

**Aus der Abteilung für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
(komm. Abteilungsleiter Prof. Dr. med. Rolf-Dieter Stenger)
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Gf. Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Holger Lode)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**

***Entwicklung eines Scores zur Diagnose
einer Late-onset-Sepsis bei
Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2011

**vorgelegt von : Anja Höpfl
geb. am : 02.06.1980
in : München**

Dekan : Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Gutachter : Prof. Dr. med. R.-D. Stenger
2. Gutachter : Prof. Dr. med. M. Rüdiger
Tag der Disputation : 01.07.2011

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 2. Zielsetzung | 5 |
| 3. Material und Methodik | |
| 3.1. Patientenkollektiv und Studiendesign | 6 |
| 3.2. Daten des Auswertungsbogens | 7 |
| 3.2.1. Einmalig zu erfassende klinische Daten | 7 |
| 3.2.2. Täglich zu erfassende Daten | 7 |
| 3.3. Einteilung des Gesamtkollektivs in Subgruppen | 8 |
| 3.4. Auswertungszeitraum | 8 |
| 3.5. Entwicklung und Validierung des Sepsis-Scores | 8 |
| 3.6. Analyse von Morbidität und Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen | 9 |
| 4. Ergebnisse | |
| 4.1. Patientenkollektiv | 10 |
| 4.2. Entwicklung des Sepsis-Scores in Studie I | 12 |
| 4.3. Validierung des Sepsis-Scores in Studie II | 13 |
| 4.4. Medianer Sepsis-Tag 0 in den Studien I und II | 14 |
| 4.5. Einmalig erfasste Parameter in den Subgruppen der Studienkohorte I | 15 |
| 4.6. Einmalig erfasste Parameter in den Subgruppen der Studienkohorte II | 16 |
| 5. Diskussion | 17 |
| 6. Zusammenfassung | 20 |
| 7. Literaturverzeichnis | 22 |
| 8. Publikation im <i>Journal of Neonatal-Perinatal Medicine</i> am 15. Dezember 2010 | 25 |
| 9. Eidesstattliche Erklärung | 34 |
| 10. Lebenslauf | 35 |
| 11. Danksagung | 36 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| AUC | Fläche unter der ROC-Kurve |
| BPD | Bronchopulmonale Dysplasie |
| CRP | C-reaktives Protein |
| FiO ₂ | Sauerstoffbedarf |
| H ₂ O | Wasser |
| ICH | Intrakranielle Hämorrhagie |
| IT-Ratio | Immature-to-total neutrophil count - Ratio |
| MAD | Mittlerer arterieller Blutdruck |
| NEC | Nekrotisierende Enterokolitis |
| ROC | Receiver Operating Characteristic |
| ROP | Retinopathia praematurorum |
| ZVK | Zentralvenöser Katheter |

1. EINLEITUNG

Aufgrund medizinischer Fortschritte können Frühgeborene mit immer geringerem Gestationsalter und Geburtsgewicht auf neonatologischen Intensivstationen versorgt und ihr Überleben gesichert werden. Durch das längere Überleben dieser sehr unreifen Patienten wird die Diagnose einer Neugeborenensepsis mit zunehmender Häufigkeit gestellt. Sie manifestiert sich in der Mehrzahl der Fälle als Late-onset-Sepsis, also nach Ablauf der ersten 72 Lebensstunden, und gilt somit als nosokomiale Infektion. Die Inzidenz der Late-onset-Sepsis steigt dabei mit abnehmendem Gestationsalter und Geburtsgewicht und liegt in der Gruppe der Neugeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (< 1500 g) zwischen 10 und 25 % (1-4). Dieser Zusammenhang wird auf die Unreife des Immunsystems Frühgeborener sowie die Störung neonataler Immunbarrieren durch invasive Maßnahmen während ihres Aufenthaltes auf der neonatologischen Intensivstation zurückgeführt (5). Risikofaktoren sind dementsprechend Intubation, lange Beatmungsdauer, parenterale Ernährung und das Vorhandensein eines zentralvenösen oder eines Nabelvenen-Katheters. Eine Late-onset-Sepsis ist mit dem Auftreten einer ICH, ROP, NEC oder BPD assoziiert. (1,3,4,6). Trotz fortschreitender medizinischer Möglichkeiten geht die Late-onset-Sepsis mit einer Mortalitätsrate von bis zu 50 % einher (7).

In bis zu 70 % der Fälle verursachen grampositive Organismen wie *Staphylococcus aureus*, Enterokokken und insbesondere Koagulase-negative Staphylokokken die Sepsis. Aus 18 bis 29 % der Blutkulturen betroffener Neugeborener lassen sich gramnegative Organismen wie *Escherichia coli*, Klebsiellen, *Pseudomonas*, *Enterobacter* und *Serratia* isolieren, bis zu 12 % der Infektionen sind auf Pilze zurückzuführen (3,4).

Die Diagnose einer Late-onset-Sepsis wird erheblich erschwert durch die geringe Spezifität und die große Vielfalt ihrer klinischen Symptome. Zu diesen zählen bei Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht gehäuftes Auftreten von Apnoen, Bradykardien oder Sauerstoffsättigungsabfällen, Nahrungsunverträglichkeit, vermehrte Magenreste, erhöhter Beatmungsbedarf, Lethargie, Hypotonie und eine verlängerte Rekapillarierungszeit. Diese Symptome sind wegen der Unreife dieser Kinder auch sonst häufig anzutreffen und zur spezifischen Diagnose der Sepsis damit nur wenig geeignet. Laborchemisch fallen neben Veränderungen im Blutbild vorwiegend eine metabolische Azidose und eine Hyperglykämie auf (8,9).

Die Aussagekraft von infektionsspezifischen Laborparametern wird kritisch diskutiert. Der Gold-Standard, die Blutkultur, identifiziert auch unter optimalen Bedingungen nur etwa 80 %

der schwer an einer Sepsis erkrankten Neugeborenen und bedarf außerdem einer Inkubationszeit von bis zu 48 Stunden (10). Auch sind falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen nicht selten. Bei Frühgeborenen zeigen insbesondere Leukopenie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie und eine erhöhte I/T-Ratio eine mögliche Sepsis an. (11,12). Das CRP gilt als guter Sepsis-Marker, seine Aussagekraft hinsichtlich seiner Nutzung als singulärer Test sowie seines Anstiegs im zeitlichen Erkrankungsverlauf wird jedoch kontrovers diskutiert (10).

Jüngere Studien untersuchten neue Laborparameter mit überzeugenden Ergebnissen bezüglich Sensitivität und Spezifität als Marker einer Late-onset-Sepsis. Zu ihnen gehören Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-1-Rezeptorantagonist und verschiedene Leukozyten-Oberflächenantigene (13,14). In vielen Neonatologien sind diese Parameter jedoch nicht als Routine-Laborwerte rund um die Uhr erhältlich. Auf jeden Fall aber benötigt ihre Bestimmung mehrere Stunden, die aufgrund des raschen Fortschreitens einer Late-onset-Sepsis oft nicht abgewartet werden kann.

Frühgeborene, die an einer Late-onset-Sepsis erkranken, weisen eine deutlich längere Aufenthaltsdauer auf der neonatologischen Intensivstation verbunden mit einem erhöhten Bedarf an invasiven Maßnahmen und folglich steigenden Behandlungskosten auf (1,2,10). Um die durch eine Sepsis erhöhte Mortalitäts- und Komorbiditätsrate durch frühzeitigen Einsatz einer antibiotischen Therapie zu senken und gleichzeitig überflüssige Therapien zu vermeiden, ist die korrekte und frühzeitige Diagnose einer Late-onset-Sepsis daher von großer Wichtigkeit.

2. ZIELSETZUNG

In der Patientengruppe Frühgeborener mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (<1500 g) ist das Auftreten einer Late-onset-Sepsis ein häufiges Problem. Die große Bandbreite an zumeist unspezifischen Symptomen erschwert oftmals eine korrekte und vor allem frühzeitige Diagnose. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, einen Sepsis-Score aus klinischen und laborchemischen Parametern zu entwickeln, der die Diagnose einer Late-onset-Sepsis frühzeitig stellt. An diesen Score wurden folgende Anforderungen gestellt:

1. Eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität soll den frühzeitigen Beginn einer antibiotischen Therapie korrekt indizieren.
2. Der Score soll im klinischen Alltag möglichst einfach und praktikabel sein.
3. Die Erhebung der Parameter soll durch die routinemäßige Diagnostik abgedeckt sein.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientenkollektiv und Studiendesign

Im Verlauf zweier unabhängiger, prospektiver Multicenter-Studien wurden Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (< 1500 g) rekrutiert, die auf der neonatologischen Intensivstation ihrer Geburtsklinik behandelt wurden. Aus den Daten der Studienkohorte I wurde ein Sepsisscore aus klinischen und laborchemischen Parametern entwickelt, Studienkohorte II diente als Validierungsgruppe.

Für die Durchführung der Studie I in den teilnehmenden Kliniken waren jeweils folgende Mitarbeiter verantwortlich: Herr Prof. Dr. Gert Lipowsky in der 1. Universitätsfrauenklinik, München, Herr Prof. Dr. Andreas Schulze im Klinikum der Universität München - Großhadern, Herr Prof. Dr. Georg Simbruner im Dr. von Haunerschen Kinderspital, München, Frau Dr. Ilse Engelsberger im Klinikum Schwabing, München, Herr Prof. Dr. Ralf Geiger in der Universitätsklinik Innsbruck, Österreich, und Herr Dr. Juraj Zbojan im Kinderkrankenhaus F. D. Roosevelt in Banska Bystrica, Slowakische Republik.

An Studie II nahmen das Dr. von Haunersche Kinderspital in München sowie das Kinderkrankenhaus F. D. Roosevelt in Banska Bystrica nicht mehr teil, stattdessen wurde die Studie zusätzlich im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität (TU) München unter der Betreuung von Frau Dr. Andrea Zimmermann sowie im Kinderkrankenhaus Kattowitz, Polen, unter der Betreuung von Frau Dr. Iwona Chudek durchgeführt.

In ausführlichen Vorarbeiten wurden zunächst die zu erfassenden Parameter ausgewählt, definiert und protokolliert. Die Dokumentation der Parameter für jeden Patienten wurde täglich durch die jeweils diensthabenden Ärzte auf den Neugeborenenintensivstationen der teilnehmenden Kliniken durchgeführt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Komplettierung fehlender Parameter aus verfügbaren Patientenunterlagen in für alle Frühgeborene einheitliche Datensätze. Die Parameter wurden nach Unterteilung des Patientenkollektivs in die unten genannten Subgruppen statistisch aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die statistische Analyse der einmalig zu erfassenden Parameter, die Ermittlung der Auswertungszeiträume sowie die Entwicklung des Sepsisscores aus den täglich zu erfassenden Parametern.

