

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

***Untersuchungen am Trachealaspirat
beatmeter Früh- und Reifgeborener
zur Infektionsdiagnostik und Prädiktion
der Bronchopulmonalen Dysplasie
- eine Pilotstudie***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Nina Herrmann
aus Gießen

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 28.01.2019.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Maier

Korreferent: Herr Prof. Dr. P. Alter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Früh- und Reifgeborene	10
1.2 Bronchopulmonale Dysplasie	11
1.2.1 Diagnose der BPD	12
1.2.2 Risikofaktoren für die Entstehung einer BPD	13
1.2.2.1 Frühgeburtlichkeit	13
1.2.2.2 Mechanische Beatmung und Sauerstoffapplikation	13
1.2.2.3 Infektion und Inflammation	14
1.2.2.4 Genetische Prädisposition	14
1.2.3 Folgen der BPD	14
1.3 Infektionen bei Früh- und Reifgeborenen	15
1.3.1 Definition und Einteilung von Infektionen	16
1.3.2 Infektionsformen bei Neugeborenen	17
1.3.2.1 Early-Onset Infektionen	17
1.3.2.2 Late-Onset Infektionen	18
1.4 Diagnostische Methoden	18
1.4.1 Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen	18
1.4.1.1 Klinische Diagnose einer Infektion	19
1.4.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen	22
1.4.1.3 Laborchemische Diagnose einer Infektion	23
1.4.2 Untersuchung am Trachealaspirat zur Diagnostik von neonatalen Infektionen und Prädiktion der BPD	25
1.4.2.1 Zytokinanalytik am Trachealaspirat	25
1.4.2.2 Die Elektronische Nase: Diagnostik mittels Geruchsanalyse	26
1.4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen am Trachealaspirat	27
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	29
2. Material, Methoden und Patienten	30
2.1 Patienten und Probengewinnung	30
2.1.1 Patienten	30
2.1.1.1 Einschlusskriterien	30

2.1.1.2	Ausschlusskriterien	30
2.1.1.3	Ethik	30
2.1.1.4	Einverständnis	30
2.1.2	Dokumentation klinischer Daten	31
2.1.3	Patienteneinteilung	31
2.1.3.1	Gruppierung nach Gestationsalter	31
2.1.3.2	Einteilung bezüglich des Vorhandenseins einer Infektion	32
2.1.3.3	Einteilung bezüglich des Vorliegens einer BPD	32
2.1.4	Trachealaspiratproben	33
2.1.4.1	Gewinnung der Trachealaspiratproben	33
2.1.4.2	Verarbeitung der Trachealaspiratproben	34
2.2	Protein- und Zytokinquantifizierung	34
2.2.1	Verwendete Materialien zur Protein- und Zytokinquantifizierung	34
2.2.2	Versuchsaufbau zur Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.2.2.1	Versuchsablauf zur Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.2.3	Versuchsaufbau zur Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ und IL-6	37
2.2.3.1	Versuchsablauf ELISA	38
2.3	Elektronische Nase / Smellprints	40
2.3.1	Die Elektronische Nase „Cyranose C-320“	40
2.3.2	Verwendete Materialien zur Analyse der Smellprints	41
2.3.3	Versuchsablauf zur Analyse der Smellprints	41
2.4	Mikrobiologische Analysen	41
2.4.1	Versuchsaufbau der genomischen Keimdiagnostik (DHPLC/WAVE®)	42
2.5	Statistische Auswertung	44
2.5.1	Auswertung der klinischen Daten, der mikrobiologischen Analyse und der Zytokinquantifizierung	44
2.5.2	Auswertung der Smellprints der Elektronischen Nase	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	45
3.1.1	Mehrfachentnahmen	45
3.1.2	Entnahmezeitpunkte	45
3.2	Auswertung der klinischen Daten	45
3.2.3	Reifegruppierung	45
3.2.1	Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD	46
3.2.2	Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf das Vorliegen einer Infektion	47

3.3 Zytokinquantifizierung	48
3.3.1 Zytokinkonzentrationen bei späterer Entwicklung einer BPD	48
3.3.2 Zytokinkonzentrationen bei Infektionen	49
3.3.3 Zytokinkonzentration und mikrobiologische Befunde	50
3.4 Elektronische Nase / Smellprints	50
3.4.1 Smellprints bei Infektionen	50
3.4.2 Smellprints bei späterer Entwicklung einer BPD	52
3.5 Mikrobiologische Analysen	53
3.5.1 Vergleich der konventionellen und genomischen Analysemethoden	53
3.5.1.1 Genomische Diagnostik	53
3.5.1.2 Konventionelle mikrobiologische Diagnostik	53
3.5.1.3 Vergleich der Befunde beider bakteriologischer Nachweismethoden	54
3.5.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen	55
3.5.2.1 Identifizierte Bakterienspezies	55
3.5.2.2 Bakterienspezies beider bakteriologischer Nachweismethoden	55
3.5.3 Mikrobiologische Befunde bei späterer Entwicklung einer BPD	56
3.5.3.1 Häufigkeiten mikrobiologischer Keimfunde bei späterer Entwicklung einer BPD	56
3.5.3.2 Bakterienspezies bei späterer Entwicklung einer BPD	57
4. Diskussion	58
4.1 Auswertung der klinischen Daten	58
4.1.1 BPD	58
4.1.2 Infektion	58
4.2 Zytokinquantifizierung	58
4.2.1 Quantifizierung von Interleukin-6 und Interferon Gamma	58
4.2.1.1 Methodik	58
4.2.2 Zytokinkonzentrationen bei späterer Entwicklung einer BPD	60
4.2.3 Zytokinkonzentrationen bei Infektionen	61
4.2.4 Zytokinkonzentration und mikrobiologische Befunde	62
4.3 Smellprints / Elektronische Nase	62
4.3.1 Smellprints bei Infektion	62
4.3.2 Smellprints bei späterer Entwicklung einer BPD	63
4.4 Mikrobiologische Analysen	64
4.4.1 Vergleich beider Analysemethoden	64
4.4.1.1 Stellenwert einer molekularen Analyse	65

4.4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen	66
4.4.2.1 Identifizierte Bakterienspezies	66
4.4.2.2 Bakterienspezies beider bakteriologischer Nachweisverfahren	67
4.4.3 Mikrobiologische Befunde bei späterer Entwicklung einer BPD	67
4.5 Stärken und Schwächen der vorliegenden Studie	68
4.6 Fazit und Schlussfolgerung	70
5. Zusammenfassung	72
5.1 Deutsche Zusammenfassung	72
5.2 Englische Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	75
7. Anhang	87
SOP „Gewinnung von Trachealspirat bei Frühgeborenen“	87
Patientenübersicht	88
Veröffentlichungen	89
Verzeichnis der akademischen Lehrer	90
Danksagung	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Diagnose und Stadieneinteilung der BPD bei Frühgeborenen < 32 SSW _____	12
Abbildung 2 Risiko- und Einflussfaktoren für die Entwicklung der BPD in den Phasen der Lungenentwicklung (nach Baraldi und Filippone, 2007) _____	13
Abbildung 3 Gruppierung der Patienten nach Gestationsalter _____	32
Abbildung 4 Infektionsscore _____	32
Abbildung 5 Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA für IL-6 (eigene Darstellung) ____	37
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Cyanose 320, mit freundlicher Genehmigung des Erstellers Akira Hattesohtl _____	40
Abbildung 7 Schematische Darstellung des DHPLC/WAVE-Systems _____	43
Abbildung 8 Übersicht der Anzahl der Patienten und Proben pro Reifegruppe _____	46
Abbildung 9 Boxplot der IL- 6 -Konzentrationen im Trachealspirat bei Patienten mit und ohne spätere Entwicklung einer BPD _____	48
Abbildung 10 Boxplot der IFN- γ -Konzentrationen im Trachealspirat bei Patienten mit und ohne spätere Entwicklung einer BPD _____	49
Abbildung 11 Graphische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints im Hinblick auf das Vorliegen einer systemischen Infektion (Weiß hervorgehobene Patientennummern entsprechen Patienten, bei denen Trachealspiratproben vor und nach dem Auftreten einer Infektion untersucht wurden) _____	51
Abbildung 12 Graphische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints im Hinblick auf die spätere Entwicklung einer BPD _____	52
Abbildung 13 Nachweishäufigkeit von Bakterien-Genomen mittels genomischer mikrobiologischer Analyse der Trachealspiratproben _____	53
Abbildung 14 Bakteriennachweise mittels konventioneller mikrobiologischer Analyse der Trachealspiratproben _____	53
Abbildung 15 Flussdiagramm zum Vergleich der Ergebnisse beider mikrobiologischer Untersuchungsmethoden _____	54
Abbildung 16 Identifizierte Bakterienspezies in den Trachealspiratproben mittels genomischer und konventioneller Analyse _____	55
Abbildung 17 Häufigkeit der mikrobiologischen Befunde nach Nachweismethode _____	56
Abbildung 18 Häufigkeiten der positiven mikrobiellen Befunde im Hinblick auf die spätere Entwicklung einer BPD _____	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Symptome einer Sepsis nach Kriterien des NEO-KISS Surveillance Systems nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen, modifiziert nach (Leistner et al., 2013) _____	20
Tabelle 2 Auflistung weiterer klinischer Hinweise auf das Vorliegen bakterieller Infektionen bei Neugeborenen, modifiziert nach Checkliste Neonatologie, 4.Auflage, Thieme (Roos et al., 2010) _____	21
Tabelle 3 Erhobene klinische und laborchemische Parameter der Patienten _____	31
Tabelle 4 Materialien zur Trachealspiratgewinnung _____	33
Tabelle 5 Geräte und Software zur Protein- und Zytokinquantifizierung _____	34
Tabelle 6 Materialien zur Protein- und Zytokinquantifizierung _____	35
Tabelle 7 Verdünnungsstufen des BCA-Assays zur Proteinbestimmung _____	36
Tabelle 8 Verdünnungsstufen der Trachealspiratproben zur Proteinbestimmung _____	36
Tabelle 9 Verdünnungsreihe zur Bestimmung von IFN- γ und IL-6 _____	38
Tabelle 10 Materialien, Geräte und Software der Elektronischen Nase _____	41
Tabelle 11 Auswertung der klinischen Daten nach Reifegruppe _____	46
Tabelle 12 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD ____	47
Tabelle 13 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf das Vorliegen des Infektionsscores _____	47
Tabelle 14 Statistische Auswertung der Smellprints bei Patienten mit Zeichen einer systemischen Infektion (inf+) sowie Patienten ohne Infektionszeichen (inf-) in Abhängigkeit von einem Keimnachweis (germ+/-) _____	51
Tabelle 15 Identifizierte Bakterienspezies bei Patienten mit späterer Entwicklung einer BPD	57

Abkürzungsverzeichnis

16S-rDNA	Desoxyribonukleinsäure, die für den 16S-Anteil der kleinen Untereinheit der Ribosomen kodiert
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, USA
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure (Atemunterstützung mit dauerhaftem positiven endexpiratorischen Druck)
CRP	C-reaktives Protein
CVV	Kreuzvalidierungswert
CXCL 10	Chemokin IP-10
DHPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBC	Exhaled Breath Condensate (kondensierte Ausatemluft)
ELF	Epithelial Lining Fluid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzymatisches Immunadsorptionsverfahren)
Enose	Elektronische Nase
FiO ₂	Fraction of Inspired Oxygen = inspiratorische Sauerstofffraktion
GA	Gestationsalter
germ-	Keimnachweis negativ
germ+	Keimnachweis positiv
I/T	unreife / gesamte Neutrophile
IFN- γ	Interferon Gamma
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
inf-	Infektionsscore negativ
inf+	Infektionsscore positiv
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
MD	Mahalanobis-Distanz
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
NG	Neugeborenes
NIH	National Institutes of Health, USA
p.m.	post menstruationem
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
ScIgA	sekretorische Komponente des Immunglobulins A
sp.	species
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VOCs	Volatile Organic Compounds (volatile organische Verbindungen)

1. Einleitung

1.1 Früh- und Reifgeborene

Ein Kind, das mit einem Gestationsalter von weniger als 259 Tagen post menstruationem (p.m.) geboren wird, ist per definitionem ein Frühgeborenes. Dies entspricht einer Geburt vor Erreichen von 37 vollendeten Schwangerschaftswochen (SSW).

In Deutschland kommen derzeit etwa 12% der Kinder als Frühgeborene zur Welt (Weichert et al., 2015). Dabei haben 0,8–1,5% der Neugeborenen ein Geburtsgewicht von < 1500g und 0,3–0,6% der Lebendgeborenen ein Geburtsgewicht von < 1000g (Jorch und Hübler, 2010). In den letzten Jahrzehnten ist die Rate an Frühgeborenen gestiegen (Blencowe et al., 2012), (Weichert et al., 2015). Dies liegt zum einen am vermehrten Einsatz reproduktionsmedizinischer Maßnahmen, zum anderen an der damit einhergehenden Anzahl an Mehrlingsschwangerschaften (Schieve et al., 2002). Zudem steigen die Zahlen medizinisch indizierter Frühgeburten, so zum Beispiel beim Auftreten maternaler Erkrankungen wie Gestosen. Aber auch fetale Indikationen, wie die intrauterine Wachstumsretardierung bei plazentarer Minderversorgung des Feten, können eine verfrühte Beendigung der Schwangerschaft notwendig machen (Ananth et al., 2005).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Frühgeborenen hat sich in den letzten Jahrzehnten durch den kontinuierlichen Fortschritt im Bereich der Neonatologie stetig verbessert. Insbesondere durch den Einsatz antenataler Kortikosteroide zur Lungenreifeinduktion, die Anpassung der Beatmungsformen und die Surfactantapplikation beim Atemnotsyndrom der Frühgeborenen konnte die Sterblichkeit bei Frühgeborenen gesenkt werden (Philip, 2005).

Trotzdem sind Erkrankungen, die mit der Unreife der Organsysteme einhergehen, verantwortlich für Morbidität und Mortalität bei Frühgeborenen. Zu den häufigsten Erkrankungen zählen unter anderem das Atemnotsyndrom, die Bronchopulmonale Dysplasie, intraventrikuläre Hirnblutungen und die periventrikuläre Leukomalazie, Infektionserkrankungen sowie die nekrotisierende Enterokolitis (Fanaroff et al., 2007), (Bassler et al., 2009), (Gouyon et al., 2012).

Auch wenn der Großteil der Patienten auf neonatologischen Stationen Frühgeborene sind, benötigen gelegentlich auch Reifgeborene medizinische Unterstützung. So ist bei Reifgeborenen eine neonatologische Betreuung häufig bei respiratorischen Anpassungsstörungen, Infektionen, Hypoglykämien oder als Folge von geburtshilflichen Komplikationen sowie bei kongenitalen Fehlbildungen notwendig (Synnes et al., 2004), (Darlow et al., 2009), (Alkiaat et al., 2013).

Die Bronchopulmonale Dysplasie und Neugeboreneninfektionen gehören zu den schwerwiegendsten Erkrankungen in der Neonatalperiode (Bassler et al., 2009), (Oza et al., 2015).

Deshalb widmet sich diese Arbeit der frühen Prädiktion der Bronchopulmonalen Dysplasie bei Frühgeborenen sowie der Infektionsdiagnostik bei Früh- und Reifgeborenen.

1.2 Bronchopulmonale Dysplasie

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine chronische Lungenerkrankung, die vor allem bei Frühgeborenen auftritt. Sie trägt zur Mortalität und Morbidität Frühgeborener bei und kann schwerwiegende Folgen bis in das Erwachsenenalter haben (Ehrenkranz et al., 2005).

In westlichen Ländern entwickeln bis zu 40% der Frühgeborenen, die vor vollendeten 28 Schwangerschaftswochen geboren werden, eine BPD (Bancalari und Claure, 2006), (Davidson et al., 2017). Je nach Zentrum und Erhebung schwanken die Zahlen jedoch stark – nicht zuletzt durch Änderungen der Diagnosekriterien im Jahre 2000 (Stoll et al., 2010).

Trotz Verbesserung der Überlebenschancen Frühgeborener ist die Inzidenz der BPD über die letzten Jahrzehnte hinweg konstant geblieben. Parallel zum Fortschritt in der Neonatologie hat sich diese chronische Lungenerkrankung gewandelt. Durch die Veränderung der Pathogenese hat man die Erkrankung neu charakterisiert: Heute unterscheidet man die „alte BPD“ vor Einsatz von Surfactant zur Therapie des Atemnotsyndroms von der „neuen BPD“ in der Surfactant-Ära (Baraldi und Filippone, 2007).

Die ältere Form der BPD war vor allem durch eine beatmungsbedingte Verletzung der Lunge mit begleitender Toxizität durch applizierten Sauerstoff gekennzeichnet. Dies führte zu einem fibrotischen Umbau der Lunge (Northway et al., 1967), (Bonikos et al., 1976). Durch die pränatale Lungenreifinduktion mithilfe von Kortikosteroiden und den Einsatz von Surfactant ließ sich das Atemnotsyndrom verhindern beziehungsweise besser therapieren (Modanlou et al., 1996). Dadurch hat sich die Beatmungsdauer erheblich verkürzt. Zudem wurden die Beatmungsregimes grundlegend verändert. Der vermehrte Einsatz synchronisierter und nicht-invasiver Beatmungsmodi, die nicht-invasive Unterstützung der Atmung mit CPAP (Continuous Positive Airway Pressure), sowie gezielterer Sauerstoffeinsatz in Verbindung mit permissiver Hyperkapnie erbrachten positive Effekte bei der Vorbeugung der BPD (Ambalavanan und Carlo, 2006). Die neue BPD hingegen ist charakterisiert durch eine Entwicklungsunterbrechung der unreifen Lunge, die durch diverse auf die Lunge einwirkende Faktoren getriggert wird (Jobe, 1999). Sie geht einher mit einer Rarefizierung des Lungengewebes sowie verminderter Septierung und weniger großen Alveolen und somit einer geringeren Gasaustauschfläche (Coalson, 2006). Zudem kommt es zu einer Vaskularisierungsstörung der Lunge (Mourani und Abman, 2013).

Je geringer das Geburtsgewicht, desto höher ist die Inzidenz der BPD. Die BPD tritt heute vor allem bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von < 1250g auf (Walsh et al., 2006). Bei Frühgeborenen, die bei Geburt unter 700g wogen, erkrankten 85% (Vom Hove et al., 2011). Zur

primären Risikogruppe zählen somit Frühgeborene mit einem Gestationsalter von < 32 SSW. Ein Auftreten der Erkrankung bei reiferen Kindern ist mittlerweile eine Seltenheit (AWMF, 2009).

1.2.1 Diagnose der BPD

Eine BPD liegt laut den im Jahre 2000 neu erarbeiteten NIH-Konsensuskriterien vor, wenn bei einem Frühgeborenen über mindestens 28 Tage nach Geburt ein zusätzlicher Sauerstoffbedarf ($\text{FiO}_2 > 21\%$) besteht. Im korrigierten Reifealter von 36 Wochen p.m. oder bei der Entlassung aus der stationären Behandlung erfolgt die Schweregradeinteilung in Abhängigkeit von der zu diesem Zeitpunkt noch benötigten Sauerstofffraktion in der Einatemluft in milde, moderate oder schwere BPD. Dies gilt für Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 32 Schwangerschaftswochen wie in Abbildung 1 dargestellt. Bei reiferen Frühgeborenen, die nach vollendeten 32 Schwangerschaftswochen geboren wurden, gilt ein anderer Bewertungszeitraum. Hier erfolgt die Schweregradeinteilung am Entlassungstag des Kindes aus der stationären Behandlung, spätestens jedoch am 56. Lebenstag (Jobe und Bancalari, 2001).

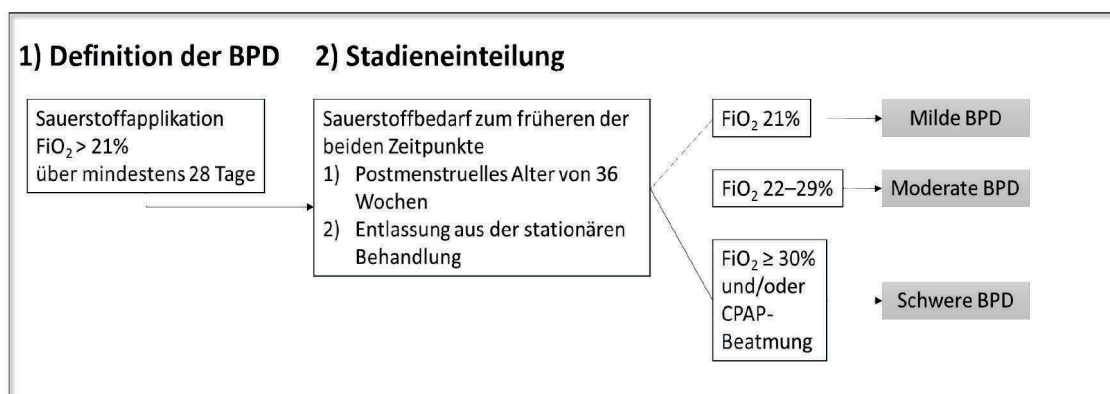


Abbildung 1 Diagnose und Stadieneinteilung der BPD bei Frühgeborenen < 32 SSW (nach AWMF, 2009)

Hieraus ergibt sich die Problematik, dass die Diagnose einer BPD erst sehr spät im Verlauf der Erkrankung gestellt werden kann, was sowohl die Prävention als auch das therapeutische Angehen der Erkrankung erschwert.

Laughon et al. haben bei sehr unreifen Frühgeborenen (Gestationsalter < 28 SSW) festgestellt, dass ein kontinuierlich erhöhter oder ansteigender Sauerstoffbedarf schon während der ersten 2 Lebenswochen in über der Hälfte der Fälle zur Entwicklung einer BPD führt (Laughon et al., 2009). Dennoch fehlen valide Frühparameter und Prädiktionsmodelle, um die Entstehung einer BPD vorherzusagen (Onland et al., 2013). Im klinischen Umfeld wurde der Begriff einer „sich entwickelnden BPD“ geprägt, um schon vor den Feststellungszeitpunkten der NIH-Kriterien Risikopatienten zu identifizieren und eine Therapie einzuleiten.

1.2.2 Risikofaktoren für die Entstehung einer BPD

Die Entstehung der BPD ist ein multifaktorielles Geschehen und betrifft die sich in Entwicklung befindliche Lunge. Einige wichtige Risikofaktoren sind im folgenden Kapitel und in Abbildung 2 aufgeführt.

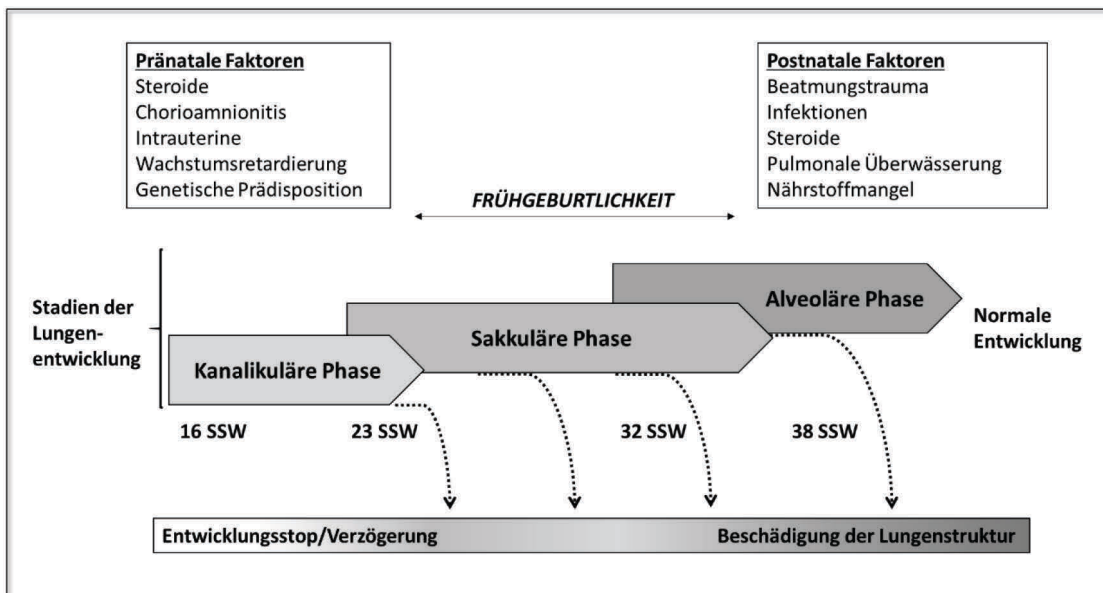


Abbildung 2 Risiko- und Einflussfaktoren für die Entwicklung der BPD in den Phasen der Lungenentwicklung (nach Baraldi und Filippone, 2007)

1.2.2.1 Frühgeburtlichkeit

Die Frühgeburtlichkeit ist ein bedeutender Risikofaktor der neuen BPD, deren Pathogenese auf die Unreife der Lunge zurückzuführen ist (Jensen und Schmidt, 2014). Wird die intrauterine Lungenentwicklung im sakkulären Stadium vor der Alveolarisierung durch frühzeitige Geburt unterbrochen, kann die extrauterine Weiterentwicklung durch Störfaktoren beeinflusst und behindert werden (Jobe, 1999). Auch eine fetale Wachstumsretardierung vor 28 Schwangerschaftswochen wurde als Risikofaktor für die Entstehung einer BPD beschrieben (Bose et al., 2009).

1.2.2.2 Mechanische Beatmung und Sauerstoffapplikation

Die invasive Beatmung war maßgeblich verantwortlich für die Entstehung der alten BPD, die mit strukturellen beatmungsassoziierten Lungenschäden einherging. Sie spielt aber auch bei der neuen Form der BPD eine wichtige Rolle in der Pathogenese (Kair et al., 2012). Insbesondere durch hohe Beatmungsvolumina kann die unreife Lunge Schaden nehmen (Lan und Bhutani, 2011).

Ein weiterer Risikofaktor ist die Toxizität durch den bei der Erstversorgung oder Beatmung applizierten Sauerstoff (Saugstad, 2010). In verschiedenen Tiermodellen verhinderten hohe

Sauerstoffkonzentrationen die hypoxieinduzierte Weiterreifung der Lungen, führten zu einer Lungenschädigung durch oxidativen Stress und ergaben ein der BPD ähnliches Bild (Buczynski et al., 2013).

1.2.2.3 Infektion und Inflammation

Der nach dem derzeitigen Kenntnisstand wichtigste Risikofaktor für die Entstehung der BPD ist ein multiätiologisches Entzündungsgeschehen (Speer, 2009), (Bhandari, 2014), (Jobe, 2015). Durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Botenstoffen kommt es zur Schädigung des Lungengewebes. Das entzündliche Milieu führt zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität, durch Entzündungs- und Reparationsprozesse wird die Lungenentwicklung negativ beeinflusst (Ryan et al., 2008).

Sowohl pränatale Infektionen wie die Chorioamnionitis als auch postnatale Infektionen begünstigen die Entwicklung einer BPD (Van Marter et al., 2002), (Lahra et al., 2009), (Thomas und Speer, 2014). Bei Patienten, die im Verlauf eine BPD entwickeln, können erhöhte Serumkonzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 6 und Interleukin 8 nachgewiesen werden (Vento et al., 2006), (Paananen et al., 2009). Aber auch nichtinfektiöse Reize durch mechanische Beatmung oder hohe Sauerstoffkonzentrationen können durch Freisetzung von Zytokinen ein inflammatorisches Geschehen fördern (Rozycki et al., 2002), (Bhandari, 2014).

1.2.2.4 Genetische Prädisposition

Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise auf eine genetische Komponente bei der Entstehung der BPD (Bhandari und Gruen, 2006). Einige Gen-Polymorphismen, die Einfluss auf die Empfänglichkeit der Lunge für diese chronische Erkrankung haben, wurden identifiziert. So konnten Kazzi und Quasney zeigen, dass ein bestimmter Genotyp der Allele des ACE-Gens (Angiotensin-konvertierendes Enzym-Gen) mit der Entstehung und dem Schweregrad der BPD assoziiert ist (Kazzi und Quasney, 2005).

1.2.3 Folgen der BPD

Frühgeborene mit einer BPD haben eine erhöhte Mortalitätsrate, die mit der Dauer der Beatmung und mit dem Auftreten einer Infektion steigt (Overstreet et al., 1991), (Landry und Menzies, 2011).

Betroffene Patienten werden im ersten Lebensjahr deutlich häufiger aufgrund respiratorischer Infekte rehospitalisiert als Kinder ohne BPD (Smith et al., 2004). Diese Infekte verlaufen bei Kindern mit bestehender BPD deutlich schwerer. Besonders gefährdet sind sie durch Infektionen mit dem Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) (Sommer et al., 2011).

Spätfolgen der BPD treten sowohl bei der alten Form der BPD als auch bei der neuen Form auf (Carlo, 2013). Bei Patienten mit BPD zeigen sich gehäuft entwicklungsneurologische Rückstände (Anderson und Doyle, 2006). Diese treten insbesondere bei Betroffenen mit hohen Schweregraden der Erkrankung auf.

Korhonen et al. beschreiben, dass bei betroffenen Kindern im Grundschulalter häufig Atemwegsobstruktionen und eine Überblähung der Lunge festgestellt werden können (Korhonen et al., 2004). Im Vergleich zu anderen Frühgeborenen zeigen sich bei Kindern mit BPD im Schulalter insgesamt schlechtere Lungenfunktionsparameter sowie vermehrt asthmatische Beschwerden (Vom Hove et al., 2014). Nach einer Untersuchung von Doyle et al. kann die Lungenfunktion auch noch nach Erreichen der Volljährigkeit eingeschränkt sein (Doyle et al., 2006). Bemerkenswert ist, dass die meisten BPD-Patienten im Verlauf trotz Einschränkungen der Lungenfunktion keine Symptome aufweisen (Vom Hove et al., 2011).

1.3 Infektionen bei Früh- und Reifgeborenen

Weltweit sterben 4 Millionen Neugeborene jährlich, schätzungsweise 36% davon an Infektionskrankungen. Obwohl die Zahlen deutliche regionale Unterschiede aufweisen und sowohl von der medizinischen Versorgung als auch von individuellen Risikofaktoren abhängen, sind auch in hoch entwickelten Ländern wie Deutschland neonatale Infektionen nicht zu unterschätzen (Shane und Stoll, 2014). Trotz der enorm verbesserten medizinischen Versorgung und der Fortschritte auf dem Gebiet der perinatalen Medizin zählen Infektionen nach wie vor zu den häufigsten Erkrankungen von Neugeborenen und sind sowohl mit einer hohen Mortalität als auch Morbidität verbunden (Philip, 2005).

