

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Stefanie Weber

**Frühdiagnose akuter systemischer Infektionen
und Prädiktion der bronchopulmonalen
Dysplasie bei Frühgeborenen mittels einer
elektronischen Nase (Cyrano)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lena Panning, geb. Feldhaus

aus Schweinfurt

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
09.02.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. R. Maier

1. Korreferent: Herr PD Dr. Dr. T. Bösel

In Liebe meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Frühgeborene	7
1.2 Immunsystem von Frühgeborenen	7
1.2.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	8
1.2.2 <i>Besonderheiten des angeborenen Immunsystems bei Frühgeborenen</i>	9
1.2.3 <i>Das adaptive Immunsystem</i>	10
1.2.4 <i>Besonderheiten des adaptiven Immunsystems bei Frühgeborenen</i>	11
1.3 Akute systemische Infektionen bei Frühgeborenen	13
1.4 Diagnose einer akuten systemischen Infektion bei Frühgeborenen	15
1.5 Bronchopulmonale Dysplasie	20
1.5.1 <i>Einfluss einer Frühgeburt auf die anatomische Reife der Lunge</i>	20
1.5.2 <i>Einfluss einer Frühgeburt auf die biochemische Reife der Lunge</i>	21
1.5.3 <i>Die persistierende Inflammationsreaktion führt zur BPD</i>	22
1.5.4 <i>Die alte und neue Form der BPD</i>	23
1.6 Diagnose einer bronchopulmonalen Dysplasie	23
1.7 Elektronische Nase	24
1.8 Zielsetzung und Fragestellung	26
2. Patienten, Methoden und Material	27
2.1 Patienten	27
2.2 Ethische Aspekte	27
2.3 Erhebung klinischer Daten	27
2.3.1 <i>Erhobene Parameter</i>	28
2.3.2 <i>Gruppeneinteilung</i>	28
2.3.2.1 <i>Gruppeneinteilung hinsichtlich akuter systemischer Infektion</i>	29
2.3.2.2 <i>Gruppeneinteilung hinsichtlich bronchopulmonaler Dysplasie</i>	30
2.4 Materialien	31
2.5 Probengewinnung	32
2.5.1 <i>Gewinnung von Urin</i>	33
2.5.2 <i>Gewinnung von Stuhl</i>	33
2.5.3 <i>Gewinnung von Speichel</i>	33
2.5.4 <i>Gewinnung von Trachealspirat</i>	33
2.6 Die elektronische Nase „Cyrano 320“	34
2.6.1 <i>Durchführung der Messung</i>	35
2.7 Statistische Auswerteverfahren	35

3. Ergebnisse	37
3.1 Patientenkollektiv und Charakterisierung der Proben	37
3.1.1 Anzahl der Proben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion	40
3.1.2 Anzahl der Proben von Frühgeborenen mit und ohne BPD	41
3.2 Auswertung der Smellprints bei akuter systemischer Infektion	42
3.2.1 Speichelproben	42
3.2.2 Trachealaspiratproben	43
3.2.3 Urinproben	45
3.2.4 Stuhlproben	46
3.3 Auswertung der Smellprints bei bronchopulmonaler Dysplasie	48
3.3.1 Speichelproben	48
3.3.2 Trachealaspiratproben	49
3.3.3 Urinproben	51
3.3.4 Stuhlproben	52
4. Diskussion	54
4.1 Diskussion der Methoden	54
4.1.1 Patientenkollektiv	54
4.1.2 Probengewinnung und Verwendbarkeit von Bioproben	54
4.2 Diskussion der Ergebnisse	56
4.2.1 Detektion akuter systemischer Infektionen mittels elektronischer Nase	56
4.2.2 Prädiktion der bronchopulmonalen Dysplasie mittels elektronischer Nase	59
4.3 Stärken und Schwächen der Arbeit	61
4.4 Ausblick	62
5. Zusammenfassung	63
5.1 Zusammenfassung	63
5.2 Abstract	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Anhang	84
7.1 Abkürzungsverzeichnis	84
7.2 Abbildungsverzeichnis	86
7.3 Tabellenverzeichnis	88

7.4 Standard Operating Procedures (SOPs)	90
7.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	96
8. Danksagung	96

1. Einleitung

“Every year, about 15 million babies are born prematurely — more than one in 10 of all babies born around the world. All newborns are vulnerable, but preterm babies are acutely so. Many require special care simply to remain alive. Newborn deaths — those in the first month of life — account for 40 percent of all deaths among children under five years of age.

Prematurity is the world’s single biggest cause of newborn death, and the second leading cause of all child deaths, after pneumonia“ (WHO, 2012)

Dieses Zitat des einstigen Generalsekretärs der Vereinten Nationen Ban Ki-moon ist im Hinblick auf die weiterhin hohe absolute Anzahl an Frühgeburten weltweit aktueller denn je und verdeutlicht die immense Relevanz der Forschung im Fachgebiet der Neonatologie.

Auch in Deutschland werden jährlich rund 60.000 Kinder vor der Vollendung von 37 Schwangerschaftswochen (SSW) geboren und gelten somit als Frühgeborene (IQTIG, 2021).

Frühgeburlichkeit birgt für das Neugeborene diverse Risiken, denn sowohl Organe als auch das Immunsystem sind noch nicht vollständig ausgereift. Besonders im Hinblick auf das noch „unerfahrene“ Immunsystem von Frühgeborenen ist die Früherkennung von akuten Erkrankungen, wie akuten systemischen Infektionen, essenziell für eine erfolgreiche Therapie.

Eine der häufigsten Komplikationen unter Frühgeborenen stellt die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), eine chronische, potenziell reversible Lungenerkrankung, dar. Zur Verhinderung von nicht-reversiblen pulmonalen Schäden ist die möglichst frühzeitige Erkennung von Risikofaktoren für die Entwicklung einer BPD und daraufhin Einleitung einer Therapie unabdingbar.

Viele Forschungsprojekte zielen darauf ab, die Früherkennung von Erkrankungen bei Frühgeborenen mit neuen Methoden zu verbessern. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass volatile organische Substanzen (Volatile Organic Compounds, VOCs) zur Frühdiagnose von schweren Erkrankungen bei Frühgeborenen genutzt werden könnten (Rogosch et al. 2014). Für zahlreiche medizinische Fragestellungen wurde die sogenannte „elektronische Nase“ (Cyranose 320) untersucht, da sie aufgrund sehr einfacher Handhabung bettseitig verwendet werden kann. Bisher wurde der medizinische Nutzen der Cyranose vielversprechend, beispielsweise in der Diagnostik der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bei erwachsenen Patienten, untersucht (Hattesoehl et al., 2011). An verschiedenen Bioproben von Frühgeborenen wurde jedoch noch nicht ausreichend geforscht, obwohl die Cyranose auch in diesem Fachgebiet ein großes Potenzial bieten könnte.

Aus diesem Grund beschäftigt sich die folgende Dissertation mit dem möglichen diagnostischen Nutzen der Cyranose in der Neonatologie. Hierbei soll das Potenzial der Cyranose zur Diagnose schwerer Erkrankungen Frühgeborener, im Speziellen zur Frühdiagnose akuter systemischer Infektionen sowie zur Prädiktion der BPD, untersucht werden.

1.1 Frühgeborene

Ein „Frühgeborenes“ bezeichnet per definitionem ein Kind, das vor der Vollendung von 37 SSW geboren wurde. Dies betrifft weltweit jährlich rund 15 Millionen Kinder, wobei die Frühgeburtlichkeit per se in diesem Kollektiv die zweithäufigste Todesursache darstellt (Perin et al., 2022). Diese Daten schwanken zwischen verschiedenen Ländern immens. So sind insbesondere südasiatische Länder und das subsaharische Afrika von einer hohen Rate an Frühgeburten betroffen (Blencowe et al., 2012). In Deutschland liegt die Frühgebursrate seit 2008 stabil um 8 % (IQTIG, 2021). Der weiterhin hohe Anteil an Frühgeburten in Deutschland lässt sich vor allem auf das steigende Alter der Primiparae, medizinische Interventionen und auch auf die steigende Anzahl von Kinderwunschbehandlungen zurückführen, welche häufig in Mehrlingschwangerschaften resultieren (Friese et al., 2003). Von den in Deutschland geborenen Frühgeborenen hatten in 2020 1,3 % ein Geburtsgewicht von < 1500 g und gelten somit als *very low birth weight (VLBW) infants*. Mit einem Geburtsgewicht von < 1000 g galten 0,3-0,7 % sogar als *extremely low birth weight (ELBW) infants*. Mehr als die Hälfte aller neonatalen Todesfälle entspringen diesen beiden Gruppen, was die enorme Relevanz der Verbesserung der klinischen Versorgung dieser Patientenpopulation unterstreicht (IQTIG, 2021).

1.2 Immunsystem von Frühgeborenen

Die Entwicklung des menschlichen Immunsystems ist hochkomplex und beginnt bereits in der frühen Embryonalperiode. Hämatopoetische Stammzellen differenzieren zunächst in der Leber, ab dem 6. Entwicklungsmonat im Knochenmark, zu Immunzellen. Bereits in der zweiten embryonalen Entwicklungswoche ist es möglich, hämatopoetische Aktivität in der Dottersackwand nachzuweisen (Zilow und Zilow, 1998). Das menschliche Immunsystem setzt sich aus der angeborenen (unspezifischen) und der adaptiven (spezifischen) Immunität zusammen.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Unter dem angeborenen Immunsystem versteht man den phylogenetisch älteren Teil des Immunsystems, dessen Aufgaben die sofortige, unspezifische Abwehr von Erregern sowie die Aktivierung des adaptiven Immunsystems sind. Das angeborene Immunsystem beinhaltet neben physikalischen sowie chemischen Barrieren, wie dem Stratum corneum der Haut, Salzsäure und Enzymen im Magen und der mukoziliären Clearance im Respirationstrakt, auch einen zellulären sowie humoralen (löslichen) Anteil.

Die zellulären Anteile des angeborenen Immunsystems erkennen mit speziellen Rezeptoren, sogenannten Pattern-Recognition-Receptors (PRR) körperfremde Strukturen, welche als Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet werden. Diese PAMPs können beispielsweise bakterielle DNA oder körperfremde Lipopolysaccharide darstellen. Auch Teile zerstörter Körperzellen, die im Rahmen einer Gewebeerletzung entstehen und als Damage-associated molecular patterns (DAMPs) bezeichnet werden, können mittels PRR erkannt werden (Tang et al., 2012).

Als erste Immunzellen des angeborenen Immunsystems gelangen neutrophile Granulozyten zytokingesteuert an den Ort der Infektion. Sie adhären an das Gefäßendothel und induzieren eine Auswanderung von Blut in das entzündete Gewebe. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, Erreger durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen, genannt oxidativer Burst, zu bekämpfen sowie die Erreger zu phagozytieren. Unter Phagozytose versteht man das Aufnehmen von Pathogenen, woraufhin diese innerhalb des Granulozyts durch Peptide sowie Enzyme verdaut werden. Neben den neutrophilen Granulozyten existieren in geringerer Anzahl eosinophile Granulozyten, welche hauptsächlich Parasiten bekämpfen sowie basophile Granulozyten, welche Histamin sowie Zytokine freisetzen (Burg und Phillinger, 2001; Burn et al., 2021).

Nach Invasion der neutrophilen Granulozyten gelangen auch Monozyten über die Blutbahn in das Gewebe und reifen dort zu Makrophagen. Diese werden ebenfalls durch PAMPs, DAMPs und Zytokine aktiviert und sind zu Phagozytose und oxidativem Burst fähig. Innerhalb der Phagozyten wird die Produktion von weiteren proinflammatorischen Zytokinen durch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) angeregt (Barnes, 1997). Des Weiteren präsentieren Makrophagen, unter anderem gemeinsam mit dendritischen Zellen, Antigene und tragen so zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei (Steinman, 2001; Sokol und Luster, 2015).

Zur Erkennung von entarteten und virusinfizierten Zellen tragen insbesondere Natural-Killer-Cells (NK-Zellen) bei (Vivier et al., 2008).

Der humorale Anteil des angeborenen Immunsystems beinhaltet Plasmaproteine, wie das Komplementsystem sowie die Zytokine. Diese Bestandteile des angeborenen Immunsystems gelangen, da sie frei im Plasma zirkulieren, passiv zum Ort einer Infektion und haben neben proteolytischer Aktivität auch die Funktion, Erreger für die Phagozytose durch Immunzellen zu „markieren“ (Opsonierung) sowie weitere Immunzellen anzulocken und diese zu Wachstum, Ausreifung oder Teilung anzuregen (Beutler, 2004).

1.2.2 Besonderheiten des angeborenen Immunsystems bei Frühgeborenen

Die Herausforderungen für das Immunsystem ändern sich mit dem Zeitpunkt der Geburt drastisch. Während der fetalen Entwicklung ist ein hohes Maß an Immuntoleranz wichtig, um mütterliche Alloantigene zu tolerieren und eine gesunde Entwicklung und Wachstum des Fetus zu ermöglichen. Mit der Geburt wird das kindliche Immunsystem daraufhin mit einer großen Anzahl an Erregern und körperfremden Stoffen konfrontiert.

Neutrophile Granulozyten sind bereits ab Ende des ersten Trimesters der Schwangerschaft nachweisbar (Slayton et al., 1998). Nach Geburt ist die absolute Anzahl an Neutrophilen im peripheren Blut in der Regel sowohl bei Früh-, als auch bei Reifgeborenen erhöht (Schmutz et al., 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Pool an Vorläuferzellen für Granulozyten sowie Monozyten insbesondere bei Frühgeborenen deutlich vermindert ist, so dass es bei einem hohen Verbrauch dieser Immunzellen, zum Beispiel im Rahmen einer Infektion, zu einer raschen Erschöpfung des Pools mit daraufhin eintretender Neutropenie kommen kann (Christensen et al., 1984; Christensen et al., 1986). Zudem bestehen in der Funktionalität große Unterschiede zwischen Neutrophilen von Früh- sowie Reifgeborenen. Je unreifer ein Kind geboren wurde, desto eingeschränkter zeigt sich die Funktion der Neutrophilen. Die Adhäsion der Neutrophilen an die Gefäßwand ist bei allen Neonaten eingeschränkt, es konnte jedoch eine direkte Korrelation zwischen dem Gestationsalter und der Fähigkeit zur Adhäsion von Neutrophilen an die Gefäßwand festgestellt werden. Bei Frühgeborenen, die vor Vollendung von 30 SSW geboren wurden, ist diese kaum vorhanden (Nussbaum et al., 2013). Ein Grund für die verminderte Adhäsionsfähigkeit der Neutrophilen bei Feten und Frühgeborenen ist die vorherrschende Verstärkung des immunsupprimierenden, nonkanonischen NF- κ B Signalwegs und gleichzeitige Suppression des proinflammatorischen kanonischen NF- κ B Signalwegs. In fetalen Neutrophilen konnte eine hohe Expression des antiinflammatorischen Enzyms A20 festgestellt werden, welches den kanonischen NF- κ B Signalweg inhibiert (Rohwedder et al., 2023).

Die Phagozyten von Früh- sowie Reifgeborenen, insbesondere neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen, weisen des Weiteren eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose auf (Falconer et al., 1995; Källman et al., 1998; Filias et al., 2011; Tissieres et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass auch die Fähigkeit zum oxidativen Burst als Reaktion auf bakterielle Stimuli in Neutrophilen von Frühgeborenen vermindert ist (Björkqvist et al., 2004). Zudem ist auch die Funktionalität dendritischer Zellen, welche für die Antigenpräsentation zuständig sind, eingeschränkt (Schüller et al., 2013).

1.2.3 Das adaptive Immunsystem

Die spezifische Immunreaktion des Körpers ist eng mit der angeborenen Immunität verwoben und setzt sich äquivalent zu dieser aus einer zellulären, sowie einer humoralen Komponente zusammen. Charakteristisch für diesen Teil des Immunsystems ist die Fähigkeit, sich gezielt gegen ein spezifisches Antigen zu richten und eine ggf. lebenslange Immunität gegen dieses zu bilden.

Als wichtigste Vertreter der zellvermittelten, spezifischen Immunantwort gelten T-Lymphozyten. Sie werden bereits ab der zehnten SSW gebildet (Haynes und Heinly, 1995). Neben diversen weiteren Subpopulationen kann man T-Lymphozyten vereinfacht in T-Helferzellen (Th, durch den CD4-Rezeptor gekennzeichnet), zytotoxische T-Zellen (CTL, durch den CD8-Rezeptor gekennzeichnet) sowie regulatorische T-Zellen (Treg) unterteilen.

Die T-Helferzellen können sich in Abhängigkeit des Zytokin-Milieus in verschiedene Subtypen differenzieren, welchen unterschiedliche Aufgaben zukommen. Th1-Lymphozyten produzieren u.A. IL-2, IFN- γ und TNF- α , welche zur Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen beitragen und für die Abwehr von intrazellulären Erregern immens wichtig sind. Th2-Lymphozyten produzieren u.A. IL-4, IL-5 und IL-13 und regen über diese B-Lymphozyten zur Produktion und Freisetzung von Antikörpern an. Th17-Lymphozyten setzen u.A. die proinflammatorischen IL-17 sowie IL-22 frei und sind insbesondere bei chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Eine Besonderheit unter den T-Helferzellen stellen die regulatorischen T-Zellen dar, welche die Aktivierung der Immunreaktion unterdrücken. Sie spielen daher eine zentrale Rolle in der Limitierung einer Immunantwort sowie in der Selbsttoleranz (Collins et al., 2018).

Die zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, entartete oder mit einem Erreger infizierte Zellen zu erkennen, sowie deren Zelltod einzuleiten. Jede zytotoxische T-Zelle besitzt hierfür einen einzigartigen, durch genetische Rekombination entstandenen T-Zell-Rezeptor, welcher durch MHC-I-Proteine präsentierte Antigene erkennen kann. Diese

MHC-I-Proteine befinden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und dienen der Präsentation von Fragmenten aus dem Zellinneren. Eine gesunde Körperzelle präsentiert also mit Hilfe der MHC-I-Proteine körpereigene, bekannte Fragmente. Kommt es durch eine Infektion oder eine Entartung der Zelle nun zu einer Präsentation von nicht-körpereigenen oder mutierten Zellbestandteilen, können diese durch die T-Zell-Rezeptoren erkannt und gebunden werden und es kommt zu einer Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle. Diese induziert einerseits die Apoptose, also den Zelltod, der gebundenen Zielzelle und sorgt andererseits durch Ausschüttung von Zytokinen für eine vermehrte Expression von MHC-I-Molekülen auf Nachbarzellen, um die Immunantwort dort zu verstärken.

Die Grundlage für die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems bilden B-Lymphozyten. Diese besitzen auf ihrer Membranoberfläche B-Zell-Rezeptoren, welche äquivalent der T-Zell-Rezeptoren durch genetische Rekombination entstanden sind und genau ein spezifisches Antigen binden können. Im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor bindet der B-Zell-Rezeptor jedoch direkt, ohne Präsentation durch MHC-I-Moleküle, an lösliche Proteine. Sobald die Bindung des Antigens und gleichzeitig eine Kostimulation durch eine T-Helferzelle erfolgt, wandert der reife B-Lymphozyt zu Lymphknoten sowie Milz und differenziert zur Plasmazelle, welche spezifische Antikörper für das erkannte Antigen produziert. Zunächst werden Immunglobuline der Klasse IgM gebildet, daraufhin kann es auch zu einem Klassenwechsel der Antikörper, also Produktion von IgG, IgA und IgE sowie zur Bildung von Gedächtnis-B-Zellen kommen. Unter Gedächtnis-B-Zellen versteht man spezialisierte B-Lymphozyten, welche bei erneutem Kontakt mit einem Antigen sofort aktiv werden und Antikörper produzieren und gemeinsam mit Gedächtnis-T-Zellen ein „immunologisches Gedächtnis“ im Organismus bilden. Neben dieser Aktivierung des B-Lymphozyts durch Kostimulation mit einer T-Helferzelle ist auch eine T-Zell unabhängige Aktivierung möglich, welche jedoch weder Klassenwechsel der Antikörper noch die Bildung einer Gedächtnis-B-Zelle ermöglicht.

1.2.4 Besonderheiten des adaptiven Immunsystems bei Frühgeborenen

Das fetale und neonatale Immunsystem weist auch hinsichtlich der adaptiven Immunreaktion diverse Unterschiede zu der eines Erwachsenen auf. Lange Zeit herrschte die Auffassung vor, das Immunsystem von Neonaten sei noch „unreif“ und die T-Lymphozyten noch nicht voll funktionsfähig. Jüngste Forschungsergebnisse weisen nun darauf hin, dass die Lymphozyten von Feten keine unreifen Versionen der adulten Zellen sind, sondern für die an sie gestellten Anforderungen im fetalen Umfeld überaus geeignet sind (Rudd, 2020). In utero kommt der Fetus in der Regel nicht mit Pathogenen,

jedoch regelmäßig mit mütterlichen Alloantigenen in Kontakt. Um eine Abstoßungsreaktion und damit einen Abort zu verhindern ist die Immuntoleranz während der fetalen Entwicklung also von besonderer Bedeutung (Guleria und Sayegh, 2007). Dies führt dazu, dass die Lymphozytenpopulation von Feten insbesondere Zellen beinhaltet, die Entzündungsreaktionen eindämmen und proinflammatorische Reize unterdrücken. Dies spiegelt sich in der Dominanz von regulatorischen T-Helferzellen (Treg) wider, welche die Immunantwort begrenzen und bestehende Entzündungsreaktionen beenden können. Im Nabelschnurblut von Frühgeborenen konnte ein im Vergleich zu Reifgeborenen oder Erwachsenen dreifach erhöhter Anteil regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden (Michaelsson et al., 2006). Zudem ist es existenziell, dass die proinflammatorische Reaktion herabgesetzt ist, was sich insbesondere durch eine herabgesetzte Th1-Reaktion und ein Überwiegen von Th2-Lymphozyten äußert (Levy, O., 2007; Romero et al., 2007; Hendricks und Fink, 2011). Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ sowie Interleukin 12 sind herabgesetzt (Zaghouani et al., 2009). Dies trägt auch zu einer im Vergleich zu adulten Zellen herabgesetzten Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen bei (McCarron und Reen, 2010). Diese Besonderheiten sind während der fetalen Entwicklung überlebensnotwendig, bergen jedoch nach der Geburt aufgrund des plötzlichen Wechsels zu einer mikrobenreichen Umgebung große Herausforderungen für das kindliche Immunsystem. Aus dieser Überlegung heraus entwickelte sich bereits 1992 die Hypothese des „überlappenden Immunsystems“ (layered immune system). Dieses beschreibt die Entwicklung des Immunsystems in utero von einem durch Immuntoleranz, also tolerogene Zellen, dominierten System zu einem auf die Immunabwehr spezialisierten System, das immunogene Zellen hervorbringt (Herzenberg et al., 1992). Während des dritten Trimenons der Schwangerschaft, ca. ab 24 SSW, kommt es zu einer Überlappung dieser beiden Gegensätze. Es ist denkbar, dass sich diese Überlappung bei jedem Individuum unterschiedlich schnell vollzieht, ein Frühgeborenes beispielsweise einen höheren Anteil an noch tolerogenen Zellen hat, ein anderes bereits einen höheren Anteil von immunogenen Zellen (Burt, 2013). Auch bei Reifgeborenen zeigt sich zunächst die Tendenz, weniger proinflammatorische Zytokine zu produzieren, die Th1-Antwort ist noch in den ersten ein bis zwei Lebensjahren des Kindes herabgesetzt und erreicht erst dann das Niveau eines Erwachsenen (MacGillivray und Kollmann, 2014).

Neben den beschriebenen fetalen sowie neonatalen T-Lymphozyten sind auch B-Lymphozyten Teil der zellvermittelten adaptiven Immunität. Die neonatale B-Zell-Population unterscheidet sich deutlich von der eines Erwachsenen. Aufgrund des fehlenden Antigenkontakts sind Gedächtnis-B-Zellen bei Feten und Neugeborenen kaum vorhanden und die vorhandenen B-Lymphozyten vorherrschend naiv (Morbach et

al., 2010; Duchamp et al., 2014). Auch funktionell gibt es Unterschiede zu den adulten B-Lymphozyten, beispielsweise hinsichtlich der eingeschränkten Fähigkeit zur Antigenpräsentation, zum Klassenwechsel während der Antikörperproduktion sowie der noch eingeschränkten Signalübertragung über den B-Zell-Rezeptor (Muthukkumar et al., 2000; Basha et al., 2014; Glaesener et al., 2018).

Zusammenfassend ist die eigenständige Antikörperproduktion bei Feten und Neonaten noch eingeschränkt und die humorale Abwehr ist auf den mütterlichen Austausch zur Bildung eines „Nestschutzes“ angewiesen. Der aktive transplazentare Transport von mütterlichen Antikörpern zum Fetus beginnt bereits nach 12 SSW, findet jedoch größtenteils erst innerhalb des dritten Trimenons statt (Simister, 2003; Alberts et al., 2011). Dies verdeutlicht, warum die humorale Abwehr bei sehr kleinen Frühgeborenen Defizite aufweist. Zudem sind lediglich IgG in der Lage, die Plazentaschranke in signifikanter Menge zu überwinden. Es wird angenommen, dass für diese Transzytose spezielle IgG Fc-Rezeptoren verantwortlich sind, welche insbesondere im dritten Trimenon der Schwangerschaft exprimiert werden (Palmeira et al., 2012). Nach der Geburt induziert der Kontakt zu fremden Antigenen dann die eigene Antikörperproduktion bei Neonaten. Bemerkenswert ist, dass das eingeschränkte Repertoire der Immunglobuline vom IgA-Typ sowohl bei Früh-, als auch bei Reifgeborenen identisch ist und sich im Laufe der Entwicklung dem adulten und spezifischeren IgA-Repertoire annähert (Rogosch et al., 2012).