3.2. Daten des Auswertungsbogens

Ärzte der jeweiligen neonatologischen Intensivstation protokollierten für jeden Patienten der beiden Studienkohorten 8 einmalig und 39 täglich zu erfassende Daten, die im Folgenden dargestellt werden.

3.2.1. Einmalig zu erfassende klinische Daten

Um Aussagen über die Inzidenzen typischer Komplikationen und Komorbiditäten der Frühgeborenen sowie den Bedarf an intensivmedizinischen Maßnahmen in den einzelnen Subgruppen machen zu können, wurden folgende Daten erhoben:

- Dauer des Aufenthalts auf der neonatologischen Intensivstation in Tagen, Dauer spezieller Intensivmaßnahmen in Tagen: pharyngeale Beatmung, tracheale Beatmung und Vorhandensein eines ZVK.
- Bei Frühgeborenen typischerweise auftretende Krankheitsbilder mit unter Umständen erheblichem, langfristigem Einfluss auf die Lebensqualität: Schwere ICH (Grad 3-4), schwere ROP (Grad 3-5), durch Operation oder pathologisch gesicherte NEC und BPD (definiert als erhöhter FiO_2 mit 36 Schwangerschaftswochen).

Die Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen sowie die Aufenthaltsdauer auf der neonatologischen Intensivstation gingen bei dort verstorbenen Kindern nicht in die Statistik ein.

3.2.2. Täglich zu erfassende Daten

Der täglich zu erfassende Datensatz umfasste 26 auf der neonatologischen Intensivstation prospektiv dokumentierte klinische Parameter aus den Bereichen Herz-Kreislauf-System, Atmung und Beatmung, Gastrointestinaltrakt, Körper- und Inkubortemperatur, Röntgen-Diagnostik und Medikation. Außerdem wurden 5 routinemäßig erhältliche Laborparameter erfasst. Dieser Datensatz wurde für die Kinder beider Studien um folgende 8 objektive, erfahrungsgemäß für eine Sepsis typische klinische Parameter ergänzt: im Vergleich zum Vortag erhöhter Beatmungsbedarf, im Vergleich zum Vortag verdoppelte Anzahl an Bradykardien und/oder Apnoen und/oder Sättigungsabfällen, im Vergleich zum Vortag erhöhter Stimulationsbedarf, Rekapillarierungszeit > 3 s, graumarmoriertes Aussehen oder kalte Extremitäten, pathologischer Basenüberschuss, arterielle Hypotonie (bezogen auf von

der Schwangerschaftswoche abhängige Grenzwerte) und reduzierte Nahrungszufuhr. Jeder dieser Parameter war mit einer detaillierten Definition versehen, um eine Vergleichbarkeit der Erhebung durch unterschiedliche Beobachter und zwischen den Studienzentren sicherzustellen.

3.3. Einteilung des Gesamtkollektivs in Subgruppen

Die Frühgeborenen beider Studienkohorten wurden in 3 Subgruppen eingeteilt:

- Sepsis-Gruppe: Frühgeborene, die wegen einer Late-onset-Sepsis mindestens 7 Tage lang antibiotisch therapiert wurden, mindestens drei der oben genannten objektiven Sepsiszeichen aufwiesen und dem subjektiven Sepsis-Verdacht des betreuenden Arztes unterlagen.
- Nicht-Sepsis-Gruppe: Frühgeborene, bei denen alle 3 zuvor genannten Kriterien nicht zutrafen.
- Intermediäre Gruppe: Frühgeborene, die sich weder der Sepsis- noch der Nicht-Sepsis-Gruppe zuordnen ließen.

Der Sepsis-Score wurde ausschließlich aus den Daten der Subgruppen 1 und 2 als Positiv- bzw. Negativgruppe entwickelt.

3.4. Auswertungszeitraum

Die tägliche Erfassung aller Parameter auf einem Beobachtungsbogen wurde für jedes Kind ab dem 1. Lebenstag durchgeführt. Beim Auftreten einer Late-onset-Sepsis wurde der Tag der Diagnosestellung als Tag 0 bezeichnet. Der mediane Lebenstag des Tages 0 in der Sepsis-Gruppe diente als Tag 0 für die Kinder der Nicht-Sepsis-Gruppe. Die Tage vor Tag 0 wurden als Tag -1 bis Tag -3 bezeichnet. Auswertungszeitraum waren die Tage -3 bis 0.

3.5. Entwicklung und Validierung des Sepsis-Scores

Für jeden Tag im Auswertungszeitraum wurde für jeden Parameter die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) errechnet. Qualitative Parameter erfuhren hierfür eine empirische Abstufung.

Für die Entwicklung eines effizienten Sepsis-Scores, der eine Late-onset-Sepsis zum Zeitpunkt ihres Auftretens diagnostiziert und damit im klinischen Alltag verwendbar ist,

waren nur diejenigen Parameter relevant, die sich von Geburt an, also bereits vor dem 4. Lebenstag, täglich erheben ließen. Erst bei Entlassung eruierbare, einmalig erfasste Parameter wie die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation sowie die Dauer von pharyngealer oder intratrachealer Beatmung und die Liegedauer eines ZVK wurden daher nicht für die Score-Entwicklung verwendet. Gleiches galt für das Auftreten von Komorbiditäten im Rahmen der Frühgeburtlichkeit.

Von den täglich erhobenen Parametern wurden die 15 Parameter mit den größten AUC-Werten an mindestens einem der Tage -3 bis 0 in einem Gesamt-Score kombiniert und dessen AUC errechnet. Parameter, die auf die AUC dieses Scores keinen Einfluss hatten, wurden anschließend sukzessive eliminiert. Der so entstandene Sepsis-Score wurde daraufhin auf die Kinder der Studienkohorte II angewendet. Seine Aussagekraft wurde dabei durch Berechnung der AUC einschließlich Sensitivität, Spezifität sowie positivem und negativem Vorhersagewert charakterisiert.

3.6. Analyse von Morbidität und Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen

Der Vergleich der Sepsis- mit der Nicht-Sepsis-Gruppe erfolgte für die jeweils medianen Zeiträume des Aufenthalts auf der neonatologischen Intensivstation, der Beatmung über einen intratrachealen oder pharyngealen Tubus und des Vorhandenseins eines ZVK. Die jeweiligen Häufigkeiten des Auftretens einer schweren ICH, einer schweren ROP, einer NEC und einer BPD wurden ebenfalls für die einzelnen Subgruppen ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Patientenkollektiv

In Studie I wurden die Daten von 101 Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g ausgewertet. Bei 21 Kindern konnten insgesamt 28 gesicherte Episoden einer Late-onset-Sepsis diagnostiziert werden. Sie wurden zur Sepsis-Gruppe gezählt. Bei 20 Patienten ergab sich keinerlei Hinweis auf das Vorliegen einer Late-onset-Sepsis, so dass sie der Nicht-Sepsis-Gruppe zugeordnet wurden. In 60 Fällen konnte das Vorliegen einer Late-onset-Sepsis weder mit Sicherheit bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die Daten dieser intermediären Gruppe flossen nicht in die Erstellung des Sepsis-Scores ein. Tabelle 1 zeigt die Patientencharakteristika der Studienkohorte I.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|--------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Gestationsalter (Wochen) | 27,1 (1,9) | 29,3 (1,9) | 27,2 (1,9) |
| Geburtsgewicht (g) | 904 (224) | 1156 (296) | 916 (235) |
| Geschlecht (w/m) | 9 / 12 | 12 / 8 | 25 / 35 |
| Todesfälle (%) | 23,8 | 0,0 | 1,7 |

Tabelle 1: Gestationsalter und Geburtsgewicht sind als Median (Standardabweichung) angegeben.

Die Verteilung der Patientenzahlen insgesamt sowie in den Subgruppen auf die teilnehmenden Kliniken der Studie I ist in Tabelle 2 dargestellt.

| | Gesamt | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|--|---------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Gesamtkollektiv | 101 | 21 | 20 | 60 |
| I.Universitätsfrauenklinik, Maistrasse, München | 39 | 4 | 7 | 28 |
| Dr. von Haunersches Kinderspital, München | 21 | 4 | 7 | 10 |
| Klinikum der Universität München - Großhadern | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Klinikum Schwabing, München | 5 | 0 | 1 | 4 |
| Kinderkrankenhaus F. D. Roosevelt, Banska Bystrica, Slowak. Rep. | 26 | 11 | 4 | 11 |
| Universitätsklinik Innsbruck, Österreich | 9 | 2 | 0 | 7 |

Tabelle 2: Anzahl der Patienten in den teilnehmenden Kliniken gesamt sowie in den einzelnen Subgruppen der Studie I.

In Studie II gingen die Daten von 187 Kindern in die Auswertung ein. 23 Patienten hatten eine Late-onset-Sepsis und wurden zur Sepsis-Gruppe gezählt. 36 Patienten gehörten zur Nicht-Sepsis-Gruppe. 128 wurden der intermediären Gruppe zugeordnet. In Tabelle 3 sind die Patientencharakteristika der Studienkohorte II dargestellt.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|--------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Gestationsalter (Wochen) | 26,1 (2,0) | 27,9 (1,4) | 27,4 (1,8) |
| Geburtsgewicht (g) | 792 (217) | 1028 (208) | 961 (235) |
| Geschlecht (w/m) | 12 / 11 | 18 / 18 | 65 / 63 |
| Todesfälle (%) | 4,3 | 0,0 | 5,5 |

Tabelle 3: Gestationsalter und Geburtsgewicht sind als Median (Standardabweichung) angegeben.

Tabelle 4 zeigt die Verteilung der Patientenzahlen insgesamt sowie in den Subgruppen auf die teilnehmenden Kliniken der Studie II.

| | Gesamt | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|---|---------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Gesamtkollektiv | 187 | 23 | 36 | 128 |
| I.Universitätsfrauenklinik, Maistrasse, München | 78 | 11 | 15 | 52 |
| Klinikum rechts der Isar der TU, München | 35 | 3 | 11 | 11 |
| Klinikum der Universität München - Großhadern | 31 | 1 | 7 | 23 |
| Klinikum Schwabing, München | 14 | 3 | 3 | 8 |
| Kinderkrankenhaus Kattowitz, Polen | 5 | 3 | 0 | 2 |
| Universitätsklinik Innsbruck, Österreich | 24 | 2 | 0 | 22 |

Tabelle 4: Anzahl der Patienten in den teilnehmenden Kliniken gesamt sowie in den einzelnen Subgruppen der Studie II.

