

**Normoblasten bei Früh- und Reifgeborenen:  
Untersuchungen zur Kinetik und diagnostische  
Wertigkeit bei der Early-onset-Infektion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Heiner, Nicole**

**2016**

**Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth**  
**1. Berichterstatter: Professor Dr.Th. Orlikowsky**  
**2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Franz**

**Meinen Eltern und Großeltern zum Dank**

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>Abkürzungen</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Die neonatale bakterielle Infektion	12
1.2 Die Early-onset-Infektion	13
1.3 Die Late-onset-Infektion	14
1.4. Symptome der EOBI	15
1.5 Folgen der EOBI	16
1.6 Die Besonderheiten des Immunsystems bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen	17
1.7 Pathophysiologie einer bakteriellen Infektion	19
1.8 Diagnostik der EOBI	20
1.8.1 Infektionsparameter	20
1.9 Linksverschiebung entsprechend zur weißen auch in der roten Blutreihe? - Normoblasten als potentieller Infektparameter	23
1.10 Entstehung von Normoblasten - Erythropoese	25
1.10.1 Proerythroblasten	26
1.10.2 Erythroblasten	26
1.10.3 Normoblasten	27
1.10.4 Retikulozyten	27
1.11 Normoblasten-Vorkommen im peripheren Blut	28
1.12 Methoden zur Normoblastenzählung	32
1.12.1 Manuelle Zählung	32

1.12.2 Durchflusszytometrische Zählung	32
1.12.3 Zählung an Hämatologie-Analysatoren der neueren Generation (z.B. Sysmex XN/ XE-2100)	33
1.13 Zielsetzung der Arbeit	34
<b>2. Material und Methodik</b>	<b>36</b>
2.1 Patienten	36
2.1.1 Erhebungsbogen	37
2.1.2 Ausschlusskriterien	38
2.1.3 Definition einer Early-onset-Infektion	38
2.1.4 Procedere	38
2.2 Messverfahren	40
2.2.1 Bestimmung der Normoblasten	40
2.2.2 Bestimmung der Leukozyten	41
2.2.3 Bestimmung des C-reaktiven Proteins	41
2.2.4 Bestimmung von Interleukin-8 im Plasma	41
2.2.5 Mikrobiologische Untersuchung	41
2.3 Statistische Auswertung	42
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Patientenmerkmale	46
3.1.1 Gestationsalter	47
3.1.2 Geburtsgewicht	47
3.2 Mikrobiologische Ergebnisse	48
3.3 Klinische Auffälligkeiten	48
3.4 Antibiotika-Therapie	49
3.5 Kinetik der Normoblasten	50
3.5.1 Kinetik der Normoblasten bei Reifgeborenen ohne EOBI	50

<b>3.5.2 Kinetik der Normoblasten bei Frühgeborenen ohne EOBI</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Einfluss des Gestationsalters auf die Normoblasten</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Einfluss des Geburtsgewichts auf die Normoblasten</b>	<b>55</b>
<b>3.8 Einfluss von Hypotrophie/ Hypertrophie auf die Normoblasten</b>	<b>58</b>
<b>3.9 Einfluss des Geschlechts auf die Normoblasten</b>	<b>59</b>
<b>3.10 Kinetik der Normoblasten bei Reifgeborenen mit EOBI im Vergleich zu Reifgeborenen ohne EOBI</b>	<b>60</b>
<b>3.11 Kinetik der Normoblasten bei Frühgeborenen mit EOBI im Vergleich zu Frühgeborenen ohne EOBI</b>	<b>62</b>
<b>3.12 Receiver operator characteristic (ROC)- Kurven</b>	<b>63</b>
<b>3.12.1 ROC-Kurven für Normoblasten bei Reifgeborenen</b>	<b>63</b>
<b>3.12.2 ROC-Kurven für Normoblasten bei Frühgeborenen</b>	<b>64</b>
<b>3.13 Diagnostische Wertigkeit von Normoblasten bei der EOBI bei Reifgeborenen</b>	<b>66</b>
<b>3.14 Diagnostische Wertigkeit von Normoblasten bei der EOBI bei Frühgeborenen</b>	<b>67</b>
<b>3.15 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen</b>	<b>68</b>
<b>3.16 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Frühgeborenen</b>	<b>71</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Ziel der Arbeit</b>	<b>74</b>
<b>4.2 Normoblasten</b>	<b>75</b>
<b>4.2.1 Kinetik der Normoblasten bei Reif- und Frühgeborenen</b>	<b>75</b>
<b>4.2.2 Einflussfaktoren auf die Normoblasten</b>	<b>78</b>
<b>4.2.3 Einfluss des Gestationsalters auf die Normoblasten</b>	<b>80</b>
<b>4.2.4. Einfluss des Geburtsgewichts auf die Normoblasten</b>	<b>81</b>