1.3 Akute systemische Infektionen bei Frühgeborenen

Jedes Jahr sterben weltweit 1,4 Millionen Neugeborene an Infektionserkrankungen (Meem et al., 2011). Unter den sehr kleinen Frühgeborenen in Deutschland stellen die schweren akuten systemischen Infektionen und die aus ihnen resultierenden Organdysfunktionen den Hauptgrund für Morbidität und Mortalität dar (Köstlin-Gille et al., 2021). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das Immunsystem von Frühgeborenen häufig noch nicht in der Lage ist, Krankheitserreger adäquat zu bekämpfen. Zudem ist die Symptomatik einer akuten systemischen Infektion bei Frühgeborenen in der Regel unspezifisch oder tritt erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion auf, so dass die Diagnosestellung und Einleitung einer Therapie häufig verzögert erfolgen. Dies ermöglicht die rasche Progredienz von akuten systemischen Infektionen zu einer Sepsis bei Frühgeborenen (Zemlin, 2015; AWMF, 2021).

Unter einer Sepsis versteht man definitionsgemäß eine potenziell lebensbedrohliche Infektion, bei welcher Erreger in den Blutkreislauf gelangen und eine dysregulierte Immunreaktion zu Organdysfunktionen führt (Baltimore, 2003; Singer et al., 2016). Die

Neugeborenenensepsis wird in der Literatur häufig in eine Früh- und eine Spätform, genannt Early- und Late-Onset Sepsis, eingeteilt.

Die Early-Onset Sepsis bezeichnet die Frühform der neonatalen Sepsis, welche innerhalb der ersten 72 Lebensstunden des Neugeborenen auftritt. Eine später auftretende neonatale Sepsis wird als Late-Onset Sepsis bezeichnet. Allerdings existiert außerhalb des deutschsprachigen Raumes auch eine Differenzierung zwischen Early- und Late-Onset Sepsis, die einen Infektionsbeginn von sieben Tagen postnatal als Grenze definiert. Eine Early-Onset Sepsis entsteht durch eine bereits vor oder eine während der Geburt von der Mutter auf das Kind übertragene Infektion. Daher umfasst das Erregerspektrum dieser Sepsis-Form besonders Erreger der mütterlichen Anogenitalregion. Ein Amnioninfektionssyndrom, also eine Infektion von Fruchthöhle, Eihäuten, Plazenta sowie ggf. des Fetus, kann zudem auch der Auslöser einer Frühgeburt sein. Das klassische Erregerspektrum einer Early-Onset Sepsis bei sehr kleinen Frühgeborenen umfasst mit einem Anteil von 58,2 % aller Erreger besonders gramnegative Bakterien. Diese werden durch E.coli dominiert, welches in 33,4 % aller frühen Sepsis-Fälle nachgewiesen werden kann. Insgesamt 34,3 % aller frühen Sepsen werden durch grampositive Erreger verursacht, in 18,2 % der Infektionen werden hierbei Gruppe-B-Streptokokken nachgewiesen (Hornik et al., 2012; Köstlin-Gille et al., 2021). Besonders bemerkenswert ist, dass die Early-Onset Sepsis mit einer Inzidenz von 1,5 % überdurchschnittlich häufig bei sehr kleinen Frühgeborenen auftritt, wohingegen die Inzidenz für alle Lebendgeborenen an einer Early-Onset Sepsis zu erkranken lediglich bei 0,08 % liegt (Weston et al., 2011; Wynn et al., 2013).

Die späte Form der neonatalen Sepsis, auch Late-Onset Sepsis genannt, ist 10-mal häufiger als die frühe Form und wird definiert als eine Infektion, die mehr als 72 Stunden nach der Geburt des Kindes auftritt (Köstlin-Gille et al., 2021; NICE, 2021). Bei den Late-Onset Sepsen spielen sowohl von der Mutter übertragene, als auch nosokomiale, also während des stationären Aufenthalts erworbene, Infektionen eine Rolle. Besonders Kinder, die invasiver Maßnahmen, wie eines zentralen Venenkatheters, einer parenteralen Ernährung oder einer Intubation bedürfen, sind durch eine Late-Onset Sepsis gefährdet (Bizarro et al., 2005). Insgesamt erkranken 10-30 % aller Frühgeborenen an einer Late-Onset Sepsis (Fleiss et al., 2021; Köstlin-Gille et al., 2021). Im Gegensatz zu den Early-Onset Sepsen sind bei der Late-Onset Sepsis von Frühgeborenen in 60-70 % der Fälle grampositive Erreger, insbesondere koagulasenegative Staphylokokken, die Auslöser der Infektion (Hornik et al., 2012; Testoni et al., 2014; Köstlin-Gille et al., 2021). Nichtsdestoweniger sind aber auch Staphylokokkus aureus und Enterokokken mit 13 % und 9 %, sowie Gruppe-B-Streptokokken mit 7 %, von großer Bedeutung. Gramnegative Erreger der Late-Onset

Sepsen sind seltener und werden mit 7 % durch E.coli dominiert (Muller-Pebody et al., 2011).

Zur erfolgreichen Therapie von akuten systemischen Infektionen und Verhinderung der Ausbildung eines septischen Zustands ist, insbesondere bei Frühgeborenen, die frühe Diagnose von großer Bedeutung.

1.4 Diagnose einer akuten systemischen Infektion bei Frühgeborenen

Um eine akute systemische Infektion bei einem Frühgeborenen zu diagnostizieren existieren aktuell verschiedene invasive und nicht-invasive Methoden. Diese entsprechen den Kriterien und Methoden zur Diagnose einer Sepsis, also einer schweren systemischen Infektion mit einhergehenden Organdysfunktionen, weshalb diese hier näher erläutert werden sollen.

Um nationale Vergleichsdaten zu erhalten, wurden im Januar 2017 die Neo-KISS-Kriterien (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System) des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) etabliert. Diese sind eine Alternative zu den SIRS-Kriterien (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) des CDC (*Center of Disease Control, Atlanta, USA*). Da ein Erreger in der Blutkultur bei höchstens 20 % aller Sepsen nachgewiesen werden kann, muss zwischen einer klassischen Sepsis mit mikrobiologischem Korrelat sowie einer klinischen Sepsis differenziert werden. Die klinische Sepsis beinhaltet keinen Erregernachweis, präsentiert sich jedoch mit klinischen Hinweisen auf eine vorliegende Infektion (NRZ, 2017; DGPI, 2018). In Anlehnung an die Neo-KISS-Kriterien für nosokomiale Infektionen zeigt Abbildung 1 die aktuell gültigen Diagnosekriterien für eine neonatale Sepsis.

Neonatale Sepsis nach Neo-KISS-Kriterien

mindestens zwei klinische Kriterien erfüllt:

- Temperatur > 38,0 °C oder < 36,5 °C, Temperaturinstabilität, zentral-periphere Temperaturdifferenz > 2,0 °C
- Atemstörungen (Apnoen) für > 20 Sekunden, erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation)
- Tachykardie > 200 /min, neu oder vermehrt aufgetretene Bradykardie < 80 /min
- Rekapillarierungszeit > 2 Sekunden oder blasses Hautkolorit
- metabolische Azidose mit BE < -10,0 mmol/l
- neu aufgetretene Hyperglykämie > 140 mg/dl
- laborchemische Zeichen (CRP, Interleukin-6 oder -8 erhöht laut laboreigenen Referenzwerten), I/T-Quotient > 0,2 (unreife neutrophile Granulozyten/ Gesamtzahl neutrophile Granulozyten)
- instabiler Allgemeinzustand, Apathie

plus

-für die Diagnose klinische Sepsis:

alle Kriterien:

- behandelnder Arzt beginnt antimikrobielle Therapie für Sepsis und führt diese für mindestens 5 Tage fort
- keine offensichtliche andere Infektion nachweisbar
- keine Blutkultur entnommen oder kein Erreger/ Antigen nachgewiesen (oder einmaliger Nachweis von Koagulase-negativen Staphylokokken, CoNS)

-für die Diagnose Sepsis mit Erregernachweis (keine CoNS):

- Isolation von Erreger aus Blut oder Liquor, der kein CoNS ist (keine Verwandtschaft zu Erreger einer Infektion an anderer Stelle)

-für die Diagnose mikrobiologisch bestätigte Sepsis mit CoNS:

alleiniger Nachweis von CoNS aus dem Blut

plus einem weiteren Kriterium:

- CRP, Interleukin-6 oder -8 erhöht (laboreigene Referenzwerte)
- I/T-Quotient > 0,2
- Leukozyten < 5 /nl (ohne Erythroblasten)
- Thrombozyten < 100 /nl

Abbildung 1, Neo-KISS-Kriterien einer Sepsis durch nosokomiale Infektion, modifiziert nach (Ussat et al., 2015; NRZ, 2017; AWMF, 2021)

Zunächst kann bereits die geburtshilfliche Anamnese auf eine erhöhte Infektionsgefahr des Kindes oder eine bereits bestehende Infektion hinweisen. Die aktuelle AWMF-Leitlinie zählt zu diesen Hinweisen nicht nur eine unklare Frühgeburt, sondern auch alle Anzeichen eines Amnioninfektionssyndroms der Mutter. Zu diesen Anzeichen zählen beispielweise ein vorzeitiger Blasensprung, vorzeitige Wehen oder Hinweise auf eine bestehende Infektion der Mutter, wie Fieber während der Geburt oder erhöhte laborchemische Infektionsmarker. Das Fehlen dieser Indikatoren gilt aber nicht als Ausschluss für eine intrauterine Infektion des Fetus (Puopolo et al., 2011; AWMF, 2021). Neben diesen anamnestischen Hinweisen auf eine potenzielle Infektion eines Kindes sind, wie in Abbildung 1 ersichtlich, besonders die klinischen Symptome der Frühgeborenen bedeutend. Diese sind jedoch häufig unspezifisch und treten neben bakteriellen Infektionen auch bei anderen Erkrankungen des Frühgeborenen auf. Als klinische Hinweise auf eine Infektion des Frühgeborenen gelten beispielsweise Störungen der Atmung, wie Apnoe oder Dyspnoe. Auch Kreislaufstörungen, welche durch eine verlängerte Rekapillarierungszeit, arterielle Hypotonie oder Tachykardie auffällig werden können, können unspezifisch auf eine Infektion hinweisen. Zudem gelten auch Veränderungen des Hautkolorits wie Blässe oder marmorierte Haut als Hinweise auf eine solche (Ussat et al., 2015; AWMF, 2021). Weitere klinische Warnsignale bezüglich des Vorliegens einer Infektion bilden unter anderem eine Trinkschwäche, Temperaturinstabilität, Berührungsempfindlichkeit, Lethargie, Muskelhypotonie- oder hypertonie, ein geblähtes Abdomen mit Erbrechen oder Magenentleerungsstörung, Obstipation oder Diarrhö, sowie unklare Hyper- oder Hypoglykämien (Roos et al., 2010).

Um das Vorliegen einer Infektion nachzuweisen, ist neben der körperlichen Untersuchung des Frühgeborenen auch die laborchemische Untersuchung von Blutproben von Relevanz. Das Ziel dieser invasiven Methodik ist herauszuarbeiten, welche der unspezifisch klinisch symptomatischen Kinder auch wirklich einer antimikrobiellen Therapie bedürfen (AWMF, 2021). Bei Verdacht auf eine neonatale Infektion sollten ein Differentialblutbild inklusive eines I/T-Quotienten, sowie die Interleukine 6 oder 8 und das CRP bestimmt werden.

Als früher Marker für eine bestehende Infektion gilt der Quotient zwischen unreifen (*immature*) und der Anzahl aller (*total*) Granulozyten im Differentialblutbild. Eine Verschiebung in diesem als I/T-Quotient bezeichnetem Quotienten spiegelt wider, wie viele unreife Zellen aus dem Knochenmark des Patienten ausgeschwemmt werden. Hierbei bezeichnet eine Linksverschiebung eine verstärkte Freisetzung von unreifen Granulozyten aus dem Knochenmark. Das Verhältnis von stabkernigen, also unreifen, und segmentkernigen, reifen Granulozyten variiert stark, da es abhängig von den jeweils

genutzten Kriterien zur morphologischen Differenzierung beider Zellpopulationen ist. In der aktuellen AWMF-Leitlinie zu bakteriellen Infektionen bei Neugeborenen wird ein Grenzwert des I/T-Quotienten von $< 0,25$ angegeben. Liegt der Quotient unterhalb von $0,25$ ist eine Infektion unwahrscheinlich (AWMF, 2021). Mit einer Sensitivität für den Nachweis einer Infektion von $< 20,0 - 90,0 \%$ ist die diagnostische Wertigkeit dieses Laborparameters jedoch eingeschränkt (Schelonka et al., 1995; Segel und Halterman, 2008). Zudem haben neben den Infektionen auch viele nicht-infektiöse Trigger einen Einfluss auf den I/T-Quotienten. So kann beispielweise bereits eine übermäßig lange Geburtseinleitung mit Oxytocin zu einem erhöhten I/T-Quotienten führen (Shah und Padbury, 2014).

Die absolute Leukozytenzahl unterliegt innerhalb der ersten Lebenstage eines Neugeborenen großen Schwankungen. Im Rahmen eines erhöhten Verbrauchs von Immunzellen, beispielsweise durch eine systemische Infektion, kann es insbesondere bei Frühgeborenen zu einer raschen Erschöpfung des Pools an Vorläuferzellen mit darauffolgender Leukopenie kommen. Eine Infektion kann daher weder anhand einer regelrechten, noch anhand einer zu niedrigen Leukozytenzahl ausgeschlossen werden (Forestier et al., 1991; Walka et al., 1998; Zemlin, 2015).

Sowohl das CRP, als auch die Interleukine zählt man zu den Akute-Phase-Proteinen. Unter diesen versteht man Proteine, die im Rahmen einer Gewebsschädigung, wie einer Infektion und Entzündungsreaktion, vermehrt gebildet werden und in die Blutbahn gelangen. Diese sind unspezifisch und können beispielweise auch durch ein Trauma, wie eine Operation oder die Geburt als solche, erhöht sein (Marchini et al., 2000). Nichtsdestoweniger können diese Parameter einen wichtigen Hinweis auf das tatsächliche Bestehen einer Infektion bieten.

Insbesondere in den frühen Phasen einer Infektion eignet sich das CRP nur eingeschränkt als Infektionsmarker, da es etwa zehn bis zwölf Stunden benötigt, um signifikant anzusteigen und bei Frühgeborenen lediglich in geringen Mengen produziert wird (Mathers und Pohlandt, 1987; Hofer et al., 2012; Shah und Padbury, 2014). Somit kann eine Infektion in den ersten Stunden nicht anhand eines negativen CRP ausgeschlossen werden. Dies bedeutet jedoch auch, dass ein bereits initial erhöhtes CRP bei einem Frühgeborenen mit klinischen Infektionszeichen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Infektion hinweist (AWMF, 2021). Das CRP hat insbesondere in der Verlaufsbeurteilung von Infektionen bei Frühgeborenen einen Stellenwert. Auf Grund seiner Halbwertszeit von 24-48 Stunden kann es beispielsweise dafür genutzt werden, den Erfolg einer Antibiotikatherapie zu verfolgen und eine solche zu beenden (Mathers und Pohlandt, 1987; NICE, 2021).

Als Frühmarker einer neonatalen Infektion eignen sich besonders die Zytokine, unter diesen die Interleukine 6 und 8 (IL-6, IL-8). Diese zeichnen sich durch einen frühzeitigen Anstieg nach Infektionsbeginn aus. Häufig zeigt sich ein Anstieg der Interleukine bereits vor der Entwicklung einer klinischen Symptomatik (Shah und Padbury, 2014). Die Serumkonzentration von IL-6 und IL-8 ist bei Neugeborenen mit einer Infektion signifikant erhöht (Berner et al., 1998; Boskabadi et al., 2013; Cortés et al., 2021). Nach 24 - 48 Stunden erreichen sie ihr Maximum und fallen zügig wieder ab. Ihr Potenzial als Marker zur Früherkennung von Infektionen bei Frühgeborenen wird zudem dadurch vergrößert, dass große Anteile der neonatalen T-Zellen IL-8 freisetzen, was im Gegensatz zu der bereits erwähnten verringerten CRP-Produktion bei Frühgeborenen ein großer Vorteil ist (Gibbons et al., 2014). Die Serumkonzentration von IL-8 spiegelt außerdem die Schwere der Infektion wider (Shah und Padbury, 2014).

Die höchste Sensitivität und Spezifität im Rahmen der laborchemischen Diagnose einer akuten systemischen Infektion bei Frühgeborenen bietet momentan eine Kombination aus dem CRP sowie den Interleukinen 6 oder 8 (Franz et al., 1999; Døllner et al., 2001; Franz et al. 2001; Laborada et al., 2003; Franz et al., 2004; Tessema et al., 2020).

Neben den beschriebenen Laborwerten sollten bei einem Verdacht auf eine akute systemische Infektion eine Blut- und gegebenenfalls Liquorkultur angelegt werden, wobei das Ergebnis dieser Untersuchungen häufig erst Tage später vorliegt (Mohrmann et al., 2006). Dennoch wird diese Methodik in der Neonatologie gegenüber Antigennachweisen sowie molekulargenetischen Methoden bevorzugt, da sie den direkten Nachweis eines Erregers samt Antibiogramm und somit eine gezielte Therapie ermöglicht. Nach Empfehlung der NICE-Guideline soll die Beurteilung einer Blutkultur nach 36(-48) Stunden erfolgen, um die antibiotische Therapie in Abhängigkeit von der klinischen Situation des Frühgeborenen frühzeitig beenden zu können (NICE, 2021).

Zusammenfassend existieren variable Methoden zur Diagnose einer akuten systemischen Infektion bei Frühgeborenen. Diese umfassen klinische Kriterien, die häufig unspezifisch sind oder erst im späteren Verlauf der Erkrankung auftreten, sowie Blutentnahmen. Diese Blutentnahmen können jedoch zu einem erheblichen Blutverlust sowie aufgrund ihrer Invasivität zu einer Stressreaktion bei den Neonaten führen (Heß et al., 2010; Valentine und Bateman, 2012). Es ist bekannt, dass besonders wiederholte Stress- und Schmerzsituationen mit einer verzögerten kognitiven und motorischen Entwicklung der Frühgeborenen assoziiert sind (Vinall und Grunau, 2014). Im Hinblick auf eben diese Vulnerabilität von Frühgeborenen ist das Interesse an der Etablierung einer nicht-invasiven Methode zur frühzeitigen Detektion von Infektionen groß.

1.5 Bronchopulmonale Dysplasie

Neben akuten systemischen Infektionen stellen auch chronische Erkrankungen ein großes Risiko für Frühgeborene dar. Zu diesen chronischen Erkrankungen zählt die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), eine chronische pulmonale Erkrankung, welche in Europa 10-25 % aller sehr kleinen Frühgeborenen betrifft (Ehrenkranz et al., 2005; Bancalari und Claure, 2006; Gortner et al., 2011). Da die Entwicklung einer BPD stark mit der Unreife der Frühgeborenen assoziiert ist, betrifft sie hauptsächlich Frühgeborene, welche vor Vollendung von 28 SSW geboren wurden. Das Auftreten einer BPD bei Frühgeborenen, welche nach > 32 SSW geboren wurden, stellt heutzutage eine Rarität dar (Walsh et al, 2004; AWMF, 2009; Gortner et al., 2011).

Die Genese der BPD ist multifaktoriell. Im Zentrum der Pathogenese stehen die durch eine Frühgeburt bedingte anatomische und funktionelle Unreife der Lunge.

1.5.1 Einfluss einer Frühgeburt auf die anatomische Reife der Lunge

Um den Einfluss der anatomischen Reife der Lunge auf die Entwicklung einer BPD nachvollziehen zu können, ist das Verständnis der embryonalen und fetalen Lungenentwicklung unumgänglich. Diese besteht aus fünf Stadien. Das erste Stadium, auch „embryonales Stadium“ genannt, verläuft von 4-7 SSW und beginnt mit der Ausbildung einer Rille im *Sulcus laryngotrachealis*, aus dessen kaudalem Pol sich eine Knospe, die eigentliche Lungenanlage, bildet. Aus dieser Knospe teilen sich die beiden Hauptbronchien und es kommt im anschließenden Verlauf zur weiteren Teilung dieser Hauptbronchien zu Lappen- und Segmentbronchien. Zudem bilden sich in der embryonalen Phase auch die Nerven und Ganglien der Lunge, sowie die glatte Muskulatur. Die daraufhin folgende Phase von 7-17 SSW wird als „pseudoglanduläre Phase“ bezeichnet und dient der Anlegung der weiteren luftleitenden Wege bis hin zu den *Bronchioli terminales*. Zudem kommt es zur Differenzierung von Epithelzellen zu Bronchialmuskulatur, Knorpel, Drüsen und Gefäßen. In der „kanalikulären Phase“, welche mit 17 SSW beginnt, tritt eine Aufzweigung der *Bronchioli terminales* über *Bronchioli respiratorii* zu *Canaliculi* ein. Diese bilden die späteren *Ductus alveolares* und zeigen bereits jetzt vereinzelt primitive *Sacculi*. Durch Vaskularisierung der *Sacculi* entstehen primäre Alveolen. Entscheidend für die Bildung der späteren Blut-Luft-Barriere ist neben der Kapillareinsprossung die Differenzierung der Epithelzellen zu Pneumozyten Typ 1 und Typ 2. Die Typ 1 Pneumozyten bilden hierbei die Auskleidung der Alveolen, wohingegen die Typ 2 Pneumozyten mit der Produktion des Surfactant beginnen. Diese Prozesse bilden die Grundlage für die Überlebensfähigkeit eines Fetus nach Vollendung von 24 SSW. Von 24 bis hin zu 36 SSW findet in der „terminalen“ oder „sakkulären Phase“ die Bildung von *Sacculi alveolares* und einer zunehmenden Anzahl

von Alveolen statt. Außerdem kommt es durch die Pneumozyten Typ 2 zur weiteren Bildung von Surfactant. Dieses Stadium der Lungenentwicklung zeichnet sich demnach durch eine immense Verbesserung der Voraussetzungen für den Gasaustausch aus. Das „Alveolarstadium“, welches bis ins Kindesalter von 8-10 Jahren andauert, zeichnet sich durch eine stetige Neubildung und Differenzierung von Alveolen aus (Schünke et al., 2009; Rivera et al., 2016). Die folgende Abbildung 2 veranschaulicht die beschriebenen Phasen der pulmonalen Entwicklung.

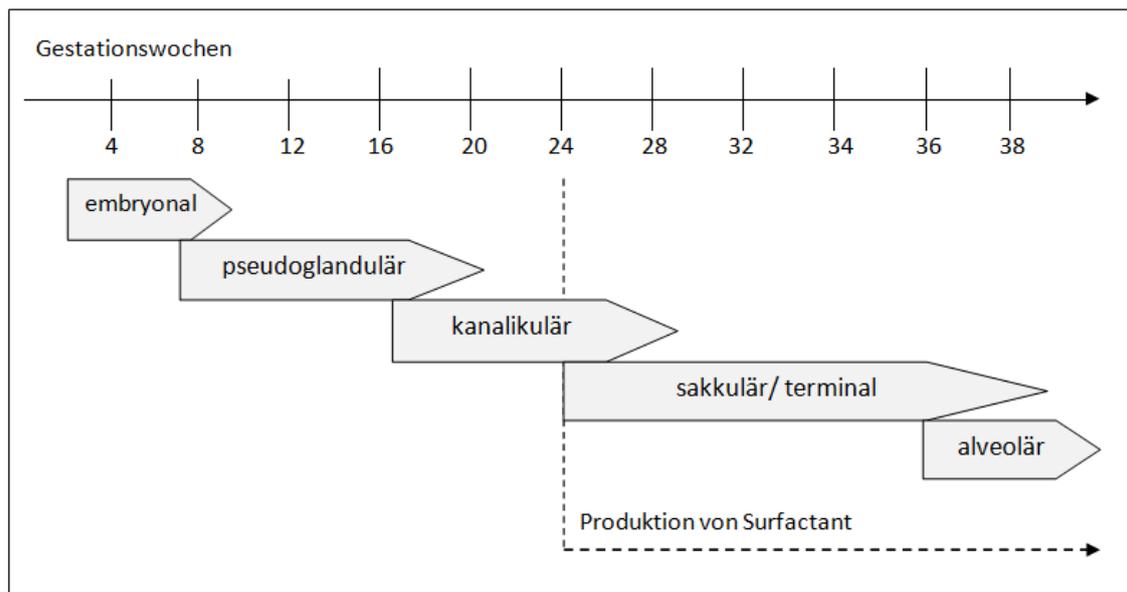


Abbildung 2, Die Phasen der pulmonalen Entwicklung, modifiziert nach (Rivera et al., 2016)

Wird dieser empfindliche Prozess der pulmonalen Reifung bereits in der späten kanalikulären bzw. der darauffolgenden sakkulären Phase durch eine Frühgeburt unterbrochen, kommt es zu einer verzögerten pulmonalen Entwicklung. Diese spielt im Folgenden eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der BPD.

1.5.2 Einfluss einer Frühgeburt auf die biochemische Reife der Lunge

Neben der anatomischen Unreife ist auch die biochemische Unreife der Lunge Frühgeborener wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung einer BPD. Besonders kennzeichnet die Lunge Frühgeborener ein Mangel an Surfactant, einem ab ca. 24 SSW von Pneumozyten Typ 2 zunehmend produzierten Oberflächenagens, welches für die Entfaltung der Sacculi und Alveolen durch Reduktion der Oberflächenspannung immens wichtig ist. Noch bis zu 34 SSW wird Surfactant jedoch in mehr oder weniger unzureichender Menge produziert (Avery und Mead, 1959; Whitsett et al., 2015). Die Einführung der Surfactanttherapie Ende der 1990er Jahre stellte einen Meilenstein in der

Neonatologie dar. Die Inzidenz der BPD sank nach Einführung der Surfactanttherapie zwar nicht wesentlich, dies ist jedoch auch darauf zurückzuführen, dass mit dem Einsatz von Surfactant noch unreifere Kinder überlebten, die per se ein höheres Risiko haben, an einer BPD zu erkranken (Bancalari und del Moral, 2001; Herting, 2013). Neben dem Mangel an Surfactant spielen die noch nicht in ausreichender Menge vorhandenen Faktoren wie Vitamin A zur Epithelregeneration sowie noch unreife intrazelluläre Enzyme zur Sauerstoffdetoxifikation eine Rolle in der Pathogenese der BPD (AWMF, 2009).