4.2. Entwicklung des Sepsis-Scores in Studie I

Nach Berechnung der jeweils optimalen Cut-offs und der AUC-Werte aller täglich erfassten Parameter für die Tage -3 bis 0 wurden die 15 Parameter mit den größten AUC-Werten in einem Score kombiniert. Durch Elimination der für dessen Aussagekraft nicht relevanten Parameter entwickelte sich folgender, aus fünf Kategorien bestehender Sepsis-Score:

| # | Kategorie | Parameter |
|---|----------------------------------|--|
| 1 | Periphere Durchblutung | Rekapillarierungszeit > 3 s |
| 2 | Atmung | Anstieg* des FiO ₂ um 20 % absolut oder Anstieg* des mittleren Beatmungsdrucks um 3 cm H ₂ O |
| | | Verdopplung* der Apnoen > 20 s oder Bradykardien < 80 /min oder Entsättigungen < 80 % |
| 3 | Ernährung | Reduktion* der enteralen Nahrungsmenge um 20 % |
| 4 | Allgemeine Laborwerte | Thrombozytenzahl < 150.000 / μ l |
| | | Basenexzess < -7 mmol/l |
| | | Anstieg oder Abfall des Blutzuckers um 50 % |
| 5 | Infektionsspezifische Laborwerte | CRP > 10 mg/l |
| | | IT-Ratio > 0,15 |

* im Vergleich zum Vortag

Der Score wurde als positiv definiert, wenn mindestens 2 der 5 Kategorien erfüllt waren. Eine Kategorie galt als positiv, wenn mindestens einer ihrer Parameter pathologisch war. Bei diesem Cut-off unterschied der Score an Tag 0 mit einer Sensitivität von 89,3 % und einer Spezifität von 100 % erkrankte von nicht erkrankten Kindern. Noch am Vortag (Tag -1) wies er lediglich eine Sensitivität von 50,0 % und eine Spezifität von 100 % auf. Abbildung 1 zeigt die ROC-Kurve des Sepsis-Scores an Tag 0 mit einem AUC-Wert von 0,925 Einheiten.

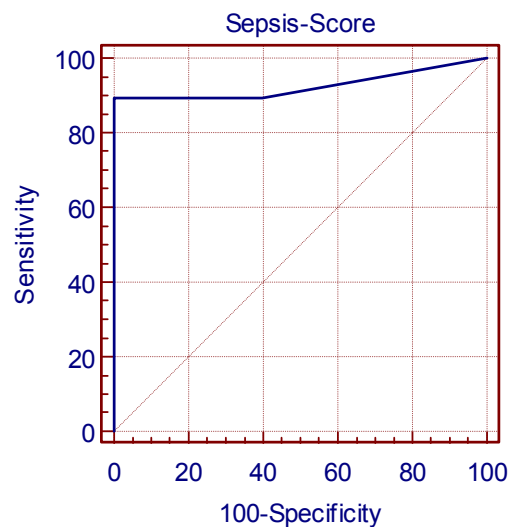


Abbildung 1: ROC-Kurve des Sepsis-Scores in Studie I an Tag 0: Aufgetragen ist (jeweils in %) 100 minus Spezifität auf der x-Achse gegen die Sensitivität auf der y-Achse. Die blaue Kurve zeigt für jeden möglichen Cut-off des Sepsis-Scores die entsprechende Spezifität und Sensitivität an. Je größer die Fläche unter der Kurve und je größer ihr Abstand von der gestrichelten diagonalen Linie ist, desto zuverlässiger unterscheidet der Score zwischen der Sepsis- und der Nicht-Sepsis-Gruppe.

4.3. Validierung des Sepsis-Scores in Studie II

Die Anwendung des Sepsis-Scores auf die Studienkohorte II bestätigte seine Aussagekraft: Der Score unterschied an Tag 0 an einer Late-onset-Sepsis erkrankte von nicht erkrankten Frühgeborenen mit einer Sensitivität von 84,0 % und einer Spezifität von 91,7 %. Sein Positiver Vorhersagewert betrug 87,5 %, sein Negativer Vorhersagewert 89,2 %. Auch in Studienkohorte II lag der Score am Tag -1 mit einer Sensitivität von nur 40,0 % und einer Spezifität von 94,4 % deutlich unter seiner Aussagekraft an Tag 0. Abbildung 2 zeigt die ROC-Kurve des Sepsis-Scores in Studie II an Tag 0 mit einem AUC-Wert von 0,950 Einheiten.

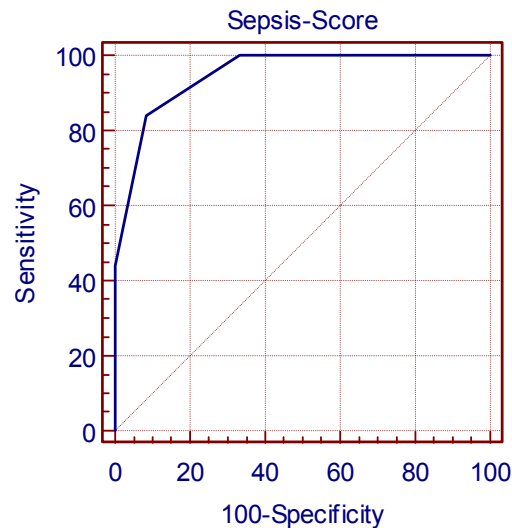


Abbildung 2: ROC-Kurve des Sepsis-Scores in Studie II an Tag 0: Aufgetragen ist (jeweils in %) 100 minus Spezifität auf der x-Achse gegen die Sensitivität auf der y-Achse. Die blaue Kurve zeigt für jeden möglichen Cut-off des Sepsis-Scores die entsprechende Spezifität und Sensitivität an. Je größer die Fläche unter der Kurve und je größer ihr Abstand von der gestrichelten diagonalen Linie ist, desto zuverlässiger unterscheidet der Score zwischen der Sepsis- und der Nicht-Sepsis-Gruppe.

4.4. Medianer Sepsis-Tag 0 in den Studien I und II

In Studie I erkrankten die Kinder der Sepsis-Gruppe im Median nach 11,5 Lebenstagen, also am 12. Lebenstag. In Studie II lag der mediane Tag 0 der Sepsis-Gruppe am 9. Lebenstag. Abbildung 3 veranschaulicht die Verteilung der Lebenstage des Auftretens einer Late-onset-Sepsis in der jeweiligen Sepsis-Gruppe der Studien I und II.

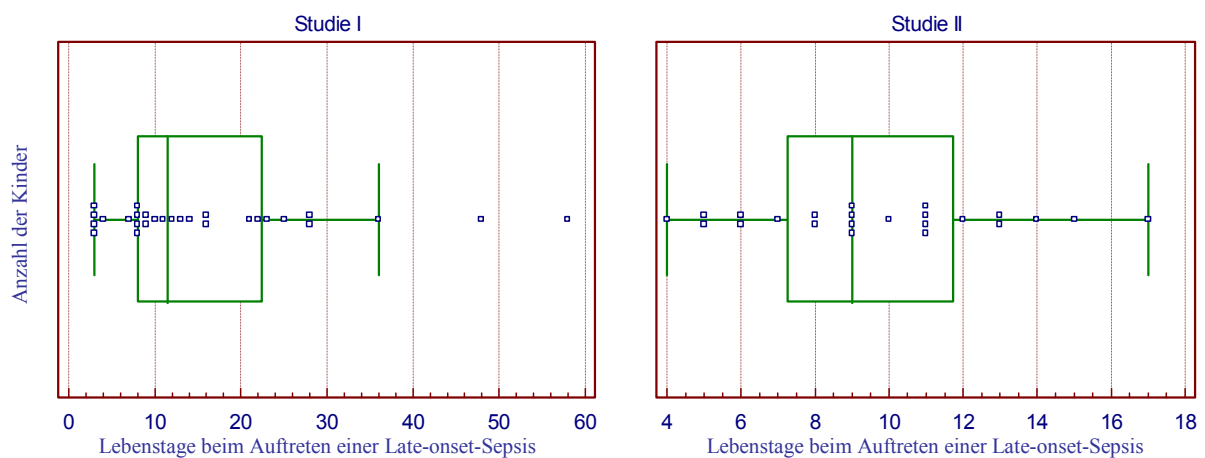


Abbildung 3: Box-and-Whisker-Plots zur Verteilung des Sepsis-Tages 0 in den Studien I und II. Jede einzelne Late-onset-Sepsis ist durch ein blaues Kästchen repräsentiert. Die mittlere grüne Linie des Plots repräsentiert den Median, der zentrale grüne Kasten umfasst den Bereich zwischen unterem und oberem Quartil (25. bis 75. Perzentile). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der x-Achse.

4.5. Einmalig erfasste Parameter in den Subgruppen der Studienkohorte I

Im Vergleich der Sepsis-Gruppe mit der Nicht-Sepsis-Gruppe ergab sich ein Unterschied bezüglich der jeweiligen durchschnittlichen Aufenthaltsdauer auf der neonatologischen Intensivstation. Bei den an einer Sepsis erkrankten Frühgeborenen fiel ein längerer Bedarf sowohl der Beatmung über einen trachealen Tubus als auch der Versorgung durch einen ZVK auf. Lediglich die mediane Beatmungsdauer über einen pharyngealen Tubus zeigte zwischen beiden Gruppen weder im Median noch in der Spannweite einen Unterschied. Tabelle 5 zeigt die jeweiligen Zeiträume intensivmedizinischer Maßnahmen in den Subgruppen der Studie I.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Aufenthaltsdauer (Tage) | 49,5 (30–109) | 33 (22–67) | 35 (14–93) |
| Pharyngealer Tubus (Tage) | 0 (0–22) | 0 (0–21) | 6 (0–29) |
| Trachealer Tubus (Tage) | 12 (0–49) | 0 (0–7) | 6,5 (0–36) |
| ZVK (Tage) | 11 (0–25) | 0 (0–8) | 0 (0–13) |

Tabelle 5: Tage sind als Median (Spannweite) angegeben.