In Europa erkranken zurzeit circa 7 von 1000 Lebendgeborenen an neonatalen Infektionen, wobei 82% der Infektionen bei Frühgeborenen auftreten (Vergnano et al., 2011). Insbesondere invasive bakterielle Infektionen wie eine Pneumonie, eine Sepsis oder auch die nekrotisierende Enterokolitis können mit schweren Folgeschäden einhergehen. Sie sind zudem in Deutschland hauptverantwortlich für die Mortalität und Morbidität sehr unreifer Frühgeborener (Stichtenoth et al., 2012).

Durch die sich kontinuierlich verbessernden Überlebenschancen auch extrem unreifer Frühgeborener wächst die Haupt-Risikogruppe für peri- und postnatale wie auch nosokomiale Infektionen (Stoll und Hansen, 2003), (Blencowe et al., 2012). Trotz des allgemeinen Fortschritts der Neonatalmedizin konnte die Inzidenz der neonatalen Sepsis in den letzten Jahren nicht gesenkt werden (Hornik et al., 2012). So erkrankten in einem von Stoll et al. beschriebenen Patientenkollektiv 36% der Frühgeborenen mit einem Gewicht von < 1500g an einer Late-Onset

Sepsis, wobei die Erkrankungsfälle mit zunehmendem Gestationsalter seltener wurden (Stoll et al., 2010).

Dies liegt zum einen an der Unreife des Immunsystems bei Frühgeborenen, die sich in Entwicklungsrückständen in der angeborenen als auch erworbenen Immunabwehr gegenüber Infektionserregern manifestiert (Polin et al., 2012). Insbesondere die humorale Abwehr ist bei Frühgeborenen reduziert, da die Übertragung von maternalen Immunglobulinen vorwiegend im dritten Trimester der Schwangerschaft stattfindet (Ohlsson und Lacy, 2013). Zum anderen sind bei sehr unreifen Frühgeborenen invasive medizinische Maßnahmen zur Sicherung des Überlebens notwendig: Die invasive Beatmung sowie künstliche Ernährung und intravasale Kathetersysteme erhöhen das Risiko nosokomialer Infektionen (Sohn et al., 2001).

Vor einigen Jahren führte das Publikwerden von Infektionen mit multiresistenten Keimen auf Frühgeborenenstationen in verschiedenen deutschen Städten zur vermehrten Aufmerksamkeit der Medien und der Bevölkerung (Tuffs, 2011). Das Thema „Infektionen bei Neugeborenen“ ist also weiterhin aktuell und bedarf intensiver Aufmerksamkeit und Forschung (Schwab et al., 2014).

1.3.1 Definition und Einteilung von Infektionen

Eine Infektion wird definiert als das „Eindringen von Mikroorganismen (...) in einen Makroorganismus und Vermehrung in ihm“ (Pschyrembel, 2010). Eine Infektion im engeren Sinne umfasst das Auftreten von obligaten oder fakultativen Pathogenen in sterilem Gewebe oder eine Entzündungsreaktion des Körpers auf das Vorhandensein von Erregern. Jedoch wird die Diagnose einer Infektion schon beim Vorhandensein typischer Symptome, ohne mikrobiologischen Nachweis der Erreger gestellt (Levy et al., 2003).

Kommt es zur Erkrankung des Organismus und Ausbreitung des Erregers, kann das eine durch Ausschüttung verschiedener Zytokine vermittelte systemische Entzündungsreaktion, genannt systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), zur Folge haben. Beim Auftreten eines SIRS in zeitlichem oder kausalem Zusammenhang mit einer Infektion, also einem Erregernachweis in Blutkulturen oder aus anderem sterilen Gewebe, spricht man von einer Sepsis (Shane und Stoll, 2013), (Randolph und McCulloh, 2014). Auch ohne Erregernachweis kann anhand definierter klinischer Befunde bei hochgradigem Infektionsverdacht eine „klinische Sepsis“ diagnostiziert werden (Chisea et al., 2004), (Leistner et al., 2013). Je nach Auswirkung auf den Gesamtorganismus und dessen Organfunktionen differenziert man „schwere Sepsis“ mit Organmanifestationen und „septischen Schock“ bei Kreislaufinstabilität (Randolph und McCulloh, 2014).

1.3.2 Infektionsformen bei Neugeborenen

Häufig auftretende bakterielle Infektionen in der Neugeborenenperiode sind Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Meningitiden und die nekrotisierende Enterokolitis. Diese Erkrankungen können durch invasive Ausbreitung der Erreger im Organismus und in der Blutbahn zu einer Sepsis mit systemischen Infektionszeichen fortschreiten. Auch primäre Bakteriämien, zum Beispiel durch Einschwemmung der Erreger über Schleimhäute oder über intravasale Katheter werden insbesondere bei intensivmedizinisch behandelten Frühgeborenen beobachtet. Die Eintrittspforte der Infektion kann oftmals nicht eruiert werden (AWMF, 2006). Zudem entwickeln sich Lokalinfektionen bei Neu- und Frühgeborenen häufig innerhalb weniger Stunden zu invasiven Infektionen. Diese können einen foudroyanten Verlauf nehmen (Muller-Pebody et al., 2011).

Neben der Lokalisation lassen sich Infektionen in der Neonatalperiode auch nach dem Zeitpunkt des Auftretens unterteilen: Je nach Alter des Neugeborenen beim Auftreten von Symptomen einer Infektion wird zwischen einer Early-Onset Infektion und einer Late-Onset Infektion unterschieden. Tritt die Symptomatik innerhalb der ersten 72 Lebensstunden des Neugeborenen auf, spricht man von einer Early-Onset Infektion. Beginnt die Symptomatik erst nach 72 Lebensstunden, liegt eine Late-Onset Infektion vor (Hornik et al., 2012).

1.3.2.1 Early-Onset Infektionen

Eine Early-Onset Infektion entwickelt sich meist durch vertikale Übertragung von Erregern der Mutter auf das Kind. Häufig liegt bei der Mutter eine ascendierende Infektion im Sinne eines Amnioninfektionssyndroms vor. So ist der Fetus schon pränatal entsprechenden Erregern ausgesetzt. Außerdem kann bei vaginalen Entbindungen während der Passage durch den Geburtskanal eine Aufnahme der mütterlichen Genitalkeime erfolgen (Polin, 2012), (Shane und Stoll, 2014). Aufgrund der Erregeraufnahme über die Atemwege handelt es sich deshalb häufig um pulmonale Infektionen wie Pneumonien oder systemische Infektionen in Form einer Sepsis. Weniger häufig kommen Meningitiden vor (Fluegge et al., 2006). Die häufigsten Erreger einer Early-Onset Infektion sind B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) (43%) und *E. coli* (29%), wobei *E. coli*-Infektionen häufiger bei Frühgeborenen auftreten (Stoll et al., 2011). Außerdem finden sich, wenn auch seltener, *Haemophilus influenzae* und *Listeria monocytogenes* als Erreger schwerer und fulminant verlaufender Infektionen (Paolucci et al., 2012).

Die Anzahl der Frühinfektionen durch B-Streptokokken ist in den letzten Jahren kontinuierlich gesunken, wobei die Anzahl der Infektionen durch *E. coli* konstant geblieben ist. Bei 73% der Nachweise von B-Streptokokken handelte es sich um Early-Onset Infektionen, wohingegen *E. coli* insgesamt häufiger bei Late-Onset Infektionen vorgefunden wird (Bauserman et al., 2013). Die sinkende Anzahl der B-Streptokokken-Infektionen konnte vor allem durch

Screeninguntersuchungen der Schwangeren und nachfolgende intrapartale Antibiotikaprophylaxe bei vaginaler Besiedlung erreicht werden (Van Dyke et al., 2009).

1.3.2.2 Late-Onset Infektionen

Während die Zahl der Early-Onset Infektionen in den letzten Jahrzehnten deutlich zurückgegangen ist, wurden parallel dazu vermehrt Fälle von Late-Onset Infektionen verzeichnet (Bizzarro et al., 2005).

Auch bei der Late-Onset Infektion spielen vertikal von der Mutter auf das Kind übertragene Keime eine Rolle. So kommt es zunächst zur Besiedlung des Neugeborenen mit Keimen, beispielsweise zu einer Besiedlung der Haut durch Keime der mütterlichen Genitalflora. In einem zweiten Schritt erfolgt bei entsprechender Prädisposition eine hämatogene Aussaat der Erreger. Folglich zeigt sich diese Form der Infektion häufig als Sepsis. Wesentlich häufiger als bei der Early-Onset Infektion tritt hier auch eine Meningitis bzw. Meningoenzephalitis auf.

Wie bei den Early-Onset Infektionen zählen auch bei den Spätinfektionen B-Streptokokken und E. coli zu den möglichen verursachenden Erregern. Parallel zur Zunahme der intrapartalen Antibiotikaprophylaxe in den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz von E. coli-Infektionen und Ampicillin-resistenten E. coli-Spezies, insbesondere bei Frühgeborenen, gestiegen (Bizzarro et al., 2008). Viel häufiger jedoch, in 60–70% der Fälle, findet man grampositive Keime als Auslöser der Infektion (Shane und Stoll, 2014), (Testoni et al., 2014). Vor allem Koagulase-negative Staphylokokken und Staphylococcus aureus sowie Enterokokken sind hier von Bedeutung. Bei den gramnegativen Erregern der Late-Onset Infektion spielen neben E. coli auch Enterobacteriaceae und Pseudomonaden eine wichtige Rolle (Muller-Pebody et al., 2011).

Die häufigsten Erreger der Late-Onset Infektion sind Koagulase-negative Staphylokokken. Als Keime der Hautflora verursachen sie vor allem bei Frühgeborenen Infektionen (Bizzarro et al., 2005). Insbesondere beim Vorhandensein zentraler Venenkatheter und intensivmedizinischer Zugänge stellen sie als endogene Nosokomialkeime ein Risiko dar (Marchant et al., 2013).

1.4 Diagnostische Methoden

1.4.1 Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen

Die Diagnosestellung und Lokalisationsbestimmung sowie die Differenzierung verschiedener Schweregrade von Neugeboreneninfektionen ist schwierig.

Es mangelt an einheitlichen, konsentierten Definitionen zu Infektionen in der Neonatalperiode, insbesondere für Frühgeborene. Dies erschwert die Diagnostik und das klinische Management (Goldstein et al., 2005), (Hofer et al., 2012), (Wynn et al., 2014), (Wynn, 2016).

Die Symptome, die Neugeborene mit Infektionen zeigen, sind oft unspezifisch. In einigen Fällen lassen sich keinerlei oder nur geringfügige klinische Auffälligkeiten finden (Shane und Stoll, 2014). Selbst bei letalen Ausgängen bakterieller Infektionen ließen sich in einer Untersuchung von Squire et al. in 18% der Fälle keine Pathogene in der Blutkultur nachweisen (Squire et al., 1979).

Es ist seit längerem bekannt, dass allein die verschiedenen Stressoren, die auf ein Neugeborenes unter der Geburt einwirken, eine Entzündungsreaktion im Sinne einer Akute-Phase-Reaktion auslösen können. Infolgedessen kommt es vor, dass bei einem Neugeborenen klinische Zeichen einer Infektion auftreten, obwohl keine Infektion vorliegt (Marchini et al., 2000). Zudem können andere pathologische Zustände in der Neonatalperiode wie das Atemnotsyndrom die Symptome einer Infektion imitieren, aber auch verschleiern (Shane und Stoll, 2013).

Die Diagnose einer Infektion muss sich deshalb auf die verschiedenen Säulen der klinischen, laborchemischen sowie mikrobiologischen Diagnostik stützen.

1.4.1.1 Klinische Diagnose einer Infektion

Die klinische Diagnose einer Infektion beginnt häufig mit dem Verdachtsmoment für das Vorliegen einer bakteriellen Exposition. Dabei sind anamnestische und geburtshilfliche Informationen von Bedeutung. Anhand des Verlaufs der Schwangerschaft und der Geburt sowie diverser mütterlicher Faktoren ergeben sich Risikokonstellationen, insbesondere im Hinblick auf die Entstehung einer Early-Onset Infektion. So können zum Beispiel anamnestische Hinweise auf das Vorliegen einer Chorioamnionitis, wie Fieber der Mutter unter der Geburt, ein vorzeitiger Blasensprung oder auch der Nachweis einer B-Streptokokken-Besiedlung, einen Infektionsverdacht begründen (Benitz et al., 1999), (Mukhopadhyay und Puopolo, 2012).

Daneben kann die Frühgeburtlichkeit – insbesondere nach vorzeitiger Wehentätigkeit – ein Hinweis auf das Vorliegen einer Infektion des Kindes sein, da selbst subklinische bakterielle Infektionen der Mutter vorzeitige Wehen auslösen können (Taylor et al., 1997).

Überdies erhöht die Unreife bei Frühgeburtlichkeit das Risiko für das Kind, Infektionen zu entwickeln (vgl. Kapitel 1.3).

Die wichtigsten klinischen Zeichen, die auf eine systemische Infektion oder Sepsis hinweisen können, entsprechen den Kriterien des SIRS. Die Kriterien für Erwachsene werden in modifizierter Form auch zur Diagnose der Sepsis bei Neonaten verwendet, da gängige SIRS- und Sepsiskriterien für Neugeborene fehlen (Wynn, 2016). Im Rahmen großer nationaler Studien bezüglich der Überwachung nosokomialer Infektionen Frühgeborener (Neo-KISS) wurden die klinischen Symptome einer Sepsis wie folgt festgelegt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Klinische Symptome einer Sepsis nach Kriterien des NEO-KISS Surveillance Systems nosokomialer Infektionen für Frühgeborene auf Intensivstationen, modifiziert nach (Leistner et al., 2013)

Fieber >38°C, Hypothermie <36,5°C oder Temperaturinstabilität
Tachykardien oder Bradykardien
verlängerte Rekapillarierungszeit
Hyperglykämie
Apnoe
Apathie

Bonadio et al. untersuchten verschiedene klinische Befunde, die bei einem Neugeborenen auf das Vorliegen einer Infektion schließen lassen. Als aussagekräftige Parameter galten dabei insbesondere die Rekapillarierungszeit als Messgröße der peripheren Durchblutung, Atemanstrengung und Status der Atmung sowie Affekt des Kindes (Bonadio et al., 1993). Auch Trinkunlust und Nahrungsunverträglichkeiten können, wenn auch unspezifisch, Zeichen einer Infektion sein (AWMF, 2006). Daneben zählen Blutungszeichen wie Petechien, das Auftreten eines Ikterus sowie eine Hepatosplenomegalie zu möglichen Symptomen. Die klinische Einschätzung des Patienten durch die betreuende Pflegekraft kann ebenfalls wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer Infektion liefern (Gardner, 2009).

Eine Reihe weiterer klinischer Zeichen, die als Hinweise für das Vorliegen einer systemischen Infektion gelten, sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Auflistung weiterer klinischer Hinweise auf das Vorliegen bakterieller Infektionen bei Neugeborenen, modifiziert nach Checkliste Neonatologie, 4.Auflage, Thieme (Roos et al., 2010)

Allgemeinzustand	„das Kind sieht nicht gut aus“, „das Kind gefällt mir heute gar nicht“, Trinkschwäche, Hypothermie, Fieber, Temperaturdifferenz von > 2 °C zwischen Kerntemperatur (zwischen den Scapulae bei Rückenlage) und den Akren (Fuß), Berührungsempfindlichkeit
Herz, Kreislauf	Tachykardie (≥ 180 /min, auch präpartal), Bradykardie, Blässe, Zentralisation mit schlechter Hautperfusion, verlängerte Kapillarfüllungszeit, arterielle Hypotonie
Atmung	Apnoe, Stöhnen, Dyspnoe, Tachypnoe, thorakale Einziehung, erhöhter Sauerstoffbedarf beim reifen Neugeborenen
Haut, Weichteile	Blässe, Zyanose, Petechien, Ikterus, Ödeme, Pusteln, Abszesse, Omphalitis, Paronychie, Hautrötung an der Einstichstelle oder im Verlauf eines Katheters
Magen-Darm-Trakt	geblähtes Abdomen, Erbrechen, verzögerte Magenentleerung, Obstipation, Diarrhö, Nahrungsverweigerung, fehlende Darmgeräusche
ZNS	Lethargie oder Irritabilität, Muskelhypotonie oder -hypertonie, Berührungsempfindlichkeit, Krampfanfälle, gespannte Fontanelle
Stoffwechsel	unklare Hyper- oder Hypoglykämien, metabolische und respiratorische Azidose, Laktatanstieg, Ikterus, Cholestasesymptome
Spätsymptome	Ikterus, Hepatomegalie, Thrombozytopenie, Petechien, Verbrauchskoagulopathie, Schock, Hypotension

Die Diagnose einer klinisch primären Sepsis kann bei Patienten unter einem Lebensjahr anhand dieser klinischen Zeichen selbst bei fehlendem mikrobiologischen Keimnachweis gestellt werden (Robert Koch-Institut, 2011).

Aufgrund der großen Anzahl unspezifischer Symptome bei neonatalen Infektionen sind zur Erhärtung der Diagnose Laboruntersuchungen sinnvoll. Damit lässt sich die Diagnose der klinischen Sepsis zur laborbestätigten (laboratory-confirmed) oder kulturgesicherten Sepsis erweitern. Hierzu können mikrobiologische Tests zum Erregernachweis, aber auch laborchemische Parameter herangezogen werden (Robert Koch-Institut, 2011), (Berner und Scholz, 2013), (Leistner et al., 2013). Wenn der klinische Zustand für eine Sepsis spricht, so muss in der Regel allerdings schon vor Erhalt der Labor- und Kulturergebnisse mit einer antimikrobiellen Therapie begonnen werden.

1.4.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Obwohl die Sensitivität der konventionellen Blutkultur relativ gering ist, gilt sie als Goldstandard zum Nachweis einer neonatalen Infektion und wird häufig als Diagnosekriterium für eine Sepsis gefordert (Goldstein et al., 2005), (Paolucci et al., 2012). Bei Kindern mit den klinischen Zeichen einer systemischen Infektion (SIRS) findet sich nur in 20% der Fälle ein Erreger in der Blutkultur (Berner und Scholz, 2013). Zudem kann ein aus einer Blutkultur isolierter Keim lediglich Zeichen einer Kontamination oder asymptomatischen Bakteriämie sein (Campos, 1989), (Thuler et al., 1997).

Das benötigte Blutvolumen, um eine Bakteriämie mit hoher Sensitivität nachzuweisen, hängt von der Bakteriendichte im Blut ab (Schelonka et al., 1996). Erhöht man das Probenvolumen in den Blutkulturflaschen, so erhöht sich auch die Rate an positiven Befunden (Isaacman et al., 1996). Bei Neugeborenen findet sich häufig nur eine geringe Bakteriendichte mit wenigen koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Blut. Dies stellt besonders bei Frühgeborenen mit niedrigem zirkulierendem Blutvolumen ein diagnostisches Problem dar (Kellogg et al., 1997). So wird zurzeit die Verwendung von mindestens 1 ml Blut pro pädiatrischer Blutkulturflasche empfohlen, um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten (Polin, 2012). Außerdem vergehen nach Abnahme einer Blutkultur bei Infektionsverdacht bis zum Vorliegen eines positiven Befundes 1–3 Tage. Je länger Blutkulturflaschen bebrütet werden, desto höher ist dabei die Rate positiver Befunde (Garcia-Prats et al., 2000).

Neuere Methoden zur mikrobiologischen Diagnostik wie Multiplex-PCR-Untersuchungen zeigen im Vergleich zu konventionellen Blutkulturen eine höhere Sensitivität und schnellere Ergebnisse, aber auch eine größere Anfälligkeit für Kontaminationen. Sie können Bakterien in geringerer Dichte sowie nicht kultivierbare und avitale Keime nachweisen (Lucignano et al., 2011). Sie ersetzen die Blutkultur im klinischen Alltag noch nicht, sondern dienen eher als Zusatzdiagnostik (Pammi et al., 2011).

Neben Blutkulturen können – bei passender klinischer Symptomatik – auch andere primär sterile Gewebe und Körperflüssigkeiten untersucht werden. Eine Urindiagnostik erfolgt bei vermuteter Harnwegsinfektion oder bei einer Late-Onset Sepsis, zur Vermeidung von Kontaminationen sollte hierzu eine suprapubische Blasenpunktion erfolgen (Tamim et al., 2003), (Polin, 2012). Bei klinischem Meningitis-Verdacht wird beim Fehlen von Kontraindikationen eine Liquorpunktion empfohlen (AWMF, 2006). Positive mikrobiologische Hautabstriche sind nicht primär als krankhaft, sondern eher als unvermeidbare Besiedlung zu werten. Eine Antibiotika-Therapie ist in diesen Fällen nur bei systemischen Entzündungszeichen in Betracht zu ziehen (Evans et al., 1988).

Bei intubierten Patienten wird eine mikrobiologische Untersuchung des Trachealspirats empfohlen (AWMF, 2006), (Berner und Scholz, 2013).

Aufgrund der zunehmenden Anzahl multiresistenter bakterieller Infektionen auf neonatologischen Intensivstationen empfiehlt das Robert Koch-Institut ein mikrobiologisches Kolonisationscreening für dort hospitalisierte Patienten. Mittels wöchentlicher Abstriche von Rachen, Nasenvorhöfen und Anus soll die Prävention und Früherkennung von Infektionen insbesondere mit multiresistenten Erregern verbessert werden, bei Bedarf kann diese Routine um Wundabstriche und Trachealspiratkulturen ergänzt werden (Robert Koch-Institut, 2013).

1.4.1.3 Laborchemische Diagnose einer Infektion

Diverse Parameter im Blut des Neugeborenen können einen Hinweis auf ein entzündliches Geschehen liefern – darunter auch einige Akute-Phase-Proteine und Zytokine, die beim Vorhandensein von Entzündungsreizen von verschiedenen Zellen wie Monozyten, Makrophagen oder Fibroblasten ausgeschüttet werden.

Viele dieser Parameter sind durch Faktoren unter der Geburt oder während der Behandlung beeinflussbar. Zudem sind die Normwerte einiger Parameter stark vom Lebensalter und vom Gestationsalter – also der Reife des Neugeborenen – abhängig (Shah und Padbury, 2014).

Bei fehlendem Konsens zur Definition der neonatalen Sepsis in der Fachliteratur, fehlen ebenfalls einheitliche und in der klinischen Praxis etablierte Kriterien zur Diagnosestellung einer Sepsis oder systemischen Infektion anhand verschiedener laborchemischer Parameter (Wynn et al., 2014).

Neben der Leukozytenzahl als relativ unspezifischem Marker sind Neutrophilenparameter sowie die Interleukine IL-6, IL-8 und das C-reaktive Protein (CRP) bereits seit langem verwendete und gut untersuchte Marker im Blut (Buck et al., 1994), (Laborada et al., 2003), (Franz et al., 2004), (AWMF, 2006). Bei den Neutrophilenparametern lässt sich neben der absoluten Neutrophilenzahl auch das Verhältnis der unreifen („immature“) Neutrophilen zur Gesamtzahl („total“) der neutrophilen Granulozyten berechnen. Dieser I/T-Quotient wird als diagnostischer Marker einer Infektion genutzt und ist auch für Frühgeborene evaluiert (Manroe et al., 1979), (Mouzinho et al., 1994). Ein Hinweis auf eine vorliegende Infektion ist ein I/T-Quotient $> 0,2$ (Mathers und Pohland, 1987), (Newman et al., 2014).

Nach Døllner et al. gilt das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP) als der diagnostisch beste Marker einer neonatalen Sepsis (Døllner, 2001). Zur frühen Beurteilung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Symptombeginn ist das CRP jedoch weniger aussagekräftig (Mathers und Pohlandt, 1987). Die Evaluation diverser weiterer Akute-Phase-Proteine zur Diagnostik von Infektionen, darunter Fibronektin, Lactoferrin oder auch Alpha-1-Antitrypsin, hat in bisherigen

Studien erfolgversprechende Ergebnisse gezeigt. Im klinischen Umfeld werden diese jedoch noch nicht routinemäßig eingesetzt (Arnon und Litmanovitz, 2008).

Des Weiteren hat man Procalcitonin (PCT) als Akute-Phase-Protein zur Infektionsdiagnostik untersucht. Die Differenzierung zwischen viralen oder lokalisierten bakteriellen Infektionen gelingt mit Procalcitonin sensitiver und spezifischer als mit dem C-reaktiven Protein, doch in den ersten 48 Stunden nach der Geburt kommt es zu einem physiologischen Anstieg der Serumkonzentration (Van Rossum et al., 2004). Nach vorherrschender Meinung bietet die PCT-Messung bei Neugeborenen keinen zusätzlichen diagnostischen Nutzen zum herkömmlich verwendeten CRP (AWMF, 2006), (Arnon und Litmanovitz, 2008).

Zytokine gelten als frühe laborchemische Hinweisparameter einer Infektion. Erhöhte Zytokin-konzentrationen im Blut finden sich oft schon vor den ersten klinischen Symptomen (Shah und Padbury, 2014). Silveira et al. konnten zeigen, dass die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-6 und TNF-alpha bei Neugeborenen mit Infektionen signifikant erhöht sind (Silveira und Procianoy, 1999). Dies gilt ebenso für das Zytokin IL-8, das von Boskabadi et al. untersucht wurde (Boskabadi et al., 2013).

Eine Kombination aus verschiedenen Laborwerten zeigt derzeit die beste Sensitivität in der Infektionsdiagnostik, wie zum Beispiel die Kombination aus pathologischen CRP-Werten mit erhöhten Werten der Zytokine IL-6 oder IL-8 (Døllner, 2001), (Laborada et al., 2003).

In Anlehnung an die CDC-Kriterien können zur Diagnosestellung einer systemischen Infektion verschiedene laborchemische Parameter herangezogen werden. Zu ihnen gehören der I/T-Quotient, das C-reaktive Protein sowie die Leukozytenzahl und das Ergebnis von Blutkulturen (Garner et al., 1988), (Maier und Obladen, 2017).

Zur laborchemischen Infektionsdiagnostik sowie zur Anlage von Blutkulturen sind Blutentnahmen erforderlich. Diese bewirken bei Neugeborenen eine Stressreaktion (Heß et al., 2010). Die Blutentnahme per se stellt wiederum eine Verletzung der natürlichen Hautbarriere dar und kann damit das Auftreten einer Infektion begünstigen. Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von unter 1500 g können wiederholte diagnostische Blutentnahmen zudem eine transfusionsbedürftige Anämie hervorrufen (Maier et al., 1996).

Zusammenfassend gilt: Eine allgemeingültige Definition der systemischen Infektion oder Sepsis bei Früh- und Reifgeborenen fehlt. Die Differenzierung zwischen Neugeborenen, bei denen unspezifische Zeichen für eine Infektion aufgrund von Anpassungsvorgängen, Stress oder einem Atemnotsyndrom auftreten und solchen, die aufgrund einer invasiven Infektion eine Entzündungsreaktion zeigen bleibt kompliziert. Laborchemische Untersuchungen und Blutkulturen sind invasive Maßnahmen, die nicht beliebig häufig wiederholt werden können.

Weitere mikrobiologische Testungen sind nur gezielt und im Kontext klinischer Infektionszeichen sinnvoll. Eine neue, nicht-invasive Untersuchung, die angesichts klinischer Infektionszeichen weitere Hinweise auf das Vorliegen einer Infektion liefern könnte, würde die neonatologische Infektionsdiagnostik verbessern und vereinfachen.

1.4.2 Untersuchung am Trachealspirat zur Diagnostik von neonatalen Infektionen und Prädiktion der BPD

Es ist zu vermuten, dass sich systemische Infektionen bei Neugeborenen an der großen Schleimhautoberfläche der Lunge und somit im alveolären Flüssigkeitsfilm (Epithelial Lining Fluid, kurz ELF) widerspiegeln. Die Bronchopulmonale Dysplasie geht ebenso mit Veränderungen des ELF einher.

Zur genaueren Betrachtung des ELF des Alveolarraums sowie dessen Veränderung bei diversen pulmonalen wie auch nicht-pulmonalen Erkrankungen wird häufig auf die bronchoalveoläre Lavage (BAL) zurückgegriffen (Reynolds, 2000). Aber auch Trachealspirat eignet sich, um Prozesse in der Lunge zu analysieren, auch wenn es weniger tief im Respirationstrakt gewonnen wird (Dargaville et al., 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Trachealspirat bezüglich der Analyse von inflammatorischen Prozessen der Lunge der BAL nicht unterlegen ist (D'Angino et al., 2002).

Tracheales Absaugen ist bei der Behandlung beatmeter Früh- und Reifgeborener zwangsläufig aus klinischen Gründen erforderlich. Normalerweise wird das abgesaugte Trachealspirat entsorgt. Für die Gewinnung von Trachealsekret ist somit keine zusätzliche Intervention erforderlich. Durch diverse Studien ist die Gewinnung von Trachealspirat bei intubierten Früh- und Neugeborenen etabliert (Darlow et al., 1997), (Blic et al., 2000).

1.4.2.1 Zytokinanalytik am Trachealspirat

Zur Identifikation von Patienten mit Infektionen und zur Prädiktion der BPD wurden bereits erfolgreich Messungen von verschiedenen Biomarkern sowie Analysen der Genexpression im Trachealspirat eingesetzt (Hasan et al., 2009), (Harwood et al., 2011), (Hikino et al., 2012).

Auch die Messung von Zytokinkonzentrationen im Trachealspirat ist bereits etabliert (Speer, 2003). Zytokine können entweder als Zeichen einer Inflammation oder eines Zellschadens freigesetzt werden, sie können aber auch im Rahmen eines immunologischen Prozesses zur Bekämpfung von Bakterien vermehrt exprimiert werden (Cameron und Kelvin, 2003).

So findet man im Trachealspirat beatmeter Frühgeborener, die im Verlauf eine BPD entwickeln, erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-6 und TNF- α (Jonsson et al., 1997). Außerdem lassen sich in den Atemwegssekreten Erkrankter vermehrt neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie gewebsdestruierende Proteasen nachweisen, die durch das Entzündungsgeschehen freigesetzt werden (Bose et al., 2008).

Bisher evaluierten nur wenige Untersuchungen, ob sich erhöhte Zytokinkonzentrationen bei systemischen, pulmonalen und nicht-pulmonalen Infektionen von Früh- und Reifgeborenen im Trachealaspirat nachweisen lassen. Harris et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen den IL-8- und IL-10- Konzentrationen im Trachealaspirat bei Neugeborenen mit Sepsis (Harris et al., 2005). Ob sich Zytokine im Trachealaspirat als Infektionsmarker eignen ist nach unserem Kenntnisstand bisher noch nicht untersucht.

