Aus der Klinik: Klinikum Ernst von Bergmann
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Charlottenstrasse 72
14409 Potsdam

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Radke

Der Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die Gewichtsentwicklung und Kolonfermentation sowie die Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut Frühgeborener

-

Auswertung einer prospektiven, randomisierten und Plazebo-kontrollierten, klinischen Doppelblindstudie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Mike Poßner, geb. am 08. Juni 1963 in Neustadt/Orla
aus Kirchbrombach

Rostock, Mai 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0054-2

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Liebe; Direktor der Abteilung Gastroenterologie; Universitätsklinikum Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Radke; Chefarzt des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin; Klinikum Ernst von Bergmann, Potsdam

3. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Henker; Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 4
1.1 Bedeutung der Zusammensetzung der Darmflora für die Gesundheit des Menschen....4
1.2 Definition des Begriffs „Probiotika“....4
1.3 Die normale Darmflora und ihre Rolle für das Abwehrsystem des Körpers 5
1.4 Wirkungen von Bifidobacteria und Lactobacilli auf den Wirtsorganismus 7
1.5 Die Besonderheiten der Darmbesiedlung bei Frühgeborenen 8
1.6 Nosokomiale Infektionen, Sepsis und nekrotisierende Enterokolitis bei Frühgeborenen....9
1.7 Einsatz von Probiotika bei Frühgeborenen 11

2 Zielstellung 13

3 Probanden und Methoden 14
3.1 Studiendesign 14
3.2 Probanden 14
3.3 Randomisierung....14
3.4 Studienpräparate und Dosierung 15
3.5 Ernährungsregime 16
3.6 Datenerfassung und Untersuchungen 17
3.7 Labormethoden zur Bestimmung des fäkalen pH-Werts und von kurzkettigen Fettsäuren sowie Calprotectin und sekretorischem IgA im Stuhl....18
3.7.1 pH-Wert 18
3.7.2 Kurzkettige Fettsäuren....18
3.7.3 Laktat....19
3.7.4 Calprotectin und sekretorisches Immunglobulin A 19
3.8 Statistische Methoden....19
3.8.1 Körpergewicht, enterales Nahrungsvolumen und klinischer Score 19
3.8.2 Kurzkettige Fettsäuren, IgA, Calprotectin und Anzahl der Bifidusbakterien ..20

Inhaltsverzeichnis

4 Ergebnisse 21
4.1 Charakteristika der Studiengruppen 21
4.2 Drop-out-Raten und Gründe für das Ausscheiden vor Ende der Interventionsperiode 22
4.3 Klinische Scorewerte bei Beginn und im Verlauf der Studienperiode 24
4.4 Gewichtsverlauf und enterales Nahrungsvolumen und Art der Nahrung in den ersten 3 Lebenswochen 28
4.4.1 Gewichtsverlauf in den ersten 3 Lebenswochen 28
4.4.2 Verlauf des enteralen Nahrungsvolumens und Art der Milchnahrung in den ersten 3 Lebenswochen 34
4.4.3 Zusammenfassung 37
4.5 pH-Wert und kurzkettige Fettsäuren im Stuhl 38
4.5.1 Stuhl pH-Wert 38
4.5.2 Kurzkettige Fettsäuren im Stuhl 39
4.5.3 Laktat im Stuhl 41
4.6 Sekretorisches Immunglobulin A (sIgA) im Stuhl 43
4.7 Calprotectin im Stuhl 44

5 Diskussion 46
5.1 Verträglichkeit und Sicherheit von Bifidobacterium lactis Bb12 und Einfluss dieses Stammes auf Gewicht, Antibiotikagabe und klinischen Gesamtzustand der Frühgeborenen 46
5.2 Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die bakteriellen Fermentationsprodukte und den pH-Wert im Stuhl 49
5.3 Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die fäkalen Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) und Calprotectin 53

6 Zusammenfassung 61

7 Referenzen 64

8 Anhang 71

Abkürzungsverzeichnis

APGAR	Bewertungsschema der Vitalfunktionen beim Neugeborenen
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cfu	colony forming unit
CRP	C-reaktives Protein
ELBW	extremly low birth weight (Geburtsgewicht unter 1000 g)
ESPGHAN	European Society for Pediatric Gastroenterlogy, Hepatology and Nutrition
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GALT	gut-associated lymphoid tissue (Darm-assoziiertes Immunsystem)
GRAS	Generally Recognized as Safe
kD	Kilodalton
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
PCR-DGGE	Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-denaturierende Gradientengelelktrophorese)
SCFA	short chain fatty acids (kurzkettige Fettsäuren)
SD	Standardabweichung
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
VLBW	very low birth weight (Geburtsgewicht unter 1500 g)

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Zusammensetzung der Darmflora für die Gesundheit des Menschen

Die Bedeutung der Zusammensetzung der Darmflora für die Gesundheit des Menschen erkannte als erster Anfang des 20. Jahrhunderts der russische Zoologe und Bakteriologe Ilja Iljitsch Metschnikoff [58], der von 1888 bis zu seinem Tode 1916 am Louis Pasteur Institut in Paris arbeitete und lehrte. In diese Zeit fällt auch die Entdeckung der Bifidusbakterien im Stuhl des gestillten Säuglings durch Tissier am Pasteur Institut in Paris [86]. Henry Tissier beobachtete, dass die im Stuhl gesunder, gestillter Säuglinge reichlich vorhandenen Bakterien mit charakteristischer Y-Form, der sie ihren Namen verdanken (bifidus, lateinisch für zweigeteilt), im Stuhl von Säuglingen mit akuten Durchfallerkrankungen nur in geringen Mengen vorhanden sind. Er leitete aus seiner Beobachtung die Empfehlung ab, Säuglingen bei Darminfektionen lebende Bifidusbakterien oral zu verabreichen, damit diese, entsprechend der Theorie von Metschnikoff, die Krankheitserreger verdrängen und die normale Darmflora wieder herstellen. In einer 1906 erschienenen Veröffentlichung [86] berichtete Tissier über die guten Erfolge mit seiner neuen Behandlungsmethode und hob hervor, dass diese Methode für den zarten Organismus des Säuglings besonders gut geeignet sei, weil sie keine schädlichen Nebenwirkungen habe.

Metschnikoffs Theorie wurde aber schon wenige Jahre später als wissenschaftlich unbewiesen angesehen, da man die verzehrten Bakterien nicht im Stuhl nachweisen konnte. So geriet der erste wissenschaftliche Ansatz für das heutige moderne Probiotika-Konzept, durch orale Gabe bestimmter Bakterien die Zusammensetzung der Darmflora und auf diese Weise die Gesundheit des Menschen positiv zu beeinflussen, allmählich wieder in Vergessenheit. Im Bewusstsein der Kinderärzte lebte jedoch die Idee weiter, dass die Bifidusflora gestillter Säuglinge die Gesundheit und das Wohlbefinden des Kindes fördert. Aber erst rund 90 Jahre nach der Entdeckung der Bifidusbakterien im Stuhl gestillter Säuglinge lieferte eine prospektive, randomisierte, kontrollierte Doppelblindstudie [74] den ersten wissenschaftlichen Beweis dafür, dass die orale Gabe lebender Bifidusbakterien tatsächlich bei Säuglingen eine Schutzwirkung gegen akute Darminfektionen hat.

1.2 Definition des Begriffs „Probiotika“

In den vergangenen 20 Jahren wurden zahlreiche neue Erkenntnisse über die Funktionen der Darmflora und ihre Bedeutung für das Abwehrsystem des Menschen gewonnen, die zu der Entwicklung des modernen Konzepts der Probiotika führten. Der Begriff „Probiotika“ stammt von Lilly und Stillwell [51], aber erst Fuller machte den

Begriff 1989 populär. Fuller [29] definierte Probiotika als „lebende mikrobielle Nahrungsergänzung, die für den Wirt durch Verbesserung des intestinalen, mikrobiellen Gleichgewichts positive Wirkungen hat“. Heute wird eine breitere Definition bevorzugt, da sich das „Gleichgewicht“ der Darmflora nicht genau definieren lässt und probiotische Bakterien auch ohne nachweisbare Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora gesundheitsfördernde Wirkungen haben können. In einem Konsensus-Dokument von Wissenschaftlern verschiedener Fachrichtungen, das im Rahmen einer Diskussion über wissenschaftliche Konzepte für funktionale Lebensmittel in Europa erarbeitet wurde, werden Probiotika definiert als „lebende mikrobielle Lebensmittelbestandteile, welche die Gesundheit fördern“ [21]. Die im Bericht der gemeinsamen Experten-Konsultation der Nahrungs- und Agrikultur Organisation der Vereinten Nationen (FAO) und Weltgesundheitsorganisation (WHO) über die Bewertung der gesundheitlichen und nutritiven Eigenschaften von Probiotika in Nahrungsmitteln [25] zitierte Definition für Probiotika („lebende Mikroorganismen, welche eine positive Wirkung auf die Gesundheit des Wirtes haben, wenn sie in ausreichenden Mengen verzehrt werden“) bezieht die Bedeutung der Dosis für die Wirkung in die Definition mit ein. Die am häufigsten als Probiotika verwendeten Bakterien gehören den Gattungen Lactobacillus und Bifidobacterium an.

1.3 Die normale Darmflora und ihre Rolle für das Abwehrsystem des Körpers

Unter dem Begriff Darmflora wird die Gesamtheit der im Magen-Darm-Trakt lebenden Mikroorganismen zusammengefasst. Die Anzahl der im Magen-Darm-Trakt lebenden Mikroorganismen beträgt etwa 100 Billionen (10^{14}), d.h. etwa 10-mal mehr als die Anzahl sämtlicher Körperzellen des Menschen. Die Mehrzahl sind Bakterien, aber auch Hefen, Pilze und Protozoen gehören zur normalen Darmflora.

Keimzahl und Zusammensetzung der Flora sind in den verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts sehr unterschiedlich. Im Magen und Dünndarm sind die Keimzahlen relativ gering (im Magen ca. 10^3, im Dünndarm ca.10^4 bis 10^6 pro g bzw. ml Inhalt) [31; 55]. Dies liegt an dem niedrigen pH-Wert und der raschen Passage in diesen Regionen. Im Dünndarm dominieren säure-resistente Laktobazillen und grampositive Kokken. Das Gros der Mikroorganismen lebt im Kolon (10^{10} - 10^{12} cfu/g Darminhalt) [66]. Dort ist auch die Vielfalt am größten. Von Untersuchungen mit traditionellen Methoden (Kulturtechnik) wissen wir, dass mindestens 500 verschiedene Bakterienspezies im Darm vorkommen. Wahrscheinlich gibt es aber mehr als 1300 Bakterienspezies im Darm [35]. Bei jedem Menschen machen jedoch nur 30 bis 40 Bakterienarten 99 % der Mikroflora aus [84]. Die überwiegende Mehrheit (> 99 %) sind Anaerobier [55].

Wenn über die Darmflora und ihre Zusammensetzung gesprochen wird, ist in der Regel die Kolonflora gemeint. Die Bakterienpopulation setzt sich aus den endogenen oder autochthonen (griech. auto für selbst und chtón für Erde, sinngemäß etwa „einheimischen“) und den transitorischen oder allochthonen (allo griech. für fremd) Mikroorganismen zusammen [90]. Letztere gelangen mit der Nahrung und Getränken in den Darm und siedeln sich nur vorübergehend und nicht auf Dauer an. Da die Stuhlflora repräsentativ für die Kolonflora ist, werden in der Regel Stuhlproben für die bakterielle Analyse verwendet [84].

Die Darmflora ist in zahlreiche Funktionen einbezogen, die für den Gesundheitszustand des Wirts wichtig sind [79]. Die Kolonflora trägt durch Fermentation unverdaulicher und der Verdauung im Dünndarm entgangener Kohlenhydrate sowie Recycling von Stickstoff zur Gewinnung von Energie und Nährstoffen bei. Die durch die Fermentation von Kohlenhydraten produzierten kurzkettigen Fettsäuren sind eine Energiequelle für das Kolonepithel und stimulieren dessen Wachstum und Differenzierung sowie die Wasser- und Natriumchlorid-Rückresorption [22]. Eine besonders wichtige Funktion der normalen Darmflora ist die Verhinderung der Ansiedlung neuer Bakterienstämme aus der Umwelt (sog. Kolonisationsresistenz [90]. In den vergangenen Jahren wurden die Interaktionen zwischen der Darmflora, den Epithelzellen und dem Darm-assoziierten Immunsystem (engl. gut-associated lymphoid tissue, Abk. GALT) intensiv erforscht und es mehren sich die Hinweise, dass die Darmflora die Physiologie der Mukosa, ihre Barrierefunktion und systemische Immun- und Entzündungsantworten moduliert [22].

Auf die Bedeutung der Darmflora für die Barrierefunktion des Darmes weist z.B. der bei keimfreien Tieren beobachtete erhöhte Antigentransport durch die Darmschleimhaut bei Fehlen einer Darmflora hin [38]. Studien an keimfreien Mäusen haben gezeigt, dass die Inokulation von Mikroorganismen in den Darm während der postnatalen Entwicklung Gene des Wirts moduliert, welche in die Integrität der Mukosabarriere, die Darmmotilität und die postnatale Darmreifung involviert sind [79]. Besondere Bedeutung hat die postnatale bakterielle Besiedlung des Darms. Sie ist ein wichtiger Stimulus für die Reifung des Darm-assoziierten Immunsystems. Dabei scheint die quantitative und qualitative Zusammensetzung der postnatalen Darmflora für die Prägung des Immunsystems eine entscheidende Rolle zu spielen [38].

1.4 Wirkungen von Bifidobacteria und Lactobacilli auf den Wirtsorganismus

Nicht alle Bakterienspezies in der physiologischen Darmflora sind für den Wirt nützlich. Nach unserem heutigen Kenntnisstand können die Darmbakterien in 3 Gruppen unterteilt werden: Bakterien mit potentiell schädlichen Einflüssen auf den Darm und den Gesamtorganismus, Bakterien, die sowohl negative als auch positive Wirkungen haben und Bakterien, die ausschließlich positive Wirkungen auf den Wirt haben [30]. Für einen optimalen Effekt der Darmflora auf den Gesundheitszustand des Wirts ist deshalb die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Darmflora ausschlaggebend.

Die wichtigsten gesundheitsfördernden Darmbakterien gehören zu den Gattungen Bifidobacterium und Lactobacillus [69]. Deshalb werden Stämme dieser Spezies auch bevorzugt als Probiotika verwendet. Soweit man heute weiß, siedeln sich Probiotika im Darm nur vorübergehend an, d.h. sie sind transitorische Bakterien [8].

Bifidobacteria und Lactobacilli produzieren durch die Fermentation von Kohlenhydraten Milch- und Essigsäure und erzeugen dadurch ein saures Milieu im Kolon. Dieses Milieu hemmt das Wachstum potentiell pathogener Mikroorganismen. Für Bifidobacteria und Lactobacilli sind dagegen die Wachstumsbedingungen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 5,8 optimal [33], so dass die Reduzierung des pH-Werts ihre Proliferation fördert. Weitere Mechanismen, durch die bestimmte Bifidobacterium- und Lactobacillus-Spezies das Wachstum potentiell pathogener und pathogener Bakterien hemmen sind:

- die Produktion von Bakteriozinen [75],
- Stimulation der Produktion antimikrobieller Peptide (Defensine) durch Paneth-Zellen in den Krypten der Darmschleimhaut [8]
- Hemmung der Adhäsion pathogener und potentiell pathogener Mikroorganismen auf der Epitheloberfläche durch Konkurrenz um die gleichen Rezeptoren (Glykokonjugate).

Darüber hinaus modulieren probiotische Bakterien unspezifische und spezifische Immun- und Entzündungsantworten auf Darmebene. Sie stärken die physikalische Mukosabarriere, indem sie die Tight Junctions stabilisieren, welche die Räume zwischen den Epithelzellen der Darmschleimhaut schließen und als Antwort auf verschiedene Signale innerhalb und außerhalb der Zellen selektiv die Passage von Molekülen regulieren. Sie stimulieren die Produktion des sekretorischen IgA, das potentiell schädliche Mikroorganismen blockiert (sog. Immunexklusion) und deren epitheliale Kolonisation und Translokation durch die Darmschleimhaut verhindert. Darüber hinaus scheinen probiotische Bakterien T-Helfer-Zell-Typ-Immunantworten

auszubalancieren [39; 53]. Durch die Vernetzung der verschiedenen Schleimhautimmunsysteme des Körpers kann eine im Darm-assoziierten Immunsystem initiierte Immunantwort auch die Immunantworten der anderen Schleimhautoberflächen beeinflussen [38].

1.5 Die Besonderheiten der Darmbesiedlung bei Frühgeborenen

Bei einem gesunden Fetus ist der Magen-Darm-Trakt praktisch steril. Die bakterielle Besiedlung des Darms des Neugeborenen, die während oder, wie bei Geburt durch Sectio caesarea, unmittelbar nach der Geburt beginnt, wird von genetischen und Umweltfaktoren beeinflusst. Eine im Rahmen einer prospektiven Geburtskohortenstudie in den Niederlanden durchgeführte quantitative Bestimmung (Echtzeit Polymerase Kettenreaktion) ausgewählter Bakterienspezies in Stuhlproben von mehr als 1000 Säuglingen im Alter von einem Monat bestätigte die schon lange bekannte Tatsache, dass vaginal geborene, gesunde, reife, voll gestillte Säuglinge die „gesündeste“ Darmflora haben, d.h. die höchste Anzahl Bifidobacteria und niedrigste Anzahl C. difficile und E. coli [69]. Die wichtigsten Faktoren, welche die Zusammensetzung der Darmflora in den ersten Lebenstagen und -wochen beeinflussten, waren Geburtsmodus, Art der Milchnahrung, Gestationsalter, postnatale Behandlung auf einer Neugeborenenintensivstation sowie die Gabe von Antibiotika.

Bei Frühgeborenen treffen häufig mehrere Faktoren zusammen, welche die Chancen für die Entwicklung der schützenden Bifidusflora reduzieren und einer postnatalen Besiedlung des Darms mit unerwünschten Hospitalkeimen Vorschub leisten. Es spielen die Geburt durch Sectio caesarea, Pflege auf einer Neugeborenenintensivstation, Antibiotikagabe und geringe Milchaufnahme in den ersten Lebenstagen eine Rolle. Mehrere Studien zeigten, dass bei Frühgeborenen die Besiedlung des Kolons mit Bifidobacteria und Lactobacilli verzögert erfolgt, selbst wenn sie mit Muttermilch ernährt werden, und dass die Anzahl potentiell pathogener Bakterien im Stuhl sehr hoch ist [94]. Eine aktuelle Studie, in der die Stuhlflora Frühgeborener mit einer modernen molekularen Methode (PCR-Denaturierende Gradientengelelektrophorese, Abk. PCR-DGGE) untersucht wurde, bestätigte, dass der Darm Frühgeborener auf einer Intensivpflegestation vorwiegend von Keimen aus dem Krankenhausmilieu besiedelt wird und cross-Transmission von Bakterien ein großes Problem darstellt. Während der ersten Lebenstage waren auffallend wenig verschiedene Bakterienspezies im Stuhl der Frühgeborenen vorhanden. Nach und nach wurde die Stuhlflora komplexer. Gleichzeitig nahm die Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der Stuhlflora zwischen den Frühgeborenen zu. Bei allen Frühgeborenen waren Escherichia coli, Enterococcus sp. und Klebsiella pneumoniae die am häufigsten im Stuhl gefundenen Bakterien. Im Gegensatz dazu wies die Zusammensetzung der Stuhlflora bei den

gestillten Reifgeborenen in der Kontrollgruppe nur geringe Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Individuen auf und die vorherrschenden Spezies waren Bifidobacteria [80].

Auf Grund der Störung der normalen bakteriellen Darmbesiedlung ist bei Frühgeborenen das Risiko für die Ansiedlung potentiell pathogener Keime und die Translokation von Bakterien durch die Darmschleimhaut erhöht. Damit wächst das Risiko für Infektionen, die wegen der Unreife des Immunsystems häufig besonders schwer verlaufen und oft zu Sepsis führen. Die Störung der bakteriellen Darmbesiedlung gilt auch als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis [16].

1.6 Nosokomiale Infektionen, Sepsis und nekrotisierende Enterokolitis bei Frühgeborenen

Laut Statistischem Bundesamt Deutschland sind 2005 von 685.795 Lebendgeborenen 1.733 in der Neugeborenenperiode (innerhalb der ersten 28 Lebenstage) gestorben (2,5 %). Obwohl nur etwa 7 % aller Neugeborenen in Deutschland Frühgeborene sind, d.h. vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche geboren werden, standen etwa 36 % der Todesursachen mit Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht in Zusammenhang.

Auch die Morbiditätsrate ist bei Frühgeborenen wesentlich höher als bei Reifgeborenen. Bei den Risikofaktoren für neonatale Sepsis, die z.B. in den USA bei 1 - 10 % der Neugeborenen auftritt und bei bis zu 50 % der Betroffenen letal verläuft, steht Frühgeburtlichkeit an 1. Stelle [32]. Das Sepsis-Risiko nimmt mit abnehmendem Geburtsgewicht zu. Ein besonderes Problem sind nosokomiale Infektionen. Seit dem Jahr 2000 werden Daten zu nosokomialen Infektionen bei neonatologischen Intensivpatienten in 37 neonatologischen Abteilungen deutschlandweit erfasst. Die Überwachung konzentriert sich auf nosokomiale primäre Sepsis, Pneumonie und nekrotisierende Enterokolitis (NEC). Die kumulative Inzidenzdichte (Fälle pro 1000 Patiententage) von Januar 2000 bis Dezember 2003 betrug bei Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (VLBW, Geburtsgewicht < 1500 g) für Sepsis 4,4, für Pneumonie 0,4 und für NEC 0,6. Bei Frühgeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (ELBW, Geburtsgewicht < 1000 g) betrug die jeweilige Inzidenzdichte 9,0, 1,3 und 1,0. Die am häufigsten nachgewiesenen Erreger bei Sepsis waren Koagulase-negative Staphylokokken (55,5 %), Staphylococcus aureus (10,2 %), Enterobacter spp. (5,7 %), Enterokokken (4,9 %) und Klebsiella spp. (4,9 %) [72].

Die NEC wurde, obwohl sie keine gesicherte Infektionskrankheit ist, mit aufgenommen, weil sie oft endemisch und manchmal epidemisch auftritt und für die Morbidität und Mortalität Frühgeborener große Bedeutung hat [72]. Sie ist eine hämorrhagisch-nekrotisierende entzündliche Krankheit des Dünn- und Dickdarms, die gewöhnlich innerhalb der ersten Lebenswoche und 3 - 5 Tage nach Beginn der enteralen Ernährung auftritt und fast ausschließlich bei Frühgeborenen vorkommt [32]. Mit abnehmendem Gestationsalter bei Geburt nimmt das Risiko der NEC zu. Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1500 g liegt die Häufigkeit zwischen 2 und 9 %, bei Frühgeborenen < 1000 g bei bis zu 20 % [4; 82]. Bei einem Teil der Fälle ist ein operatives Eingreifen nicht zu umgehen. Wenn eine ausgedehnte Resektion befallener Darmabschnitte notwendig ist, kann dies zu einem Kurzdarmsyndrom führen. Bei der Heilung geschädigter Darmabschnitte können Stenosen entstehen, die dann ebenfalls eine chirurgische Behandlung erfordern. Die Sterblichkeit beträgt in der gesamten Erkrankungsgruppe ca. 10 %, nach Darmperforation versterben fast ein Drittel der Kinder [82]. Ungefähr ein Viertel der Überlebenden leidet unter Langzeitfolgen [78].

Die genaue Ursache der NEC ist nicht bekannt. Man geht aber davon aus, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt [52]. Mit NEC assoziierte Faktoren sind Frühgeburtlichkeit, Unreife der Barrierefunktion und Motilität des Magen-Darm-Trakts, intestinale Ischämie, Darmbesiedlung mit pathogenen Mikroorganismen sowie enterale Ernährung [78]. Die mesenterial-intestinale Ischämie, die häufig in Assoziation mit bestimmten klinischen Konditionen wie z.B. Frühgeburt, Asphyxie, Hyperviskositätssyndrom, zyanotischen Herzfehlern u.a. auftritt, trägt zur Mukosaschädigung bei und begünstigt die Invasion bakterieller intestinaler Erreger [82]. Heute steht jedoch weniger die klassische Trias Ischämie, Bakterien und enterale Nahrungszufuhr, sondern eher die Rolle der Darmreifung und pro-inflammatorischer Zytokine sowie der postnatalen Darmbesiedlung im Fokus der Forschung [68]. Es wird diskutiert, dass die durch Unreife der Mukosabarriere begünstigte Translokation von Bakterien durch die Darmschleimhaut der entscheidende erste Schritt ist, der die Kaskade der Ereignisse einleitet, die zur Entwicklung der NEC führen [33]. Die Tatsache, dass bei einem Fetus in utero keine NEC vorkommt trotz Stress und fetaler Ingestion von ca. 150 ml Fruchtwasser/kg Körpergewicht/Tag, das Eiweiß, Kohlenhydrate, Fett und Elektrolyte enthält, untermauert die Annahme, dass die bakterielle Darmbesiedlung für die Entwicklung der NEC eine essentielle Rolle spielt [52]. In mehreren Studien wurde eine ausgeprägte Störung der Zusammensetzung der Stuhlflora bei Patienten mit NEC im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden, z.B. seltener eine Kolonisation mit schützenden Bakterien wie Lactobacilli und stattdessen eine Zunahme potentiell pathogener Bakterien wie Clostridium perfringens oder eine erhöhte Anzahl gram-negativer Bakterien, insbesondere Escherichia coli [33]. Diese Beobachtung stützt die Hypothese der Arbeitsgruppe um W. Allan Walker [16],

dass die Störung der normalen Darmbesiedlung Frühgeborener nekrotisierende Enterokolitis verursachen kann.

1.7 Einsatz von Probiotika bei Frühgeborenen

Nosokomiale Infektionen und NEC tragen nicht nur wesentlich zur Mortalität und hohen Morbidität Frühgeborener bei, sie verlängern auch die Krankenhaus-Verweildauer und somit die Behandlungskosten erheblich. Da das Basisproblem Frühgeborener ihre immunologische und funktionelle Unreife ist, erscheint es sinnvoll, dass Präventionsmaßnahmen zur Senkung der hohen Morbidität an diesem physiologischen Schwachpunkt Frühgeborener ansetzen. Die Erkenntnis, dass bestimmte probiotische Bakterien die Mukosabarriere stärken und die Reifung des Immunsystems auf Darmebene stimulieren können, legt den Gedanken nahe, bei Frühgeborenen Probiotika einzusetzen.

Der Einsatz von Probiotika bei der hochempfindlichen Risikopopulation der Frühgeborenen ist interessant, da ihre Sicherheit gut dokumentiert ist. Probiotika bewirken auch keine Störung natürlicher Vorgänge im Körper, sondern führen zur Bildung einer natürlichen Darmflora. Sie sind sozusagen Nahrungsergänzungen und keine Medikamente [34].

In mehreren randomisierten, kontrollierten Studien wurde der Einfluss von verschiedenen Probiotika auf die Darmflora Frühgeborener untersucht [1; 2; 47; 60; 88]. Die Studien zeigen, dass die orale Verabreichung von Probiotika die Darmflora von Frühgeborenen moduliert. Der Prozentsatz der Frühgeborenen, bei denen eine transitorische Kolonbesiedlung durch die oral verabreichten Bakterien nachgewiesen wurde und die Förderung der Besiedlung des Kolons durch Bifidusbakterien sind aber in den verschiedenen Studien unterschiedlich groß. Das kann sowohl an den unterschiedlichen Bakterienstämmen als auch an anderen Unterschieden zwischen den Studien liegen, z.B. im Studiendesign, in der Ernährung, in der Art und Häufigkeit der Antibiotikagabe, im Geburtsgewicht etc.

Auch die präventive Wirkung probiotischer Bakterien bei Frühgeborenen gegen Sepsis und NEC wurde in einigen klinischen Studien untersucht [7; 18; 37; 52; 88].

Insgesamt sind die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien vielversprechend. Bevor eine generelle Empfehlung für den Einsatz von Probiotika bei Frühgeborenen gegeben werden kann, sind jedoch weitere Daten notwendig. Eine noch nicht ausreichend geklärte Frage ist z.B. die Sicherheit von Probiotika für Frühgeborene bei sehr früher Verabreichung nach der Geburt. Bisher wurde nur eine Studie publiziert, in der

Frühgeborene die erste Probiotikagabe bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden erhielten [37]. Auch die Wirkungen probiotischer Bakterien auf die Immunfunktion und den Entzündungsstatus des Darms Frühgeborener wurden noch nicht ausreichend untersucht.

2 Zielstellung

Ziel der Arbeit war es, zur Klärung folgender Fragen beizutragen:

1. Ist Bifidobacterium lactis Bb12 für Frühgeborene gut verträglich und sicher, selbst dann, wenn die Verabreichung von B. lactis Bb12 bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt beginnt?
2. Hat die Verabreichung von B. lactis Bb12 Einfluss auf das enterale Nahrungsvolumen und die Gewichtszunahme der Frühgeborenen?
3. Bewirkt B. lactis Bb12 Veränderungen der bakteriellen Fermentation im Kolon und
4. Veränderungen der Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut bei Frühgeborenen?
5. Korrelieren die Ergebnisse der Laboruntersuchungen der Fermentationsprodukte und der Parameter der Immunantwort und Entzündungsaktivität im Darm mit der Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl, die von einem anderen Arbeitsteam in der gleichen Studie ermittelt wurde [61]?