1.5.3 Die persistierende Inflammationsreaktion führt zur BPD

Unter der Grundvoraussetzung der anatomisch und funktionell noch unreifen Lunge Frühgeborener können sowohl prä-, intra-, als auch postnatal einwirkende Noxen eine Inflammationsreaktion der Lunge verursachen. Die Reparaturmechanismen der noch unreifen Lunge sind häufig noch nicht ausreichend, um insbesondere repetitiven Verletzungen adäquat begegnen zu können (Thébaud et al., 2019). Bereits eine in utero auftretende Chorioamnionitis kann der Beginn einer persistierenden pulmonalen Entzündung des Frühgeborenen sein (Yoon et al., 1997). Insbesondere postnatal einwirkende Noxen wie Infektionen sowie im Rahmen der benötigten intensivmedizinischen Betreuung auftretende Baro- und Volutraumata sowie die Sauerstofftoxizität im Rahmen einer Beatmung begünstigen dabei eine lokale Imbalance von pro- sowie antiinflammatorischen Einflussfaktoren (Bancalari et al., 2003; Speer, 2009; Lal und Ambalavanan, 2015). In einer Vielzahl von Studien an Frühgeborenen, welche im Verlauf an einer BPD erkrankten, konnten neben einer erhöhten Anzahl an Neutrophilen sowie Makrophagen auch erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, unter ihnen beispielsweise IL-6, IL-8 sowie TNF- α , nachgewiesen werden (Todd et al., 1998; Speer, 2006). Gleichermaßen konnten verringerte Konzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 sowie von für die weitere pulmonale Entwicklung benötigten Wachstumsfaktoren festgestellt werden (Bhatt et al., 2001; Speer, 2006; Popova et al., 2014). Die persistierende Inflammationsreaktion verzögert die weitere Lungenentwicklung durch eine Störung der pulmonalen Kapillarisation und Alveolarisation, einer veränderten Parenchymdifferenzierung und einer Verringerung der Gasaustauschfläche und spielt daher eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der BPD (Groneck et al., 1994; Coalson, 2006; Speer, 2006; Mourani et al., 2015). Auch genetische Faktoren sowie ein persistierender Ductus arteriosus konnten mit der Entwicklung einer BPD in Zusammenhang gebracht werden (Rojas et al., 1995).

1.5.4 Die alte und neue Form der BPD

Da sich das Krankheitsbild der BPD aufgrund der verbesserten medizinischen Versorgung in den letzten Jahrzehnten stark verändert hat, wird heutzutage zwischen der ursprünglich 1967 beschriebenen „alten BPD“ und der heute beobachteten „neuen BPD“ differenziert (Northway et al., 1967; Speer, 2006; Baraldi und Filippone, 2007).

Im Rahmen der sog. alten BPD erkrankten auch aus heutiger Sicht mäßig unreife Frühgeborene. Die damals bei Atemnotsyndrom im Rahmen der maschinellen Beatmung eingesetzten hohen Beatmungsdrücke sowie Sauerstoffkonzentrationen verursachten eine erhebliche Entzündungsreaktion, starke Gewebeschäden mit lokaler Überblähung und resultierten in einem fibrotischen Umbau der Lunge (Northway et al., 1967; Bonikos et al., 1976; Taghizadeh und Reynolds, 1976; AWMF, 2009).

Durch die Etablierung der Lungenreifeinduktion, der Surfactant-Gabe und der neuen Erkenntnisse über verbesserte Beatmungsregimes wurde die Therapie des Atemnotsyndroms und damit die Prävention der „alten BPD“ in den 1980er und 1990er Jahren maßgeblich revolutioniert (Modanlou et al., 1996; Roberts und Dalziel, 2006; Gupta et al., 2009). Die Schädigung durch schwere Beatmungstraumata nahm ab und die „alte BPD“ verlor an Häufigkeit. Gleichmaßen führte der medizinische Fortschritt in der Neonatologie dazu, dass sich durch verbesserte Überlebenschancen von Frühgeborenen ein neues Patientenkollektiv der sehr kleinen Frühgeborenen eröffnete, welches neue Herausforderungen und unter ihnen eine neue Form der BPD barg (Baraldi und Filippone, 2007; Younge et al., 2017). Diese neue Form der BPD zeichnet sich insbesondere durch eine Unterbrechung und Verzögerung der pulmonalen Alveolarisierung und Kapillarisation bis hin zu einem Arrest der Lungenentwicklung in einem sehr frühen Entwicklungsstadium aus (Husain et al., 1998; Jobe, 1999; Speer, 2006; Thébaud, 2019).

1.6 Diagnose einer bronchopulmonalen Dysplasie

Die im Jahr 2000 erarbeiteten NIH-Konsensuskriterien (*National Institute of Health*) sind der aktuelle Standard für die Diagnose einer BPD (Jobe und Bancalari, 2001; Ehrenkranz et al., 2005). Diese nutzen den zusätzlichen Sauerstoffbedarf eines Kindes als Marker für das Vorliegen einer BPD. Wenn ein Frühgeborenes einen zusätzlichen Sauerstoffbedarf von $> 21\%$ ($FiO_2 > 21\%$) über mehr als 28 Tage benötigt, liegt nach diesen Kriterien eine BPD vor.

Die Schweregradeinteilung erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt je nach Gestationsalter des Kindes. Bei Frühgeborenen, die vor Vollendung von 32 SSW geboren wurden, erfolgt die Schweregradeinteilung im Alter von 36 Wochen p.m. oder bei Entlassung, je

nachdem, was zuerst eintritt. Bei Kindern, die nach Vollendung von 32 SSW geboren wurden, erfolgt die Einteilung der Schwere der BPD am 56. Lebenstag oder am Entlassungstag des Kindes aus der stationären Behandlung, ebenfalls je nachdem, welcher Fall zuerst eintritt.

Für beide Patientenpopulationen gilt, dass der Schweregrad der BPD anhand der zu diesem Zeitpunkt benötigten inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) bestimmt wird. Es werden drei Schweregrade, die „milde“, „moderate“ und „schwere“ BPD, unterschieden. Wird zum Zeitpunkt der Schweregradeinteilung kein zusätzlicher Sauerstoff mehr benötigt, spricht man von einer „milden BPD“. Eine „moderate BPD“ zeichnet sich durch eine noch benötigte FiO_2 von 22-29 % aus, während man von einer „schweren BPD“ ab einer benötigten Sauerstofffraktion von > 30 % und/ oder einer künstlichen Atemunterstützung spricht (AWMF, 2009).

Die Diagnose einer BPD anhand der NIH-Kriterien erfolgt demnach retrospektiv und erst spät im Verlauf der Erkrankung. Aktuelle Studien empfehlen daher die individuelle Einschätzung von Risikofaktoren eines jeden Frühgeborenen für die spätere Entwicklung einer BPD. So sollen Frühgeborene identifiziert werden, die einer frühzeitigen Therapie bedürfen, auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch keine Diagnose einer BPD gestellt werden kann (Trembath und Laughon, 2012). Eine valide Möglichkeit zur Prädiktion einer BPD besteht jedoch momentan nicht (Onland et al., 2013). Aus diesem Grund wäre ein diagnostisches Tool zur Prädiktion der BPD von großem medizinischem Interesse.

1.7 Elektronische Nase

Ein potenzielles neues Instrument zur Diagnostik von Erkrankungen stellt die elektronische Nase, auch „Cyranose“ genannt, dar. Diese besitzt die Fähigkeit, mit Hilfe von Biopolymersensoren volatile, flüchtige Substanzen (VOCs, *volatile organic compounds*) in der Gasphase über einer Bioprobe zu detektieren. Anhand dieser erfassten Substanzen ist es möglich, sogenannte „Smellprints“ zu ermitteln, welche einer Art Fingerabdruck der jeweiligen Probe entsprechen (Koczulla et al., 2010).

Die erste Cyranose wurde im Jahr 1982 von Persaud und Odd an der University of Warwick als Nachbau des menschlichen Riechsystems entwickelt. Initial lag das Einsatzgebiet der Cyranose in diversen Industriezweigen, wie der Lebensmittel- oder Automobilindustrie (Hofmann, 2000; Kalman et al., 2002). Als ihr mögliches Potenzial auch im medizinischen Sektor erkannt wurde, wurden diverse Patientengruppen mit Hilfe der Cyranose untersucht. Insbesondere anhand von Ausatemluft und Atemluftkondensat konnte das Potenzial der Cyranose bereits mehrfach bestätigt werden. Mittels

Smellprints der Ausatemluft konnte beispielweise zwischen erwachsenen Patienten mit stabiler und exazerbierter COPD differenziert werden. In diesem Zusammenhang war auch die Unterscheidung zwischen einer akuten Exazerbation mit und ohne bakterielle oder virale Infektion der Luftwege möglich (Shafiek et al., 2015; Van Geffen et al., 2016). Auch konnte zwischen Proben von gesunden Probanden und Patienten mit COPD und Alpha-1-Antitrypsin-Mangel differenziert werden (Koczulla et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Ausatemluft geeignet ist, um verschiedene Entzündungsphänotypen des Asthma (eosinophil, neutrophil oder paucigranulozytär) mittels Cyranose voneinander zu unterscheiden (Plaza et al., 2015).

Grundsätzlich eignen sich für die Untersuchung mittels Cyranose alle Bioproben, die in gasförmiger Form vorliegen oder durch Erwärmung in eine gasförmige Phase übergehen können. Besonders die Untersuchung von Körperausscheidungen, die routinemäßig nicht-invasiv gewonnen werden können, bietet eine große Chance für die Weiterentwicklung dieser medizinischen Diagnostik. Zu diesen potenziellen Bioproben zählen beispielsweise der Urin, der Stuhl, der Speichel und das Trachealspirat, die im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht wurden. Es konnten bereits einige Untersuchungen dieser Bioproben von Erwachsenen und auch pädiatrischen Patienten durchgeführt werden, welche vielversprechende Ergebnisse lieferten und Anlass für weitere Untersuchungen mittels Cyranose gaben. So konnte nachgewiesen werden, dass Harnwegsinfekte bei erwachsenen Patienten anhand des Smellprints des Urins mittels Cyranose detektiert werden können (Kodogiannis und Wadge, 2005). De Meij et al. konnten zudem zeigen, dass anhand der Smellprints von Stuhlproben signifikant zwischen Frühgeborenen die eine nekrotisierende Enterokolitis (NEC) entwickeln und Frühgeborenen ohne NEC unterschieden werden kann (De Meij et al., 2015). Des Weiteren wurde festgestellt, dass mit Hilfe einer Cyranose zwischen Proben von Kindern mit und ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung unterschieden werden kann (De Meij et al., 2014).

Rogosch et al. konnten Hinweise darauf finden, dass es möglich ist, systemische bakterielle Infektionen anhand von Trachealspiratproben Frühgeborener zu detektieren. Auch die Prädiktion der BPD anhand von Smellprints des Trachealspirats wurde im Rahmen dieser Studie untersucht und lieferte vielversprechende Ergebnisse, weitere Bioproben wurden jedoch nicht untersucht (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019).

Insgesamt zeigte sich, dass sowohl Ausatemluft-, als auch Urin-, Stuhl- und Trachealspiratproben grundsätzlich geeignet sind, um als Bioproben für die Messung mittels Cyranose zu fungieren und diverse Krankheitsbilder zu untersuchen. Dies wurde

jedoch noch nicht ausreichend an unterschiedlichen Bioproben von Frühgeborenen untersucht.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Zu den besonders häufig auftretenden Erkrankungen im Rahmen einer Frühgeburt zählen die akuten systemischen Infektionen sowie die BPD (Stoll et al., 2015; Bell et al., 2022). Aktuell existiert kein geeignetes Diagnostikinstrument zur zuverlässigen und nicht-invasiven Diagnose von akuten systemischen Infektionen. Auch fehlt ein Diagnostikinstrument zur Prädiktion der BPD. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher ermittelt werden, ob mittels Cyranose zwischen Bioproben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion differenziert werden kann. Zudem sollte untersucht werden, ob mit Hilfe der Cyranose zwischen Frühgeborenen ohne BPD und Frühgeborenen, welche im Verlauf die Diagnose BPD erhielten, unterschieden werden kann. Ein weiteres Ziel war zu ermitteln, welche Bioproben für diese Fragestellungen verwendet werden können.

Konkrete Fragestellungen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen, sind:

1. Ist es mit Hilfe der Cyranose möglich, zwischen Proben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion zu differenzieren?
2. Ist es mittels Cyranose möglich, zwischen Proben von Frühgeborenen, die im weiteren Verlauf eine BPD entwickeln und Frühgeborenen, die keine BPD entwickeln, zu unterscheiden?
3. Ist eine solche potenzielle Unterscheidung anhand von Urin-, Stuhl-, Speichel- und/oder Trachealaspiratproben gleichermaßen möglich?

2. Patienten, Methoden und Material

2.1 Patienten

Die Auswahl der an dieser Studie teilnehmenden Frühgeborenen erfolgte unter Berücksichtigung von folgenden festen Ein- und Ausschlusskriterien.

In diese Studie wurden Frühgeborene eingeschlossen, die folgende Kriterien erfüllten:

- 1) Geburt vor der Vollendung von 32 SSW und/ oder Geburtsgewicht < 1500 g
- 2) vorliegendes Einverständnis der Sorgeberechtigten

Als Ausschlusskriterium für diese Studie galt:

- 1) primär palliativer Therapieansatz
- 2) kein vorliegendes Einverständnis der Sorgeberechtigten

2.2 Ethische Aspekte

Vor Beginn der Untersuchungen für diese Dissertation lag ein schriftliches Einverständnis der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg vor. Die Sorgeberechtigten der Frühgeborenen wurden vor Einschluss der Kinder in die Studie ausführlich aufgeklärt und ebenfalls um ihre schriftliche Zustimmung gebeten.

Wie aus den anliegenden SOPs (*Standard Operating Procedures*) ersichtlich ist, wurden alle Proben nicht-invasiv oder hinsichtlich Trachealaspirat aus rein klinischer Indikation heraus entnommen (siehe Kapitel 2.5 Probengewinnung). Demnach kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer zusätzlichen Belastung eines der Frühgeborenen durch das Forschungsprojekt.

2.3 Erhebung klinischer Daten

Um die Smellprints mit der klinischen Situation der Kinder korrelieren zu können, wurden angelehnt an die Vorgängerstudie dieser Arbeit folgende Parameter erhoben und dokumentiert (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019).

2.3.1 Erhobene Parameter

Basisdaten:

- Geburtsdatum
- Gestationsalter bei Geburt (in Tagen p.m.)
- Geschlecht
- Geburtsgewicht (in Gramm)
- Zeitpunkt der Erstintubation (Datum, Uhrzeit)
- Reintubationen (Anzahl, Datum, Uhrzeit)
- Dauer der invasiven Beatmung (in Tagen)
- Dauer der nicht-invasiven Beatmung (in Tagen)
- Dauer zusätzlicher O₂-Zufuhr (in Tagen)
- Vorhandensein einer BPD nach NIH-Kriterien
- Schweregrad der BPD nach NIH-Kriterien

Bei Probenentnahme erfasste Daten:

- Differentialblutbild
- Laborchemische Entzündungsparameter CRP (in mg/l), IL-8 (in ng/l)
- Körpertemperatur, rektal gemessen (in Grad Celsius)
- Körpergewicht (in Gramm)
- Atmung (keine Atemhilfe, nicht-invasive Beatmung, invasive Beatmung)
- Inspiratorische Sauerstofffraktion (in Prozent)
- Antibiotische Therapie

2.3.2 Gruppeneinteilung

Die Patienten und ihre Proben wurden anhand der mit ihnen korrelierten klinischen Daten in Gruppen eingeteilt. Hierbei betrachtete Krankheitsbilder, nach denen die Proben der Frühgeborenen eingeteilt wurden, waren die akute systemische Infektion und die im Verlauf diagnostizierte BPD.

2.3.2.1 Gruppeneinteilung hinsichtlich akuter systemischer Infektion

Die in Kapitel 1.4 beschriebenen Neo-KISS-Kriterien zur Diagnose einer Infektion sind für den klinischen Alltag sehr wichtig, um zu identifizieren, welche Kinder eine antibiotische Therapie benötigen. Aus der aktuellen AWMF-Leitlinie zum Thema „Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen“ geht jedoch hervor, dass die Sensitivität der klinischen Anzeichen einer Infektion bei Frühgeborenen gering ist (AWMF, 2021). Im Rahmen der hier vorliegenden Forschungsarbeit stand die mit einer Infektion verbundene Entzündungsreaktion im Vordergrund, weshalb sich für einen laborchemischen Nachweis einer Entzündungsreaktion entschieden wurde. Nach den laboreigenen Referenzwerten wurden ein CRP > 10 mg/l und/ oder ein IL-8 > 63 ng/l als sicheres Zeichen einer akuten systemischen Infektion des Frühgeborenen zum Zeitpunkt der Probenentnahme gedeutet. Es wurden die Blutwerte des der Probenentnahme am nächsten liegenden Tages zugrunde gelegt. Um eine Beeinflussung der gemessenen Smellprints durch eventuell zum Zeitpunkt der Probengewinnung eingenommene Antibiotika zu berücksichtigen, wurde zwischen vier verschiedenen Gruppen von Kindern differenziert (siehe Tabelle 1). Die Gruppe inf⁺ abx⁻ umfasst Proben, welche noch vor Beginn der antibiotischen Therapie gesammelt wurden, jedoch schon eine Infektion des Frühgeborenen bestand. Des Weiteren wurden Proben während einer Antibiotikatherapie gewonnen, da der klinische Verdacht auf eine Infektion bestand, dieser bestätigte sich jedoch retrospektiv nicht (Gruppe inf⁻ abx⁺).

Tabelle 1 Gruppeneinteilung der Frühgeborenen im Hinblick auf das Vorliegen einer akuten systemischen Infektion sowie einer antibiotischen Therapie

Gruppe	Akute systemische Infektion	Antibiotika-therapie
inf ⁻ abx ⁺	nein	ja
inf ⁺ abx ⁺	ja	ja
inf ⁻ abx ⁻	nein	nein
inf ⁺ abx ⁻	ja	nein

2.3.2.2 Gruppeneinteilung hinsichtlich bronchopulmonaler Dysplasie

Die Diagnose einer BPD erfolgte anhand der NIH-Konsensuskriterien. Es wurde zunächst eine Einteilung der Proben je nach Vorliegen einer BPD (BPD) oder keiner BPD (no BPD) bei dem jeweiligen Frühgeborenen vorgenommen. Zudem wurde der Zeitpunkt der Probenentnahme berücksichtigt und die Proben in solche aus dem frühen, mittleren und späten Krankheitsverlauf unterteilt. Für die Untersuchung einer möglichen Prädiktion der BPD wurden Proben aus den ersten 14 Lebenstagen der Frühgeborenen verwendet und als früh im Krankheitsverlauf entnommene Proben gewertet (BPD 1, no BPD 1). Anhand der NIH-Kriterien ist die Diagnose einer BPD erst nach 28 Lebenstagen möglich, weshalb hier die Grenze zwischen den mittleren und späten Proben gezogen wurde. Alle Proben, die zwischen dem 15. und 27. Lebenstag des Frühgeborenen gewonnen wurden, werden im Folgenden als Proben im mittleren Krankheitsverlauf gewertet (BPD 2, no BPD 2). Als spät im Krankheitsverlauf gewonnene Proben wurden somit Proben bezeichnet, die ab dem 28. Lebenstag des Frühgeborenen gewonnen wurden (BPD 3, no BPD 3). Insgesamt wurde also zwischen sechs verschiedenen Gruppen differenziert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Gruppeneinteilung der Frühgeborenen im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD und den Zeitpunkt der Probenentnahme

Gruppe	Zeitpunkt der Probenentnahme (in Tagen nach Geburt)	BPD im Verlauf
no BPD 1	1-14	nein
no BPD 2	15-27	nein
no BPD 3	≥ 28	nein
BPD 1	1-14	ja
BPD 2	15-27	ja
BPD 3	≥ 28	ja

2.4 Materialien

Zur Gewinnung der Bioproben sowie Untersuchung mittels Cyranose wurden die in der folgenden Tabelle 3 genannten Materialien, Geräte und Software verwendet.

Tabelle 3 Liste der verwendeten Materialien, Geräte und Software

Materialien, Geräte und Software	Hersteller
Trachea-Sekretprobenset	B. Braun, Melsungen, D
Absaugkatheter	B. Braun, Melsungen, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen Tip One, diverse Größen	StarLab, Ahrensburg, D
Pipetten, diverse Größen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cyranose 320-C	Smiths Detection Group Ltd., Watford, UK
PC Nose 6.9	Cyrano Sciences Inc. Smiths Detection, Watford, UK
GnuPlot Version 5.0	Dice Holdings Inc., NYC, USA
AccuBlock TM digital drybath	Labnet Int., Woodbridge, USA
Druckluft DIN 12021	Linde, Pullach, D
Probenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, D
NaCl	B. Braun, Melsungen, D
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Waage	Ohaus Corporation, Parsippany, USA
Stuhlröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Urinröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Stieltupfer	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH u. Co., D
selbstklebende Urinbeutel	B. Braun, Melsungen, D

2.5 Probengewinnung

Wie in Tabelle 4 dargestellt wurden nach einem festen Zeitplan montags Speichelproben, sowie donnerstags Urin- und Stuhlproben gesammelt. War an diesem Wochentag keine Probengewinnung möglich, erfolgte ein erneuter Versuch an den folgenden drei Tagen. Bei klinischer Indikation zum endotrachealen Absaugen, bei Erstintubation sowie kurz vor der Extubation eines Frühgeborenen wurde Trachealaspirat gewonnen.

Tabelle 4 Zeitplan zur Probengewinnung je nach Bioprobe

Bioprobe	Zeitpunkt der Probengewinnung
Urin	jeden Donnerstag sechs Wochen postnatal oder bis zum Tag der Entlassung
Stuhl	jeden Donnerstag sechs Wochen postnatal oder bis zum Tag der Entlassung
Speichel	jeden Montag sechs Wochen postnatal oder bis zum Tag der Entlassung
Trachealaspirat	bei klinischer Indikation zum endotrachealen Absaugen

Die Probengewinnung erfolgte auf der Neugeborenen-Intensivstation und auf der neonatologischen Station 042 des Universitätsklinikums Marburg. Die Entnahme des Trachealaspirats erfolgte nach dem bereits publizierten standardisierten Vorgehen (SOPs siehe Anhang) (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019). Für Speichel, Urin und Stuhl wurden standardisierte Methoden zur Probengewinnung im Rahmen dieser Studie neu etabliert (SOPs siehe Anhang).

Vor dem Beginn der Probesammelphase erhielt das Pflegepersonal eine Schulung zur korrekten Probenentnahme. Zudem wurden die SOPs ausgehändigt, um sicherzustellen, dass die Proben immer mit gleicher Methodik gewonnen werden würden.

Nach der Entnahme wurden die Proben mit Patientennamen, Datum und Uhrzeit der Probengewinnung beschriftet und im stationseigenen Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Daraufhin erfolgte eine tägliche Überführung der Proben in das Labor der AG Neonatologie und pädiatrische Immunologie, wo die weitere Verarbeitung erfolgte.

2.5.1 Gewinnung von Urin

Aus einem selbstklebenden Urinbeutel wurden 2 ml Urin entnommen und in ein Probenröhrchen gegeben, welches bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert wurde. Daraufhin wurden jeweils 0,5 ml Urin in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert (SOP siehe Anhang).

2.5.2 Gewinnung von Stuhl

Wenn möglich, wurden donnerstags Stuhlproben gewonnen. Wenn dies nicht gelang, wurde eine Probe im Verlauf der folgenden drei Tagen gesammelt. Die Stuhlproben wurden mit Hilfe eines Spatels direkt aus der Windel des Frühgeborenen entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden jeweils 0,2 g Stuhl in Reaktionsgefäße gegeben. Zur Herstellung einer flüssigen Phase wurden 0,1 ml NaCl 0,9 % Lösung hinzugegeben. Dieses Probengemisch wurde für 3 Sekunden in einer Minizentrifuge zentrifugiert, für 5 Sekunden mittels Vortexer vermischt und daraufhin bei -20 °C gelagert (SOP siehe Anhang).

2.5.3 Gewinnung von Speichel

War der Allgemeinzustand eines Frühgeborenen schlecht oder erfolgte aktuell eine invasive Beatmung, so konnten zu diesem Zeitpunkt keine Speichelproben gewonnen werden. Die Speichelproben der Frühgeborenen wurden vor der Nahrungsaufnahme entnommen, um eine Kontaminierung der Proben mit Milch bestmöglich zu vermeiden. Hierfür wurde ein Stieltupfer für 10 Minuten in eine Wangentasche des Kindes eingeführt. Danach wurde dieser Tupfer in ein 15 ml Probenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Zum Extrahieren des Speichels aus dem Stieltupfer wurde dieser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit abgetrenntem Boden eingebracht, welches wiederum in ein 15 ml Probenröhrchen überführt wurde. Dieses wurde dann bei 23 °C und 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der extrahierte Speichel wurde daraufhin in einem Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert (SOP siehe Anhang).

2.5.4 Gewinnung von Trachealspirat

Das Trachealspirat wurde zum Zeitpunkt der Intubation, kurz vor der Extubation sowie bei jedem weiteren Absaugen des Tubus aufgrund klinischer Hinweise auf einen

Sekretverhalt gewonnen. In Zeiten mit Spontanatmung konnte daher kein Trachealaspirat gesammelt werden.