Die Messung von Zytokinen im Trachealaspirat findet im klinischen Alltag bei der Prädiktion der BPD und der Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen bisher noch keine Anwendung (Aghai et al., 2013).

1.4.2.2 Die Elektronische Nase: Diagnostik mittels Geruchsanalyse

Seit der Antike ist bekannt, dass Gerüche Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Erkrankungen liefern können. Die Analyse volatiler organischer Substanzen (VOCs) als diagnostisches Mittel in der klinischen und experimentellen Medizin ist ein relativ neues und aufstrebendes Forschungsgebiet (Boots et al., 2012). Die Untersuchung von VOCs in der Ausatemluft basiert auf der Hypothese, dass diese in ihrer Zusammensetzung der des alveolären Flüssigkeitsfilms (ELF) entsprechen (Skiepko et al., 2006). Änderungen der Homöostase, wie sie bei verschiedenen Erkrankungen und Stoffwechselfathologien entstehen, gehen mit Änderungen der vom Körper emittierten VOCs einher (Shirasu und Touhara, 2011), (Kataoka et al., 2013).

Früher wurde hauptsächlich kondensierte Ausatemluft (Exhaled Breath Condensate, kurz EBC) mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie auf VOCs hin untersucht, die für einzelne Krankheiten spezifisch sind (Mangler et al., 2012), (Wang et al., 2014). Durch die Etablierung der sogenannten Elektronischen Nase (Enose) steht nun ein weiteres Messinstrument zur Analyse der VOCs zur Verfügung (Fens et al., 2013).

In einigen wenigen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Elektronische Nase bei intubierten Patienten anhand der VOCs der Ausatemluft Patienten mit einem ARDS (acute respiratory distress syndrome) identifizieren kann (Bos et al., 2014). Außerdem haben Untersuchungen zu entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma oder COPD sowie dem Schlafapnoe-Syndrom und dem Bronchialkarzinom erbracht, dass die Elektronische Nase in der Lage ist, erkrankte Patienten anhand der sogenannten Smellprints von Gesunden zu unterscheiden (Dragonieri et al., 2007), (Dragonieri et al., 2009), (Greulich et al., 2013).

Auch Erkrankungen, die nicht primär die Lunge betreffen, konnten durch Analyse der aus den Atemwegen stammenden VOCs diagnostiziert werden. Dies zeigten kürzlich veröffentlichte Studien zum kolorektalen Karzinom und zum Mammakarzinom (Mangler et al., 2012), (Wang et al., 2014). Diese ersten Ergebnisse lassen vermuten, dass sich über die flüchtigen organischen

Verbindungen der Atemwege weitere systemische Erkrankungen wie auch invasive Infektionen identifizieren lassen.

Die bisher verwendeten Medien zur Untersuchung mittels der Elektronischen Nase an der Lunge beschränkten sich hauptsächlich auf Ausatemluft oder Atemwegskondensat. Atemwegskondensat kann zwar bei beatmeten Kindern gewonnen werden, doch bei Neu- und Frühgeborenen gestaltet sich die Gewinnung schwierig und ist nicht gut etabliert (Harrison und Andersen, 2005), (Rosias et al., 2004). Untersuchungen des Trachealaspirats von Neugeborenen mittels einer Elektronischen Nase wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Humphreys et al. haben jedoch bereits Untersuchungen mit einer Elektronischen Nase an Bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit durchgeführt. Hierzu wurde wie in der vorliegenden Arbeit der Gasraum über der gewonnenen Flüssigkeit von einer Elektronischen Nase analysiert (Humphreys et al., 2011). Die Etablierung der Elektronischen Nase zur Frühdiagnostik einer neonatalen Infektion oder zur Prädiktion einer BPD wäre eine sinnvolle Ergänzung in der Neugeborenenmedizin.

1.4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen am Trachealaspirat

Die Lunge von Neugeborenen ist nicht steril, wie lange vermutet wurde. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass nach der Geburt auch bei gesunden Neugeborenen eine rasche Besiedlung der Atemwege durch ein breites Spektrum an Bakterien erfolgt (Stressmann et al., 2010), (Mourani et al., 2011), (Beck et al., 2012).

Positive mikrobiologische Befunde im Trachealaspirat haben daher nur einen geringen positiv prädiktiven Wert für das Vorliegen einer invasiven Infektion oder Pneumonie bei Neugeborenen. Sie zeigen potentielle Pathogene, sollten aber nur in Kombination mit klinischen Zeichen einer Infektionserkrankung eine antimikrobielle Therapie nach sich ziehen (Lau und Hey, 1991). Insbesondere kulturelle Nachweismethoden der Bakterien im Trachealaspirat zeigen häufig keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Blutkulturen bei septischen Neugeborenen (Slagle et al., 1989).

Trachealaspirat bietet die Möglichkeit, neue Einblicke in das sogenannte „Mikrobiom“ der Lunge, also der Gesamtheit der vorherrschenden Bakterienspezies, zu gewinnen. Bisher gibt es nur wenige standardisierte Untersuchungen zum Mikrobiom der neonatalen Lunge (Beck et al., 2012), (Kiley und Caler, 2014).

Zunehmend ergeben sich aber Hinweise, dass anhand der Diversität und der vorkommenden Spezies im Trachealaspirat beatmeter Neugeborener Verknüpfungen zu bestimmten Erkrankungen, wie zum Beispiel der BPD gestellt werden können. Dabei kann ein stabiles Mikrobiom schützende Funktion haben, eine Dysbiose kann im Gegensatz dazu mit Erkrankungen einhergehen (Lohmann et al., 2014), (Gallacher und Kotecha, 2016).

Überdies hat sich gezeigt, dass das Vorhandensein von Bakterien im Trachealaspirat signifikant mit der Entstehung einer BPD zusammenhängt (Beeton et al., 2011). Es wurden einige Spezies – unter anderem Ureaplasmen – identifiziert, deren Besiedlung oder Infektion der Atemwege ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer BPD darstellen (Gancia et al., 2014), (Lowe et al., 2014).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird der Stellenwert von verschiedenen neuartigen und bereits etablierten Trachealspirat-Untersuchungen im Hinblick auf die Diagnose von neonatalen Infektionen bei Früh- und Reifgeborenen und der Prädiktion der BPD bei Frühgeborenen evaluiert. Neben der Analyse von Smellprints / VOCs mittels einer Elektronischen Nase erfolgt die Quantifizierung der Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Interferon Gamma (IFN- γ) im Trachealspirat. Zudem wird das mikrobiologische Keimspektrum im Trachealspirat untersucht. Dabei wird folgenden Fragen nachgegangen:

Prädiktion der Bronchopulmonalen Dysplasie

Finden sich erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-6 und IFN- γ im Trachealspirat bei Frühgeborenen, die später eine BPD entwickeln?

Unterscheiden sich die Smellprints / VOCs der Trachealspirate von Frühgeborenen, die eine BPD entwickeln, von denen, die keine BPD entwickeln?

Wie häufig identifiziert man Keime beziehungsweise welche Keimspezies finden sich bei Frühgeborenen, die eine BPD entwickeln?

Diagnose einer neonatalen systemischen Infektion

Finden sich erhöhte Zytokinkonzentrationen von IL-6 und IFN- γ im Trachealspirat bei Früh- und Reifgeborenen mit Zeichen einer systemischen Infektion oder positivem Keimnachweis?

Unterscheiden sich die Smellprints / VOCs der Trachealspirate von Früh- und Reifgeborenen mit einer systemischen Infektion von denen ohne Zeichen einer systemischen Infektion?

Mikrobiologie

Welche mikrobiologischen Befunde zeigen sich im Trachealspirat beatmeter Früh- und Reifgeborener bei folgenden zwei Untersuchungsmethoden:

- 1) konventionelle Anzucht und Mikroskopie
- 2) genomische Analyse mittels PCR der 16S-rDNA

2. Material, Methoden und Patienten

2.1 Patienten und Probengewinnung

2.1.1 Patienten

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden am routinemäßig aus klinischer Indikation gewonnenen Trachealaspirat von intubierten Früh- und Reifgeborenen durchgeführt. Alle Patienten befanden sich im Zeitraum von Dezember 2010 bis Juli 2012 in stationärer Behandlung auf der neonatologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Marburg.

2.1.1.1 Einschlusskriterien

In diesem Zeitraum erfolgte ein Einschluss von Patienten, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Gestationsalter 24+0 bis einschließlich 42+0 Schwangerschaftswochen
- Postnatales Alter 0 bis einschließlich 28 Tage
- Einverständnis der Erziehungsberechtigten

2.1.1.2 Ausschlusskriterien

Die Patientin duften keines der folgenden Ausschlusskriterien erfüllen:

- Lebensbedrohliche oder schwere Fehlbildungen
- Keine kurative Therapie
- Fehlendes Einverständnis der Erziehungsberechtigten

2.1.1.3 Ethik

Die Studie erfolgte nach schriftlicher Zustimmung der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vom 06.12.2010, Studie 167/10 als Pilotstudie. Die Analyse der Patientendaten erfolgte pseudonymisiert.

2.1.1.4 Einverständnis

Die schriftliche Einwilligung der Erziehungsberechtigten der Patienten zur Teilnahme an der Studie wurde nach entsprechender Aufklärung bei stationärer Aufnahme des Kindes oder schon pränatal bei drohender Frühgeburt eingeholt.

2.1.2 Dokumentation klinischer Daten

Zusätzlich zu den in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen experimentellen Verfahren wurden verschiedene Parameter der Patienten aus klinischen Gründen erfasst. Die Erhebung der in Tabelle 3 erfassten Parameter erfolgte anhand der Krankenakte.

Tabelle 3 Erhobene klinische und laborchemische Parameter der Patienten

Erhobene Parameter
Geburtsdaten (Datum, Uhrzeit)
Gestationsalter bei Geburt (in Tagen p.m.)
Geburtsgewicht (in Gramm)
Geschlecht
Geburtsmodus (vaginale Entbindung / Sectio caesarea)
Apgar-Werte in Minute 1,5 und 10
Zeitpunkt der Erstintubation (Datum, Uhrzeit)
Reintubation (Anzahl, Datum, Uhrzeit)
Beatmungsdauer – invasive Beatmung (in Tagen)
Beatmungsdauer – nicht-invasive Beatmung (in Tagen)
Dauer erhöhter O ₂ -Zufuhr (in Tagen)
Vorhandensein einer BPD nach NIH-Kriterien
Differentialblutbild (bei Probenentnahme)
Laborchemischer Entzündungsparameter CRP (bei Probenentnahme)
Befunde mikrobiologischer Untersuchungen (bei Probenentnahme)

2.1.3 Patienteneinteilung

Die Patienten wurden nach dem Gestationsalter, dem Vorhandensein einer Infektion und dem Vorliegen einer BPD eingeteilt. Eine Übersicht der Patienten und der entsprechenden Einteilung findet sich im Anhang (7.5 Patientenübersicht).

2.1.3.1 Gruppierung nach Gestationsalter

Frühgeborene mit einem Gestationsalter von weniger als 224 Tagen (< 32+0 SSW) bildeten Gruppe 1, Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 224 bis 258 Tagen (32+0 – 36+5 SSW) wurden Gruppe 2 und alle reifgeborenen Patienten mit einem Gestationsalter \geq 259 Tagen (\geq 37+0 SSW) wurden Gruppe 3 zugeordnet (Abbildung 3).

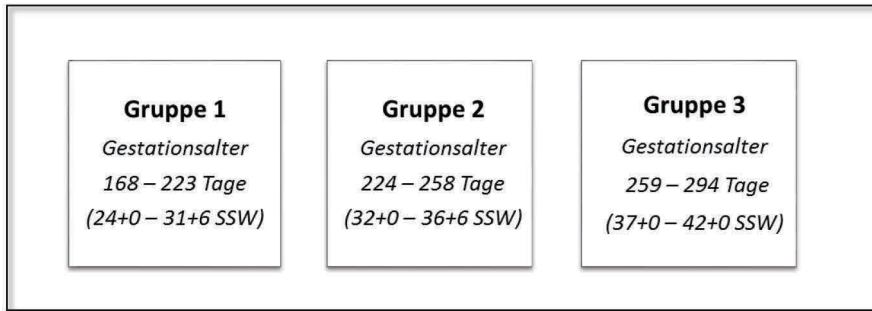


Abbildung 3 Gruppierung der Patienten nach Gestationsalter

2.1.3.2 Einteilung bezüglich des Vorhandenseins einer Infektion

Von einer systemischen Infektion des Patienten wurde ausgegangen, wenn mindestens eines der in Abbildung 4 dargestellten Kriterien – nachfolgend Infektionsscore genannt – zum Probenentnahmezeitpunkt erfüllt war.

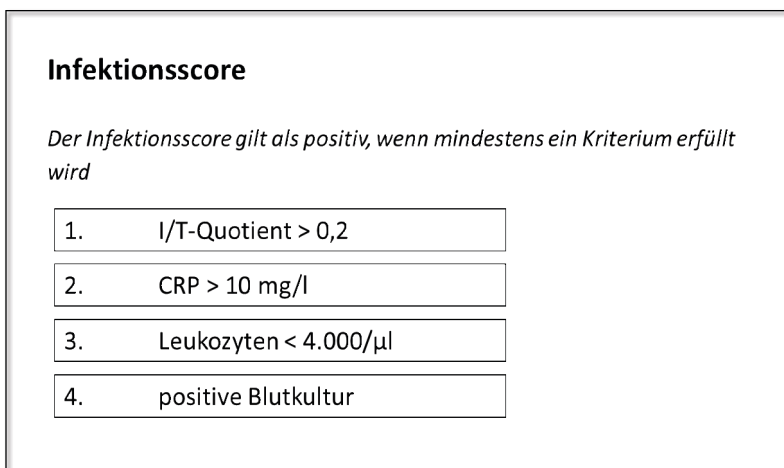


Abbildung 4 Infektionsscore

Die Kriterien wurden abgewandelt und in modifizierter Form in Anlehnung an die laborgestützten Diagnosekriterien einer neonatalen Infektion von Mathers und Pohland sowie der neonatalen Sepsiskriterien nosokomialer Infektionen von Maier und Obladen festgelegt (Mathers und Pohlandt, 1987), (Maier und Obladen, 2017).

2.1.3.3 Einteilung bezüglich des Vorliegens einer BPD

Die Patienten mit einem Gestationsalter < 32 SSW bei Geburt wurden entsprechend der NIH-Konsensuskriterien eingeteilt (siehe Kapitel 1.2.1). Bei Probenentnahme konnte die Einteilung aufgrund der Diagnosekriterien noch nicht erfolgen, sie erfolgte daher retrospektiv.

2.1.4 Trachealspiratproben

2.1.4.1 Gewinnung der Trachealspiratproben

Die Trachealspiratproben wurden ausschließlich bei routinemäßigem Absaugen von Sekretverhalten oder vor Extubation gewonnen. Somit erforderte die Studie keinerlei zusätzliche Interventionen an den Patienten. Die verwendeten Materialien zur Trachealspiratgewinnung sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4 Materialien zur Trachealspiratgewinnung

Material	Hersteller
Trachea-Sekretprobenset	B. Braun, Melsungen, D
Absaugkatheter	B. Braun, Melsungen, D
Ringer-Acetat-Lösung	B. Braun, Melsungen, D
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen Tip One, diverse Größen	StarLab, Ahrensburg, D
Pipetten, diverse Größen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Es wurde eine detaillierte Arbeitsanweisung (Standard Operating Procedure, SOP) erstellt, die den Vorgang und die einzelnen Schritte der Gewinnung der Trachealspiratproben erklärt. Diese wurde dem an der Studie beteiligten Pflegepersonal im Rahmen einer Einweisung in die Probengewinnung ausgehändigt, um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten (siehe Anhang 7.4, SOP „Gewinnung von Trachealspirat bei Frühgeborenen“). Die SOP wurde ursprünglich für Frühgeborene entwickelt, dann aber auch auf den Absaugvorgang bei Reifgeborenen übertragen.

Die Probengewinnung erfolgte zu zweit. Hierzu wurde eine Sekretfalle in den Absaugschlauch zwischengeschaltet und 0,5 ml einer Ringer-Acetat-Lösung steril in einer 2 ml Spritze aufgezogen. Die Länge des Tubus des Patienten wurde am Absaugkatheter markiert, um eine korrekte Einführtiefe des Absaugkatheters zu erzielen. Lagen die Vitalparameter wie die Herzfrequenz und die transkutane arterielle Sauerstoffsättigung des Patienten im Zielbereich, wurde der Respirator vom Tubus dekonnektiert und 0,5 ml einer Ringer-Acetat-Lösung rasch in den Tubus appliziert. Der Respirator oder ein Beatmungsbeutel wurden rekonnektiert und der Patient mit 2 Atemzügen beatmet. Daraufhin wurde der Respirator oder Beatmungsbeutel wieder dekonnektiert, eine zweite Person führte den Absaugkatheter bis zur Markierung in den Tubus ein und aspirierte. Anschließend wurde der Respirator rekonnektiert. Es erfolgte eine Auskultation der Lungen; bei weiterhin bestehendem Sekretverhalt wurde der Vorgang wiederholt. Um im Katheter verbliebene Trachealspiratreste aufzufangen, wurde der Absaugkatheter mit Ringer-Acetat-Lösung gespült.

Das Röhrchen der Sekretfalle wurde mit beiliegendem Deckel verschlossen, mit Entnahmekzeitpunkt sowie einer pseudonymisierten Identifikationsnummer beschriftet und bei + 4 °C verwahrt.

2.1.4.2 Verarbeitung der Trachealspiratproben

Innerhalb der nächsten 12 h wurden die Trachealspiratproben im Forschungslabor für Neonatologie und pädiatrische Immunologie weiter verarbeitet.

Nach Aliquotierung der Trachealspiratproben in mindestens 3 Teile mit je 250 µl in Reaktionsgefäße wurden diese bei –21 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

2.2 Protein- und Zytokinquantifizierung

2.2.1 Verwendete Materialien zur Protein- und Zytokinquantifizierung

In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die zur Protein- und Zytokinquantifizierung verwendeten Materialien, Geräte und Software aufgelistet.

Tabelle 5 Geräte und Software zur Protein- und Zytokinquantifizierung

Geräte und Software	Hersteller
Mikrotiterplatten Waschautomat ASYS Atlantis 4	Hitech, Eugendorf, A
Mikrotiterplatten Lesegerät ASYS UVM 340	Hitech, Eugendorf, A
MikroWin 2000 Software	Mikrotek, Overath, D
Rüttler KM-2	Edmund Bühler, Hechingen, D
Heraeus B15 Brutschrank	Kendro, Hanau, D

Tabelle 6 Materialien zur Protein- und Zytokinquantifizierung

Chemikalien und Utensilien	Hersteller
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, A
BCA Protein Assay Kit BCA Reagenz A + B Albumin Standard, Ampullen 2 mg/ml	Pierce, Rockford, USA
Ampuwa® Spüllösung, steriles Wasser (Aqua ad iniectabilia)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Wasser (Water, Mol Bio grade) (DNase, RNase, Proteinase frei)	5 Prime, Hamburg, D
ELISA Buffer Kit PBS (20-fach konzentriert) WashBuffer (1% TWEEN-20 in PBS) Blocking Buffer (1% BSA in PBS) ABTS Liquid Substrate	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Human IFN- γ Mini ELISA Development Kit Human IFN- γ Standard Capture Antibody + Detection Antibody	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Human IL-6 Mini ELISA Development Kit Human IL-6 Standard Capture Antibody + Detection Antibody	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Avidin Peroxidase Conjugat	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Ringer-Acetat-Lösung	B. Braun, Melsungen, D
Mikrotiterplatten Verschlussfolien	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Costar®96-Well Mikrotiterplatten	Corning Inc., New York, USA
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen Tip One, diverse Größen	StarLab, Ahrensburg, D
CellStar® Tubes 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

2.2.2 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Um den Verdünnungsgrad der einzelnen Trachealspiratproben festzustellen, wurde der Proteingehalt des abgesaugten Trachealspirats ermittelt. Dies erfolgte durch die kolorimetrische Bestimmung mit einem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) und die anschließende Quantifizierung des Proteingehalts durch Messung der Absorption der Trachealspiratproben bei 562 nm.

Beim BCA-Assay reagieren die Proteine quantitativ mit zweiwertigen Kupferionen. Die entstehenden einwertigen Kupferionen bilden im Komplex mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, der spektrophotometrisch gemessen wird. Mithilfe mitgeführter Standards bekannter Konzentration wird eine Eichkurve erstellt. Damit kann die Proteinkonzentrationen der Trachealspiratproben berechnet werden.

2.2.2.1 Versuchsablauf zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die zu bestimmenden Trachealspiratproben wurden vom Lagerungsort bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Eisbett aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Um sowohl stark verdünnte Trachealspiratproben als auch Proben mit geringen Volumina zu bestimmen, wurden die Standards nach dem Enhanced Protocol des Herstellers angesetzt. Hierzu wurden die vorgegebenen Ampullen des Albumin-Standards mit einer BSA-Konzentration von 2 mg/ml mit PBS entsprechend Tabelle 7 so verdünnt, dass sich eine Standardreihe von 250, 125, 50, 25, und $5\text{ }\mu\text{g Protein/ml}$ ergab.

Tabelle 7 Verdünnungsstufen des BCA-Assays zur Proteinbestimmung

Standard	Verdünnung	Zielkonzentration Protein ($\mu\text{g/ml}$)
A	100 μl des Albumin Standards; (2 mg/ml) + 700 μl PBS	250
B	400 μl des Standards A + 400 μl PBS	125
C	300 μl des Standards B + 450 μl PBS	50
D	400 μl des Standards C + 400 μl PBS	25
E	100 μl des Standards D + 400 μl PBS	5
F	400 μl PBS	0

Trachealspiratproben mit geringen Volumina wurden mit PBS in entsprechendem Verhältnis verdünnt, sodass 25 μl Probenvolumen erzielt wurden. Alle anderen Trachealspiratproben wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen wie in Tabelle 8 angegeben mit PBS angesetzt, sodass auch bei Trachealspiratproben mit entnahmebedingtem geringen Verdünnungsgrad die Proteinkonzentration im Detektionsbereich ($5\text{--}250\text{ }\mu\text{g Protein/ml}$) lag.

Tabelle 8 Verdünnungsstufen der Trachealspiratproben zur Proteinbestimmung

Verdünnung	Mischverhältnis
1:2	15 μl Trachealspiratprobe + 15 μl Dulbecco's PBS
1:5	6 μl Trachealspiratprobe + 24 μl Dulbecco's PBS
1:10	3 μl Trachealspiratprobe + 27 μl Dulbecco's PBS

Für jede zu messende Trachealspiratprobe wurden 200 μl BCA-Arbeitsreagenz hergestellt. Hierzu wurde BCA Reagenz A und BCA Reagenz B im Verhältnis 50:1 in einem verschließbaren Gefäß gemischt und lichtgeschützt bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Zunächst erfolgte das Auftragen der Standardreihen und der Trachealspiratproben in den verschiedenen Verdünnungsstufen auf 96-Well-Mikrotiterplatten. Es wurden 25 μl Trachealspiratprobe oder Standard nach einem zuvor angefertigten Pipettierschema in jede Vertiefung pipettiert. Daraufhin wurden 200 μl des Arbeitsreagenz pro Vertiefung hinzu pipettiert und die Mikrotiterplatte für 30 Sekunden auf den Rüttler gestellt, um eine gute Durchmischung der

Tracheal aspiratproben / Standards und des Arbeitsreagenz zu erreichen. Die Platte wurde abgedeckt bei 60 °C für 90 Minuten inkubiert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption der Tracheal aspiratproben bei 562 nm mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Mithilfe der zugehörigen Software MikroWin 2000 ließ sich anhand der Standardkurve die Proteinkonzentration der Tracheal aspiratproben berechnen.

2.2.3 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ und IL-6

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Interferon Gamma (IFN- γ) und Interleukin-6 (IL-6) im Tracheal aspirat wurden Kits der Firma PeproTech, Rocky Hill, USA verwendet. Diese basieren auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), wie in Abbildung 5 dargestellt. Die Böden der Mikrotiterplatten werden mit einem „Capture Antibody“ beschichtet; diese binden spezifisch das gesuchte Zytokin. Durch Zugabe eines biotinylierten „Detection Antibody“ wird das gesuchte Zytokin an einem weiteren Epitop gebunden. Das Avidin-Peroxidase-Konjugat bindet nun an das am Detection Antibody gekoppelte Biotin und enthält zudem das Enzym Peroxidase. Diese Peroxidase setzt ein daraufhin zugegebenes Substrat so um, dass ein Reaktionsprodukt mit einem Absorptionsmaximum bei 405 nm entsteht. Die spektrophotometrisch gemessenen optischen Dichten der Tracheal aspiratproben erlauben nun quantitativ auf das in der Tracheal aspiratprobe enthaltene Zytokin zurückzuschließen.

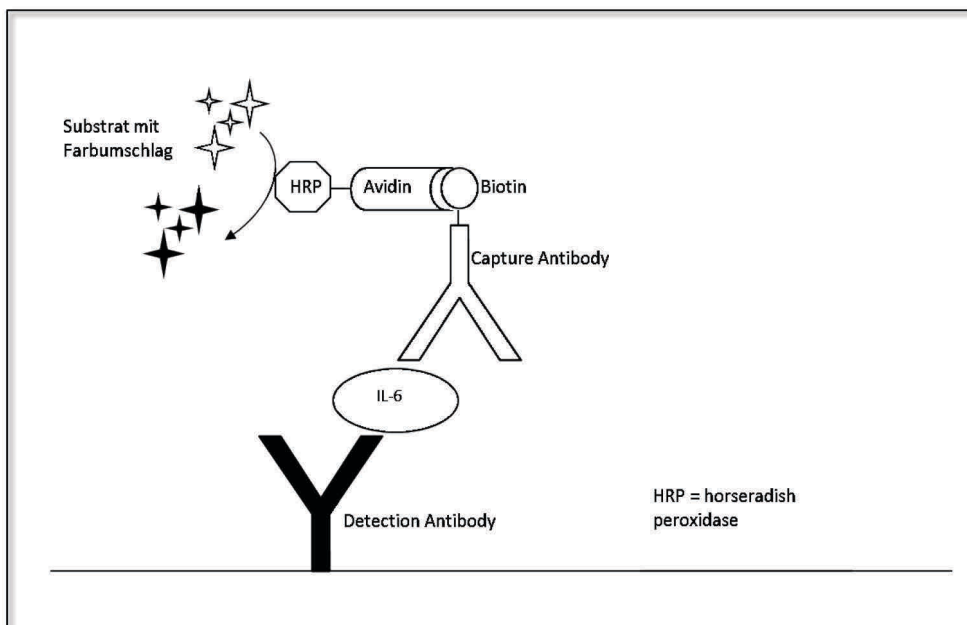


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA für IL-6 (eigene Darstellung)

2.2.3.1 Versuchsablauf ELISA

Zu Beginn wurde eine für den Versuch ausreichende Menge der Stammlösungen PBS, Diluent und Waschpuffer (WashBuffer) mit sterilem Wasser (Aqua ad iniectabilia) im Verhältnis 1:20 verdünnt und in verschließbaren Röhrchen verwahrt. Die Tracheal aspiratproben wurden im Eisbett aufgetaut und langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Die im Kit enthaltenen Antikörper und rekombinanten Standards wurden entsprechend den Herstellerangaben einmalig zu Beginn mit sterilem Wasser rekonstituiert und dann bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die weiteren Versuchsdurchführungen aufbewahrt.

Im ersten Arbeitsschritt erfolgte das Beschichten der Mikrotiterplatten. Zur Beschichtung der Platten wurden die Capture Antikörper für IFN- γ und IL-6 mit PBS auf eine Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt. In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (zur IFN- γ -Bestimmung) wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ des Capture Antikörpers für IFN- γ pipettiert; analog dazu wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ des Capture Antikörpers für IL-6 in jede Vertiefung einer zweiten Platte (zur IL-6-Bestimmung) aufgetragen. Die Platten wurden beschriftet, mit einem Klebefilm abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Waschen der Platten mit Waschpuffer im ELISA-Platten-Waschautomat erfolgte in einem zweiten Arbeitsschritt das Auftragen des auf Raumtemperatur angewärmten Blockpuffers (Blocking Buffer). Hierzu wurden $300\text{ }\mu\text{l}$ Blockpuffer in jede Vertiefung pipettiert. Die beiden Platten wurden erneut mit Klebefolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, um freie, nicht durch den Capture Antikörper belegte Bindungsstellen des Plattenbodens abzusättigen.

Währenddessen wurden im dritten Arbeitsschritt Verdünnungsreihen hergestellt. Dazu wurden die im Kit mitgelieferten Standards von IL-6 und IFN- γ durch seriell Verdünnen unter Zugabe von Diluent in die in Tabelle 9 angegebenen Konzentrationsstufen überführt:

Tabelle 9 Verdünnungsreihe zur Bestimmung von IFN- γ und IL-6

	IFN- γ (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)
Ausgangskonzentration	3	2
Stufe 2	1,5	1
Stufe 3	0,75	0,5
Stufe 4	0,375	0,25
Stufe 5	0,1875	0,125
Stufe 6	0,0938	0,0625
Stufe 7	0,0469	0,0313
Stufe 8	0,0234	0,0078
Stufe 9	0,0117	0,0039
Stufe 10	0,005	0,002

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten erneut viermal gewaschen. Im vierten Arbeitsschritt erfolgte das Auftragen der zuvor hergestellten Standardreihen und der Trachealaspiratproben. In den ersten beiden Reihen der Platten wurde die entsprechende Standardreihe in Doppelbestimmung aufgetragen, dazu als Leerwerte Diluent und Ringer-Acetat-Lösung, die als Verdünnungslösung der Trachealaspiratproben dienten (100 µl/Vertiefung). Dann folgte das Auftragen der zu bestimmenden Trachealaspiratproben: Jeweils 100 µl jeder Trachealaspiratprobe wurden nach Pipettierschema auf den Platten zur Bestimmung von IFN- γ beziehungsweise IL-6 aufgetragen. Bei geringerem vorhandenen Probenvolumen wurde die Trachealaspiratprobe vorher mit gleichem Volumen Diluent (Verhältnis 1:2) verdünnt und die entsprechende Probennummer notiert. Beide Platten wurden mit Klebefolie abgedeckt und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Entfernung des überschüssigen Probenmaterials folgten vier Waschzyklen im Waschautomat. Im fünften Schritt erfolgte das Auftragen der biotinylierten Detection Antikörper. Der Detection Antikörper zur IFN- γ -Bestimmung wurde durch Zugabe von Diluent auf eine Zielkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Davon wurden 100 µl in jede Vertiefung der IFN- γ -Platte aufgetragen. Der Detection Antikörper zur IL-6-Bestimmung wurde durch Verdünnung mit Diluent auf eine Konzentration von 0,25 µg/ml gebracht; es wurden jeweils 100 µl in jede Vertiefung der IL-6-Platte pipettiert. Nach erneutem Abkleben mit Folie folgte eine weitere zweistündige Inkubationsperiode.