3 Probanden und Methoden

3.1 Studiendesign

Die klinische Studie wurde als prospektive, randomisierte, kontrollierte, doppelblinde Studie (Verum vs. Plazebo) geplant. Die Probanden für beide Studiengruppen wurden parallel rekrutiert und geführt.

Die Durchführung der Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Die Eltern der Probanden wurden eingehend mündlich und schriftlich über die Studie aufgeklärt bevor ihnen die Einverständniserklärung zur Unterschrift vorgelegt wurde.

3.2 Probanden

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte zwischen August 2003 und Juli 2005. Infrage kamen alle in diesem Zeitraum vom 1. Lebenstag an auf der Neugeborenenintensivstation im Klinikum Ernst von Bergmann in Potsdam behandelten Neugeborenen, sofern sie die geforderten Aufnahmekriterien erfüllten.

Einschlusskriterien waren:

- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern
- Gestationsalter bei Geburt > 26 und < 37 Wochen

Ausschlusskriterien waren:

- Angeborene Fehlbildungen des Gastrointestinaltrakts
- Geplante Verlegung in ein anderes Krankenhaus innerhalb der ersten Lebenswoche
- Hydrops fetalis
- Chromosomenaberration
- Bekannte mütterliche HIV-Infektion

69 Frühgeborene konnten in die Studie aufgenommen werden.

3.3 Randomisierung

Bei Aufnahme in die Studie wurden die Frühgeborenen auf der Basis von Geburtsgewicht, Gestationsalter, Geschlecht, arteriellem Nabelschnurblut-pH-Wert und Apgar Score 5 Minuten nach der Geburt mit Hilfe eines Randoma-Programms (Randoma Software Version 4.3 - HaSoTec, Rostock) entweder der B. lactis- oder der Plazebo-Gruppe zugeordnet.

3.4 Studienpräparate und Dosierung

Die B. lactis-Gruppe erhielt einen Muttermilchverstärker **mit** Zusatz von Bifidobacterium lactis Bb12 (2 x 10^9 Bakterien / g Pulver). Die Plazebo-Gruppe erhielt den gleichen Muttermilchverstärker **ohne** Zusatz von Bifidobacterium lactis Bb12. Die Dauer der Applikation des Studienpräparates betrug 21 Tage.

Als Muttermilchverstärker wurde Nestlé FM 2000 verwendet, ein speziell für diese Studie hergestelltes Pulver. Es setzt sich zusammen aus extensiv hydrolysiertem Molkenprotein, Laktose, Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen. Die genaue Zusammensetzung findet sich im Anhang. Der lyophilisierte Stamm Bifidobacterium lactis Bb12 (B. lactis Bb12) für das probiotische Präparat wurde auf kommerziellem Wege durch Nestlé von Christian Hansen Biosystem A/S (CHL) bezogen. Beide Präparate, FM 2000 ohne und mit Bifidobacterium lactis Bb12, wurden von der Firma Nestlé in Konolfingen, Schweiz, hergestellt und für die Studie zur Verfügung gestellt.

Für jedes Kind wurde anhand der Randomisierungslisten der jeweilige Muttermilchverstärker mit oder ohne Zusatz von Bifidobacterium lactis Bb12 bereitgestellt. Die beiden Studienpräparate waren weder als Pulver noch in gelöstem Zustand voneinander zu unterscheiden.

Die Zubereitung der Lösungen erfolgte jeweils kurz vor der morgendlichen Applikation auf der Station. Es wurden 10 g Pulver des Muttermilchverstärkers FM 2000, das entweder Bifidobacterium lactis Bb12 mit einer Konzentration von 2 x 10^9 Bakterien/g oder keine probiotischen Bakterien enthielt, auf 50 ml mit Wasser aufgelöst. Die wässrige Lösung mit B. lactis Bb12 enthielt 4 x 10^8 Bakterien / ml mit einer Osmolarität von 428 mosmol/l.

Die zubereiteten Lösungen wurden bis zur Applikation im Kühlschrank aufbewahrt und der Rest wurde am Ende des Tages verworfen. Das jeweilige Studienpräparat wurde 2-mal täglich über 21 Tage verabreicht. Die erste Verabreichung erfolgte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden. Bei den Kindern der B. lactis-Gruppe wurde die Gesamtdosis B. lactis Bb12 stufenweise von 1,6 x 10^9 Bakterien an Tag 1 bis auf 4,8 x 10^9 Bakterien an Tag 4 gesteigert und dann bis zum Tag 21 beibehalten. Die Dosisverteilung pro Tag ist in Tabelle 1 ausgewiesen.

Tab. 1: Dosierung des Studienpräparates und Dosis B. lactis Bb12

Lebenstag	B. lactis-Gruppe (A)		Plazebo-Gruppe (B)
	FM 2000 mit B. lactis		FM 2000 pro Tag
	pro Tag	Bakterien/Tag	
1	2 x 2 ml	$1{,}6 \times 10^9$	2 x 2 ml
2	2 x 3 ml	$2{,}4 \times 10^9$	2 x 3 ml
3	2 x 4 ml	$3{,}2 \times 10^9$	2 x 4 ml
4 – 21	2 x 6 ml	$4{,}8 \times 10^9$	2 x 6 ml

Die Studienpräparate wurden zusätzlich zu der normalen Nahrung gegeben, entweder über eine nasogastrale Sonde oder oral mit einer Spritze vor einer Flaschenmahlzeit / Stillmahlzeit.

3.5 Ernährungsregime

Die Nahrung wurde, solange wie notwendig, über eine nasogastrale Sonde verabreicht. Allen Müttern wurde empfohlen, ihr Kind möglichst mit Muttermilch zu ernähren. Die abgepumpte Muttermilch wurde entweder sofort angeboten oder tiefgefroren und bei –70°C aufbewahrt. Wenn keine oder nicht genügend Muttermilch zur Verfügung stand, wurde pasteurisierte Frauenmilch oder Alfaré zugefüttert. Frühgeborenennahrung wurde nur verwendet, wenn die Milchproduktion trotz aller Bemühungen nicht in Gang kam oder sich die Mutter für Abstillen entschied.

Am 1. Lebenstag erhielten alle Frühgeborenen zur Deckung ihres Wasser- und Energiebedarfs intravenöse Infusionen mit 5 %-iger Glukoselösung. Ab dem 2. Lebenstag wurde die parenterale Ernährung ggf. ergänzt und solange fortgesetzt bis die enterale Ernährung ausreichend aufgebaut war, um den Wasser- und Nährstoffbedarf des Frühgeborenen zu decken.

Der enterale Nahrungsaufbau wurde nach dem auf der neonatologischen Intensivstation in der Kinderklinik in Potsdam üblichem Schema durchgeführt, das folgendermaßen aussieht:

- Beginn des enteralen Nahrungsaufbaus, wenn möglich, innerhalb der ersten 24 Lebensstunden mit 1 - 2 ml dreistündig, 1. und 2. Mahlzeit Maltodextrin (15 %), dann rohe Muttermilch oder pasteurisierte Frauenmilch bzw. ggf. Alfaré:
- bei gutem Allgemeinbefinden Steigerung des Volumens um insgesamt 20 bis 40 ml pro Tag je nach dem Geburtsgewicht, bis eine Menge von 150 - 200 ml Muttermilch / kg Körpergewicht erreicht ist

- wenn eine Menge von etwa 20 ml / Mahlzeit toleriert wird, erfolgt die Anreicherung der Muttermilch / Frauenmilch mit einem handelsüblichen Muttermilchverstärker (FM 85 3 - 5 g / 100 ml Muttermilch)

3.6 Datenerfassung und Untersuchungen

Im Studienprotokoll wurde dokumentiert, ob die Mutter einen vorzeitigen Blasensprung (> 12 Stunden vor der Geburt), Antibiotika vor oder unter der Geburt bekommen und Fieber hatte.

Von jedem Kind wurden nach der Geburt folgende Daten dokumentiert:

- Geschlecht, Einling / Mehrling, Geburtsmodus
- Gewicht, Länge und Kopfumfang, Gestationsalter auf Basis des errechneten Geburtstermins
- Apgar Score (1, 5 und 10 Minuten nach Geburt)
- arterieller Nabelschnurblut pH-Wert

Während der Studienperiode wurden die Kinder täglich mindestens einmal ärztlich untersucht. Dabei wurde besonders auf klinische Symptome geachtet, die Zeichen für eine Infektion sein könnten. Zweimal pro Woche (dienstags und freitags) wurde der klinische Gesamtzustand mittels eines klinischen Scores evaluiert (die Scorekomponenten finden sich im Anhang).

Die Kinder wurden täglich einmal unbekleidet mit einer geeichten Waage (Messgenauigkeit von 5 g) gewogen.

Außerdem wurden täglich Art und Volumen der enteralen Ernährung sowie Frequenz und Beschaffenheit der Stühle aufgezeichnet.

Darüber hinaus wurden im Studienprotokoll alle schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse und geringfügigen unerwünschten Ereignisse, die klinisch relevant waren und bei denen ein Zusammenhang mit dem Studienpräparat vermutet werden konnte, dokumentiert (s. Anlage im Anhang).

1, 2 und 3 Wochen nach Beginn der Gabe des Studienpräparates wurden von jedem Kind, Stuhlproben untersucht. Aus ethischen Gründen wurde auf invasive Routine-Untersuchungen verzichtet. Venöse Blutabnahmen wurden nur bei klinischer Indikation, z.B. bei Verdacht auf Infektionen durchgeführt.

In den Stuhlproben wurden der pH-Wert und die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren insgesamt und von Acetat sowie von Laktat gemessen, d.h. von Stoffwechselprodukten, die bei der Fermentation von Kohlenhydraten und Proteinen durch anaerobe Bakterien produziert werden. Außerdem wurden die fäkalen Gesamt-Konzentrationen der sekretorischen Immunglobuline A, der wichtigsten vom Darm-assoziierten Immunsystem gebildeten Antikörper und die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen, die Marker für den Entzündungsstatus des Darms sind, bestimmt.

In den Blutproben wurden bei Infektionsverdacht C-reaktives Protein (CRP) und Interleukin-6 bestimmt und bei Sepsis aerobe und anaerobe Blutkulturen angelegt.

3.7 Labormethoden zur Bestimmung des fäkalen pH-Werts und von kurzkettigen Fettsäuren sowie Calprotectin und sekretorischem IgA im Stuhl

3.7.1 pH-Wert

Der pH-Wert wurde im frischen Stuhl mit einer Glaselektrode (Hamilton Biotrode, Präcitronic, Deutschland), die mit einem pH-Meter (MV 88, Präcitronik, Dresden, Deutschland) verbunden war, gemessen.

3.7.2 Kurzkettige Fettsäuren

Frische Stuhlproben (300 mg) wurden 5-fach in Wasser verdünnt und bei 15000 x g 5 Minuten zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden mit 23,6 µl 12 mM Isobuttersäure (Internationaler Standard), 280 µl 0,36 M $HCLO_4$ und 270 µl 1 M NaOH gemischt. Das Gemisch wurde lyophilisiert und der Rückstand in 400 µl Aceton und 100 µl 5 M Ameisensäure aufgelöst. Nach Zentrifugieren bei 4000 x g für 5 Minuten bei Zimmertemperatur wurde 1 µl des Überstandes in einen HP 5890 Serie II Gaschromatographen (Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit einer HP-20 M Säule (25 m x 0,32 mm; Filmdicke 0,3 µm; Carbowax 20 M, J& W Scientific, CA, USA) und einem Flammenionisationsdetektor, injiziert. Als Trägergas wurde Helium mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min benutzt. Die Anfangstemperatur der Säule von 75° C für eine Minute wurde nachfolgend mit einer Rate von 20° C/min bis auf 100° C und dann bis auf 150° C mit einer Rate von 5° C/min gesteigert. Die Endtemperatur von 150° C wurde für 3 Minuten erhalten. Die Temperatur des Injektors und des Detektors betrug 200° C. Die Split-Ratio war 1:10. Authentische Standards wurden in alle Läufe inkorporiert.

3.7.3 Laktat

Fäkales Laktat wurde mit einem kommerziell verfügbaren Testkit (Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) nach den Instruktionen des Herstellers bestimmt. Eine Leerprobe (Probe und $H_2O_{redist.}$) wurde für jede Probe eingeschlossen, weil die Farbe des Stuhles mit der Messung interferierte. Die Messungen erfolgten in einer Mikrotiterplatte und die Farbentwicklung wurde mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Spectra rainbow, SLT Labinstruments, Österreich) abgelesen.

3.7.4 Calprotectin und sekretorisches Immunglobulin A

Calprotectin und sIgA wurden aus 100 mg frischem Stuhl mit dem PhiCal™ Test und sIgA ELISA-Kits (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) nach den Instruktionen des Herstellers bestimmt. Die Absorption wurde mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Spectra rainbow, SLT Labinstruments, Österreich) bei 405 nm gemessen.

3.8 Statistische Methoden

3.8.1 Körpergewicht, enterales Nahrungsvolumen und klinischer Score

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Software-Programm SAS JMP Version 6.03 durchgeführt.

Die Plausibilität der Daten wurde mit grafischen Methoden geprüft wie z.B. mittels Korrelationsanalysen zwischen Geburtsgewicht und dem nachfolgenden Verlauf unter der Intervention.

Die Verteilung der Variablen wurde geprüft und entschieden, welche statistischen Kenngrößen für die deskriptive Darstellung der Ergebnisse verwendet werden (arithmetischer Mittelwert, Median, entsprechend Streumaße). Für die Vergleiche zwischen den beiden Studiengruppen wurden in der Regel parametrische Tests durchgeführt. Bei deutlicher Abweichung von der Normalverteilung wurde der Wilcoxon Rangsummentest verwendet. Unterschiede zwischen qualitativen Variablen wurden mit dem Chiquadrat-Test statistisch geprüft.

Welche der beiden Gruppen, A oder B, Bifidobacterium lactis Bb12 erhalten hat, war bei der Auswertung nicht bekannt. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig auf dem Niveau 0,05 durchgeführt.

Die relevanten Variablen wurden am Beginn der Studie auf Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen geprüft.

Die Auswertung der Verläufe fokussierte auf Probanden, bei denen vollständige Daten bis Tag 21 vorhanden waren. Für die stetigen Zielgrößen wurden überlagerte Einzelverläufe mit Gruppenzugehörigkeit (Farbe) dargestellt, um eventuelle Profil-

Unterschiede in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit zu visualisieren. Entsprechend wurden Mittelwertsverläufe pro Gruppe grafisch dargestellt. Statistische Tests wurden vorwiegend für den Endzeitpunkt sowie für geeignete Kenngrößen wie z.B. den Tag, an dem nachhaltig das Geburtsgewicht wieder erreicht wurde, und die Gesamtmenge des enteralen Nahrungsvolumens durchgeführt.

Für Zielgrößen wie Körpergewicht und enterales Nahrungsvolumen wurde die Abhängigkeit von relevanten Einflussgrößen wie Art der Nahrung, Geburtsgewicht und Antibiotika-Behandlung mit dem verallgemeinerten linearen Modell untersucht.

3.8.2 Kurzkettige Fettsäuren, IgA, Calprotectin und Anzahl der Bifidusbakterien

Diese statistischen Analysen wurden mit dem Statistik-Paket SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) durchgeführt.

Mit einem verallgemeinerten gemischten linearen Modell wurde die Abhängigkeit von relevanten Einflussgrößen wie Behandlung (B. lactis Bb12 oder Plazebo), Zeit der Probensammlung, Woche der Behandlung und Antibiotikagabe analysiert. Um die Verbindung zwischen SCFA, sIgA, Calprotectin und der Anzahl an Bifidusbakterien zu bestimmen, wurden intra-Probanden-Korrelationen berechnet. Es wurde die wöchentliche und die gesamte Wirkung der B. lactis Bb12-Supplementierung (betraf alle Datenpunkte) berechnet. Die Kinder in der B. lactis- und Plazebo-Gruppe wurden weiter aufgesplittet, um den Einfluss der Antibiotikagabe zu prüfen.

Für alle Analysen wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war ($p < 0,05$). Für die Grafiken wurden folgende Anmerkungen benutzt, um den Grad der Signifikanz anzuzeigen: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Fehlerleiste repräsentiert den Standardfehler.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studiengruppen

Von den 69 Studienteilnehmern sind 37 randomisiert der B. lactis-Gruppe und 32 der Plazebo-Gruppe zugeordnet.

Das durchschnittliche Geburtsgewicht beträgt in der B. lactis-Gruppe 1449,16 g ± 343,41 und in der Plazebo-Gruppe 1397,97 g ± 331,11. Der Unterschied ist bei Anwendung des üblichen t-Tests nicht statistisch signifikant (p = 0,947).

Auch die durchschnittliche Rangordnung der Perzentilen für das Geburtsgewicht bezogen auf die Schwangerschaftsdauer der beiden Gruppen ist vergleichbar (36,69 vs. 33,05, p = 0,441). Das Gestationsalter beträgt in der B. lactis-Gruppe im Durchschnitt 31,05 ± 2,31 Wochen und in der Plazebo-Gruppe 31,27 ± 0,09 Wochen. Der Unterschied ist bei Anwendung des üblichen t-Tests nicht statistisch signifikant (p = 0,575).

In der B. lactis-Gruppe liegt bei 13,5 % (5/37) der Kinder das Geburtsgewicht unter 1000 g, in der Plazebo-Gruppe bei 15,6 % (5/32). 64 % der Frühgeborenen sind weiblich, der Anteil weiblicher Frühgeborener ist in beiden Gruppen vergleichbar. Auch bei den anderen Parametern (arterieller Nabelschnurblut-pH-Wert, Apgar Score 5 Minuten nach Geburt), auf denen die Randomisierung basierte, bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen. Die Randomisierungs-Parameter der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe sind in Tab. 2 zusammengefasst (Apgar Score 5 Minuten nach Geburt nicht dargestellt).

Tab. 2: Vergleich der Randomisierungs-Parameter in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B)

Parameter	**B. lactis-Gruppe (A)** n = 37	**Plazebo-Gruppe (B)** n = 32	**p-Wert Vergleich**
weiblich männlich	62,2 % 37,8 %	65,6 % 34,4 %	0,806
Geburtsgewicht* (g)	1449,16 ± 343,41	1397,97 ± 331,11	0,947
Gestationsalter*	31,05 ± 2,31	31,27 ± 0,09	0,575
arterieller Nabelschnurblut-pH-Wert*	7,31 ± 0,07	7,29 ± 0,09	0,165

* Mittelwert ± SD

Von 69 Kindern waren 8 (11,6 %) vaginal geboren worden und 61 (88,4 %) durch Sectio caesarea. Der Prozentsatz der vaginal geborenen Kinder in der B. lactis-Gruppe und in der Plazebo-Gruppe ist vergleichbar (13,5 % [5/37] vs. 9,4 % [3/32]).

25 (36,2 %) aller Studienteilnehmer wurden als Zwillinge und 6 (8,7 %) als Drillinge geboren. In der B. lactis-Gruppe waren von 37 Kindern 14 (35,9 %) als Zwillinge und 2 (5,4 %) als Drillinge geboren, in der Plazebo-Gruppe waren von 32 Kindern 11 (34,4 %) als Zwillinge und 4 (12,5 %) als Drillinge geboren.

4.2 Drop-out-Raten und Gründe für das Ausscheiden vor Ende der Interventionsperiode

23,2 % (16/69) aller Probanden schieden vor dem Ende der 21-tägigen Interventionsperiode aus. In der B. lactis-Gruppe ist die Drop-out-Rate mit 27 % (10/37) höher als in der Plazebo-Gruppe (18,8 %, 6/32), der Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant (p = 0,88). Ein Kind in der B. lactis-Gruppe (Studiennummer 49) ist am 32. Lebenstag verstorben (Zustand nach Nierenvenenthrombose und nachfolgend Klebsiellen-Sepsis; laut Prüfarzt kein kausaler Zusammenhang mit dem Studienpräparat). Dieses Kind wurde in die Auswertungen einbezogen, da von ihm vollständige Daten bis zum Ende der Interventionsperiode (Tag 21) vorhanden waren.

In Tab. 3 sind alle Frühgeborenen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe, die vor dem 21. Lebenstag aus der Studie ausgeschieden sind, mit Angabe des Geburtsgewichts und dem Zeitpunkt und Grund für das vorzeitige Ausscheiden aufgelistet.

Tab. 3: Drop-outs in der B.-lactis-Gruppe (A) und der Plazebo-Gruppe (B) mit Geburtsgewicht, Zeitpunkt und Grund für das Ausscheiden vor Ende der 21-tägigen Interventionsperiode.

Studien-Gruppe / Nr.	Geburts-gewicht (g)	Drop-out-Tag (Lebenstag)	Drop-out-Grund
A / 4	1210	11	schwere Infektion (Blutkultur negativ), enterale Ernährung vorübergehend abgesetzt
A / 54	999	4	schwerwiegende Probleme beim enteralen Nahrungsaufbau bei Infektion (CRP > 22,7 μg/l)
A / 56	945	3	NEC, nach Operation Kurzdarmsyndrom
A / 63	1335	4	abdominelle Symptomatik, enterale Ernährung vorübergehend abgesetzt
A / 73	740	7	schwere Sepsis (Enterokokken)

Studien-Gruppe / Nr.	Geburts-gewicht (g)	Drop-out-Tag (Lebenstag)	Drop-out-Grund
A /10	1970	18	nach Hause entlassen
A / 31	1570	7	versehentliche Verwechslung der Studienpräparate
A / 44	2010	18	Wunsch der Eltern
A / 46	1850	19	Wunsch der Eltern
A / 57	2260	15	Wunsch der Eltern
B / 21	1835	8	blutige Stühle
B / 48	1450	11	NEC
B / 55	740	13	NEC
B / 58	910	17	Infektion mit abdomineller Symptomatik, enterale Ernährung vorübergehend abgesetzt
B / 11	1720	11	nach Hause entlassen
B / 45	1665	17	Wunsch der Eltern

Den Eltern war vor Studienbeginn das Recht zugesprochen worden, dass sie das Einverständnis zur Teilnahme ihres Kindes jederzeit ohne Angabe der Gründe wieder zurückziehen können. Deshalb sind die Gründe, warum Eltern ihr Kind vorzeitig aus der Studie nahmen, nicht bekannt.

Ein Zusammenhang zwischen dem Studienabbruch aus medizinischer Indikation und der Verabreichung des jeweiligen Studienpräparates wurde von den behandelnden Ärzten in keinem Fall als sicher oder wahrscheinlich angesehen.

4.3 Klinische Scorewerte bei Beginn und im Verlauf der Studienperiode

Die klinischen Scorewerte wurden zu folgenden Zeitpunkten erfasst:

T0: innerhalb der ersten 24 Lebensstunden

T1: 1. Lebenswoche

T2: 2. Lebenswoche

T3: 3. Lebenswoche.

In den ersten 3 Lebenswochen wurden die klinischen Scorewerte zweimal pro Woche ermittelt. Die Einzelwerte wurden in die jeweiligen statistischen Berechnungen mit einbezogen.

Einen groben Überblick über die Einzelverläufe der klinischen Scorewerte gibt die Abb. 1. Ein Kind von den insgesamt 69 Probanden wurde von der Auswertung ausgeschlossen, weil nur der Scorewert vom Zeitpunkt T0 vorhanden war. Der Überblick zeigt, dass viele Scorewerte auf dem Niveau von 21 liegen. 2 Scorewerte von Kindern der B. lactis-Gruppe unterschreiten den Score von 10.

Die mittleren Scorewerte betragen zum Zeitpunkt T0 in der B. lactis-Gruppe 17,69 und in der Plazebo-Gruppe 17,67. Von der ersten bis zur dritten Lebenswoche steigen die Mittelwerte in beiden Gruppen kontinuierlich bis auf 20.25 (B. lactis-Gruppe) bzw. 20 (Plazebo-Gruppe) an (s. Abb. 2).

In der B. lactis-Gruppe liegt der Mittelwert der klinischen Scorewerte in der ersten Lebenswoche (T1) bei 18,26, in der zweiten Lebenswoche (T2) bei 19,58 und in der dritten Lebenswoche (T3) bei 20,25. Der Mittelwert der klinischen Scorewerte in der Plazebo-Gruppe ist in der ersten Lebenswoche 18,52, in der zweiten Lebenswoche 19,38 und in der dritten Lebenswoche 20,00.

Die mittleren und medianen Scorewerte der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe sind zum Zeitpunkt T0 gut vergleichbar. Die B. lactis-Gruppe liegt im Mittelwert tendenziell etwas höher.

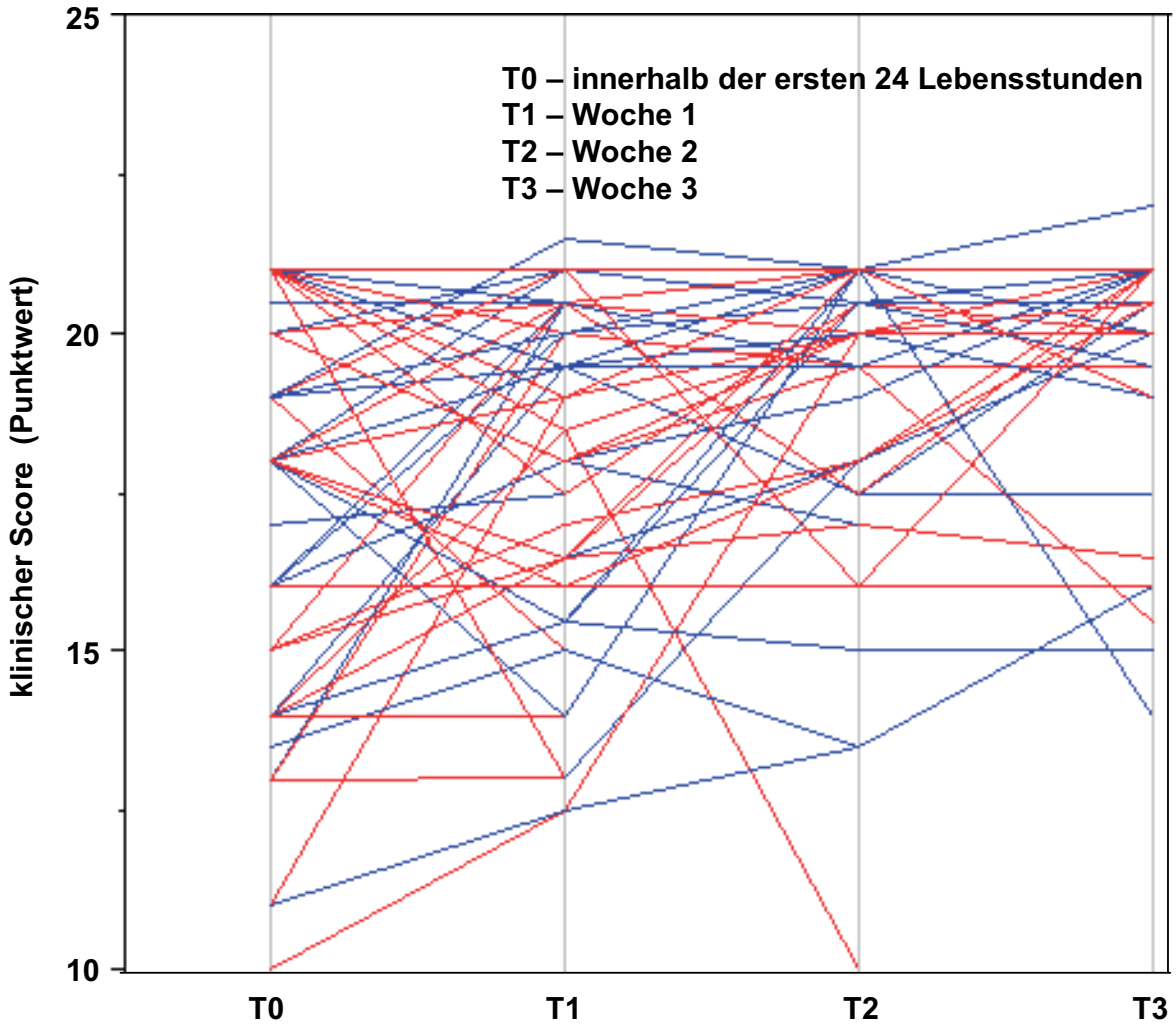

Abb. 1: Grober Überblick über die Einzelwerte der klinischen Scorewerte (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

In der ersten Lebenswoche (T1) liegt der mittlere Scorewert in der Plazebo-Gruppe tendenziell etwas höher. Ab der zweiten Lebenswoche liegt der mittlere Scorewert in der B. lactis-Gruppe tendenziell etwas höher als in der Plazebo-Gruppe. Die Mediane beider Gruppen sind an den jeweiligen Zeitpunkten identisch. Die Unterschiede in den Mittelwerten basieren auf Unterschieden in den Einzelwerten.