Zunächst wurde die Länge des Tubus zur Sicherstellung der korrekten Einführtiefe am Absaugkatheter markiert, sowie eine Sekretfalle in den Absaugschlauch eingefügt. Daraufhin wurden 0,5 ml NaCl 0,9 % steril in einer 2 ml Spritze aufgezogen und nach Dekonnectieren des Beatmungsschlauches vom Tubus in den Tubus gegeben. Mittels Rekonnectierung des Beatmungsschlauches oder eines Beatmungsbeutels wurden zwei Atemzüge gegeben. Es folgte ein erneutes Dekonnectieren des Beatmungsschlauches oder Beatmungsbeutels. Der Absaugkatheter wurde bis zur Markierung in den Tubus eingeführt. Unverzüglich erfolgte das Absaugen des Sekrets. Nach Rekonnectieren des Beatmungsschlauches erfolgte die Sicherstellung einer adäquaten Beatmung mittels Auskultation und Palpation. Im Falle eines weiterhin bestehenden Sekretverhalts wurde der beschriebene Vorgang wiederholt. Die so gewonnenen Trachealaspiratproben wurden zunächst bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml Trachealaspirat in Reaktionsgefäße gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert (SOP siehe Anhang).

2.6 Die elektronische Nase „Cyrano 320“

Die elektronische Nase „Cyrano 320“ beinhaltet ein Messsystem, welches über 32 chemische Sensoren, sogenannte „Biopolymersensoren“ oder „Chemoresistoren“, verfügt. Diese sind in der Lage, flüchtige volatile Substanzen in der Gasphase über einer Probe wahrzunehmen. Die 32 Sensoren bestehen aus unterschiedlichen Polymeren und verfügen deshalb über individuelle chemische Eigenschaften, was zu unterschiedlichen Reaktionen bei Kontakt mit chemischen Substanzen führt. Beim Kontakt eines Polymers mit einem Analyten fungiert die Polymeroberfläche ähnlich wie ein Schwamm. In Abhängigkeit von den chemischen Eigenschaften des Polymers wird die vorbeiströmende Substanz unterschiedlich stark aufgenommen. Das System der Cyrano basiert auf einer durch die Aufnahme des Analyten messbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes der Sensoren vor und nach der Exposition mit dem volatilen Detergenz. Die maximale positive oder negative Änderung des Widerstandes, die als „Delta Rmax“ bezeichnet wird, wird von jedem der 32 Sensoren an das System übermittelt. Das individuelle Muster dieser Messwerte ist die Grundlage für die Erstellung eines „Smellprints“ aus einer Probe.

2.6.1 Durchführung der Messung

Die untersuchten Proben beinhalteten jeweils ein Biosample, demnach bestand eine Probe entweder aus 0,2 g Stuhl mit 0,1 ml NaCl-Lösung, aus 0,5 ml Urin, aus 0,5 ml Trachealaspirat oder je nach vorhandener Speichelmenge aus bis zu 0,5 ml Speichel. Sie wurden vor Beginn der eigentlichen Messung in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Heizblockes auf 37 °C, ähnlich der menschlichen Körpertemperatur, erwärmt. Zeitgleich erfolgte ein zweimaliger „Identify Run“ der Cyranose zur Anpassung an die Umgebungsluft im Labor. Hierbei wurde ein konstantes Gasvolumen aus der Umgebungsluft, jedoch ohne Probe, angesaugt. Nach Abschluss dieser Vorbereitungen wurden die Proben nacheinander in ihren Reaktionsgefäßen mit 0,5 cm Abstand für je eine Minute unter der Cyranose positioniert, durch welche in dieser Zeit ein konstantes Gasvolumen angesaugt wurde. Die Smellprints für die jeweiligen Proben wurden durch das Programm PC Nose 6.9 (Cyranose Sciences Inc. Smiths Detection, Watford, UK) aufgezeichnet und gespeichert. Durch das Ansaugen von Druckluft ohne Biosample wurde die Cyranose zwischen zwei Messungen für jeweils 60 Sekunden gereinigt.

2.7 Statistische Auswerteverfahren

Zur statistischen Auswertung der mittels Cyranose gemessenen Proben wurde das Statistikprogramm R 3.0.2 (Prozess und Statistik, Dormagen, Deutschland) genutzt. Es erfolgte äquivalent der Vorgängerstudie eine lineare Diskriminanzanalyse (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019). Dies beschreibt eine Methode der Statistik, die der Untersuchung von Gruppenunterschieden dient. Zwei oder mehr Gruppen können hierbei hinsichtlich der Unterschiedlichkeit ihrer jeweiligen Merkmale untersucht werden. Je kleiner die Streuung der Merkmale innerhalb einer Gruppe und je größer die Streuung der Merkmale zwischen den verschiedenen Gruppen, desto genauer kann daraufhin eine Klassifizierung neuer Werte in die jeweilige Gruppe erfolgen (Backhaus et al., 2018). Mittels linearer Diskriminanzanalyse wurden die Mahalanobisdistanz (MHD), sowie der Kreuzvalidierungswert (CVV) ermittelt. Die in dieser Arbeit verwendete MHD ist ein Distanzmaß und gibt wieder, wie groß die Verwandtschaft zwischen zwei miteinander verglichenen Gruppen ist. Als signifikant wurde in dieser Auswertung eine MHD von $> 1,96$ angenommen. Der CVV wurde mittels k-facher Kreuzvalidierung errechnet, wobei k für das Produkt der Gruppengröße steht. Als signifikant wurde ein CVV von $> 70\%$ angesehen, was bedeutet, dass eine Zuordnung zu der korrekten Gruppe in mehr als 70 % gelingt. Gleichzeitig bedeutet dies, dass die Treffsicherheit für eine korrekte Zurdnung der Proben bei einem CVV von annähernd 50 % der Ratewahrscheinlichkeit entspräche. Dieser Wert ist abhängig von der Anzahl der verglichenen Proben (Koczulla et al., 2011; Rogosch et al., 2014).

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms GnuPlot Version 5.0 (Dice Holdings Inc., NYC, USA). Aufgrund technischer Limitationen konnten die Punktwolken, die im 32-dimensionalen Raum berechnet wurden, nur auf eine zweidimensionale Darstellung projiziert werden und nicht - wie in ähnlichen Analysen häufig praktiziert - auf eine dreidimensionale Darstellung. Der Blickwinkel der zweidimensionalen Grafiken konnte nicht verändert werden, so dass sich auch deutlich auseinander liegende Punktwolken in der zweidimensionalen Darstellung überlagern konnten, wenn sie in der Blickachse nicht abwichen. Beim Vergleich zweier Grafiken muss auch beachtet werden, dass die Skalierungen der Abbildungen den jeweiligen Extremen einer Gruppe entsprechen. Die Untersuchungsergebnisse sollten daher stets unter Berücksichtigung der rechnerisch ermittelten Werte (Mahalanobisdistanz und Kreuzvalidierungswert) erfolgen. Aufgrund der dargelegten Limitationen wurden im Folgenden nicht alle statistischen Ergebnisse durch Abbildungen dargestellt, sondern je Bioprobe die Abbildung mit der größten Aussagekraft ausgewählt.

Konkret wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit eine lineare Diskriminanzanalyse von Proben, welche in einem Zeitraum einer akuten systemischen Infektion gewonnen wurden (inf+) mit Proben, welche in einem Zeitraum ohne akute systemische Infektion gewonnen wurden (inf-), durchgeführt. Um eine Beeinflussung der ermittelten Ergebnisse durch eventuell zum Zeitpunkt der Probengewinnung bereits injizierte Antibiotika zu vermeiden, erfolgte die Diskriminanzanalyse von allen Proben (inf+ vs. inf-) und separat eine Analyse von den Proben, die ohne zeitgleiche antibiotische Therapie gewonnen wurden (inf+abx- vs. inf-abx-).

Um festzustellen, ob sich die Smellprints von Frühgeborenen generell im Verlauf der Entwicklung, unabhängig von der Entwicklung einer BPD, verändern, wurden zunächst die früh und spät im Verlauf gewonnenen Proben von Frühgeborenen ohne BPD statistisch miteinander verglichen (no BPD 1 und no BPD 3). Zudem wurden die frühen und späten Proben von Kindern, die im Verlauf eine BPD entwickelten, miteinander verglichen (BPD 1 und BPD 3). Besonders interessant in Bezug auf das klinische Potenzial der Cyanose ist der Vergleich der frühen Proben von Kindern ohne spätere BPD mit Kindern, die im Verlauf eine BPD entwickelten (no BPD 1 und BPD 1). Dies zeigt, ob anhand von Smellprints aus den ersten 14 Lebenstagen eines Frühgeborenen zwischen Proben von Kindern mit und ohne sich im Verlauf entwickelnder BPD differenziert werden kann. Zudem erfolgte ein Vergleich der späten Proben von Kindern mit und ohne diagnostizierter BPD (no BPD 3 und BPD 3).

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Charakterisierung der Proben

Insgesamt 21 Frühgeborene konnten von November 2014 bis Juli 2015 in diese Studie aufgenommen werden. Die Auswahl der teilnehmenden Patienten erfolgte konsekutiv, es wurden demnach alle Frühgeborenen eingeschlossen, die innerhalb dieses Zeitraums die Einschlusskriterien erfüllten. Die Frühgeborenen wurden von der Geburt an bis zum Tag der Entlassung aus der Klinik, jedoch maximal für sechs Wochen postnatal, beobachtet. Wie in Tabelle 5 zusammengefasst entwickelten vier der Frühgeborenen im Verlauf eine akute systemische Infektion, bei drei Kindern wurde eine BPD diagnostiziert.

Tabelle 5: Charakterisierung der Frühgeborenen

Kind	Gestationsalter (SSW) bei Geburt	Geburtsgewicht (g)	Beginn Infektion (Lebenstag)	BPD (ja/nein)
1	30+4	1775	keine	nein
2	30+4	1900	keine	nein
3	30+3	1245	keine	nein
4	26+4	720	keine	nein
5	33+1	1400	keine	nein
6	31+0	1240	keine	nein
7	27+3	895	4	nein
8	30+5	1470	keine	nein
9	33+5	1490	keine	nein
10	31+0	1880	keine	nein
11	32+6	1480	keine	nein
12	25+1	665	1	ja
13	30+5	960	18	nein
14	26+5	860	keine	ja
15	31+0	1445	keine	nein
16	31+0	1365	keine	nein
17	30+6	860	keine	nein
18	32+4	1320	keine	nein
19	30+0	1465	keine	nein
20	32+4	1490	keine	nein
21	27+6	865	2	ja

Von diesen 21 Frühgeborenen, darunter 18 sehr kleine Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1500 g, konnten insgesamt 393 Proben gewonnen und untersucht werden. Die Anzahl und Art der Bioproben pro Kind sind in Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6: Zahl und Art der Bioproben pro Kind

Kind (ID)	Urin (n)	Stuhl (n)	Speichel (n)	Tracheal- aspirat (n)	insgesamt (n)
1	6	8	7	0	21
2	8	9	7	0	24
3	5	6	6	0	17
4	9	10	7	2	28
5	6	7	6	0	19
6	6	7	7	0	20
7	10	8	5	0	23
8	6	5	6	0	17
9	5	5	4	0	14
10	1	2	2	1	6
11	6	6	4	0	16
12	8	4	4	9	25
13	8	5	5	0	18
14	6	6	9	2	23
15	7	7	4	0	18
16	8	5	4	0	17
17	6	6	2	0	14
18	6	7	4	0	17
19	7	6	5	0	18
20	6	7	5	0	18
21	8	3	3	6	20

3.1.1 Anzahl der Proben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion

Wie die folgende Tabelle 7 zeigt, konnten insgesamt 44 Proben der Diagnose einer akuten systemischen Infektion zugewiesen werden. Von diesen wurden 31 Proben bei gleichzeitiger antibiotischer Therapie des Frühgeborenen, 13 Proben vor Beginn der antibiotischen Therapie gesammelt. Insgesamt wurden 349 Proben von Kindern, welche nicht durch eine akute systemische Infektion betroffen waren, gewonnen. Von diesen wurden 25 Proben während einer Antibiotikatherapie gewonnen, da der klinische Verdacht auf eine Infektion bestand, dieser bestätigte sich jedoch retrospektiv nicht. 324 Proben wurden in einem Intervall ohne bestehende Infektion und ohne antibiotische Therapie gesammelt.

Tabelle 7 Anzahl der Proben nach Gruppeneinteilung in Proben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion und gleichzeitig vorliegender sowie nicht vorliegender antibiotischer Behandlung

Bioprobe	Anzahl (n)	inf ⁺ (n)	inf (n)	inf abx ⁺ (n)	inf ⁺ abx ⁺ (n)	inf abx ⁻ (n)	inf ⁺ abx ⁻ (n)
Urin	138	16	122	8	12	114	4
Stuhl	129	7	122	8	5	114	2
Speichel	106	7	99	7	4	92	3
Tracheal-aspirat	20	14	6	2	10	4	4
insgesamt	393	44	349	25	31	324	13

inf⁺ = Proben, die zum Zeitpunkt einer akuten systemischen Infektion gewonnen wurden; inf = Proben, die in einem infektionsfreien Intervall abgenommen wurden; abx⁺ = gleichzeitige antibiotische Therapie; abx⁻ = keine gleichzeitige antibiotische Therapie

3.1.2 Anzahl der Proben von Frühgeborenen mit und ohne BPD

Alle Proben eines Kindes, das im Verlauf des stationären Aufenthalts nach NIH-Kriterien die Diagnose BPD erhalten hatte, wurden retrospektiv als BPD positiv eingestuft. Insgesamt konnte die Diagnose BPD bei drei der in dieser Studie eingeschlossenen Frühgeborenen gestellt werden. Von diesen drei Frühgeborenen wurden 68 Proben gewonnen (BPD), 325 Proben stammen von Frühgeborenen ohne BPD (no BPD). Zudem erfolgte eine weitere Einteilung der Proben nach dem jeweiligen Zeitpunkt der Probengewinnung. Es wurden 131 Proben früh im Verlauf (1.-14. Lebenstag, Gruppen BPD 1 und no BPD 1) gewonnen, 105 im mittleren Verlauf (15.-27. Lebenstag, Gruppen BPD 2 und no BPD 2) und 157 spät im Verlauf (ab dem 28. Lebenstag, Gruppen BPD 3 und no BPD 3). Die Verteilung der Proben auf die verschiedenen Bioproben zeigt die folgende Tabelle 8.

Tabelle 8 Anzahl der Proben nach Gruppeneinteilung in Proben von Frühgeborenen mit und ohne bronchopulmonale Dysplasie, sowie dem Zeitpunkt der Probenentnahme

Bioprobe	Anzahl	BPD (n)	no BPD (n)	no BPD 1 (n)	no BPD 2 (n)	no BPD 3 (n)	BPD 1 (n)	BPD 2 (n)	BPD 3 (n)
Urin	138	22	116	35	34	47	7	5	10
Stuhl	129	13	116	40	34	42	3	3	7
Speichel	106	16	90	31	23	36	5	2	9
Tracheal- aspirat	20	17	3	3	-	-	7	4	6
insgesamt	393	68	325	109	91	125	22	14	32

*BPD = Proben Frühgeborener mit BPD; no BPD = Proben Frühgeborener ohne BPD;
BPD 1 und no BPD 1 = früh im Verlauf gewonnen; BPD 2 und no BPD 2 = im mittleren
Verlauf gewonnen; BPD 3 und no BPD 3 = im späten Verlauf gewonnen*

3.2 Auswertung der Smellprints bei akuter systemischer Infektion

3.2.1 Speichelproben

Anhand der Smellprints von Speichelproben konnte nicht signifikant zwischen Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion unterschieden werden (Abbildung 3; Tabelle 9). Auch nach Differenzierung zwischen Proben von Frühgeborenen mit akuter systemischer Infektion, welche bereits antibiotisch behandelt wurden und solchen, deren Probe noch vor Beginn der antibiotischen Therapie gewonnen wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Um den Einfluss der antibiotischen Therapie auf die Smellprints zu untersuchen, wurden daraufhin lediglich die Proben mit und ohne gleichzeitige antibiotische Therapie von Kindern, die retrospektiv keine akute systemische Infektion hatten, analysiert. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 9 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Speichelproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose

Bioprobe	inf abx ⁺ vs. inf abx ⁻		inf abx ⁻ vs. inf ⁺ abx ⁻		inf ⁺ vs. inf	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Speichel	0,782	48,76 %	1,695	48,37 %	1,071	49,06 %

inf abx⁺ = keine akute systemische Infektion und antibiotische Therapie; inf abx⁻ = keine akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie, inf⁺ abx⁻ = akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie; inf⁺ = akute systemische Infektion; inf = keine akute systemische Infektion

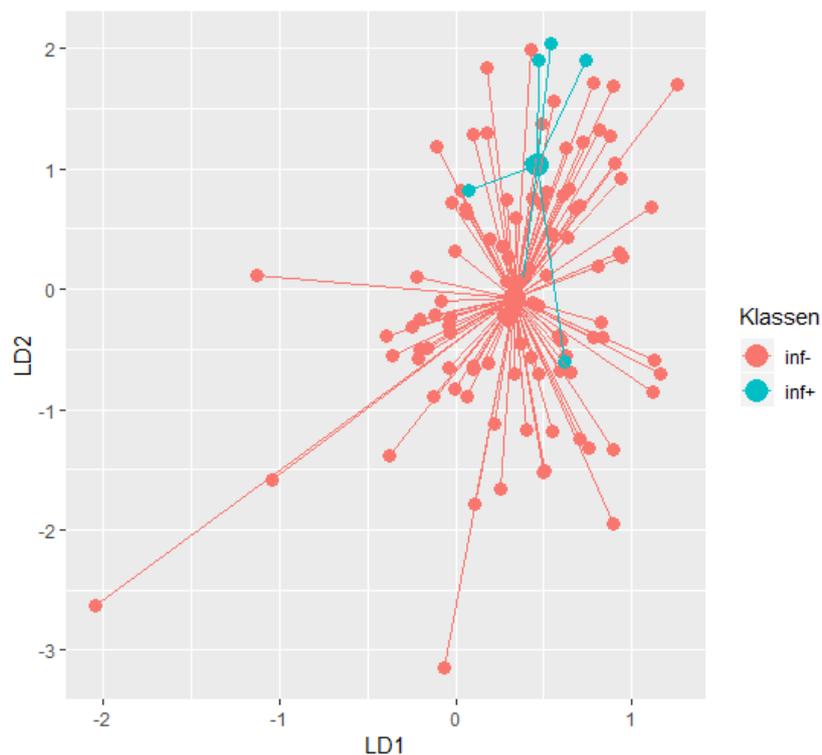


Abbildung 3 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit (inf^+) und ohne (inf^-) akuter systemischer Infektion, unabhängig von einer antibiotischen Therapie; äquivalent des statistischen Ergebnisses sind die Punktwolken in dieser Darstellung nicht voneinander differenzierbar (MHD: 1,071, CVV: 49,06 %)

3.2.2 Trachealspiratproben

Anhand von Smellprints des Trachealspirats konnte zwischen Proben von Frühgeborenen mit und solchen ohne akuter systemischer Infektion unterschieden werden. Dies traf jedoch nur auf Proben zu, welche in einem Zeitfenster ohne antibiotische Therapie gewonnen wurden (Abbildung 4; Tabelle 10). Unter Einbeziehung der Proben, welche bei bereits eingeleiteter antibiotischer Therapie gewonnen wurden, konnte kein signifikanter Unterschied mehr ermittelt werden. Smellprints der Proben von Kindern ohne Infektion mit und ohne Antibiotika-Therapie unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

Tabelle 10 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Trachealaspiratproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose

Bioprobe	inf abx ⁺ vs. inf abx ⁻		inf abx ⁻ vs. inf ⁺ abx ⁻		inf ⁺ vs. inf	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Trachealaspirat	1,251	43,75 %	2,055	31,25 %	1,736	52,98 %

inf abx⁺ = keine akute systemische Infektion und antibiotische Therapie; inf abx⁻ = keine akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie, inf⁺ abx⁻ = akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie; inf⁺ = akute systemische Infektion; inf = keine akute systemische Infektion

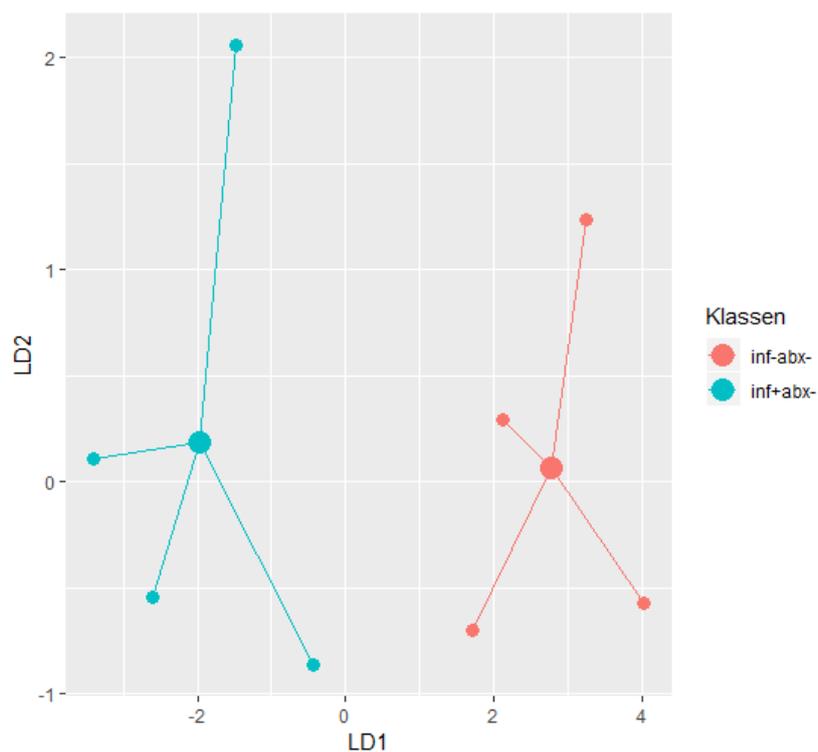


Abbildung 4 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Trachealaspiratproben Frühgeborener ohne (inf) und mit (inf⁺) akuter systemischer Infektion, noch vor Einleitung einer antibiotischen Therapie (abx⁻); aus diesem Blickwinkel können die Gruppen anhand der Abbildung äquivalent des statistischen Ergebnisses voneinander differenziert werden (**MHD: 2,055**, CVV:

31,25 %)

3.2.3 Urinproben

Wie in Tabelle 11 dargestellt konnten Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit einer akuten systemischen Infektion signifikant von den Smellprints der Frühgeborenen ohne akuter systemischer Infektion unterschieden werden, wenn noch keine antibiotische Therapie eingeleitet wurde.

Bei bereits eingeleiteter antibiotischer Therapie konnte nicht mehr signifikant zwischen den Proben von Kindern mit und ohne akuter systemischer Infektion differenziert werden (Abbildung 5).

Auch zwischen Urinproben von Kindern ohne akuter systemischer Infektion mit und ohne antibiotischer Therapie konnte nicht signifikant unterschieden werden.

Tabelle 11 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Urinproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose

Bioprobe	inf abx ⁺ vs. inf abx ⁻		inf abx ⁻ vs. inf ⁺ abx ⁻		inf ⁺ vs. inf	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Urin	1,618	54,06 %	2,795	47,37 %	1,262	47,44 %

inf abx⁺ = keine akute systemische Infektion und antibiotische Therapie; inf abx⁻ = keine akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie, inf⁺ abx⁻ = akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie; inf⁺ = akute systemische Infektion; inf = keine akute systemische Infektion

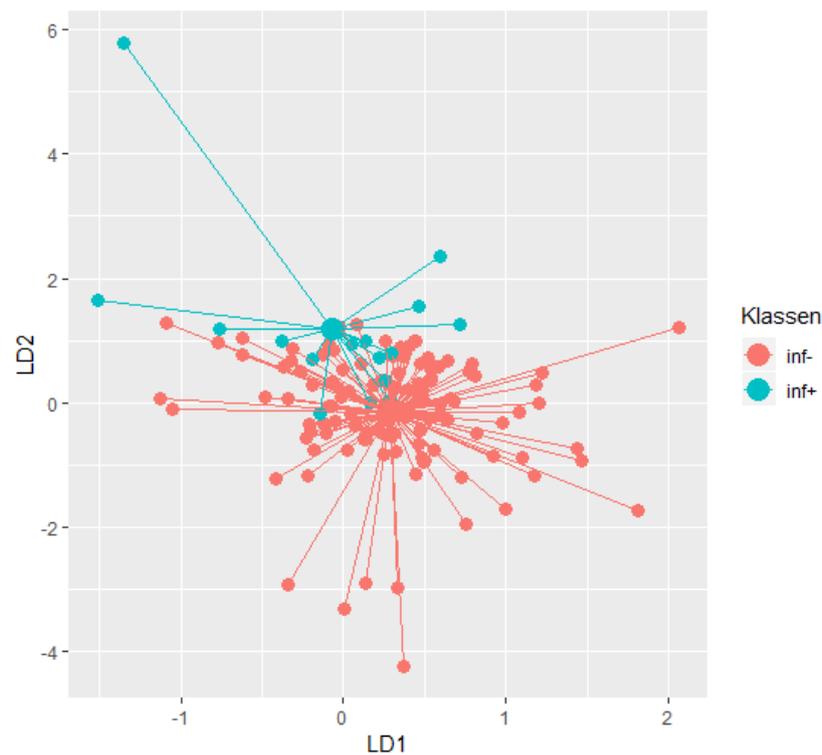


Abbildung 5 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit (inf^+) und ohne (inf^-) akuter systemischer Infektion, unabhängig von einer antibiotischen Therapie; anhand der Abbildung ist äquivalent der statistischen Ergebnisse keine Differenzierung zwischen den Gruppen möglich (MHD: 1,262, CVV: 47,44 %)

3.2.4 Stuhlproben

Mittels linearer Diskriminanzanalyse konnte signifikant zwischen Stuhlproben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion differenziert werden. Dies war sowohl bei Proben, welche vor Beginn der antibiotischen Therapie, als auch während einer antibiotischen Therapie gewonnen wurden, möglich.