Nach viermaligem Waschen der Platten zur Entfernung nichtgebundener Detection Antikörper wurde im sechsten Arbeitsschritt das Avidin-Peroxidase-Konjugat aufgetragen. Das im Kit enthaltene Konjugat wurde im Verhältnis 1:2000 mit Diluent verdünnt und 100 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte ein letzter Waschzyklus.

Im letzten Arbeitsschritt wurden zügig 100 µl ABTS Liquid Substrat zu jeder Vertiefung pipettiert und die Platten in das Lesegerät gestellt. Dort wurde der Farbumschlag durch Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase spektrophotometrisch anhand Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mit Untergrundkorrektur bei 650 nm bestimmt. Bei beiden Platten erfolgte die Messung der Absorption der Trachealaspiratproben alle 2–4 min über einen Zeitraum von 40 min.

Durch die mitgeführte Verdünnungsreihe ließ sich anhand der optischen Dichten der einzelnen Trachealaspiratproben die entsprechende Konzentration der gesuchten Zytokine IFN- γ und IL-6 in den Trachealaspiratproben errechnen.

2.3 Elektronische Nase / Smellprints

2.3.1 Die Elektronische Nase „Cyranoze C-320“

Eine Elektronische Nase (Enose) ist ein portables Gerät zur Detektion flüchtiger organischer Verbindungen (Volatile Organic Compounds, kurz VOCs) in Gasen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Elektronische Nase „Cyranoze C-320“ (Abbildung 6) ist mit 32 Biopolymersensoren, sogenannten Chemosensoren, ausgestattet. Diese Chemosensoren erkennen volatile organische Verbindungen (VOCs). Diese sind organische Verbindungen, die schon bei niedrigen Temperaturen (zum Beispiel bei menschlicher Körpertemperatur) in Gasform vorliegen. Bindet eine in der Gasprobe enthaltene flüchtige Verbindung an den für diese Substanz sensiblen Sensor der Enose, ändert sich der Widerstand der Sensoren und ergibt so einen Messwert. Für jede untersuchte Probe entsteht so innerhalb von Sekunden ein individuelles Muster aus 32 Messwerten, ein sogenannter Smellprint.

Die Messung der VOCs durch die hier verwendete Cyranoze 320 ist verblindet, es ist also nicht bekannt, welcher Sensor welche volatile Substanz registriert. Vielmehr geht man davon aus, dass jeder Sensor mehrere verschiedene Substanzen detektiert (Lewis, 2004). Somit lassen sich anhand der Vergleiche einzelner Sensorwerte keine Rückschlüsse auf eine entsprechende Veränderung individueller Substanzen beim Patienten ziehen (Thaler und Hanson, 2005).



Abbildung 6 Schematische Darstellung der Cyranoze 320, mit freundlicher Genehmigung des Erstellers Akira Hattesoht

2.3.2 Verwendete Materialien zur Analyse der Smellprints

In Tabelle 10 sind die zur Analyse der Smellprints mittels Elektronischer Nase (Enose) verwendeten Materialien, Geräte und Software angegeben.

Tabelle 10 Materialien, Geräte und Software der Elektronischen Nase

Materialien, Geräte und Software	Hersteller
Cyranose 320-C	Smiths Detection Group Ltd., Watford, UK
PC Nose 6.9	Cyranose Sciences Inc. Smiths Detection, Watford, UK
AccuBlock™ digital drybath	Labnet Int., Woodbridge, USA
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Druckluft DIN 12021	Linde, Pullach, D

2.3.3 Versuchsablauf zur Analyse der Smellprints

Im vorliegenden Versuch wurden jeweils 250 µl jeder Trachealaspiratprobe in Reagiergefäßen zunächst auf Raumtemperatur gebracht und dann im Heizblock auf 37 °C erwärmt, um den dabei entstehenden Gasraum über dem Flüssigkeitsspiegel mit der Enose zu analysieren. Dazu wurde das Ansaugrohr der Enose per Hand über die Öffnung des entsprechenden Reagiergefäß gehalten. Ein von der Enose vorgegebenes Programm sorgte dafür, dass über einen Zeitraum von 60 Sekunden ein konstantes Gasvolumen angesaugt und durch das Gerät an den Sensoren entlanggeleitet wurde. Für jede Trachealaspiratprobe wurde ein Smellprint anhand der emittierten Substanzen des Trachealaspirats erstellt und durch das zugehörige Programm PC Nose 6.9 aufgezeichnet. Zwischen zwei Messungen erfolgte eine Reinigungsphase von 60 Sekunden durch automatisches Ansaugen von Druckluft nach DIN 12021.

2.4 Mikrobiologische Analysen

Die entnommenen Trachealaspirate wurden mikrobiologisch untersucht. Dazu wurde jeweils eine Teilprobe des Trachealaspirats nach klinikinternen Standards zur Routinediagnostik an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg verbracht. Dort erfolgten eine mikroskopische Untersuchung und eine Anzucht auf Kulturmedien.

Zusätzlich zur routinemäßig durchgeführten konventionellen Untersuchung erfolgte im Rahmen dieser Studie eine molekulare – auf einem genomischen Ansatz basierende – Analyse des in der Trachealaspiratprobe vorhandenen Keimspektrums. Diese Analyse führte das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (AG Prof. Dr. Domann) im Rahmen eines kollaborativen Projektes durch. Die in Marburg entnommenen Proben wurden

nach Aliquotierung bis zum gekühlten Transport per Kurier bei + 4 °C aufbewahrt, in Gießen wurden die Proben bei –21°C bis zur Sammelanalyse verwahrt.

2.4.1 Versuchsaufbau der genomischen Keimdiagnostik (DHPLC/WAVE®)

Die Analyse basiert auf der chromatographischen Trennung des in der Trachealspiratprobe vorhandenen bakteriellen Genmaterials anhand einer denaturierenden Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC) im WAVE®-System.

Dazu wurden 250 µl jeder Trachealspiratprobe in einem Reagiergefäß auf Eis nach Gießen ins Institut für Medizinische Mikrobiologie versendet. Dort erfolgte zunächst die Extraktion der in den Trachealspiratproben vorhandenen DNA. Hierzu wurde ein Kit der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Primern 0933F (vorwärts) und 1407R (rückwärts) zur Amplifikation der V6-V8 Region der 16S-rDNA Gene.

Dieser Genabschnitt kodiert für die kleine Untereinheit prokaryotischer Ribosomen und ist in fast allen Bakterienspezies vorhanden. Daher eignet er sich als Nachweis für das Vorhandensein von Bakterien. Zudem dient er durch die unterschiedlichen Sequenzen der hypervariablen Regionen V6-V8 zur Identifikation der Keime.

Die 16S-rDNA Amplifikate einer Trachealspiratprobe wurden dann dem DHPLC/WAVE®-System (Abbildung 7) zugeführt. Dort wurden die amplifizierten 16S-rDNA Abschnitte durch das Erhitzen auf 50 °C bis 70 °C im DNASep® Cartridge partiell denaturiert. Aufgrund der Variationen in der Basenabfolge läuft dies bei Amplifikaten mit verschiedenen Sequenzen unterschiedlich schnell ab. Denaturierte ein Abschnitt, wurde er aus dem DNASep® Cartridge freigesetzt und wanderte durch ein UV-Spektrometer zur Detektion. Dabei entstand ein Chromatogramm für jede Trachealspiratprobe, auf dem die Zeitpunkte der Freisetzung von Amplifikaten durch Bildung eines Peaks erkennbar waren. Peaks zu verschiedenen Zeitpunkten entsprachen Gruppen von Amplifikaten mit unterschiedlichen Basenabfolgen, also Amplifikaten unterschiedlicher Bakterienspezies. Ein angeschlossener Fragmentkollektor sammelte automatisch Proben aus den sich bildenden Peaks des Chromatogramms. Diese Proben wurden im Anschluss reamplifiziert und sequenziert. Durch Abgleich der Sequenzen mit der Datenbank GenBank® (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ließen sich die entsprechenden Bakterien identifizieren. Abschließend erfolgte ein Abgleich zwischen den konventionell erhobenen und den mittels DHPLC/WAVE®-Analyse gefundenen Keimen.

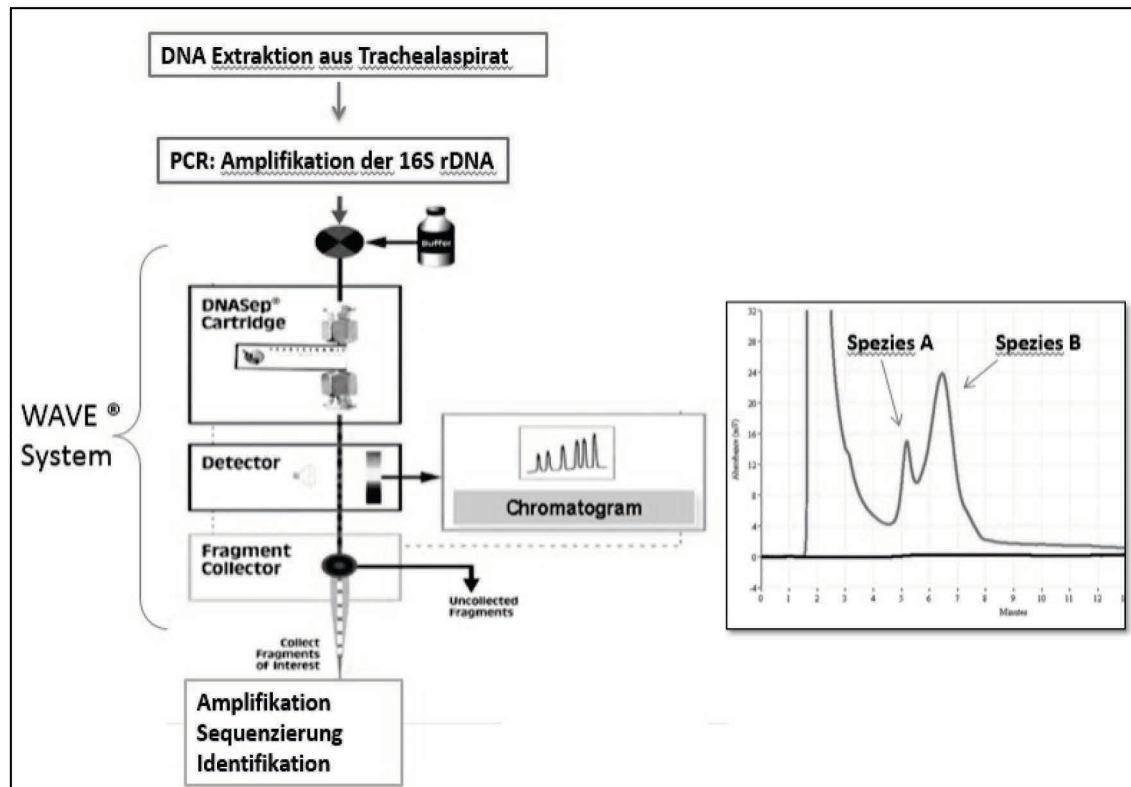


Abbildung 7 Schematische Darstellung des DHPLC/WAVE-Systems
(modifiziert nach Leddy et al., 2004)

2.5 Statistische Auswertung

2.5.1 Auswertung der klinischen Daten, der mikrobiologischen Analyse und der Zytokinquantifizierung

Mithilfe der Programme Microsoft® Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und IBM® SPSS® Statistics Version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) wurden sowohl die klinischen Daten als auch die experimentell erhobenen Daten der Zytokinquantifizierung und der mikrobiologischen Analysen erfasst und statistisch ausgewertet.

Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte bei Normalverteilung (Test auf Normalverteilung nach Kolmogorow-Smirnow) mittels t-Test. Bei nicht normalverteilten Daten wurden Median und Quartilen berechnet und der p-Wert mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Vor Beginn des Versuches wurden folgende Signifikanzniveaus definiert: $p \geq 0,05$ entspricht keiner nachgewiesenen Signifikanz; $p < 0,05$ entspricht einer statistischen Signifikanz.

2.5.2 Auswertung der Smellprints der Elektronischen Nase

Die statistische Auswertung des Datensatzes der Sensormesswerte der Elektronischen Nase (Enose) wurde mittels einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) durchgeführt. Dieses multivariate statistische Verfahren ermöglicht es, den Datensatz entsprechend der Fragestellung (Prädiktion der BPD und Diagnostik von Infektionen) auf einige wenige Dimensionen zu begrenzen. So lassen sich Unterschiede zwischen den Smellprints der verschiedenen untersuchten Gruppen auf wenige relevante Sensormesswerte reduziert darstellen. Verwandtschaft zwischen verschiedenen Smellprints können dann anhand von Distanzmaßen, beispielsweise der in dieser Arbeit verwendeten Mahalanobis-Distanz, bemessen werden. Eine Mahalanobis-Distanz $> 1,96$ wurde als signifikant angesehen. Außerdem wurde der Kreuzvalidierungswert mittels k-facher Kreuzvalidierung errechnet ($k = \text{Produkt der Gruppengrößen}$).

Diese Analyse erfolgte mit den Programmen R 3.0.2 (Prozess und Statistik, Dormagen, Deutschland) und GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Im Zeitraum von Dezember 2010 bis Juli 2012 wurden insgesamt 48 Trachealaspiratproben von 35 Patienten gewonnen und analysiert. Nachträglich wurden 2 Trachealaspiratproben von 2 Patienten aus der Studie ausgeschlossen; bei einem Patienten bestand eine erst nach Studieneinschluss diagnostizierte schwerwiegende syndromale Erkrankung, die den Entschluss zu einer palliativen Therapie zur Folge hatte, bei einem weiteren fehlten wichtige klinische Daten, wegen Verlegung in eine andere Klinik.

Somit gingen 46 Trachealaspiratproben von 33 verschiedenen Patienten in die Auswertung ein.

3.1.1 Mehrfachentnahmen

Von 7 Patienten wurden im Verlauf der invasiven Beatmung mehrere Trachealaspiratproben gewonnen – bei 5 Patienten jeweils 2, bei einem Patienten 3 und bei einem weiteren Patienten 7 Trachealaspiratproben.

Bei 3 Patienten erfolgte die erste oder erneute Abnahme der Trachealaspirate im Rahmen einer Reintubation bei respiratorischer Verschlechterung, bei den anderen 30 Patienten nach der Erstintubation.

3.1.2 Entnahmezeitpunkte

26 Trachealaspiratproben von 23 Patienten wurden unmittelbar nach Intubation oder bis 12 Stunden nach Intubation oder Reintubation entnommen. 20 Probenentnahmen erfolgten mehr als 12 Stunden nach Intubation. Davon stammten 6 Trachealaspiratproben von 6 Patienten, bei denen nur einmalig ein Trachealaspirat entnommen wurde. Weitere 14 Trachealaspiratproben stammten von 7 Patienten, bei denen im Verlauf mehrere Probenentnahmen stattfanden.

3.2 Auswertung der klinischen Daten

3.2.3 Reifegruppierung

Für die Auswertungen erfolgte eine Einteilung der Patienten in drei Gruppen anhand ihres Gestationsalters: Abbildung 8 zeigt die Anzahl der gewonnenen Proben je Reifegruppe, in Tabelle 11 sind die erhobenen klinischen Daten für die verschiedenen Reifegruppen erfasst.

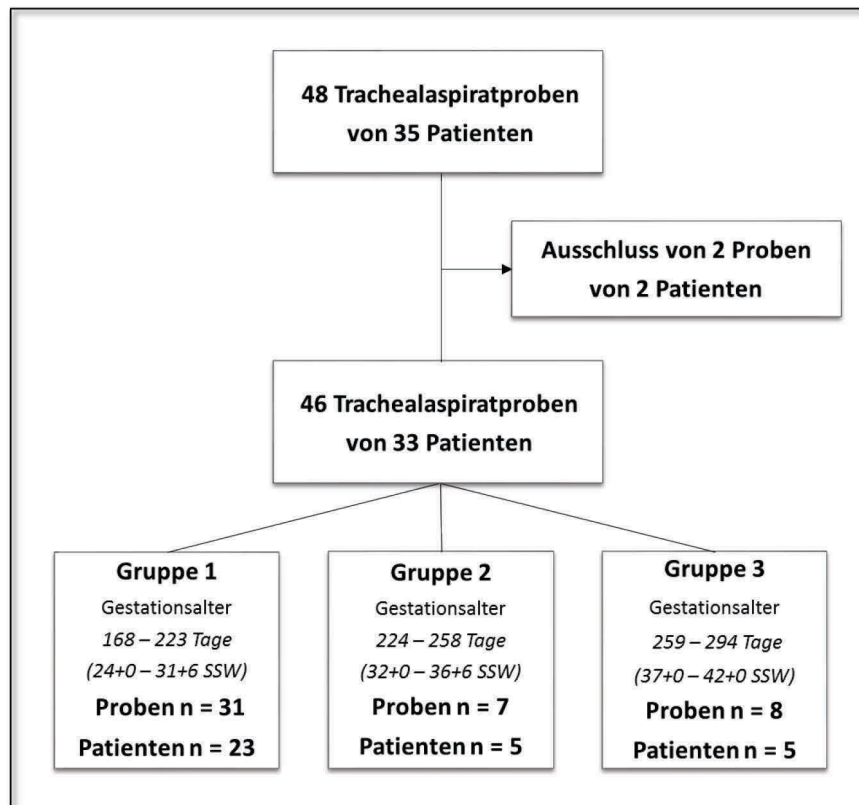


Abbildung 8 Übersicht der Anzahl der Patienten und Proben pro Reifegruppe

Tabelle 11 Auswertung der klinischen Daten nach Reifegruppe

Median (Quartilen)	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Patienten, n	23	5	5
Gestationsalter, Tage	190 (176,5; 202)	253 (244; 256)	279 (261; 281)
Männliches Geschlecht, n	14	3	2
Geburtsgewicht, g	880 (737,5; 1085)	2290 (2190; 2645)	3375 (3180; 3640)
Vaginale Geburt, n	7	1	2
Beatmungsdauer invasiv, Stunden	25 (15; 328,75)	29 (19; 36)	10 (6; 89)

3.2.1 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD

In Tabelle 12 ist die Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD nach NIH-Kriterien (siehe Kapitel 1.2.1) zusammengefasst. Hierbei wurden nur Patienten der Gruppe 1, also Frühgeborene mit einem Gestationsalter <32 Schwangerschaftswochen ausgewertet.

Patientenkollektiv: Gruppe 1 (Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 32SSW)

Tabelle 12 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD

Median (Quartilen)	keine BPD n = 11 Patienten	BPD n = 12 Patienten	p-Werte
Gestationsalter, Tage	205 (198; 206,5)	176 (172,25; 180,25)	p = 0,000016
Männliches Geschlecht, n	5	9	
Geburtsgewicht, g	1045 (892,5; 1262,5)	725 (556,25; 746,25)	p = 0,001
Vaginale Geburt, n	1	6	
Beatmungsdauer invasiv, Stunden	11 (7; 19)	384 (328,75; 579)	p = 0,000034

3.2.2 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf das Vorliegen einer Infektion

In Tabelle 13 ist die Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf das Vorliegen einer systemischen Infektion dargestellt. Die Einteilung erfolgte mittels des in Kapitel 2.1.3.2 Einteilung bezüglich des Vorhandenseins einer Infektion, Abbildung 5 vorgestellten Infektionsscores. Hierbei wurden die Patienten aller Reifegruppen miteinbezogen. Bei Mehrfachentnahmen gilt der Infektionsscore als positiv, wenn der Patient zu mindestens einem Zeitpunkt der Probenentnahmen zeitgleich einen positiven Infektionsscore aufgewiesen hat.

Patientenkollektiv: alle Patienten (Gruppe 1–3)

Tabelle 13 Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf das Vorliegen des Infektionsscores

Median (Quartilen)	Infektionsscore negativ n=23 Patienten	Infektionsscore positiv n=10 Patienten	p-Werte
Gestationsalter, Tage	210 (193; 256)	178 (175,5; 194,25)	p = 0,038
Männliches Geschlecht, n	12	6	
Geburtsgewicht, g	1495 (880; 2540)	735 (622; 970)	p = 0,034
Vaginale Geburt, n	5	4	
Beatmungsdauer invasiv, Stunden	20 (9,5; 91)	227,5 (19,75; 514,5)	p = 0,100

3.3 Zytokinquantifizierung

3.3.1 Zytokinkonzentrationen bei späterer Entwicklung einer BPD

Patientenkollektiv: Gruppe 1 (Gestationsalter < 32 SSW); nur die zeitlich erste entnommene Trachealspiratprobe nach Intubation der jeweiligen Patienten wurde ausgewertet

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen der Zytokine IL-6 und IFN- γ zwischen Patienten, die keine BPD entwickelten, und Patienten, die später eine BPD entwickelten (Abbildungen 9 und 10).

Die Konzentration für IL-6 lag in der Gruppe der Patienten, die keine BPD entwickelten ($n = 11$) im Median bei 0,293 ng pro mg Protein (Quartilen 0,077; 0,537), bei Patienten, die später eine BPD entwickelten ($n = 12$) bei 0,675 ng pro mg Protein (Quartilen 0,191; 1,133).

Die Konzentration für IFN- γ lag in der Gruppe der Patienten, die keine BPD entwickelten, im Median bei 0,055 ng pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,101), bei Patienten, die später eine BPD entwickelten bei 0,110 ng IFN- γ pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,365).

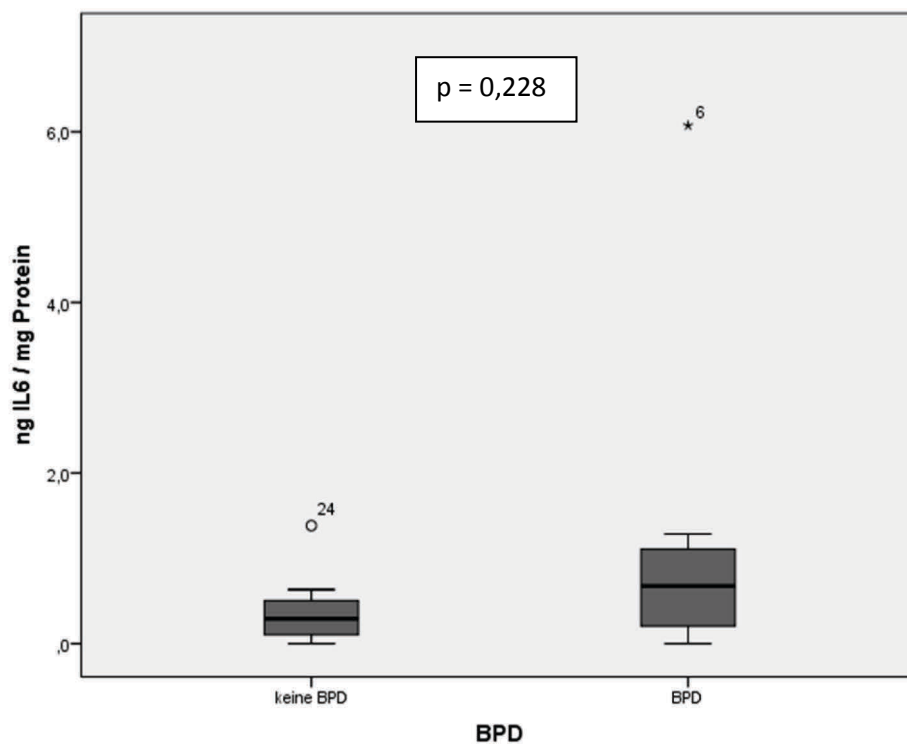


Abbildung 9 Boxplot der IL-6-Konzentrationen im Trachealspirat bei Patienten mit und ohne spätere Entwicklung einer BPD

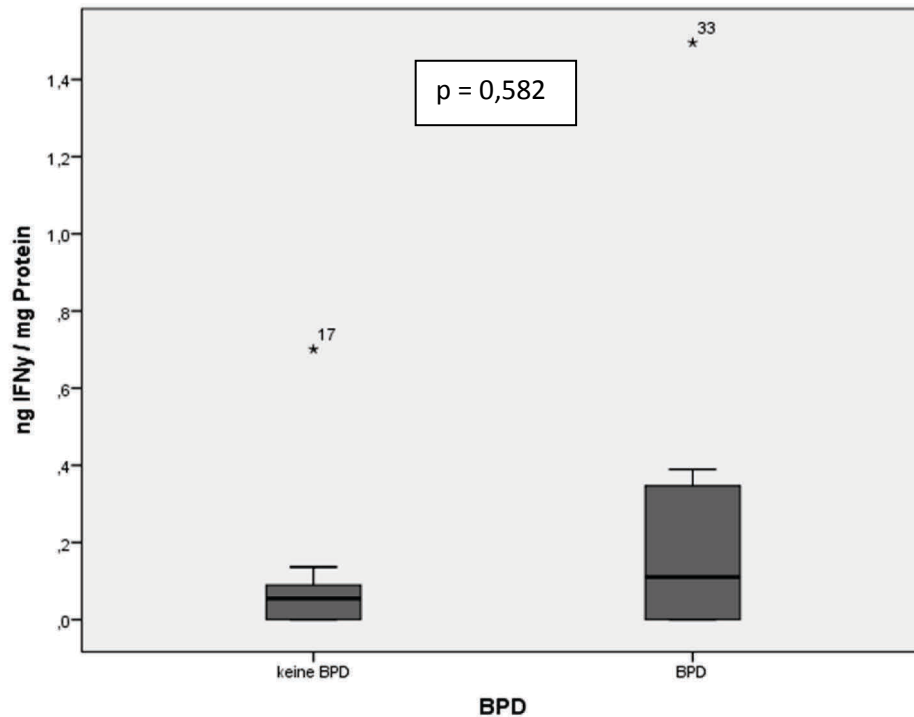


Abbildung 10 Boxplot der IFN- γ -Konzentrationen im Trachealspirat bei Patienten mit und ohne spätere Entwicklung einer BPD

3.3.2 Zytokinkonzentrationen bei Infektionen

Patientenkollektiv: Gruppen 1–3; es wurden alle Trachealspiratproben der jeweiligen Patienten ausgewertet

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zytokinkonzentrationen im Trachealspirat von Patienten mit positivem und negativem Infektionsscore.

Die Konzentration für IL-6 lag im Trachealspirat der Patienten mit negativem Infektionsscore (n = 36) im Median bei 0,250 ng pro mg Protein (Quartilen 0,093; 0,910), bei Patienten mit positivem Infektionsscore (n = 10) bei 0,281 ng pro mg Protein (Quartilen 0,119; 0,599) ($p = 0,933$).

Die Konzentration für IFN- γ lag im Trachealspirat der Patienten mit negativem Infektionsscore im Median bei 0,053 ng pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,254), bei Patienten mit positivem Infektionsscore bei 0,000 ng pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,054) ($p = 0,115$).

3.3.3 Zytokinkonzentration und mikrobiologische Befunde

Patientenkollektiv: Gruppen 1–3; es wurden alle Trachealaspiratproben der jeweiligen Patienten ausgewertet. Der Keimnachweis galt als positiv, wenn in mindestens einer mikrobiologischen Analysemethode (genomisch oder konventionell) ein Keimnachweis im Trachealaspirat gelang.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zytokinkonzentrationen im Trachealaspirat von Patienten mit und ohne Keimnachweis im Trachealaspirat.

Die Konzentration für IL-6 lag im Trachealaspirat mit negativem Keimnachweis (n = 25) im Median bei 0,278 ng pro mg Protein (Quartilen 0,091; 0,682), im Trachealaspirat mit Keimnachweis (n = 21) bei 0,253 ng pro mg Protein (Quartilen 0,106; 0,905) (p = 0,942).

Die Konzentration für IFN- γ lag im Trachealaspirat mit negativem Keimnachweis im Median bei 0,053 ng pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,170), im Trachealaspirat mit Keimnachweis bei 0,029 ng pro mg Protein (Quartilen 0,000; 0,178) (p = 0,679).

3.4 Elektronische Nase / Smellprints

3.4.1 Smellprints bei Infektionen

Patientenkollektiv: Gruppen 1 und 2 (Gestationsalter < 37 SSW); es wurden alle Trachealaspiratproben der jeweiligen Patienten eingeschlossen. Der Keimnachweis galt als positiv, wenn in mindestens einer mikrobiologischen Analysemethode (genomisch oder konventionell) Bakterien im Trachealaspirat identifiziert werden konnten

Zunächst erfolgte die Einteilung nach dem bereits zuvor verwendeten Infektionsscore in Trachealaspiratproben von Patienten mit positivem Infektionsscore (inf+) und negativem Infektionsscore (inf-). Zusätzlich wurde differenziert, ob bei der jeweiligen Trachealaspiratprobe ein mikrobiologischer Keimnachweis gelang (germ+ / germ-). Dieser erfolgte mittels konventioneller Analysen und / oder mittels genomischer Analyse.

Die Smellprints der Trachealaspiratproben von Patienten mit systemischen Infektionszeichen (inf+, n = 8) zum Entnahmezeitpunkt unterschieden sich signifikant von den Smellprints der Trachealaspiratproben von Patienten ohne systemische Infektionszeichen (inf-), unabhängig davon, ob sich bei negativen systemischen Infektionszeichen Bakterien im Trachealaspirat nachweisen ließen (germ+ inf- n = 14) oder nicht (germ- inf-, n = 16). Die Kreuzvalidierungsrate (CVV) lag bei 62,5% (germ+ inf-) respektive bei 70% (germ- inf-), basierend auf einer Mahalanobis-Distanz (MD) von 2,39 (germ+ inf-) und 2,55 (germ- inf-). Dies ist in Tabelle 14 sowie in Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 14 Statistische Auswertung der Smellprints bei Patienten mit Zeichen einer systemischen Infektion (inf+) sowie Patienten ohne Infektionszeichen (inf-) in Abhängigkeit von einem Keimnachweis (germ+/-)

		p-Wert	CVV	MD
inf+	germ+ inf-	< 0,0001	62,5%	2,39
	germ- inf-	< 0,0001	70%	2,55

Die Smellprints der Trachealspiratproben von Patienten ohne systemische Infektionszeichen zum Entnahmezeitpunkt unterschieden sich im Hinblick auf den positiven oder negativen Nachweis eines Keimes (germ+ inf-; germ- inf-) in der Probe nicht signifikant voneinander ($p = 0,11$). Wurden mehrere Trachealspiratproben eines Patienten untersucht, erfolgte die Bestimmung des Infektionsscores jeweils zeitnah zur Probenentnahme. Dadurch ließen sich zwei verschiedene Trachealspiratproben von zwei Patienten im Verlauf unterschiedlichen Gruppen zuordnen. Von 2 Patienten konnte sowohl kurz vor Beginn einer systemischen Infektion als auch währenddessen eine Trachealspiratprobe gewonnen werden (Nummer 1; 15; Hervorhebung in Weiß). Weitere 3 Patienten zeigten erst im Verlauf eine Besiedlung des Trachealspirats, was einen Wechsel von der Gruppe „germ- inf-“ zur Gruppe „germ+ inf-“ zur Folge hatte (Nummer 16; 22; 25).