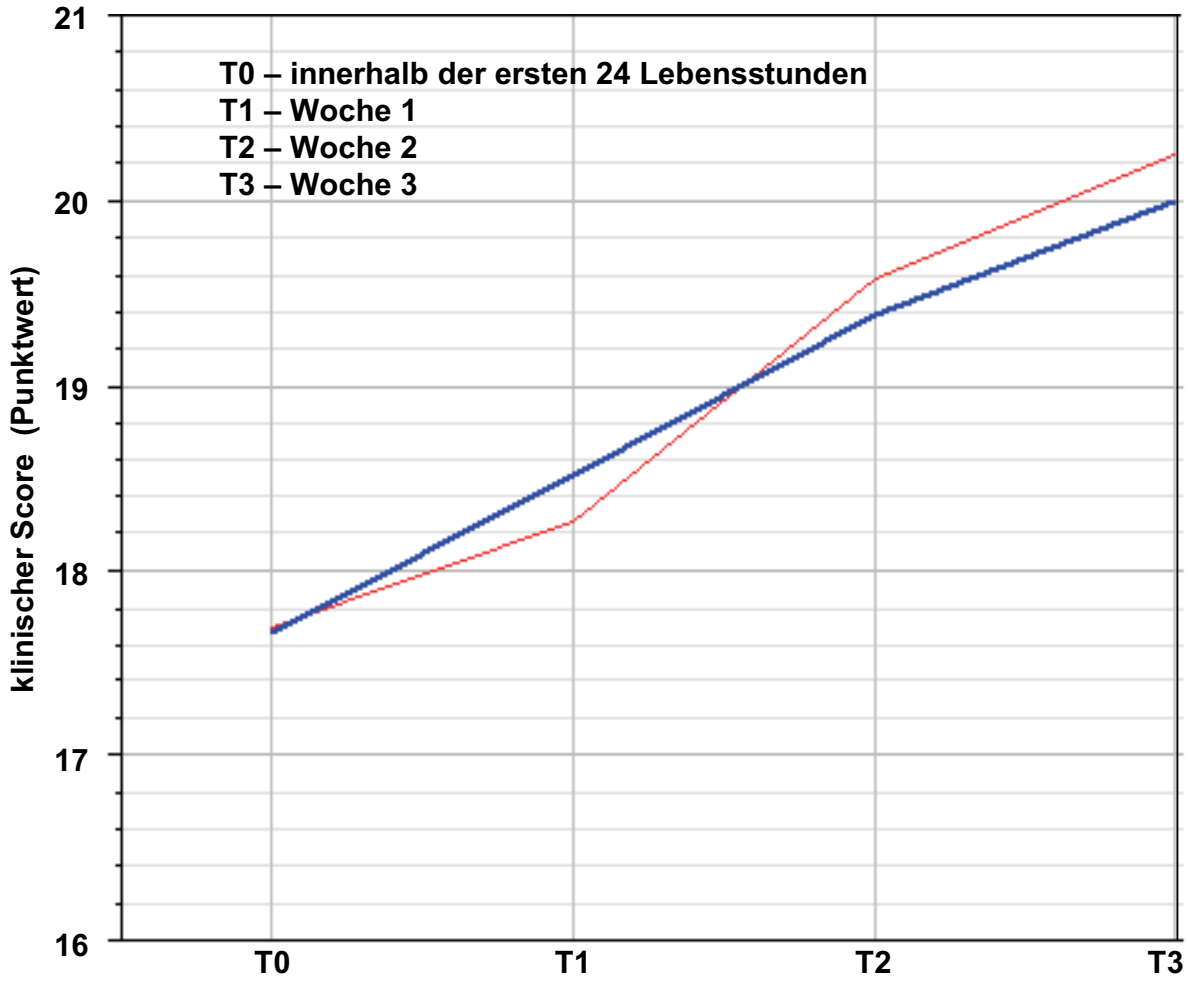

Abb. 2: Mittelwertverlauf des klinischen Scores (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

Die anschließende Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Mittelwerte und Mediane der klinischen Scorewerte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und in der 1. , 2. und 3. Lebenswoche.

Tab. 4: Mittelwerte und Mediane der klinischen Scorewerte in der B. lactis- (A) und in der Plazebo-Gruppe (B) innerhalb der ersten 24 Lebensstunden (T0) und den ersten 3 Lebenswochen (T1, T2, T3) (p Wert: Mittelwertvergleich mit t-Test, Vergleich der Mediane mit Wilcoxon Rangsummentest)

		Gruppen		p-Wert
		B. lactis (A)	Plazebo (B)	Vergleich
Score T0	Anzahl der Kinder	36	30	
	Mittelwert	17,69	17,67	0,97
	Median	18,5	18,0	0,74
Score T1	Anzahl der Kinder	36	32	
	Mittelwert	18,26	18,52	0,69
	Median	19,0	19,5	0,68
Score T2	Anzahl der Kinder	31	30	
	Mittelwert	19,58	19,38	0,74
	Median	20,5	20,5	0,62
Score T3	Anzahl der Kinder	30	28	
	Mittelwert	20,25	20,00	0,59
	Median	21,0	21,0	0,73

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die klinischen Scorewerte der Kinder im Verlauf im Mittel kontinuierlich zunehmen, wobei sich ein Unterschied zwischen der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe tendenziell im Mittelwert, nicht aber im Median andeutet. Weder im parametrischen noch im verteilungsfreien Test ist jedoch ein signifikanter Unterschied in der Scorewertentwicklung erkennbar.

4.4 Gewichtsverlauf und enterales Nahrungsvolumen und Art der Nahrung in den ersten 3 Lebenswochen

In die statistische Auswertung wurden nur die Kinder einbezogen, deren Daten bis zum 21. Lebenstag vollständig erfasst werden konnten. Von 26 Kindern der B. lactis-Gruppe und von 23 Kindern der Plazebo-Gruppe waren alle erforderlichen Daten vollständig erfasst worden.

4.4.1 Gewichtsverlauf in den ersten 3 Lebenswochen

Von 26 Kindern der B. lactis-Gruppe und 23 Kindern der Plazebo-Gruppe sind in Abb. 3 die Einzelverläufe des Körpergewichts in Gramm in den ersten 21 Lebenstagen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Kind der B. lactis-Gruppe ein verhältnismäßig hohes Geburtsgewicht und ein Kind der Plazebo-Gruppe ein relativ niedriges Geburtsgewicht hat.

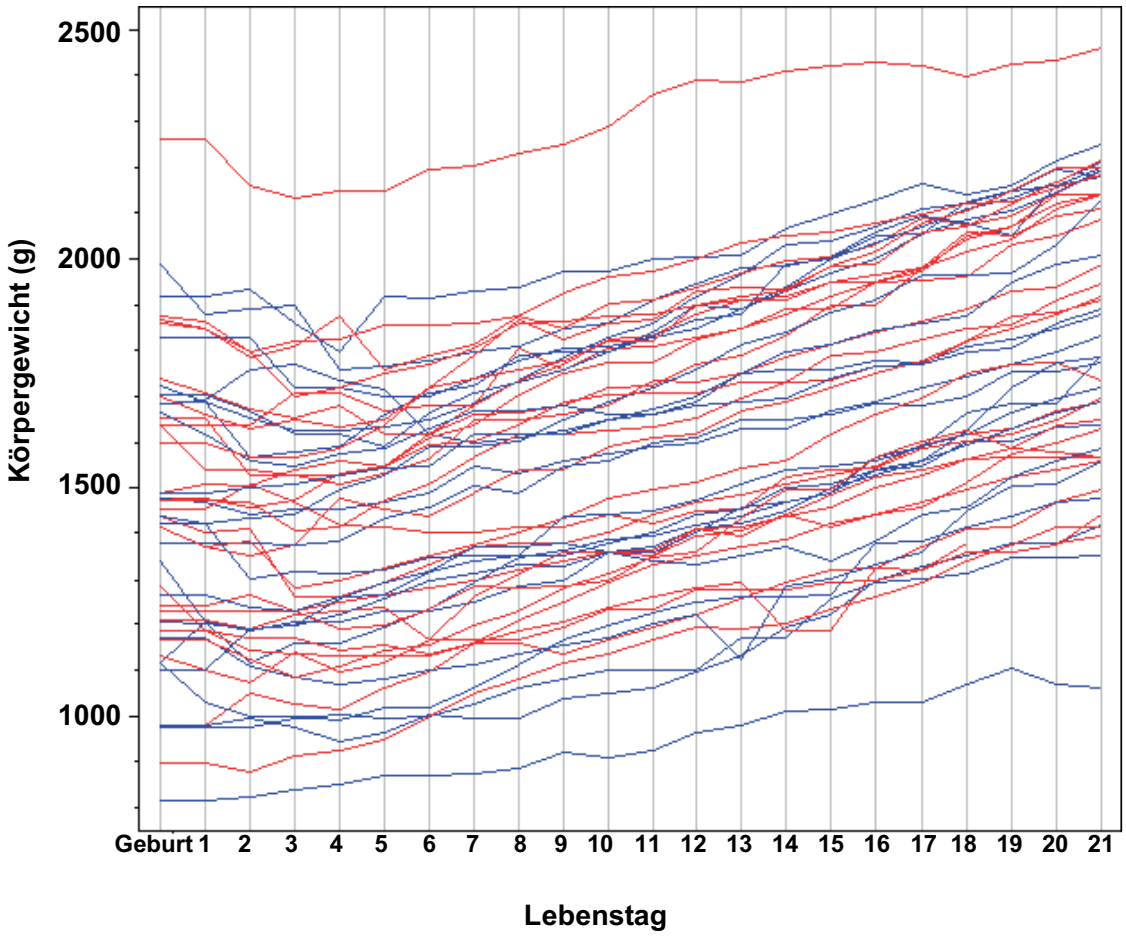

Abb. 3: Einzelverläufe des Körpergewichts (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

Das mittlere Geburtsgewicht beträgt in der B. lactis-Gruppe 1474,8 g ± 310,1 (SD) und in der Plazebo-Gruppe 1414,1 g ± 323,4 (SD). Das Geburtsgewicht ist im Mittel in der B. lactis-Gruppe um 60,7 g höher als in der Plazebo-Gruppe (Abb. 4) .Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (p = 0,506).

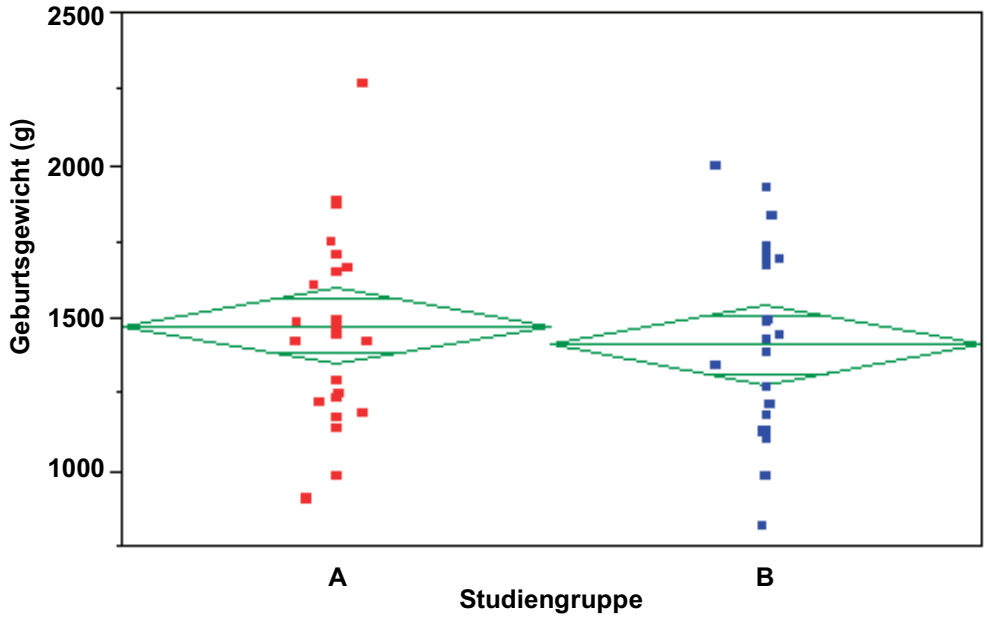

Abb. 4: Geburtsgewicht in der B. lactis- (A) und in der Plazebo-Gruppe (B)

Bis zum 3. Behandlungstag (B. lactis-Gruppe) bzw. 4. Lebenstag (Plazebo-Gruppe) fällt das Geburtsgewicht im Mittel um knapp 50 g ab. Danach steigt es im Mittel stetig an, wobei ab dem 5. – 6. Lebenstag der Anstieg mit durchschnittlich 27 g pro Tag annähernd linear ist (Abb. 6).

In der B. lactis-Gruppe dauert es im Durchschnitt 0,19 Tage länger bis zum Wiedererreichen des Geburtsgewichtes (Abb. 5). Der Unterschied ist bei weitem nicht statistisch signifikant (p = 0,85, zweiseitiger Test).

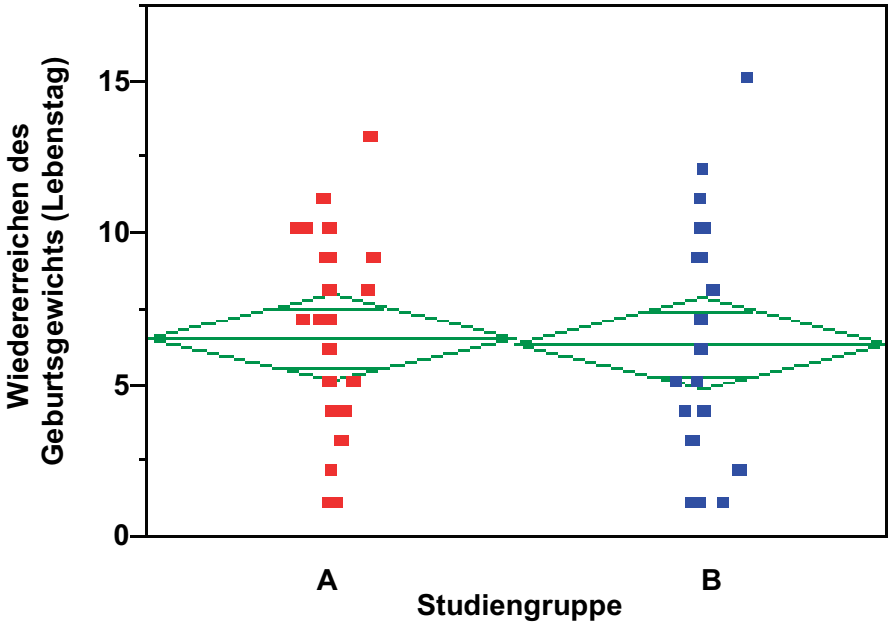

Abb. 5: Tag an dem das Geburtsgewicht nachhaltig wieder erreicht wurde. B. lactis- (A), Plazebo-Gruppe (B)

Der nahezu parallele Verlauf des Körpergewichts beider Gruppen in den ersten 21 Lebenstagen ist in der Abbildung 6 gut zu erkennen.

Kinder mit einem geringeren Geburtsgewicht, die in der Studie verblieben sind, nehmen relativ und tendenziell auch absolut stärker zu als Kinder mit etwas höherem Geburtsgewicht. Die Kinder der Plazebo-Gruppe nehmen im Mittel etwas mehr zu als die Kinder der B. lactis-Gruppe.

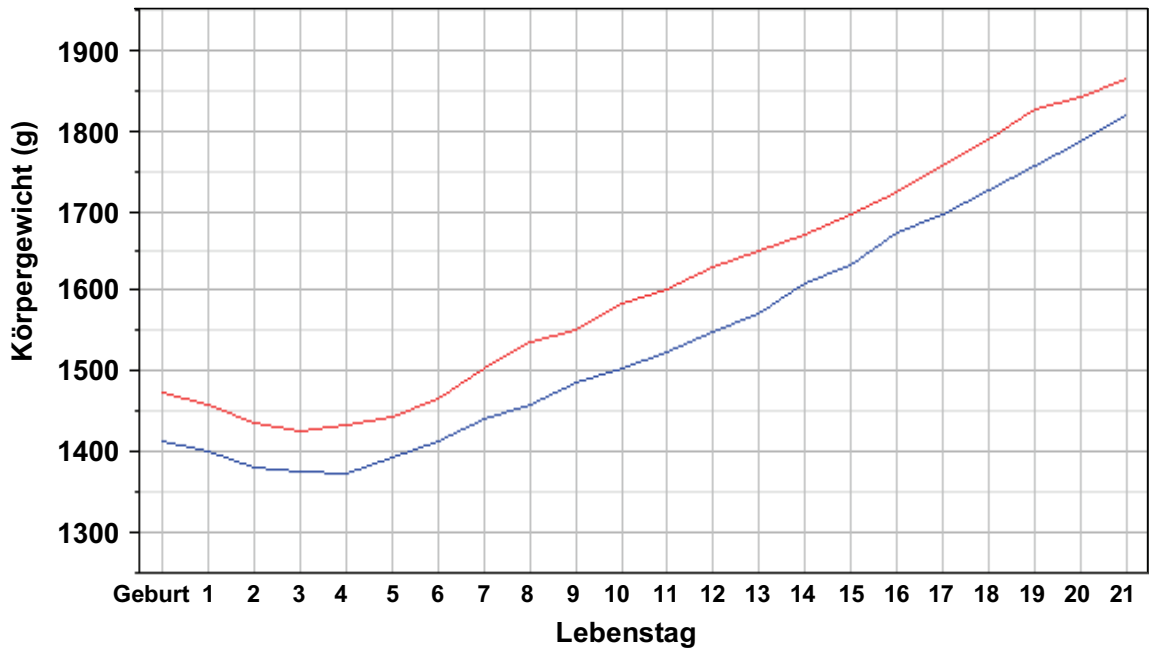

Abb. 6: Mittelwertverlauf des Körpergewichts (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

Am 21. Lebenstag beträgt das mittlere Körpergewicht in der B. lactis-Gruppe 1864,2 g ± 306,5 (SD) und in der Plazebo-Gruppe 1818,3 g ± 321,8 (SD). Das mittlere Körpergewicht in der B. lactis-Gruppe ist um 45,9 g höher als das in der Plazebo-Gruppe (Abb. 7). Der Unterschied ist erwartungsgemäß nicht signifikant (p = 0,611).

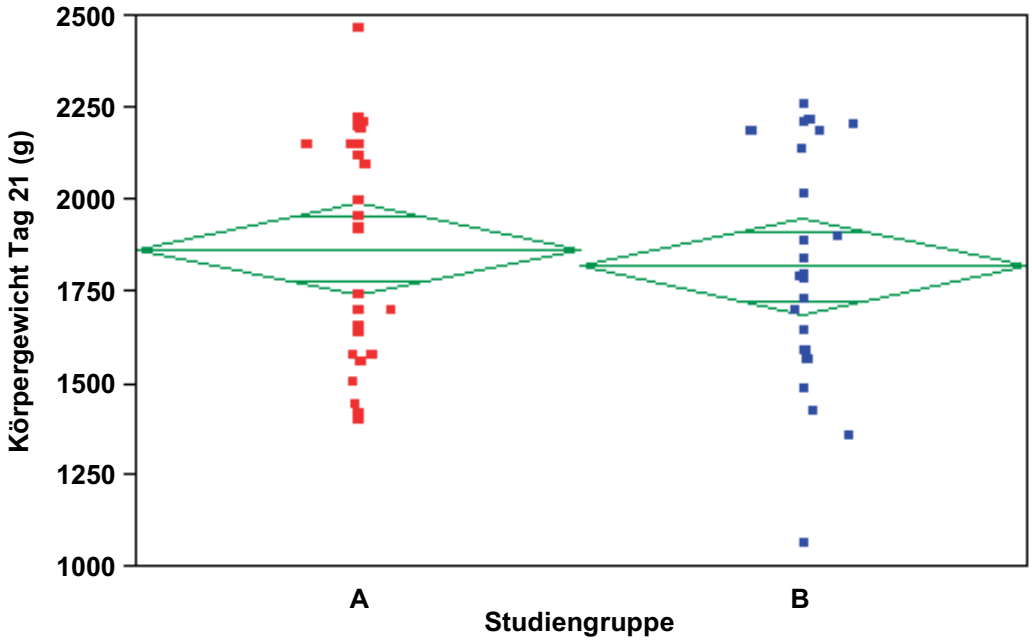

Abb. 7: Körpergewicht am 21. Lebenstag in der B. lactis- (A) und Plazebo-Gruppe (B)

Die Abhängigkeit des Körpergewichtes an Tag 21 vom Geburtsgewicht kann recht gut durch eine quadratische Regression beschrieben werden. Nach Adjustierung bezüglich des Körpergewichtes an Tag 0 liegen die beiden Kurven praktisch übereinander (Abb. 8).

Nach Adjustierung für das etwas unterschiedliche mittlere Geburtsgewicht beträgt der Unterschied im Körpergewicht an Tag 21 zwischen beiden Gruppen 6,23 g. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p = 0,72).

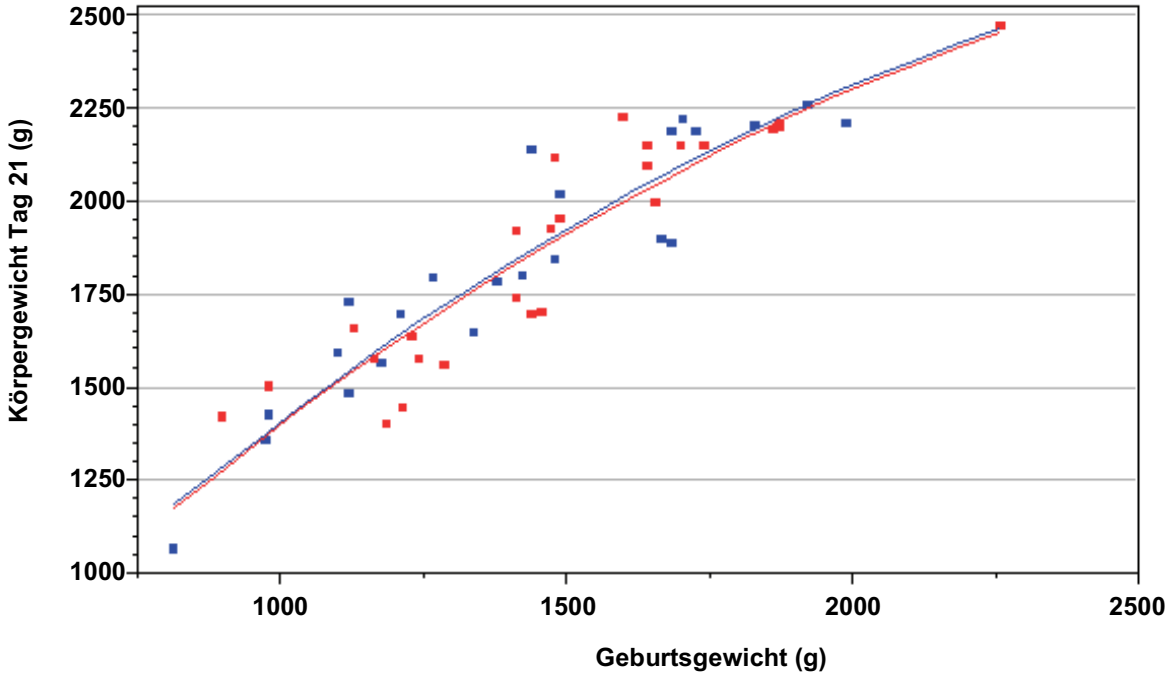

Abb. 8: Körpergewicht am 21. Lebenstag in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht und von B. lactis oder Plazebo-Gabe (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

Insgesamt erhielten 46 der 69 (66,7 %) Frühgeborenen in unserer Studie im Verlauf der Studienperiode für zwei Tage oder länger Antibiotika, in der B. lactis-Gruppe 25 von 37 (67,6) %), in der Plazebo-Gruppe 21 von 32 (65,6 %). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht statistisch signifikant (p = 0,86). In beiden Gruppen mit vollständigen Verläufen bis zum 21. Lebenstag haben knapp 40 % der Kinder Antibiotika innerhalb der ersten 24 Lebensstunden erhalten (Tab. 5). Von den 49 Kindern mit vollständigen Verläufen erhielten insgesamt 34 (69,4 %) zwei oder mehr Tage während der Interventionsperiode Antibiotika, in der B-lactis-Gruppe 19 von 26 (73,1 %) und in der Plazebo-Gruppe 15 von 23 (65,2 %). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch nicht signifikant (p = 0,55).

Tab. 5: Applikation von Antibiotika in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) innerhalb der ersten 24 Lebensstunden

Gruppe	ohne Antibiotika Anzahl Kinder (%)	mit Antibiotika Anzahl Kinder (%)	n
B. lactis (A)	16 (61,54)	10 (38,46)	26
Plazebo (B)	14 (60,87)	9 (39,13)	23
Alle Kinder	30	19	49

Die Kinder der B. lactis-Gruppe haben während der ersten 3 Lebenswochen im Mittel an insgesamt 5,5 Tagen Antibiotika bekommen, die Kinder der Plazebo-Gruppe an 5,3 Tagen (Abb. 9). In beiden Gruppen ist die Häufigkeit der Antibiotikagabe sowohl innerhalb der ersten 24 Stunden wie auch im Verlauf gut vergleichbar.

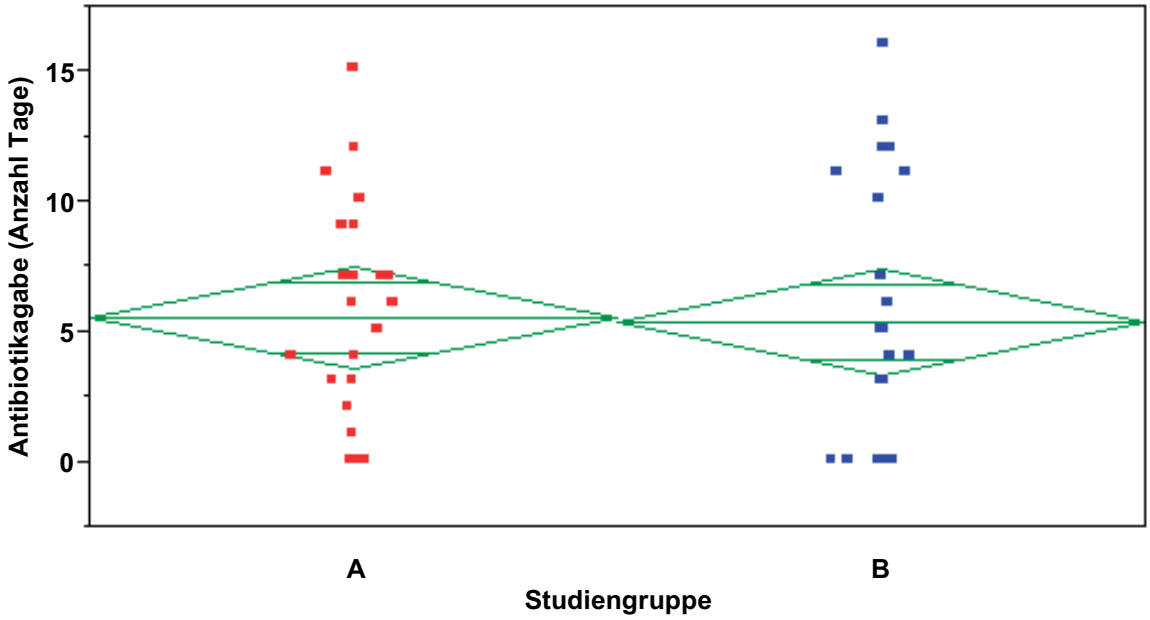

Abb. 9: Anzahl der Tage mit Antibiotikagabe, B. lactis- (A), Plazebo-Gruppe (B)

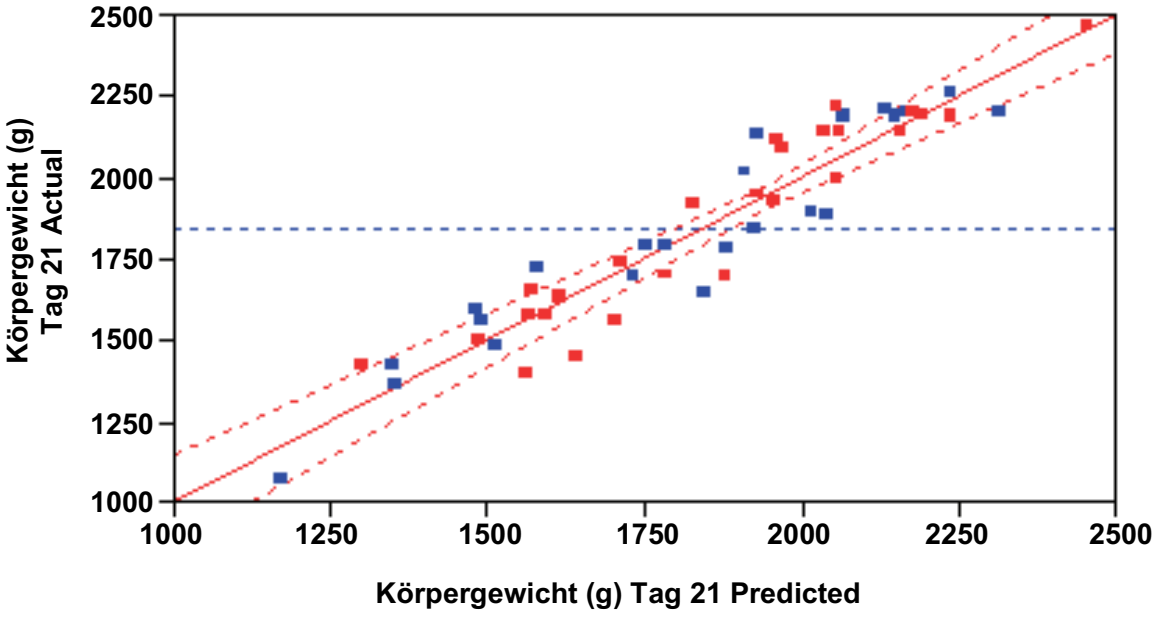

Abb. 10: Prognostiziertes und aktuelles Körpergewicht (g) am 21. Lebenstag bei Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten (rot = B. lactis- n = 25, blau = Plazebo-Gruppe n = 21) $p < 0{,}001$, RSquare = 0,89, Root Mean Square Error = 105,86

Das Körpergewicht an Tag 21 kann aus dem Geburtsgewicht und der Zahl der Tage mit antibiotischer Therapie mit einer Standardabweichung von 106 g recht gut prognostiziert werden. Die antibiotische Therapie hat einen statistisch gesicherten Einfluss (p = 0,001); pro Tag unter antibiotischer Therapie wird ein negativer Einfluss von 12,9 g auf das Körpergewicht geschätzt (s. Abb. 10).