Die Diagnosen schwere ICH, schwere ROP und NEC wurden in der Sepsisgruppe jeweils relativ häufig gestellt, während diese Komorbiditäten bei keinem der nicht von einer Late-onset-Sepsis betroffenen Frühgeborenen auftraten. Die Inzidenz einer BPD war in der Sepsis-Gruppe höher als in der Nicht-Sepsis-Gruppe. Tabelle 6 zeigt die Häufigkeit dieser Komorbiditäten in den einzelnen Subgruppen der Studienkohorte I.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| ICH Grad 3-4 (%) | 19,0 | 0,0 | 10,6 |
| ROP Grad 3-5 (%) | 14,3 | 0,0 | 12,8 |
| NEC (%) | 14,3 | 0,0 | 10,9 |
| BPD (%) | 28,6 | 10,0 | 23,1 |

Tabelle 6: Häufigkeiten der Komorbiditäten in Studienkohorte I.

4.6. Einmalig erfasste Parameter in den Subgruppen der Studienkohorte II

Wie in Studie I ergab sich bei den Patienten der Sepsis-Gruppe im Vergleich mit denen der Nicht-Sepsis-Gruppe eine längere durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der neonatologischen Intensivstation. Außerdem wurden die Kinder der Sepsis-Gruppe länger sowohl über einen pharyngealen Tubus als auch über einen trachealen Tubus beatmet. Im Vergleich mit der Nicht-Sepsis-Gruppe hatten die an einer Late-onset-Sepsis erkrankten Frühgeborenen weiterhin länger einen ZVK. Die jeweilige Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen in den einzelnen Subgruppen der Studienkohorte II wird in Tabelle 7 dargestellt.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Aufenthaltsdauer (Tage) | 91 (48–137) | 67 (7–148) | 77 (13–163) |
| Pharyngealer Tubus (Tage) | 28 (14–55) | 7 (0–50) | 17 (0–77) |
| Trachealer Tubus (Tage) | 19 (1–90) | 1 (0–37) | 8 (0–86) |
| ZVK (Tage) | 15 (0–93) | 0 (0–16) | 6 (0–49) |

Tabelle 7: Tage sind als Median (Spannweite) angegeben.

Alle erfassten Komorbiditäten traten in Studie II häufiger in der Sepsis-Gruppe als in der Nicht-Sepsis-Gruppe auf. Die Komorbiditäten in den einzelnen Subgruppen der Studienkohorte II werden in Tabelle 8 dargestellt.

| | Sepsis-Gruppe | Nicht-Sepsis-Gruppe | Intermediäre Gruppe |
|------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| ICH Grad 3-4 (%) | 13,0 | 0,0 | 14,0 |
| ROP Grad 3-5 (%) | 17,4 | 5,1 | 7,7 |
| NEC (%) | 14,3 | 2,8 | 7,8 |
| BPD (%) | 36,8 | 11,8 | 32,7 |

Tabelle 8: Häufigkeiten der Komorbiditäten in Studienkohorte II.

5. DISKUSSION

Die Late-onset-Sepsis stellt bei Frühgeborenen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht ein häufiges Problem dar. Ihre sichere und frühe Diagnose stellt die Ärzte der neonatologischen Intensivstation oftmals vor eine schwierige Herausforderung (1,3,4,10). In der vorliegenden Studie wurde ein Score aus klinischen und laborchemischen Parametern entwickelt, der den Beginn einer Late-onset-Sepsis in dieser Patientengruppe diagnostiziert. Der resultierende Score erfüllt die vorab gestellten Anforderungen: In der Validierungsgruppe zeigte er mit einer Sensitivität von 84,0 % und einer Spezifität von 91,7 % eine hohe Aussagekraft. Die 4 Kinder der Sepsis-Gruppe in der Validierungskohorte, die von diesem Score nicht identifiziert wurden, hatten jeweils 1 Score-Punkt. Bei einem dieser Kinder lag der Basenüberschuss mit -6,8 mmol/l, bei einem anderen die Steigerung des MAP um 2,3 cm H₂O nahe am Cut-off des Sepsis-Scores.

In Studienkohorte I lag die Sensitivität des Scores an Tag -1 bei lediglich 50,0 %, in Studienkohorte II bei 40,0 %. In den Sepsis-Gruppen der beiden Studienkohorten war der Score bei 2/3 der Kinder, die an Tag 0 mindestens 3 Scorepunkte hatten, an Tag -1 mit 2 Scorepunkten positiv. Bei 24 (47,1 %) Kindern hätte man mit Hilfe des Scores die Sepsis einen Tag früher erkennen und den Kindern dadurch möglicherweise eine vorübergehende Verschlechterung ihres Zustandes ersparen können. Andererseits hätte er bei 3,6 % der Kinder fälschlicherweise eine Sepsis angezeigt und diese Kinder wären unnötigerweise antibiotisch behandelt worden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Sepsisscore für die Frühdiagnose einer Late-onset-Sepsis, also an den Tagen -3 bis -1, keine ausreichende Aussagekraft besitzt, am Diagnosetag selbst jedoch mit hoher Sensitivität und Spezifität als Entscheidungshilfe dienen kann.

Durch Elimination von Parametern, die auf die AUC des Gesamt-Scores keinen Einfluss hatten, wurde der Score bestmöglich vereinfacht. Der Einsatz von ausschließlich objektiven Parametern trägt zudem zur Vermeidung subjektiver Einschätzungsfehler bei. Die Verwendung von Daten wie Vitalparametern, die auf der neonatologischen Intensivstation routinemäßig erhoben werden, optimiert wiederum seine Praktikabilität im klinischen Alltag. Aus demselben Grund wurden auch von den Laborparametern nur solche in den Score integriert, die überall verfügbar sind. In neueren Studien wurden zwar zahlreiche Leukozytenoberflächenmarker und Zytokine als laborchemische Marker mit hohen prädiktiven Werten für die Diagnose einer neonatalen Sepsis vorgestellt (13,14), es ist jedoch davon auszugehen, dass die meisten dieser Marker nicht routinemäßig in jeder

neonatologischen Intensivstation zur Verfügung stehen. Daher gingen nur Laborparameter, die diese Anforderung erfüllten, in den Sepsis-Score ein.

Zahlreiche Studien belegen, dass das Auftreten einer neonatalen Sepsis für die betroffenen Patienten sowohl die Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen als auch die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation verlängert (4,5,15). In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls eine längere intratracheale Beatmungsdauer sowie eine längere Liegedauer eines ZVK bei den an einer Late-onset-Sepsis erkrankten Frühgeborenen beider Kohorten. Die mediane Aufenthaltsdauer der Frühgeborenen auf der Intensivstation kann aufgrund der unterschiedlichen Verlegungsmodalitäten in den Neonatologien der vorliegenden Studie jedoch nicht sicher mit dem Auftreten einer Late-onset-Sepsis in Zusammenhang gebracht oder mit den Ergebnissen bisheriger Studien verglichen werden.

Auch die Inzidenzen typischer Komorbiditäten des Frühgeborenen stiegen in bisherigen Studien mit dem Auftreten einer Late-onset-Sepsis deutlich an. Dies betrifft insbesondere die Häufigkeit einer schweren ICH, einer schweren ROC, einer NEC und einer BPD (6,16-20). In der vorliegenden Studie lagen die Inzidenzen dieser Komorbiditäten in den Sepsis-Gruppen höher als die in den Nicht-Sepsis-Gruppen beider Studienkohorten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein Teil der unterschiedlichen Inzidenzen von Komorbiditäten zwischen den Gruppen der vorliegenden Studie auf die Differenz des Gestationsalters zurückzuführen ist: In der Nicht-Sepsis-Gruppe lag dieses im Median jeweils mehr als eine Woche über dem der Sepsis-Gruppe. Eine klare Differenzierung dieser Inzidenzen im Zusammenhang mit dem Auftreten einer Late-onset-Sepsis muss daher in Matched-pair-Analysen in Studien mit ausreichenden Fallzahlen erfolgen.

Des Weiteren unterliegt die Interpretation solcher Zusammenhänge der Einschränkung der wechselseitigen Beeinflussung: zum einen erhöhen aufgrund extremer Unreife notwendige invasive Maßnahmen das Infektionsrisiko, eine Neugeboreneninfektion zum anderen verlängert zwangsläufig den Bedarf solcher Maßnahmen (5). Auch zwischen den untersuchten Komorbiditäten des Frühgeborenen bestehen gegenseitige Abhängigkeiten: bei postpartal maschinell beatmeten Frühgeborenen wurde eine erhöhte Inzidenz einer schweren ICH nachgewiesen (21). Eine signifikante Assoziation besteht zudem zwischen dem Auftreten einer ICH und einer NEC (22). Eine getrennte Beurteilung der einzelnen Faktoren bezüglich ihres Zusammenhangs mit einer Late-onset-Sepsis ist aus diesen Gründen grundsätzlich schwierig und retrospektiv nicht möglich.

Die Frühgeburtlichkeit stellt einen der für die Diagnose der Sepsis wichtigen und trotz medizinischer Fortschritte nicht vermeidbaren Risikofaktoren dar. Der in der vorliegenden

Studie entwickelte Sepsis-Score bietet jedoch eine Grundlage für die frühzeitige und damit effiziente Therapie der Late-onset-Sepsis, einer mit einer hohen Mortalität und Komorbidität behafteten Diagnose in dieser Patientengruppe. Er ist zudem geeignet für den Vergleich von Patientenkollektiven in multizentrischen Studien.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Late-onset-Sepsis stellt besonders in der Gruppe Frühgeborener mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (< 1500 g) eine Herausforderung dar. Ihre Diagnose bereitet aufgrund der großen Bandbreite unspezifischer Symptome besonders in diesem Patientenkollektiv oftmals Schwierigkeiten. Die Late-onset-Sepsis geht mit einer hohen Mortalitätsrate, einem gesteigerten Bedarf an intensivmedizinischen Maßnahmen und erhöhten Inzidenzen von typischen Komorbiditäten des Frühgeborenen einher. Umso wichtiger ist daher einerseits eine frühzeitige antibiotische Therapie, andererseits die Vermeidung von Resistenzentwicklungen durch überflüssige Antibiotikagaben.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Entwicklung eines Sepsis-Scores aus klinischen und laborchemischen Parametern, der das Auftreten einer Late-onset-Sepsis diagnostiziert. Besonderer Wert wurde dabei auf Praktikabilität im klinischen Alltag sowie den Einsatz routinemäßig erhobener Werte gelegt. Im Rahmen zweier unabhängiger, prospektiver Multicenter-Studien wurden daher Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht selektiert, die anhand prospektiv definierter Kriterien einer Gruppe mit Late-onset-Sepsis oder einer Nicht-Sepsis-Gruppe zugeordnet wurden. Für alle Frühgeborenen wurden täglich 39 klinische und laborchemische Parameter erfasst. Durch die Berechnung ihrer AUC-Werte wurden in Studie I diejenigen Parameter eruiert, die in der Sepsis-Gruppe im Gegensatz zur Nicht-Sepsis-Gruppe an den 3 Tagen vor dem und am Diagnosetag pathologisch wurden. Nach Berechnung der jeweils optimalen Cut-offs und Elimination von für die Aussagekraft des Scores nicht relevanten Parametern entstand ein aus 9 Parametern bestehender Score mit einer Fläche von 0,925 Einheiten unter der ROC-Kurve. Dieser Sepsis-Score ließ sich in die 5 Kategorien periphere Zirkulation, Atmung, Gastrointestinaltrakt, Laborparameter und infektionsspezifische Laborparameter unterteilen. Von einem positiven Score wurde ausgegangen, wenn mindestens 2 dieser Kategorien pathologisch waren.