Wie in Tabelle 12 ersichtlich konnte auch signifikant zwischen Stuhlproben von Kindern ohne akuter systemischer Infektion mit und ohne antibiotischer Therapie unterschieden werden (Abbildung 6).

Tabelle 12 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Stuhlproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose

Bioprobe	inf abx ⁺ vs. inf abx ⁻		inf abx ⁻ vs. inf ⁺ abx ⁻		inf ⁺ vs. inf	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Stuhl	2,51	53,29 %	5,202	50,0 %	2,276	47,89 %

inf abx⁺ = keine akute systemische Infektion und antibiotische Therapie; inf abx⁻ = keine akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie, inf⁺ abx⁻ = akute systemische Infektion und keine antibiotische Therapie; inf⁺ = akute systemische Infektion; inf = keine akute systemische Infektion

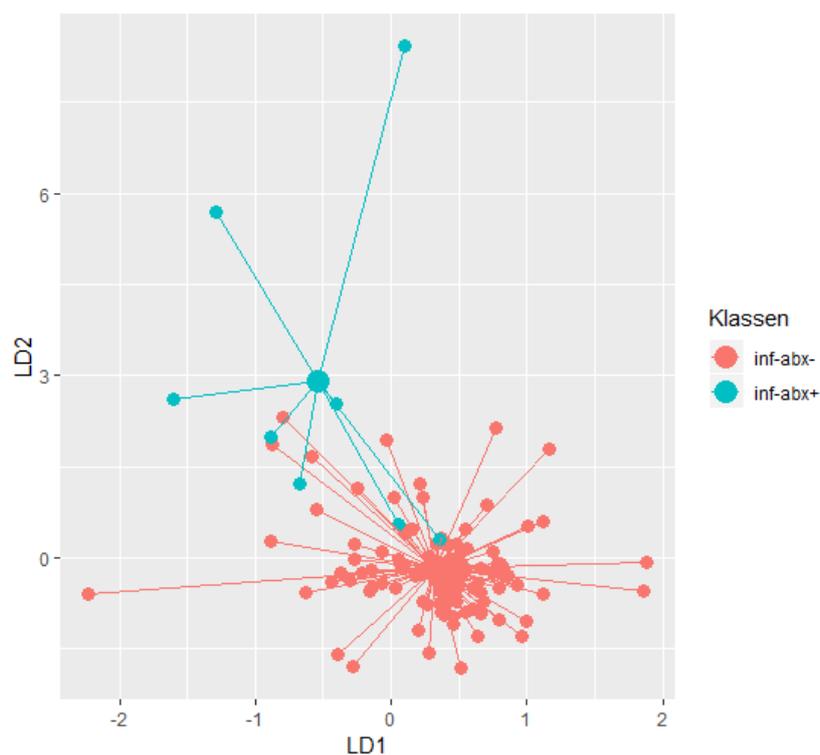


Abbildung 6 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener ohne akuter systemischer Infektion (inf) und mit (abx⁺) bzw. ohne (abx⁻) antibiotischer Therapie; aus dem hier gezeigten zweidimensionalen Blickwinkel ist eine Differenzierung zwischen den Gruppen anhand der Abbildung nur bedingt möglich (**MHD: 2,51**, CVV: 53,29 %)

3.3 Auswertung der Smellprints bei bronchopulmonaler Dysplasie

3.3.1 Speichelproben

Anhand der Smellprints von Speichelproben konnte nicht zwischen Proben von Frühgeborenen mit und ohne BPD differenziert werden (Abbildung 7; Tabelle 13). Dies war unabhängig davon, ob die Proben im frühen oder späten Verlauf der Erkrankung gewonnen wurden. Ebenfalls konnte anhand der Speichelproben nicht zwischen frühen und späten Proben der Frühgeborenen ohne BPD unterschieden werden.

Tabelle 13 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung

Bioprobe	BPD vs. no BPD		no BPD 1 vs. no BPD 3		BPD 1 vs. BPD 3		BPD 1 vs. no BPD 1		BPD 3 vs. no BPD 3	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Speichel	1,185	48,12 %	0,786	43,59 %	1,219	57,78 %	1,467	49,35 %	1,375	76,54 %

no BPD 1 = keine BPD, früh im Verlauf gewonnen; no BPD 3 = keine BPD, spät im Verlauf gewonnen; BPD 1 = BPD, früh im Verlauf gewonnen; BPD 3 = BPD, spät im Verlauf gewonnen

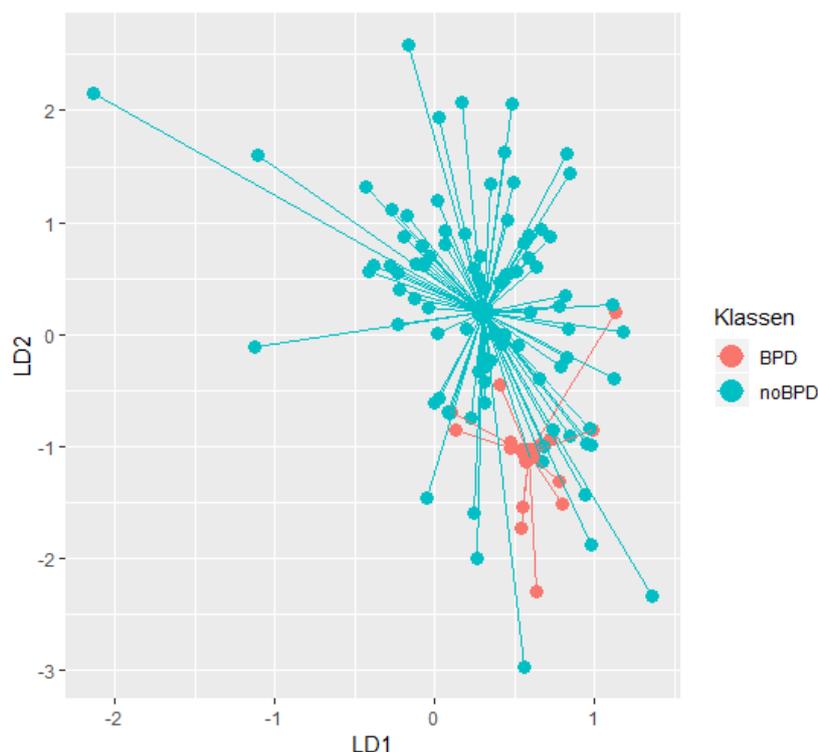


Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit (BPD) und ohne (no BPD) BPD; eine Differenzierung zwischen den Gruppen ist äquivalent der statistischen Ergebnisse auch anhand der Abbildung nicht möglich (MHD: 1,185, CVV: 48,12 %)

3.3.2 Trachealspiratproben

Trachealspirat wird durch das Absaugen aus einem Endotrachealtubus gewonnen. Keines der in dieser Studie eingeschlossenen Frühgeborenen ohne BPD wurde nach dem 28. Lebenstag mittels Endotrachealtubus beatmet. Daher gibt es in diesem Patientenkollektiv keine Proben und somit keine Gruppe „no BPD 3“.

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, konnte anhand von früh im Verlauf gewonnenen Trachealspiratproben signifikant zwischen Kindern mit und ohne BPD unterschieden werden (Abbildung 8).

Der statistische Vergleich aller Proben Frühgeborener mit und ohne BPD unabhängig vom Entnahmezeitraum sowie von früh und spät im Verlauf gewonnenen Trachealspiratproben der Frühgeborenen mit BPD zeigte keine Signifikanz.

Tabelle 14 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Tracheal-aspiratproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung

Bioprobe	BPD vs. no BPD		no BPD 1 vs. no BPD 3		BPD 1 vs. BPD 3		BPD 1 vs. no BPD 1		BPD 3 vs. no BPD 3	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Tracheal-aspirat	1,678	63,73 %	keine Gruppe no BPD 3		1,737	58,33 %	2,067	59,52 %	keine Gruppe no BPD 3	

no BPD 1 = keine BPD, früh im Verlauf gewonnen; no BPD 3 = keine BPD, spät im Verlauf gewonnen; BPD 1 = BPD, früh im Verlauf gewonnen; BPD 3 = BPD, spät im Verlauf gewonnen

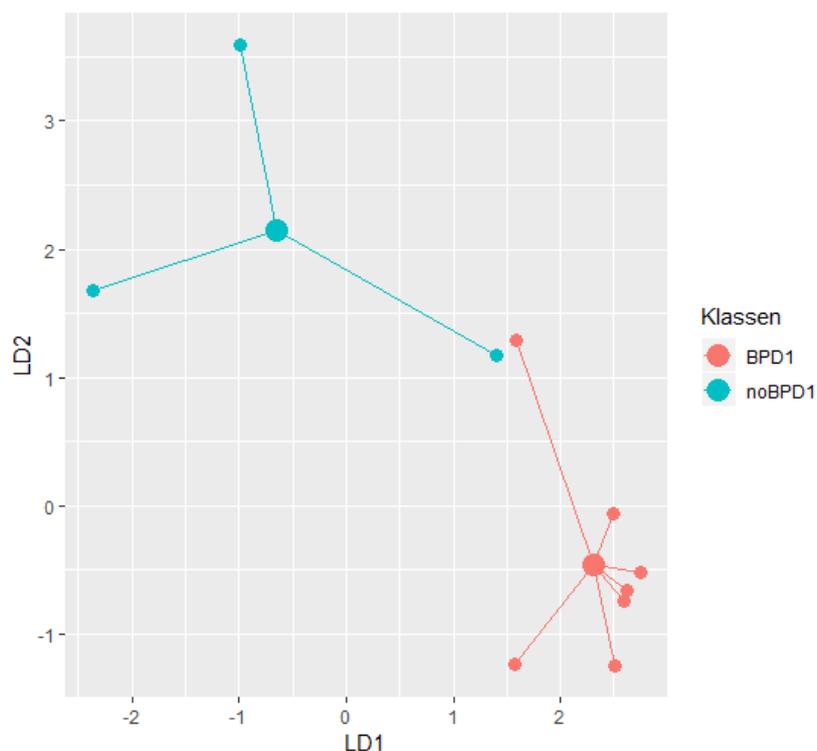


Abbildung 8 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von früh im Verlauf gewonnenen Tracheal-aspiratproben Frühgeborener mit (BPD 1) bzw. ohne (no BPD 1) sich entwickelnder BPD; der in der Abbildung dargestellte Abstand zwischen den Punktwolken ist kongruent zu dem ermittelten statistischen Ergebnis (MHD: 2,067, CVV: 59,52 %)

3.3.3 Urinproben

Die lineare Diskriminanzanalyse von innerhalb der ersten 14 Lebenstage gewonnenen Urinproben Frühgeborener mit und ohne BPD erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 9; Tabelle 15). Die Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit und ohne BPD unabhängig vom Entnahmezeitpunkt sowie im späten Verlauf zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 15 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung

Bioprobe	BPD vs. no BPD		no BPD 1 vs. no BPD 3		BPD 1 vs. BPD 3		BPD 1 vs. no BPD 1		BPD 3 vs. no BPD 3	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Urin	1,231	51,65 %	1,019	63,56 %	1,94	58,57 %	2,074	59,18 %	1,533	45,96 %

no BPD 1 = keine BPD, früh im Verlauf gewonnen; no BPD 3 = keine BPD, spät im Verlauf gewonnen; BPD 1 = BPD, früh im Verlauf gewonnen; BPD 3 = BPD, spät im Verlauf gewonnen

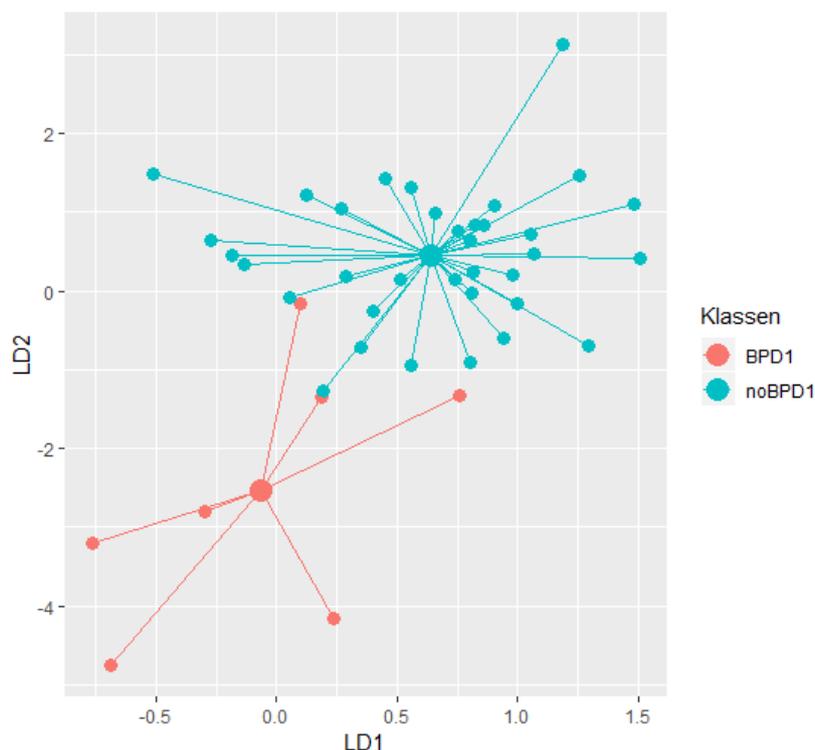


Abbildung 9 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von früh im Verlauf gewonnenen Urinproben Frühgeborener mit (BPD 1) bzw. ohne (no BPD 1) sich entwickelnder BPD; aus dem hier gezeigten zweidimensionalen Blickwinkel ist eine Differenzierung der Gruppen nur bedingt möglich (MHD: 2,074, CVV: 59,18 %)

3.3.4 Stuhlproben

Anhand der Smellprints von im frühen Verlauf gewonnenen Stuhlproben konnte signifikant zwischen Frühgeborenen mit und ohne sich entwickelnder BPD differenziert werden (Tabelle 16). Des Weiteren unterschieden sich früh und spät im Verlauf gewonnene Stuhlproben von Frühgeborenen mit einer BPD signifikant. Bei Proben von Frühgeborenen ohne BPD ließen sich Proben aus dem frühen und späten Verlauf nicht signifikant voneinander differenzieren.

Zwischen den Stuhlproben von Frühgeborenen mit und ohne BPD unabhängig vom Zeitpunkt der Probengewinnung wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abbildung 10). Auch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Smellprints von spät im Verlauf gewonnenen Stuhlproben von Frühgeborenen mit und ohne BPD zeigen.

Tabelle 16 Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung

Bioprobe	BPD vs. no BPD		no BPD 1 vs. no BPD 3		BPD 1 vs. BPD 3		BPD 1 vs. no BPD 1		BPD 3 vs. no BPD 3	
	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV	MHD	CVV
Stuhl	1,647	62,5 %	0,992	64,14	2,382	76,19 %	2,366	49,17 %	1,756	80,95

no BPD 1 = keine BPD, früh im Verlauf gewonnen; no BPD 3 = keine BPD, spät im Verlauf gewonnen; BPD 1 = BPD, früh im Verlauf gewonnen; BPD 3 = BPD, spät im Verlauf gewonnen

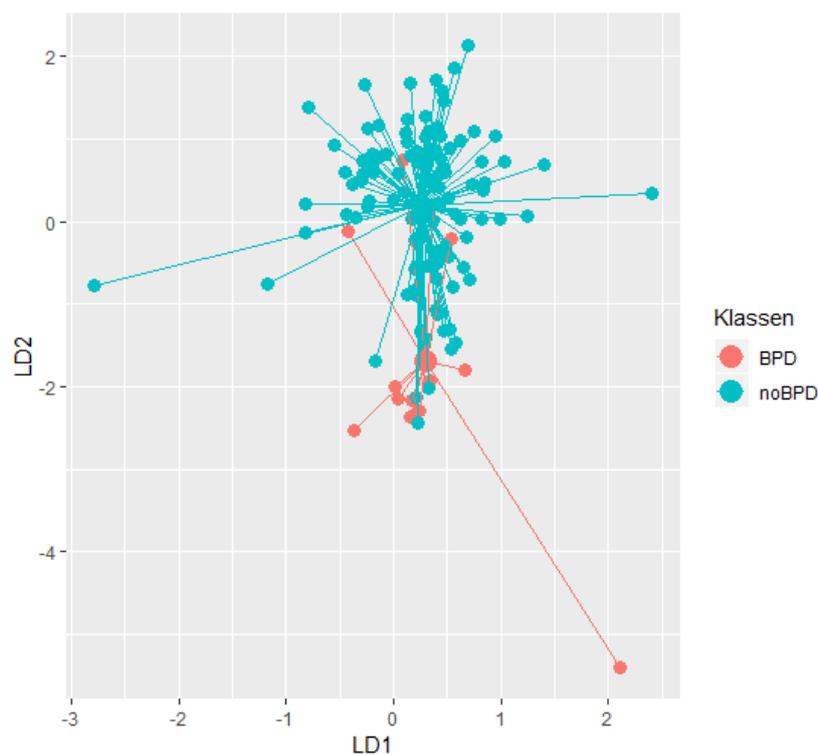


Abbildung 10 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener mit (BPD) und ohne (no BPD) BPD; Anhand der Abbildung ist eine Differenzierung zwischen den Punktwolken äquivalent zu dem ermittelten statistischen Ergebnis nicht möglich (MHD: 1,647, CVV: 62,5 %)

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Studie wurde der potenzielle Nutzen der Cyranose zur Detektion akuter systemischer Infektionen und Prädiktion der BPD bei Frühgeborenen anhand verschiedener Bioproben untersucht. Hierbei wurden die Smellprints des Urins, des Stuhls, des Speichels und des Trachealaspirats von Frühgeborenen analysiert, da diese Proben im klinischen Alltag ohne zusätzliche invasive Maßnahmen und folglich ohne zusätzliche Belastung der Frühgeborenen zur Verfügung stehen. Die ermittelten Ergebnisse und die daraus resultierende Perspektive für die Nutzung der Cyranose sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 21 Frühgeborene über einen Zeitraum von sechs Wochen nach Geburt oder bis zu ihrer stationären Entlassung untersucht. Der kürzeste beobachtete Zeitraum lag für ein Frühgeborenes bei drei Wochen, der längste für neun Frühgeborene bei sechs Wochen. Im Mittel wurden die Frühgeborenen für fünf Wochen beobachtet. Als Einschlusskriterien für diese Studie galten ein Geburtsgewicht von < 1500 g und/ oder eine Geburt vor Vollendung von 32 SSW. Von den 21 in dieser Studie eingeschlossenen Frühgeborenen hatten 18 ein Geburtsgewicht von < 1500 g und galten somit per definitionem als sehr kleine Frühgeborene (VLBW). Die übrigen drei Patienten hatten bei Geburt ein Gewicht von > 1500 g, wurden jedoch vor Vollendung von 32 SSW geboren. Der Zusammenhang zwischen einem niedrigen Gestationsalter sowie Geburtsgewicht und der Entwicklung einer BPD ist bereits bekannt (Stoll et al, 2010; Jensen und Schmidt, 2014). In mehreren Studien beschrieben Stoll et al., dass auch das Risiko für eine Infektion bei Neugeborenen mit sinkendem Geburtsgewicht und Gestationsalter steigt (Stoll et al., 2002; Stoll et al., 2010).

4.1.2 Probengewinnung und Verwendbarkeit von Bioproben

Insgesamt 393 Proben konnten im Rahmen der hier vorliegenden Studie gewonnen werden. Durch ein standardisiertes Vorgehen (siehe Kapitel 2.5 Probengewinnung) erfolgte dies nach immer gleichem Procedere. Die Möglichkeit einer Probengewinnung und die damit einhergehenden Entnahmezeitpunkte variierten jedoch von Kind zu Kind. Falls möglich, wurde von jedem Frühgeborenen wöchentlich jeweils eine Speichelprobe, Urinprobe sowie Stuhlprobe gewonnen. Da das Trachealspirat routinemäßig lediglich bei intubierten Kindern im Rahmen der Intubation, kurz vor der Extubation oder bei klinischer Notwendigkeit eines Absaugens gewonnen werden konnte, war keine

regelmäßige Probengewinnung möglich. Außerdem sind Vergleichsuntersuchungen mit Proben gesunder Frühgeborener nicht möglich, da ohne Vorhandensein eines Tubus auch kein Trachealaspirat gewonnen werden konnte.

Die Gewinnung von Urin ist im klinischen Alltag Routine und kann nicht-invasiv durchgeführt werden. Urinproben sind daher besonders für die kontinuierliche Beobachtung von Frühgeborenen geeignet. War der Allgemeinzustand des Frühgeborenen jedoch zu schlecht oder gelang das Aufkleben des Urinbeutels nicht suffizient, so konnte keine Urinprobe gesammelt werden. Auch kam es wie bereits in der Studie von El-Metwally et al. berichtet gelegentlich zu Vermischungen mit Stuhl, so dass die Proben nicht verwendet werden konnten (El-Metwally et al., 2018). McFarlane et al. konnten zeigen, dass es bei Urinproben nach 12-48 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur zu einer deutlichen Zunahme der Variabilität von VOCs kommt. Daher wurde empfohlen, Urinproben vor der weiteren Untersuchung oder Weiterverarbeitung für maximal 12 Stunden bei Raumtemperatur zu lagern (McFarlane et al., 2020). Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurden die Proben umgehend nach Gewinnung bei 4 °C gekühlt und spätestens am Folgetag bei -20 °C eingelagert.

Im Patientenkollektiv der Frühgeborenen stellen Stuhlproben die bisher am häufigsten untersuchten Bioproben für die Messung mittels Cyanose dar (Course et al., 2021; Wright et al., 2021). Die Stuhlproben können non-invasiv aus der Windel der Frühgeborenen gewonnen werden. Da es jedoch mehrfach nicht gelang, eine ausreichende Menge Stuhl für die Weiterverarbeitung aus der Windel zu entnehmen, konnten nicht in jeder Woche Proben gewonnen werden. Des Weiteren ist eine mögliche Vermischung der Stuhlproben mit Urin aufgrund der Probenentnahme aus der Windel nicht auszuschließen, was eine Schwäche der hier verwendeten SOP darstellt. Da die Cyanose lediglich ein Muster aller VOCs über einer Probe ermittelt, kann eine Vermischung der Proben auch anhand der Smellprints nicht ausgeschlossen werden. Bous et al. gelang es mittels Ionemobilitätsspektrometrie zwischen VOCs von Stuhl und Urin in Windeln Frühgeborener zu differenzieren (Bous et al., 2022).

Die Gewinnung der Speichelproben gestaltete sich in diesem Studienkollektiv als problematisch. Aufgrund von unzureichenden Speichelmengen waren 33 Speichelproben nicht verwertbar, da nach dem Zentrifugieren im Labor zu wenig Speichel im Probenröhrchen vorhanden war. Die dadurch verminderte Anzahl an Proben schränkt die Aussagekraft der hier ermittelten Ergebnisse ein. Eine andere Form der Speichelgewinnung, wie beispielsweise mittels einer Spritze wie von Dietz et al. beschrieben, wäre für weitere Studien denkbar (Dietz et al., 2011). Die geringe Menge des von Frühgeborenen produzierten Speichels stellt eine große Schwierigkeit dar und

verdeutlicht, dass der Speichel von Frühgeborenen eventuell auf Grund der Entnahmebedingungen weniger für die Untersuchung geeignet ist als andere Bioproben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Detektion akuter systemischer Infektionen mittels elektronischer Nase

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob sich Frühgeborene mit und ohne akuter systemischer Infektion anhand der VOCs verschiedener Bioproben unterscheiden lassen. Bereits mehrere Studien konnten nachweisen, dass sich die durch die Cyranose ermittelten VOCs im Rahmen einer pathologischen Veränderung der Homöostase, wie beispielsweise einer Entzündungsreaktion des Körpers, verändern (Kataoka et al., 2013; Amann et al., 2014; Nardi-Agmon und Peled, 2017).

Insbesondere die frühe Diagnose einer akuten systemischen Infektion ist zur Verhinderung von schweren Verläufen und Mortalität obligatorisch. So konnten bereits in der Vorgängerstudie unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf gefunden werden, dass es mittels der Cyranose möglich ist, akute systemische Infektionen anhand der Smellprints von Trachealspiratproben intubierter Frühgeborener nachzuweisen (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019). Da jedoch nur Trachealspiratproben untersucht wurden, erfolgte im Rahmen dieser Studie eine Ausweitung der untersuchten Bioproben. Neben Trachealspirat wurden nun auch Speichel, Urin und der Stuhl von Frühgeborenen einbezogen.

Insgesamt sind die VOCs von Trachealspirat noch wenig untersucht. Äquivalent zur Vorgängerstudie zeigte sich auch in den hier durchgeführten Untersuchungen, dass das Trachealspirat großes Potenzial als Bioprobe zur Messung mittels Cyranose hat. Anhand der Smellprints von Trachealspiratproben war es möglich, zwischen Kindern mit und ohne akuter systemischer Infektion, welche noch keine antibiotische Therapie erhielten, zu unterscheiden. Wurden Proben von Kindern mit einbezogen, welche bereits eine antibiotische Therapie erhielten, zeigte sich keine Signifikanz, die Detektion einer bestehenden Infektion unter bereits eingeleiteter Antibiose gelang im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht. Insgesamt konnten im Rahmen dieser Studie Trachealspiratproben von sechs Frühgeborenen gewonnen werden. Aufgrund der geringen Probenanzahl (Proben von Kindern mit Infektion N=14, Proben von Kindern ohne Infektion N=6) kann dies jedoch nur Hinweise darauf geben, dass eine Früherkennung von akuten systemischen Infektionen mittels Cyranose möglich sein könnte. Da eine Intubation gleichzeitig auch einen Risikofaktor für die Entwicklung einer akuten Infektion darstellt, wäre die Nutzung der Smellprints von Trachealspirat zum

Monitoring einer eventuell im Verlauf auftretenden Infektion bei intubierten Frühgeborenen denkbar (Geffers et al., 2014). Dies könnte in zukünftigen Projekten erforscht werden. Ein weiterer Versuch, das Trachealaspilat zu diagnostischen Zwecken mittels Cyranose zu nutzen, erfolgte beispielsweise durch Willson et al. Es gelang nicht, anhand der Smellprints von angelegten Kulturen des Trachealaspilats zwischen einer Kolonisierung und einer Infektion mit Bakterien zu unterscheiden (Willson et al., 2014).