4.4.2 Verlauf des enteralen Nahrungsvolumens und Art der Milchnahrung in den ersten 3 Lebenswochen

Die Abb. 11 zeigt die Einzelverläufe des enteralen Nahrungsvolumens. Es fällt auf, dass bei einzelnen Kindern das enterale Nahrungsvolumen einige Tage lang nicht ansteigt.

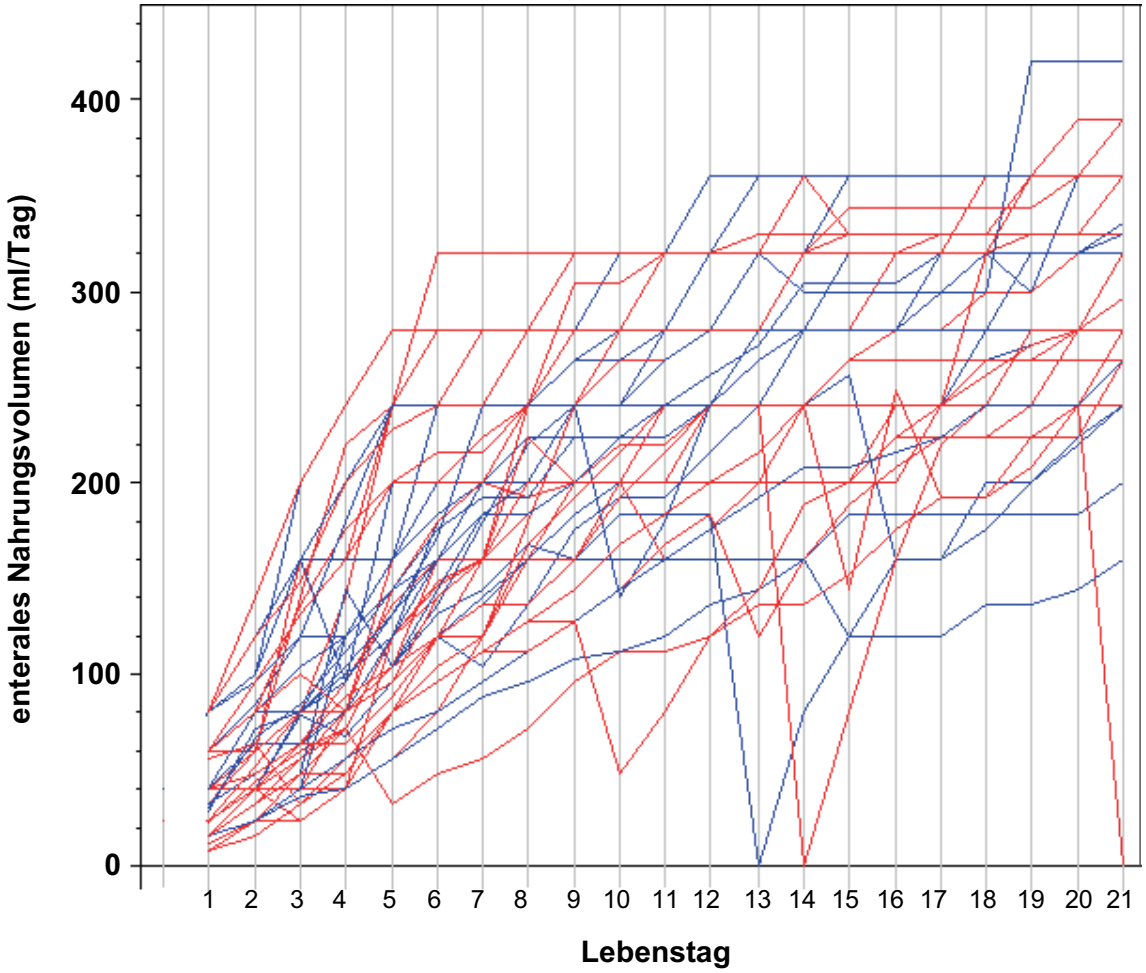

Abb. 11: Einzelverläufe des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag) von Geburt bis zum 21. Lebenstag (rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe)

Das enterale Nahrungsvolumen steigt bis etwa zum 9. Lebenstag im Mittel steil an. Ab dem 10. Lebenstag ist der weitere Anstieg im Mittel annähernd linear, aber deutlich flacher.

Im mittleren Verlauf ist das enterale Nahrungsvolumen in der B. lactis-Gruppe tendenziell geringer als in der Plazebo-Gruppe (Abb. 12). Dies wird bei der medianen Verlaufsdarstellung noch deutlicher (Abb. 13).

Das enterale Nahrungsvolumen ist in der B. lactis-Gruppe am ersten Lebenstag um 4,9 ml im Durchschnitt geringer als in der Plazebo-Gruppe. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p = 0,45). Das enterale Nahrungsvolumen am 21. Lebenstag ist in der B. lactis-Gruppe um 4,5 ml geringer im Vergleich zur Plazebo-Gruppe. Erwartungsgemäß ist dieser Unterschied ebenfalls statistisch nicht signifikant (p = 0,82). Auch im anschließenden Wilcoxon Rangsummentest ist kein Hinweis auf einen Unterschied erkennbar (p = 0,97).

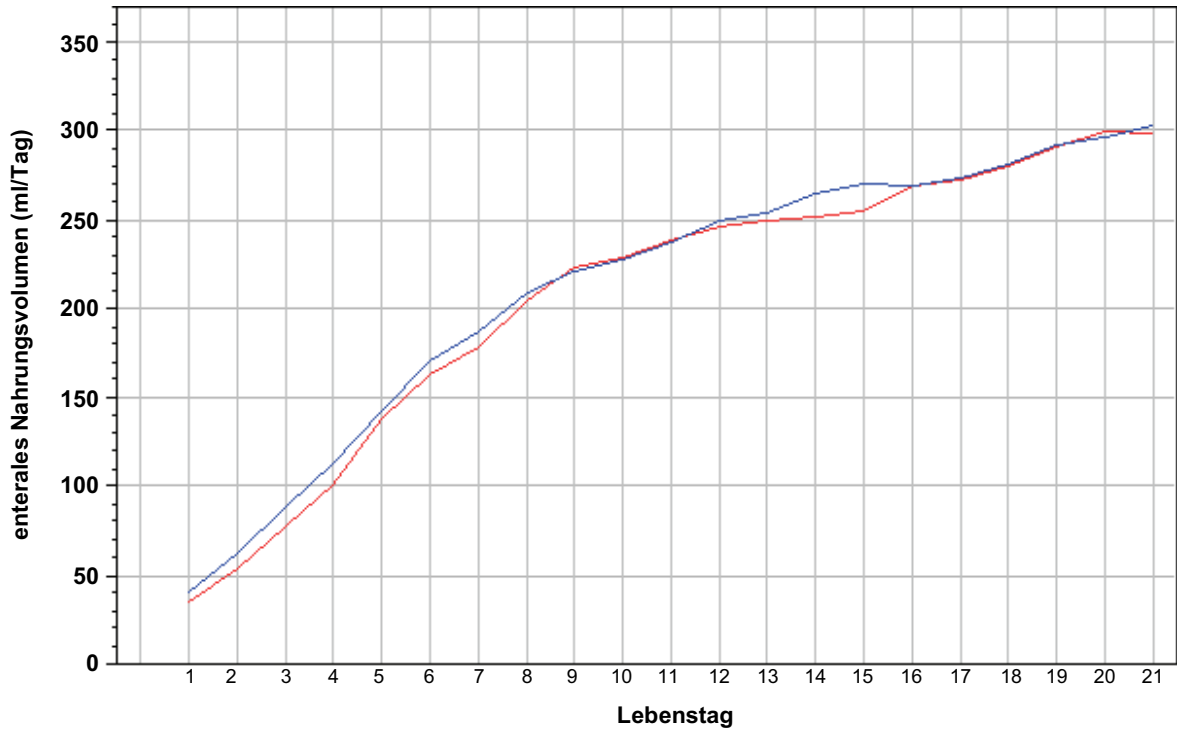

Abb. 12: Mittelwertverlauf des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag) rot = B. lactis-, blau = Plazebo-Gruppe

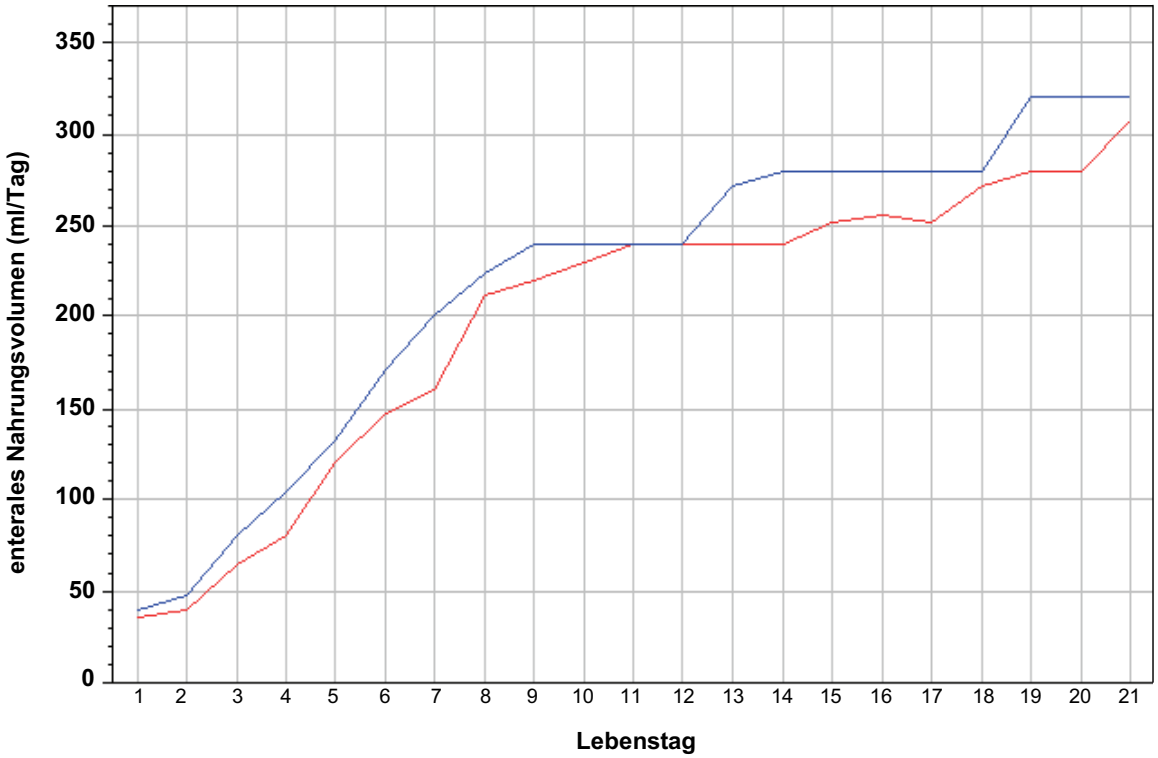

Abb. 13: Medianer Verlauf des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag) rot = B.lactis-, blau = Plazebo-Gruppe

Im gesamten Zeitraum ist das enterale Nahrungsvolumen in der B. lactis-Gruppe im Durchschnitt um 98,75 ml geringer als in der Plazebo-Gruppe (Abb. 14). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p = 0,74).

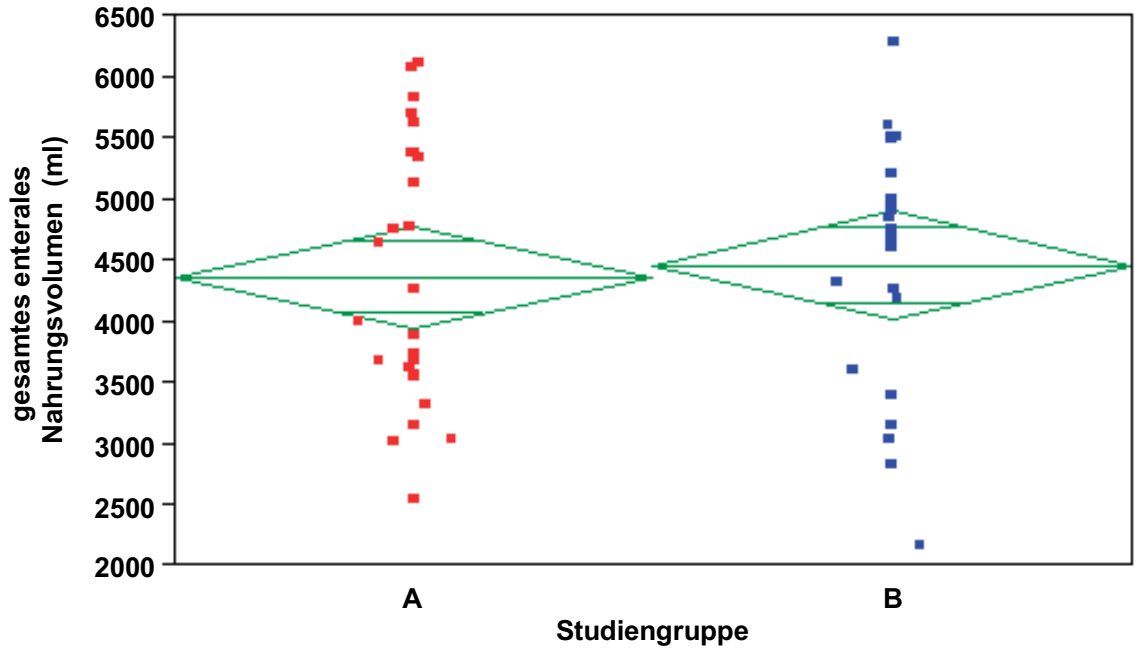

Abb. 14: Vergleich des gesamten enteralen Nahrungsvolumens (ml) bis Tag 21, B. lactis- (A), Plazebo-Gruppe (B)

Vergleicht man die Anzahl der Tage, an denen die Kinder der beiden Gruppen als enterale Nahrung nur Muttermilch bekommen haben, ergibt sich, dass Kinder der Plazebo-Gruppe im Durchschnitt 1,47 Tage länger nur Muttermilch bekommen haben als Kinder der B. lactis-Gruppe. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,51$).

In der B. lactis-Gruppe haben 3 Kinder über eine bestimmte Anzahl von Tagen nur Frühgeborenennahrung erhalten, in der Plazebo-Gruppe 2 Kinder. In jeder Gruppe hat je ein Kind über die gesamten 21 Tage nur Formula (anfangs Alfaré, dann Frühgeborenennahrung) bekommen. Insgesamt ist der Unterschied in der Art der Nahrung statistisch nicht signifikant ($p = 0,76$, Wilcoxon Rangsummentest).

Die Art der Milchnahrung hat keinen Einfluss auf die aufgenommene Menge. Allerdings ist die Anzahl der Kinder, die keine Muttermilch bekamen, sehr gering. Es besteht jedoch neben dem Einfluss des Geburtsgewichts auch ein statistisch signifikanter Einfluss der Antibiotikagabe auf das Gesamtvolumen der enteralen Nahrungsaufnahme während der ersten drei Lebenswochen.

4.4.3 Zusammenfassung

Die Kinder der B. lactis-Gruppe sind bei Geburt im Mittel ca. 60 g schwerer als die Kinder der Plazebo-Gruppe ($p = 0,51$; ns).

Bis zum 3. (B. lactis-Gruppe) bzw. 4. Lebenstag (Plazebo-Gruppe) fällt das Körpergewicht im Vergleich zum Geburtsgewicht um knapp 50 g ab. Danach steigt es im Mittel stetig an, wobei ab dem 5. – 6. Lebenstag der Anstieg mit durchschnittlich 27 g pro Tag annähernd linear ist. Kinder mit einem geringeren Geburtsgewicht, die in der Studie verblieben sind, nehmen relativ und tendenziell auch absolut stärker zu als Kinder mit etwas höherem Geburtsgewicht.

Die Kinder der Plazebo-Gruppe nehmen im Mittel pro Zeiteinheit etwas mehr zu als die Kinder der B. lactis-Gruppe. Am 21. Lebenstag sind die Kinder der B. lactis-Gruppe im Mittel um 45,9 g schwerer als die Kinder der Plazebo-Gruppe.

Nach Adjustierung für das etwas unterschiedliche mittlere Geburtsgewicht beträgt der Unterschied im Körpergewicht am 21. Lebenstag zwischen beiden Gruppen nur noch 6,23 g ($p = 0,72$), weit von jeglicher statistischer Signifikanzschranke.

Die Verläufe von Gewicht und enteraler Nahrungsaufnahme sind insgesamt in beiden Gruppen jeweils weitgehend parallel. Das enterale Nahrungsvolumen steigt bis etwa zum 9. Lebenstag im Mittel steil an. Ab dem 10. Lebenstag ist der weitere Anstieg im Mittel annähernd linear, aber deutlich flacher.

Die Art der Milchnahrung hat keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf. Alle Kinder wurden jedoch vorwiegend mit angereicherter Muttermilch bzw. Spenderinnenmilch mit in etwa identischen Zusammensetzungen bzw. Qualitäten (Energie-, Protein-, Kohlenhydratgehalt etc.) ernährt.

Häufigkeit und Dauer der Applikation von Antibiotika in beiden Gruppen sind gut vergleichbar und nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Unabhängig von der Studiengruppe ist aber die Gabe von Antibiotika negativ korreliert mit der Körpergewichtsentwicklung; pro Tag unter Applikation von Antibiotika wird ein negativer Einfluss von 12,9 g auf das Körpergewicht geschätzt.

4.5 pH-Wert und kurzkettige Fettsäuren im Stuhl

Die Probandenzahlen variieren bei den verschiedenen Untersuchungen, da zu den festgesetzten Untersuchungszeitpunkten nicht von allen Frühgeborenen Stuhlproben oder ausreichende Mengen an Stuhl für die jeweilige Untersuchung zur Verfügung standen.

4.5.1 Stuhl pH-Wert

Der durchschnittliche fäkale pH-Wert während der gesamten 3-wöchigen Interventionsperiode ist bei den Frühgeborenen der B. lactis-Gruppe signifikant niedriger als bei den Frühgeborenen der Plazebo-Gruppe (5,68 ± 0,09 vs. 6,38 ± 0,10, $p < 0,001$) (Abb. 15).

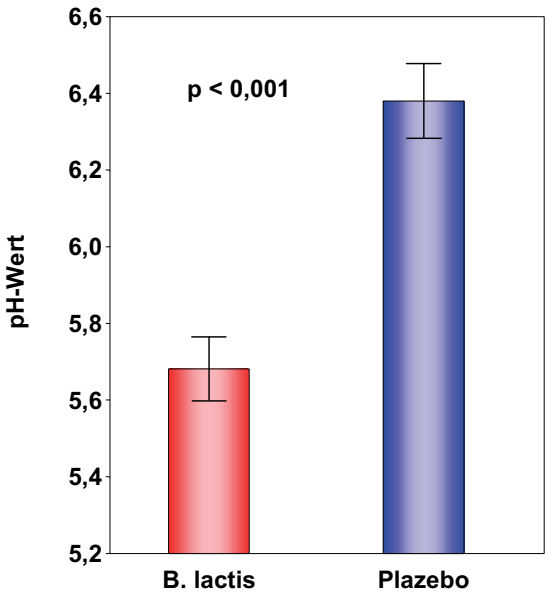

Abb. 15 Durchschnittlicher pH-Wert der Stühle der Frühgeborenen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe: während der gesamten 3-wöchigen Interventionsperiode. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar.

4.5.2 Kurzkettige Fettsäuren im Stuhl

In der ersten Woche der Intervention ist der Unterschied der fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentration zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe noch nicht statistisch signifikant (Tab. 6). In der 2. Woche ist der Mittelwert der Gesamt-SCFA-Konzentrationen in der B. lactis-Gruppe mit 32,51 ± 1,78 vs. 24,54 ± 2,17 µmol/g Stuhl im Vergleich zur Plazebo-Gruppe signifikant (p = 0,013) höher. In der 3. Interventionswoche ist der Unterschied zwischen den Gruppen mit 47,60 ± 3,30 vs. 27,15 ± 2,34 µmol/g Stuhl (p = 0,001) noch ausgeprägter (Abb. 16). Auch die Konzentration von Acetat im Stuhl (Tab. 7), welche in beiden Gruppen etwa 90 % der SCFA ausmacht, ist in der 2. (29,53 ± 1,49 vs. 21,55 ±1,92 µmol/g Stuhl) und 3. Studienwoche (43,35 ± 2,78 vs. 24,18 ± 1,65 µmol/g Stuhl, p = 0,001) in der B. lactis-Gruppe signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe (Abb.17 A).

Das geometrische Mittel der molaren Anteile des SCFA-Profils über die Gesamtzeit ist in beiden Gruppen ähnlich (C2:C3:C4:C5; B. lactis-Gruppe: 90:4:3,2:2; Plazebo-Gruppe: 89,3:5:3:2).

Tab. 6: Mittelwerte der fäkalen Gesamt-SCFA- Konzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe in der 1., 2. und 3. Woche

Woche	Gesamt-SCFA (µmol/g Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe n = 34	 Plazebo-Gruppe n = 31	p-Wert Vergleich
1	20,75 ± 2,11	18,64 ± 2,57	ns
2	32,51 ± 1,78	24,51 ± 2,17	0,013
3	47,60 ± 3,30	27,15 ± 2,34	< 0,001

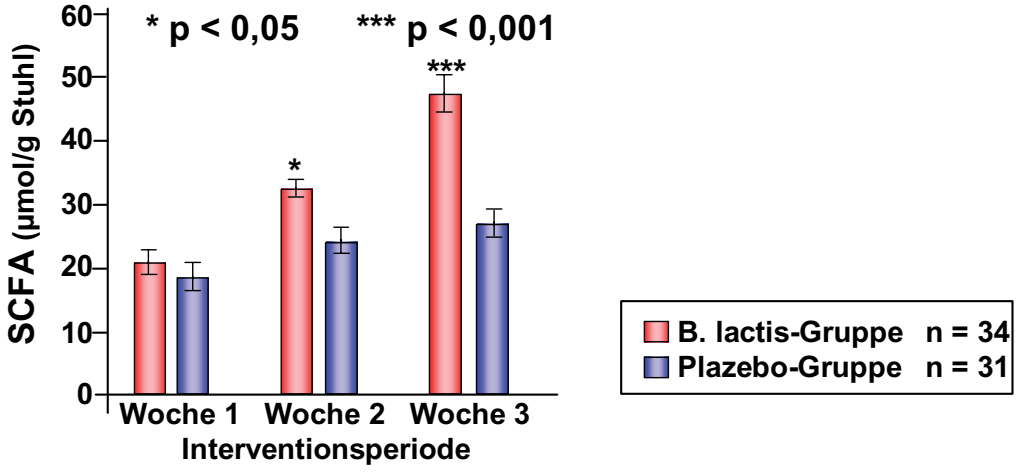

Abb. 16: Mittelwert der fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar.

Tab. 7: Mittelwerte der fäkalen Acetat-Konzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe in der 1., 2. und 3. Woche

Woche	Acetat (µmol/g Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe	Plazebo-Gruppe	p-Wert Vergleich
1	18,13 ± 1,60	15,61 ± 1,96	ns
2	29,53 ± 1,49	21,55 ± 1,92	< 0,001
3	43,35 ± 2,78	24,18 ± 1,65	< 0,001

Die durchschnittlichen Acetat-Konzentrationen im Stuhl von allen 3 Untersuchungszeitpunkten zusammen (Tab. 8) sind sowohl bei Betrachtung der Gesamtgruppen (33,50 ± 2,07 vs. 19,32 ± 1,52 µmol/g Stuhl) als auch bei Betrachtung der Subgruppen, die entweder Antibiotika (33,88 ± 3,96 vs. 17,82 ± 2,5) oder keine Antibiotika bekommen haben (3319 ± 2,79 µmol/g Stuhl vs. 20,94 ± 1,81 µmol/g Stuhl), in der B. lactis-Gruppe signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe (jeweils $p < 0,001$) (Abb. 17 B).

Tab. 8: Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Acetat-Konzentrationen insgesamt bei allen Kindern der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) und bei Kindern mit und ohne Applikation von Antibiotika

	Acetat im Gesamtzeitraum (µmol/g Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe (A)	Plazebo-Gruppe (B)	p-Wert Vergleich
alle Frühgeborenen A: n = 34; B: n = 31	33,50 ± 2,07	19,32 ± 1,52	< 0,001
Kinder mit Antibiotika A: n = 23; B: n = 19	33,88 ± 3,70	17,82 ± 2,50	< 0,001
Kinder ohne Antibiotika A: n = 11; B: n = 12	33,19 ± 2,79	20,94 ± 1,81	< 0,001

Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl, die in der Publikation von Mohan et al. [61] zu finden ist, korreliert signifikant mit den fäkalen Acetat-Konzentrationen ($r = 0,243$, $p = 0,05$).

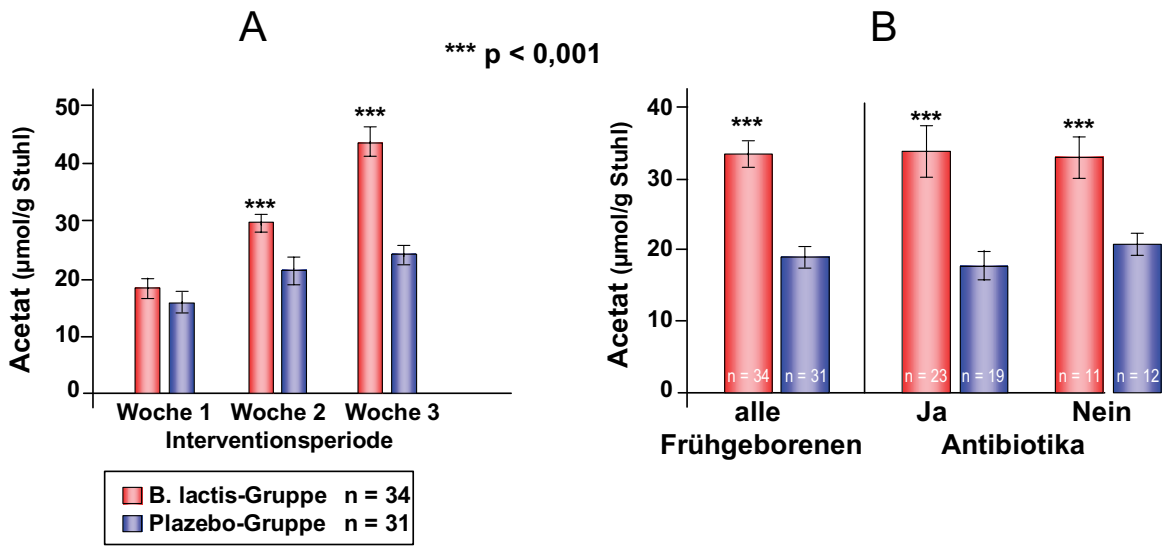

Abb. 17: Mittelwert der fäkalen Acetat-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar. A) in jeder der 3 Interventionswochen B) in der Interventionsperiode insgesamt bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen mit und ohne Antibiotika

4.5.3 Laktat im Stuhl

Die fäkale Laktatkonzentration steigt in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter an (Abb. 18A). In allen 3 Interventionswochen ist jedoch der Unterschied der Mittelwerte der fäkalen Laktatkonzentrationen zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe signifikant (p = 0,001; 0,007 und 0,048) (s. Tab. 9 u. Abb. 18 A). Die durchschnittliche fäkale Laktatkonzentration über die gesamte Interventionsperiode ist in der B. lactis-Gruppe (n = 35) signifikant höher (p = 0,011) als in der Plazebo-Gruppe (n = 31) (Abb. 18 B). Der Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe ist bei den Frühgeborenen, die keine Antibiotika erhielten (B. lactis-Gruppe n = 11, Plazebo-Gruppe n = 11) stärker ausgeprägt (p = 0,009). Bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten (B. lactis-Gruppe n = 24; Plazebo-Gruppe n = 20) ist der Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe dagegen nicht signifikant (s. Tab. 10 u. Abb. 18 B).