4.2.5 Einfluss von Hypotrophie/ Hypertrophie auf die Normoblasten	83
4.2.6 Einfluss des Geschlechts auf die Normoblasten	85
4.3 Verhalten der Normoblasten im Rahmen einer Early-onset-Infektion	85
4.4 Normoblasten als prädiktiver Marker einer Early-onset-Infektion bei Früh- und Reifgeborenen	87
4.5 Methodenkritik	90
4.5.1 Patientenkollektiv	90
4.5.2 Messung mit dem Sysmex XE-2100	91
4.5.3 Diagnose der neonatalen bakteriellen Infektion	92
4.5.4 Anforderung an Infektparameter	93
4.5.5 Statistische Auswertung	94
4.6 Normoblasten als Infektparameter: Schlussfolgerung	96
5. Zusammenfassung	98
6. Anhang	100
7. Literaturverzeichnis	101
8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	118
9. Danksagung	119
10. Lebenslauf	120

## **Abkürzungen:**

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

<b>Abb</b>	<b>Abbildung</b>
<b>AIS</b>	<b>Amnioninfektionssyndrom</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Analysis of variance</b>
<b>BPD</b>	<b>Bronchopulmonale Dysplasie</b>
<b>CRP</b>	<b>C-reaktives Protein</b>
<b>CTG</b>	<b>Kardiotokogramm</b>
<b>d</b>	<b>Tage</b>
<b>DAPI</b>	<b>4', 6-Diamidino-2-phenylindol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
<b>EOBI</b>	<b>Early-onset-bacterial infection</b>
<b>EONS</b>	<b>Early-onset-neonatal sepsis</b>
<b>FIRS</b>	<b>Fetal inflammatory response syndrome</b>
<b>FG</b>	<b>Frühgeborenes</b>
<b>g</b>	<b>Gramm</b>
<b>G-CSF</b>	<b>Granulozyte colony-stimulating factor</b>
<b>h</b>	<b>Stunde</b>
<b>HLA</b>	<b>human leukocyte antigen</b>
<b>Ig</b>	<b>Immunglobulin</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>IMI</b>	<b>Immature myeloid information</b>
<b>IQR</b>	<b>Interquartile range</b>
<b>I/T</b>	<b>Immature to total neutrophils</b>
<b>Kap</b>	<b>Kapitel</b>