In der statistischen Auswertung der hier vorliegenden Studie zeigte sich, dass sich die Smellprints von Speichelproben der Frühgeborenen mit akuter systemischer Infektion nicht signifikant von denen der Frühgeborenen ohne akuter systemischer Infektion unterscheiden. Der humane Speichel enthält diverse Inhaltsstoffe, unter anderem Enzyme, Mikroorganismen, Elektrolyte, Immunglobuline, Hormone, Proteine, Muzine und Nukleinsäuren. Diese sind jedoch in ihrer Konzentration sowohl vom Alter als auch von der Reife des Kindes abhängig (Ben-Aryeh et al., 1990; Salvolini et al., 1999). Neben den unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Speicheldrüsen spielen auch der Geburtsmodus und die postnatale Art der Ernährung, i.d.R. Muttermilch oder Formula, eine Rolle in der Zusammensetzung des Speichels und der Kolonisation des Gastrointestinaltrakts (Castagnola et al., 2011; Lif Holgerson et al., 2011; Morzel et al., 2012; Hassaneen und Maron, 2017). Es ist anzunehmen, dass sich die deutliche Variabilität in der Zusammensetzung des Speichels auch in der Zusammensetzung der mittels Cyranose untersuchten VOCs widerspiegelt. Um den Speichel generell als Bioprobe zur nicht-invasiven Diagnostik in der Klinik zu untersuchen und zu etablieren sind weitere und größere prospektive Studien nötig (Hassaneen und Maron, 2017). In diesem Rahmen sollten die verschiedenen VOCs von Speichelproben identifiziert werden sowie die Beeinflussung dieser durch exogene Faktoren weiter untersucht werden. Dies könnte beispielsweise durch Ionenmobilitätsspektrometrie erfolgen. Es kann auch im Rahmen dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, dass die Speichelproben beispielsweise durch im Mund verbliebene Milchreste oder andere Faktoren beeinflusst wurden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung könnten weitere Studien mit Erfassung von weiteren klinischen Daten erfolgen. In unserer Versuchsreihe war es nicht möglich, signifikant zwischen Speichelproben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion zu unterscheiden.

Des Weiteren wurden in der hier durchgeführten Studie Stuhlproben mittels Cyranose untersucht. Zwischen Stuhlproben Frühgeborener mit und ohne akuter systemischer Infektion konnte signifikant differenziert werden. Auch Berkhout et al. konnten in einer prospektiven Studie Hinweise darauf finden, dass mittels Cyranose zwischen Smellprints der Stuhlproben Frühgeborener mit und ohne Late-Onset Sepsis unterschieden werden kann. Dies gelang bis zu drei Tage vor Einsetzen einer klinischen Symptomatik

(Berkhout et al., 2017). Eine Differenzierung zwischen den VOCs der Stuhlproben von Frühgeborenen mit und ohne Late-Onset Sepsis gelang auch mittels Ionenmobilitätsspektrometrie (Berkhout et al., 2019; Berkhout et al., 2020). Sowohl Garner et al. als auch de Meij et al. konnten Hinweise darauf finden, dass anhand der Smellprints von Stuhlproben zwischen Kindern mit und ohne NEC unterschieden werden kann. Im Rahmen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass mittels Cyranose bereits vor der Entwicklung von klinischen Symptomen Unterschiede zwischen den Proben von Kindern mit und ohne beginnender NEC festgestellt werden können (Garner et al., 2009; de Meij et al., 2015). Zudem gelang in der Studie von de Meij et al. auch eine Differenzierung zwischen Frühgeborenen mit einer Sepsis und solchen mit einer NEC bereits zwei bis drei Tage vor Beginn einer klinischen Symptomatik (de Meij et al., 2015). Die Cyranose könnte somit möglicherweise zur Prädiktion der NEC beitragen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte außerdem signifikant zwischen Smellprints der Stuhlproben von Kindern mit und ohne zeitgleiche antibiotische Medikation unterschieden werden. Die VOCs in der Gasphase über den Stuhlproben von Kindern mit Antibiotikatherapie waren also von den VOCs von Proben der Kinder ohne eine solche abgrenzbar. Es ist bekannt, dass Antibiotika die Darmflora beeinflussen und die Mikroorganismen in eben dieser beeinträchtigen und verändern. Auch tritt die Stabilisierung der Darmflora ähnlich zu der eines Erwachsenen erst in einem Alter von 2-3 Jahren ein. Eine Beeinflussung dieser durch exogene Faktoren, wie beispielsweise Antibiotika, ist unabhängig vom Alter des Patienten wahrscheinlich (Campeotto et al., 2007; Voreades et al., 2014). Aus dieser Überlegung heraus lassen sich auch Rückschlüsse darauf ziehen, dass sich auch die VOCs von Stuhlproben durch eine antibiotische Therapie verändern und wie hier gezeigt voneinander abgegrenzt werden können.

Die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es mittels Cyranose in unseren Untersuchungen möglich war, Urinproben von Frühgeborenen ohne bereits eingeleiteter antibiotischer Therapie mit einer akuten systemischen Infektion signifikant von Urinproben nicht erkrankter Kinder zu unterscheiden. Wurde gleichzeitig bereits eine antibiotische Therapie durchgeführt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Bereits im Jahr 400 v. Chr. beschrieb Hippokrates den veränderten Geruch von Urin bei bestimmten Erkrankungen (Adams, 1994). Diese Feststellung weist darauf hin, dass es auch mittels Cyranose möglich sein könnte, anhand von Urinproben zwischen gesunden und erkrankten Individuen zu unterscheiden. Diese Hypothese bestätigten unter anderem Esfahani et al., die nachweisen konnten, dass mittels elektronischer Nase zwischen Proben von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sowie einer Kontrollgruppe differenziert werden kann (Esfahani et al., 2018). Diverse weitere Untersuchungen bestätigten die Hinweise

darauf, dass der Urin eine geeignete Bioprobe zur Diagnose vielfältiger Erkrankungen mittels Cyranose ist (Bernabei et al., 2007; Arasaradnam et al., 2013; Covington et al., 2013). Besonders erwähnenswert ist die Untersuchung von Pavlou et al., die nachweisen konnten, dass die Detektion von Harnwegsinfektionen anhand der Smellprints von Urinproben möglich ist (Pavlou et al., 2002). Dies gelang in einer Studie von Visser et al. auch anhand von Urinproben von Kindern in einem Alter von 0-18 Jahren (Visser et al., 2020). Im Hinblick auf den Nachweis akuter systemischer Infektionen wurde der Urin bisher noch nicht ausreichend mittels Cyranose untersucht. Die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass mittels Cyranose zwischen Urinproben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion differenziert werden kann.

Im Rahmen dieser Studie war es möglich mittels Cyranose unter Verwendung von Urin, Stuhl und Trachealspirat zwischen Kindern mit und ohne akuter systemischer Infektion, welche noch keine antibiotische Therapie erhielten, zu differenzieren. Lediglich anhand von Stuhlproben gelang dies auch bei gleichzeitiger antibiotischer Therapie.

4.2.2 Prädiktion der bronchopulmonalen Dysplasie mittels elektronischer Nase

Das zweite Ziel der hier vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob anhand der Smellprints verschiedener Bioproben zwischen Frühgeborenen mit und ohne BPD differenziert werden kann. Wie bereits beschrieben konnten in der Vorgängerstudie dieser Arbeit Hinweise darauf gefunden werden, dass anhand von Trachealspirat zwischen Proben von Frühgeborenen mit und ohne BPD unterschieden werden kann (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019). Erwartungsgemäß konnte auch in den hier vorliegenden Untersuchungen signifikant zwischen Smellprints von in den ersten 14 Lebenstagen der Frühgeborenen gewonnenen Trachealspiratproben mit und ohne sich entwickelnder BPD differenziert werden.

Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten, eine Trachealspiratprobe zu gewinnen, ist insbesondere die Frage nach weiteren geeigneten Bioproben zur Prädiktion der BPD anhand von Smellprints interessant. Hierzu wurden Speichel-, Urin-, sowie Stuhlproben von Frühgeborenen untersucht.

Es zeigte sich, dass zwischen den Smellprints der Speichelproben von Frühgeborenen mit und ohne BPD sowohl im frühen als auch im späten Verlauf nicht differenziert werden kann. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, ist die in dieser Studie verwendete SOP zur Gewinnung von Speichel nur eingeschränkt geeignet. Für weitere Studien empfiehlt sich daher die Etablierung einer neuen Methode zur Probengewinnung.

Bei der Untersuchung der Smellprints von Urinproben aus den ersten 14 Lebenstagen der Frühgeborenen zeigte sich, dass mittels Cyranose signifikant zwischen Kindern mit und ohne sich entwickelnder BPD unterschieden werden kann. Wurden auch Proben aus dem späteren Verlauf einbezogen, gelang die Differenzierung nicht mehr signifikant. Auch Balena-Borneman et al. untersuchten in einer Studie den Urin als Bioprobe zur Prädiktion der BPD und konnten zeigen, dass dies anhand von ausgewählten Biomarkern im Urin möglich sein könnte. Hierzu wurden das Albumin und das sogenannte „Clusterin“ (Apolipoprotein J), ein Marker für oxidativen Stress, im Urin von Frühgeborenen bestimmt. Es zeigte sich, dass diese Biomarker im Urin mit der Entwicklung einer BPD assoziiert sind (Balena-Borneman et al., 2017). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich auch die Konzentration des „Protein CC16“ im Serum und im Urin im Rahmen der Erkrankung an Asthma bronchiale verändert (Broeckeaert et al., 2000; Ma et al., 2015). Diese Ergebnisse sind Hinweise darauf, dass sich bestimmte Inhaltsstoffe des Urins im Rahmen einer pulmonalen Erkrankung verändern, so dass auch die VOCs in der Gasphase über den Urinproben nachweisbar verändert sein könnten.

Ferner erwiesen sich die Stuhlproben in den hier vorgestellten Untersuchungen als vielversprechendste Bioproben für die Untersuchung mittels Cyranose. Besonders interessant für eine Prädiktion der BPD sind die Proben der ersten Lebensstage eines Frühgeborenen. Im Rahmen der hier durchgeführten Studie konnten die Stuhlproben von Frühgeborenen mit einer sich entwickelnden BPD signifikant von Stuhlproben der Kinder ohne BPD unterschieden werden. Berkhout et al. konnten außerdem zeigen, dass es mit Hilfe der Cyranose möglich ist, fäkale VOCs von Patienten mit BPD ab dem 14. Tag postnatal von den VOCs der gesunden Kontrollgruppe zu differenzieren. Eine Verbindung zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms ließ sich in diesem Rahmen nicht nachweisen (Berkhout et al., 2018). Diese Differenzierung zwischen Proben von Kindern mit und ohne BPD im späteren Verlauf gelang im Rahmen der hier vorliegenden Studie nicht. Welche weiteren Einflussfaktoren, wie beispielsweise die Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf Formula oder Medikamente wie Antibiotika, eine Rolle in der Veränderung der VOCs über den Stuhlproben spielen ist noch nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Es konnte bereits Anhalt dafür gefunden werden, dass sich die VOCs der Stuhlproben von mit Muttermilch oder Formula ernährten Kindern unterscheiden (El Manouni El Hassani et al., 2018). Des Weiteren konnten Berkhout et al. in einer Studie nachweisen, dass die VOCs von fäkalen Proben deutlich je nach Art der Probengewinnung, Dauer der Lagerung und Temperatur der Probe differieren und empfehlen, zunächst eine standardisierte Methode der Probengewinnung und Verarbeitung zu entwickeln, bevor die Technologie der elektronischen Nase weiter genutzt werden kann (Berkhout et al., 2017).

Zusammenfassend konnten mittels der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen Hinweise darauf gefunden werden, dass mittels Cyranose zwischen Smellprints des Urins, Stuhls und Trachealaspirats zwischen Frühgeborenen ohne und mit sich im Verlauf entwickelnder BPD differenziert werden kann.

4.3 Stärken und Schwächen der Arbeit

Eine Limitation der Arbeit liegt in der Fallzahl bzw. Probenanzahl. Die hier vorliegende Studie ist eine Pilotstudie als Machbarkeitsstudie an einer kleinen Zahl von Kindern. Bereits anhand der untersuchten Stichprobe von Frühgeborenen konnte die Machbarkeit gezeigt werden. Um Rückschlüsse auf die Grundgesamtheit aller Frühgeborenen ziehen zu können, sind weitere und größere Studien mit einer deutlich höheren Probenanzahl nötig. Je höher die Probenanzahl, also je sicherer die Referenzdatenbank, desto höher ist der CVV für die darauffolgende klinische Anwendung.

Des Weiteren ist die zweidimensionale Darstellung der Punktwolken in den verwendeten Abbildungen als Schwäche der vorliegenden Arbeit zu benennen. Eine dreidimensionale Abbildung wäre wünschenswert, um die Abbildungen drehen und die Punktwolken aus unterschiedlichen Perspektiven sehen zu können. Zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung stand kein System zur Verfügung, das eine solche Darstellung hätte ermöglichen können. Daher kann die Interpretation der Abbildungen nur in Kombination mit den rechnerisch ermittelten Maßen der Mahalanobisdistanz (Maß für den Abstand zweier Punktwolken) und des Kreuzvalidierungswerts (Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung) erfolgen. Den 32-dimensionalen Raum der Smellprints können die Abbildungen nur ungenügend abstrahieren. Zudem ist ein Vergleich der Abbildungen miteinander aufgrund der unterschiedlichen Skalen erschwert. Trotz der Limitationen bieten die Abbildungen einen Eindruck der Punktwolken in einem zweidimensionalen Raum.

Eine weitere Schwäche der Studie ist, dass mehrfache Tests an einem Datensatz durchgeführt wurden. Durch das mehrfache Nutzen des gleichen Datensatzes gab es eine Überschneidung zwischen den zwei verschiedenen Fragestellungen bzw. untersuchten Erkrankungen. Im Rahmen dieser Studie gab es ein Frühgeborenes, welches an einer akuten systemischen Infektion erkrankte und später eine BPD entwickelte. Welche Auswirkungen dies auf die Smellprints hat, ist nicht klar.

Wie bereits an anderen Stellen dargestellt ist eine Schwäche der Arbeit, dass die Gewinnung von Trachealspirat nur bei intubierten Kindern möglich ist. Der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe ist deshalb nicht möglich.

Da alle Proben durch wechselndes medizinisches Personal gewonnen wurden, ist eine zusätzliche Schwäche der Arbeit, dass die Adhärenz an die jeweilige SOP zur Probengewinnung nicht überprüfbar ist.

Eine Stärke dieser Studie ist, dass die Verarbeitung der Proben sowie die Messung und Auswertung der Daten von nur einer Person erfolgten, so dass sichergestellt werden konnte, dass alle Proben im Labor einheitlich untersucht wurden. Zudem erfolgte die Messung der Proben nur einmalig, da Mayor et al. nachweisen konnten, dass eine mehrfache Testung der gleichen Stuhlprobe zu signifikanten Veränderungen in der Intensität der VOCs führt (Mayor et al., 2014).

Des Weiteren ist eine Stärke der hier vorliegenden Untersuchung die Vergleichbarkeit innerhalb der Arbeitsgruppe. Wie in der Studie von Rogosch et al. und im Hinblick auf nachfolgende Studien der Arbeitsgruppe wurde die SOP zur Gewinnung von Trachealaspilat beibehalten und die Messung mittels elektronischer Nase in identischer Weise zur Vorgängerstudie durchgeführt (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019). So können die ermittelten Daten auch für weitere Studien dieser Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen und sind miteinander vergleichbar.

Eine weitere Stärke der Studie liegt in ihrem prospektiven Ansatz. Durch den nicht-interventionellen, prospektiven Ansatz kam es zu keiner zusätzlichen Belastung der Patienten und die erhobenen Daten konnten zielgerichtet gewonnen werden.

Da es bisher keine vergleichbaren Studien zu den Biosamples Urin und Speichel zur Detektion von akuten systemischen Infektionen sowie zur Prädiktion der BPD gibt, ist als weitere Stärke dieser Studie ihre Originalität zu nennen.

4.4 Ausblick

Die Cyranose bietet als nicht-invasives, kostengünstiges und schnelles Diagnostikinstrument großes Zukunftspotenzial. Mittels Cyranose können VOCs über einer Probe erfasst und zu einem Smellprint, einer Art Fingerabdruck der jeweiligen Probe, zusammengefasst werden. Eben diese VOCs sollen sich bei Änderungen der Homöostase des Körpers, wie beispielsweise bei einer Entzündungsreaktion, verändern. Diese Veränderungen, die man sich bei der Diagnostik mittels Cyranose zu Nutzen machen möchte, führen jedoch auch zu Herausforderungen. Da die ermittelten Smellprints ein gemeinsames Abbild aller VOCs über der Probe darstellen, nehmen neben krankheitsspezifischen Veränderungen auch exogene Faktoren einen Einfluss.

Mittels der hier vorliegenden Studie konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass anhand der Smellprints von Urin-, Stuhl- und Trachealaspilatproben zwischen Proben

von Frühgeborenen mit und solchen ohne einer akuten systemischen Infektion differenziert werden kann. Dies gelang anhand von Urin und Trachealspirat jedoch nur, bevor eine antibiotische Therapie eingeleitet wurde. Ebenfalls gelang es, anhand von VOCs zwischen innerhalb der ersten 14 Lebenstage gewonnenen Urin-, Stuhl- und Trachealspiratproben Frühgeborener ohne und mit sich entwickelnder BPD zu unterscheiden. Die Treffsicherheit einer korrekten Zuordnung von Proben zu den jeweiligen Gruppen war im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen noch gering, die Ergebnisse ermutigen jedoch zu weiterer Forschung in der Zukunft. Bis zur etwaigen Etablierung einer Routine für den klinischen Alltag sind noch zahlreiche und größere Studien nötig, um einerseits mittels einer höheren Fallzahl repräsentative Daten zu generieren und andererseits, um den Einfluss einzelner exogener Faktoren auf die Smellprints zu identifizieren. Für die Vergleichbarkeit von Studien wäre zukünftig eine vereinheitlichte Methode zur Gewinnung von Bioproben wünschenswert (Berkhout et al., 2016). Zudem sollten die ermittelten Ergebnisse in gezielten Studien auf ihre Reproduzierbarkeit untersucht werden. Auch die genaue Detektion einzelner VOCs, beispielsweise mittels Ionenmobilitätsspektrometrie, könnte ein Ziel für erneute Studien sein und gegebenenfalls krankheitsspezifische VOCs identifizieren (Berkhout et al., 2016). Zuletzt könnte der technische Fortschritt mit Entwicklung neuer Sensoren für die elektronische Nase die Genauigkeit der Methode weiter verbessern (Capelli et al., 2016).

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Jedes Jahr kommen in Deutschland rund 60.000 Kinder als Frühgeborene zur Welt, 1,3 % von ihnen gelten mit einem Geburtsgewicht von < 1500 g als sehr kleine Frühgeborene (IQTIG, 2021). Zu den häufigsten Gründen für Mortalität in diesem Patientenkollektiv gehören akute systemische Infektionen sowie chronische Atemwegserkrankungen wie die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), welche europaweit mit einer Inzidenz von 10-25 % aller sehr kleinen Frühgeborenen auftritt (Gortner et al., 2011). Diese beruht auf einer durch die Frühgeburt bedingten gestörten Lungenentwicklung in Kombination mit prä- und postnatal einwirkenden Noxen, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Besonders aufgrund der großen Vulnerabilität von Frühgeborenen ist die möglichst frühe Diagnose einer akuten systemischen Infektion sowie Prädiktion der BPD für den klinischen Verlauf der Erkrankungen und die Prognose des Frühgeborenen entscheidend. Die Etablierung einer geeigneten Methode zur gezielten Frühdiagnose und Prädiktion von Erkrankungen bei Frühgeborenen stellt die medizinische Forschung vor eine große Herausforderung. Durch Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die elektronische Nase (Cyranose), ein elektronisches

Äquivalent zum biologischen Geruchssinn, möglicherweise als neues und nicht-invasives Diagnostiktool in der Neonatologie einsetzbar ist. Diese ist in der Lage, volatile organische Substanzen (*volatile organic compounds*, VOCs) über einer Probe zu detektieren und zu einem „Smellprint“, einer Art Fingerabdruck der jeweiligen Probe, zusammenzufassen. Diese Smellprints können daraufhin statistisch miteinander verglichen werden. Das übergeordnete Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob mittels Cyranose zwischen Proben von Frühgeborenen mit und ohne sich entwickelnder BPD und Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion differenziert werden kann. Da besonders nicht-invasiv gewonnene Proben für die potenzielle klinische Nutzung interessant sind, wurden Urin-, Stuhl-, Speichel- und Trachealaspiratproben untersucht. Zu diesem Zweck wurden 21 Frühgeborene des Universitätsklinikums Marburg über einen Zeitraum von sechs Wochen postnatal oder bis zum Zeitpunkt ihrer Entlassung aus der stationären Behandlung beobachtet. Wenn möglich, wurden wöchentlich Urin, Stuhl und Speichel sowie im Rahmen der Erstintubation, kurz vor der Extubation oder bei klinischer Indikation zum Absaugen Trachealaspirat gewonnen. Diese Proben wurden daraufhin mittels Cyranose untersucht und durch eine lineare Diskriminanzanalyse statistisch miteinander verglichen. Hierbei konnte anhand von Trachealaspirat-, Urin- und Stuhlproben zwischen Smellprints von Kindern mit und ohne einer akuten systemischen Infektion sowie mit und ohne sich entwickelnder BPD differenziert werden. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Pilotstudie konnte die Machbarkeit bestätigen und wichtige Ergebnisse liefern, welche nun mittels größerer Studien überprüft werden müssen. Zusammenfassend ermutigen die in dieser Arbeit gefundenen Hinweise zu weiterer Forschung, um das Potenzial der Cyranose zur Frühdiagnose akuter systemischer Infektionen und Prädiktion der BPD bei Frühgeborenen anhand von Urin-, Stuhl- und Trachealaspiratproben weiter zu untersuchen.

5.2 Abstract

Every year approximately 60,000 children are born prematurely in Germany, 1.3 % of whom are considered very small preterm infants with a birth weight of < 1500 g (IQTIG, 2021). The most common causes of mortality in this patient population include acute systemic infections as well as chronic respiratory diseases such as bronchopulmonary dysplasia (BPD), which has an incidence of 10-25 % of all very small preterm infants across Europe (Gortner et al., 2011). This is due to a disturbed lung development caused by the premature birth in combination with pre- and postnatally acting noxae, which cause an inflammatory reaction. Especially due to the high vulnerability of preterm infants, the earliest possible diagnosis of acute systemic infection as well as prediction

of BPD is crucial for the clinical course of the diseases and the prognosis of the preterm infant. The establishment of a suitable method for targeted early diagnosis and prediction of diseases in preterm infants is a major challenge for medical research. Preliminary studies have shown that the electronic nose (cyranose), an electronic equivalent to the biological sense of smell, may be applicable as a new and non-invasive diagnostic tool in neonatology. The cyranose is able to detect volatile organic compounds (VOCs) over a sample and aggregating them into a "smellprint", a kind of fingerprint of the sample. These smellprints can then be statistically compared with each other. The overall aim of this study was to investigate whether the cyranose can be used to differentiate between samples from preterm infants with and without developing BPD and preterm infants with and without acute systemic infection. Because noninvasively obtained samples are of particular interest for potential clinical use, urine, stool, saliva, and tracheal aspirate samples were examined. For this purpose, 21 premature infants of the University Hospital Marburg were observed over a period of six weeks postnatally or until the time of their discharge from inpatient treatment. When possible, urine, stool, and saliva were obtained weekly, as well as tracheal aspirate during initial intubation, shortly before extubation, or when clinically indicated for aspiration. These samples were then analyzed by the cyranose and statistically compared by linear discriminant analysis. Here, tracheal aspirate, urine, and stool samples could be used to differentiate between smellprints from children with and without an acute systemic infection and with and without developing BPD. The pilot study conducted as part of this dissertation was able to confirm the feasibility and provide important results, which now need to be verified by means of larger studies. In summary, the evidence found in this work encourages further research to investigate the potential of the cyranose to detect acute systemic infections and predict BPD in preterm infants using urine, stool, and tracheal aspirate samples.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, F., 1994. Hippocratic Writings: Aphorism, 5th edition. Web Atomics: New York, NY, USA.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2011. Molekularbiologie der Zelle, 5. Auflage. Wiley-VCH Verlag, 1782.
- Amann, A., Costello, Bde.L., Miekisch, W., Schubert, J., Buszewski, B., Pleil, J., Ratcliffe, N., Risby, T., 2014. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res* 8 (3):034001.
- Arasaradnam, R.P., Ouaret, N., Thomas, M.G., Quaraishi, N., Heatherington, E., Nwokolo, C.U., Bardhan, K.D., Covington, J.A., 2013. A novel tool for noninvasive diagnosis and tracking of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19 (5), 999–1003.
- Avery, M.E., Mead, J., 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child*, 97, 517–523.
- AWMF-Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Erstveröffentlichung 1996, letzte Aktualisierung 2009. S2-Leitlinie Neonatologie: Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener. URL: https://gnpi.de/wp-content/uploads/2020/07/024-014_S2_Praevention_und_Therapie_der_bronchopulmonalen_Dysplasie_Fruehgeborener_06-2009_06-2014.pdf . Abrufdatum: 15.08.2023
- AWMF-Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Erstveröffentlichung 1996, letzte Aktualisierung 03/2021. S2-Leitlinie Neonatologie: Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. URL: https://register.awmf.org/assets/guidelines/024-008I_S2k_Bakterielle_Infektionen_Neugeborene_2021-03.pdf . Abrufdatum: 15.08.2023.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R., 2018. Multivariate Analysemethoden, eine anwendungsorientierte Einführung, 15. Auflage. Springer, Berlin.