Der so entstandene Sepsis-Score wurde in der Frühgeborenenkohorte der Studie II validiert und wies dabei eine Fläche von 0,950 Einheiten unter der ROC-Kurve auf. Die Sensitivität betrug bei einem Cut-off von 2 pathologischen Kategorien 84,0 %, die Spezifität 91,7 %, der Positive Vorhersagewert 87,5 % und der Negative Vorhersagewert 89,2 %.

Des Weiteren wurden in beiden Studien die medianen Zeiträume des Aufenthalts auf der neonatologischen Intensivstation, der intratrachealen oder pharyngealen Beatmung und des

Vorhandenseins eines ZVK gemessen. Ebenfalls erfasst wurden die Inzidenzen einer schweren ICH, einer schweren ROP, einer NEC und einer BPD. Dabei zeigte sich tendenziell eine jeweils längere Dauer intensivmedizinischer Maßnahmen in den Sepsis-Gruppen. Auch die Komorbiditäten der Frühgeborenen wiesen unter den an einer Late-onset-Sepsis erkrankten Patienten jeweils deutlich höhere Inzidenzen auf als unter den nicht von einer Sepsis Betroffenen. Da die Frühgeborenen der Sepsis-Gruppen im Median auch ein deutlich niedrigeres Gestationsalter aufwiesen, muss man jedoch davon ausgehen, dass die Abhängigkeit dieser Daten von der Gruppenzugehörigkeit hauptsächlich auch auf diesen Unterschied zurückzuführen ist.

Nicht zuletzt stellt ein extrem niedriges Gestationsalter mit zunehmender Häufigkeit auch einen Risikofaktor für das Auftreten einer Late-onset-Sepsis dar. Der in der vorliegenden Studie entwickelte Sepsis-Score kann dabei einen Beitrag zur schnellen Diagnose und somit zur effizienten Therapie dieses Krankheitsbildes leisten, sowie zum Vergleich von Patientenkollektiven in multizentrischen Studien herangezogen werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL. Late-onset sepsis in very low birthweight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*. 1996;129:63-71.
- 2) Klaus MH, Fanaroff AA. Neonatal infections in Care of the high-risk neonate. fifth edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001;363-392.
- 3) Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110:285-291.
- 4) Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics*. 2005;116:595-602.
- 5) Mussi-Pinhata MM, Rego MA. Immunological peculiarities of extremely preterm infants: a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81:59-68.
- 6) Shah VA, Yeo CL, Ling YLF, Ho Ly. Incidence, risk factors of retinopathy of prematurity among very low birthweight infants in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2005;34:169-178.
- 7) Remington JS, Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis in Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. fourth edition. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001;944.
- 8) Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, Tyson JE, Philips JB 3rd, Edwards W, Lucey JF, Catz CS, Shankaran S, Oh W. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:593-598.

-
- 9) Gonzales BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med.* 2003;31:60-68.
 - 10) Gerdes JS. Clinicopathologic Approach to the Diagnosis of Neonatal Sepsis, *Clin Perinat.* 1991;18:361-379.
 - 11) Mancilla-Ramirez J, Sanchez-Saucedo LU. Neonatal septicemia: differences in full-term and pre-term newborn infants. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1990;47:227-233.
 - 12) Guida JD, Kunig AM, Leef KH, McKenzie SE, Paul DA. Platelet count and sepsis in very low birth weight neonates: is there an organism-specific response? 2003;111:1411-1415.
 - 13) Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18:125-131.
 - 14) Kuester H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, Geiger R, Lipowsky G, Simbruner G. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet.* 1998;352:1271-1277.
 - 15) Pessoa-Silva CL, Miyasaki CH, de Almeida MF, Kopelman BI, Raggio RL, Wey SB. Neonatal late-onset bloodstream infection: attributable mortality, excess of length of stay and risk factors. *Eur J Epidemiol.* 2001;17:715-720.
 - 16) Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birthweight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics.* 2002;109:34-39.
 - 17) Cakmak CF, Aygun C, Cetinoglu E. Does early enteral feeding of very low birth weight infants increase the risk of necrotizing enterocolitis? *Eur J Clin Nutr.* 2007;online publication, November 2007.
 - 18) Patole S. Prevention and treatment of necrotising enterocolitis in preterm neonates. *Early Hum Dev.* 2007;83:635-642.
 - 19) Chauhan M, Henderson G, McGuire W. Enteral feeding for very low birth weight infants: reducing the risk of necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93:F162-166.

- 20) Tapia JL, Agost D, Alegria A, Standen J, Escobar M, Grandi C, Musante G, Zegarra J, Estay A, Ramirez R, Neocosur Collaborative Group. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birthweight infants. *J Pediatrics (Rio J)*. 2006;82:15-20.
- 21) Gleissner M, Jorch G, Avenarius S. Risk factors for intraventricular hemorrhage in a birth cohort of 3721 premature infants. *J Perinat Med*. 2000;28:104-110.
- 22) Jen HC, Graber JJ, Hill JL, Alaish SM, Voigt RW, Strauch ED. Surgical necrotizing enterocolitis and intraventricular hemorrhage in premature infants below 1000 g. *J Pediatr Surg*. 2006;41:1425-1430.

8. PUBLIKATION

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Posterpreis 2010 der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ) ausgezeichnet und von der Union of European Neonatal and Perinatal Societies (UENPS) für die Endrunde der Academic Olympics nominiert.

Sie wurde am 15. Dezember 2010 im folgenden Artikel im Journal of Neonatal-Perinatal Medicine veröffentlicht.

A score predicting late-onset sepsis in very low birthweight infants

Anja Höpfl^b, Andrea Willeitner^c, Tina Arenz^d, Irmela Jeremias^e, Ralf Geiger^f and Helmut Küster^{a,*}

^aUniversity Children's Hospital, Greifswald, Germany

^bChildren's Hospital St Marien, Landshut, Germany

^cDepartment of Pediatrics, Neonatal-Perinatal Medicine, University of Oklahoma, OK, USA

^dInselspital Bern, Bern, Switzerland

^eHelmholtz Center, HZM-Haematologikum, Munich, Germany

^fDepartment of Pediatric Cardiology, University Children's Hospital, Innsbruck, Austria

Received 3 December 2009

Revised 10 July 2010

Accepted 4 August 2010

Abstract. *Objective:* To establish a score to predict late-onset sepsis in very low birth weight infants.

Study Design: Two successive prospective multi center studies in very low birth weight infants were used: infants in the first served as calculation cohort, those in the second as validation cohort. Infants were divided into a sepsis group, a non-sepsis group, and an undetermined group by predefined criteria partially based on the sepsis definition by the Robert Koch institute. In the first study 39 parameters recorded daily were compared in the sepsis and the non-sepsis group between Day -3 and Day 0 of sepsis. The score was created combining those parameters with the highest area under the ROC curve.

Results: A score was generated consisting of five clinical and laboratory categories: peripheral circulation, respiration, gastrointestinal tract, general laboratory findings and infection-specific laboratory findings. Sepsis was defined as pathological findings in at least 2 out of these 5 categories. This scoring system reached a sensitivity of 84.0% and a specificity of 91.7% (PPV 87.5% and NPV 89.2%) in discriminating the sepsis group from the non-sepsis group in the validation cohort.

Conclusion: We created a score for early diagnosis of late-onset sepsis in very low birth weight infants. The score may be of value when comparing infants with sepsis in multi center studies.

Keywords: Late onset neonatal sepsis, NICU, sepsis score, very low birth weight

1. Introduction

With an incidence of 0.1 to 1.0% and a mortality rate of 2 to 50%, neonatal sepsis is a common disease in Neonatal Intensive Care Units (NICUs) [1]. Prematurity and birth weight adversely affect the probability of bacterial sepsis. Among very low birth weight

(VLBW) infants the incidence rises up to 21%, presenting as late-onset sepsis in many cases [2–8].

Diagnosing sepsis still poses considerable difficulties, because neonatal sepsis generally begins with few and non-specific symptoms. Fanaroff et al. identified apneas, feeding intolerance, increased respiratory support and hypotonia as the most frequently presenting signs of late-onset sepsis with no sign exclusively offering a high predictive accuracy [2]. Other studies add symptoms like temperature instability, poor perfusion, heart rate variabilities or simply “looking ill” to the wide spectrum of clinical sepsis signs. Furthermore, the identification of a septic infant by clinical param-

*Corresponding author: Helmut Küster, M.D., University Children's Hospital, Sauerbruchstr. 1, 17475 Greifswald, Germany. Tel.: +49 3834 86 6333; Fax: +49 3834 86 6422; E-mail: kuester@uni-greifswald.de.

ters strongly correlates with the experience of the judging clinician [9]. Routine laboratory findings, such as white blood cell count or C-reactive protein (CRP), are not sufficient to early detect sepsis, either. As one of the most frequently used sepsis markers, CRP has a high specificity of up to 96 % that allows its use for exclusion of sepsis. But in contrast to cytokines like IL-6, it increases late after the onset of sepsis [10] resulting in a low sensitivity especially when measured early during sepsis before antibiotic therapy has been started. Therefore, given the high mortality rate of late-onset sepsis in VLBW infants, CRP can not be used as a single test for the early diagnosis of this disease. Blood cultures require up to 72 hours of incubation and, under optimal conditions, attain a sensitivity of only 80% [11].