<b>LOBI</b>	<b>Late-onset-bacterial infection</b>
<b>max</b>	<b>Maximal</b>
<b>MDSC</b>	<b>Myeloid-derived suppressor cells</b>
<b>min</b>	<b>Minimal</b>
<b>MTA</b>	<b>Medizinisch technische Assistentin</b>
<b>NBI</b>	<b>Neonatale bakterielle Infektion</b>
<b>NET</b>	<b>Neutrophil extracellular traps</b>
<b>NRBC</b>	<b>Nucleated red blood cells</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>PCT</b>	<b>Procalcitonin</b>
<b>PVL</b>	<b>Periventrikuläre Leukomalazie</b>
<b>QQ-Plot</b>	<b>Quantile-Quantile-Plot</b>
<b>R</b>	<b>Korrelationskoeffizient</b>
<b>RG</b>	<b>Reifgeborenes</b>
<b>ROC-Kurve</b>	<b>Receiver-operating-characteristic-Kurve</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Real-time polymerase chain reaction</b>
<b>SD</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>SIRS</b>	<b>Systemic inflammatory response syndrome</b>
<b>SSW</b>	<b>Schwangerschaftswoche</b>
<b>Tab</b>	<b>Tabelle</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumornekrosefaktor-alpha</b>
<b>VBS</b>	<b>Vorzeitiger Blasensprung</b>
<b>VE</b>	<b>Vakuumextraktion</b>
<b>VK</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
<b>ZNS</b>	<b>Zentrales Nervensystem</b>

## **Abbildungsverzeichnis:**

Abb. 1: Erythropoese

Abb. 2: Fluoreszenzverhalten im NRBC-Kanal nach Einwirkung von Stromatolyser

Abb. 3: Konzentration der Normoblasten, Reifgeborene ohne EOBI

Abb. 4: Konzentration der Normoblasten, Frühgeborene ohne EOBI

Abb. 5: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Neugeborenen ohne EOBI

Abb. 6: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Neugeborenen ohne EOBI ( $r=-0,49$ )

Abb. 7: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht bei Neugeborenen ohne EOBI

Abb. 8: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht bei Neugeborenen ( $r=-0,35$ ) ohne EOBI

Abb. 9: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei hypotrophen (<P10), eutrophen und hypertrophen (>P90) Neugeborenen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden

Abb. 10: Normoblasten innerhalb der ersten 24 Lebensstunden in Abhängigkeit vom Geschlecht

Abb. 11: Normoblasten nach dem ersten klinischen Verdacht bei Reifgeborenen

Abb. 12: Normoblasten nach dem ersten klinischen Verdacht bei Frühgeborenen

Abb. 13: ROC-Kurven für Normoblasten bei Reifgeborenen 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht.

Abb. 14: ROC-Kurven für Normoblasten bei Frühgeborenen 24,48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

Abb. 15: ROC-Kurven für Normoblasten und Normoblasten kombiniert mit IL-8 Reifgeborener 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

Abb. 16: ROC-Kurven für Normoblasten und Normoblasten kombiniert mit IL-8 Frühgeborener 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

Abb. 17: QQ-Plot Geburtsgewicht Reifgeborene mit EOBI

Abb. 18: QQ-Plot Geburtsgewicht Reifgeborene ohne EOBI

## **Tabellenverzeichnis:**

Tab. 1: Early- vs. Late-onset-bacterial-infection

Tab. 2: Wichtige Symptome der EOBI

Tab. 3: Besonderheiten des Immunsystems Früh- und Reifgeborener

Tab. 4: Etablierte Infektionsparameter

Tab. 5: Ursachen für eine Normoblastenerhöhung bei Früh- und Reifgeborenen

Tab. 6: Erfasste Patientendaten

Tab. 7: Vierfeldertafel für den Normoblastenwert

Tab. 8: Deskriptive Statistik für Reifgeborene

Tab. 9: Deskriptive Statistik für Frühgeborene

Tab. 10: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen nach 24 Stunden

Tab. 11: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen nach 48 Stunden

Tab. 12: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen nach 72 Stunden

Tab. 13: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Frühgeborenen nach 24 Stunden

Tab. 14: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen nach 48 Stunden

Tab. 15: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen nach 72 Stunden

# 1. Einleitung

## 1.1 Die neonatale bakterielle Infektion

Die neonatale Infektion in ihrer systemischen Form, der Sepsis, ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität von Neu- und Frühgeborenen (19/186/188). Ihre rechtzeitige Erkennung und Behandlung ist entscheidend für die Prognose (119). Die klinischen Symptome präsentieren sich häufig unspezifisch und sind mitunter schwierig zu erkennen (177). Die bisher bekannten Infektionsparameter sind aufgrund einer Unreife des Immunsystems der Neugeborenen (3) oft nicht sensitiv und spezifisch (119). Dies führt häufig zur Verzögerung der antibiotischen Therapie. Neue Infektionsparameter sind daher von klinischem Interesse, um Diagnostik und Therapie rascher einleiten zu können.