Tab. 9: Mittelwerte der fäkalen Laktatkonzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) in der 1., 2. und 3. Woche

Woche	Laktat (mmol/g Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe (A)	Plazebo-Gruppe (B)	p-Wert Vergleich
1	6,75 ± 0,99	3,92 ± 0,86	0,001
2	11,31 ± 1,26	7,02 ± 0,85	0,007
3	16,66 ± 1,33	11,26 ± 1,33	0,048

Tab. 10: Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Laktatkonzentrationen insgesamt bei allen Kindern der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) und bei Kindern mit und ohne Applikation von Antibiotika

	Laktat im Gesamtzeitraum (mmol /g Stuhl) ± Standardfehler		p-Wert Vergleich
	B. lactis-Gruppe (A)	Plazebo-Gruppe (B)	
alle Frühgeborenen A: n = 35, B:n = 31	11,43 ± 1,37	7,06 ± 1,14	0,011
Kinder mit Antibiotika A: n = 24, B: n = 20	10,81 ± 2,43	6,98 ± 2,29	ns
Kinder ohne Antibiotika A: n = 11, B: n = 11	12,05 ± 1,75	7,15 ± 1,08	0,009

Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl (publiziert von [61]), korreliert signifikant mit den Laktatkonzentrationen im Stuhl (r = 0,336, p = 0,010). Auch zwischen der Acetat- und der Laktatkonzentration im Stuhl besteht eine signifikante Korrelation (r = 0,490, p < 0,001).

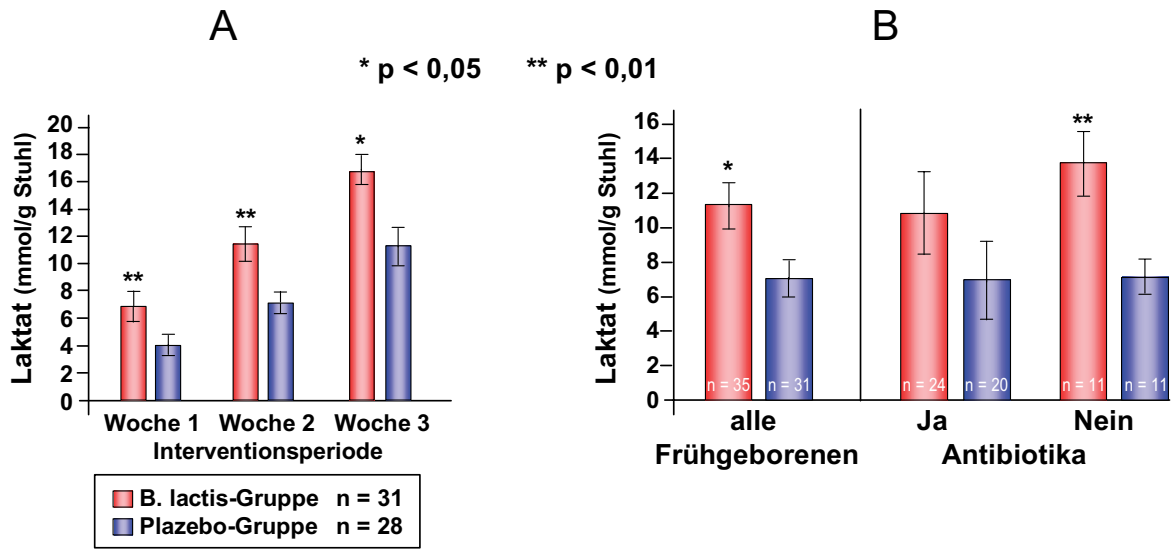

Abb. 18: Mittlere fäkale Laktatkonzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar. A) in jeder der 3 Interventionswochen; B) über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten

4.6 Sekretorisches Immunglobulin A (sIgA) im Stuhl

Die mittlere Konzentration des Gesamt-sIgA im Stuhl steigt in der B. lactis-Gruppe (n = 19) von der ersten zur zweiten Woche der Intervention von 3,67 ± 0,731 auf 5,94 ± 0,67 mg/kg Stuhl an, während in der Plazebo-Gruppe (n = 16) kein Anstieg der Gesamt-sIgA-Spiegel (3,24 ± 0,59 bzw. 3,24 ± 0,54 mg/kg Stuhl) im Stuhl während der 3-wöchigen Interventionsperiode zu beobachten ist (Tab. 11). Das führt dazu, dass die mittleren Gesamt-IgA-Konzentrationen in der 2. (5,94 ± 0,67 vs. 3,24 ± 0,54 mg/kg Stuhl) und 3. Woche (5,73 ± 0,46 vs. 3,54 ± 0,43 mg/kg Stuhl) in der B. lactis-Gruppe signifikant höher (0,001 bzw. 0,032) sind als in der Plazebo-Gruppe (Abb. 19 A).

Tab. 11: Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Gesamt-IgA-Konzentrationen der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) in Woche 1, 2 und 3

Woche	IgA (mg/kg Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe (A) n = 19	Plazebo-Gruppe (B) n = 16	p-Wert Vergleich
1	3,67 ± 0,71	3,24 ± 0,59	ns
2	5,94 ± 0,67	3,24 ± 0,54	0,001
3	5,73 ± 0,46	3,54 ± 0,43	0,032

Tab. 12: Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen sIgA-Konzentrationen im Gesamtzeitraum bei Kindern der B. lactis- (A) und Plazebo-Gruppe (B) insgesamt und mit und ohne Applikation von Antibiotika

	IgA (mg/kg Stuhl) ± Standardfehler B. lactis-Gruppe (A)	Plazebo-Gruppe (B)	p-Wert Vergleich
alle Frühgeborenen A: n = 19; B: n = 16	4,40 ± 0,49	2,47 ± 0,59	< 0,05
Kinder mit Antibiotika A: n = 13; B: n = 13	3,27 ± 0,85	2,56 ± 0,90	ns
Kinder ohne Antibiotika A: n = 6; B: n = 3	5,92 ± 1,46	2,38 ± 0,82	< 0,05

Die durchschnittliche fäkale Konzentration des Gesamt-sIgA über die gesamte Studienperiode (Tab. 12) ist in der B. lactis-Gruppe (n = 19) fast doppelt so hoch wie in der Plazebo-Gruppe (n = 16): 4,40 ± 0,49 vs. 2,47 ± 0,59 mg/kg Stuhl; p < 0,05

(Abb. 19 B). Bei separater Betrachtung der Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten (B. lactis-Gruppe n = 13, Plazebo-Gruppe n = 13) und derjenigen, die keine Antibiotika erhielten (B. lactis-Gruppe n = 6; Plazebo-Gruppe n = 3), zeigt sich, dass der Unterschied in der Konzentration des Gesamt-sIgA im Stuhl zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe nur in der Subgruppe ohne Antibiotikagabe signifikant ist (5,92 ± 1,46 vs. 2,38 ± 0,82 mg/kg Stuhl; p = 0,018). In der Subgruppe, die Antibiotika bekommen hatte, ist der Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe dagegen nicht signifikant (3,27 ± 0,85 vs. 2,56 ± 0,90 mg/kg Stuhl) (Abb. 19 B).

Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl korreliert nicht signifikant mit dem Gesamt-sIgA im Stuhl [61]. Es ist jedoch ein Trend zu einer positiven Korrelation erkennbar (r = 0,344, p = 0,08).

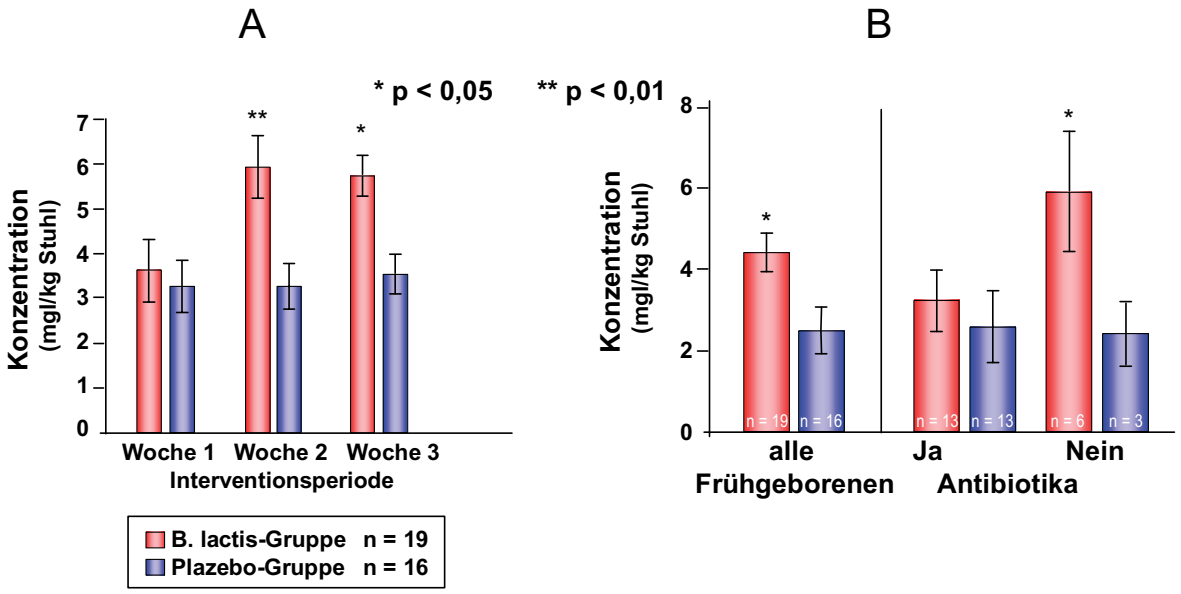

Abb. 19: Mittlere fäkale Gesamt-sIgA-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar. A) in jeder der 3 Interventionswochen; B) über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten

4.7 Calprotectin im Stuhl

Die durchschnittliche Konzentration des non-invasiven Entzündungsparameters Calprotectin im Stuhl über die gesamte Interventionsperiode (Tab. 13) ist in der B. lactis-Gruppe (n = 34) signifikant niedriger als in der Plazebo-Gruppe (n = 29): 269,77 ± 26,71 vs. 350,00 ± 31,19 mg/kg Stuhl; p = 0,041 (Abb. 20). Bei separater Betrachtung der Subgruppen mit und ohne Antibiotikagabe zeigt sich, dass der

Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe nur bei Frühgeborenen, die keine Antibiotika bekamen, statistisch signifikant ist (250,61 ± 29,93 vs. 378,44 ± 38,43 mg/kg Stuhl; p = 0,007), während der Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe bei Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten, statistisch nicht signifikant ist (289,73 ± 46,78 vs. 325,84 ± 56,99 mg/kg Stuhl; p > 0,05) (Tab. 13 und Abb. 20).

Tab. 13: Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Calprotectin-Konzentrationen im Gesamtzeitraum bei Kindern der B. lactis- (A) und Plazebo-Gruppe (B) insgesamt und mit und ohne Applikation von Antibiotika

	Calprotectin (mg/kg Stuhl) ± Standardfehler		**p-Wert Vergleich**
	B. lactis-Gruppe (A)	**Plazebo-Gruppe (B)**	
alle Frühgeborenen A: n = 34; B: n = 29	269,77 ± 26,71	350,75 ± 31,19	0,041
Kinder mit Antibiotika A: n = 24; B: n = 18	289,73 ± 46,78	325,84 ± 56,99	ns
Kinder ohne Antibiotika A: n = 10; B: n = 11	250,61 ± 29,93	378,44 ± 38,43	0,007

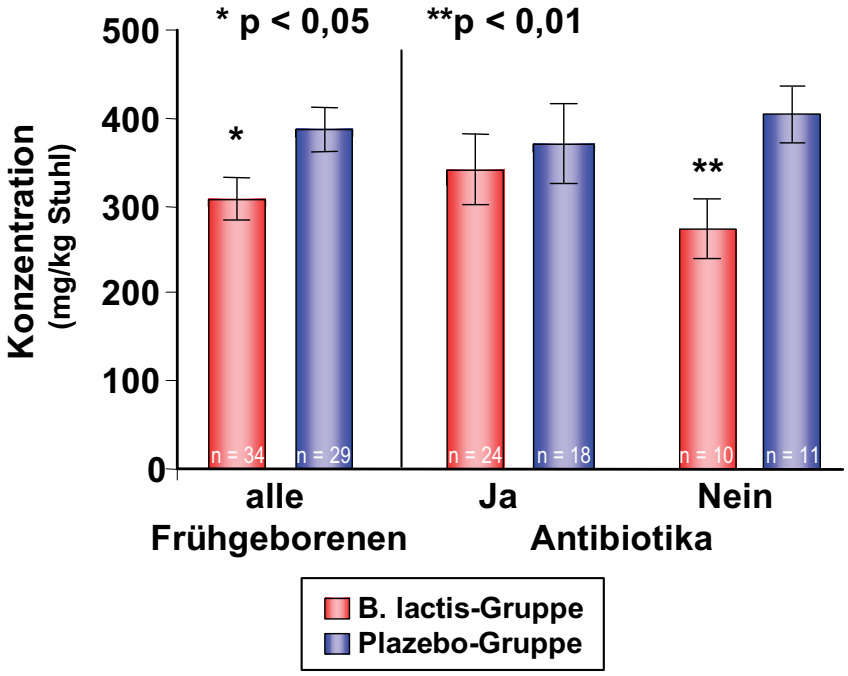

Abb. 20: Mittlere fäkale Calpropectinkonzentrationen über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten. Die Fehlerleiste stellt den Standardfehler dar.

5 Diskussion

5.1 Verträglichkeit und Sicherheit von Bifidobacterium lactis Bb12 und Einfluss dieses Stammes auf Gewicht, Antibiotikagabe und klinischen Gesamtzustand der Frühgeborenen

Das Ernährungskomitee der European Society for Pediatric Gastroenterlogy, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) fordert aus Sicherheitsgründen bei Säuglingen nur solche Bakterien als Probiotika einzusetzen, deren Identität und genetische Stabilität durch Kultur- und molekulare Methoden nachgewiesen ist und die für die vorgesehene Verwendung als allgemein sicher angesehen werden können (engl. Generally Recognized as Safe, Abk. GRAS) [22]. Das gilt insbesondere für Frühgeborene, die wegen der Unreife ihres Abwehrsystems ein besonders hohes Risiko für mögliche Nebenwirkungen probiotischer Bakterien wie z.B. Infektionen haben. Der probiotische Stamm Bifidobacterium lactis Bb12 (B. lactis Bb12) gehört zu den wenigen probiotischen Stämmen mit vollständig entschlüsselter DNS-Sequenz seines Genoms. Ein von einem internationalen Expertenteam erarbeitetes Exposé, welches anhand von Daten darlegt, dass Bakterien des Stammes B. lactis Bb12 als Zusatz zu Säuglingsanfangsnahrungen „GRAS“ sind, wurde von Nestlé der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Stellungnahme vorgelegt. Nach eingehender Prüfung der vorgelegten und anderer verfügbarer Daten hatte diese keine weiteren Fragen bzgl. der Einschätzung von B. lactis Bb12 als GRAS für junge Säuglinge (GRAS Notice No. GRN 000049). Die gut dokumentierte Sicherheit des Zusatzes von B. lactis Bb12 zu Säuglingsmilch und die in randomisierten, kontrollierten klinischen Studien mit älteren Säuglingen und Kleinkindern gezeigten Wirkungen dieses Stammes wie z.B. Stimulation der intestinalen Schleimhautimmunität [28] und Prävention akuter Durchfallerkrankungen [74] lassen ihn als geeigneten Kandidaten für den Einsatz als Probiotikum bei Frühgeborenen erscheinen. Die in der vorliegenden Arbeit ausgewertete Studie ist, soweit bekannt, die erste abgeschlossene klinische Studie, in der B. lactis Bb12 bei Frühgeborenen eingesetzt wurde.

Die Strukturgleichheit der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe bezüglich aller nicht kontrollierbaren Faktoren ist durch die geschichtete Randomisierung und den statistischen Vergleich der Randomisierungsparameter sowie der klinischen Scorewerte der beiden Gruppen zu Studienbeginn gewährleistet.

Die Studie war nicht darauf ausgerichtet, explizit die Sicherheit von B. lactis Bb12 zu prüfen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass alle Frühgeborenen die Verabreichung von B. lactis Bb12 in der verwendeten Dosis (Tag 1 bis 3: $1{,}6 \times 10^9$, $2{,}4 \times 10^9$, $3{,}2 \times 10^9$, und ab Tag 4: $4{,}8 \times 10^9$ Bakterien pro Tag) ohne Probleme tolerierten. Das war

auch bei frühem Beginn der Verabreichung von B. lactis Bb12 innerhalb der ersten 24 Lebensstunden der Fall. Die Gabe von B. lactis Bb12 als Nahrungsergänzung hatte keinen negativen Einfluss auf den enteralen Nahrungsaufbau. Es ist jedoch wie in den Studien von Reuman et al. [71] und Millar et al. [60] auch kein positiver Effekt der Probiotika-Supplementierung auf den enteralen Nahrungsaufbau nachweisbar. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der von Deshpande et al. [20] durchgeführten Analyse der gepoolten Daten von 3 doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Einzelstudien [7; 47; 57] mit insgesamt 316 Frühgeborenen. Die Ergebnisse dieser Meta-Analyse zeigten, dass die Zeitspanne von Geburt bis zum Erreichen der vollständigen enteralen Ernährung bei der Probiotika-Gruppe signifikant kürzer ist (gewichtete mittlere Differenz –2,74 Tage, 95 %CI –4,98 bis –0,51) als bei der Kontrollgruppe. Gründe dafür, warum in der hier ausgewerteten Studie kein positiver Einfluss der enteralen Verabreichung von Probiotika auf den enteralen Nahrungsaufbau nachweisbar ist, könnten die geringe Probandenzahl und ein höheres mittleres Geburtsgewicht bei Studienbeginn im Vergleich zu dem der Frühgeborenen, die in die Meta-Analyse einbezogen wurden, sein. Auch der gute klinische Gesamtzustand der meisten Frühgeborenen und die Ernährung nahezu aller Frühgeborenen mit Muttermilch (oder Spenderinnenmilch in Kombination mit Muttermilch), die selbst von sehr unreifen Frühgeborenen in der Regel schon frühzeitig gut toleriert wird und einen frühen zügigen enteralen Nahrungsaufbau erlaubt, könnten dazu beigetragen haben, dass in dieser Studie im Gegensatz zu der Meta-Analyse von Deshpande et al. [20] kein signifikanter Unterschied im enteralen Nahrungsaufbau zwischen der Probiotika- und der Plazebo-Gruppe nachweisbar ist.

Wie erwartet, verursachte die Verabreichung von B. lactis Bb12 bei den Frühgeborenen keinen einzigen Fall einer Infektion. Es wurden auch keine anderen unerwünschten Nebenwirkungen der Applikation von B. lactis Bb12 beobachtet. Der fehlende Unterschied in der Drop-out-Rate zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe (27,02 % vs.18,75 %; p = 0,88) kann ebenfalls als Zeichen für die gute Verträglichkeit der Supplementation von B. lactis Bb12 gewertet werden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass in dieser Studie nur wenige der Frühgeborenen schwer krank waren und nur 14,5 % (10/69) aller Frühgeborenen ein extrem niedriges Geburtsgewicht < 1000 g hatten, in der B. lactis-Gruppe 13,5 % (5/37) und in der Plazebo-Gruppe 15,6 % (5/32). Zudem wurden, wie bereits erwähnt, nahezu alle Frühgeborenen mit Muttermilch ernährt, die zahlreiche anti-mikrobielle, anti-entzündliche und immunmodulierende Faktoren enthält, die für Frühgeborene wegen der Unreife ihres Immunsystems besonders wertvoll sind.

Die Mittelwertsverläufe des Körpergewichts der beiden Studiengruppen während der ersten 3 Lebenswochen sind weitgehend parallel. Nach Adjustierung bezüglich des Geburtsgewichts sind die Kinder der B. lactis Gruppe am 21. Lebenstag im Durchschnitt 6,23 g leichter als die Kinder der Plazebo-Gruppe, bei weitem kein statistisch

signifikanter Unterschied (p = 0,72). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen der Studien von Reuman et al. [71] und Millar et al. [60], die ebenfalls keinen positiven Einfluss der enteralen Gabe von Probiotika (in diesem Fall Lactobacillus GG) auf den Gewichtsverlauf Frühgeborener zeigen. Im Gegensatz dazu beobachteten Kitajima et al. [47] in ihrer Studie bei VLBW-Frühgeborenen, die Bifidobacterium breve (0,5 x 10^9 cfu B. breve YIT 4010/Tag über 4 Wochen) erhielten, eine bessere Gewichtszunahme im Vergleich zu der Plazebo-Gruppe. Der Unterschied in der wöchentlichen Gewichtszunahme zwischen der B. -breve- und der Plazebo-Gruppe war aber erst ab der 4. Lebenswoche signifikant. In den ersten 3 Lebenswochen, dem Zeitraum, den die in der vorliegenden Arbeit ausgewertete Studie erfasst hat, bestand noch kein signifikanter Unterschied in der wöchentlichen Gewichtszunahme zwischen den beiden Gruppen.

Die Studienergebnisse zeigen, dass die Antibiotikagabe einen statistisch signifikanten Einfluss (p = 0,001) auf das Körpergewicht an Tag 21 hat. Pro Tag unter Antibiotikabehandlung wird ein negativer Einfluss von 12,9 g auf das Körpergewicht geschätzt. Das steht im Einklang mit dem statistisch signifikanten negativen Einfluss der Antibiotikagabe auf das Gesamtvolumen der enteralen Nahrung während der 3-wöchigen Interventionsperiode und der Beobachtung, dass kranke Frühgeborene allgemein schlechter gedeihen als gesunde.

Insgesamt erhielten 46 der 69 (66,7 %) Frühgeborenen im Verlauf der Studienperiode für zwei Tage oder länger Antibiotika, in der B. lactis-Gruppe 25 von 37 (67,6 %), in der Plazebo-Gruppe 21 von 32 (65,6 %) (p = 0,86). In beiden Gruppen mit vollständigen Verläufen bis zum 21. Lebenstag haben knapp 40 % der Kinder Antibiotika innerhalb der ersten 24 Lebensstunden erhalten. Insgesamt erhielten von den 49 Kindern mit vollständigen Verlaufsdaten 69,4 % der Kinder einige oder mehrere Tage während der Interventionsperiode Antibiotika, in der B. lactis-Gruppe (n = 26) 73,1 %, in der Plazebo-Gruppe (n = 23) 65,2 %. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p = 0,55).

Die Kinder der B. lactis-Gruppe haben während der ersten 3 Lebenswochen im Mittel an insgesamt 5,5 Tagen Antibiotika bekommen, die Kinder der Plazebo-Gruppe an 5,3 Tagen. Die gute Vergleichbarkeit der beiden Gruppen in der Häufigkeit der Antibiotikagabe und der Anzahl der Tage, an denen Antibiotika verabreicht wurden, kann als ein Zeichen dafür angesehen werden, dass die Häufigkeit und der Schweregrad von Infektionen in beiden Studiengruppen ähnlich waren. Andere prospektive, randomisierte, kontrollierte Studien fanden ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der enteralen Verabreichung von Probiotika auf den Antibiotikabedarf [47] oder auf Infektionen [7; 18; 59; 88]. .In einer prospektiven, randomisierten Plazebo-kontrollierten Studie von Lin et al. [52] wurde allerdings bei Frühgeborenen, die Probiotika (B. infantis und L. acidophilus) bekamen, eine signifikant (p = 0,03) niedrigere Sepsisrate

im Vergleich zu der Plazebo-Gruppe beobachtet. Eine Meta-Analyse [20] der Daten von 6 doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Einzelstudien mit Frühgeborenen, zu denen auch die Studie von Lin et al. gehörte, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied des Risikos für Sepsis zwischen der Probiotika- und der Plazebo-Gruppe ($p = 0,33$).

Die mittleren klinischen Scorewerte, die innerhalb der ersten 24 Lebensstunden ermittelt wurden, sind bei den Frühgeborenen der beiden Gruppen identisch (17,69 von 21 möglichen Punkten für die B. lactis-Gruppe und 17,67 für die Plazebo-Gruppe). Der relativ hohe Scorewert am ersten Lebenstag zeigt, dass der klinische Gesamtzustand der meisten Frühgeborenen bei Studienbeginn relativ gut war. Die mittleren und medianen klinischen Scorewerte steigen in beiden Gruppen bis zur 3. Lebenswoche kontinuierlich an. Das zeigt die weitere Stabilisierung des klinischen Gesamtzustands der Frühgeborenen im Verlauf der ersten Lebenswochen. Zu keinem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen in den durchschnittlichen und medianen Scorewerten (p immer $> 0,5$, d.h. deutlich von der Signifikanzgrenze 0,05 entfernt). Daraus lässt sich schließen, dass die enterale Verabreichung von B. lactis Bb12 keinen Einfluss auf den klinischen Gesamtzustand hat.

5.2 Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die bakteriellen Fermentationsprodukte und den pH-Wert im Stuhl

Anaerobe Bakterien produzieren durch Fermentation von Kohlenhydraten und Proteinen im Kolon organische Säuren, vor allem kurzkettige Fettsäuren (SCFA) und Laktat. Mehr als 95 % der SCFA werden resorbiert und erscheinen daher nicht im Stuhl.

Die 3 Haupt-Fettsäuren sind Essig-, Propion- und Buttersäure bzw. deren Salze (Acetat, Propionat und Butyrat). Sie dienen den Epithelzellen des Dickdarms als Energiequelle, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Proliferation und Differenzierung der Kolonozyten und stimulieren die Natrium- und Wasserresorption aus dem Kolon [70; 81; 83]. Außerdem wird durch die Produktion von SCFA und Laktat der pH-Wert im Kolon reduziert, wodurch das Wachstum von potentiell pathogenen Bakterien gehemmt wird.

In den ersten Lebenstagen enthält der Dickdarm noch sehr wenige Bakterien, die aus der Nahrung stammende oder endogene Substrate abbauen. Außerdem ist in dieser Lebensperiode die Verfügbarkeit an exogenen Substraten wegen der noch geringen enteralen Nahrungszufuhr begrenzt. Daher ist keine nennenswerte SCFA- und Laktat-Produktion zu erwarten bevor sich nicht anaerobe Bakterien im Dickdarm

des Neugeborenen ansiedeln [92] und die enterale Milchzufuhr ansteigt. Bei gesunden Reifgeborenen erfolgt die bakterielle Besiedlung des Kolons nach der Geburt sehr rasch. Zuerst siedeln sich fakultativ anaerobe Bakterien an, vor allem E. coli und Streptokokken, gefolgt von anaeroben Bakterien, welche gegen Ende der ersten zwei Lebenswochen die dominanten Bakterien im Kolon sind [83]. Man nimmt an, dass die fakultativ aeroben Bakterien durch Verbrauch von Sauerstoff das relativ hohe Oxidations-Reduktions-Potential im Kolon Neugeborener (zwischen 0 und +200 mV im Vergleich zu ca. –300 mV bei Erwachsenen) reduzieren und so die Voraussetzung für die Ansiedlung anaerober Bakterien schaffen [66].

Bei Frühgeborenen treffen oft mehrere Faktoren zusammen, welche die normale mikrobielle Darmbesiedlung beeinträchtigen wie z.B.

- Geburt durch Sectio caesarea
- strikte Hygienemaßnahmen auf der Intensivstation
- Unreife der gastrointestinalen und Immunfunktionen
- Antibiotikagabe und
- fehlende oder geringe enterale Milchzufuhr in den ersten Lebenstagen [56; 83].

Die Folgen sind sehr geringe Zahlen von Bakterienspezies im Kolon in den ersten 10 Lebenstagen, verzögerte Besiedlung mit Bifidobacteria und Lactobacilli und verminderte Anzahl dieser für den Wirt nützlichen Bakterien sowie vorwiegende Besiedlung mit Hospitalkeimen [80; 83; 94]. Mehrere randomisierte, kontrollierte Studien zeigen, dass die Darmflora Frühgeborener durch enterale Verabreichung von Probiotika moduliert werden kann und sich die enteral applizierten probiotischen Bakterien zumindest vorübergehend im Kolon ansiedeln [1; 2; 47; 60; 88]. Bisher wurden jedoch erst wenige Studien publiziert, welche den Einfluss von Probiotika auf die fäkalen SCFA- und Laktat-Konzentrationen bei Frühgeborenen untersuchten, obwohl wahrscheinlich für Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 34 Wochen die SCFA-Produktion wichtiger als für jede andere Altersgruppe ist [83].

Bei Frühgeborenen ist die Laktoseverdauung im Dünndarm wegen der noch nicht voll entwickelten Laktaseaktivität eingeschränkt [46]. Durch die bakterielle Fermentation von unverdauter Laktose im Kolon und die Utilisierung der dabei gebildeten SCFA wird der Energieverlust durch Ausscheidung von unverdauter Laktose im Stuhl reduziert [45; 83]. Außerdem sind SCFA eine wichtige Energiequelle für die Epithelzellen des Kolons [27; 46]. Darüber hinaus wird durch die Produktion von SCFA und Laktat der pH-Wert im Kolon reduziert, wodurch das Wachstum von Fäulnisbakterien und anderen potentiell schädlichen Bakterien gehemmt wird [22]. Auch das ist für Frühgeborene, die auf Grund des noch unreifen Abwehrsystems besonders anfällig für Infektionen sind und deren Entgiftungskapazität eingeschränkt ist, von Vorteil.

Nach Recherche der Literatur wurde bisher nur eine Studie publiziert, welche den Einfluss der oralen Verabreichung von Lactobacillus GG auf die fäkalen SCFA-Konzentrationen bei Frühgeborenen untersuchte [83]. Die Studie zeigte, dass sich bei 9 der 10 Frühgeborenen, die innerhalb der ersten 3 Lebenstage als Ergänzung zu ihrer Milchnahrung über zwei Wochen zweimal täglich 10^8 cfu Lactobacillus GG erhielten, dieser Stamm im Kolon ansiedelte. In den fäkalen SCFA-Konzentrationen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die entweder Lactobacillus GG oder Plazebo erhielten, während der ersten 4 Lebenswochen gefunden werden. Die in der vorliegenden Arbeit ausgewertete Studie ist die erste klinische Studie, in der der Einfluss der Applikation von B. lactis Bb12 auf die fäkalen SCFA- und Laktat-Konzentrationen Frühgeborener untersucht wurde.