Delayed initiation of antibiotic treatment adversely affects outcome. Therefore, antibiotic treatment is usually started as soon as the first non-specific symptoms of sepsis are observed. This approach, however, results in a high percentage of unnecessary use of antibiotics. This unnecessary treatment promotes bacterial resistance to antibiotics, prolongs the duration of the hospital stay, and results in exaggerated costs [2,6]. Last but not least, the emotional impact on parents and their family may be immense.

Therefore, an efficient and systematic approach is required to allow diagnosis of late-onset sepsis in VLBW infants with high sensitivity and specificity. The aim of this study was to establish a predictive score that defines the begin of late onset sepsis and is easily applicable in the NICU.

2. Patients and methods

2.1. Study population

In two successive prospective observational multi center studies, all VLBW infants (< 1500 g) admitted to 8 independent level 3 NICUs were prospectively enrolled. Neonates included in the first served as a cohort for the calculation of the sepsis score, the cohort recruited in the second study was used for the validation of the resulting score. The patients were enrolled according to power size calculation; the first study lasted 19 months, the second 30 months.

We enrolled only patients whose parents gave their informed consent. Both studies were approved by all local ethics committees and conducted in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

2.2. Classification of patients

In the calculation and in the validation cohort, the infants were classified into three prospectively defined groups: a proven sepsis group, a non-sepsis group, and an undetermined group. Referring to the definition for sepsis of the NeoKISS surveillance system by the German national hygiene centre (Robert Koch Institute Berlin, Germany), proven sepsis was assumed in those patients who had subjective clinical suspicion of sepsis by the physician in charge, received antibiotic treatment for at least 7 days, and presented at least 3 out of 8 of the later mentioned objective signs of sepsis from a predefined list. Classifying an infant as non-septic was based on the absence of all of these criteria. All other infants were allocated to the undetermined group and excluded from the development of the sepsis score because a score can only be developed using data from patients definitely allocated to either group. All infants were classified during the score development phase. Only cases of sepsis appearing later than 3 days after birth were included into the study.

Based on previous studies, the following were considered objective clinical signs of sepsis: increased ventilation requirements (> 20% increase of oxygen requirement or > 3 cmH₂O increase of mean airway pressure compared to the previous day); increased tactile stimulation requirements (compared to the previous day); pathological capillary refill time (> 3 seconds); increased occurrence of apnea, bradycardia or desaturation (twice as many compared to the previous day); pallor (> 30 minutes); pathological mean arterial pressure (mmHg < gestational age); pathological base excess (< -8 mmol/L), and feeding intolerance (reduction of enteral feeds > 50% compared to the previous day). Each sign of sepsis was prospectively defined in detail.

All cases of early onset sepsis were excluded from analysis because analysis in those infants would have required prenatal blood sampling.

2.3. Study periods

From day 1 to week 11 of life, the 39 parameters listed in Table 1 were recorded for each infant. Clinical parameters were registered once daily. For ethical reasons, laboratory values were taken only as clinically indicated. If there was more than one laboratory value documented per day, the second most pathological was used for calculation in order to avoid outliers. Whenever sepsis occurred, Day 0 was defined as the day of

Table 1
Areas under the ROC curve calculated for all parameters in the calculation cohort

| | Day -3 | Day -2 | Day -1 | Day 0 (diagnosis) |
|--|--------|--------|--------|----------------------|
| Base excess [minimum / day] | 0.528 | 0.743 | 0.860 | 1.000 |
| Platelet count [minimum / day] | | 1.000 | 0.800 | 0.974 |
| Enteral feeds [mL / kg / day] | 0.908 | 0.905 | 0.898 | 0.882 |
| Oxygen demand [maximum for at least 30 min / day] | 0.733 | 0.810 | 0.865 | 0.858 |
| Feeding intolerance [yes / no] | 0.690 | 0.636 | 0.625 | 0.840 |
| Grey skin color [yes / no] | 0.617 | 0.646 | 0.580 | 0.810 |
| Gastric residuals / enteral feeds [mL / day] | 0.681 | 0.640 | 0.747 | 0.779 |
| Discarded gastric residuals [mL / day] | 0.722 | 0.593 | 0.718 | 0.774 |
| Mean airway pressure [maximum / day] | 0.662 | 0.634 | 0.658 | 0.769 |
| Dark green gastric residuals [mL / day] | 0.650 | 0.650 | 0.700 | 0.750 |
| Cold hands / feet [yes / no] | 0.571 | 0.542 | 0.580 | 0.740 |
| Capillary refill time > 3 s [yes / no] | 0.562 | 0.553 | 0.550 | 0.714 |
| Pharyngeal / tracheal tube [yes / no] | 0.673 | 0.672 | 0.592 | 0.712 |
| Blood glucose [highest / day] | 0.528 | 0.724 | 0.618 | 0.711 |
| Increase in apneas / bradycardias / desaturations * [yes / no] | 0.580 | 0.487 | 0.520 | 0.692 |
| Postnatal use of steroids [yes / no] | 0.659 | 0.692 | 0.565 | 0.681 |
| Increase in need of respiratory support * [yes / no] | 0.500 | 0.500 | 0.540 | 0.680 |
| Increase in need of tactile stimulation * [yes / no] | 0.504 | 0.591 | 0.567 | 0.673 |
| Temperature of incubator [at time of rectal temperature] | 0.625 | 0.637 | 0.620 | 0.659 |
| Use of opioids [yes / no] | 0.583 | 0.614 | 0.614 | 0.659 |
| HFO-amplitude [average of day] | 0.611 | 0.595 | 0.595 | 0.643 |
| Use of sodium bicarbonate [yes / no] | 0.525 | 0.540 | 0.540 | 0.636 |
| Frequency of spontaneous respiration if not mechanically ventilated [average of day] | 0.569 | 0.540 | 0.477 | 0.608 |
| Transfused erythrocyte concentrates [mL / day] | 0.500 | 0.545 | 0.654 | 0.606 |
| Heart frequency [average of day] | 0.701 | 0.628 | 0.713 | 0.568 |
| Mean arterial pressure [lowest / day] | 0.708 | 0.594 | 0.703 | 0.562 |
| Use of adrenaline [yes / no] | 0.522 | 0.558 | 0.519 | 0.558 |
| Diuresis [mL / kg / day] | 0.647 | 0.550 | 0.550 | 0.545 |
| Use of crystalline fluid [yes / no] | 0.525 | 0.518 | 0.518 | 0.545 |
| Use of dopamine [yes / no] | 0.500 | 0.520 | 0.540 | 0.540 |
| Rectal temperature [highest / day] | 0.706 | 0.548 | 0.692 | 0.537 |
| Use of diuretics [yes / no] | 0.501 | 0.504 | 0.532 | 0.529 |
| PIP-PEEP [average of day] | 0.559 | 0.450 | 0.443 | 0.524 |
| X-ray [yes / no] | 0.528 | 0.519 | 0.500 | 0.523 |
| Persistent Ductus arteriosus Botalli [yes / no] | 0.505 | 0.512 | 0.512 | 0.510 |
| Use of indomethacin [yes / no] | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.504 |
| Use of catecholamines [yes / no] | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.500 |
| CRP | | 0.639 | | |
| IT-ratio | | | 0.810 | |

AUC values are calculated from Day -3 to Day 0 in the proven sepsis group and from the 9th to the 12th day of life in the non-sepsis group. They are listed in descending order on Day 0. The closer the AUC is to 1.0 the more the parameter distinguishes between septic and non-septic infants. For the calculation of an AUC the data of at least 10% of infants had to be available each day.

*in comparison to the previous day.

diagnosis and start of antibiotic treatment. The median age on Day 0 in the proven sepsis group served as a reference point that was applied as Day 0 in the non-sepsis group. For the development of a clinical score to predict late-onset sepsis, we compared the clinical parameters between Day -3 and Day 0 in both groups.

2.4. Statistics

In both cohorts, all patients in the proven sepsis group were designated to the positive groups, and those in the non-sepsis group to the negative groups.

The sepsis score was calculated as follows: Using the data from the calculation cohort, for each day between Day -3 and Day 0, receiver-operating-characteristics were calculated separately for each of the 39 parameters. The resulting area under the ROC curve (AUC) was used to find those parameters that had the highest predictive power as judged by them having the largest AUC on the day of diagnosis (Day 0). For the calculation of ROC at least 10% of values had to be available. Because, for ethical reasons, CRP and IT-ratio were not taken daily in every infant in the non-sepsis group, the number of values available was not suffi-

Table 2
Characteristics of patients in the calculation (I) and the validation (II) cohort

| Cohort | Sepsis | | Non-sepsis | | Undetermined | |
|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| | I <i>n</i> = 21 | II <i>n</i> = 23 | I <i>n</i> = 20 | II <i>n</i> = 36 | I <i>n</i> = 60 | II <i>n</i> = 128 |
| Gestational age [weeks] | 27.1 (1.9) | 26.1 (2.0) | 29.3 (1.9) | 27.9 (1.4) | 27.2 (1.9) | 27.4 (1.8) |
| Birth weight [g] | 904 (224) | 792 (217) | 1,156 (296) | 1,028 (208) | 916 (235) | 961 (235) |
| Sex [f/m] | 9 / 12 | 12 / 11 | 12 / 8 | 18 / 18 | 25 / 35 | 65 / 63 |
| CRIB score | 6.5 (3.5) | 7.2 (3.6) | 1.8 (2.3) | 4.0 (3.6) | 4.5 (4.1) | 4.9 (4.0) |
| Apgar min 1 | 5.3 (2.4) | 4.5 (2.1) | 7.2 (1.6) | 6.8 (1.6) | 5.2 (2.4) | 5.5 (2.1) |
| min 5 | 7.1 (2.0) | 7.5 (1.8) | 8.7 (1.1) | 8.8 (1.0) | 8.5 (1.9) | 8.0 (1.6) |
| min 10 | 7.9 (2.3) | 8.3 (1.6) | 9.1 (0.9) | 9.1 (0.9) | 9.0 (1.7) | 8.6 (1.3) |
| Number of deaths | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 7 |

All values are mean (SD).

cient to calculate the AUC for every Day -3 to 0 for these two parameters. Anyhow, because both represent sepsis markers used routinely, both were applied to create the sepsis score. We used the cut-offs found for those days with sufficient data. All other laboratory findings were evaluated frequently enough to calculate their ROC curves for each Day -3 to 0 . Finally, the 15 most predictive parameters were used in multiple combinations and with different cut-offs to find the optimal score. Concurrently, those of the 15 parameters without influence on the predictive power of the resulting score were omitted stepwise in order to improve the usability of the score. The number of score parameters was not determined in advance, but found by comparing the predictive power of various combinations with attention to maximizing the AUC while minimizing the number of score parameters. This resulted in a final score consisting of 9 parameters grouped into 5 categories.