-
- Balena-Borneman, J., Ambalavanan, N., Tiwari, H.K., Griffin, R.L., Halloran, B., Askenazi, D., 2017. Biomarkers associated with bronchopulmonary dysplasia/mortality in premature infants. *Pediatr Res* 81 (3), 519-525.
- Bancalari, E., Claure, N., Sosenko, I.R., 2003. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol* 8 (1), 63-71.
- Bancalari, E., Claure, N., 2006. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 30 (4), 164-170.
- Bancalari, E., del Moral, T., 2001. Bronchopulmonary dysplasia and surfactant. *Biol Neonate* 80 (1), 7-13.
- Baltimore, R.S., 2003. Neonatal Sepsis. *Epidemiology and Management. Pediatr Drugs* 5 (11), 723.
- Baraldi, E., Filippone, M., 2007. Chronic Lung Disease after Premature Birth. *N Engl J Med* 357, 1946-1955.
- Barnes, P.J., 1997. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (6), 867-870.
- Basha, S., Surendran, N., Pichichero, M., 2014. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol* 10 (9), 1171-1784.
- Bell, E.F., Hintz, S.R., Hansen, N.I., Bann, C.M., Wyckoff, M.H., DeMauro, S.B., Walsh, M.C., Vohr, B.R., Stoll, B.J., Carlo, W.A., Van Meurs, K.P., Rysavy, M.A., Patel, R.M., Merhar, S.L., Sánchez, P.J., Laptook, A.R., Hibbs, A.M., Cotten, C.M., D'Angio, C.T., Winter, S., Fuller, J., Das, A., 2022. Mortality, In-Hospital Morbidity, Care Practices, and 2-Year Outcomes for Extremely Preterm Infants in the US, 2013-2018. *JAMA* 327 (3), 248-263.
- Ben-Aryeh, H., Fisher, M., Szargel, R., Laufer, D., 1990. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Arch Oral Biol* 35 (11), 929-931.
- Berkhout, D.J.C., Benninga, M.A., van Stein, R.M., Brinkman, P., Niemarkt, H.J., de Boer, N.K., de Meij, T.G., 2016. Effects of Sampling Conditions and Environmental Factors on Fecal Volatile Organic Compound Analysis by an Electronic Nose Device. *Sensors (Basel)* 16 (11).
- Berkhout, D.J.C., Niemarkt, H.J., Andriessen, P., Vijlbrief, D.C., Bomers, M.K., Cossey, V., Hulzebos, C.V., van Kaam, A.H., Kramer, B.W., van Lingen, R.A., Wicaksono, A.N., Covington, J.A., van Weissenbruch, M.M., Benninga, M.A., de Boer, N.K.H., de Meij, T.G.J., 2020. Preclinical Detection of Non-catheter Related

-
- Late-onset Sepsis in Preterm Infants by Fecal Volatile Compounds Analysis: A Prospective, Multi-center Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J* 39 (4), 330-335.
- Berkhout, D.J.C., Niemarkt, H.J., Benninga, M.A., Budding, A.E., van Kaam, A.H., Kramer, B.W., Pantophlet, C.M., van Weissenbruch, M.M., de Boer, N.K.H., de Meij, T.G.J., 2018. Development of severe bronchopulmonary dysplasia is associated with alterations in fecal volatile organic compounds. *Pediatr Res* 83 (2), 412-419.
- Berkhout, D.J.C., Niemarkt, H.J., Buijck, M., van Weissenbruch, M.M., Brinkman, P., Benninga, M.A., van Kaam, A.H., Kramer, B.W., Andriessen, P., de Boer, N.K., de Meij, T.G., 2017. Detection of Sepsis in Preterm Infants by Fecal Volatile Organic Compounds Analysis: A Proof of Principle Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 65 (3), 47-52.
- Berkhout, D.J.C., van Keulen, B.J., Niemarkt, H.J., Bessem, J.R., de Boode, W.P., Cossey, V., Hoogenes, N., Hulzebos, C.V., Klaver, E., Andriessen, P., van Kaam, A.H., Kramer, B.W., van Lingen, R.A., Schouten, A., van Goudoever, J.B., Vijlbrief, D.C., van Weissenbruch, M.M., Wicaksono, A.N., Covington, J.A., Benninga, M.A., de Boer, N.K.H., de Meij, T.G.J., 2019. Late-onset Sepsis in Preterm Infants Can Be Detected Preclinically by Fecal Volatile Organic Compound Analysis: A Prospective, Multicenter Cohort Study. *Clin Infect Dis* 68 (1), 70-77.
- Bernabei, M., Pennazza, G., Santonico, M., Corsi, C., Roscioni, C., Paolesse, R., Di Natale, C., D'Amico, A., 2007. A preliminary study on the possibility to diagnose urinary tract cancers by an electronic nose. *Sens Actuator B Chem* 131 (1), 1-4.
- Berner, R., Niemeyer, C.M., Leititis, J.U., Funke, A., Schwab, C., Rau, U., Richter, K., Tawfeek, M.S.K., Clad, A., Brandis, M., 1998. Plasma Levels and Gene Expression of Granocyte Colony-Stimulating Factor, Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-8, and Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in Neonatal Early Onset Sepsis. *Pediatr Res* 44, 469-477.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40 (12), 845-859.
- Bhatt, A.J., Pryhuber, G.S., Huyck, H., Watkins, R.H., Metlay, L.A., Maniscalco, W.M., 2001. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 164 (10), 1971-1980.

-
- 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.
- Björkqvist, M., Jurstrand, M., Bodin, L., Fredlund, H., Schollin, J., 2004. Defective Neutrophil Oxidative Burst in Preterm Newborns on Exposure to Coagulase-Negative Staphylococci. *Pediatr Res* 55 (6), 966-971.
- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ et al., 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. *Lancet* 2012 (379), 2162-2172.
- Bonikos, D.S., Bensch, K.G., Northway, W.H., Edwards, D.K., 1976. Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 7 (6), 643-666.
- Bos, L.D., Schultz, M.J., Sterk, P.L., 2016. Exhaled breath profiling for diagnosing acute respiratory distress syndrome. *BMC Pulm Med* 14 (72).
- 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. *Iran J Basic Med Sci* 16 (12), 1232-1237.
- Bous, M., Tutdibi, E., Nourkami-Tutdibi, N., Kaiser, E., Stutz, R., Meyer, S., Baumbach, J.I., Zemlin, M., Goedicke-Fritz, S., 2022. Patterns of volatile organic compounds in excrements of preterm neonates. *Eur J Clin Invest* (5): e13868.
- Broeckaert, F., Clippe, A., Knoop, B., Hermans, C., Bernard, A., 2000. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci* 923, 68-77.
- Burg, N.D., Pillinger, M.H., 2001. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 99(1), 7-17.
- Burn, G.L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D.F., Zychlinsky, A., 2021. The Neutrophil. *Immunity* 54(7), 1377-1391.
- Burt, T.D., 2013. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *Am J Reprod Immunol* 69 (4), 346-358.

-
- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., Butel, M.J., 2007. Establishment of the intestinal microflora in neonates. *Gastroenterol Clin Biol* 31 (5), 533-542.
- Capelli, L., Taverna, G., Bellini, A., Eusebio, L., Buffi, N., Lazzeri, M., Guazzoni, G., Bozzini, G., Seveso, M., Mandressi, A., Tidu, L., Grizzi, F., Sardella, P., Latorre, G., Hurle, R., Lughezzani, G., Casale, P., Meregali, S., Sironi, S., 2016. Application and Uses of Electronic Noses for Clinical Diagnosis on Urine Samples: A Review. *Sensors (Basel)* 16 (10), 1708.
- Castagnola, M., Inzitari, R., Fanali, C., Iavarone, F., Vitali, A., Desiderio, C., Vento, G., Tirone, C., Romagnoli, C., Cabras, T., Manconi, B., Sanna, M.T., Boi, R., Pisano, E., Olanas, A., Pellegrini, M., Nemolato, S., Heizmann, C.W., Faa, G., Messina, I., 2011. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Mol Cell Proteomics* 10 (1): M110.003467.
- Christensen, R.D., Harper, T.E., Rothstein, G., 1986. Granulocyte-macrophage progenitor cells in term and preterm neonates. *J Pediatr* 109, 1047–1051.
- Christensen, R.D., Rothstein, G., 1984. Pre- and postnatal development of granulocytic stem cells in the rat. *Pediatr Res* 18, 599–602.
- Coalson, J.J., 2006. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 30 (4), 179-184.
- Collins, A., Weitkamp, J.H., Wynn, J.L., 2018. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 103 (4), 391-394.
- Cortés, J.S., Losada, P.X., Fernández, L.X., Beltrán, E., DeLaura, I., Narváez, C.F., Fonseca-Becerra, C.E., 2021. Interleukin-6 as a Biomarker of Early-Onset Neonatal Sepsis. *Am J Perinatol* 38 (01), 338-346.
- Course, C., Watkins, W.J., Müller, C.T., Odd, D., Kotecha, S., Chakraborty, M., 2021. Volatile organic compounds as disease predictors in newborn infants: a systematic review. *J Breath Res* 15 (2).
- Covington, J.A., Westenbrink, E.W., Ouaret, N., Harbord, R., Bailey, C., O'Connell, N., Cullis, J., Williams, N., Nwokolo, C.U., Bardhan, K.D., Arasaradnam, R.P., 2013. Application of a novel tool for diagnosing bile acid diarrhoea. *Sensors (Basel)* 13 (9), 11899-11912.
- De Meij, T.G., de Boer, N.K., Benninga, M.A., Lentferink, Y.E., de Groot, E.F., van de Velde, M.E., van Bodegraven, A.A., van der Schee, M.P., 2014. Faecal gas analysis by electronic nose as novel, non-invasive method for assessment of

-
- active and quiescent pediatric inflammatory bowel disease: Proof of principle study. *J Crohns Colitis* 8 (2), 396.
- De Meij, T.G., van der Schee, M.P., Berkhout, D.J., van de Velde, M.E., Jansen, A.E., Kramer, B.W., van Weissenbruch, M.M., van Kaam, A.H., Andriessen, P., van Goudoever, J.B., Niemarkt, H.J., de Boer, N.K., 2015. Early Detection of Necrotizing Enterocolitis by Fecal Volatile Organic Compounds Analysis. *J Pediatr* 167 (3), 562-567.
- Dietz, J.A., Johnson, K.L., Wick, H.C., Bianchi, D.W., Maron, J.L., 2011. Optimal Techniques for mRNA Extraction from Neonatal Salivary Supernatant. *Neonatology* 101 (1), 55-60.
- Døllner, H., Vatten, L., Austgulen, R., 2001. Early diagnostic markers for neonatal sepsis comparing C-reactive protein, interleukin 6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol* 54 (12), 1251-1257.
- Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie e.V., 2018. DGPI Handbuch, Infektionen bei Kindern und Jugendlichen, 7. Auflage. Futuramed, 893.
- Duchamp, M., Sterlin, D., Diabate, A., Uring-Lambert, B., Guerin-El Khourouj, V., Le Mauff, B., Monnier, D., Malcus, C., Labalette, M., Picard, C., 2014. B-cell subpopulations in children: National reference values. *Immun Inflamm Dis* 2(3), 131–140.
- 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.
- El Manouni El Hassani, S., Niemarkt, H.J., Said, H., Berkhout, D.J.C., van Kaam, A.H., van Lingen, R.A., Benninga, M.A., de Boer, N.K.H., de Meij, T.G.J., 2018. Fecal Volatile Organic Compounds in Preterm Infants Are Influenced by Enteral Feeding Composition. *Sensors (Basel)* 18 (9), 3037.
- El-Metwally, D., Chain, K., Stefanak, M.P., Alwis, U., Blount, B.C., LaKind, J.S., Bearer, C.F., 2018. Urinary metabolites of volatile organic compounds of infants in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Res* 83 (6), 1158-1164.
- Esfahani, S., Wicaksono, A., Mozdiak, E., Arasaradnam, R.P., Covington, J.A., 2018. Non-Invasive Diagnosis of Diabetes by Volatile Organic Compounds in Urine Using FAIMS and Fox4000 Electronic Nose. *Biosensors (Basel)* 8(4), 121.

-
- Falconer, A.E., Carr, R., Edwards, S.W., 1995. Impaired neutrophil phagocytosis in preterm neonates: lack of correlation with expression of immunoglobulin or complement receptors. *Biol Neonate* 68(4), 264-269.
- Franz, A.R., Kron, M., Pohlandt, F., Steinbach, G., 1999. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. *Pediatr Infect Dis J* 18 (8), 666-671.
- Franz, A.R., Steinbach, G., Kron, M., Pohlandt, F., 1999. Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* 104(3), 447-453.
- Franz, A.R., Steinbach, G., Kron, M., Pohlandt, F., 2001. Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants. *Acta Pædiatr* 90 (9), 1025-1032.
- Franz, A.R., Bauer, K., Schalk, A., Garland, S.M., Bowman, E.D., Rex, K., Nyholm, C., Norman, M., Bougateg, A., Kron, M., Mihatsch, W.A., Pohlandt, Fr., 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.
- Franz, A.R., Sieber, S., Pohlandt, F., Kron, M., Steinbach, G., 2004. Whole blood interleukin 8 and plasma interleukin 8 levels in newborn infants with suspected bacterial infection. *Acta Pædiatr* 93(5), 648-653.
- Filias, A., Theodorou, G.L., Mouzopoulou, S., Varvarigou, A.A., Stephanos, M., Karakantza, M., 2011. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr* 11 (29).
- Fleiss, N., Coggins, S.A., Lewis, A.N., Zeigler, A., Cooksey, K.E., Walker, L.A., Husain, A., De Jong, B.S., Wallman-Stokes, A., Alrifai, M.W., Visser, D.H., Good, M., Sullivan, B., Polin, R.A., Martin, C.R., Wynn, J.L., 2021. Evaluation of the Neonatal Sequential Organ Failure Assessment and Mortality Risk in Preterm Infants with Late-Onset Infection. *JAMA Netw Open* 4 (2): e2036518.
- Forestier, F., Daffos, F., Catherine, N., Renard, M., Andreux, J.P., 1991. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 77 (11), 2360-2363.
- Friese, K., Dudenhausen, J.W., Kirschner, W., Schäfer, A., Elkeles, T., 2003. Risk Factors of Premature Birth and their Significance for Prevention and Health

-
- Promotion- An Analysis Based on the BabyCare Program. *Gesundheitswesen* 65 (8/09), 477-485.
- Garner, C.E., Ewer, A.K., Elasouad, K., Power, F., Greenwood, R., Ratcliffe, N.M., Costello, B.L., Probert, C.S., 2009. Analysis of faecal volatile organic compounds in preterm infants who develop necrotising enterocolitis: a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49 (5), 559-565.
- Geffers, C., Haller, S., Heller, G., Gortner, L., Göpel, W., Bühner, C., 2014. Nosokomiale Infektionen bei Neugeborenen. *Monatsschr Kinderheilkd* 162 (5), 385-393.
- Gibbons, D., Fleming, P., Virasami, A., Michel, M.L., Sebire, N.J., Costeloe, K., Carr, R., Klein, N., Hayday, A., 2014. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med* 20 (10), 1206-1210.
- Glaesener, S., Jaenke, C., Habener, A., Geffers, R., Hagendorff, P., Witzlau, K., Imelmann, E., Krueger, A., Meyer-Bahlburg, A., 2018. Decreased production of class-switched antibodies in neonatal B cells is associated with increased expression of miR-181b. *PLoS One* 13 (2): e0192230.
- Gortner, L., Misselwitz, B., Milligan, D., Zeitlin, J., Kollée, L., Boerch, K., Agostino, R., Van Reempts, P., Chabernaude, J.L., Bréart, G., Papiernik, E., Jarreau, P.H., Carrapato, M., Gadzinowski, J., Draper, E., members of the MOSAIC Research Group, 2011. Rates of bronchopulmonary dysplasia in very preterm neonates in Europe: results from the MOSAIC cohort. *Neonatology* 99 (2), 112-127.
- Groneck, P., Götze-Speer, B., Oppermann, M., Eiffert, H., Speer, C.P., 1994. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 93, 712-718.
- Guleria, I., Sayegh, M.H., Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *J Immunol* 178, 3345-3351.
- Gupta, S., Sinha, S.K., Donn, S.M., 2009. Ventilatory management and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Semin Fetal Neonatol Med* 14 (6), 367-373.
- Hassaneen, M., Maron, J.L., 2017. Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations. *Front Public Health* 5:83.
- Hattesoehl, A.D., Jörres, R.A., Dressel, H., Schmid, S., Vogelmeier, C., Greulich, T., Noeske, S., Bals, R., Koczulla, A.R., 2011. Discrimination between COPD

- patients with and without alpha-1-antitrypsin deficiency using an electronic nose. *Respirology* 16 (8), 1258-1264.
- Haynes, B.F., Heinly, C.S., 1995. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med* 181 (4), 1445-1458.
- Hendricks, D.W., Fink, P.J., 2011. Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage. *Blood* 117 (4), 1239–1249.
- Herrmann, N., 2019. Untersuchungen am Trachealspirat beatmeter Früh- und Reifgeborener zur Infektionsdiagnostik und Prädiktion der Bronchopulmonalen Dysplasie- eine Pilotstudie. Dissertation Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg.
- Herting, E., 2013. Bronchopulmonale Dysplasie (BPD). *Monatsschr Kinderheilkd* 161 (5), 417-424.
- Herzenberg, L.A., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., 1992. Layered evolution in the immune system. A model for the ontogeny and development of multiple lymphocyte lineages. *Ann N Y Acad Sci* 651, 1-9.
- Heß, N., Hüning, B.M., Roll, C., 2010. Stressreaktionen und zerebrale Oxygenierung während venöser und kapillärer Blutentnahmen bei sehr kleinen Frühgeborenen. *Klin Padiatr* 222 (S01).
- Hofer, N., Zacharias, E., Müller, W., Resch, B., 2012. An Update on the Use of C-Reactive Protein in Early-Onset Neonatal Sepsis: Current Insights and New Tasks. *Neonatology* 102, 25-36.
- Hofmann, T., 2000. Neue Chemosensoren zur Aromastoffmessung. *NadC* 48 (7-8), 938-941.
- Hornik, C.P., Fort, P., Clark, R.H., Watt, K., Benjamin, D.K.Jr., Smith, P.B., Manzoni, P., Jacqz-Aigrain, E., Kaquelidou, 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 Hum Dev* 88, 69-74.
- Husain, A.N., Siddiqui, N.H., Stocker, J.T., 1998. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 29 (7), 710-717.
- IQTIG. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, 2021. Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020.

https://iqtig.org/downloads/auswertung/2020/16n1gebh/QSKH_16n1-GEBH_2020_BUAW_V01_2021-08-10.pdf. Abrufdatum 15.08.2023.

- Jensen, E.A., Schmidt, B., 2014. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100 (3), 145-157.
- Jobe, A.J., 1999. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 46 (6), 641-643.
- Jobe, A.H., Bancalari, E., 2001. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 1723-1729.
- Källman, J., Schollin, J., Schalèn, C., Erlandsson, A., Kihlström, E., 1998. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 78(1), 46-50.
- Kalman, E.L., Winqvist, F., Löfvendahl, A., Rudell, B., Wass, U., 2002. Chemical Gas Sensors for Car Exhaust and Cabin Air Monitoring. *Indoor Built Environ* 11, 105-110.
- 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.
- Koczulla, A.R., Hattesoehl, A., Jörres, R.A., Noeske, S., Schmid, S., Vogelmeier, C., Bals, R., 2009. Die elektronische Nase 320R unterscheidet das Atemwegskondensat von Patienten mit COPD, Alpha-1-Antitrypsin Mangel und gesunden Kontrollen. *Pneumologie* 63 A6.
- Koczulla, A.R., Noeske, S., Herr, C., Jörres, R.A., Römmelt, H., Vogelmeier, C., Bals, R., 2010. Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled breath condensate in current smokers. *Respiration* 79 (1), 61-67.
- Koczulla, A.R., Hattesoehl, A., Biller, H., Hofbauer, J., Hohlfeld, J., Oeser, C., Gessner, C., Vogelmeier, C., Baumbach, J.I., Wirtz, H., Jörres, R.A., 2011. Krankheiten erriechen? Eine kurze Übersicht über elektronische Nasen. *Pneumologie* 65 (7), 401-405.
- Kodogiannis, V., Wadge, E., 2005. The use of gas-sensor arrays to diagnose urinary tract infections. *Int J Neural Syst*. 15 (5), 363-376.
- Köstlin-Gille, N., Härtel, C., Haug, C., Göpel, W., Zemlin, M., Müller, A., Poets, C.F., Herting, E., Gille, C., 2021. Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal

-
- Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data From the German Neonatal Network. *Pediatr Infect Dis J* 40(3), 255-259.
- Laborada, G., Rego, M., Jain, A., Guliano, M., Stavola, J., Ballabh, P., Krauss, A.N., Auld, P.A.M., Nesin, M., 2003. Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 20 (8), 491-502.
- Lal, C.V., Ambalavanan, N., 2015. Genetic predisposition to bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 39 (8), 584-591.
- Levy, O., 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7 (5), 379-90.
- Lif Holgerson, P., Harnevik, L., Hernell, O., Tanner, A.C., Johansson, I., 2011. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *J Dent Res* 90 (10), 1183-1188.
- Ma, Y.N., Wang, J., Lee, Y.L., Ren, W.H., Lv, X.F., He, Q.C., Dong, G.H., 2015. Association of urine CC16 and lung function and asthma in Chinese children. *Allergy Asthma Proc* 36 (4), 59-64.
- MacGillivray, D.M., Kollmann, T.R., 2014. The role of environmental factors in modulations immune responses in early life. *Frontiers in Immunology* 5, 1-12.
- 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 Paediatr* 89 (9), 1082-1086.
- Mathers, N.J., Pohlandt, F., 1987. Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. *Eur J Pediatr* 146 (2), 147-151.
- Mayor, A., Reade, S., Aggio, R., Khalid, T., Probert, C., 2014. Paediatric Faecal Voc Analysis: Method Optimisation. *Gut* 63, 2018.
- McCarron, M.J., Reen, D.J., 2010. Neonatal CD8+ T-cell differentiation is dependent on interleukin-12. *Hum Immunol* 71 (12), 1172-1179.
- McFarlane, M., Mozdiak, E., Daulton, E., Arasaradnam, R., Covington, J., Nwokolo, C., 2020. Pre-analytical and analytical variables that influence urinary volatile organic compound measurements. *PLoS One* 15 (7): e0236591.
- Meem, M., Modak, J.K., Mortuza, R., Morshed, M., Islam, M.S., Saha, S.K., 2011. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *Literaturübersicht potentieller Biomarker für die Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen unter dem Aspekt der Anwendbarkeit in Schwelle- und Entwicklungsländern. J Global Health* 1(2), 201-209.

- Michaelsson, J., Mold, J.E., McCune, J.M., Nixon, D.F., 2006. Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol* 176, 5741– 5748.
- 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. *J Perinatol* 16 (6), 422-428.
- Morbach, H., Eichhorn, E.M., Liese, J.G., Girschick, H.J., 2010. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 162 (2), 271-279.
- Morzell, M., Jeannin, A., Lucchi, G., Truntzer, C., Pecqueur, D., Nicklaus, S., Chambon, C., Ducoroy, P., 2012. Human infant saliva peptidome is modified with age and diet transition. *J Proteomics* 75 (12), 3665-3673.
- Mourani, P.M., Sontag, M.K., Younoszai, A., Miller, J.I., Kinsella, J.P., Baker, C.D., Poindexter, B.B., Ingram, D.A., Abman, S.H., 2015. Early pulmonary vascular disease in preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 191 (1), 87-95.
- 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? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 96 (1), 4-8.
- Muthukkumar, S., Goldstein, J., Stein, K.E., 2000. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. *J Immunol* 165 (9), 4803-4813.
- Nardi-Agmon, I., Peled, N., 2017. Exhaled breath analysis for the early detection of lung cancer: recent developments and future prospects. *Lung Cancer (Auckl.)* 8, 31-38.
- NICE. National Institute for Health and Care Excellence, 2021. Neonatal infection: antibiotics for prevention and treatment. NICE guideline 195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK571222>. Abrufdatum 15.08.2023.
- Northway, W.H., Rosan, R.C., Porter, D.Y., 1967. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276 (7), 357-368.
- NRZ. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. KISS (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System), 2017. URL: https://www.nrz-hygiene.de/files/KISS-Definitionen/KISS_Definitionen_E-Book_Neuaufgabe_06_2017.pdf . Abrufdatum: 15.08.2023.
- Nussbaum, C., Gloning, A., Pruenster, M., Frommhold, D., Bierschenk, S., Genzel-Boroviczény, O., von Andrian, U.H., Quackenbush, E., Sperandio, M., 2013. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *J Leukoc Biol* 93(2), 175-184.