Die fäkalen mittleren Gesamt-SCFA-Konzentrationen während der gesamten 3 Inteventionswochen sind in der B. lactis-Gruppe, die eine Dosis von B. lactis Bb12 von täglich $1,6 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$ bzw. $3,2 \times 10^9$ Bakterien in den ersten 3 Tagen und ab Tag 4 von $4,8 \times 10^9$ Bakterien erhielt, signifikant höher ($p = 0,001$) im Vergleich zur Plazebo-Gruppe. In Woche 1 ist der Unterschied zwischen den zwei Gruppen noch nicht signifikant. In Woche 2 und 3 ist der Unterschied dann stärker ausgeprägt und statistisch signifikant (µmol/g Stuhl: 32,51 ± 1,78 vs. 24,54 ± 2,17 bzw. 47,60 ± 3,30 vs. 27,15 ± 2,34, $p = 0,013$ bzw. $< 0,001$). Den Hauptanteil kurzkettiger Fettsäuren stellt sowohl in der B. lactis-Gruppe als auch in der Plazebo-Gruppe die Essigsäure mit 90 % der fäkalen Gesamt-SCFA. Die fäkale Acetat-Konzentration während der gesamten 3 Interventionswochen ist ebenso wie die Konzentration der Gesamt-SCFA in der B. lactis-Gruppe im Vergleich zur Plazebo-Gruppe signifikant höher (33,50 ± 2,79 vs. 19,32 ± 1,53 µmol/g Stuhl, $p = 0,001$). Bei dem hohen Anteil von Essigsäure an den Gesamt-SCFA in beiden Gruppen ist das auch nicht anders zu erwarten. Dementsprechend verläuft auch die Entwicklung der Acetat-Konzentrationen ähnlich wie die der Gesamt-SCFA-Konzentrationen. In der ersten Interventionswoche ist der Unterschied in den mittleren fäkalen Acetat-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen noch nicht statistisch signifikant. In der 2. und 3. Interventionswoche ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen dann stärker ausgeprägt als in Woche 1 und statistisch signifikant (µmol/g Stuhl: 29,53 ± 1,49 vs. 21,55 ± 1,92 bzw. 43,35 ± 24,18, $p < 0,001$ für Woche 2 und 3). Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen bleiben auch bei separater Analyse von Kindern, die Antibiotika erhielten, signifikant ($p < 0,001$).

In anderen Studien, welche die fäkalen SCFA-Konzentrationen von Frühgeborenen unter dem Einfluss verschiedener Nahrungen (Muttermilch vs. Nutramigen, eine laktosefreie Formula [26] bzw. Muttermilch vs. Muttermilch mit Zusatz von Lactobacillus GG [83]) verglichen, war der molare Prozentsatz von Essigsäure an den Gesamt-SCFA mit 65 % [26] bzw. 69 % [83] in jeweils beiden Gruppen deutlich niedriger. In der Studie von Favre et al. [26] wiesen die SCFA-Profile bei Frühgeborenen

mit einem Gestationsalter ≥ 33 Wochen im Gegensatz zu den fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentrationen deutliche Unterschiede zwischen der mit Muttermilch und der mit Formula ernährten Gruppe auf, die am 17. Lebenstag signifikant wurden. Ein Hauptunterschied war ein signifikanter Anstieg der Buttersäurekonzentration (12 % vs. 30 %) bei den mit Formula ernährten Kindern. Bei extrem unreifen, mit Muttermilch ernährten Frühgeborenen (Gestationsalter < 33 Wochen) betrug die durchschnittliche Konzentration der Gesamt-SCFA im Stuhl weniger als ein Drittel im Vergleich zu der bei gleichfalls mit Muttermilch ernährten reiferen Frühgeborenen (7,4 µmol/g vs. 24 µmol/g). In unserer Studie waren extrem unreife Frühgeborene ausgeschlossen, so dass keine Aussagen über eine mögliche Beeinflussung von B. lactis Bb12 auf die fäkalen SCFA-Konzentrationen und das SCFA-Profil solcher Kinder gemacht werden können.

Die höheren molaren Prozentsätze von Acetat und Laktat korrelieren gut mit der hohen Anzahl Bifidusbakterien in den Stuhlproben [61]. Bifidusbakterien produzieren bei der Fermentation von Laktose hauptsächlich Laktat und Acetat. Die fäkalen Konzentrationen von Propionsäure und von Buttersäure sind in der B. lactis-Gruppe durchweg höher als in der Plazebo-Gruppe ($p = 0,040$, bzw. $p = 0,026$). Die Verabreichung von B. lactis Bb12 hat jedoch keinen Einfluss auf die fäkalen Konzentrationen von Iso-Valeriansäure und n-Valeriansäure. (die Daten der Konzentrationen von Propionsäure, Buttersäure, iso-Valeriansäure und Valeriansäure sind in der Arbeit nicht aufgezeigt). Der geometrische Mittelwert der molaren Anteile des SCFA-Profils über die Gesamtzeit ist für die B. lactis- und die Plazebo-Gruppe ähnlich (C2:C3:C4:C5 B. lactis-Gruppe: 90:4:3,2:2; Plazebo-Gruppe: 89,3:5:3:2). Der niedrigere Anteil von Butyrat und Propionat an den Gesamt-SCFA im Vergleich zu anderen Studien kann möglicherweise durch die geringere Anzahl von Clostridia spp., Bacteroides spp. und Veillonella spp. erklärt werden [61].

Der Einfluss der oralen bzw. enteralen Applikation von Probiotika auf die fäkalen Laktatkonzentrationen bei Frühgeborenen wurde bisher noch in keiner klinischen Studie untersucht. Laktat ist ein Intermediärmetabolit der bakteriellen Fermentation von Kohlenhydraten im Kolon. Bei Erwachsenen liegen die fäkalen Laktatkonzentrationen unter 2 - 3 mmol/l [62]. Die Dickdarmflora produziert sowohl L- als auch D-Laktat [15; 43], welche zu SCFA, den hauptsächlichen Endprodukten der bakteriellen Fermentation weiter metabolisiert werden [62]. Im Gegensatz dazu produziert der probiotische Stamm Bifidobacterium lactis Bb12 ausschließlich L- und keine D-Milchsäure. Die fäkale Laktatkonzentration bei Säuglingen ist höher als bei Erwachsenen. Das kann auf das Fehlen von Laktat-abbauenden Bakterien zurückgeführt werden. Bei gestillten Säuglingen wurden höhere fäkale Laktatkonzentrationen gefunden als bei nicht gestillten Säuglingen [64]. Bei Ernährung mit einer Säuglingsmilch mit Zusatz von Galakto- und Frukto-Ologosacchariden waren

die fäkalen Laktatspiegel Reifgeborener höher als bei Ernährung mit einer Säuglingsmilchnahrung ohne eine solche Supplementierung [48].

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Verabreichung von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die fäkalen Laktatspiegel bei Frühgeborenen untersucht. Fäkales Laktat steigt sowohl in der B. lactis- als auch in der Plazebo-Gruppe mit dem Alter an. Die Frühgeborenen, welche Bifidobacterium lactis Bb12 als Supplement erhielten, haben jedoch während der gesamten Interventionsperiode signifikant höhere durchschnittliche fäkale Laktatkonzentrationen im Vergleich zu den Frühgeborenen, welche Plazebo erhielten (11,43 ± 1,37 vs. 7,06 ± 1,14 mmol/g Stuhl; p = 0,011). Die Unterschiede zwischen den 2 Gruppen sind bei Kindern, die keine Antibiotika erhielten, ausgeprägter (12,05 ± 1,75 vs. 7,15 ± 1,08 mmol/g Stuhl; p = 0,009). Es besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Anstieg der Anzahl der Bifidusbakterien und der Laktatkonzentration [61].

Es wurde beschrieben, dass der Verzehr von nicht fermentierter Milch mit Zusatz von Bifidobacterium longum beim Menschen die Laktoseverdauung verbessert [40]. Da der Laktosegehalt in Muttermilch relativ hoch ist, haben Bifidobacteria gegenüber anderen Bakterienspezies, die keine ß-Galaktosidase besitzen, die Laktose spaltet, einen Vorteil. Der signifikant niedrigere durchschnittliche fäkale pH-Wert bei den Frühgeborenen in der B. lactis-Gruppe von 5,68 $\pm$ 0,09 im Vergleich zu. 6,38 $\pm$ 0,10 ($p < 0,001$) in der Plazebo-Gruppe kann durch den höheren fäkalen Acetat- und Laktatgehalt bei diesen Kindern erklärt werden. Die Reduzierung des pH-Werts im Kolon trägt bekanntlich zur Hemmung des Wachstums potentiell pathogener Bakterien bei. Die signifikant ($p = 0,014$) geringere Anzahl der Enterobacteriaceae und Clostridium spp. im Stuhl der Kinder der B. lactis-Gruppe im Vergleich zu der bei Kindern der Plazebo-Gruppe [61] ist wahrscheinlich durch ihren signifikant niedrigeren Stuhl-pH-Wert mitbedingt.

5.3 Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die fäkalen Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) und Calprotectin

Das Darm-assoziierte Immunsystem (engl. gut-associated lymphoid tissue, Abk. GALT) ist das größte Teilimmunsystem des menschlichen Körpers. Es enthält ca. 80 % der aktivierten B-Lymphozyten des gesamten Immunsystems, die sich schließlich zu Plasmazellen, den Effektorzellen der humoralen Immunantwort, differenzieren [36]. Die meisten Plasmazellen der Darmmukosa produzieren IgA. Das sekretorische IgA kommt stets als IgA-Dimer vor. Es besteht aus 2 IgA-Monomeren, die durch eine J-Kette miteinander verbunden sind. Außerdem ist am Aufbau des sIgA ein weiteres

Polypeptid beteiligt. Es wird als sekretorische Komponente bezeichnet. Diese sekretorische Komponente wird von Epithelzellen gebildet. Sie ermöglicht den Transport des IgA-Dimers durch die Epithelzellen und schützt sie weitgehend vor proteolytischem Abbau.

Die sIgA-Antikörper spielen eine essentielle Rolle bei der Immunabwehr. Sie blockieren potentiell schädliche Antigene. Dieser Prozess wird auch als Immunexklusion bezeichnet. Dadurch wird die Darmbesiedlung mit pathogenen Bakterien und das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen und anderem schädlichem Fremdmaterial in die Darmschleimhaut verhindert [8].

Bei Geburt ist das Darm-Immunsystem noch unreif. In der ersten Lebenswoche sind normalerweise sehr wenig IgA-produzierende Zellen in der Schleimhaut nachweisbar [67]. IgA ist deshalb kaum vorhanden. Initial werden vorwiegend Immunglobuline der Klasse M gebildet. Die IgA-Produktion nimmt aber nach der Geburt rasch zu und nach 1 - 2 Monaten sind IgA die vorherrschenden Antikörper im Darm [9; 67].

In-vitro-Untersuchungen demonstrieren, dass einige Stämme der Bifidusbakterien die IgA-Produktion in der Darmschleimhaut stimulieren [96]. Eine klinische Studie von Fukushima et al. [28] zeigte bei gesunden 15 - 31 Monate alten Kleinkindern, die 8 Tage eine mit B. lactis Bb12 supplementierte Milchnahrung erhalten hatten, einen signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Gesamt-IgA-Konzentration (1,49 ± 0,32 vs. 4,29 ± 1,09 mg/g Stuhl, $p < 0,05$). Im Stuhl dieser Kinder, die alle gegen Poliomyelitis mit einem Lebendimpfstoff geimpft waren, stiegen auch die fäkalen anti-Poliovirus-spezifischen sIgA-Antikörper signifikant an. Dies zeigt, dass eine B. lactis Bb12-Gabe offensichtlich auch eine polyklonale Aktivierung Antikörper-bildender Zellen bewirkt. Die Anzahl der Kinder war allerdings mit 7 Kindern nur sehr gering.

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Studie zeigen den Einfluss von B. lactis Bb12 auf die fäkalen sIgA-Spiegel Frühgeborener. Bei Frühgeborenen der B. lactis-Gruppe steigt die durchschnittliche fäkale Gesamt-sIgA-Konzentration im Verlauf der 3-wöchigen Interventionsperiode an, während die durchschnittlichen fäkalen Gesamt-sIgA-Spiegel in der Plazebo-Gruppe unverändert bleiben. Im Mittel beträgt das fäkale Gesamt-sIgA in den ersten 3 Lebenswochen in der B. lactis-Gruppe 4,40 ± 0,49 mg/kg Stuhl, in der Plazebo-Gruppe dagegen nur 2,47 ± 0,59 mg/kg Stuhl. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,021$). Wenn man die Kinder beider Gruppen, die Antibiotika bekamen, nicht mit berücksichtigt, ist der Unterschied noch größer ($p = 0,009$). Bei der Beurteilung der sIgA-Konzentrationen muss bedacht werden, dass die Kinder mit Muttermilch ernährt wurden. Muttermilch enthält sIgA. Kinder, die mit Muttermilch ernährt werden, nehmen große Mengen an sIgA auf [76; 95]. Damit sind auch die höheren mittleren fäkalen Gesamt-

IgA-Konzentrationen, die bei mit Muttermilch ernährten Frühgeborenen im Vergleich zu Frühgeborenen gefunden werden, die mit einer Frühgeborenennahrung ernährt werden, zu erklären [76]. In einer Untersuchung über das Immunglobulin-A Profil in Muttermilch von Müttern Frühgeborener (sog. Pretermmilch) und Müttern Reifgeborener wurden mittels Immunblotting die sIgA-Konzentrationen gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass Pretermmilch ebenso hohe bzw. anfangs im Mittel sogar eher höhere sIgA-Konzentrationen hat wie die Milch von Müttern Reifgeborener [5]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Muttermilch als Quelle von schützenden Immunfaktoren für Frühgeborene.

In Bezug auf die Ernährung mit Muttermilch und das enterale Nahrungsvolumen bestehen zwischen den beiden Gruppen in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Unterschiede in den fäkalen Gesamt-sIgA-Konzentrationen durch die Ernährung bedingt waren. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Verabreichung von B. lactis Bb12 die Produktion von sekretorischem IgA im Darm stimuliert und so den Anstieg der fäkalen Gesamt-sIgA-Konzentrationen bewirkt.

Die Steigerung der lokalen Immunabwehr durch Stimulation der IgA-Produktion im Darm nach enteraler Verabreichung von Probiotika könnte die Effektivität der Exklusion von pathogenen Mikroorganismen aus dem Darm erhöhen und dadurch die Häufigkeit und den Schweregrad von Infektionen beeinflussen. Diese Annahme wird durch klinische Studien gestützt. Beispielhaft hierfür sind die beiden folgenden Studien. Stationär behandelte Säuglinge und Kleinkinder mit einer Rotavirusinfektion, die in der Realimentationsphase zusätzlich Joghurt mit Lactobacillus GG erhielten, hatten eine signifikant höhere Anzahl IgA sezernierende Zellen in den Blutproben, assoziiert mit kürzerer Durchfalldauer im Vergleich zu Kindern, die einen Plazebo-Joghurt erhielten [42].

Saavedra et al. [74] wiesen in einer randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudie eine präventive Wirkung einer mit B. lactis Bb12 supplementierten Milchnahrung gegen akute Diarrhö bei hospitalisierten Säuglingen und Kleinkindern nach.

Beim Vergleich der mittleren fäkalen sIgA-Konzentrationen der Kinder, die Antibiotika erhielten, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe festgestellt werden. Der fehlende positive Effekt von B. lactis Bb12 auf die fäkalen sIgA-Spiegel bei Antibiotikagabe kann nicht durch eine gleichzeitige Reduzierung der Anzahl der Bifidobakterien erklärt werden, denn die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl wurde durch die Antibiotikagabe nicht vermindert [61]. Vermutlich spielt die signifikante Reduzierung ($p = 0,03$) der Gesamtzahl der Bakterien im Stuhl eine Rolle, die bei Kindern unter Antibiotikagabe im Vergleich zu Kin-

dern, die keine Antibiotika bekamen, beobachtet wurde [61]. Die ohnehin wegen der Gefahr einer Resistenzentwicklung für neonatologische Intensivstationen geltende Forderung für eine strenge Indikation einer Antibiotikagabe wird durch den negativen Einfluss der Antibiotika auf die sIgA-Konzentrationen zusätzlich unterstützt.

Neben den fäkalen sIgA-Konzentrationen wurden auch die Untersuchungen der fäkalen Calprotectin-Konzentrationen ausgewertet, die ein non-invasiver Parameter für den intestinalen Entzündungsstatus sind.

Calprotectin ist ein komplexes 36,5 kD Kalzium- und Zink-bindendes Protein, das etwa 60 % der löslichen zytosolischen Proteine in den Granulozyten des Menschen ausmacht [23; 44]. Es hat gegenüber dem fäkalen Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), der auch als Marker für die Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut verwendet wird, den Vorteil, dass es in seiner an Kalzium gebundenen Form im Stuhl bei Zimmertemperatur bis zu 7 Tage stabil bleibt, weil es gegen proteolytische Enzyme und Hitze resistent ist [44].

Bei Patienten mit malignen oder entzündlichen Erkrankungen im Magen-Darm-Trakt wie kolorektales Karzinom, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) und bakterielle Darminfektionen sind die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen erhöht [6; 10; 13; 24; 44; 49; 85]. Amati et al. [3] fanden signifikant höhere fäkale Calprotectin-Spiegel bei erwachsenen Patienten mit aktivem Morbus Crohn und bei Patienten mit ulceröser Kolitis im Vergleich zu gesunden Freiwilligen. De Jong et al. [19] beobachteten bei Kindern mit CED im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern signifikant höhere fäkale Calprotectin-Konzentrationen, wobei die Spiegel eng mit der Krankheitsaktivität korrelierten, besonders bei Befall der unteren Darmabschnitte.

Calprotectin ist auch ein einfacher, non-invasiver Marker zur Beurteilung des Entzündungsstatus des Gastrointestinaltrakts Neugeborener, besonders jener mit Risiko für nekrotisierende Enterokolitis, wie Frühgeborene und Kinder mit intrauteriner Wachstumsretardierung [14]. Mehrere Studien zeigen, dass Neugeborene und Frühgeborene wesentlich höhere fäkale Calprotectin-Spiegel haben als Erwachsene [12; 65; 73] und Kinder [63]. Bei gesunden Kleinkindern liegt die fäkale Calprotectin-Konzentration bereits weit unter dem Spiegel gesunder Neugeborener und Frühgeborener. In einer Studie von Canani et al. [13] lag der Median der fäkalen Calprotectin-Konzentration bei 76 gesunden Kindern im Alter von 13 bis 209 Monaten bei 28 mg/kg Stuhl mit einem interquartilen Bereich von 15 - 27.

Über einen möglichen Einfluss einer Probiotikagabe auf die fäkalen Calprotectin-Spiegel ist bisher noch nichts bekannt. In dieser Studie wurden die Ergebnisse der fäkalen Calprotectin-Konzentrationen von Frühgeborenen, die als Nahrungsergän-

zung B. lactis Bb12 oder ein Plazebo erhielten, ausgewertet. Die Frühgeborenen der B. lactis-Gruppe haben im Gesamtzeitraum im Vergleich zu jenen Frühgeborenen der Plazebo-Gruppe im Mittel signifikant niedrigere fäkale Calprotectin-Konzentrationen (269,77 $\pm$ 26,71 vs. 350 $\pm$ 31,19 mg/kg Stuhl; p = 0,041). Die Konzentrationen variieren von 49 bis 898 mg/kg Stuhl. Bei Kindern, die Antibiotika erhielten, ist der Unterschied in den Calprotectin-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Jedoch ist der Unterschied größer, wenn die Kinder untereinander verglichen werden, die keine Antibiotika erhielten (p = 0,007).

Die Gesamt-Mittelwerte des fäkalen Calprotectins beider Gruppen liegen mit 269,77 bzw. 350 mg/kg Stuhl weit über der oberen Referenzgrenze für Erwachsene von 50 mg/kg Stuhl [12]. Die höheren Calprotectin-Konzentrationen bei Neugeborenen im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen hängen wahrscheinlich mit der besonderen Physiologie des Darms Neugeborener zusammen [12]. Charakteristisch für die ersten Lebenswochen ist u.a. eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmschleimhaut, wie Walker bereits 1979 [91] aufgezeigt hat. Diese kann durch intestinale Permeabilitätsstudien festgestellt werden [93]. Bei Frühgeborenen ist die Permeabilität der Darmschleimhaut für Makromoleküle deutlich höher im Vergleich zu der bei reifen Neugeborenen. Laforgia et al. [50] glauben, dass die erhöhte Permeabilität der unreifen Darmschleimhaut eine vermehrte transepitheliale Migration neutrophiler Granulozyten oder Makrophagen in das Darmlumen zulassen könnte, die dann höhere Calprotectin-Konzentrationen verursachen. Auch Campeotto et al. [12] argumentieren, dass die erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut mit einer erhöhten Migration von neutrophilen Granulozyten assoziiert sein könnte und die hohen fäkalen Calprotectin-Konzentrationen bei gesunden Früh- und Neugeborenen dadurch bedingt sind.

Die in dieser Studie nachgewiesene signifikant niedrigere mittlere Calprotectin-Konzentration in der B. lactis-Gruppe im Vergleich zur Plazebo-Gruppe könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Verabreichung von B. lactis Bb12 die Reifung der Schleimhautimmunität beschleunigt und die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen fördert.

Da bisher keine weiteren Studien über den Einfluss von Probiotika auf die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen bei Frühgeborenen vorliegen, können diesbezüglich keine Vergleiche mit Ergebnissen anderer Autoren gezogen werden. Es ist lediglich eine Studie bekannt [12], in der bei reifen Neugeborenen der Einfluss von Präbiotika und damit indirekt von probiotischen Bakterien auf die fäkalen Calprotectin-Spiegel untersucht wurde, weil Präbiotika das Wachstum von Bifidusbakterien in der Kolonflora fördern. In dieser Studie wurde kein Einfluss der Präbiotika auf das fäkale Calprotectin beobachtet: die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen der Neugeborenen, die eine Säuglingsmilchnahrung mit Präbiotika bekamen, waren mit denen der

Neugeborenen, die mit einer Säuglingsmilchnahrung ohne Präbiotika ernährt oder die gestillt wurden, vergleichbar. Offensichtlich reicht im Gegensatz zur enteralen Verabreichung von B. lactis Bb12 die Gabe von Präbiotika nicht aus, um die Calprotectin-Konzentrationen zu senken.

In der vorliegenden Studie wurden keine Unterschiede in den mittleren fäkalen Calprotectin-Konzentrationen zwischen Kindern mit und ohne NEC gefunden. Allerdings trat in der gesamten Studienpopulation von 69 Kindern nur bei 3 Kindern (4,3 %) eine nekrotisierende Enterokolitis auf. Von den 32 Kindern der Plazebo-Gruppe waren 2 Kinder (6,3 %) und von den 37 Kindern der B. lactis-Gruppe ein Kind (2,7 %) von einer NEC betroffen.

In der Literatur wird für NEC bei Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (VLBW) < 1500 g eine Häufigkeit von bis zu 10 % und bei Frühgeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (< 1000 g) bis zu 20 % angegeben [4; 82]. In einem amerikanischen Leitfaden der Neonatologie [32] wird für Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g insgesamt eine Häufigkeit von 8 bis 12 % angegeben, wobei das NEC-Risiko mit abnehmendem Gestationsalter ansteigt. In einer Multizenter-Studie, die 2681 Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g einschloss, betrug die Prävalenz der NEC (Bell Stadium II oder III) 10,1 %. Zusätzlich hatten 17,2 % der Frühgeborenen einen Verdacht auf NEC (Bell Stadium I). Die beobachteten großen Differenzen in der Prävalenz zwischen den Studienzentren werden Unterschieden im frühen klinischen Management zugeschrieben [89]. Das relativ geringe Vorkommen der NEC bei den hier diskutierten Probanden ist möglicherweise durch die Muttermilchernährung bedingt, die eine Schutzwirkung gegen NEC hat [54; 77].

Wie unterschiedlich die Häufigkeitsangaben der NEC sind, zeigen auch 3 aktuelle randomisierte Plazebo-kontrollierte Interventionsstudien mit bestimmten probiotischen Bakterienstämmen. In den Kontrollgruppen trat bei 2,8 % (8/290), 5,3 % (10/187) bzw. 13,7 % (10/73) der Kinder eine nekrotisierende Enterokolitis auf, in den Probiotika-Gruppen dagegen nur bei 1,4 % (4/295), 1,1 % (2/180) bzw. 1,4 % (1/72) [18; 52; 7]. In zwei der drei Studien war der Unterschied in der Häufigkeit der NEC zwischen der Kontroll- und der Probiotika-Gruppe statistisch signifikant [7; 52].

Josefsson et al. [41], die in einer Longitudinalstudie über 8 Wochen fäkales Calprotectin bei Frühgeborenen (n= 59) mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (VLBW, < 1500 g) untersuchten, fanden ähnlich hohe fäkale Calprotectin-Konzentrationen wie sie in unserer Studie nachweisbar waren. Bei gesunden VLBW-Kindern lag der Median der Calprotectin-Konzentrationen in den Stuhlproben bei 253 µg/g Stuhl (Variationsbreite 9 – 1867 µg/g Stuhl). 7 der 59 VLBW-Frühgeborenen entwickelten eine NEC oder andere schwerwiegende Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts. Vier

dieser Kinder, davon 3 Kinder mit NEC und ein Kind mit einer Perforation und mikroskopisch nachweisbarer Entzündung des Darms, hatten fäkale Calprotectin-Konzentrationen von über 2000 µg/g Stuhl. Bei den 3 anderen Fällen, einem Kind mit NEC ohne mikroskopisch erkennbare Entzündungszeichen und 2 Kindern mit fokaler Darmperforation lagen die fäkalen Calprotectin-Konzentrationen wie bei den gesunden VLBW-Frühgeborenen niemals über 2000 microg/g Stuhl. Die Autoren weisen darauf hin, dass ein fäkaler Calprotectin-Spiegel von über 2000 µg/g Stuhl ein nützlicher, aber kein früher Marker von NEC und anderen schweren entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts ist. Die Variationsbreite der Calprotectin-Konzentrationen reicht bei den Frühgeborenen in der vorliegenden Studie von 49 bis 898 mg/kg Stuhl. Da die Kinder nach vorläufiger Diagnosestellung einer NEC sofort aus der Studie genommen wurden, standen bei fortgeschrittener Erkrankung keine Stuhlproben mehr zur Bestimmung der Calprotectin-Konzentrationen zur Verfügung. Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch bei den an NEC erkrankten Kindern zu diesem frühen Zeitpunkt keine fäkalen Calprotectin-Konzentrationen von über 2000 µg/g Stuhl nachgewiesen werden konnten.

Die begrenzte Probandenzahl in der vorliegenden Studie erlaubt keine sichere Aussage darüber, ob die Gabe von Bifidobacterium lactis Bb12 zum Schutz vor NEC beitrug.

Deshpande et al. [20] überprüften systematisch alle randomisierten kontrollierten Studien, welche die Wirksamkeit und Sicherheit einer beliebigen probiotischen Zugabe zur Nahrung innerhalb der ersten 10 Lebenstage über 7 Tage und länger zur Prävention einer nekrotisierenden Enterokolitis (Stadium 2 oder größer) bei Frühgeborenen (Gestationsalter < 33 Wochen), mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (VLBW, < 1500 g) evaluierten. Von den 59 potentiell relevanten Literaturstellen blieben schließlich nur 7 [7; 17; 18; 47; 52; 57; 61] übrig, die alle geforderten Kriterien erfüllten und insgesamt 1393 Frühgeborene einschlossen. Zu diesen ausgewählten qualitativ hochwertigen, randomisierten, kontrollierten Doppelblind-Studien gehört auch die vorliegende Studie, deren Daten über die Wirkung von B. lactis Bb12 auf die Darmflora Frühgeborener aus der Publikation von Mohan et al. [61] für die Meta-Analyse herangezogen wurden. Die Meta-Analyse der 7 Studien zeigt, dass Probiotika das Risiko der Entwicklung einer NEC reduzieren. Das relative Risiko war 0,36 (95 % CI 0,20 - 0,65) für die Reduzierung der NEC. Die Ergebnisse zeigen auch, dass Probiotika-Zugabe zur Nahrung die Mortalität reduziert (relatives Risiko 0,47, 95 % CI 0,30 - 0,73), nicht aber die Letalität bei NEC und Sepsis.

Caffarelli und Bernasconi [11] weisen in ihrem Kommentar zur Meta-Analyse von Deshpande et al. [20] darauf hin, dass Probiotika tatsächlich die Reifung intestinaler Funktionen fördern und Wachstum und Adhärenz pathogener Bakterien im Darm Frühgeborener reduzieren. Sie zeigen aber auch etliche Mängel der Meta-Analyse

auf. Dennoch bezeichnen sie den Überblick von Deshpande et al. [20] als wichtigen Schritt vorwärts zu einer Evidenz-basierten Anwendung der Probiotika.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit ausgewerteten Studie bezüglich der Wirkung von B. lactis Bb12 auf die Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut sind ermutigend. Bifidobacterium lactis Bb12 trägt zum Anstieg der fäkalen sIgA-Konzentration und zur Senkung der fäkalen Calprotectin-Konzentration bei.