Then the scoring system was applied to the validation cohort and sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated.

Excel 2002 (Microsoft, Unterschleißheim, Germany) and the MedCalc Version 4.30 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) were used for statistical analysis.

3. Results

In the first study 158 VLBW infants were enrolled. 57 infants had to be excluded because of early transfer to non-participating hospitals or because of an incomplete dataset. Of the remaining 101 infants, 21 were allocated to the proven sepsis group, 20 to the non-sepsis group, and 60 to the undetermined group.

As expected, infants in the proven sepsis group had a lower gestational age and birth weight compared to

the non-sepsis group, as well as higher CRIB and lower Apgar scores.

Among the 21 infants in the proven sepsis group, 28 episodes of late-onset sepsis occurred with 6 infants suffering 2 or 3 septic episodes, all of which were used as separate events during analysis. We recovered the following organisms from blood cultures in 28 episodes: *Staphylococcus epidermidis* (9); other *coagulase-negative staphylococci* (6); *Escherichia coli* (6); *Candida albicans* (3); *Enterococcus* (3); and *Pseudomonas aeruginosa* (1). Two infants in the sepsis group died in the course of sepsis. None of them had a positive blood culture. In none of the infants of the undetermined group, the event of death was related to infection.

In the second study 268 infants were enrolled. 81 were excluded because of early transfer to non-participating hospitals or because of an incomplete dataset. Of the remaining 187 infants, 23 infants were allocated to the proven sepsis group, 36 to the non-sepsis group, and 128 to the undetermined group.

Table 2 provides demographic characteristics of the calculation and the validation cohort.

In the proven sepsis group, 4 blood cultures were positive: 3 grew *coagulase-negative staphylococci*, and 1 *Enterococcus*.

The one deceased infant in the sepsis group died 6 days after onset of sepsis and had no positive blood culture. Only one of the deceased infants in the undetermined group revealed a positive blood culture 2 weeks before death, but died during cardiac surgery. Due to low numbers, no attempt was made to analyze the value of the score in predicting survival.

The median day of diagnosis of late-onset sepsis was the 12th day of life with an interquartile range from 8 to 23 days in the calculation cohort and the 9th day of life with an interquartile range from 8 to 12 days in the validation cohort. All documented parameters and

Table 3
Score categories and parameters

| # | Category | Parameter |
|---|--|--|
| 1 | Peripheral circulation | Capillary refill time > 3 s |
| 2 | Respiration | 20% increase in FiO ₂ or 3 cm H ₂ O increase* of mean airway pressure 100% increase* in apneas or bradycardias or desaturations |
| 3 | Gastrointestinal tract | 20% reduction* of daily enteral feeds |
| 4 | General laboratory findings | Platelet count < 150,000 / μ L Base excess < -7 mmol/L 50% increase* or reduction* of blood glucose |
| 5 | Infection-specific laboratory findings | CRP > 10 mg/L IT-ratio > 0.15 |

Increase* and reduction* are in comparison to the previous day.

In case of blood glucose, an unchanged supply was a prerequisite.

In clinical practice, a reduction of enteral feeds by 20% would be equivalent to a 50% reduction of feeds in four meals or a 100% reduction in two meals in a VLBW infant having 12 feedings per day.

their AUC values from Day -3 to 0 in the calculation cohort are given in Table 1.

As described in detail in the Methods section, after testing various combinations of those parameters with the highest AUC value and stepwise eliminating those parameters with no influence on the score's predictive power, the optimal combination of clinical and laboratory parameters resulted in a score consisting of 9 parameters in five categories (Table 3).

The score's cut-off to assume the presence of late-onset sepsis in a VLBW infant was positivity in at least 2 of the score's 5 categories. Each category was defined positive when at least one of its parameters turned pathologic.

In the calculation cohort, this sepsis score had an AUC of 0.925 units (standard error 0.039). With a sensitivity of 89.3% and a specificity of 100%, the score correctly identified 25 of the 28 episodes of late-onset sepsis in the proven sepsis group and all infants in the non-sepsis group. Positive predictive value was 100% and negative predictive value 87.0%. The application of this sepsis score to the validation cohort confirmed its predictive power with a sensitivity of 84.0% and a specificity of 91.7%. Positive and negative predictive values were 87.5% and 89.2%, respectively. In all cases with a positive sepsis score on Day 0, that score was negative on Day -3 to -1.

In the "undetermined group" of the validation cohort, 70 % of infants received antibiotic treatment for at least 7 days. In 57% of these cases the sepsis score was negative.

For further analysis we divided the patients in the "undetermined group" according to the number of "pre-defined positive objective sepsis signs" into two sub-groups: probably infected (>2 signs) and probably not infected (< 3 signs). Our score correctly diagnosed all

of the 95 probably infected infants and 62% of the 33 probably not infected infants.

4. Discussion

In the light of a growing number of VLBW infants and their susceptibility to infections [1–8], we constructed a score to predict late-onset sepsis specifically in these patients. We prospectively monitored a pre-defined set of clinical and laboratory parameters in two large cohorts. Using the first cohort for calculation and the second for validation, our sepsis score distinguished those infants who developed late-onset sepsis from those who did not with a sensitivity of 84.0% and a specificity of 91.7%. When judging the scores' predictive value one has to be aware that the sepsis score contains, among others, the same signs as used in the sepsis definition by the Robert Koch institute mainly applied in our study.

This result is similar to that obtained when using modern laboratory parameters like cytokines but the score is faster available and supposedly cheaper, because it only requires routinely available laboratory values. Sensitivity and specificity of our score are similar to the models developed for other patient groups. While a misclassification of only 8% of infants as having sepsis is better than currently achieved in many intensive care units, 16% were incorrectly diagnosed as "without sepsis". The scoring system might have identified them later during the course of their sepsis but because any delay can substantially reduce outcome this is a high percentage. Because even a low rate of underdiagnosed infants will not be acceptable, in the presence of reasonable suspicion of sepsis antibiotic treatment should

not be withheld from score negative infants in order to avoid the risk of increased morbidity and mortality.

While our score is an additional tool to help diagnosing neonatal late-onset sepsis it should also be of value when comparing infants with sepsis in multi center studies. Infants in whom antibiotic treatment was started late during their course of sepsis the score should be higher compared to those infants with early treatment. Therefore, the score should be tested in a separate study if it allows NICUs with higher incidence of unfavorable outcome to prove that this is not a result of delayed treatment.

In order to obtain a score with high specificity, high cut-offs were used to identify those patients with clearly pathologic features. Such a score is prone to underdiagnose those infants whose parameters are just below the respective cut-off values, as the score might still be increasing in the first hours of developing sepsis. Those 16% of infants in the validation cohort who developed late-onset sepsis but were missed by our score all had 1 score point. 50% of them had parameters close to their cut-off, e.g. a base excess of -6.8 mmol/L or an 11% reduction of enteral feeds. All these infants received antibiotic treatment before the respective parameters turned pathologic according to our cut-off, which happened in 75% of these cases.

We classified infants according to the definitions for non culture-proven sepsis defined by the Robert Koch institute, which do not demand a positive blood culture to diagnose late-onset sepsis. This definition was established because even under ideal conditions blood cultures have a sensitivity of only 80% [11]. This classification system is supported by the fact that, in both studies, none of the infants who died in the course of clinical sepsis had a positive blood culture. Evidence of infection could not be found in any of the events of death in the undetermined groups.

While during the first study 28 episodes of blood culture positive sepsis were observed, we were surprised to see the substantially reduced rate of positive blood cultures in the second study in spite of its longer duration. Our primary assumption that this effect may be attributable to a reduced duration of invasive procedures like intratracheal ventilation or central lines did not turn out to be true. We suppose that the reduced number of positive blood cultures in the second study may be due to the increased alertness of the NICU staff after 19 month of recording sepsis symptoms. Such a decline in the frequency of culture-positive sepsis over time has been observed by most neonatologists. Furthermore, we can not exclude an effect due to a partial change of participating centers.

Ten of all 32 positive blood cultures grew Gram negative organisms which are known to cause more severe morbidity and higher mortality rates among VLBW infants compared to Gram positive pathogens. Those infants did not have a higher mean sepsis score. A scoring system specifically focusing on the prediction of high virulence pathogens may be of use to further improve outcome of VLBW infants.

While seeking a predictive indicator for late-onset sepsis, we attached importance to practicability and objectivity by using parameters that were both easily obtained and objectively measured. For that purpose, we included parameters like the amount of enteral feeds or the capillary refill time and abstained from more subjective parameters like feeding intolerance or cold hands and feet. Whilst the highest possible level of objectivity is provided by laboratory values, their exclusive use makes a score depend on their availability and the time lapse between blood sampling and obtaining the results. Furthermore, Guida et al. showed that both the extent and the duration of thrombocytopenia depend on the organism causing late-onset sepsis in VLBW infants: the most pathologic values are found in Gram-negative and fungal sepsis [12]. We obtained 10 blood cultures containing these organisms; 8 were accompanied by thrombocytopenia $< 150.000/\mu\text{l}$ compared to only 7 of the 22 in both studies with Gram-positive organisms. The validity of a clinical sepsis score created by Kudawla et al. rose significantly when combining it with laboratory screening parameters [13]. Consequently, a score consisting of both clinical and laboratory parameters will less likely be misleading compared to a score that is exclusively based on one of these areas.

In the validation cohort, all infants with a positive sepsis score on Day 0 scored negative on Day -3 to -1 . This finding throughout all participating NICUs might indicate the rapid deterioration and severity of the disease: as neonatal sepsis is known to become symptomatic and life threatening within very short periods, we assume that, during onset of sepsis, the score turned positive within hours. We only evaluated the score once daily. This might be the major reason for false negative results in our sepsis score. In contrast, in daily routine infants would be looked after every two to three hours which will increase the value of the scoring system.

For the development of our score we only included those infants who could be clearly assigned to either the proven sepsis or to the non-sepsis group. Our stringent definition assigned most of the enrolled infants to the undetermined group, which consequently resulted in

comparably low sample sizes for the sepsis and the non-sepsis group as a limitation to the validity of this study.