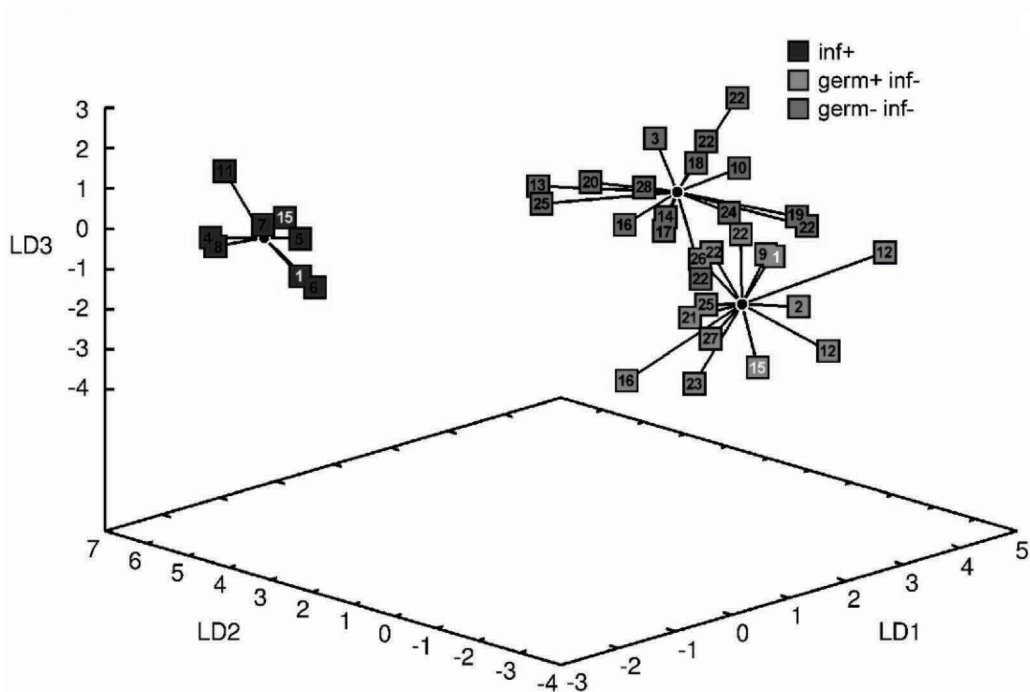


Abbildung 11 Graphische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints im Hinblick auf das Vorliegen einer systemischen Infektion (Weiß hervorgehobene Patientennummern entsprechen Patienten, bei denen Trachealspiratproben vor und nach dem Auftreten einer Infektion untersucht wurden)

Änderte sich bei Patienten mit Mehrfachentnahmen im Verlauf die Zuordnung zu einer Gruppe, so wurden diese Trachealaspiratproben während der statistischen Auswertung den entsprechenden korrekten Gruppen zugeordnet. Daher interferierten interindividuelle Unterschiede der Smellprints nicht mit der Zuordnung. Demzufolge konnte die Elektronische Nase Neugeborene mit und ohne Infektion unterscheiden.

3.4.2 Smellprints bei späterer Entwicklung einer BPD

Patientenkollektiv: Gruppe 1 (Gestationsalter < 32 SSW); nur die zeitlich erste entnommene Trachealaspiratprobe nach Intubation der jeweiligen Patienten wurde ausgewertet

Es zeigte sich, dass sich die Smellprints in der Diskriminanzanalyse von Patienten, die später eine BPD entwickelten, signifikant ($p = 0,0017$) von denen der Patienten unterschieden, die die Kriterien einer BPD nicht erfüllten (Abbildung 12). Die Kreuzvalidierungsrate von 37,1% sowie die Mahalanobis-Distanz von 1,91 lagen hier hingegen nicht im signifikanten Bereich.

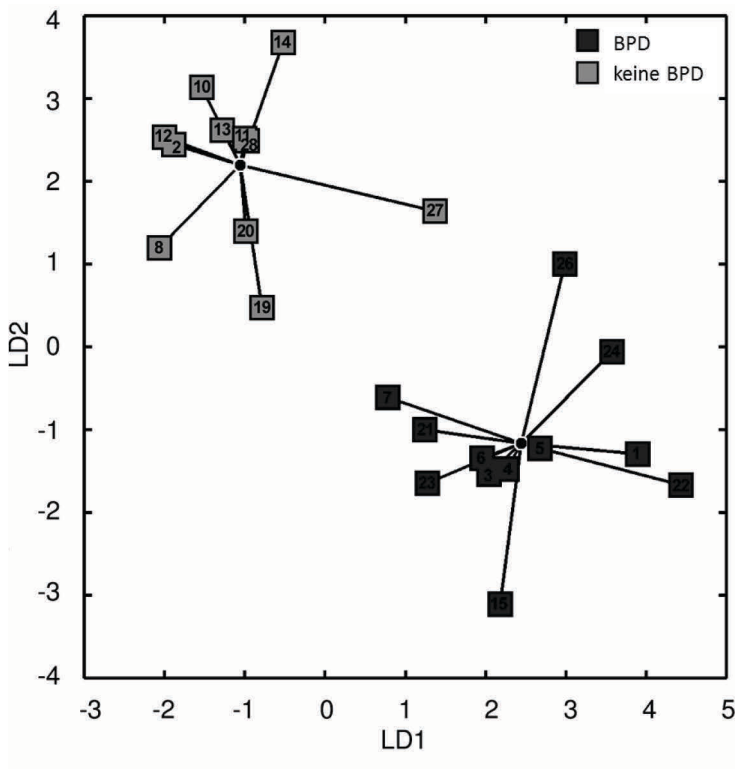


Abbildung 12 Graphische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints im Hinblick auf die spätere Entwicklung einer BPD

3.5 Mikrobiologische Analysen

3.5.1 Vergleich der konventionellen und genomischen Analysemethode

Patientenkollektiv: Gruppen 1–3; alle Trachealaspiratproben der jeweiligen Patienten wurden ausgewertet

3.5.1.1 Genomische Diagnostik

42 der insgesamt 46 Trachealaspiratproben wurden der genomischen Keimdiagnostik zugeführt. Bei 27 davon ließen sich keine Bakterien-Genome nachweisen. In 15 Trachealaspiratproben wurde bakterielles Genmaterial nachgewiesen: in 11 Trachealaspiratproben Material einer Bakterienspezies, in 2 Trachealaspiratproben Material 2 verschiedener Spezies und in 2 Proben wurde Material von 3 verschiedenen Bakterien nachgewiesen (Abbildung 13).

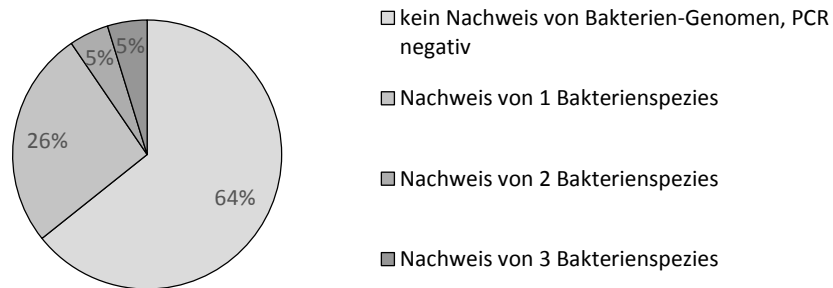


Abbildung 13 Nachweishäufigkeit von Bakterien-Genomen mittels genomischer mikrobiologischer Analyse der Trachealaspiratproben

3.5.1.2 Konventionelle mikrobiologische Diagnostik

Bei 45 der 46 gesammelten Trachealaspiratproben erfolgte eine mikrobiologische Diagnostik mittels Mikroskopie und konventioneller Anzuchtung vorhandener Bakterien. In 29 Trachealaspiratproben konnten keine Bakterien nachgewiesen werden, in 14 Proben wurde eine Bakterienspezies, in 2 Proben 2 verschiedene Spezies identifiziert (Abbildung 14).

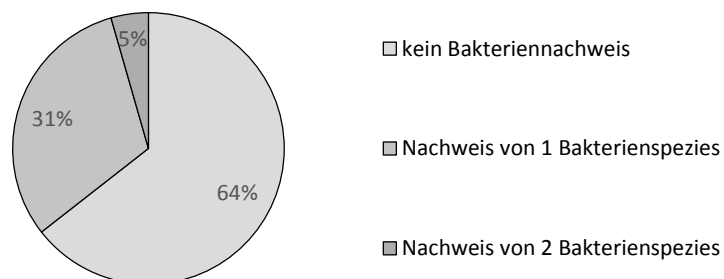


Abbildung 14 Bakteriennachweise mittels konventioneller mikrobiologischer Analyse der Trachealaspiratproben

3.5.1.3 Vergleich der Befunde beider bakteriologischer Nachweismethoden

Von den 46 Trachealspiratproben wurden 41 mit beiden Nachweismethoden auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Eine Übereinstimmung der Befunde zeigte sich in 66 %, also in 27 der 41 Fälle (Abbildung 15). Übereinstimmung bedeutet in diesem Fall, dass mindestens ein von einer Methode nachgewiesener Keim auch von der jeweils anderen nachgewiesen wurde oder dass beide Methoden keinen Keimnachweis lieferten. In 6 Fällen gelang eine Identifikation nur mittels der genomischen Analyse. Davon wurde in einer Trachealspiratprobe eine Bakterienspezies genomisch identifiziert, die zuvor zwar mikroskopisch gesehen, aber konventionell nicht angezüchtet werden konnte. In 7 Fällen ließen sich im Trachealspirat enthaltene Bakterien herkömmlich kultivieren, genomisch jedoch nicht nachweisen. In einem Fall zeigten beide Nachweismethoden unterschiedliche Erreger.

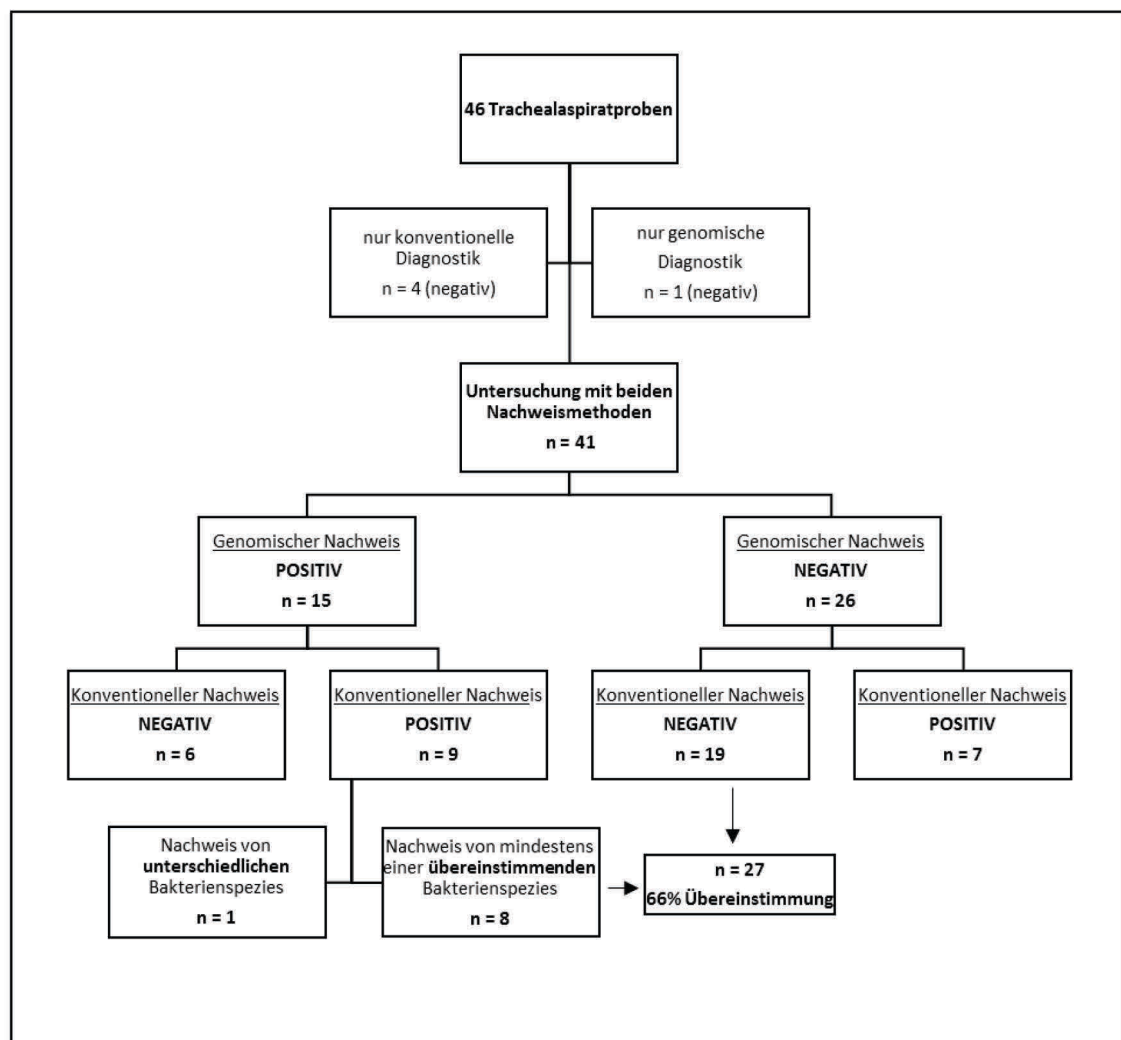


Abbildung 15 Flussdiagramm zum Vergleich der Ergebnisse beider mikrobiologischer Untersuchungsmethoden

3.5.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen

3.5.2.1 Identifizierte Bakterienspezies

In 22 der 46 Trachealspiratproben wurde mit mindestens einer der beiden Methoden ein positiver mikrobiologischer Befund erhoben.

In den 22 positiven Trachealspiratproben ließen sich 16 verschiedene Bakterienspezies (Abbildung 16) identifizieren. 7 Trachealspiratproben zeigten Mehrfachfunde. Zeigten beide Analysemethoden differente Befunde, wurden die gefundenen Spezies beider Analysemethoden berücksichtigt, zeigten sie gleiche Befunde wurde nur eine Analysemethode berücksichtigt.

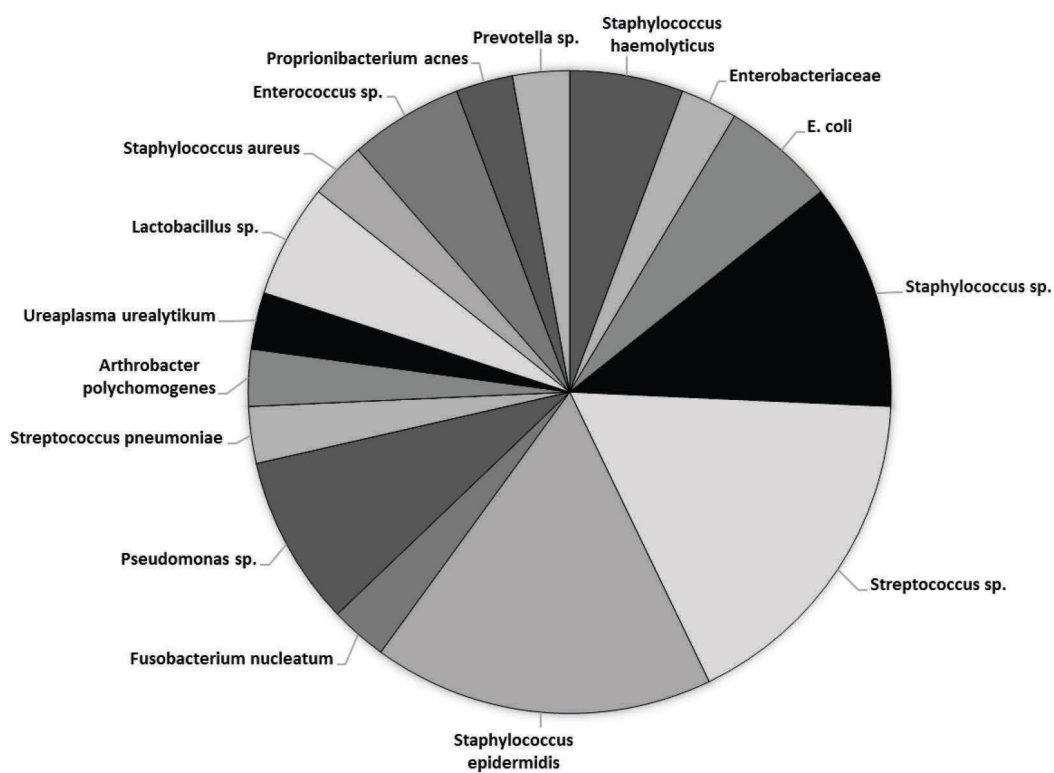


Abbildung 16 Identifizierte Bakterienspezies in den Trachealspiratproben mittels genomischer und konventioneller Analyse

3.5.2.2 Bakterienspezies beider bakteriologischer Nachweismethoden

In den mit beiden Methoden untersuchten Trachealspiratproben gelangen insgesamt 41 Keimnachweise, inklusive der Funde von mehreren Keimen pro Trachealspiratprobe sowie der Funde der gleichen Spezies mittels beider Methoden (Abbildung 17).

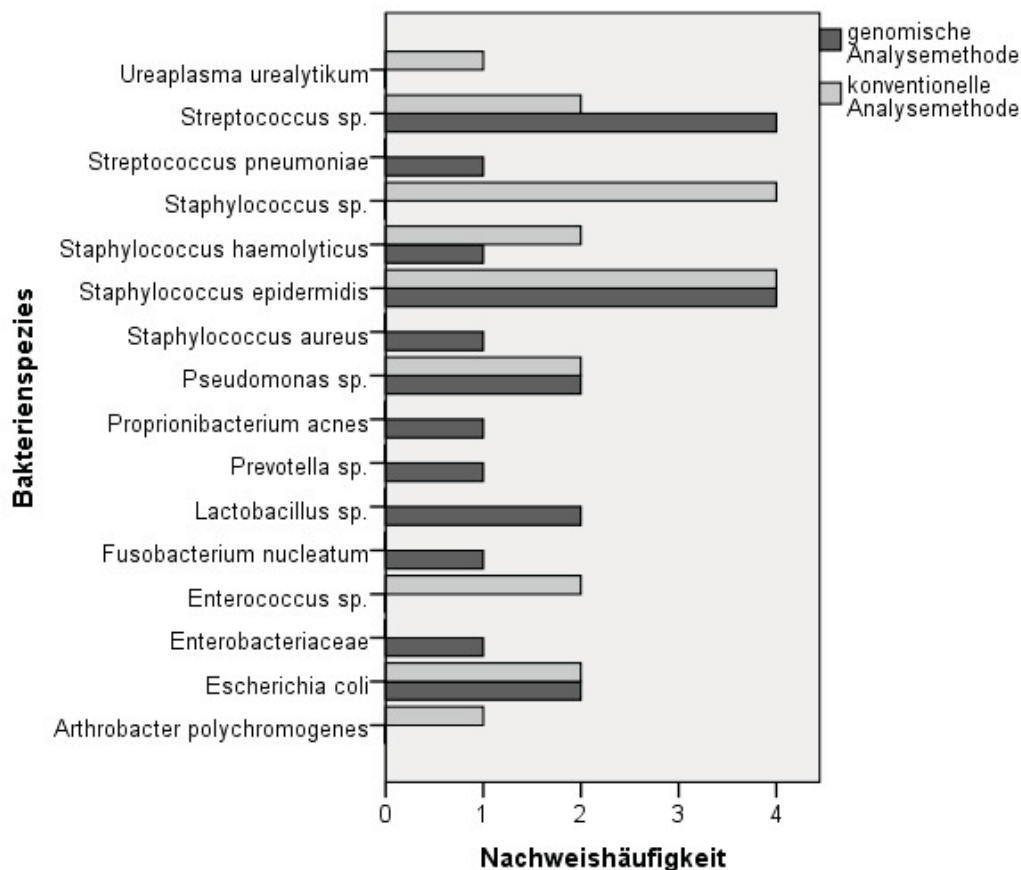


Abbildung 17 Häufigkeit der mikrobiologischen Befunde nach Nachweismethode

3.5.3 Mikrobiologische Befunde bei späterer Entwicklung einer BPD

Patientenkollektiv: Gruppe 1 (Gestationsalter < 32 SSW); nur die zeitlich erste entnommene Trachealspiratprobe nach Intubation der jeweiligen Patienten wurde untersucht. Der Keimnachweis galt als positiv, wenn in mindestens einer mikrobiologischen Analysemethode (genomisch oder konventionell) ein Keim identifiziert werden konnte.

3.5.3.1 Häufigkeiten mikrobiologischer Keimfunde bei späterer Entwicklung einer BPD

Trachealspiratproben von Patienten mit einem Gestationsalter < 32 SSW (Gruppe 1), die später eine BPD entwickelten, zeigten signifikant häufiger positive mikrobielle Befunde ($p = 0,021$; Chi-Quadrat-Test mit Kontinuitätskorrektur bei Probenanzahl $n = 23$) als Kinder, die später keine BPD entwickelten. Sobald eine der beiden mikrobiologischen Nachweismethoden einen Keim nachweisen konnte, galt dies als positiver Befund. So ließen sich lediglich bei 2 Patienten, die später keine BPD entwickelten ($n = 11$), Keime nachweisen, wohingegen in der Gruppe der Patienten mit der späteren Diagnose einer BPD ($n = 12$) in 9 Trachealspiratproben Bakterien nachgewiesen wurden (Abbildung 18).

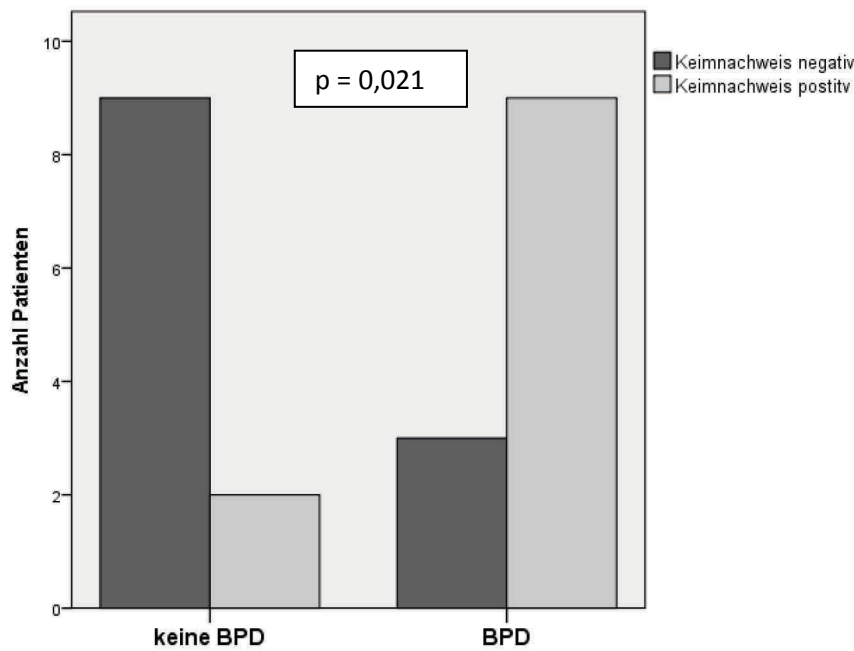


Abbildung 18 Häufigkeiten der positiven mikrobiellen Befunde im Hinblick auf die spätere Entwicklung einer BPD

3.5.3.2 Bakterienspezies bei späterer Entwicklung einer BPD

Es zeigte sich ein variierendes Keimspektrum bei Patienten mit und ohne spätere Entwicklung einer BPD (Tabelle 15). Wurde eine Bakterienspezies mit beiden Analysemethoden (konventionell und genomisch) detektiert, wurde diese nur einmal aufgenommen. Wurden mehrere Bakterien bei einem Patienten gefunden, wurden diese berücksichtigt und mit aufgeführt.

Tabelle 15 Identifizierte Bakterienspezies bei Patienten mit späterer Entwicklung einer BPD

BPD im weiteren Verlauf	keine BPD im weiteren Verlauf
Escherichia coli (n = 2)	Streptococcus sp. (n = 2)
Streptococcus sp. (n = 2)	Fusobacterium nucleatum
Staphylococcus haemolyticus	Prevotella sp.
Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus sp.	Enterobacteriaceae sp.
Pseudomonas sp. (n = 2)	Lactobacillus sp.
Arthrobacter polychromogenes	
Enterococcus sp.	

4. Diskussion

4.1 Auswertung der klinischen Daten

4.1.1 BPD

Patienten mit einem Gestationsalter < 32 SSW, welche im Verlauf eine BPD entwickelten, unterschieden sich signifikant in Gestationsalter und Geburtsgewicht von Patienten mit einem Gestationsalter < 32 SSW, die keine BPD entwickelten. Je unreifer und leichter Frühgeborene sind, desto häufiger und schwerer sind sie von einer BPD betroffen (Jensen und Schmidt, 2014). Diese Abhängigkeit der Erkrankung von Reife und Gewicht zeigte sich auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv, führte jedoch zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit beider Gruppen.

4.1.2 Infektion

Die Gruppen mit positivem und negativem Infektionsscore unterschieden sich signifikant im Hinblick auf das Geburtsgewicht und das Gestationsalter. Wie durch diverse Untersuchungen bereits gezeigt, steigt das Risiko für konnatale und nosokomiale Infektion beim Neugeborenen mit sinkendem Gestationsalter und Gewicht (Stoll et al., 2002; 2011). Auch in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass die Patienten mit positivem Infektionsscore deutlich unreifer waren und folglich bei Geburt ein geringeres Gewicht aufwiesen. Die invasive Beatmungsdauer war in der Gruppe der Patienten, die im Verlauf der Beobachtung einen positiven Infektionsscore zeigten, länger. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Eine invasive Beatmung stellt bekanntermaßen ein erhöhtes Risiko für eine nosokomiale Infektion dar (Sohn et al., 2001), (Leistner et al., 2013).

4.2 Zytokinquantifizierung

4.2.1 Quantifizierung von Interleukin-6 und Interferon Gamma

4.2.1.1 Methodik

Die vorliegenden Messwerte für Interleukin-6 und Interferon Gamma im Trachealaspirat sind unter folgenden Aspekten kritisch zu werten:

Ein häufig verwendetes Verfahren ist die Normierung der Zytokinkonzentrationen auf die in der Trachealaspiratprobe vorhandene Proteinmenge (Farhath et al., 2008), (Figueras-Aloy et al., 2011). Die Proteinkonzentration wurde in dieser Arbeit mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) gemessen. Diese Methode wird für mit Detergentien verunreinigte Proben sowie geringen Proteingehalt empfohlen (Smith et al., 1985). Trotzdem lassen sich Messfehler aufgrund einer

Beeinflussung durch intratracheale Surfactantapplikationen nicht komplett ausschließen. Dies könnte insbesondere für Trachealaspiratproben zutreffen, die in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Surfactantgabe gewonnen wurden. Eine Auswertung im Hinblick auf zuvor stattgefundenen Surfactantgaben wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Viele Autoren geben die Konzentration pro Milliliter gewonnenen Trachealaspirats an (Jonsson et al., 1997), (Been et al., 2010). Diese – die Verdünnung nicht beachtende – Angabe der Massenkonzentration (pg/ml) empfiehlt auch die European Respiratory Society für Trachealaspiratproben von Neugeborenen (Blic et al., 2000). Dabei ergeben sich jedoch grundlegende Probleme: Die erzielte Menge und die Volumenmessung des abgesaugten Trachealaspirats ist stark untersucherabhängig und variiert mit der Technik des Absaugens wie auch mit dem Instillationsvolumen. Außerdem nimmt die Menge des absaugbaren Aspirats bei pulmonalen Erkrankungen deutlich zu. Dies zeigten Iwatani et al. bei Patienten mit BPD (Iwatani et al., 2013). Anstelle der Proteinkonzentration kann zur Normierung zudem die sekretorische Komponente des Immunglobulin A (SclgA) verwendet werden (Kazzi et al., 2001). Dieses für den Transport verschiedener Immunglobuline bestimmte Protein unterliegt weniger interindividuellen Schwankungen und wird durch das Gestations- und Lebensalter sowie Infektionserkrankungen nur gering beeinflusst. Laut Watts und Bruce ist es in der Anwendung als Referenzprotein für Trachealaspiratproben somit vorteilhafter als die Gesamtproteinmenge oder Albumin (Watts und Bruce, 1995).

Eine weitere Möglichkeit bietet die „trockene“ Absaugung von Trachealaspirat, ohne Instillation einer isotonen Lösung in den Tubus des Patienten. Hierbei können in einigen Fällen ausreichende Mengen des Aspirats gewonnen werden, ohne jedoch unterschiedliche interindividuelle Verdünnungsgrade zu erhalten. Bei einer Untersuchung zeigten sich im Hinblick auf den Gehalt verschiedener Proteine (z.B. Alpha-1-Antitrypsin) keine Unterschiede zwischen dem „trockenen“ Absaugvorgang und der Absaugung nach Flüssigkeitsinstillation (Darlow et al., 1997).

Es mangelt also an einem einheitlichen Vorgehen zur Konzentrationsbestimmung in Trachealaspiraten, was die Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen verschiedenen Studien erschwert und teilweise unmöglich macht.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Absaugung nach Flüssigkeitsinstillation sowie Normierung auf die in der Trachealaspirat vorhandene Proteinkonzentration zurückgegriffen. Eine trockene Absaugung geht in vielen Fällen nur mit geringen Aspirat-Volumina einher und hätte eine Aliquotierung für die unterschiedlichen Untersuchungen zusätzlich erschwert. Eine Gewinnung von ausreichend Volumen wäre nicht garantiert gewesen. Die Angabe als Massenkonzentration – wie von der European Respiratory Society empfohlen – erschien zu unpräzise,

gerade im Hinblick auf die hier untersuchten pulmonalen Veränderungen bei sich entwickelnder BPD und die damit einhergehende Änderung der Trachealsekret-Produktion.