Eine Reihe von Fragen bleibt aber noch offen, z.B. wie die individuellen sIgA- und Calprotectin-Konzentrationen für die Prognose eines frühgeborenen Kindes in Bezug auf die Entstehung lebensbedrohlicher Infektionen und NEC einzuschätzen sind. Der Empfehlung von Caffarelli und Bernasconi [11], geeignete Probiotika in weiteren großen kontrollierten Studien sowohl auf ihre Kurz- als auch auf ihre Langzeitwirkung zu überprüfen, wird auch aufgrund der eigenen Ergebnisse dieser Studie zugestimmt.

6 Zusammenfassung

Das Darm-assoziierte Immunsystem (GALT) ist das größte Teilimmunsystem des menschlichen Körpers. Bei Geburt ist dieses System noch unreif. Forschungen der vergangenen Jahre zeigen, dass die Darmflora die Physiologie und die Barrierefunktion der Mukosa sowie Immun- und Entzündungsantworten moduliert. Dabei scheint die quantitative und qualitative Zusammensetzung der postnatalen Darmflora für die Prägung des Immunsystems eine zentrale Rolle zu spielen.

Die bakterielle Besiedlung des Darms Neugeborener beginnt während oder unmittelbar nach Geburt. Bei vaginal geborenen, gesunden, reifen, voll gestillten Säuglingen entwickelt sich schon bald eine „gesunde“ Darmflora, bei der die Bifidusbakterien überwiegen.

Bei Frühgeborenen treffen häufig mehrere Faktoren wie z.B. Geburt durch Sectio cesarea, Intensivtherapie und antibiotische Behandlung zusammen, die einer postnatalen Besiedlung des Darms mit unerwünschten Hospitalkeimen Vorschub leisten. Der gestörten Darmbesiedlung und Unreife der Mukosabarriere wird eine Schlüsselrolle für das erhöhte Risiko Frühgeborener für Infektionen und die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) zugeschrieben. Das hat den Fokus der Forschung auf die Probiotika gelenkt, die die Ansiedlung pathogener oder potentiell pathogener Bakterien im Darm hemmen, die Barrierefunktion optimieren und die Immun- und Entzündungsantworten modulieren können.

Ziel dieser Arbeit war es, in einer prospektiven randomisierten kontrollierten klinischen Doppelblindstudie die Verträglichkeit des probiotischen Stammes Bifidobacterium lactis Bb12 bei Frühgeborenen und seinen Einfluss auf die bakterielle Fermentation im Darm und die Immunantwort und Entzündungsaktivität des Darms zu untersuchen. Die Genehmigung der lokalen Ethikkommission für die klinische Studie lag vor.

Von 69 Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von < 37 und > 26 Wochen wurden 37 Kinder randomisiert der B. lactis-Gruppe und 32 der Plazebo-Gruppe zugeordnet. Die Kinder der B. lactis Gruppe erhielten zusätzlich zur Nahrung über 21 Tage zweimal täglich das Studienpräparat FM 2000 (Muttermilchverstärker) mit einer Gesamtdosis B. lactis Bb12 von 1,6 x 10^9 Bakterien am ersten Tag, ansteigend bis zum 4. Tag auf 4,8 x 10^9 Bakterien. Die Kinder der Plazebo-Gruppe erhielten stattdessen FM 2000 ohne B. lactis Bb12, das äußerlich nicht von dem Präparat mit Zusatz von B. lactis Bb12 zu unterscheiden war.

Im Studienprotokoll wurden alle für die Endpunkte der Studie bedeutsamen klinischen Daten der Mütter und Kinder erfasst. Von den Frühgeborenen wurden täglich Gewicht und Nahrungsvolumen, eventuelle Antibiotika-Applikation sowie unerwünschte Ereignisse und die Drop-outs dokumentiert. Zweimal wöchentlich wurden klinische Scorewerte zur Beurteilung des klinischen Gesamtzustands ermittelt. Pro Woche wurden, wenn möglich, 2 Stuhlproben gesammelt, um den pH-Wert, die Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und Laktat sowie von sIgA und Calprotectin zu bestimmen.

Die Auswertung der Randomisierungsparameter zeigte, dass die beiden Gruppen gut vergleichbar sind.

Die Anzahl der Kinder, die Antibiotika erhielten und die Dauer der Applikation in beiden Gruppen sind ebenfalls gut vergleichbar.

Die Verträglichkeit von B. lactis Bb12 kann als gut eingeschätzt werden. In keinem Fall wurde eine unerwünschte Nebenwirkung oder gar eine schwere Erkrankung, die mit der Applikation von B. lactis Bb12 in Zusammenhang stehen könnte, beobachtet. Die Anzahl von Kindern, die eine nekrotisierende Enterokolitis entwickelten, ist in beiden Gruppen mit einem (B. lactis-Gruppe) bzw. zwei Fällen (Plazebo-Gruppe) gering.

Weder in den parametrischen noch in den verteilungsfreien Tests sind zwischen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe signifikante Unterschiede in der klinischen Scoreentwicklung, dem Gewichtsverlauf und dem enteralen Nahrungsvolumen zu erkennen. In beiden Gruppen korreliert die Antibiotikagabe negativ mit der Körpergewichtsentwicklung.

Der durchschnittliche fäkale pH-Wert während der gesamten 3-wöchigen Interventionsperiode ist bei Frühgeborenen der B. lactis-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zu dem der Frühgeborenen der Plazebo-Gruppe (5,68 ± 0,09 vs. 6,38 ± 0,10, $p < 0,001$). Die fäkale Laktatkonzentration steigt in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter an. In allen 3 Interventionswochen ist jedoch der Mittelwert in der B. lactis-Gruppe im Vergleich zur Plazebo-Gruppe signifikant höher ($p = 0,001$; 0,007 und 0,048). Die fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentrationen sind in der B. lactis-Gruppe ab der 2. Woche signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe ($p < 0,05$). In der 3. Woche betragen die mittleren fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentration in der B. lactis-Gruppe 47,60 µmol/g ± 3,30, in der Plazebo-Gruppe dagegen nur 27,15 µmol/g ± 2,34 ($p < 0,001$). Die Acetat-Konzentrationen, die ca. 90 % der molaren Konzentrationen der Gesamt-SCFA in beiden Gruppen ausmachen, sind dementsprechend in der B. lactis-Gruppe ebenfalls signifikant höher. Der Mittelwert der Acetat-Konzen-

trationen während der 3 Interventionswochen insgesamt beträgt in der B. lactis-Gruppe 33,50 µmol/g ± 2,07 und in Plazebo-Gruppe 19,32 µmol/ ± 1,53. Der signifikante Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den beiden Gruppen trifft auch auf die Subgruppen, die Antibiotika erhalten haben, zu. Das geometrische Mittel der molaren Anteile des SCFA-Profils über die Gesamtzeit ist in beiden Gruppen ähnlich (C2:C3:C4:C5 B. lactis-Gruppe: 90:4:3,2:2; Plazebo-Gruppe: 89,3:5:3:2).

Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl [61] korreliert signifikant mit den Laktatkonzentrationen ($r = 0,336$, $p = 0,010$) und den Acetat-Konzentrationen ($r = 0,243$, $p = 0,05$).

Die durchschnittliche Konzentration des Gesamt-sIgA über die gesamte Studienperiode ist in der B. lactis-Gruppe signifikant höher im Vergleich zur Plazebo-Gruppe (4,40 mg/kg ± 0,49 vs. 2,47 mg/kg ± 0,59, $p = 0,021$). Der Unterschied ist ausgeprägter, wenn nur die Kinder beider Gruppen verglichen werden, die keine Antibiotika erhalten haben (5,92 mg/kg ± 1,46 vs. 2,38 mg/kg ± 0,82, $p = 0,009$). In den Subgruppen der Kinder, die Antibiotika erhalten haben, ist der Unterschied in den mittleren Gesamt-sIgA-Konzentrationen zwischen der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe statistisch nicht signifikant. Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl [61] korreliert nicht signifikant mit den Gesamt-sIgA-Konzentrationen im Stuhl. Es ist jedoch ein positiver Trend erkennbar ($r = 0,344$, $p = 0,08$).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Studie, dass Frühgeborene die enterale Gabe lebender probiotischer Bakterien des Stammes B. lactis Bb12 während der ersten 3 Lebenswochen gut tolerieren und die regelmäßige Verabreichung dieser Bakterien den fäkalen pH-Wert reduziert, die fäkalen Acetat- und Laktatkonzentrationen erhöht, die Produktion von sIgA, der wichtigsten Antikörper im Darm, erhöht und die intestinale Entzündungsaktivität reduziert.

Diese klinische Studie ist gemeinsam mit anderen gut kontrollierten Studien ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer Evidenz-basierten Anwendung von Probiotika bei Frühgeborenen. Weitere Kurz- und Langzeitstudien sind jedoch erforderlich, bevor die Verabreichung von Bifidobacterium lactis Bb12 an Frühgeborene allgemein empfohlen werden kann.

7 Referenzen

1. AGARWAL R, Sharma N, Chaudhry R et al.: *Effects of oral Lactobacillus GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates.* JPGN 2003; 36:397-402
2. AKIYAMA K, Shimada M, Ishizeki S et al.: *Effects of administration of Bifidobacterium in extremely premature infants – development of intestinal microflora by orally administered Bifidobacterium longum in comparison with Bifidobacterium breve.* Acta Neonatologica Japonica 1994; 30:257-63
3. AMATI L, Passeri ME, Selicato F et al.: *New insights into biological and clinical significance of fecal calprotecin in inflammatory bowel disease.* Immunopharmaco Immunotoxicol, 2006; 28(4):665-81
4. AWMF online, Kinderchirurgie: *Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)* (Stand 09/2002, gültig bis 09/2007)
5. BALLABIO C, Bertino E, Coscia A et al.: *Immunglobulin-A profile in breast milk from mothers delivering full term and preterm infants.* Int J Immunopathol Pharmacol 2007; Jan-Mar, 20(1):119-28
6. BERSTAD A, Arslan G, Fobrik G: *Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid.* Scand J Gastroenterol 2000; 35(1):64-9
7. BIN-NUN A, Bromiker R, Wilschanski M et al.: *Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates*. J Pediatr 2005; 147:192-6
8. BOURLIOUX P, Koletzko B, Guarner F et al.: *The intestine and its microflora are partners for the protection of the host* : report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”, held in Paris, June 14, 2002. Am J Clin Nutr 2003; 78:675-83
9. BRANDZAEG P: *Mucosal adaptive immunity: impact of exogenous stimuli and feeding.* Euroconference: Nutrition, Immune Function and Health. Paris, June 9-10, 2005
10. BUNN SK, Bisset WM, Main MJ et al.: F*ecal calprotectin validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 33:14-22
11. CAFFARELLI C, Bernasconi S: P*reventing necrotising enterocolitis with probiotics.* Lancet 2007; 369:1578-79 (Comment)
12. CAMPEOTTO F, Butel MJ, Kalach N et al.: *High feaecal calprotectin concentrations in newborn infants.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2004; 89:F353-55
13. CANANI RB, Rapacciulo L, Romano MT et al.: *Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice.* Digestive and Liver Disease 2004; 36:467-70

14. CARROLL D, Corfield A, Spicer R et al.: *Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis.* Lancet 2003; 361 (9354):310-1
15. CATO EP, Moore WE: *A routine determination of the optically active isomers of lactic acid for bacterial classification.* Can J microbial 1965; 11:319-24
16. CLAUD EC, Walker WA: *Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intenstine can cause neonatal necrotizing enterocolitis.* The FASEB Journal 2001; 15:1398-1403
17. COSTALOS C, Skouteri V, Gounaris A et al.: *Enteral feeding of premature neonates with Saccharomyces boulardii.* Early Hum Dev 2003; 74:89-96
18. DANI C, Biadaioli R, Bertini G et al.: *Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants.* Biol Neonate 2002; 82:103-8
19. DE JONG NS, Leach ST, Day AS: *Fecal S100A12 : a novel non-invasive marker in children with Crohn´s disease.* Inflamm Bowel Dis. 2006; 12(7):566-72
20. DESHPANDE G, Rao S, Patole S: *Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight : a sytematic review of randomised controlled trials.* Lancet 2007; 369:1614-20
21. DIPLOCK AT, Aggett PJ, Ashwell M et al.: *Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document*. British Journal of Nutrition 1999; 81(Suppl 1):1S-27S
22. ESPGHAN Committee on Nutrition. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C et al.: *Probiotic bacteria in dietetic products for infants*: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. Medical Position Paper. JPGN 2004; 38:365-74
23. FAGERHOL MK, Anderson KB, Nars-Andresen CF et al.: Calprotectin (the L1 leucocyte protein). In : Smith VL, Dedman JR, (Hrsg.), *Stimulus response coupling the role of intracellular calcium-binding proteins.* Boca Raton CRC Press, 1990; 187-210
24. FAGERHOL MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet 2000; 356:1783-4
25. FAO/WHO: *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, Cordoba, Argentina 1 - 4 October 2001
26. FAVRE A, Szylit O, Popot F et al.: *Diet, length of gestation and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates.* JPEN 2002; 26(1):51-6
27. FUKUSHIMA Y, Li S-T, Hara H et al.: *Effect of follow-up formula containing Bifidobacteria (NAN BF) on fecal-flora and fecal metabolites in healthy children.* Bioscience Microflora 1997; 16(2):65-72
28. FUKUSHIMA Y, Kawata Y, Hara H et al.: *Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children.* Int J Food Microbiol; 1998; 42:39-44

29. FULLER R: *Probiotics in man and animals.* J Appl Bacteriol 1989; 66 (Suppl):365-78
30. GIBSON GR, Roberfroid MB: *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.* J Nutr 1995;125:1401-12
31. GIBSON GR and Collins MD: Concept of balanced colonic microbiota, probiotics, and synbiotics. In: Hanson, Lars A.; Yolken, Robert H. (Hrsg.) : *Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora.* Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 42. Vevey : Lippincott-Raven Publisher, 1999, 139-56
32. GOMELLA TL: Necrotizing enterocolitis. In : Gomella, Tricia Lacy (ed.) *A LANGE clinical manual, Neonatalogy,* Prentice Hall International Inc, Appleton & Lange, 1992; 372-6
33. HAMMERMAN C, Bin-Nun A, Caplan M: *Germ warfare : probiotics in defence of the premature gut.* Clin Perinatol 2004; 31:489-500
34. HAMMERMAN C, Kaplan M: *Probiotics and neonatal intestinal infections.* Curr Opin Infect Dis 2006; 19(3):277-82
35. HESELMANS M, Reid G, Akkermans LMA et al.: *Gut flora in health and disease: Potential role of Probiotics.* Report of the Workshop on Probiotics 22 - 24 April, 2004, Amsterdam. Curr Issues Intestinal Microbiol. 2005; 6:1 - 8
36. HOLLÄNDER G, Seger RA: Aufbau und Funktionen des Immunsystems. In : Wahn, U; Seger, R; Wahn, V (Hrsg.) *Pädiatrische Allergologie und Immunologie.* Stuttgart : Gustav Fischer, 1994; 3-50
37. HOYOS AB: *Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium infantis to neonates in an intensive care unit.* Int J Infect Dis 1999; 3(4):197-202
38. ISOLAURI E, Sitas Y, Kankaanpää P et al.: *Probiotics : Effect on immunity.* Am J Clin Nutr 2001; 73(2):444-50
39. ISOLAURI E, da Costa Ribeiro H, Gibson G et al.: *Functional foods and probiotics : Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepathology and Nutrition.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 35:S106-9
40. JIANG T, Mustapha A, Savaiano DA: *Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing Bifidobacterium longum.* J Dairy Sci 1996; 79(5):750-7
41. JOSEFSSON S, Bunn SK, Domellof M: *Fecal calprotectin in very low birth weight infants.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44(4):407-13
42. KAILA M, Isolauri E, Soppi E et al.: *Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain.* Pediatr Res 1992; 32:141-4
43. KANDLER O: *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria.* Antonie van Leeuvenhoek 1983; 49(3):209-49

44. KAPEL N, Roman C, Caldari D et al.: *Fecal tumor necrosis factor-α and calprotectin as differential diagnosis markers for severe diarrhea of small infants.* JPGN 2005; 41:396-400
45. KIEN CL, Kepner J, Grotjohn KA et al.: *Efficient assimilation of lactose carbon in premature infants.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1992; 15:253-9
46. KIEN CL: Carbohydrates. In : Tsang R C, Lucas R, Uauy S, Zlotkin A (Hrsg.): *Nutritional Needs of the Preterm Infants: Scientific Basis and Practical Guidelines.* New York : Williams & Wilkins 1993; 47-63
47. KITAJIMA H, Sumida Y, Tanaka R et al.: *Early administration of Bifidobacterium breve to preterm infants: randomised controlled trial.* Arch Dis Child 1997; 76:F101-F107
48. KNOLL J, Scholten P, Kafka C et al.: *Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-ologosaccharides: more like breast-fed infants.* J Pediatr gastroenterol Nutr 2005; 4(1):36-42
49. KRISTINSSON J, Roseth A, Fagerhol MK et al.: *Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma.* Dis Colon Rectum 1998; 41(3):316-21
50. LAFORGIA N, Baldassarre ME, Pontrelli G et al.: *Calprotectin levels in meconium*. Acta Paediatr 2003; 92:463-6
51. LILLY DM, Stillwell RH: *Probiotics: growth promotion factors produced by microorganisms.* Science 1965; 147:747-8
52. LIN H-C, Su B-H, Chen A-C et al.: *Oral Probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants.* Pediatrics 2005; 115(1):1-4
53. LU L, Walker AW: *Pathologic and physiologic interaction of bacteria with the gastrointestinal epithelium.* Am J Clin Nutr 2001; 73(6):1124S-30S
54. LUCAS A, Cole TJ: *Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis.* Lancet 1990; 336:1519-23
55. MACKIE R, Sghir A, Gaskins HR: *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.* Am J Clin Nutr 1999; 69:135S-45S
56. MAGNE E, Suau A, Pochart P et al.: *Fecal microbial community in preterm infants.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 41:386-92
57. MANZONI P, Mostert M, Leonessa ML et al.: *Oral supplementation with Lactobacillus casei subspecies rhamnosus Prevents Enteric Colonisation by Candida Species in Preterm Neonates: A randomized Study.* Clin Infect Dis 2006; 42:1735-42
58. METSCHNIKOFF I: *Beiträge zu einer optimistischen Weltauffassung.* München : J. F. Lehmanns Verlag, 1908
59. MIHATSCH WA, Vossbeck S, Franz AR et al.: *Einfluss von Bifidobacterium lactis auf die Inzidenz nosokomialer Infektionen bei Frühgeborenen.* Z Geburtsh Neonatol 2004; 208 (Suppl 1):149 (Abstract)

60. MILLAR MR, Bacon C, Smith SL et al.: *Enteral feeding of premature infants with Lactobacillus GG.* Arch Dis Child 1993; 69:483-7

61. MOHAN R, Koebnick C, Schildt J et al.: *Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study.* J Clin Microbiol 2006; 44:4025-31

62. MORTENSEN PB, Hove H, Clausen MR et al.: *Fermentation to short-chain fatty acids and lactate in human faecal batch cultures. Intra- and inter-individual variations versus variations caused by changes in fermented saccharides.* Scand Gastroenterol 1991; 26(12):1285-94

63. NISSEN AC, van Gils CE, Menheere PP et al.: *Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38(1):107-8

64. OGAVA K, Pons S, de Paola MI et al.: *Volatile fatty acids, lactic acid, and pH in the stools of breast fed and bottle fed infants.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1992; 15:248-52

65. OLAFSDOTTIR E, Aksnes L, Fluge G et al.: *Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children.* Acta Paediatr 2002; 91:45-50

66. ORRHAGE K, Nord CE: *Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants.* Acta Paediatr Suppl 1999; 430:47-57

67. OUWEHAND A, Isolauri E, Salminen S: *The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood.* Eur Nutr 2002; 41(suppl. 1):I/32-7

68. PANIGRAPHI P: *Necrotizing enterocolitis: a practical guide to its prevention and management.* Paediatr Drugs 2006; 8(3):151-65

69. PENDERS J, Thijs C, Vink C et al.: *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy.* Pediatrics 2006; 118:511-21

70. PRIEBE MG, Vonk RJ, Sun X et al.: *The physiology of colonic metabolism. Possibilities or interventions with Pre- and Probiotics.* Eur J Nutr 2002; 41(Suppl 1):2-10

71. REUMAN PD, Duckworth TH, Smith KL et al.: *Lack of effect of lactobacillus on gastrointestinal bacterial colonization in premature infants.* Pediatr Infect Dis J 1986; 5:663-8

72. ROBERT KOCH INSTITUT. *Epidemiologisches Bulletin.* Aktuelle Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS): NEO-KISS: Surveillance nosokomialer Infektionen auf Frühgeborenen-Intensivstationen 2004; Nr. 48

73. RUGTVEIT J, Fagerhol MK: *Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 34:323-4

74. SAAVEDRA JM, Bauman NA, Perman JA et al.: *Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus.* Lancet 1994; 344:146-9

75. SALMINEN S, Isolauri E, Salminen E: *Clinical uses of Probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges.* Antonie van Leeuwenhoek 1996; 70:347-58

76. SCHANLER RJ, Goldblum RM, Garza C et al.: *Enhanced excretion of selected immune factors in very low birth weight infants fed fortified human milk.* Pediatric Research 1986; 20:711-5

77. SCHANLER RJ, Shulman RJ, Lau C: *Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula.* Pediatrics 1999; 103:1150-7

78. SCHANLER RJ: *Probiotic and necrotising enterocolitis in premature infants.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2006; 91(6):F395-97

79. SCHIFFRIN E J, Donnet-Highes AD: Education of the mucosal immune system: The role of breast milk during bacterial colonisation of the neonatal intestine. In : Mengheri E, Roselli M, Britti MS et al. (Hrsg.) *Nutrition and Immunity*. Research Signpost, Kerala India 2006; ISBN 81-7736-251-8; 39-51

80. SCHWIERTZ A, Gruhl B, Löbnitz M et al.: *Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants.* Pediatr Res 2003; 54:393-9

81. SIIGUR U, Tamm E, Torm S et al.: *Effect of bacterial infection and administration of a probiotic on feaecal short-chain fatty acids.* Microbial Ecology in Health and Disease 1996; 9:271-7

82. SPEER CP: Intestinale Krankheiten. In : Lentze MJ, Schaub J, Schulte EJ, Spranger J (Hrsg.), *Pädiatrie.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2001; 422-3

83. STANSBRIDGE EM, Walker V, Hall MA et al.: *Effects of feeding premature infants with Lactobacillus GG on gut fermentation.* Arch Dis Child 1993; 69:488-92

84. TANNOCK G: Microecology of Lactobacilli and Bifidobacteria inhabiting the digestive tract: essential knowledege for successfull probiotic reasearch. In: Hanson; Lars A. and Yolken, Robert H. (Hrsg.) *Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora.* Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 42. Nestec Ltd., Vevey : Lippincott-Raven Publisher 1999; 17-31

85. TIBBLE JA, Teahon K, Thjodleifsson B et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn´s disease.* Gut 2000; 47:506-13

86. TISSIER MH: *La réaction chromophile d´Escherich et bactrium coli.* CR. Soc Biol 1899; 51:943-5

87. TISSIER MH: *Traitment des infectione intestinales par la methode de transformation de la flora bactérienne de l´intestin.* CR. Soc Biol 1906; 60:359-61

88. UHLEMANN M, Heine W, Mohr C et al.: *Wirkungen oral verabreichter Bifidobakterien auf die intestinale Mikroflora von Früh- und Neugeborenen.* Z Geburtsh Neonatol 1999; 203:213-7

89. UAUY RD, Fanaroff AA, Korones SB et al.: *Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clincal correlates.* J Pediatr 1991; 119 (4):630-8

90. VAN DER WAAIJ D: Microbial Ecology of the Intestinal Microflora: Influence of Interaction with the Host Organism. In : Hanson Lars A and Yolken Robert H (Hrsg.) *Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora* Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 42. Nestec Ltd., Vevey : Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia 1999; 1-31

91. WALKER WA: *Gastrointestinal host defence: importance of gut closure in control of macromolecular transport.* Ciba Found Symp. 1979; Jan 16 - 18; (70):201-19

92. WALKER V, Mills GA, Hall MA et al.: *Carbohydrate fermentation by gut microflora in preterm neonates.* Arch Dis Child 1989; 64:1367-73

93. WEAVER LT, Laker MF, Nelson R: *Intestinal permeability in the newborn.* Arch Dis Child 1984; 59:236-41

94. WESTERBEEK EAM, van den Berg A, Lafeber HN et al.: *The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature.* Clin Nutr 2006; 25:361-8

95. WOLD AE, Adlerberth I: *Does breastfeeding affect infant´s immune responsiveness?* Acta Paediatr 1998; 87:19-22

96. YASUI H, Nagaoka N, Mike A et al.: *Detection of Bifidobacterium strains that induce large quantities of IgA.* Microb Ecol Health Dis 1992; 5:155-62

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Grober Überblick über die Einzelwerte der klinischen Scorewerte 25
Abb.2 Mittelwertverlauf des klinischen Scores 26
Abb. 3 Einzelverläufe des Körpergewichts 28
Abb. 4 Geburtsgewicht in der B. lactis- (A) und in der Plazebo-Gruppe (B).....29
Abb. 5 Tag an dem das Geburtsgewicht nachhaltig wieder erreicht wurde.....30
Abb. 6 Mittelwertverlauf des Körpergewichts 30
Abb. 7 Körpergewicht am 21. Lebenstag in der B. lactis- und Plazebo-Gruppe.....31
Abb. 8 Körpergewicht am 21. Lebenstag in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht und von B. lactis- oder Plazebo-Gabe 32
Abb. 9 Anzahl der Tage mit Antibiotikagabe 33
Abb. 10 Prognostiziertes und aktuelles Körpergewicht (g) am 21. Lebenstag bei Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten 33
Abb. 11 Einzelverläufe des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag) von Geburt bis zum 21. Lebenstag.....34
Abb. 12 Mittelwertverlauf des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag).....35
Abb. 13 Medianer Verlauf des enteralen Nahrungsvolumens (ml/Tag).....36
Abb. 14 Vergleich des gesamten enteralen Nahrungsvolumens (ml) bis Tag 21, B. lactis- (A), Plazebo-Gruppe (B) 36
Abb. 15 Durchschnittlicher pH-Wert der Stühle der Frühgeborenen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe: während der gesamten 3-wöchigen Interventionsperiode. 38
Abb. 16 Mittelwert der fäkalen Gesamt-SCFA-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe 39
Abb. 17 Mittelwert der fäkalen Acetat-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe, A) in jeder der 3 Interventionswochen, B) in der Interventionsperiode insgesamt bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen mit und ohne Antibiotika. 41
Abb. 18 Mittlere fäkale Laktatkonzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe, A) in jeder der 3 Interventionswochen, B) über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten 42

Abb. 19 Mittlere fäkale Gesamt-sIgA-Konzentrationen in den 3 Interventionswochen in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe, A) in jeder der 3 Intervenionswochen, B) über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten.....44

Abb. 20 Mittlere fäkale Calpropectinkonzentrationen über die gesamte 3-wöchige Interventionsperiode bei allen Frühgeborenen der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe und bei den Frühgeborenen, die Antibiotika erhielten und denen, die keine Antibiotika erhielten 45

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Dosierung des Studienpräparates und Dosis B. lactis Bb12.....16
Tab. 2 Vergleich der Randomisierungs-Parameter in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe.....21
Tab. 3 Drop-outs in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) mit Geburtsgewicht, Zeitpunkt und Grund für das Ausscheiden vor Ende der 21-tägigen Interventionsperiode. 22
Tab. 4 Mittelwerte und Mediane der klinischen Scorewerte in der B. lactis- und in der Plazebo-Gruppe innerhalb der ersten 24 Lebensstunden und den ersten 3 Lebenswochen.....27
Tab. 5 Applikation von Antibiotika in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) innerhalb der ersten 24 Lebensstunden.....32
Tab. 6 Mittelwerte der fäkalen Gesamt-SCFA- Konzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe in der 1., 2. und 3. Woche ...39
Tab. 7 Mittelwerte der fäkalen Acetat-Konzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe in der 1., 2. und 3. Woche.....40
Tab. 8 Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Acetat-Konzentrationen insgesamt bei allen Kindern der B. lactis- und der Plazebo-Gruppe und bei Kindern mit und ohne Applikation von Antibiotika 40
Tab. 9 Mittelwerte der fäkalen Laktatkonzentrationen und Standardfehler in der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) in der 1., 2. und 3. Woche 41
Tab. 10 Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Laktatkonzentrationen insgesamt bei allen Kindern der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) und bei Kindern mit und ohne Applikation von Antibiotika 42
Tab. 11 Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Gesamt-IgA-Konzentrationen der B. lactis- (A) und der Plazebo-Gruppe (B) in Woche 1, 2 und 3 43
Tab. 12 Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen sIgA-Konzentrationen im Gesamtzeitraum bei Kindern der B. lactis- (A) und Plazebo-Gruppe (B) insgesamt und mit und ohne Applikation von Antibiotika 43
Tab. 13 Mittelwerte und Standardfehler der fäkalen Calprotectin-Konzentrationen im Gesamtzeitraum bei Kindern der B. lactis- (A) und Plazebo-Gruppe (B) insgesamt und mit und ohne Applikation von Antibiotika 45

Zusammensetzung von FM 2000

Hauptnährstoffe:

Protein	23,3	g / 100 g
Fett	0,1	g / 100 g
Laktose	1,5	g / 100 g

Mineralstoffe und Spurenelemente:

Natrium	465	mg / 100 g
Kalium	977	mg / 100 g
Calcium	1744	mg / 100 g
Magnesium	23	mg / 100 g
Phosphor	1047	mg / 100 g
Chlorid	400	mg / 100 g
Ca/P	1,7	
Zink	7	mg / 100 g
Kupfer	0,24	mg / 100 g
Jod	350	µg / 100 g

Vitamine:

Vitamin A	4700	IU / 100 g
Vitamin E	23	IU / 100 g
Vitamin K1	47	µg / 100 g
Ascorbinsäure	230	mg / 100 g
Vitamin B1	0,47	mg / 100 g
Vitamin B2	1,2	mg / 100 g
Vitamin B6	0,7	mg / 100 g
Folsäure	470	µg / 100 g

Osmolarität:

(4,3 g in 100 ml Wasser)	92	mOsm / l

Klinischer Score

Allgemeinzustand:	***Hautkolorit***	**0** Petechien/Hautblutungen **1** Gräulich/Marmoriert **2** Blässe/Akrozyanose **3** Rosig
	Peripherie (Hand)	**0** Kühl **1** Warm
	Muskeltonus	**0** Opisthotonus/Strecktendenz **1** Vorwiegend Hypotonie **2** Beugetonus
	Spontan-Atmung	**0** Einziehungen **1** Tachypnoe **2** Apnoen **3** Unauffällig
	Herzfrequenz in Ruhe	**1** < 100 oder > 180/min **2** 100 – 180/min
Beatmung/Atem-unterstützung		**0** Beatmung/instabil **1** Beatmung/stabil **2** CPAP **3** Sauerstoffapplikation **4** Keine
Tropf		**0** Vollparenteral **1** Teilparenteral **2** Gastrale Ernährung
Antibiotika		**0** Ja **1** Nein
Katecholamine		**0** Ja **1** Nein
Zentraler Katheter		**0** Ja **1** Nein
Harnblasenkatheter		**0** Ja **1** Nein

Gesamt: 21 Punkte

21 = gesund
0 = schwer krank

Definition: Unerwünschtes Ereignis

Als unerwünschtes Ereignis gilt jedes Ereignis (Erkrankung, Anzeichen oder Symptom), das während der Studiendauer auftritt oder sich verschlimmert. Der Ausdruck „unerwünschtes Ereignis“ ist als weiter Begriff aufzufassen, der keine Kausalität zwischen dem eintretenden Ereignis und der Prüfsubstanz beinhalten muss.

