255-62.
- Reissbrodt, R.; Hammes, W. P. und dal Bello, F. et al. (2009): Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters* 290 [1], Seite 62-9.
- Rembacken, B. J.; Snelling, A. M.; Hawkey, P. M.; Chalmers, D. M. und Axon, A. T. (1999): Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial, *Lancet* 354 [9179], Seite 635-9.
- Riemann, J (2004, in Überarbeitung): Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa Ergebnisse einer "evidenz"-basierten Konsensuskonferenz, *Zeitschrift für Gastroenterologie*.
- Roos, R (2006): Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen, Leitlinie, Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin.
- Rosenbaum, Paul und Rubin, Donald (1985): Constructing a Control Group Using Multivariate Matched Sampling Methods That Incorporate the Propensity Score, *The American Statistician* 39 [1], Seite 33-38.
- Rothman, Kenneth J. (2002): *Epidemiology: an introduction*, Oxford Univ. Press, New York, NY [u.a.], ISBN: 0195135539 (hbk) 0195135547 (pbk).

- Rothman, Kenneth J. und Greenland, Sander (1998): Modern epidemiology, 2nd. Auflage, Lippincott-Raven, Philadelphia, ISBN: 0316757802.
- Rouge, C.; Piloquet, H. und Butel, M. J. et al. (2009): Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Am J Clin Nutr* 89 [6], Seite 1828-35.
- Salazar-Lindo, E.; Miranda-Langschwager, P.; Campos-Sanchez, M.; Chea-Woo, E. und Sack, R. B. (2004): Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial [ISRCTN67363048], *BMC Pediatr* 4, Seite 18.
- Salminen, M. K.; Rautelin, H. und Tynkkynen, S. et al. (2004): Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG, *Clinical Infectious Diseases* 38 [1], Seite 62-9.
- Salminen, M. K.; Tynkkynen, S. und Rautelin, H. et al. (2002): Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland, *Clinical Infectious Diseases* 35 [10], Seite 1155-60.
- Saxelin, M.; Chuang, N. H. und Chassy, B. et al. (1996): Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992, *Clin Infect Dis* 22 [3], Seite 564-6.
- Schulze, J.; Lorenz, A. und Mandel, L. (1992): Colonisation of Escherichia coli in different gnotobiotic animal models., *Microbial Ecol health Health Dis* 5, Seite 4-5.
- Schulze, Jürgen (2008): Probiotika : Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte ; 47 Tabellen, Hippokrates Verl., Stuttgart, ISBN: 9783830453567.
- Schulze, Jürgen; Schiemann, Martina und Sonnenborn, Ulrich (2006): 120 Jahre E.coli : Bedeutung in Forschung und Medizin, ANG, Hagen, ISBN: 300018600X.
- Snydman, D. R. (2008): The safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases* 46 Suppl 2, Seite S104-11; discussion S144-51.
- Sonnenborn, Ulrich und Greinwald, Roland (1991): Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora : unter besonderer Berücksichtigung von Physiologie und Funktion der normalen Escherichia-coli-Flora, 2., vollst. überarb. Aufl. Auflage, Schattauer, Stuttgart [u.a.], ISBN: 3794514491.
- Sturmer, T.; Joshi, M.; Glynn, R. J.; Avorn, J.; Rothman, K. J. und Schneeweiss, S. (2006): A review of the application of propensity score methods yielded increasing use, advantages in specific settings, but not substantially different estimates compared with conventional multivariable methods, *Journal of Clinical Epidemiology* 59 [5], Seite 437-47.
- Sur, D.; Manna, B. und Niyogi, S. K. et al. (2011): Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum, *Epidemiol Infect*, Seite 1-8.
- Szajewska, H.; Skorka, A.; Rusczyński, M. und Gieruszczak-Bialek, D. (2007): Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute diarrhoea in children, *Aliment Pharmacol Ther* 25 [8], Seite 871-81.
- Taylor, A. L.; Dunstan, J. A. und Prescott, S. L. (2007): Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial, *J Allergy Clin Immunol* 119 [1], Seite 184-91.
- Thompson, C.; McCarter, Y. S.; Krause, P. J. und Herson, V. C. (2001): Lactobacillus acidophilus sepsis in a neonate, *J Perinatol* 21 [4], Seite 258-60.

- Van Niel, C. W.; Feudtner, C.; Garrison, M. M. und Christakis, D. A. (2002): Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis, *Pediatrics* 109 [4], Seite 678-84.
- van Santvoort, H. C.; Besselink, M. G.; Timmerman, H. M.; van Minnen, L. P.; Akkermans, L. M. und Gooszen, H. G. (2008): Probiotics in surgery, *Surgery* 143 [1], Seite 1-7.
- Vittinghoff, E. und McCulloch, C. E. (2007): Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression, *Am J Epidemiol* 165 [6], Seite 710-8.
- WHO, Working Group FAO/ (2002): Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/ WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation on Probiotics in Food, London Ontario, Canada.