4.2.2 Zytokinkonzentrationen bei späterer Entwicklung einer BPD

Die Rolle des IL-6 als proinflammatorisches Zytokin im Kontext der Atemwegsinfektion bei der Pathogenese der BPD ist weithin bekannt (Speer 2003; 2006). Ambalavanan et al. sowie Paananen et al. haben gezeigt, dass die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-6 und IFN- γ bei Patienten, die eine BPD entwickeln, frühzeitig erhöht sind (Ambalavanan et al., 2009), (Paananen et al., 2009). Auch im Trachealspirat fanden sich in mehreren Studien bei Patienten, die eine BPD entwickelten, signifikant erhöhte Konzentrationen von Interleukin-6 (Jonsson et al., 1997), (Köksal et al., 2012), (Tullus et al., 1996).

Andere Studien zeigten im Fall einer sich entwickelnden BPD lediglich eine erhöhte IL-6-Aktivität im Zell-Stimulationsversuch, wohingegen das Zytokin selbst nicht erhöht war (Bagchi et al., 1994). Auch Chakraborty et al. konnten bei Patienten, die eine BPD entwickelten, lediglich eine Erhöhung des Glykoproteins 130, das als IL-6-Rezeptor fungiert, nachweisen (Chakraborty et al., 2013). Bismarck et al. vermuteten, dass die Entzündungsreaktion, die maßgeblich zur Entstehung der BPD beiträgt, eine Veränderung des IL-6-Signalweges im Organismus bewirkt (Bismarck et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IL-6-Konzentration zwischen Patienten, die später eine BPD entwickelten, und solchen, die keine BPD entwickelten. Die IL-6-Aktivität sowie die Relation des Zytokins zum löslichen IL-6-Rezeptor oder weiteren nachgeschalteten Signalproteinen in den Trachealspiratproben wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Überdies ist festzuhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Studie eine recht frühe Probenentnahme nach Intubation erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich Entzündungsprozesse und Lungenschädigung, die bei der Entstehung einer BPD ablaufen, noch im Anfangsstadium. Die größten Unterschiede in der IL-6-Konzentration im Trachealspirat von gesunden Patienten und von Patienten, die eine BPD entwickelten, zeigten sich in einer Studie von Kotecha et al. erst am 10. Lebensstag (Kotecha et al., 1996).

Auch das IFN- γ spielt bei der Pathogenese der BPD eine Rolle. Patienten, die eine BPD entwickelten, zeigten signifikant höhere Serumkonzentrationen von IFN- γ als gesunde Patienten (Ambalavanan et al., 2009). Untersuchungen am Mausmodell wiesen darauf hin, dass IFN- γ signifikant zur Hypoxie-Schädigung der Lunge und dem Bild der BPD beiträgt (Yamada et al., 2004), (Harijith et al., 2011). Zuvor wurde bei Entwicklung einer BPD im Trachealspirat die Erhöhung eines Downstream Target des IFN- γ (MMP 9) nachgewiesen. Der Nachweis von IFN- γ gelang bei beatmeten Frühgeborenen lange Zeit nicht (Harijith et al., 2011). Kürzlich konnten

Aghai et al. jedoch erstmalig mithilfe eines Immunassays IFN- γ im Trachealspirat beatmeter Frühgeborener nachweisen und den vermuteten Zusammenhang bei der Entstehung einer BPD bestätigen (Aghai et al., 2013).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Nachweis von IFN- γ gelang, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der IFN- γ -Konzentration im Trachealspirat von Patienten, die später eine BPD entwickelten, und solchen, die keine BPD entwickelten.

4.2.3 Zytokinkonzentrationen bei Infektionen

Bei Patienten mit laborchemischen Zeichen einer systemischen Infektion (I/T > 0,2, CRP > 10 mg/l, Leukozyten < 4000/ μ l oder positive Blutkultur) zeigte sich im Vergleich mit Patienten ohne Infektion entgegen der Erwartung kein Unterschied in den Konzentrationen von IL-6 und IFN- γ im Trachealspirat.

Im Rahmen einer systemischen bakteriellen Infektion kommt es bei Neugeborenen häufig zur Erhöhung der Serum-IL-6-Konzentrationen. Darum dient Interleukin-6 als laborchemischer Marker zur Infektionsdiagnostik (Boskabadi et al., 2013), (Laborada et al., 2003). Eine Evaluation des IL-6 als diagnostischer Marker bei Neugeboreneninfektionen im Trachealspirat existiert nach unserem Kenntnisstand bisher nicht. Jedoch ließen sich bei Vorliegen einer Chorioamnionitis erhöhte IL-6-Konzentrationen im Trachealspirat von Frühgeborenen feststellen, weshalb auch bei postnatalen, systemischen Infektionen bei Früh- und Reifgeborenen eine IL-6 Erhöhung im Trachealspirat vermutet wurde (Grigg et al., 1992) (Aghai et al., 2012). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

Welche Rolle IFN- γ bei entzündlichen Prozessen der Lunge spielt, zeigte sich im Mausmodell an den Krankheitsbildern des Emphysems und des Hyperoxie-induzierten Lungenschadens (Harjith et al., 2011). IFN- γ führte zu einer Makrophagen- und Neutrophilen-dominierten Entzündung (Wang et al., 2000). Auch die erhöhte IFN- γ -Konzentration im Serum dient bisweilen als Marker einer neonatalen Sepsis (Simonsen et al., 2014). Bei Neugeborenen liegen nach unserem Kenntnisstand bisher keine Untersuchungen zur Konzentration des IFN- γ im Trachealspirat bei systemischen Infektionen vor: Man vermutet jedoch auch hier einen Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen, wie sie im Rahmen einer BPD auftreten (Aghai et al., 2013). Bisher ließ sich lediglich ein Zusammenhang der IFN- γ -Konzentration im Trachealspirat mit der Beatmungsdauer und dem Sauerstoffbedarf sowie mit der Krankenhausverweildauer darstellen (Aghai et al., 2012).

In der vorliegenden Studie führte die bei Entzündungsprozessen insgesamt erhöhte Proteinkonzentration in der Lunge vermutlich zu einer Verzerrung der Ergebnisse. Im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion werden eine Vielzahl von Proteinen vermehrt exprimiert und in die Alveolarflüssigkeit abgegeben (Heinrich et al., 1990). Die Zytokinkonzentrationen könnten im

Rahmen einer Infektion absolut erhöht sein, sich jedoch in Relation zur Gesamtprotein-konzentration vermindert darstellen. Eine sinnvolle Ergänzung für die IL-6-Quantifizierung wäre zum Beispiel die Analyse des absoluten Zytokingehalts oder der Zytokinaktivität mittels zusätzlicher Messung der löslichen Zytokinrezeptoren (Bismarck et al., 2008), (Chakraborty et al., 2013). Zur präziseren Detektion eines inflammatorischen Prozesses via IFN- γ bietet sich zudem die Analyse der IFN- γ -mRNA sowie die Messung der Genexpression des nachgeschalteten Liganden CXCL 10/IP-10 (Downstream Target) an (Harjith et al., 2011), (Aghai et al., 2013).

4.2.4 Zytokinkonzentration und mikrobiologische Befunde

Beeton et al. konnten zeigen, dass bei einer mikrobiellen Besiedlung im Trachealspirat von Neugeborenen signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6 vorliegen (Beeton et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse für das Zytokin IL-6 konnten auch Miralles et al. bei positivem Keimnachweis in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) feststellen (Miralles et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit ließ sich hingegen kein Zusammenhang zwischen der IL-6-Konzentration des Trachealspirats und dessen mikrobieller Besiedlung nachweisen.

Ebenso zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit bei Patienten mit und ohne Keimnachweis im Trachealspirat keine unterschiedlichen Konzentrationen des IFN- γ .

Die Konzentration von IFN- γ im Trachealspirat in Abhängigkeit von vorhandenen Bakterien wurde in der Literatur bisher nicht hinreichend beschrieben. Untersuchungen am Tiermodell wiesen jedoch darauf hin, dass das Vorhandensein von Endotoxinen in der Amnionflüssigkeit zu einer Erhöhung diverser, dem IFN- γ nachgeschalteter Zytokine führt (Kallapur et al., 2003). Für die hier vorliegende Untersuchung ist freilich zu beachten, dass das Vorkommen von Bakterien allein noch keine Freisetzung von Endotoxinen oder eine Infektion mit konsekutiver Immunreaktion beweist. Eine inflammatorische Immunantwort auf ein bloßes Vorhandensein von Bakterien ist jedoch durchaus möglich und konnte bereits gezeigt werden (Følsgaard et al., 2013). Eine Unterscheidung zwischen bakterieller Besiedlung und bakterieller Infektion war mit dem in der hier vorliegenden Arbeit genutzten Versuchsaufbau nicht möglich.

4.3 Smellprints / Elektronische Nase

4.3.1 Smellprints bei Infektion

Die Elektronische Nase konnte unterscheiden zwischen Neugeborenen mit systemischer Infektion und solchen ohne systemische Infektion. Die Enose könnte also als neue, zuvor nicht beschriebene diagnostische Methode bei der Detektion von neonatalen Infektionen dienen.

Aufgrund diverser Voruntersuchungen war zu erwarten, dass nicht nur bei pulmonalen Pathologien, sondern auch bei systemischen Krankheiten das Muster der aus den Atemwegen

emittierten VOCs spezifische Charakteristika zeigt (Mangler et al., 2012), (Wang et al., 2014). Biller et al. konnten außerdem zeigen, dass die Smellprints der Elektronischen Nase mit Markern einer systemischen Entzündung im Blut korrelierten (Biller et al., 2011).

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Smellprints von Patienten mit und ohne Nachweis von Bakterien im Trachealaspirat (germ+ inf-) / (germ- inf-) aufgezeigt werden, wenn keine Zeichen einer systemischen Infektion vorlagen. Das kann darauf hindeuten, dass es sich bei den in dieser Untersuchung nachgewiesenen Keimen nicht immer um Pathogene als Auslöser einer invasiven Infektion handelt. Demnach kann es auch zur asymptomatischen Besiedlung der Lunge mit Bakterien kommen. Die genaue Betrachtung der Proben von Patienten, bei denen mehrere Trachealaspiratproben gewonnen wurden, verdeutlicht dies. Drei Patienten, deren später entnommene Trachealaspiratproben erstmalig einen Keimnachweis zeigten, wurden durch die Hauptkomponentenanalyse zunächst in den korrekten Cluster (germ – inf-) klassifiziert. Zwei Patienten zeigten in der ersten entnommenen Trachealaspiratprobe einen Keimnachweis, ohne dass zu diesem Zeitpunkt eine Infektion vorlag, entwickelten jedoch im Verlauf laborchemische Zeichen einer invasiven Infektion. Diese Patienten fielen mit der zweiten, später entnommenen Trachealaspiratprobe ebenfalls in den korrekten Cluster (inf+).

Eine asymptomatische Besiedlung der Lunge mit Keimen hat somit vermutlich nur wenig Einfluss auf die Smellprints, wohingegen eine invasive Infektion – ob durch pulmonale Entzündung oder andere Infektionslokalisation – die VOCs deutlich beeinflusst.

4.3.2 Smellprints bei späterer Entwicklung einer BPD

Die Smellprints der Frühgeborenen, die später eine BPD entwickelten, unterschieden sich in der linearen Diskriminanzanalyse signifikant ($p = 0,0017$) von den Smellprints der Vergleichsgruppe, die später keine BPD entwickelten. Jedoch lag die Mahalanobis-Distanz mit 1,91 nicht innerhalb des Signifikanzniveaus. Die Klassifizierung einzelner Patienten zu den entsprechenden Gruppen (BPD positiv, BPD negativ) gelang allein aufgrund ihrer Smellprints nicht zuverlässig (Kreuzvalidierungswert 37,1%).

Bei der Pathogenese der BPD wirken verschiedene Faktoren und Prozesse auf die Lunge des Neugeborenen ein, wie zum Beispiel die invasive Beatmung oder Infektionen. All diese verursachen ein Entzündungsgeschehen, welches zum Entwicklungsstopp der noch unreifen Lunge führt (Kinsella et al., 2006), (Speer, 2006). In diversen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Elektronische Nase zwischen gesunden Patienten und Patienten mit inflammatorischen Atemwegserkrankungen wie Asthma oder COPD unterscheiden kann (Dragonieri et al., 2009). Die emittierten volatilen Substanzen von Patienten mit einem Entzündungsgeschehen in den Atemwegen wiesen also Besonderheiten auf, die sich mit einer Elektronischen Nase nachweisen

ließen (Skiępko et al., 2006). Deshalb ist grundsätzlich davon auszugehen, dass die Smellprints von Frühgeborenen, die später eine BPD entwickeln, und solchen, die später keine BPD entwickeln, divergieren, wobei vermutlich der zugrundeliegende inflammatorische Prozess bei sich entwickelnder BPD die Unterscheidung bedingt. Es ist jedoch fraglich, ob eine Differenzierung zwischen inflammatorischen Prozessen bei entstehender BPD und inflammatorischen Prozessen anderer Ursachen mittels Smellprints möglich ist.

Es gibt eine Reihe von Prädiktionsfaktoren für die Entstehung einer BPD. Dabei fehlen jedoch nach unserem Kenntnisstand valide Prädiktionsmodelle, um Patienten, die eine BPD entwickeln, rechtzeitig zu identifizieren (Onland et al., 2013). Dies wäre bei der Erkrankung BPD von herausragender Bedeutung, da die Diagnose nach NIH-Kriterien erst im postmenstruellen Alter von 36 Wochen oder bei der Entlassung aus der stationären Behandlung gestellt werden kann. Risikopatienten sollten frühzeitig identifiziert werden, damit präventive Maßnahmen ergriffen werden können.

Laut den hier vorgestellten Ergebnissen lassen sich möglicherweise mithilfe einer Enose Frühgeborene identifizieren, die im weiteren Verlauf eine BPD entwickeln.

4.4 Mikrobiologische Analysen

4.4.1 Vergleich beider Analysemethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei mikrobiologische Nachweisverfahren eingesetzt: die konventionelle Analyse, bestehend aus Färbung und Mikroskopie sowie Anzucht der Bakterien, und ein genomisch basierter mikrobiologischer Ansatz, der sich einer denaturierenden Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC) sowie der Amplifikation und Sequenzierung der bakteriellen 16S-rDNA bediente. Beide Methoden wurden im Hinblick auf die Nachweisbarkeit von Bakterien im Trachealspirat verglichen.

Mit beiden Methoden gelang bei jeweils 36% der Trachealspiratproben ein Keimnachweis. Willson et al. beschrieb eine kulturelle Nachweisrate von 11% für intubierte Kindern mit einem durchschnittlichen Alter von 1,9 Jahren in den ersten 3 Tagen nach Intubation (Willson et al., 2014). Mourani et al. konnten in 40% bakterielles Genmaterial im Trachealspirat mittels genomischer Diagnostik bei Frühgeborenen in den ersten 72 Lebensstunden detektieren (Mourani et al., 2011). Die in der hier vorliegenden Arbeit erreichte genomische Nachweisfrequenz lag also im Bereich der durch Voruntersuchungen erwarteten Rate, wohingegen die kulturelle Nachweisrate etwas höher lag. Im Vergleich war eine Überlegenheit der genomischen Nachweismethode zu erwarten. Selbst angesichts mangelnder Kultivierbarkeit, langsamen Wachstums oder avitaler Keime ist bei Verwendung eines genomischen Ansatzes mit einem Nachweis zu rechnen (Han et al., 2009), (Woo et al., 2008).

Das in dieser Studie verwendete DHPLC/WAVE®-System zur Auftrennung der 16S-rDNA der verschiedenen bakteriellen Spezies zur anschließenden Sequenzierung wurde bereits in mehreren klinischen Studien eingesetzt. Insbesondere bei Analysen von mikrobiellen Gemeinschaften wie der gastrointestinalen Flora oder polymikrobiellen Infektionen kam diese Methode zum Einsatz (Goldenberg et al., 2007), (Imirzalioglu et al., 2014). So konnten Domann et al. zeigen, dass sich im Urin von nierentransplantierten Patienten eine Vielzahl von uropathogenen Bakterien befand, auch wenn diese zuvor nicht kultivierbar waren (Domann et al., 2003). DHPLC und Sequenzierung der 16S-rDNA sind gut geeignet, um einen erweiterten Überblick über die Gesamtheit der sich in einem Organsystem befindlichen Bakterien zu erhalten, also das Mikrobiom genauer darzustellen. Dies zeigten Mounier et al. am Beispiel des Keimpektrums bei Patienten mit zystischer Fibrose (Mounier et al., 2014). Dennoch erbrachte die genomische Untersuchung in der vorliegenden Arbeit keine entscheidenden Ergänzungen des im Trachealspirat vorhandenen Keimpektrums im Vergleich zu konventionellen mikrobiologischen Methoden. Vielmehr zeigten sich Diskrepanzen in den Befunden beider Methoden: Bei nur 66% der Trachealspiratproben lieferten beide Methoden übereinstimmende Ergebnisse (konkordant kein Keimnachweis oder mindestens eine übereinstimmende Bakterienspezies). Die Diskrepanz kann auf verschiedenen Ursachen beruhen und auf präanalytische und methodische Probleme hinweisen. Dies wird dadurch bekräftigt, dass bei einigen PCR-negativen Trachealspiratproben in der konventionellen Mikroskopie und Kultur Keime identifiziert werden konnten, obwohl die genomische Nachweismethode als sensitiver gilt. Die variierende Probentransportzeit zwischen den Universitätsklinik in Marburg (Probenentnahme) und Gießen (Probenanalyse) sollte sich zwar bei der Genomanalyse weniger auswirken als bei der kulturellen Anzucht von Bakterien, ist aber trotzdem ein in Betracht zu ziehender präanalytischer Faktor. Zudem wurden Sammelanalysen vorgenommen, was zu unterschiedlichen Lagerungszeiten der Trachealspiratproben bei -21 °C vor der genomischen Analyse führte. Die Diskrepanz zwischen den beiden Methoden kann darüber hinaus durch Kontamination bedingt sein. Sowohl bei der konventionellen Analyse als auch beim molekularen Ansatz kann es zu einer Verunreinigung der Trachealspiratprobe während der Entnahme und Verarbeitung kommen.

4.4.1.1 Stellenwert einer molekularen Analyse

Molekulare Analysemethoden ermöglichen eine Aussage über die Gesamtheit der in der Lunge befindlichen Bakterien. Bisher existieren jedoch nur wenige Untersuchungen zur Normalflora der Lunge. Eine Aussage über die Pathogenität der Erreger ist somit nur schwer zu treffen (Beck et al., 2012), (Venkataraman et al., 2015). Auch die Frage, ob es sich um eine einfache Besiedlung mit fakultativen Pathogenen oder eine Infektion mit fakultativ oder obligat pathogenen

Bakterien handelt, lässt sich nur unter genauer Kenntnis der physiologischen Flora und unter Beachtung des klinischen Zustandes des Patienten entscheiden.

Bei molekularen Analysemethoden ist zudem die höhere Rate an falsch positiven Befunden sowie Unklarheit über die Vitalität der Bakterien zu beachten (Relman, 1999). Diese Faktoren können bei Neugeborenen zu einer kritisch zu beurteilenden Übertherapie mit Antibiotika führen. Der Einsatz von Antibiotika in der ersten Lebenswoche nach Geburt kann eine Veränderung der Normalflora und die Entstehung von Infektionen mit resistenten Keimen bewirken. Dies wiederum begünstigt die Entstehung einer BPD durch Entzündungsprozesse (Novitsky et al., 2015).

Insbesondere eine Resistenztestung zur Erstellung eines Antibiogramms erfordert weiterhin die Anlage einer herkömmlichen Kultur, sodass die molekularen Identifikationsmethoden derzeit lediglich als ergänzende mikrobiologische Untersuchung zu sehen sind (Pammi et al., 2011).

4.4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen

Ein Vergleich der hier vorliegenden Ergebnisse mit anderen Untersuchungen ist aufgrund methodischer Unterschiede und der geringen Patientenzahl kaum möglich. Ähnliche Studien von Mourani et al. sowie Stressmann et al. haben andere Nachweisverfahren sowie andere Probenentnahmezeitpunkte verwendet. Zudem war die Patientenzahl bei beiden Untersuchungen, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, gering (Mourani et al., 2011), (Stressmann et al., 2010).

Insbesondere die Entnahmezeitpunkte scheinen für die Häufigkeit positiver Befunde eine entscheidende Rolle zu spielen. Mourani et al. haben gezeigt, dass innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt nur bei 4 von 10 Patienten Keime im Trachealaspirat gefunden wurden, nach 7 Tagen jedoch bei allen 10 Patienten (Mourani et al., 2011).

4.4.2.1 Identifizierte Bakterienspezies

In dieser Arbeit wurden mit beiden mikrobiologischen Nachweismethoden insgesamt 16 verschiedene Bakterienspezies identifiziert.

Mourani et al. haben mittels PCR Trachealaspirate von 10 Frühgeborenen in den ersten 3 Lebenswochen auf die vorherrschende Spezies analysiert. Dabei wurden am häufigsten Staphylokokken- und Ureaplasma-Spezies nachgewiesen, des Weiteren Pseudomonaden sowie Enterokokken und Escherichia coli (Mourani et al., 2011). Analog dazu wurden in der vorliegenden Arbeit häufig Staphylokokken identifiziert. Auch der Nachweis von Enterokokken, Escherichia coli und Pseudomonaden gelang. Stressmann et al. konnten mittels Analyse der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen ein ähnliches Keimspektrum, bestehend aus

Staphylokokken, Enterobacter- und Moraxella-Spezies., Pseudomonaden sowie Streptokokken, nachweisen (Stressmann et al., 2010).

Eine interessante Frage ist nun, woher die Bakterien in der Lunge stammen und unter welchen Umständen es bei Neugeborenen zur Besiedlung kommt: Zunächst vermutete man – im Einklang mit dem traditionell sterilen Bild der Lunge – eine Verschleppung der Keime während der Probengewinnung (Charlson et al. 2011). Die Arbeitsgruppe um Venkataraman vermutete eine Migration sowie Ansiedlung der oralen Keimflora durch Mikroaspirationen bis in die tieferen Atemwege und das Trachealsystem. Dafür spricht, dass sich das Mikrobiom des Mundraumes und der Lunge ähnelte, die Bakteriendichte in der Lunge aber um ein Vielfaches geringer war (Venkataraman et al., 2015). Dagegen konnten Morris et al. zeigen, dass in der Lunge von Erwachsenen Bakterienspezies vorkamen, die sich in der Mundhöhle nicht nachweisen ließen (Morris et al., 2013). Es muss also noch eine weitere Möglichkeit der Bakterienakquisition geben. Bei Neugeborenen ist die Mundhöhle unmittelbar postnatal noch wenig besiedelt (Nelson-Filho et al., 2013). Je nach Entbindungsmodus sowie der Möglichkeit von direktem Kontakt zur Mutter und zum Pflegepersonal erfolgt in den ersten Stunden ein Übergang von Bakterien auf das Neugeborene (Kononen, 2000), (Dominguez-Bello et al., 2010). Auch durch den Vorgang der Intubation, durch invasive Beatmung und durch Absaugvorgänge können Bakterien in die Lunge von Neugeborenen gelangen (Friedland et al., 2001), (Willson et al., 2014). Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Spezies könnten deshalb auch Abbild des Keimspektrums der direkten Patientenumgebung sein, welches auf den Patienten übertragen wird.

4.4.2.2 Bakterienspezies beider bakteriologischer Nachweisverfahren

Es zeigte sich, dass einige Spezies nur mittels genomischem Nachweisverfahren identifiziert werden konnten, so zum Beispiel Fusobakterien, Laktobazillen, Prevotella, Propionibakterien und Enterobakterien. Bei der hier vorliegenden geringen Probenanzahl spricht dies aber nicht für eine fehlende konventionelle Nachweisbarkeit, sondern für die oben bereits beschriebene Diskrepanz der beiden Analysemethoden.

Ureaplasmen hingegen wurden in einer Trachealspiratprobe – entgegen der Erwartung – lediglich mittels konventioneller Analyse detektiert. Insbesondere für Mykoplasmen und Ureaplasmen sind normalerweise molekulare Nachweisverfahren sensitiver, wohingegen zur kulturellen Anzucht Spezialnährmedien benötigt werden und in der Probe eine hohe Anzahl vitaler Keime vorhanden sein muss (Waites et al., 2012).

4.4.3 Mikrobiologische Befunde bei späterer Entwicklung einer BPD

Bei Patienten der Gruppe 1 (Gestationalalter < 32 SSW) wurden signifikant häufiger Bakterien in der ersten postnatal entnommenen Trachealspiratprobe nachgewiesen, wenn sie später eine

BPD entwickelten ($p = 0,021$). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit diversen Voruntersuchungen (Beeton et al., 2011).

Zudem ist bekannt, dass prä- und postnatale bakterielle Infektionen und die damit einhergehenden Inflammationsprozesse einen Risikofaktor für die Entstehung der BPD darstellen (Speer, 2009), (Van Marter et al., 2002), (Bhandari, 2014).

Følsgaard et al. haben gezeigt, dass selbst eine asymptomatische bakterielle Besiedlung der Lunge zu einem Entzündungsprozess führte (Følsgaard et al., 2013). Es sind also weitere Studien erforderlich, um die apathogene und unproblematische Flora der Lunge von fakultativen und obligaten Pathogenen zu unterscheiden, welche einen Entzündungsprozess triggern könnten. Die genauere Analyse des Mikrobioms der neonatalen Lunge mittels molekularer Nachweismethoden könnte Aufschlüsse bringen, wann und durch welche Keime die Lunge nach der Geburt regelhaft besiedelt wird (Mourani et al., 2011).

Die Besiedlung der Atemwege mit bestimmten Risikokeimen kann die Entstehung einer BPD begünstigen. Für die Gattung *Ureaplasma* wurde dies schon mehrfach gezeigt, da Ureaplasmen eine starke inflammatorische und fibrotische Immunantwort in der Lunge hervorrufen (Gancia et al., 2014), (Lowe et al., 2014), (Schelonka et al., 2005). Zudem sind Ureaplasmen die häufigsten Erreger pränataler Infektionen wie der Chorioamnionitis, welche wiederum ein Risikofaktor für die Entwicklung einer BPD sein kann (Kallapur et al., 2013). In der vorliegenden Studienpopulation konnte in einer Trachealspiratprobe mittels konventioneller Kultur eine Ureaplasma-Spezies nachgewiesen werden. Es handelte sich jedoch um einen Patienten, der nicht der BPD-Risikogruppe angehörte (Gestationsalter 33+2 SSW).

4.5 Stärken und Schwächen der vorliegenden Studie

Schwächen dieser Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv aus 33 Neugeborenen untersucht. Die geringen Patientenzahlen, insbesondere in den eingeteilten Subgruppen, schränken die Aussagekraft der dargestellten Ergebnisse ein. Alle Patienten wurden intubiert und invasiv beatmet. Vergleichsuntersuchungen am Trachealspirat von gesunden Neugeborenen oder nicht-intubierten Frühgeborenen waren aufgrund der fehlenden Indikation zur endotrachealen Absaugung nicht durchführbar. Eine Kontrollgruppe lag somit nicht vor.

Nicht bei allen Patienten konnten im Verlauf mehrere Trachealspiratproben untersucht werden. Bestand keine klinische Indikation zur invasiven Beatmung mehr, wurde der Patient extubiert und es ließen sich keine weiteren Trachealspiratproben entnehmen. Somit gelangen

nur bei 7 Patienten Mehrfachentnahmen, was eine Auswertung im Hinblick auf Verlaufsuntersuchungen deutlich einschränkte.

Die Entnahmezeitpunkte der Trachealspiratproben differierten. Eine große Anzahl der Trachealspiratproben (26 von 46) wurde unmittelbar nach Intubation der Patienten gewonnen. Alle weiteren Trachealspiratproben und Verlaufsproben bei Patienten mit Mehrfachentnahmen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, weil für die vorliegende Arbeit keine zusätzlichen Absaugvorgänge zur Probengewinnung durchgeführt wurden.

Obwohl alle Proben der Zytokinquantifizierung sowie der Messung mit der Elektronischen Nase zugeführt wurden, gelang es aufgrund der sehr geringen Probenvolumina bei einigen wenigen Proben nicht, eine mikrobiologische Analyse mit beiden beschriebenen Untersuchungsmethoden durchzuführen.

Die Einteilung der Patienten hinsichtlich des Vorliegens einer Infektion erfolgte in dieser Arbeit mittels eines nicht validierten Infektionsscores. Es erfolgte zudem keine Differenzierung bezüglich konnataler und nosokomialer oder Early- und Late-Onset Infektionen und keine Unterteilung bezüglich verschiedener Infektionslokalisationen sowie deren Schweregrade. Sie wurden unter dem Begriff „systemische Infektion“ zusammengefasst.

Es sind weitere umfangreiche und standardisierte Untersuchungen notwendig um eine bessere Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen. Hierbei sollte vor allem auf definierte Entnahmezeitpunkte auch hinsichtlich der Mehrfachentnahmen Wert gelegt werden. Die Differenzierung von verschiedenen Infektionsformen erscheint klinisch sinnvoll. Dazu sind Untersuchungen mit größerer Patientenzahl erforderlich.

Stärken dieser Studie

Diese Pilotstudie bietet einen Überblick über diverse Untersuchungsansätze am Trachealspirat von intubierten Früh- und Reifgeborenen. Sie soll als Orientierung dienen, welche Untersuchungsansätze im Bereich der Trachealspirat-Diagnostik zukünftig ausgebaut und weiterverfolgt werden sollten.

Trachealspirat wird durch routinemäßige Absaugvorgänge bei intubierten Patienten gewonnen und üblicherweise verworfen. Es bietet sich also als leicht zugängliches Untersuchungsmedium zu diagnostischen Zwecken an. Im Vergleich zu invasiven Blutentnahmen und Punktionen entsteht bei der Trachealspiratuntersuchung keine zusätzliche Belastung, was bei neonatologischen Patienten vorteilhaft ist.

Es wurde lediglich auf vorhandene klinische Daten und Parameter der Patienten zurückgegriffen, ebenso erfolgte die Gewinnung von Trachealspirat nur, wenn das Absaugen klinisch indiziert war. Es fanden somit keine zusätzlichen Maßnahmen oder Interventionen für diese Arbeit statt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Trachealaspirate von Neugeborenen mittels der Elektronischen Nase untersucht. Sie ist somit als Machbarkeitsstudie („proof of concept“) zu betrachten. Ebenso erfolgte erstmalig eine Zytokinuntersuchung am Trachealaspirat mit Blick auf die frühe Infektionsdiagnostik.