Bei Auftreten eines unerwünschten Ereignisses – gleichgültig, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen diesem Ereignis und der verabreichten Studienmedikation vermutet wird oder nicht – muss das Frühgeborene in jedem Fall so lange beobachtet werden, bis die Symptome abgeklungen und abnormale Laborwerte auf die Vorwerte zurückgegangen sind, oder bis es eine plausible Erklärung für die beobachteten Veränderungen gibt oder bis zum Tod. Alle unerwünschten Ereignisse sind im Dokumentationsbogen (auf den Formblättern „schwerwiegende unerwünschte Ereignisse“, „geringfügige unerwünschte Ereignisse“) sowie in der betreffenden Krankenakte zu dokumentieren.

Zu unterscheiden sind grundsätzlich zwei Kategorien unerwünschter Ereignisse, nämlich „schwerwiegende“ und „geringfügige“ unerwünschte Ereignisse. Diese Unterscheidung bestimmt das weitere Vorgehen bezüglich der Meldung/Dokumentation des betreffenden Ereignisses (siehe unten).

Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse

Ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis ist ein unerwünschtes Ereignis, das tödlich oder lebensbedrohlich ist, das eine andauernde oder starke Schädigung verursacht, eine stationäre Behandlung erfordert oder verlängert. Außerdem jedes Ereignis, das als signifikante Gefährdung bewertet wird (d.h. jedes Ereignis, dem medizinische Relevanz zugeordnet wird und dem, unter besonderer Berücksichtigung des Gesamtzusammenhanges der vorliegenden Studien, besondere Bedeutung zukommt).

Folgende unerwünschte Ereignisse gelten als in hohem Maße mit der Frühgeburtlichkeit assoziiert und unterliegen deshalb nicht den Dokumentationsanforderungen für schwerwiegende unerwünschte Ereignisse:

- Periventrikuläre-intraventikuläre Hirnblutungen
- bronchopulmuonale Dysplasie
- persistierender Ductus Arteriosus
- Retinopathia Praematurorum
- Laborwertschwankungen
- Indikation zur Beatmung und damit verbundene Komplikationen, wie z.B. Pneumothorax, pulmonale Infekte.

Folgende Ereignisse werden einmal pro Woche im Prüfbogen abgefragt und dokumentiert, sie unterliegen deshalb nicht den Dokumentationsanforderungen für schwerwiegende unerwünschte Ereignisse:

- Bakterielle Infektionen
- Rotavirusinfektionen
- NEC.

Wenn jedoch eines dieser Ereignisse zum Tode des Frühgeborenen führt, so muss dieses Ereignis wie ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis behandelt und dokumentiert werden.

Alle anderen Ereignisse, die die Kriterien eines schwerwiegenden unerwünschten Ereignisses erfüllen, müssen innerhalb von 48 Stunden oder spätestens am folgenden Werktag per Fax der Projektleitung und dem Studienmonitor gemeldet werden. Sie müssen außerdem am Ende des Prüfbogens dokumentiert werden. Für die Meldung spielt es keine Rolle, ob ein Zusammenhang mit der Studiensubstanz besteht oder nicht. Bitte kontaktieren Sie die folgenden Personen:

Dipl. med. Mike Poßner

Tel.: 069 - 66714946

Fax: 069 - 66714723

Geringfügige unerwünschte Ereignisse

Unerwünschte Ereignisse, die sich nicht einer der obengenannten Kategorien zuordnen lassen, gelten als geringfügig. Die Komplexität des Zustands der Frühgeburtlichkeit lässt neben klinisch relevanten unerwünschten Ereignissen auch viele klinisch nicht relevante unerwünschte Ereignisse zu. Um die Durchführbarkeit der Meldungen unerwünschter Ereignisse praktikabel zu gestalten, sollen nur klinisch relevante, geringfügige unerwünschte Ereignisse gemeldet werden, wenn ein Zusammenhang mit der Prüfsubstanz vermutet wird. Jedes unerwünschte Ereignis, das zum Tod des Patienten führt, muss als schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis behandelt und dokumentiert werden (s.o.).

Geringfügige unerwünschte Ereignisse müssen bei jeder Untersuchung im Prüfbogen notiert und als leicht, mittelstark oder stark klassifiziert werden, und zwar ausschließlich auf der Basis medizinischer Kriterien.

Der Studienleiter wird aufgefordert, geringfügige unerwünschte Ereignisse nach folgenden Punkten zu erfassen: Datum, Schweregrad, Häufigkeit, Dauer, Einschätzung des Arztes, inwiefern dieses Ereignis abhängig von der Studie ist, Maßnahmen/ Ergebnis, Erfolg und eventuelle Schäden. Genaue Bögen zur Erfassung dieser Daten werden dem Studiendesign beigelegt.

Der **Schweregrad** der unerwünschten Ereignisse wird wie folgt charakterisiert:

- Leichte Ereignisse:
  Ereignisse, die im allgemeinen von kurzer Dauer sind, keine spezielle Behandlung erfordern und keinerlei Einfluss auf den klinischen Zustand des Patienten haben.
- Mittelstarke Ereignisse:
  Ereignisse, die im allgemeinen leichte Unannehmlichkeiten oder geringfügige Probleme für den Patienten mit sich bringen und Einfluss auf den klinischen Zustand des Patienten haben können, aber in der Regel durch einfache therapeutische Maßnahmen verbessert werden können.
- Schwere Ereignisse:
  Ereignisse, die den klinischen Zustand des Patienten beeinträchtigen und in der Regel eine allgemeine medikamentöse Behandlung oder eine andere Therapie erfordern.

Der mögliche Zusammenhang zwischen Studienpräparat und unerwünschtem Ereignis (Kausalität) wird vom Prüfarzt anhand folgender Kriterien eingeschätzt:

- es existiert ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Ereignis und Verwendung des Studienpräparates
- eine Wiedereinführung des Studienpräparates führt zum Wiederauftreten der Reaktion
- vorausgegangene Fütterungen mit dem Studienpräparat führten zu ähnlichen Reaktionen
- das Ereignis steht in keinem Zusammenhang zu anderen Bedingungen, Maßnahmen oder Umweltfaktoren

Die kausale Verknüpfung des unerwünschten Ereignisses mit dem Studienpräparat wird anschließend folgendermaßen bestimmt:

- ohne: es existiert kein Zusammenhang zwischen Ereignis und Studienpräparat
- schwach: weniger als 2 der vier genannten Kriterien treffen zu
- möglich: mindestens 2 der vier genannten Kriterien treffen zu
- wahrscheinlich: mindestens 3 der vier genannten Kriterien treffen zu
- sicher: das Studienpräparat hat das Ereignis sicher ausgelöst

Falls weitere Untersuchungen, zur Einschätzung einer möglichen kausalen Verknüpfung von Studienpräparat und unerwünschtem Ereignis, notwendig sind, werden alle Untersuchungen und Laboranalysen mit ihren Ergebnissen mit Hilfe der Prüfbögen dokumentiert.

Elternbrief

Studie zur interventionellen Primärbesiedlung des Gastroenterons Frühgeborener mit *Bifidobacterium bifidum*, Stamm Bb12

Liebe Eltern,

Herzlichen Glückwunsch zur Geburt Ihres Kindes. Es ist viel zu früh auf die Welt gekommen und braucht in den ersten Stunden und Tagen eine schonende Pflege und Behandlung.

Unser wesentliches Ziel ist es zu verhindern, dass Ihr Kind im weiteren Verlauf noch Krankheiten erleidet, die sich wegen seiner Unreife in Folge zu früher Geburt leider einstellen können. Frühgeborene haben ein hohes Risiko an Infektionen zu erkranken, weil ihnen noch ausreichende Abwehrkräfte fehlen, um diese Infektionen zu bekämpfen.

Viele Infektionen nehmen ihren Ausgang im Darm frühgeborener Kinder, der häufig durch krankmachende Bakterien in großer Zahl besiedelt wird. Dies liegt daran, dass Frühgeborene oft durch eine Operation (Kaiserschnitt) zur Welt kommen, intensivmedizinisch behandelt werden müssen und eben leider nicht gestillt oder evtl. sogar überhaupt nicht über den Magen-Darm-Kanal ernährt werden können.

Wir möchten dafür Sorge tragen, dass es gar nicht erst zur Besiedlung des Darms Ihres Kindes mit krankmachenden Bakterien kommt. Im Rahmen einer Untersuchungsreihe wollen wir herausfinden, ob sich durch die Gabe von nicht krankmachenden Bifidusbakterien schwerwiegende Infektionen vorbeugen lassen. Bifidusbakterien findet man im Darm gesunder gestillter Neugeborener in großer Zahl. Dort verhindern sie die Ansiedlung von gefährlichen Krankheitserregern und schützen so vor Infektionen. Die eingesetzten Bifidusbakterien werden normalerweise in fermentierten Milchen oder Säuglingsmilchnahrungen eingesetzt und mit diesen verzehrt.

Wir möchten Ihrem Kind vom ersten Lebenstag an für die Dauer von 3 Wochen Bifidusbakterien geben. Meistens erfolgt dies durch eine Sonde direkt in den Magen. Die Untersuchung ist Plazebo-kontrolliert, d.h. ein Teil der Frühgeborenen bekommt die

Bifidusbakterien, ein anderer Teil bekommt eine Zuckerlösung ohne Bifidusbakterien. Ob Ihr Kind der einen oder anderen Gruppe zugeordnet wird, wissen wir selbst nicht. Die Zuordnung erfolgt unabhängig von unserem Einfluss. Man nennt dieses Verfahren Randomisieren.

Die sonst notwendige Behandlung ändert sich durch die Teilnahme an der Studie nicht. Ihr Kind ist keinerlei durch die Studie verursachten Belastungen ausgesetzt. Wir untersuchen lediglich den in der Windel befindlichen Stuhl. Alle anderen diagnostischen und Behandlungsmaßnahmen verlaufen völlig unabhängig von der vorgesehenen Untersuchung.

Den genauen Ablauf erklären Ihnen gern Frau Dr. Rinne, Herr Dr. Schildt, Herr Dr. König oder Herr Oberarzt Müller.

Die Studie wird in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Bergholz-Rehbrücke (Prof. Dr. M. Blaut) durchgeführt.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes, zurückziehen.

Wir würden uns sehr freuen, wenn Sie einer Teilnahme Ihres Kindes an der Untersuchung zustimmen würden.

Wir bedanken uns ganz herzlich für Ihre Mitarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Mike Poßner
Geboren:	08. Juni 1963 in Neustadt/Orla
Familienstand:	verheiratet, 3 Kinder

Schulausbildung:

1970 – 1978	Allgemeinbildende Oberschule (POS) in Neunhofen
1978 – 1981	Erweiterte Oberschule (EOS/Gymnasium) in Pößneck
1981 – 1982	Fortsetzung der Erweiterten Oberschule an der ABF in Halle / Saale
1982	Abitur (Note 1,6)

Studium:

1982 – 1988	Studium der Humanmedizin am I. Medizinischen Institut in Leningrad, abgeschlossen mit Staatsexamen und Diplom
1988 – 1990	begonnene Facharztausbildung Pädiatrie an der Universitäts-kinderklinik Jena

Beruflicher Werdegang:

1988 – 1990	**Universitätskinderklinik in Jena** Assistenzarzt
1990 – 2000	**Nestlé Nutrition GmbH** Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Außendienst
ab 2000	**Nestlé Nutrition GmbH** Leiter der Wissenschaftlichen Fachberatung

Publikationen:

Journal of Clinical Microbiology, 2006; 44:4025-31

Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind placebo controlled randomized study

Ruchika Mohan, Corinna Koebnick, Janko Schildt, Sabine Schmidt, Manfred Mueller, Mike Poßner, Michael Radke, Michael Blaut

Kinderkrankenschwester, 26.Jg. Nr.5, 2007

Das Leben zwischen Toleranz und Allergie

Mike Poßner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorgelegte Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. habil. Radke, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu betreuen, der die Konzeptidee mit seiner klinischen Erfahrung möglich gemacht und die Fertigstellung der Arbeit engagiert unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich vielmals bei den Ärzten und Kinderkrankenschwestern der Neugeborenen- und Intensivstation der Kinderklinik am Klinikum Ernst von Bergmann in Potsdam für den sorgsamen Umgang mit den Frühgeborenen und das gewissenhafte Ausfüllen der Studienprotokolle.

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Ruchika Mohan vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung für die Durchführung der Stuhlanalytik. Für die Beratung und Unterstützung bei den statistischen Fragestellungen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Koch.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die Geduld und das Verständnis für die wenige Zeit während der Fertigstellung der Arbeit.

Widmen möchte ich die Arbeit meinen Eltern, die mir unter schwierigen Umständen das Studium der Humanmedizin damals ermöglicht haben.

Universität Rostock
Medizinische Fakultät

Thesen
zur Dissertation

Der Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die Gewichtsentwicklung und Kolonfermentation sowie die Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut Frühgeborener

-

Auswertung einer prospektiven, randomisierten und Plazebo-kontrollierten, klinischen Doppelblindstudie

vorgelegt von

Mike Poßner

2007

1. Das Darm-assoziierte Immunsystem (GALT) ist das größte Teilimmunsystem des menschlichen Körpers. Bei Geburt ist das Darm-Immunsystem noch unreif. Bei vaginal geborenen, gesunden, reifen und voll gestillten Neugeborenen kommt es zu einer „gesunden“ Darmbesiedlung mit Prädominanz der Bifidusbakterien, die die Reifung des GALT fördert. Die Darmflora beeinflusst die Physiologie der Darmschleimhaut, ihre Barrierefunktion und die Immun- und Entzündungsantworten.

2. Auf Grund der Störung der normalen bakteriellen Darmbesiedlung ist bei Frühgeborenen das Risiko für die Ansiedlung potentiell pathogener Keime und die Translokation von Bakterien durch die Darmschleimhaut erhöht. Damit wächst die Gefahr für vom Gastroenteron ausgehende Infektionen, die wegen der Unreife des Immunsystems und der enteralen Mukosabarriere häufig besonders schwer verlaufen und oft zu Sepsis führen. Die gestörte bakterielle Darmbesiedlung gilt zudem als ein wesentlicher Faktor für das erhöhte Risiko Frühgeborener, an einer nekrotisierenden Enterokolitis zu erkranken.

3. Die Erkenntnis, dass bestimmte probiotische Bakterien die Mukosabarriere des Darms stärken und die Reifung seines Immunsystems stimulieren, legt den Gedanken nahe, bei Frühgeborenen Probiotika präventiv einzusetzen. Ziel dieser Arbeit war es, die Verträglichkeit und den Einfluss des probiotischen Stammes Bifidobacterium lactis Bb12 auf die Gewichtsentwicklung, die klinischen Scorewerte sowie auf die Fermentation im Kolon und die Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut bei Frühgeborenen zu prüfen. Die Auswahl eines geeigneten probiotischen Bakterienstammes war ein ganz wesentlicher Aspekt bei der Studienplanung. Die Entscheidung, den Stamm Bifidobacterium lactis Bb12 auszuwählen, beruht in erster Linie darauf, dass dieser Stamm zu den wenigen probiotischen Stämmen mit vollständig entschlüsselter DNS-Sequenz seines Genoms gehört. Die gute Charakterisierung des Stammes und seine in klinischen Studien gezeigte gute Verträglichkeit bei älteren Säuglingen und Kleinkindern sowie die beschriebenen positiven Wirkungen auf die Schleimhautimmunität ließen ihn für das Studienvorhaben als geeignet erscheinen. Die klinische Studie wurde als prospektive, randomisierte, Plazebo-kontrollierte Doppelblindstudie angelegt.

4. Als Probanden kamen alle Frühgeborenen in Frage, die zwischen August 2003 und Juli 2005 vom ersten Lebenstag an auf der Neugeborenenintensivstation im Klinikum Ernst von Bergmann in Potsdam behandelt wurden. Voraussetzungen für die Aufnahme der Frühgeborenen in die Studie war ein Gestationsalter < 37 und > 26 Wochen, die schriftliche Einverständniserklärung der Eltern sowie das Fehlen von zuvor festgelegten folgenden Ausschlusskriterien: angeborene Fehlbildungen des Magen-Darm-Trakts, Chromosomenaberrationen, HIV-Infektion der Mutter. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

5. 69 Probanden, die alle gewünschten Kriterien erfüllten, wurden randomisiert. 37 Frühgeborene wurden der B. lactis- und 32 der Plazebo-Gruppe zugeordnet. Die Kinder der B. lactis-Gruppe erhielten zusätzlich zur Nahrung zweimal täglich das Studienpräparat FM 2000 (Muttermilchverstärker) mit B. lactis Bb12, die Kinder der Plazebo-Gruppe erhielten stattdessen FM 2000 ohne B. lactis Bb12. Die beiden Studienpräparate waren weder als Pulver noch in gelöster Form voneinander zu unterscheiden. Die erste Applikation erfolgte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden. Die verabreichte Gesamtdosis B. lactis Bb12 wurde von $1,6 \times 10^9$ Bakterien am ersten Tag schrittweise bis auf $4,8 \times 10^9$ Bakterien am 4. Tag gesteigert und in dieser Dosis bis zum 21. Lebenstag verabreicht.

6. In einem für diese Studie entwickelten Studienprotokoll wurden alle für die Endpunkte relevanten klinischen Daten der Mütter und der Kinder erfasst. Von den Frühgeborenen wurden täglich Gewicht und enterales Nahrungsvolumen protokolliert und die Applikation von Antibiotika sowie unerwünschte Ereignisse und die Drop-outs dokumentiert. Zweimal wöchentlich wurden die klinischen Scorewerte als Maß für den klinischen Gesamtzustand ermittelt. Pro Woche wurden 2 Stuhlproben gesammelt, um den pH-Wert und die Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (Gesamt-SCFA, Acetat, Laktat) sowie von sIgA und Calprotectin zu bestimmen.

7. Die Auswertung der Randomisierungsparameter zeigt, dass die beiden Gruppen gut vergleichbar sind. Die klinischen Scorewerte der Kinder nehmen im Verlauf im Mittel kontinuierlich zu. Weder im parametrischen noch im verteilungsfreien Test ist zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied der Scoreentwicklung erkennbar. 46 (66,7 %) der 69 Frühgeborenen erhielten im Verlauf der Studienperiode für 2 oder mehr Tage Antibiotika. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant. Auch die Dauer der Antibiotika-Gabe mit insgesamt 5,5 Tagen im Mittel bei den Kindern der B. lactis-Gruppe und 5,3 Tagen bei den Kindern der Plazebo-Gruppe ist gut vergleichbar. Bis zum 3. (B.

lactis-Gruppe) bzw. 4. Lebenstag (Plazebo-Gruppe) fällt das Körpergewicht im Mittel um knapp 50 g unter das Geburtsgewicht. Danach steigt das Gewicht im Mittel stetig an, wobei die tägliche Zunahme des Körpergewichts von durchschnittlich 27 g ab etwa dem 5. Lebenstag annähernd linear ist. Das tolerierte enterale Nahrungsvolumen steigt bis etwa zum 9. Lebenstag im Mittel steil an. Ab dem 10. Lebenstag ist der weitere Anstieg im Mittel annähernd linear, aber deutlich flacher. Die Verläufe von Gewicht und enteralem Nahrungsvolumen sind insgesamt in beiden Gruppen jeweils weitgehend parallel. In beiden Gruppen ist die Gabe von Antibiotika mit einer geringeren Gewichtszunahme verbunden.

8. Die Ergebnisse unserer Studie[1] über den Einfluss von Bifidobacterium lactis Bb12 auf die Stuhlflora der Frühgeborenen sind bereits publiziert. Über die Wirkung von B. lactis Bb12 auf die bakterielle Fermentation im Darm und die Immunität und Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut liegen bisher keine Berichte in der Literatur vor. Die Konzentrationen und Profile der fäkalen kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) können Aufschluss über die bakterielle Fermentation und somit über die mikrobielle Stoffwechselaktivität im Darm geben. Die fäkale sIgA-Konzentration ist ein geeigneter Marker für die lokale Darmwandimmunität und Calprotectin ist ein non-invasiver, unspezifischer Marker für Entzündungsprozesse in der Darmschleimhaut.

9. Der durchschnittliche fäkale pH-Wert während der gesamten 3-wöchigen Interventionsperiode ist bei den Frühgeborenen der B. lactis-Gruppe signifikant niedriger als bei den Frühgeborenen der Plazebo-Gruppe (5,68 ± 0,10 vs. 6,38 ± 0,10, p = 0,001). Die fäkale Laktatkonzentration steigt in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter an. In allen 3 Interventionswochen ist jedoch der Unterschied der Mittelwerte zwischen der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe signifikant (p: 0,001; 0,007; 0,048). Die durchschnittliche Laktatkonzentration über die gesamte Interventionsperiode ist in der B. lactis-Gruppe signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe (11,43 ± 1,37 vs. 7,06 ± 1,14 mmol/g Stuhl, p = 0,011). Die Applikation von Antibiotika hatte in beiden Gruppen keine unterschiedlichen Einflüsse auf die fäkalen Laktatkonzentrationen.

10. Der Mittelwert der Gesamt-SCFA-Konzentrationen im Stuhl stieg von der ersten bis zur dritten Interventionswoche in der B. lactis-Gruppe von 20,25 ± 2,11 auf 47,60 ± 3,30 µmol/g Stuhl und in der Plazebo-Gruppe von 18,64 ± 2,57 auf 27,15

[1] Mohan R, Koebnick, C Schildt J et al.: Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. J Clin Microbiol 2006; 44:4025-31

± 2,34 µmol/g Stuhl an. Der Unterschied zwischen den Gruppen war in der zweiten und dritten Studienwoche signifikant ($p = 0,013$ bzw. $p < 0,001$). Die Acetatkonzentrationen, die ca. 90 % der molaren Konzentrationen der Gesamt-SCFA in beiden Gruppen ausmachen, stiegen dementsprechend in der B. lactis-Gruppe ebenfalls innerhalb der 3 Interventionswochen von 18,23 ± 1,60 auf 43,35 ± 2,78 µmol/g Stuhl und in der Plazebo-Gruppe von 15,61 ± 1,96 auf 24,18 ± 1,65 µmol/g Stuhl an. Die mittlere Acetatkonzentration der B. lactis-Gruppe im Stuhl betrug im Gesamtzeitraum 33,50 ± 2,07 µmol/g Stuhl, die der Plazebo-Gruppe 19,32 ± 1,25 µmol/g Stuhl. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist hoch signifikant ($p = 0,001$). Das ist sogar bei den Subgruppen, die Antibiotika erhalten haben, der Fall (33,88 ± 3,96 vs. 17,82 ± 2,5 µmol/g Stuhl). Das geometrische Mittel der molaren Anteile des SCFA-Profils über die Gesamtzeit ist in beiden Gruppen ähnlich (C2:C3:C4:C5: B. lactis-Gruppe: 90:4:3,2:2, Plazebo-Gruppe: 89,3:5:3:2).

11. Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl korrelierte signifikant mit den Laktat- ($r = 0,336$, $p = 0,010$) und den Acetatkonzentrationen ($r = 0,243$, $p = 0,05$). Die Ergebnisse zeigen, dass Bifidobacterium lactis Bb12 die bakterielle Fermentation im Darm positiv beeinflusst. Die höheren SCFA- und Laktatkonzentrationen in der B. lactis-Gruppe sind für den signifikant niedrigeren pH-Wert in der B. lactis-Gruppe im Vergleich zur Plazebo-Gruppe verantwortlich. Durch den niedrigeren pH-Wert wird die Hemmung des Wachstums potentiell pathogener Bakterien unterstützt.

12. Die durchschnittliche Konzentration des Gesamt-sIgA über die gesamte Studienperiode war in der B. lactis-Gruppe signifikant höher als in der Plazebo-Gruppe (4,40 ± 0,49 vs. 2,47 ± 0,59 mg/kg Stuhl, $p = 0,021$). Der Unterschied war noch ausgeprägter, wenn nur jene Probanden beider Gruppen verglichen wurden, die keine Antibiotika erhalten haben (5,92 ± 1,46 vs. 2,38 ± 0,82 mg/kg Stuhl: $p = 0,009$). In den Subgruppen der Kinder, die Antibiotika erhalten haben, war der Unterschied in den mittleren Gesamt-sIgA-Konzentrationen zwischen der B. lactis-Gruppe und der Plazebo-Gruppe statistisch nicht signifikant. Die Anzahl der Bifidusbakterien im Stuhl[2] korrelierte nicht signifikant mit den fäkalen Gesamt-sIgA-Konzentrationen. Es war jedoch ein positiver Trend erkennbar ($r = 0,344$, $p = 0,08$).

[2] Mohan R, Koebnick, C Schildt J et al.: Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. J Clin Microbiol 2006; 44:4025-31

13. Die durchschnittliche Konzentration von Calprotectin insgesamt von allen Untersuchungszeitpunkten war in der B. lactis-Gruppe signifikant niedriger als in der Plazebo-Gruppe (269,77 ± 26,21 vs. 350 ± 31,29 mg/kg Stuhl, p = 0,041). Der Unterschied zwischen den Gruppen wird deutlicher, wenn man nur Kinder vergleicht, die keine Antibiotika erhalten haben (250,61 ± 29,93 vs. 378,44 ± 38,43 mg/kg Stuhl: p = 0,007). Dagegen ist der Unterschied der mittleren Calprotectinkonzentrationen in den Subgruppen mit Antibiotikagabe nicht signifikant. Die im Mittel signifikant niedrigere Calprotectinkonzentration in der B. lactis-Gruppe im Vergleich zur Plazebo-Gruppe stützt die Hypothese, dass die Supplementation von B. lactis Bb12 bei Frühgeborenen die Reifung und Immunität der Darmschleimhaut stimuliert und die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen fördert.

14. Die Verträglichkeit von B. lactis Bb12 kann insgesamt als gut eingeschätzt werden, auch dann, wenn B. lactis Bb12 bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden verabreicht wird. Es gab keinen Fall einer unerwünschten Nebenwirkung oder gar einer schweren Erkrankung, die mit der Gabe von B. lactis Bb12 in kausalem Zusammenhang steht.

15. Die Anzahl von Kindern, die eine nekrotisierende Enterokolitis (NEC) entwickelten, war mit 3 vergleichsweise gering. Zwei der Kinder gehörten zur Plazebo-Gruppe, ein weiteres zur B. lactis-Gruppe. Eine Analyse dieser Daten ist auf Grund der geringen Fallzahlen nicht angezeigt. Die in den letzten Jahren publizierten klinischen Studien geben Hinweise darauf, dass Probiotika das Risiko einer NEC bei Frühgeborenen reduzieren können.

16. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden randomisierten Plazebo-kontrollierten klinischen Studie die Hoffnungen, dass Bifidobacterium lactis Bb12 ein probiotischer Stamm ist, der sich für die präventive und möglicherweise in der Zukunft auch für eine therapeutische Anwendung bei Frühgeborenen gut eignet. Die Studie ist gemeinsam mit anderen gut kontrollierten Studien ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer Evidenz-basierten Anwendung von Probiotika bei Frühgeborenen.