-
- 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, A., Anton, H., Moons, K.G., Offringa, M., 2013. Clinical prediction models for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and external validation study. *BMC Pediatr* 13, 207.
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A.L., Zago, C.A., Carneiro-Sampaio, M., 2012. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*, 2012: 985646.
- Pavlou, A.K., Magan, N., McNulty, C., Jones, J.M., Sharp, D., Brown, J., Turner, A.P.F., 2002. Use of an electronic nose system for diagnoses of urinary tract infections. *Biosens Bioelectron* 17 (10), 893–899.
- Perin J., Mulick, A., Yeung, D., Villavicencio, F., Lopez, G., Strong, K.L., Prieto-Merino, D., Cousens, S., Black, R.E., Liu, L., 2022. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc Health* 6(2),106-115.
- Plaza, V., Crespo, A., Giner, J., Merino, J.L., Ramos-Barbón, D., Mateus, E.F., Torrego, A., Cosio, B.G., Agustí, A., Sibila, O., 2015. Inflammatory Asthma Phenotype Discrimination Using an Electronic Nose Breath Analyzer. *J Investig Allergol Clin Immunol* 25 (6), 431-437.
- Popova, A., Bentley, J.K., Cui, T.X., Richardson, M.N., Lei, J., Chen, Q., Goldsmith, A.M., Pryhuber, G.S., Hershenson, M.B., 2014. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307(3), 231–239.
- Puopolo, K.M., Draper, D., Wi, S., Newman, T.B., Zupancic, J., Lieberman, E., Smith, M., Escobar, G.J., 2011. Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics* 128(5), 1155-1163.
- Rivera, L., Siddaiah, R., Oji-Mmuo, C., Silveyra, G.R., Silveyra, P., 2016. Biomarkers for Bronchopulmonary Dysplasia in the Preterm Infant. *Front Pediatr* 4, 33.
- Roberts, D., Dalziel, S., 2006. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 19 (3), CD004454.

-
- Rojas, M.A., Gonzalez, A., Bancalari, E., Claire, N., Poole, C., Silva-Neto, G., 1995. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 126 (4), 605-610.
- Rogosch, T., Herrmann, N., Maier, R.F., Domann, E., Hattesoehl, A., Koczulla, A.R., Zemlin, M., 2014. Detection of primary bloodstream infections and prediction of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates by using an electronic nose. *J Pediatr* 165 (3), 622-624.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Hoß, K., Hoersch, G., Zemlin, C., Heckmann, M., Berek, C., Schroeder Jr., H.W., Maier, R.F., Zemlin, M., 2012. IgA Response in Preterm Neonates Shows Little Evidence of Antigen-Driven Selection. *J Immunol* 189 (11), 5449-5456.
- Rohwedder, I., Wackerbarth, L.M., Heinig, K., Ballweg, A., Altstätter, J., Ripphahn, M., Nussbaum, C., Salvermoser, M., Bierschenk, S., Straub, T., Gunzer, M., Schmidt-Supprian, M., Kolben, T., Schulz, C., Ma, A., Walzog, B., Heinig, M., Sperandio, M., 2023. A20 and the noncanonical NF-κB pathway are key regulators of neutrophil recruitment during fetal ontogeny. *JCI Insight* 8(4): e155968.
- Romero, R., Espinoza, J., Goncalves, L.F., Kusanovic, J.P., Friel, L., Hassan, S., 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 25, 21–39.
- Roos, R., Genzel-Boroviczeny, O., Proquitté, H.M., 2010. Checkliste Neonatologie, 4., überarbeitete Auflage ed. Thieme, Stuttgart, Online Ressource.
- Rudd, B.D., 2020. Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol* 38, 229-247.
- Salvolini, E., Mazzanti, L., Martarelli, D., Di Giorgio, R., Fratto, G., Curatola, G., 1999. Changes in the composition of human unstimulated whole saliva with age. *Aging (Milano)* 11 (2), 119-122.
- Schelonka, R.L., Yoder, B.A., Hall, R.B., Trippett, T.M., Louder, D.S., Hickman, J.R., Guerra, C.G., 1995. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. *J Pediatr* 127(2), 298-300.
- Schmutz, N., Henry, E., Jopling, J., Christensen, R.D., 2008. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Monroe and Mouzinho charts revisited. *J Perinatol* 28, 275–281.
- Schüller, S.S., Sadeghi, K., Wisgrill, L., Dangl, A., Diesner, S.C., Prusa, A.R., Klebermasz-Schrehof, K., Greber-Platzer, S., Neumüller, J., Helmer, H., Husslein, P., Pollak, A., Spittler, A., Förster-Waldl, E., 2013. Preterm

- neonates display altered plasmacytoid dendritic cell function and morphology. *J Leukoc Biol* 93 (5), 781-788.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U, 2009. Prometheus Lernatlas der Anatomie, 2. Auflage. Aufbau und Embryonalentwicklung der Organsysteme, Lungenentwicklung- und reifung. Georg Thieme Verlag, 26-27.
- Segel, G.B., Halterman, J.S., 2008. Neutropenia in pediatric practice. *Pediatr Rev* 29 (1), 12-23.
- Shafiek, H., Fiorentino, F., Merino, J.L., López, C., Oliver, A., Sequra, J., de Paul, I., Sibila, O., Agustí, A., Cosío, B.G., 2015. Using the Electronic Nose to Identify Airway Infection during COPD Exacerbations. *PLoS One* 10 (9): e0135199.
- Shah, B.A., Padbury, J.F., 2014. Neonatal sepsis: An old problem with new insights. *Virulence* 5 (1), 170-178.
- Simister, N.E., 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21 (24), 3365-3369.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.L., Angus, D.C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8), 801-810.
- Slayton, W.B., Li, Y., Calhoun, D.A., Juul, S.E., Iturraspe, J., Braylan, R.C., Christensen, R.D., 1998. The first-appearance of neutrophils in the human fetal bone marrow cavity. *Early Hum Dev* 53(2), 129-144.
- Sokol, C.L., Luster, A.D., 2015. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(5): a016303.
- Speer, C.P., 2006. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonat M* 11, 354-362.
- Speer, C.P., 2006. Pulmonary inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 1, 57-62.
- Speer, C.P., 2009. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 95 (4), 353-361.
- Steinman R.M., 2001. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 68(3), 160-166.
- 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, W.K., 2002. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 347 (4), 240-247.

- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, 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 (2Pt1), 285-291.
- 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, K.P., Faix, R.G., Phelbs, D.L., Frantz, I.D., Watterberg, K.L., Saha, S., Das, A., Higgins, R.D., 2010. Neonatal outcomes of extremely premature infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 126 (3), 443-456.
- Stoll, B.J., Hansen, N.I., Bell, E.F., Walsh, M.C., Carlo, W.A., Shankaran, S., Laptook, A.R., Sánchez, P.J., Van Meurs, K.P., Wyckoff, M., Das, A., Hale, E.C., Ball, M.B., Newman, N.S., Schibler, K., Poindexter, B.B., Kennedy, K.A., Cotten, C.M., Watterberg, K.L., D'Angio, C.T., DeMauro, S.B., Truog, W.E., Devaskar, U., Higgins, R.D., 2015. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA* 314 (10), 1039-1051.
- Taghizadeh, A., Reynolds, E.O., 1976. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia following hyaline membrane disease. *Am J Pathol* 82 (2), 241-264.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249 (1), 158-175.
- Tessema, B., Lippmann, N., Willenberg, A., Knüpfer, M., Sack, U., König, B., 2020. The Diagnostic Performance of Interleukin-6 and C-Reactive Protein for Early Identification of Neonatal Sepsis. *Diagnostics (Basel)* 10 (11), 978.
- Testoni, D., Hayashi, M., Cohen-Wolkowicz, M., Benjamin, D.K.Jr., Lopes, R.D., Clark, R.H., Benjamin, D.K., Smith, P.B., 2014. Late-Onset Bloodstream Infections in Hospitalized Term Infants. *Pediatr Infect Dis J* 33 (9), 920-923.
- Thébaud, B., Goss, K.N., Laughon, M., Whitsett, J.A., Abman, S.H., Steinhorn, R.H., Aschner, J.L., Davis, P.G., McGrath-Morrow, S.A., Soll, R.F., Jobe, A.H., 2019. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers* 5 (1), 78.
- Tissières, P., Ochoda, A., Dunn-Siegrist, I., Drifte, G., Morales, M., Pfister, R., Berner, M., Pugin, J., 2012. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ . *PLoS One* 7 (3): e32863.
- Todd, D.A., Earl, M., Lloyd, J., Greenberg, M., John, E., 1998. Cytological changes in endotracheal aspirates associated with chronic lung disease. *Early Hum Dev* 51 (1), 13-22.

- Ussat, M., Vogtmann, C., Gebauer, C., Pulzer, F., Thome, U., Knupfer, M., 2015. The role of elevated central-peripheral temperature difference in early detection of late-onset sepsis in preterm infants. *Early Hum Dev* 91 (12), 677-681.
- Valentine, S.L., Bateman, S.T., 2012. Identifying factors to minimize phlebotomy-induced blood loss in the pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 13 (1), 22-27.
- Van Geffen, W.H., Bruins, M., Kerstjens, H.A., 2016. Diagnosing viral and bacterial respiratory infections in acute COPD exacerbations by an electronic nose: a pilot study. *J Breath Res* 10 (3), 036001.
- Vinall, J., Grunau, R.E., 2014. Impact of repeated procedural pain-related stress in infants born very preterm. *Pediatr Res* 75 (5), 584-587.
- Visser, E.H., Berkhout, D.J.C., Singh, J., Vermeulen, A., Ashtiani, N., Boer, N.K., Wijk, J.A.E.V., Meij, T.G., Bökenkamp, A., 2020. Smell - Adding a New Dimension to Urinalysis. *Biosensors (Basel)* 10 (5), 48.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9 (5), 503-510.
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L., 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* 5, 494.
- Walka, M.M., Sonntag, J., Kage, A., Dudenhausen, J.W., Obladen, M., 1998. Complete blood counts from umbilical cords of healthy term newborns by two automated cytometers. *Acta Haematol* 100 (4), 167-173.
- Walsh, M.C., Yao, Q., Gettner, P., Hale, E., Collins, M., Hensman, A., Everette, R., Peters, N., Miller, N., Muran, G., Auten, K., Newman, N., Rowan, G., Grisby, C., Arnell, K., Miller, L., Ball, B., McDavid, G., 2004. Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatr* 114 (5), 1305-1311.
- Weston, E.J., Pondo, T., Lewis, M.M., Martell-Cleary, P., Morin, C., Jewell, B., Daily, P., Apostol, M., Petit, S., Farley, M., Lynfield, R., Reingold, A., Hansenm N.I., Stoll, B.J., Shane, A.L., Zell, E., Schrag, S.J., 2011. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. *Pediatr Infect Dis J*, 30 (11), 937-941.
- Whitsett, J.A., Wert, S.E., Weaver, T.E., 2015. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu Rev Pathol* 10, 371-393.
- 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. *Pediatr Crit Care Med* 15 (4), 299-305.

-
- World Health Organisation (WHO), 2012. Born too soon: The Global Action Report on Preterm Birth, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241503433>. Abrufdatum 15.08.2023.
- Wright, H., Bannaga, A.S., Iriarte, R., Mahmoud, M., Arasaradnam, R.P., 2021. Utility of volatile organic compounds as a diagnostic tool in preterm infants. *Pediatr Res* 89 (2), 263-268.
- Wynn, J.L., Hansen, N.I., Das, A., Cotten, C.M., Goldberg, R.N., Sanchez, P.J., Bell, E.F., Van Meurs, K.P., Carlo, W.A., Laptook, A.R., Higgins, R.D., Benjamin Jr, D.K., Stoll, B.J., 2013. Early sepsis does not increase the risk of late sepsis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 162 (5), 942-948.
- Yoon, B.H., Romero, R., Jun, J.K., Park, K.H., Park, J.D., Ghezzi, F., Kim, B.I., 1998. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 177 (4), 825-830.
- Younge, N., Goldstein, R.F., Bann, C.M., Hintz, S.R., Patel, R.M., Smith, P.B., Bell, E.F., Rysavy, M.A., Duncan, A.F., Vohr, B.R., Das, A., Goldberg, R.N., Higgins, R.D., Cotten, C.M., 2017. *New Engl J Med* 376 (7), 617- 628.
- Zaghouani, H., Hoeman, C.M., Adkins, B., 2009. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol* 30 (12), 585-591.
- Zemlin, M., 2015. Klinische, mikrobiologische und laborchemische Diagnostik bakterieller Infektionen bei Früh- und Reifgeborenen. *Neonatologie Scan* 2015, 04 (04), 317-334.
- Zilow, E.P., Zilow, G., 1998. Entwicklung des Immunsystems von Fetus und Neugeborenem, in (Hrsg.): Friese, K., Kachel, W., 1998. *Infektionserkrankungen der Schwangeren und des Neugeborenen*. Springer Berlin Heidelberg, 23-24.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BE	Base Excess
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
CDC	Center of Disease Control
CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CTL	zytotoxische T-Zelle
CVV	Kreuzvalidierungswert
Cyranose	elektronische Nase
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
ELBW infant	extremely low birth weight infant (Geburtsgewicht < 1000 g)
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
MHD	Mahalanobisdistanz
NaCl	Natriumchlorid
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NEO-KISS	neonatologisches Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NIH	National Institute of Health
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PRR	Pattern-Recognition-Receptor
rpm	revolutions per minute

SIRS	septic inflammatory response syndrome
SOP	Standard Operating Procedure
SSW	Schwangerschaftswoche
Th	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
VOCs	volatile organic compounds
VLBW infant	very low birth weight infant (Geburtsgewicht < 1500 g)

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Neo-KISS-Kriterien einer Sepsis durch nosokomiale Infektion, modifiziert nach (Ussat et al., 2015; NRZ, 2017; AWMF, 2021;)
- Abbildung 2 Die Phasen der pulmonalen Entwicklung, modifiziert nach (Rivera et al., 2016)
- Abbildung 3 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit (inf⁺) und ohne (inf⁻) akuter Infektion, unabhängig von einer antibiotischen Therapie; äquivalent der statistischen Ergebnisse sind die Punktwolken in dieser Darstellung nicht voneinander differenzierbar (MHD: 1,071, CVV: 49,06 %)
- Abbildung 4 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Trachealaspiratproben Frühgeborener ohne (inf⁻) und mit (inf⁺) akuter systemischer Infektion, noch vor Einleitung einer antibiotischen Therapie (abx⁻); aus diesem Blickwinkel können die Gruppen anhand der Abbildung äquivalent der statistischen Ergebnisse voneinander differenziert werden (**MHD: 2,055**, CVV: 31,25 %)
- Abbildung 5 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit (inf⁺) und ohne (inf⁻) akuter Infektion, unabhängig von einer antibiotischen Therapie; anhand der Abbildung ist äquivalent der statistischen Ergebnisse keine Differenzierung zwischen den Gruppen möglich (MHD: 1,262, CVV: 47,44 %)
- Abbildung 6 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener ohne akute Infektion (inf⁻) und mit (abx⁺) bzw. ohne (abx⁻) antibiotischer Therapie; aus dem hier gezeigten zweidimensionalen Blickwinkel ist eine Differenzierung zwischen den Gruppen anhand der Abbildung nur bedingt möglich (**MHD: 2,51**, CVV: 53,29 %)
- Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit (BPD) und ohne (no BPD) BPD; eine Differenzierung zwischen den Gruppen ist äquivalent der statistischen Ergebnisse auch anhand der Abbildung nicht möglich (MHD: 1,185, CVV: 48,12 %)

-
- Abbildung 8 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von früh im Verlauf gewonnenen Trachealspiratproben Frühgeborener mit (BPD 1) bzw. ohne (no BPD 1) sich entwickelnder BPD; der in der Abbildung dargestellte Abstand zwischen den Punktwolken ist kongruent zu dem ermittelten statistischen Ergebnis (**MHD: 2,067**, CVV: 59,52 %)
- Abbildung 9 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von früh im Verlauf gewonnenen Urinproben Frühgeborener mit (BPD 1) bzw. ohne (no BPD 1) sich entwickelnder BPD; aus dem hier gezeigten zweidimensionalen Blickwinkel ist eine Differenzierung der Gruppen nur bedingt möglich (**MHD: 2,074**, CVV: 59,18 %)
- Abbildung 10 Zweidimensionale Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener mit (BPD) und ohne (no BPD) BPD; Anhand der Abbildung ist eine Differenzierung zwischen den Punktwolken äquivalent zu dem ermittelten statistischen Ergebnis nicht möglich (MHD: 1,647, CVV: 62,5 %)

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gruppeneinteilung der Frühgeborenen im Hinblick auf das Vorliegen einer akuten systemischen Infektion sowie einer antibiotischen Therapie
Tabelle 2	Gruppeneinteilung der Frühgeborenen im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD und den Zeitpunkt der Probenentnahme
Tabelle 3	Liste der verwendeten Materialien, Geräte und Software
Tabelle 4	Zeitplan zur Probengewinnung je nach Bioprobe
Tabelle 5	Charakterisierung der Frühgeborenen
Tabelle 6	Zahl und Art der Bioproben pro Kind
Tabelle 7	Anzahl der Proben nach Gruppeneinteilung in Proben von Frühgeborenen mit und ohne akuter systemischer Infektion und gleichzeitig vorliegender sowie nicht vorliegender antibiotischer Behandlung
Tabelle 8	Anzahl der Proben nach Gruppeneinteilung in Proben von Frühgeborenen mit und ohne bronchopulmonale Dysplasie, sowie dem Zeitpunkt der Probenentnahme
Tabelle 9	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Speichelproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose
Tabelle 10	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Trachealaspiratproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose
Tabelle 11	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Urinproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose
Tabelle 12	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Stuhlproben anhand des Vorliegens einer akuten systemischen Infektion und einer gleichzeitigen antibiotischen Therapie mittels Cyranose

Tabelle 13	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Speichelproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung
Tabelle 14	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Tracheal aspiratproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung
Tabelle 15	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Urinproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung
Tabelle 16	Statistische Ergebnisse der Untersuchungen der Smellprints von Stuhlproben Frühgeborener mit bzw. ohne BPD sowie bezüglich des Zeitpunkts der Probengewinnung

7.4 Standard Operating Procedures (SOPs)

SOP „Gewinnung von Urinproben bei Frühgeborenen“

1. Zeitpunkt der Gewinnung:

- jeden Donnerstag für 6 Wochen (parallel zur routinemäßigen Uringewinnung)

2. Methodik der Gewinnung von Urinproben

- für die Studie werden gesammelt: alle Urinproben parallel zur routinemäßigen Urinsammlung mittels Urinbeutel 1x/ Woche
- eine Person
- zusätzliches Probenröhrchen bereitlegen
- Urinbeutel vorsichtig lösen, neben den routinemäßig entnommenen Proben mindestens 2 ml Urin in das zusätzliche Röhrchen füllen

3. Probenverarbeitung

- Röhrchen mit Patientennamen, Datum, Uhrzeit beschriften
- Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank lagern
- Information Labor: Frau Stöhr, Frau Jennemann. Tel. 64247, Email neonatologie-labor@med.uni-marburg.de
Oder lena.feldhaus@freenet.de 017632609562
- täglich um 7:30 Uhr prüfen Frau Stöhr, Frau Jennemann oder Lena Feldhaus, ob neue Proben vorliegen
- Probe wird ins Labor geholt, erfasst, pseudonymisiert (Vergabe eines Nummernschlüssel)
- Aliquotierung in pseudonymisierte Eppendorfgefäße mit jeweils 0,5 ml Urin
- Lagerung der Proben im Labor bei -20 °C
- Messung mittels Cyranose im Labor

SOP „Gewinnung von Stuhlproben bei Frühgeborenen“

1. Zeitpunkt der Gewinnung:

- jeden Donnerstag für 6 Wochen

2. Methodik der Gewinnung von Stuhlproben

- für die Studie werden gesammelt: Stuhlproben für 6 Wochen 1x/ Woche
- eine Person
- Stuhlprobenröhrchen bereitlegen
- Windel vorsichtig öffnen
- Stuhlprobe aus hinterem Teil der Windel mittels Spatel entnehmen, möglichst nicht die Windel berühren
- Stuhlprobe in Probenröhrchen geben

3. Probenverarbeitung

- Röhrchen mit Patientennamen, Datum, Uhrzeit beschriften
- Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank lagern
- Information Labor: Frau Stöhr, Frau Jennemann. Tel. 64247, Email neonatologie-labor@med.uni-marburg.de
Oder lena.feldhaus@freenet.de 017632609562
- täglich um 7:30 Uhr prüfen Frau Stöhr, Frau Jennemann oder Lena Feldhaus, ob neue Proben vorliegen
- Probe wird ins Labor geholt, erfasst, pseudonymisiert (Vergabe eines Nummernschlüssel)
- Mengenbestimmung mittels wiegen
- Aliquotierung in pseudonymisierte 2 ml Eppendorfgeläße: je 0,2 g Stuhlprobe abwiegen, 0,1 ml NaCl 0,9 % Lösung zugeben und für drei Sekunden in einer Minizentrifuge zentrifugieren, dann für fünf Sekunden im Vortexer vermischen
- Lagerung der Proben im Labor bei -20 °C
- Messung mittels Cyranose

SOP „Gewinnung von Speichelproben bei Neugeborenen“

1. Zeitpunkt der Gewinnung:

- jeden Montag für 6 Wochen

2. Methodik der Gewinnung von Speichelproben

- für die Studie werden gesammelt: Speichelproben vor der nächsten Mahlzeit
- eine Person
- bereitlegen:
 - Wattestäbchen NOBA Verbandsmittel Danz GmbH u. Co., Wetter
 - Cellstar Tube (15 ml) Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Wattestäbchen für 10 Minuten in die Wangentasche des Kindes einführen
- Wattestäbchen in das Cellstar Tube geben und verschließen

3. Probenverarbeitung

- Röhrchen mit Patientennamen, Datum, Uhrzeit beschriften
- Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank lagern
- Information Labor: Frau Stöhr, Frau Jennemann. Tel. 64247, Email neonatologie-labor@med.uni-marburg.de
- Oder lena.feldhaus@freenet.de 017632609562
- täglich um 7:30 Uhr prüfen Frau Stöhr, Frau Jennemann oder Lena Feldhaus, ob neue Proben vorliegen
- Probe wird ins Labor geholt, erfasst, pseudonymisiert (Vergabe eines Nummernschlüssel)
- Extraktion des Speichels durch Zentrifugieren: Das Wattestäbchen wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit abgetrenntem Boden eingebracht, dieses wird wiederum in das 15 ml Probenröhrchen überführt und bei 4000 rpm und 23 °C für 10 Minuten zentrifugiert
- Aliquotierung in pseudonymisierte Eppendorfgefäße
- Lagerung der Proben im Labor bei -20 °C
- Messung mittels Cyranose

SOP „Gewinnung von Trachealspirat bei Frühgeborenen“

Äquivalent der Vorgängerstudie (Rogosch et al., 2014; Herrmann, 2019)

1. Zeitpunkt der Gewinnung:

- zum Zeitpunkt der ersten Intubation
- wenn die Extubation unmittelbar bevorsteht
- wenn es klinische Hinweise auf einen Sekretverhalt gibt

2. Methodik der Gewinnung von Trachealspiratproben

- für die Studie werden gesammelt: Alle Trachealspirate der ersten Intubation, Trachealspirat vor Extubation, jedes Trachealspirat das im Rahmen des Absaugens gewonnen werden kann
- zwei Personen
- Länge des Tubus am Absaugkatheter markieren (korrekte Einführtiefe)
- Sekretfalle in den Absaugschlauch einfügen
- 0,5 ml NaCl 0,9 % Lösung 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 % Lösung 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 Katheter in den Tubus ein 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 neonatologie-labor@med.uni-marburg.de

Oder lena.feldhaus@freenet.de

017632609562

- täglich um 7:30 Uhr prüfen Frau Stöhr, Frau Jennemann oder Lena Feldhaus, ob neue Proben vorliegen
- Probe wird ins Labor geholt, erfasst, pseudonymisiert (Vergabe eines Nummernschlüssel)

- Mengenbestimmung mittels wiegen
- Aliquotierung in pseudonymisierte Probenröhrchen mit jeweils 0,5 ml Trachealspirat
- Lagerung der Proben im Labor bei -20 °C,
- Messung mittels Cyanose

7.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Bartsch, Becker, Bette, Brehm, Bien, Cetin, Daut, Dodel, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grundmann, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kaider, Kill, Kircher, Kruse, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Maier, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neff, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Opitz, Oliver, Pagenstecher, Plant, Renz, Reese, Rost, Ruchholtz, Schieffer, Schratt, Sahmland, Sekundo, Thieme, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zovko.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Maier danke ich für die Überlassung dieses spannenden und zukunftssträchtigen Themas sowie ganz besonders für die überaus kompetente, geduldige und freundliche Begleitung dieser Dissertation.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Zemlin für die nette und unermüdliche Betreuung bei der Laborarbeit sowie bei der Verfassung dieser Dissertation. Nicht nur fachlich, sondern auch menschlich war mir Herr Prof. Dr. Zemlin mit seiner Hilfsbereitschaft und seinem Engagement stets ein Vorbild. Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Goedicke-Fritz danken, die stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Herrn Dr. Rogosch und Herrn Konrad Krahl möchte ich für die engagierte Hilfe bei der statistischen Auswertung danken. Ebenso danke ich Sabine Jennemann und Regina Stöhr, die mich geduldig und mit Spaß an die Arbeit in einem Labor heranführten.

Zudem möchte ich den Teams der Neugeborenen-Intensivstation 7 und der Station 042 der Neonatologie des Universitätsklinikums Marburg für die stetige Unterstützung und hohe Motivation diese Studie durchzuführen danken. Insbesondere als Mutter bin ich auch allen Eltern, die sich gemeinsam für eine Studienteilnahme Ihrer Kinder entschieden haben, zu großem Dank verpflichtet.

Zuletzt gilt mein Dank all den wunderbaren Menschen, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet haben. Insbesondere gilt mein Dank meinem Ehemann Lucas Panning, der auch in schwierigen Zeiten für mich da war, sowie meiner großartigen Familie, die mir jederzeit ermutigend zur Seite stand. Frau Dr. Julie Jost danke ich von ganzem Herzen dafür, jederzeit an mich und an diese Dissertation geglaubt zu haben.