4.6 Fazit und Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen sich im Bezug zu den initial formulierten Fragestellungen folgende Aussagen zu dieser Pilotstudie treffen:

Zytokinquantifizierung

Im Trachealaspirat von Frühgeborenen, die später eine BPD entwickelten, konnten keine signifikant höheren Zytokinkonzentrationen festgestellt werden als bei Frühgeborenen, die keine BPD entwickelten.

Bei Neugeborenen mit Zeichen einer systemischen Infektion oder mit positivem Keimnachweis im Trachealaspirat konnten keine signifikant höheren Zytokinkonzentrationen festgestellt werden als bei Neugeborenen ohne Zeichen einer systemischen Infektion oder ohne Keimnachweis.

In der vorliegenden Studie eignete sich die Zytokinbestimmung im Trachealaspirat von Früh- und Neugeborenen nicht zur Diagnose einer Infektion und nicht zur Prädiktion der BPD.

Elektronische Nase

Die Smellprints der Trachealaspirate von Frühgeborenen, die später eine BPD entwickelten, unterschieden sich von denen, die keine BPD entwickelten, signifikant.

Die Smellprints der Trachealaspirate von Neugeborenen mit systemischer Infektion unterschieden sich signifikant von denen, die keine Infektionszeichen aufwiesen.

In Gegensatz zur Zytokinbestimmung im Trachealaspirat von Früh- und Neugeborenen könnten Smellprints aus dem Trachealaspirat von Früh- und Reifgeborenen zur Diagnose einer Infektion und zur Prädiktion der BPD beitragen.

Mikrobiologie

Analog zu Ergebnissen aus der Literatur zeigten sich bei Frühgeborenen, die im weiteren Verlauf eine BPD entwickelten, signifikant häufiger Bakterien im Trachealaspirat, als bei Frühgeborenen, die keine BPD entwickelten.

Ausblick

Die Untersuchungen des Trachealspirat von Früh- und Reifgeborenen mit der Elektronischen Nase wurden in dieser Pilotstudie erstmalig durchgeführt. Die Ergebnisse sind vielversprechend hinsichtlich Diagnose einer Infektion und Prädiktion der BPD und sollten daher in größer angelegten Studien validiert werden. In dieser Arbeit wurde auf Trachelaspiratproben zurückgegriffen. Jedoch stellen auch nicht-intubierte Frühgeborene, bei denen keine Trachealspiratproben gewonnen werden können, eine Risikogruppe für Infektionen dar.

Für zukünftige Studien wäre darum eine Ergänzung des Untersuchungsmaterials durch Ausatemluft sinnvoll, um zu überprüfen, ob auch bei nicht intubierten Patienten ähnliche Ergebnisse darstellbar sind und um damit die Zugänglichkeit zur Untersuchung von der Notwendigkeit einer Intubation zu lösen. Ausatemluft wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Fragestellungen zur Elektronischen Nase analysiert (Biller et al., 2011), (Greulich et al., 2013). Ob der in dieser Arbeit analysierte Gasraum über erhitzten Trachealspiratproben ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchung von Atemwegskondensat oder Ausatemluft liefert, ist im Vergleich nach unserem Kenntnisstand noch nicht untersucht.

Interessant erscheint ebenso die Frage, ob Untersuchungen von weiteren Körperflüssigkeiten bei Neugeborenen verwertbare Ergebnisse liefern. Meij et al. konnten zeigen, dass sich Smellprints der Stuhlproben von Patienten mit und ohne kolorektalem Karzinom signifikant unterschieden (Meij et al., 2014). Insbesondere Stuhlproben wären bei Frühgeborenen ideale Untersuchungsmedien im Hinblick auf die Frühdiagnostik einer nekrotisierenden Enterokolitis.

Der Einsatz der Enose im klinischen Alltag erscheint realistisch und praktikabel. Hierzu sollte auch der Transfer der Untersuchung aus dem Labor an das Patientenbett in Betracht gezogen und evaluiert werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Eine Frühgeburt birgt aufgrund der Unreife der Organsysteme des Neugeborenen erhöhte Krankheitsrisiken. Dazu zählen unter anderem Infektionserkrankungen und die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Early- oder Late-Onset Infektionen durch diverse Erreger sind bei Frühgeborenen eine der Hauptursachen für die Mortalität in der Neonatalperiode. Bei der BPD führen inflammatorische Prozesse in der unreifen Lunge zu einer chronischen Lungenschädigung mit persistierendem Sauerstoffbedarf im Verlauf. Hierfür fehlen valide Frühvorhersagemodelle. Auch was Infektionserkrankungen betrifft, ergeben sich bei Früh- und Neugeborenen wegen der unspezifischen Symptomatik diagnostische Schwierigkeiten. Im Hinblick auf die Prädiktion der BPD und die Diagnostik von systemischen Infektionen erfolgten in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen am Trachealspirat von 33 intubierten Früh- und Reifgeborenen. Das Trachealspirat wurde beim routinemäßigen Absaugen der Patienten gewonnen. Die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und IFN- γ im Trachealspirat wurden mittels Immunassay bestimmt. Zudem wurden die Trachealspiratproben mit zwei verschiedenen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht: Der konventionelle Untersuchungsansatz umfasste Färbung und Mikroskopie sowie kulturelle Anzucht, der molekulare Ansatz bestand aus einer PCR der im Trachealspirat vorhandenen 16S-rDNA sowie chromatographischer Auftrennung und Sequenzierung der Amplifikate. Des Weiteren kam eine Elektronische Nase zum Einsatz, ein tragbares Gerät, das volatile organische Substanzen (VOCs) detektiert. So wurde ein Smellprint, also ein Profil der emittierten Substanzen, für jede Trachealspiratprobe – ähnlich einem individuellen Fingerabdruck – erstellt.

Die Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen der Zytokine IL-6 und IFN- γ im Trachealspirat von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 32 SSW, die später eine BPD entwickelten und denen, die keine BPD entwickelten. Die Zytokin-konzentrationen im Trachealsekret korrelierten ebenfalls nicht mit dem Vorliegen einer systemischen Infektion oder dem Bakteriennachweis im Trachealspirat.

Der Vergleich des konventionellen und genomischen Erregernachweises im Trachealspirat zeigte eine erhebliche Diskrepanz. Bei Patienten, die später eine BPD entwickelten, zeigten sich signifikant häufiger Bakterien im Trachealspirat.

Die erstmalig bei Neugeborenen durchgeführte Analyse der durch die Elektronische Nase erstellten Smellprints erbrachte erfolgversprechende Ergebnisse: Die Smellprints der Trachealspirate von Frühgeborenen, die später eine BPD entwickelten und Frühgeborenen, die keine BPD entwickelten, unterschieden sich in der Diskriminanzanalyse signifikant. Ebenso

unterschieden sich die Smellprints von Patienten mit einer laborchemisch bestätigten Infektion signifikant von Patienten ohne Infektionsparameter, unabhängig davon, ob Letztere einen positiven Keimnachweis im Trachealaspirat hatten oder nicht. Der Einsatz der Elektronischen Nase in der Neugeborenenmedizin ist also vielversprechend hinsichtlich der Prädiktion der BPD sowie der Diagnostik von systemischen Infektionen. Es sind jedoch weitere Studien zur Validierung dieser Methode notwendig.

5.2 Englische Zusammenfassung

Diseases of prematurity such as neonatal infections and bronchopulmonary dysplasia (BPD) are frequent in preterm neonates, resulting from incomplete organ development. Early and late onset neonatal infections are a primary reason for mortality in preterms during the neonatal period. BPD is caused by an inflammatory process that prevents further development of the premature lung, resulting in a chronic pulmonary disease with prolonged need for supplementary oxygen. Early prediction markers for BPD are still lacking. Likewise, valid diagnosis of invasive infection in preterm and term neonates is difficult due to unspecific clinical symptoms.

In this project BPD and neonatal infections were investigated by analysing tracheal aspirates of 33 preterm and term neonates, which were collected during routine suctioning of the intubated patients. IL-6 and IFN- γ cytokine concentrations in the tracheal aspirates were measured by immunoassay. Conventional microbiological analysis consisting of gram staining, microscopy and bacterial culture was performed, as well as molecular analysis, which included PCR of 16S-rDNA and separation of the PCR-products by chromatography. Additionally, an electronic nose, a device that senses volatile organic compounds (VOCs) through 32 biopolymer sensors, was utilized. Smellprints were generated according to the detected VOCs.

Preterms born before completion of 32 weeks that developed BPD later on did not show higher levels of IL-6 and IFN- γ in their tracheal aspirates when compared to preterms that did not develop BPD. Tracheal aspirate cytokines were also not elevated in patients with signs of systemic infection or detection of bacteria in the tracheal aspirate.

Comparison of the different microbiological detection methods showed a high rate of mismatches. In patients that developed BPD, germs were detected significantly more often in the tracheal aspirate when compared to patients that did not develop BPD.

The smellprint linear discriminant analysis showed promising results: smellprints from tracheal aspirates of patients with and without subsequent development of BPD differed significantly. Furthermore, smellprints from tracheal aspirates of neonates with laboratory-confirmed

bloodstream infection differed significantly from those without infection, regardless of a positive or negative microbiological test result.

The application of an electronic nose may prove useful in the prediction of BPD development and diagnosis of neonatal infections. Larger numbers of samples will be needed for further validation of the respective smellprint patterns.

6. Literaturverzeichnis

- Aghai, Z.H., Camacho, J., Saslow, J.G., Mody, K., Eydelman, R., Bhat, V., Stahl, G., Pyon, K., Bhandari, V., 2012. Impact of histological chorioamnionitis on tracheal aspirate cytokines in premature infants. *American Journal of Perinatology* 29 (7), 567–572.
- Aghai, Z.H., Saslow, J.G., Mody, K., Eydelman, R., Bhat, V., Stahl, G., Pyon, K., Bhandari, V., 2013. IFN- γ and IP-10 in tracheal aspirates from premature infants: Relationship with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology* 48 (1), 8–13.
- Alkiaat, A., Hutchinson, M., Jaques, A., Sharp, M.J., Dickinson, J.E., 2013. Evaluation of the frequency and obstetric risk factors associated with term neonatal admission to special care units. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 53 (3), 277–282.
- Ambalavanan, N., Carlo, W.A., 2006. Ventilatory strategies in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30 (4), 192–199.
- Ambalavanan, N., Carlo, W.A., D'Angio, C.T., McDonald, S.A., Das, A., Schendel, D., Thorsen, P., Higgins, R.D., 2009. Cytokines Associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 123 (4), 1132–1141.
- Ananth, C.V., Joseph, K.S., Oyelese, Y., Demissie, K., Vintzileos, A.M., 2005. Trends in preterm birth and perinatal mortality among singletons: United States, 1989 through 2000. *Obstetrics & Gynecology* 105 (5), 1084–1091.
- Anderson, P.J., Doyle, L.W., 2006. Neurodevelopmental outcome of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30 (4), 227–232.
- AWMF-Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2006. S2-Leitlinie Neonatologie: Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. URL:http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024008_S2_Bakterielle_Infektionen_des_Neugeborenen_02-2006_02-2011.pdf. Abrufdatum: 20. März 2014.
- AWMF-Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 2009. S2-Leitlinie Neonatologie: Prävention und Therapie der Bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener. URL:http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-014_S2_Praevention_und_Therapie_der_Bronchopulmonalen_Dysplasie_Fruehgeborener_06-2009_06-2014_01.pdf. Abrufdatum: 26. März 2014.
- Arnon, S., Litmanovitz, I., 2008. Diagnostic tests in neonatal sepsis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21 (3), 223–227.
- Bagchi, A., Viscardi, R.M., Taciak, V., Ensor, J.E., McCrea, K.A., Hasday, J.D., 1994. Increased activity of interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in lung lavage of premature infants is associated with the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Research* 36 (2), 244–252.
- Bancalari, E., Claire, N., 2006. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30 (4), 164–170.
- Bassler, D., Stoll, B.J., Schmidt, B., Asztalos, E.V., Roberts, R.S., Robertson, C.M., Sauve, R.S., 2009. Using a count of neonatal morbidities to predict poor outcome in extremely low birth weight infants: Added role of neonatal infection. *Pediatrics* 123 (1), 313–318.
- Baraldi, E., Filippone, M., 2007. Chronic lung disease after premature birth. *The New England Journal of Medicine* 357 (19), 1946–1955.
- Bauserman, M.S., Laughon, M., Hornik, C.P., Smith, P.B., Benjamin, D.K., Clark, R.H., Engmann, C., Cohen-Wolkowicz, M., 2013. Group B Streptococcus and Escherichia coli infections in the intensive

- care nursery in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 32 (3), 208–212.
- Beck, J.M., Young, V.B., Huffnagle, G.B., 2012. The microbiome of the lung. *Translational Research* 160 (4), 258–266.
- Been, J.V., Debeer, A., van Iwaarden, J Freek, Kloosterboer, N., Passos, V.L., Naulaers, G., Zimmermann, L.J., 2010. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Research* 67 (1), 83–89.
- Beeton, M.L., Maxwell, N.C., Davies, P.L., Nuttall, D., McGreal, E., Chakraborty, M., Spiller, O.B., Kotecha, S., 2011. Role of pulmonary infection in the development of chronic lung disease of prematurity. *European Respiratory Journal* 37 (6), 1424–1430.
- Benitz, W.E., Gould, J.B., Druzin, M.L., 1999. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 103 (6), 77.
- Berner, R., Scholz, H., 2013. *DGPI-Handbuch Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*, 6., vollständig überarbeitete Auflage ed. Thieme, Stuttgart.
- Bhandari, V., 2014. Postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 100 (3), 189–201.
- Bhandari, V., Gruen, J.R., 2006. The genetics of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30 (4), 185–191.
- Biller, H., Holz, O., Windt, H., Koch, W., Muller, M., Jörres, R.A., Krug, N., Hohlfeld, J.M., 2011. Breath profiles by electronic nose correlate with systemic markers but not ozone response. *Respiratory Medicine* 105 (9), 1352–1363.
- Bismarck, P. von, Claass, A., Schickor, C., Krause, M.F., Rose-John, S., 2008. Altered pulmonary interleukin-6 signaling in preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia. *Experimental Lung Research* 34 (10), 694–706.
- Bizzarro, M.J., Raskind, C., Baltimore, R.S., Gallagher, P.G., 2005. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics* 116 (3), 595–602.
- Bizzarro, M.J., Dembry, L.-M., Baltimore, R.S., Gallagher, P.G., 2008. Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 121 (4), 689–696.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., Lawn, J.E., 2012. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet* 379 (9832), 2162–2172.
- Blic, J. de, Midulla, F., Barbato, A., Clement, A., Dab, I., Eber, E., Green, C., Grigg, J., Kotecha, S., Kurland, G., Pohunek, P., Ratjen, F., Rossi, G., 2000. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *European Respiratory Journal* 15 (1), 217–231.
- Bonadio, W.A., Hennes, H., Smith, D., Ruffing, R., Melzer-Lange, M., Lye, P., Isaacman, D.J., 1993. Reliability of observation variables in distinguishing infectious outcome of febrile young infants. *Pediatric Infectious Disease Journal* 12 (2), 111–114.
- Bonikos, D.S., Bensch, K.G., Northway, W.H., Edwards, D.K., 1976. Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis. *Human Pathology* 7 (6), 643–666.
- Boots, A.W., van Berkel, Joep J B N, Dallinga, J.W., Smolinska, A., Wouters, E.F., van Schooten, Frederik J, 2012. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *Journal of Breath Research* 6 (2), 027108.
- Bos, L. D. J., Schultz, M.J., Sterk, P.J., 2014. Exhaled breath profiling for diagnosing acute respiratory distress syndrome. *BMC Pulmonary Medicine* 14, 72.
- Bose, C., Dammann, C E L, Laughon, M.M., 2008. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 93 (6), 455–461.

- Bose, C., Van Marter, Linda J, Laughon, M., O'Shea, T.M., Allred, E.N., Karna, P., Ehrenkranz, R.A., Boggess, K., Leviton, A., 2009. Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* 124 (3), 450–458.
- Boskabadi, H., Maamouri, G., Tavakol Afshari, J., Mafinejad, S., Hosseini, G., Mostafavi-Toroghi, H., Saber, H., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G., 2013. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16 (12), 1232–1237.
- Buck, C., Bundsch, J., Bartmann, P., Pohlandt, F., Gallati, H., 1994. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 93 (1), 54–58.
- Buczynski, B.W., Maduekwe, E.T., O'Reilly, M.A., 2013. The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. *Seminars in Perinatology* 37 (2), 69–78.
- Cameron, M.J., Kelvin, J.D., 2003. Cytokines and chemokines – their receptors and their genes: an overview. *Advances in experimental medicine and biology* 520, 8–32.
- Campos, J.M., 1989. Detection of bloodstream infections in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 8 (9), 815–824.
- Carlo, W.A., 2013. Long-term respiratory morbidities after bronchopulmonary dysplasia despite current therapies. *Journal of Pediatrics* 164 (1), 12–13.
- Chakraborty, M., McGreal, E.P., Davies, P.L., Nowell, M.A., Jones, S., Kotecha, S., 2013. Role of interleukin-6, its receptor and soluble gp130 in chronic lung disease of prematurity. *Neonatology* 104 (3), 161–167.
- Charlson, E.S., Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F.D., Collman, R.G., 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184 (8), 957–963.
- Chisea, C., Panero, A., Osborn, J.F., Simonetti, A.F., Pacifico, L., 2004. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clinical Chemistry* 50 (2), 279–287.
- Coalson, J.J., 2006. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30 (4), 179–184.
- D'Angio, C. T., Basavegowda, K., Avissar, N. E., Finkelstein, J. N., Sinkin, R. A., 2002. Comparison of tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage specimens from premature infants. *Biology of the Neonate* 82,145–149.
- Dargaville, P.A., South, M., McDougall, P.N., 1999. Comparison of two methods of diagnostic lung lavage in ventilated infants with lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160 (3), 771–777.
- Darlow, B.A., Mogridge, N., Horwood, L.J., Wynn-Williams, M.B., Austin, N.C., 2009. Admission of all gestations to a regional neonatal unit versus controls: Neonatal morbidity. *Journal of Paediatrics and Child Health* 45 (4), 181–186.
- Darlow, B.A., Sluis, K.B., Inder, T.E., Winterbourn, C.C., 1997. Endotracheal suctioning of the neonate: comparison of two methods as a source of mucus material for research. *Pediatric Pulmonology* 23 (3), 217–221.
- Davidson, L.M., Berkelhamer, S.K., 2017. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung disease of infancy and long-term pulmonary outcomes. *Journal of Clinical Medicine*, 6 (1).
- Døllner, H., 2001. Early diagnostic markers for neonatal sepsis Comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *Journal of Clinical Epidemiology* 54 (12), 1251–1257.
- Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Turschner, S., Kuhle, J., Watzel, C., Hain, T., Hossain, H., Chakraborty, T., 2003. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (12), 5500–5510.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26), 11971–11975.

- Doyle, L.W., Faber, B., Callanan, C., Freezer, N., Ford, G.W., Davis, N.M., 2006. Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics* 118 (1), 108–113.
- Dragonieri, S., Annema, J.T., Schot, R., Van der Schee, M P, Spanevello, A., Carratu, P., Resta, O., Rabe, K.F., Sterk, P.J., 2009. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 64 (2), 166–170.
- Dragonieri, S., Schot, R., Mertens, Bart J A, Le Cessie, S., Gauw, S.A., Spanevello, A., Resta, O., Willard, N.P., Vink, T.J., Rabe, K.F., Bel, E.H., Sterk, P.J., 2007. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (4), 856–862.
- Ehrenkranz, R.A., Walsh, M.C., Vohr, B.R., Jobe, A.H., Wright, L.L., Fanaroff, A.A., Wrage, L.A., Poole, K., 2005. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 116 (6), 1353–1360.
- Evans, M.E., Schaffner, W., Federspiel, C.F., Cotton, R.B., McKee, K T Jr, Stratton, C.W., 1988. Sensitivity, specificity, and predictive value of body surface cultures in a neonatal intensive care unit. *Journal of the American Medical Association* 259 (2), 248–252.
- Fanaroff, A.A., Stoll, B.J., Wright, L.L., et al; NICHD Neonatal Research Network, 2007. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196 (2), 147.
- Farhath, S., He, Z., Nakhla, T., Saslow, J., Soundar, S., Camacho, J., Stahl, G., Shaffer, S., Mehta, D.I., Aghai, Z.H., 2008. Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 121 (2), 253–259.
- Fens, N., Van der Schee, M P, Brinkman, P., Sterk, P.J., 2013. Exhaled breath analysis by electronic nose in airways disease. Established issues and key questions. *Clinical & Experimental Allergy* 43 (7), 705–715.
- Figueras-Aloy, J., Salvia-Roiges, M.D., Rodriguez-Miguel, J.M., Miracle-Echegoyen, X., Botet-Mussons, F., Marin-Soria, J.L., Carbonell-Estrany, X., 2011. Impact of chorioamnionitis on exhaled nitric oxide and endotracheal aspirate levels of nitrites-nitrates and interleukin-8 in mechanically ventilated preterm neonates. *Pediatric Pulmonology* 46 (6), 595–603.
- Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B., Schulte-Moenting, J., Moennig, M.-J., Bartels, D.B., Dammann, O., Kries, R. von, Berner, R., 2006. Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 117 (6), 1139–1145.
- Følsgaard, N.V., Schjørring, S., Chawes, B.L., Rasmussen, M.A., Krogh, K.A., Brix, S., Bisgaard, H., 2013. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (6), 589–595.
- Franz, A.R., Bauer, K., Schalk, A., Garland, S.M., Bowman, E.D., Rex, K., Nyholm, C., Norman, M., Boutgatef, A., Kron, M., Mihatsch, W.A., Pohlandt, F., International IL-8 Study Group, 2004. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics* 114 (1), 1–8
- Friedland, D.R., Rothschild, M.A., Delgado, M., Isenberg, H., Holzman, I., 2001. Bacterial colonization of endotracheal tubes in intubated neonates. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 127 (5), 525–528.
- Gallacher, D.J., Kotecha, S., 2016. Respiratory microbiome of new-born infants. *Frontiers in Pediatrics*, 4 (10).
- Gancia, P., Delogu, A., Pomero, G., 2014. Ureaplasma and bronchopulmonary dysplasia. *Early Human Development* 90, 39–41.
- Garcia-Prats, J.A., Cooper, T.R., Schneider, V.F., Stager, C.E., Hansen, T.N., 2000. Rapid detection of microorganisms in blood cultures of newborn infants utilizing an automated blood culture system. *Pediatrics* 105 (3 Pt 1), 523–527.
- Gardner, S.L., 2009. Sepsis in the Neonate. *Critical Care Nursing Clinics of North America* 21(1), 121-141.

- Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C., Hughes, J.M., 1988. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American Journal of Infection Control* 16 (3), 128–140.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., Göbel, U.B., 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 68 (1), 94–105.
- Goldstein, B., Giroir, B., Randolph, A.G., 2005. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine* 6 (1), 2–8.
- Gouyon, J.B., Iacobelli, S., Ferdynus, C., Bonsante, F., 2012. Neonatal problems of late and moderate preterm infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 17 (3), 146–152.
- Greulich, T., Hattesoehl, A.D., Grabisch, A., Jörres, R.A., Koczulla, A.-R., Koepke, J., Köhler, U., Nell, C., Noeske, S., Schmid, S., Vogelmeier, C., Wencker, M., 2013. Detection of obstructive sleep apnoea by an electronic nose. *European Respiratory Journal* 42 (1), 145–155.
- Grigg, J.M., Barber, A., Silverman, M., 1992. Increased levels of bronchoalveolar lavage fluid interleukin-6 in preterm ventilated infants after prolonged rupture of membranes. *American Review of Respiratory Disease* 145 (4. 1), 782–786.
- Han, Y.W., Shen, T., Chung, P., Buhimschi, I.A., Buhimschi, C.S., 2009. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *Journal of Clinical Microbiology* 47 (1), 38–47.
- Harijith, A., Choo-Wing, R., Cataltepe, S., Yasumatsu, R., Aghai, Z.H., Janér, J., Andersson, S., Homer, R.J., Bhandari, V., 2011. A role for Matrix Metalloproteinase 9 in IFN γ -mediated injury in developing lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44 (5), 621–630.
- Harris, M.C., D'Angio, C.T., Gallagher, P.R., Kaufman, D., Evans, J., Kilpatrick, L., 2005. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *Journal of Pediatrics* 147 (4), 462–468.
- Harrison, C.M., Andersen, C.C., 2005. Exhaled breath measures of inflammation: are they useful in neonatal chronic lung disease? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 90 (1), 6–10.
- Harwood, D.T., Darlow, B.A., Cheah, F.-C., McNeill, N., Graham, P., Winterbourn, C.C., 2011. Biomarkers of neutrophil-mediated glutathione and protein oxidation in tracheal aspirates from preterm infants: association with bacterial infection. *Pediatric Research* 69 (1), 28–33.
- Hasan, J., Beharry, K.D., Valencia, A.M., Strauss, A., Modanlou, H.D., 2009. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *Pediatrics* 123 (6), 1541–1547.
- Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus, T., 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal* 265 (3), 621–636.
- Heß, N., Hüning, B.M., Roll, C., 2010. Stressreaktionen und zerebrale Oxygenierung während venöser und kapillärer Blutentnahmen bei sehr kleinen Frühgeborenen. *Klinische Pädiatrie* 222 (1).
- Hikino, S., Ohga, S., Kinjo, T., Kusuda, T., Ochiai, M., Inoue, H., Honjo, S., Ihara, K., Ohshima, K., Hara, T., 2012. Tracheal aspirate gene expression in preterm newborns and development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society* 54 (2), 208–214.
- Hofer, N., Zacharias, E., Müller, W., Resch, B., 2012. Performance of the definitions of the systemic inflammatory response syndrome and sepsis in neonates. *Journal of Perinatal Medicine* 40 (5), 587–590.
- Hornik, C.P., Fort, P., Clark, R.H., Watt, K., Benjamin, D.K., Smith, P.B., Manzoni, P., Jacqz-Aigrain, E., Kaguelidou, F., Cohen-Wolkowicz, M., 2012. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Human Development* 88, 69.
- Humphreys, L., Orme, R.M., Moore, P., Charaklias, N., Sahgal, N., Pont, N.P., Magan, N., Stone, N., Kendall, C.A., 2011. Electronic nose analysis of bronchoalveolar lavage fluid. *European Journal of Clinical Investigation* 41 (1), 52–58.

- Imirzalioglu, C., Sethi, S., Schneider, C., Hain, T., Chakraborty, T., Mayser, P., Domann, E., 2014. Distinct polymicrobial populations in a chronic foot ulcer with implications for diagnostics and anti-infective therapy. *BMC Research Notes* 7, 196.
- Isaacman, D.J., Karasic, R.B., Reynolds, E.A., Kost, S.I., 1996. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *Journal of Pediatrics* 128 (2), 190–195.
- Iwatani, S., Mizobuchi, M., Tanaka, S., Inomata, K., Sakai, H., Yoshimoto, S., Nakao, H., 2013. Increased volume of tracheal aspirate fluid predicts the development of bronchopulmonary dysplasia. *Early Human Development* 89 (2), 113–117.
- Jensen, E.A., Schmidt, B., 2014. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 100 (3), 145–157.
- Jobe, A.H., 2015. Animal models, learning lessons to prevent and treat neonatal chronic lung disease. *Frontiers in Medicine* 2, 49.
- Jobe, A.H., Bancalari, E., 2001. Bronchopulmonary Dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (7), 1723–1729.
- Jobe, A.J., 1999. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatric Research* 46 (6), 641–643.
- Jonsson, B., Tullus, K., Brauner, A., Lu, Y., Noack, G., 1997. Early increase of TNF α and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 77 (3), 198–201.
- Jorch, G., Hübler, A., 2010. Neonatologie: Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen. Thieme, Stuttgart.
- Kair, L.R., Leonard, D.T., Anderson, J.M., 2012. Bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics in Review* 33 (6), 255–263.
- Kallapur, S.G., Jobe, A.H., Ikegami, M., Bachurski, C.J., 2003. Increased IP-10 and MIG expression after intra-amniotic endotoxin in preterm lamb lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (5), 779–786.
- Kallapur, S.G., Kramer, B.W., Jobe, A.H., 2013. Ureaplasma and BPD. *Seminars in Perinatology* 37 (2), 94–101.
- Kataoka, H., Saito, K., Kato, H., Masuda, K., 2013. Noninvasive analysis of volatile biomarkers in human emanations for health and early disease diagnosis. *Bioanalysis* 5 (11), 1443–1459.
- Kazzi, S.N., Quasney, M.W., 2005. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme is associated with increased risk and severity of bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Pediatrics* 147 (6), 818–822.
- Kazzi, S.N., Romero, R., McLaughlin, K., Ager, J., Janisse, J., 2001. Serial changes in levels of IL-6 and IL-1 β in premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology* 31 (3), 220–226.
- Kellogg, J.A., Ferrentino, F.L., Goodstein, M.H., Liss, J., Shapiro, S.L., Bankert, D.A., 1997. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatric Infectious Disease Journal* 16 (4), 381–385.
- Kiley, J.P., Caler, E.V., 2014. The lung microbiome. A new frontier in pulmonary medicine. *Annals of the American Thoracic Society* 11 (1), 66–70.
- Kinsella, J.P., Greenough, A., Abman, S.H., 2006. Bronchopulmonary dysplasia. *The Lancet* 367 (9520), 1421–1431.
- Köksal, N., Kayik, B., Çetinkaya, M., Özkan, H., Budak, F., Kiliç, Ş., Canitez, Y., Oral, B., 2012. Value of serum and bronchoalveolar fluid lavage pro- and anti-inflammatory cytokine levels for predicting bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *European Cytokine Network* 23 (2), 29–35.
- Kononen, E., 2000. Development of oral bacterial flora in young children. *Annals of Medicine* 32 (2), 107–112.
- Korhonen, P., Laitinen, J., Hyödynmaa, E., Tammela, O., 2004. Respiratory outcome in school-aged, very-low-birth-weight children in the surfactant era. *Acta Paediatrica* 93 (3), 316–321.
- Kotecha, S., Wilson, L., Wangoo, A., Silverman, M., Shaw, R.J., 1996. Increase in interleukin (IL)-1 β and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatric Research* 40 (2), 250–256.