Because infants in the undetermined group were neither definitely septic nor definitely non-septic they had to be precluded from the development of the sepsis score. If nevertheless the final score is applied to the undetermined group of the validation cohort it proved its predictive power even in this mixed population.

Unfortunately, 32% of all primarily enrolled infants were excluded from the study, because parents did not give their informed consent or because they were transferred from the participating level 3 NICUs to those closer to home as soon as they were stable enough. The study protocol and the ethical approval did not include to collect data on these infants. We therefore can only assume that this group of infants is similar to that included into the study.

Historically, the first score to diagnose late-onset sepsis in neonates was the NOSEP score created by Mahieu et al. in 2000, one of the latest scores results from the findings of Griffin et al. in 2007. The NOSEP score consists of 5 parameters: three laboratory variables (CRP ≥ 14 mg/L, thrombocytopenia $< 150,000 /\mu\text{L}$, neutrophil fraction $> 50\%$), one clinical factor (fever $> 38.2^\circ\text{C} = 100.8^\circ\text{F}$), and one risk factor (parenteral nutrition for ≥ 14 days) [14,15]. An increased CRP and thrombocytopenia have been valuable parameters also in our calculation, but the neutrophil fraction was not used for our score because of its wide normal range during the first days of life [16]. The latter would not allow using the neutrophil fraction in an age-independent score. Instead, our score contains the IT-ratio, which is known to be a reliable and early sepsis parameter if the correct definition is used [17]. Therefore, both CRP and the IT-ratio were included in our score in spite of them not having been measured daily for ethical reasons. A slightly lower than usual cut-off of 0.15 for IT-ratio actually offered the best predictive accuracy in our study. Body temperature was not of sufficient significance in our calculations; it may have been influenced by adjustments of the incubator temperature. Consistent with our results, Griffin et al. found that symptoms like feeding problems, apneas, increased IT-ratio, and hyperglycemia were significantly associated with the onset of sepsis [18]. Recently, Modi et al. developed a predictive model for surveillance of neonatal blood stream infections using data from small for gestational age preterm infants. Their selection of 12 symptoms evaluated as suggestive to neonatal sepsis contained all the clinical parameters combined in our score. They

found that the presence of at least 3 clinical signs out of their selection had the best predictive accuracy for a positive blood culture during late-onset sepsis [19]. The sepsis score developed in this study requires the evaluation of only 9 parameters, which offers an even higher practicability.

The NOSEP score and the sepsis score by Griffin et al. must be regarded as different from the one presented here because they do not specifically refer to VLBW infants. These infants require special considerations because clinical symptoms considered to be indicators of sepsis like apneas, are frequently seen in the absence of an infection in these infants. In addition, traditional laboratory parameters like CRP reach pathological values in only 50% of cases with proven sepsis [10,20]. More recently, several cytokines like TNF- α , interleukin-6 and interleukin-8 as well as other immunological markers like CD64 or serum amyloid A have been shown to by itself or in combination be able to predict neonatal sepsis with high sensitivity and specificity [20–22]. A combination of these markers with our sepsis score may have a high diagnostic capability [22].

As VLBW infants are a growing group of patients, more practicable and effective approaches to predict late-onset sepsis specifically in these infants are required. The usefulness of our sepsis score in daily clinical life to reduce unnecessary antibiotic treatment as well as to classify infants in multi center trials should be tested in a prospective study.

Acknowledgements

We thank Iwona Chudek, M.D., and Juraj Zbojan, M.D., for their kind assistance with collecting data sets and the staff of the following participating NICUs for the dedicative care of these critically ill patients and their help in performing the studies:

1. University Women's Hospital, Maistrasse, Munich, Germany
2. Neonatology, University Hospital Großhadern, Marchioninistrasse, Munich, Germany
3. University Children's Hospital Schwabing, Technical University, Kölner Platz, Munich, Germany
4. University Children's Hospital, Anichstrasse, Innsbruck, Austria
5. Dr von Hauner Children's Hospital, Lindwurmstrasse, Munich, Germany
6. Children's Hospital F. D. Roosevelt, Banska Bystrica, Slovakia

7. Neonatology, University Hospital Rechts der Isar, Technical University, Ismaninger Strasse, Munich, Germany
8. Children's Hospital, Medykow 16, Katowice, Poland

The NICUs 1 to 4 participated in both studies, 5 and 6 exclusively in study 1, 7 and 8 exclusively in study 2.

We also thank the Wilhelm Vaillant-Stiftung, Munich, Germany, for partly funding the studies.

Financial disclosure

The authors do not have any financial interest to disclose.

References

- [1] J.O. Klein and S.M. Marcy, Bacterial sepsis and meningitis, in: *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, J.S. Remington and J.O. Klein, eds, Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
- [2] A.A. Fanaroff, S.B. Korones, L.L. Wright et al., Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants, *Pediatr Infect Dis J* **17** (1998), 593–597.
- [3] B.J. Stoll, T. Gordon, S.B. Korones et al., Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, *J Pediatr* **129** (1996), 63–71.
- [4] B.J. Stoll, T. Gordon, S.B. Korones et al., Early-onset sepsis in very low birthweight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, *J Pediatr* **129** (1996), 72–80.
- [5] R.P. Gaynes, J.R. Edwards, W.R. Jarvis, D.H. Culver, J.S. Tolson and W.J. Martone, Nosocomial infections among neonates in high risk nurseries in the United States, *Pediatrics* **98** (1996), 357–361.
- [6] B.J. Stoll, N. Hansen, A.A. Fanaroff et al., Late-onset-sepsis in very low birthweight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network, *Pediatrics* **110** (2002), 285–291.
- [7] M.J. Bizzarro, C. Raskind, R.S. Baltimore and P.G. Gallagher, Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928–2003, *Pediatrics* **116** (2005), 595–602.
- [8] V. Khadilkar, D. Tudehope and S. Fraser, A prospective study of nosocomial infection in a neonatal intensive care unit, *J Pediatr Child Health* **31** (1995), 387–391.
- [9] C.J. Dewhurst, R.W. Cooke and M.A. Turner, Clinician observation of physiological trend monitoring to identify late-onset sepsis in preterm infants, *Acta Paediatr* **97** (2008), 1187–1191.
- [10] H. Küster, M. Weiss, A.E. Willeitner et al., Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation, *Lancet* **352** (1998), 1271–1277.
- [11] J.S. Gerdes, Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis, *Clin Perinatol* **18** (1991), 361–379.
- [12] J.D. Guida, A.M. Kunig, K.H. Leef, S.E. McKenzie and D.A. Paul, Platelet count and sepsis in very low birth weight neonates: is there an organism-specific response? *Pediatrics* **111** (2003), 1411–1415.
- [13] M. Kudawla, S. Dutta and A. Narang, Validation of a clinical score for the diagnosis of late onset neonatal septicemia in babies weighing 1000–2500 g, *J Trop Pediatr* **54** (2008), 66–69.
- [14] L.M. Mahieu, A.O. De Muynck, J.J. De Dooy, S.M. Laroche and K.J. Van Acker, Prediction of nosocomial sepsis in neonates by means of a computer-weighted bedside scoring system (NOSEP score), *Crit Care Med* **28** (2000), 2166–2167.
- [15] D. Vidyasagar, A new score to detect neonatal nosocomial infection: “a rule of 14”, *Crit Care Med* **28** (2000), 2166–2167.
- [16] B.W. Lloyd and A. Oto, Normal values for mature and immature neutrophils in very preterm babies, *Arch Dis Child* **57** (1982), 233–235.
- [17] N.J. Mathers and G. Pohlandt, Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection, *Eur J Pediatr* **146** (1987), 147–151.
- [18] M.P. Griffin, D.E. Lake, T.M. O’Shea and J.R. Moorman, Heart rate characteristics and clinical signs in neonatal sepsis, *Pediatr Res* **61** (2007), 222–227.
- [19] N. Modi, C.J. Doré, A. Saraswatula et al., A case-definition for national and international bloodstream infection surveillance, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **94** (2009), F8–12.
- [20] M.M. Mussi-Pinhata and S.D. do Nascimento, Neonatal nosocomial infections, *J Pediatr (Rio J)* **77** (2001), 81–96.
- [21] P.C. Ng, S.H. Cheng, K.M. Chui et al., Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **77** (1997), 221–227.
- [22] P.C. Ng and H.S. Lam, Diagnostic markers for neonatal sepsis, *Curr Opin Pediatr* **18** (2006), 125–131.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Landshut, den 01.02.2011

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------|--------------------------------|
| Name | Anja Höpfl (geb. Lutzenberger) |
| Geburtsdatum | 02.06.1980 |
| Geburtsort | München |
| Familienstand | verheiratet |
| Nationalität | deutsch |

Schulbildung

| | |
|-------------------|--|
| 09/1986 - 08/1990 | Volksschule Grafrath |
| 09/1990 - 07/1999 | Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien (Abschluss Abitur) |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 03/2000 - 06/2006 | Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 03/2002 | Ärztliche Vorprüfung |
| 03/2003 | 1. Staatsexamen |
| 03/2005 | 2. Staatsexamen |
| 04/2006 | 3. Staatsexamen |

Ärztliche Tätigkeit

| | |
|-------------------|---|
| 07/2006 - 05/2008 | Assistenzärztin in der pädiatrischen Abteilung des Klinikums Landsberg am Lech |
| seit 08/2008 | Assistenzärztin im Kinderkrankenhaus St. Marien in Landshut |

Landshut, den 01.02.2011

11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Rolf-Dieter Stenger danke ich für seine freundliche Bereitschaft, mich als Doktorvater zu betreuen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Helmut Küster für seine Betreuung und engagierte Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Ich möchte mich bei den Ärzten und Schwestern der teilnehmenden neonatologischen Intensivstationen für ihre engagierte Fürsorge für die kleinen Patienten und die ausführliche Dokumentation bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt dabei Frau Dr. Tina Arenz, Herrn Prof. Dr. Gert Lipowsky, Herrn Prof. Dr. Ralf Geiger, Herrn Prof. Dr. Andreas Schulze, Herrn Prof. Dr. Georg Simbruner, Frau Dr. Ilse Engelsberger, Frau Dr. Andrea Zimmermann, Herrn Dr. Juraj Zbojan und Frau Dr. Iwona Chudek.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Andrea Willeitner, Frau Michaela Kretz und Frau Mahnaz Sadat für ihre Mithilfe bei der Datenverarbeitung sowie Frau Dr. Tanja Meier für ihre Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen Eltern sowie meinem Ehemann, die mir während meiner Ausbildung und bei der Erstellung dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.