- Laborada, G., Rego, M., Jain, A., Guliano, M., Stavola, J., Ballabh, P., Krauss, A.N., Auld, Peter A M, Nesin, M., 2003. Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *American Journal of Perinatology* 20 (8), 491–501.
- Lahra, M.M., Beeby, P.J., Jeffery, H.E., 2009. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 123 (5), 1314–1319.
- Lan, W.-C.J., Bhutani, V.K., 2011. Core Concepts: Neonatal tidal volume: physiologic, technologic, and clinical considerations. *NeoReviews* 12 (11), e652.
- Landry, J.S., Menzies, D., 2011. Occurrence and severity of bronchopulmonary dysplasia and respiratory distress syndrome after a preterm birth. *Paediatrics and Child Health* 16 (7), 399–403.
- Lau, Y.L., Hey, E., 1991. Sensitivity and specificity of daily tracheal aspirate cultures in predicting organisms causing bacteremia in ventilated neonates. *Pediatric Infectious Disease Journal* 10 (4), 290–294.
- Laughon, M., Allred, E.N., Bose, C., O'Shea, T.M., Van Marter, Linda J, Ehrenkranz, R.A., Leviton, A., 2009. Patterns of respiratory disease during the first 2 postnatal weeks in extremely premature infants. *Pediatrics* 123 (4), 1124–1131.
- Leddy, M.B., Shields, J.M., Donald, P.W., 2004. Using a denaturing high performance liquid chromatography system to analyze environmental communities and their constituents. Research and Development Department, Orange County Water District.
- Leistner, R., Piening, B., Gastmeier, P., Geffers, C., Schwab, F., 2013. Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: current data from the National Surveillance System NEO-KISS. *Klinische Pädiatrie* 225 (2), 75–80.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., Ramsay, G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 29 (4), 530–538.
- Lewis, N.S., 2004. Comparisons between mammalian and artificial olfaction based on arrays of carbon black-polymer composite vapor detectors. *Accounts of Chemical Research* 37 (9), 663–672.
- Lohmann, P., Luna, R.A., Hollister, E.B., Devaraj, S., Mistretta, T-A., Welty, S.E., Versalovic, J., 2014. The airway microbiome of intubated premature infants: characteristics and changes that predict the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Research*, 76 (3), 294–301.
- Lowe, J., Watkins, W.J., Edwards, M.O., Spiller, O.B., Jacqz-Aigrain, E., Kotecha, S.J., Kotecha, S., 2014. Association between pulmonary ureaplasma colonization and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: updated systematic review and meta-analysis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 33 (7), 697–702.
- Lucignano, B., Ranno, S., Liesenfeld, O., Pizzorno, B., Putignani, L., Bernaschi, P., Menichella, D., 2011. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (6), 2252–2258.
- Maier, R.F., Obladen, M., 2017. *Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung*, 9. überarbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Maier, R.F., Obladen, M., Messinger, D., Wardrop, C.A., 1996. Factors related to transfusion in very low birthweight infants treated with erythropoietin. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 74 (3), 182–186.
- Mangler, M., Freitag, C., Lanowska, M., Staack, O., Schneider, A., Speiser, D., 2012. Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath of patients with breast cancer in a clinical setting. *Ginekologia polska* 83 (10), 730–736.
- Manroe, B.L., Weinberg, A.G., Rosenfeld, C.R., Browne, R., 1979. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *Journal of Pediatrics* 95 (1), 89–98.
- Marchant, E.A., Boyce, G.K., Sadarangani, M., Lavoie, P.M., 2013. Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clinical and Developmental Immunology* 2013, 586076.
- Marchini, G., Berggren, V., Djilali-Merzoug, R., Hansson, L.O., 2000. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatrica* 89 (9), 1082–1086.

- Mathers, N.J., Pohlandt, F., 1987. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. *European Journal of Pediatrics* 146 (2), 147–151.
- Meij, T. G., Larbi, I. B., Schee, M. P., Lentferink, Y. E., Paff, T., Terhaar sive Droste, J. S., Mulder, C. J., Bodegraven, A. A., Boer, N. K., 2014. Electronic nose can discriminate colorectal carcinoma and advanced adenomas by fecal volatile biomarker analysis: proof of principle study. *International Journal of Cancer* 134, 1132–1138.
- Miralles, R., Hodge, R., McParland, P.C., Field, D.J., Bell, S.C., Taylor, D.J., Grant, W.D., Kotecha, S., 2005. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. *Pediatric Research* 57 (4), 570–577.
- Modanlou, H.D., Beharry, K., Padilla, G., Iriye, B., 1996. Combined effects of antenatal corticosteroids and surfactant supplementation on the outcome of very low birth weight infants. *Journal of Perinatology* 16 (6), 422–428.
- Morris, A., Beck, J.M., Schloss, P.D., Campbell, T.B., Crothers, K., Curtis, J.L., Flores, S.C., Fontenot, A.P., Ghedin, E., Huang, L., Jablonski, K., Kleerup, E., Lynch, S.V., Sodergren, E., Twigg, H., Young, V.B., Bassis, C.M., Venkataraman, A., Schmidt, T.M., Weinstock, G.M., 2013. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (10), 1067–1075.
- Mounier, J., Gouello, A., Keravec, M., Le Gal, S., Pacini, G., Debaets, S., Nevez, G., Rault, G., Barbier, G., Hery-Arnaud, G., 2014. Use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to characterize the bacterial and fungal airway microbiota of cystic fibrosis patients. *Journal of Microbiology* 52 (4), 307–314.
- Mourani, P.M., Abman, S.H., 2013. Pulmonary vascular disease in bronchopulmonary dysplasia: pulmonary hypertension and beyond. *Current Opinion in Pediatrics* 25 (3), 329–337.
- Mourani, P.M., Harris, J.K., Sontag, M.K., Robertson, C.E., Abman, S.H., 2011. Molecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants. *PLOS ONE* 6 (10), 25959.
- Mouzinho, A., Rosenfeld, C.R., Sanchez, P.J., Risser, R., 1994. Revised reference ranges for circulating neutrophils in very-low-birth-weight neonates. *Pediatrics* 94 (1), 76–82.
- Mukhopadhyay, S., Puopolo, K.M., 2012. Risk assessment in neonatal early onset sepsis. *Seminars in Perinatology* 36 (6), 408–415.
- Muller-Pebody, B., Johnson, A.P., Heath, P.T., Gilbert, R.E., Henderson, K.L., Sharland, M., 2011. Empirical treatment of neonatal sepsis: are the current guidelines adequate? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 96 (1), 4–8.
- Nelson-Filho, P., Borba, I.G., Mesquita, Késsia Suênia Fidelis de, Silva, Raquel Assed Bezerra, Queiroz, Alexandra Mussolino de, Silva, Léa Assed Bezerra, 2013. Dynamics of microbial colonization of the oral cavity in newborns. *Brazilian Dental Journal* 24 (4), 415–419.
- Newman, T.B., Draper, D., Puopolo, K.M., Wi, S., Escobar, G.J., 2014. Combining immature and total neutrophil counts to predict early onset sepsis in term and late preterm newborns: use of the I/T2. *Pediatric Infectious Disease Journal* 33 (8), 798–802.
- Northway, W.H., Rosan, R.C., Porter, D.Y., 1967. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *The New England Journal of Medicine* 276 (7), 357–368.
- Novitsky, A., Tuttle, D., Locke, R.G., Saiman, L., Mackley, A., Paul, D.A., 2015. Prolonged early antibiotic use and bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *American Journal of Perinatology* 32 (1), 43–48.
- Ohlsson, A., Lacy, J.B., 2013. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (7), CD000361.
- Onland, W., Debray, T.P., Laughon, M., Miedema, M., Cools, F., Askie, L.M., Asselin, J.M., Calvert, S.A., Courtney, S.E., Dani, C., Durand, D.J., Marlow, N., Peacock, J.L., Pillow, J., Soll, R.F., Thome, U.H., Truffert, P., Schreiber, M.D., van Reempts, P., Vendettuoli, V., Vento, G., van Kaam, Anton H,

- Moons, K.G., Offringa, M., 2013. Clinical prediction models for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and external validation study. *BMC Pediatrics* 13 (1), 207.
- Overstreet, D.W., Jackson, J.C., van Belle, G., Truog, W.E., 1991. Estimation of mortality risk in chronically ventilated infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 88 (6), 1153–1160.
- Oza, S., Lawn, J.E., Hogan, D.R., Mathers, C., Cousen, S.N., 2015. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods from 194 countries: 2000–2013. *Bulletin of the World Health Organisation* 93 (1), 19.
- Paananen, R., Husa, A.-K., Vuolteenaho, R., Herva, R., Kaukola, T., Hallman, M., 2009. Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Pediatrics* 154 (1), 39–43.
- Pammi, M., Flores, A., Leeflang, M., Versalovic, J., 2011. Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 128 (4), 973–985.
- Paolucci, M., Landini, M.P., Sambri, V., 2012. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? *International Journal of Pediatrics* 2012, 120–139.
- Philip, A.G., 2005. The evolution of neonatology. *Pediatric Research* 58 (4), 799–815.
- Polin, R.A., 2012. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics* 129 (5), 1006–1015.
- Polin, R.A., Denson, S., Brady, M.T., 2012. Epidemiology and diagnosis of health care-associated infections in the NICU. *Pediatrics* 129 (4), e1104–9.
- Pschyrembel, W., 2010. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011*, 262., neu bearbeitete und erweiterte Auflage ed. de Gruyter, Berlin.
- Randolph, A.G., McCulloh, R.J., 2014. Pediatric sepsis: Important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents. *Virulence* 5 (1), 179–189.
- Relman, D.A., 1999. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 29 (3), 475–486.
- Reynolds, H.Y., 2000. Use of bronchoalveolar lavage in humans—past necessity and future imperative. *Lung*, 178(5), 271–293.
- Robert Koch-Institut, 2011. *Definition nosokomialer Infektionen (CDC-Definitionen)*, 7. Auflage.
- Robert Koch-Institut- Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention, 2013. *Kolonisationscreenings bei intensivmedizinisch behandelten Früh- und Neugeborenen. Epidemiologisches Bulletin* 2013,42: 421–436
- Roos, R., Genzel-Boroviczeny, O., Proquitté, H.M., 2010. *Checkliste Neonatologie*, 4., überarbeitete Auflage ed. Thieme, Stuttgart.
- Rosias, Philippe P R, Dompeling, E., Hendriks, Han J E, Heijmens, Jan W C M, Donckerwolcke, Raymond A M G, Jobsis, Q., 2004. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatric Allergy and Immunology* 15 (1), 4–19.
- Rozycki, H.J., Comber, P.G., Huff, T.F., 2002. Cytokines and oxygen radicals after hyperoxia in preterm and term alveolar macrophages. *The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 282 (6), 1222–1228.
- Ryan, R.M., Ahmed, Q., Lakshminrusimha, S., 2008. Inflammatory mediators in the immunobiology of bronchopulmonary dysplasia. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 34 (2), 174–190.
- Saugstad, O.D., 2010. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Perinatal Medicine* 38 (6), 571–577.
- Schelonka, R.L., Chai, M.K., Yoder, B.A., Hensley, D., Brockett, R.M., Ascher, D.P., 1996. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *Journal of Pediatrics* 129 (2), 275–278.
- Schelonka, R.L., Katz, B., Waites, K.B., Benjamin, Daniel, K., 2005. Critical appraisal of the role of Ureaplasma in the development of bronchopulmonary dysplasia with metaanalytic techniques. *Pediatric Infectious Disease Journal* 24 (12), 1033–1039.
- Schieve, L.A., Meikle, S.F., Ferre, C., Peterson, H.B., Jeng, G., Wilcox, L.S., 2002. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *The New England Journal of Medicine* 346 (10), 731–737.

- Schwab, F., Geffers, C., Piening, B., Haller, S., Eckmanns, T., Gastmeier, P., 2014. How many outbreaks of nosocomial infections occur in German neonatal intensive care units annually? *Infection* 42 (1), 73–78.
- Shah, B.A., Padbury, J.F., 2014. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. *Virulence* 5 (1), 170–178.
- Shane, A.L., Stoll, B.J., 2013. Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. *American Journal of Perinatology* 30 (2), 131–141.
- Shane, A.L., Stoll, B.J., 2014. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *Journal of Infection* 68, 24–32.
- Shirasu, M., Touhara, K., 2011. The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *Journal of Biochemistry* 150 (3), 257–266.
- Silveira, R.C., Procianny, R.S., 1999. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatrica* 88 (6), 647–650.
- Simonsen, K.A., Anderson-Berry, A.L., Delair, S.F., Davies, H.D., 2014. Early-onset neonatal sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 27 (1), 21–47.
- Skiepkowski, R., Zietkowski, Z., Tomasiak, M.M., Bodzenta-Lukaszyk, A., 2006. Exhaled breath condensate in the assessment of airway inflammation. *Przegląd Lekarski* 63 (12), 1321–1325.
- Slagle, T.A., Bifano, E.M., Wolf, J.W., Gross, S.J., 1989. Routine endotracheal cultures for the prediction of sepsis in ventilated babies. *Archives of Disease in Childhood* 64 (1), 34–38.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1), 76–85.
- Smith, V.C., Zupancic, John A F, McCormick, M.C., Croen, L.A., Greene, J., Escobar, G.J., Richardson, D.K., 2004. Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Pediatrics*. 144 (6), 799–803.
- Sohn, A.H., Garrett, D.O., Sinkowitz-Cochran, R.L., Grohskopf, L.A., Levine, G.L., Stover, B.H., Siegel, J.D., Jarvis, W.R., 2001. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *Journal of Pediatrics* 139 (6), 821–827.
- Sommer, C., Resch, B., Simões, Eric A F, 2011. Risk factors for severe respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Open Microbiology Journal* 5, 144–154.
- Speer, C.P., 2003. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology, Bronchopulmonary Dysplasia* 8 (1), 29–38.
- Speer, C.P., 2006. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 11 (5), 354–362.
- Speer, C.P., 2009. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 95 (4), 353–361.
- Squire, E., Favara, B., Todd, J., 1979. Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. *Pediatrics* 64 (1), 60–64.
- Stichtenoth, G., Demmert, M., Bohnhorst, B., Stein, A., Ehlers, S., Heitmann, F., Rieger-Fackeldey, E., Olbertz, D., Roll, C., Emeis, M., Mögel, M., Schiffmann, H., Wieg, C., Wintgens, J., Herting, E., Göpel, W., Härtel, C., 2012. Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klinische Pädiatrie* 224 (4), 276–281.
- Stoll, B.J., Hansen, N., 2003. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Seminars in Perinatology* 27 (4), 293–301.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Bell, E.F., Shankaran, S., Laptook, A.R., Walsh, M.C., Hale, E.C., Newman, N.S., Schibler, K., Carlo, W.A., Kennedy, K.A., Poindexter, B.B., Finer, N.N., Ehrenkranz, R.A., Duara, S., Sánchez, P.J., O’Shea, T.M., Goldberg, R.N., Van Meurs, Krisa P, Faix, R.G., Phelps, D.L., Frantz, I.D., Watterberg, K.L., Saha, S., Das, A., Higgins, R.D., 2010. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 126 (3), 443–456.

- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Stark, A.R., Tyson, J.E., Oh, W., Bauer, C.R., Korones, S.B., Shankaran, S., Laptook, A.R., Stevenson, D.K., Papile, L.-A., Poole, K., 2002. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110 (2 Pt 1), 285–291.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Sánchez, P.J., Faix, R.G., Poindexter, B.B., Van Meurs, Krisa P, Bizzarro, M.J., Goldberg, R.N., Frantz, I.D., Hale, E.C., Shankaran, S., Kennedy, K.A., Carlo, W.A., Watterberg, K.L., Bell, E.F., Walsh, M.C., Schibler, K., Laptook, A.R., Shane, A.L., Schrag, S.J., Das, A., Higgins, R.D., 2011. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics* 127 (5), 817–826.
- Stressmann, F.A., Connett, G.J., Goss, K., Kollamparambil, T.G., Patel, N., Payne, M.S., Puddy, V., Legg, J., Bruce, K.D., Rogers, G.B., 2010. The use of culture-independent tools to characterize bacteria in endo-tracheal aspirates from pre-term infants at risk of bronchopulmonary dysplasia. *Journal of Perinatal Medicine* 38 (3), 333–337.
- Sutula, J., Coulthwaite, L., Verran, J., 2012. Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbiological Methods* 90 (1), 65–71.
- Synnes, A.R., Berry, M., Jones, H., Pendray, M., Stewart, S., Lee, S.K., 2004. Infants with congenital anomalies admitted to neonatal intensive care units. *American Journal of Perinatology* 21 (4), 199–207.
- Tamim, M.M., Alesseh, H., Aziz, H., 2003. Analysis of the efficacy of urine culture as part of sepsis evaluation in the premature infant. *Pediatric Infectious Disease Journal* 22 (9), 805–808.
- Taylor, D., Kenyon, S., Tarnow-Mordi, W., 1997. Infection and preterm labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 104 (12), 1338–1340.
- Testoni, D., Hayashi, M., Cohen-Wolkowicz, M., Benjamin, Daniel K Jr, Lopes, R.D., Clark, R.H., Benjamin, D.K., Smith, P.B., 2014. Late-Onset Bloodstream Infections in Hospitalized Term Infants. *Pediatric Infectious Disease Journal* 33 (9), 920–923.
- Thaler, E.R., Hanson, C.W., 2005. Medical applications of electronic nose technology. *Expert Review of Medical Devices* 2 (5), 559–566.
- Thomas, W., Speer, C.P., 2014. Chorioamnionitis is essential in the evolution of bronchopulmonary dysplasia—the case in favour. *Paediatric Respiratory Reviews* 15 (1), 49–52.
- Thuler, L.C., Jenicek, M., Turgeon, J.P., Rivard, M., Lebel, P., Lebel, M.H., 1997. Impact of a false positive blood culture result on the management of febrile children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 16 (9), 846–851.
- Tuffs, A., 2011. Poor hospital hygiene is blamed for deaths of three babies in Bremen. *British Medical Journal* 343, 7396.
- Tullus, K., Noack, G.W., Burman, L.G., Nilsson, R., Wretling, B., Brauner, A., 1996. Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia. *European Journal of Pediatrics* 155 (2), 112–116.
- Van Dyke, M.K., Phares, C.R., Lynfield, R., Thomas, A.R., Arnold, K.E., Craig, A.S., Mohle-Boetani, J., Gershman, K., Schaffner, W., Petit, S., Zansky, S.M., Morin, C.A., Spina, N.L., Wymore, K., Harrison, L.H., Shutt, K.A., Baretta, J., Bulens, S.N., Zell, E.R., Schuchat, A., Schrag, S.J., 2009. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *The New England Journal of Medicine* 360 (25), 2626–2636.
- Van Marter, Linda J, Dammann, O., Allred, E.N., Leviton, A., Pagano, M., Moore, M., Martin, C., 2002. Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *Journal of Pediatrics* 140 (2), 171–176.
- Van Rossum, A.M.C., Wulkan, R.W., Oudesluys-Murphy, A.M., 2004. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *The Lancet Infectious Diseases* 4 (10), 620–630.
- Venkataraman, A., Bassis, C.M., Beck, J.M., Young, V.B., Curtis, J.L., Huffnagle, G.B., Schmidt, T.M., 2015. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio* 6 (1), 02284–14.

- Vento, G., Capoluongo, E., Matassa, P.G., Concolino, P., Vendettuoli, C.V., Frezza, S., Zuppi, C., Romagnoli, C., Ameglio, F., 2006. Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: correlation with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Medicine* 32 (5), 723–730.
- Vergnano, S., Menson, E., Kennea, N., Embleton, N., Russell, A.B., Watts, T., Robinson, M.J., Collinson, A., Heath, P.T., 2011. Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 96 (1), 9–14.
- Vom Hove, M., Henn, C., Meir, U., Prenzel, F., 2011. Pulmonale Langzeitfolgen der Bronchopulmonalen Dysplasie. *Kinder- und Jugendmedizin* 11 (1), 38–42.
- Vom Hove, M., Prenzel, F., Uhlig, H.H., Robel-Tillig, E., 2014. Pulmonary outcome in former preterm, very low birth weight children with bronchopulmonary dysplasia: a case-control follow-up at school age. *Journal of Pediatrics* 164 (1), 40–45.
- Waites, K.B., Xiao, L., Paralanov, V., Viscardi, R.M., Glass, J.I., 2012. Molecular methods for the detection of mycoplasma and ureaplasma Infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnostics* 14 (5), 437–450.
- Walsh, M.C., Szeffler, S., Davis, J., Allen, M., van Marter, L., Abman, S., Blackmon, L., Jobe, A., 2006. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 117 (3 Pt 2), 52–56.
- Wang, C., Ke, C., Wang, X., Chi, C., Guo, L., Luo, S., Guo, Z., Xu, G., Zhang, F., Li, E., 2014. Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (19), 4757–4763.
- Wang, Z., Zheng, T., Zhu, Z., Homer, R.J., Riese, R.J., Chapman, H A Jr, Shapiro, S.D., Elias, J.A., 2000. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *Journal of Experimental Medicine* 192 (11), 1587–1600.
- Watts, C.L., Bruce, M.C., 1995. Comparison of secretory component for immunoglobulin A with albumin as reference proteins in tracheal aspirate from preterm infants. *Journal of Pediatrics* 127 (1), 113–122.
- Weichert, A., Weichert, T.M., Bergmann, R.L., Heinrich, W., Kalache, K.D., Richter, R., Neymeyer, J., Bergmann, K.E., 2015. Factors for preterm births in germany - an analysis of representative german data (KiGGS). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 75 (8), 819–826.
- Willson, D.F., Conaway, M., Kelly, R., Hendley, J.O., 2014. The lack of specificity of tracheal aspirates in the diagnosis of pulmonary infection in intubated children. *Pediatric Critical Care Medicine* 15 (4), 299–305.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., Yuen, K.-Y., 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (10), 908–934.
- Wynn, J.L., 2016. Defining neonatal sepsis. *Current Opinion in Pediatrics* 28 (2), 135–140.
- Wynn, J.L., Wong, H.R., Shanley, T.P., Bizzarro, M.J., Saiman, L., Polin, R.A., 2014. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatric Critical Care Medicine* 15 (6), 523–528.
- Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., Ishizawa, K., Sasaki, H., 2004. Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (5), 1042–1047.

7. Anhang

SOP „Gewinnung von Trachealaspirat bei Frühgeborenen“

SOP Trachealaspirat

M. Zemlin, Marburg

08.09.2010

Studie: „Prädiktion der chronischen Lungenerkrankung anhand der Entzündungsmediatoren und der Mikroflora im Trachealaspirat beatmeter Frühgeborener“

SOP „Gewinnung von Trachealaspirat bei Frühgeborenen“

1. Zeitpunkt der Gewinnung:

- a) Wenn es klinische Hinweise auf Sekretverhalt gibt
- b) Wenn die Extubation unmittelbar bevorsteht.

2. Methodik der Gewinnung von Trachealaspirat

- Für die Studie werden gesammelt: Alle Trachealaspirate der ersten 24 Lebensstunden (separate Röhrchen) und das letzte Trachealaspirat vor Extubation.
- Zwei Personen
- Länge des Tubus am Absaugkatheter markieren (korrekte Einführtiefe)
- Sekretfalle in den Absaugschlauch einfügen.
- 0,5 ml NaCl 0,9% steril in einer 2 ml-Spritze aufziehen
- Vitalparameter (SaO₂, Herzfrequenz) des Kindes müssen im Zielbereich liegen
- Person 1 dekonnektiert den Respirator und gibt rasch die 0,5 ml NaCl 0,9% in den Tubus
- Person 1 konnektiert den Respirator oder einen Beatmungsbeutel und gibt 2 Atemzüge
- Person 1 dekonnektiert den Respirator oder den Beatmungsbeutel
- Person 2 führt den Absaugkatheter bis zur Markierung in den Tubus und saugt das Sekret ab
- Person 1 konnektiert den Respirator
- Auskultation, Palpation: Falls noch Sekretverhalt vorhanden, Vorgang wiederholen

3. Probenverarbeitung

- Röhrchen mit Patientennamen, Datum, Uhrzeit beschriften
- Röhrchen bei 4°C im Kühlschrank lagern
- Information Labor: Frau Stöhr, Frau Jennemann. Tel. 64247, Email neonatalogie-labor@med.uni-marburg.de
- Täglich um 7:30 prüfen Frau Stöhr und Frau Jennemann, ob neue Proben vorliegen
- Probe wird ins Labor geholt, erfasst, pseudonymisiert (Vergabe eines Nummernschlüssel)
- Mengenbestimmung mittels Wiegen
- Aliquotierung in drei pseudonymisierte Röhrchen für smell print, Entzündungsparameter und Nukleinsäureextraktion (jeweils 1/3)
- Probe für smell prints: Nachricht an Dr. Koczulla oder Kollegen, Labor Pneumologie, Tel. 06421-58-64956 oder Email koczulla@staff.uni-marburg.de, Transfer der Proben nach Vereinbarung.
- Probe für Entzündungsparameter: Verarbeitung im Labor AG Zemlin
- Probe für Nukleinsäureextraktion: Täglich auf Eis, nicht tiefgefroren bis 10:30 zur Fahrbereitschaft bringen, Adresse: Prof. Dr. Domann – betrifft Studie „Trachealaspirat Marburg“, Institut für Medizinische Mikrobiologie Gießen, Frankfurter Str. 107, 35392 Gießen, (bei Rückfragen: Tel: 0641 99-41287).
- Die Proben des ersten Tages werden gepoolt analysiert, da die Sekretproduktion am ersten Tag sehr viel geringer ist als nach längerer Beatmungsdauer.

Patientenübersicht

	Patienten- nummer	Tracheal- aspirat- nummer	Infektscore	Keimnachweis	BPD	Infektscore
			positiv/negativ	positiv/negativ	ja/nein	
			zum Zeitpunkt der Probenentnahme	mit konventioneller und/oder genomischer Nachweismethode	nach NIH- Kriterien	zu mindestens einem Zeitpunkt der Probenentnahme positiv
Gruppe 1	1	1	negativ	positiv	ja	ja
		2	positiv	positiv		
	2	1	negativ	positiv	nein	nein
	3	1	positiv	positiv	ja	ja
	4	1	positiv	positiv	ja	ja
	5	1	negativ	negativ	ja	nein
	6	1	negativ	positiv	ja	nein
	7	1	positiv	positiv	ja	ja
	9	1	negativ	negativ	nein	nein
	10	1	negativ	positiv	nein	nein
	13	1	negativ	negativ	nein	nein
	14	1	negativ	negativ	nein	nein
	16	1	positiv	negativ	nein	ja
	17	1	negativ	negativ	nein	nein
	20	1	negativ	positiv	ja	nein
	21	1	negativ	positiv	ja	nein
	24	1	negativ	negativ	nein	nein
	25	1	negativ	positiv	ja	nein
	26	1	negativ	negativ	ja	ja
		2	negativ	negativ		
3		negativ	negativ			
4		negativ	negativ			
5		negativ	positiv			
6		negativ	positiv			
7		negativ	positiv			
27	1	negativ	negativ	nein	nein	
29	1	negativ	negativ	nein	nein	
	2	negativ	positiv			
32	1	negativ	negativ	ja	nein	
33	1	positiv	positiv	ja	ja	
34	1	positiv	negativ	nein	ja	
Gruppe 2	12	1	negativ	negativ		nein
		2	negativ	positiv		
	18	1	negativ	negativ		ja
		2	positiv	negativ		
	19	1	negativ	negativ		nein
22	1	negativ	positiv	nein		
35	1	negativ	positiv	nein		
Gruppe 3	8	1	negativ	positiv		nein
	15	1	negativ	negativ		nein
	23	1	negativ	negativ		nein
		2	negativ	negativ		
	28	1	negativ	negativ		ja
		2	positiv	negativ		
3		positiv	negativ			
31	1	negativ	positiv	nein		

Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertationsarbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Originalarbeit

Rogosch, T., Herrmann, N., Maier, R.F., Domann, E., Hattesoehl, A., Koczulla, A.R., Zemlin, M., 2014. Detection of bloodstream infections and prediction of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates with an electronic nose. *Journal of Pediatrics* 165 (3), 622–624

Publizierte Abstracts, Poster & Vorträge

Zemlin, M., Herrmann, N., Domann, E., Hattesoehl, A., Koczulla, A.R., Rogosch, T., Maier, R.F., 2014. Can we "smell" developing Bronchopulmonary Dysplasia? Preliminary study using an electronic nose to detect volatile organic substances in tracheal aspirates of preterm neonates. 7th Recent Advances in Neonatal Medicine 2014, Würzburg

Herrmann, N., Rogosch, T., Chakraborty, T., Domann, E., Maier, R.F., Zemlin, M., 2014. Microbiome of the neonatal lung. 5. von-Behring-Röntgen-Symposium 2014, New Concepts in Chronic Disease: Microbes, Metabolism and Inflammation, Marburg

Herrmann, N., Zemlin, M., Chakraborty, T., Rogosch, T., Koczulla, R., Hattesoehl, A., Karaalp, N., Maier, R.F., Domann, E., 2013. Prädiktion der chronischen Lungenerkrankung anhand der Entzündungsmediatoren und der Mikroflora im Trachealaspirat beatmeter Frühgeborener. Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC) Symposium, Begutachtung der LOEWE-Kooperationsprojekte, 13.12.2013, Gießen

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg und Berlin waren die Damen und Herren

Adamkiewicz, Albert, Alter, Arabin, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bien, Brehm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dodel, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Greulich, Grimm, Hadji, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jacob, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kill, Kienapfel, Kinscherf, Kircher, Klose, Köhler, König, Koolman, Kühnert, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Mayer, Meier, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Ramaswamy, Rausch, Renz, Richter, Riera, Röhm, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schütz, Seifert, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sommer, Stahl, Steiniger, Steinkamp, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilhelm, Wollmer, Wulf, Zemlin, Zovko, Zwiorek.

Danksagung

Zuvorderst möchte ich Herrn Prof. Dr. Rolf Felix Maier für die Ermöglichung der Promotion in seiner Klinik meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Michael Zemlin danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung, sowie die fortwährende Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Ich danke auch Herrn Dr. Tobias Rogosch sowie Frau Sabine Jennemann und Frau Regina Stöhr, die durch ihre große Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Ratschläge maßgeblich am Gelingen des Projektes beteiligt waren.

Ebenfalls möchte ich den beteiligten Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Rembert Koczulla und Herrn Dr. Akira Hattesoehl aus der Klinik für Pneumologie in Marburg sowie Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty und Herrn Prof. Dr. Eugen Doman aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die produktive und angenehme Zusammenarbeit danken.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin in Marburg, die mich tatkräftig bei der Probensammlung unterstützt haben, sowie allen Eltern und Patienten für die Bereitschaft zur Teilnahme.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Frau Martina Wiese für die mühevollen Durchsicht dieser Arbeit aussprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der großartigsten Familie der Welt für ihre unermüdliche Motivation und Unterstützung sowie für ihren stetigen Rückhalt in allen Situationen.

Außerdem danke ich von ganzem Herzen meinem Partner, der mich während der gesamten Zeit durch seinen emotionalen und fachlichen Beistand besonders unterstützt und begleitet hat.