Zelluläre Marker stehen in ihrer diagnostischen Wertigkeit dabei eher im Hintergrund. So sind z.B. auch Infektionen mit normaler Leukozytenzahl, Leukopenie bzw. -zytose beschrieben. Bei der roten Blutreihe kann es durch Inflammation oder Infektionen entsprechend zur weißen Blutreihe ebenfalls zur Ausschüttung unreifer Vorstufen u.a. Normoblasten kommen. So konnte eine signifikante Erhöhung der Normoblasten im Zusammenhang mit erhöhtem IL-6 bei Feten im Rahmen eines FIRS (fetal inflammatory response syndrome) nachgewiesen werden (154).

Bisher gestaltete es sich methodisch schwierig, die Normoblastenzahl zu bestimmen. Seit der Einführung von Hämatologie-Analysatoren der neueren Generation z.B. des Sysmex XN/ XE-2100 (zur genauen Funktionsweise vgl. Kap. 2.2.1) ist eine Normoblastenbestimmung routinemäßig, vollautomatisiert und ohne erhöhten Zeitaufwand möglich (139).

Die Normoblastenzahl ist daher ein vielversprechender potentieller Parameter in der neonatalen Infektions-Diagnostik. Dies gilt es in dieser Arbeit genauer zu untersuchen.

## 1.2 Die Early-onset-Infektion

Unterschieden wird bei der neonatalen bakteriellen Infektion die früh einsetzende „early-onset-bacterial-infection“ (EOBI) von der später einsetzenden „late-onset-bacterial-infection“ (LOBI). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Early-onset-Infektion.

**Die Early-onset-Infektion** tritt innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt auf (20/136/183/200), wobei das gewählte Zeitfenster variiert (162). Die Inzidenz liegt zwischen 1 und 10/ 1000 Lebendgeburten (65/97/166), bei Kindern mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (<1500 g) sogar bei 15-19 /1000 Lebendgeburten. Die Mortalität liegt zwischen 15 und 50 % und hängt vom Zeitpunkt des Therapiebeginns, vom Gestationsalter und vom Geburtsgewicht ab (92/158). Ursache ist eine prä- oder intrapartale Infektion. Bei einem häufig foudroyanten Verlauf besteht bei fehlender Therapie oder verzögertem Therapiebeginn ein hohes Risiko für die Ausbildung einer Meningitis oder einer Sepsis, dies kann bis zum Vollbild des septischen Schocks mit Multiorganversagen führen. Das Erregerspektrum entspricht meist der mütterlichen Vaginalflora. (Streptokokken der Gruppe B, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Enterokokken (57/82/165/173/195/205).

Als Risikofaktoren der EOBI gelten:

- Frühgeburtlichkeit <37 SSW (11/75/162/164/211)
- Niedriges Geburtsgewicht (91/164)
- Tachykardes CTG (>160 /min) (211)
- Vorzeitige Amnionruptur >18 Stunden (11/75/211)
- Bakteriämie der Mutter (153) mit hämatogener Übertragung auf das Kind
- Amnioninfektionssyndrom (AIS) (1/11/86/164/211)

Definition des AIS: Fieber der Mutter bei der Geburt >38,0 °C begleitet von mindestens 2 der folgenden Symptome: fetale (≥160

/min.) oder mütterliche ( $\geq 100$  /min.) Tachykardie, fötides Fruchtwasser, Loslaßschmerz des Uterus, Erhöhung der Leukozytenzahl im mütterlichen Blut auf  $>15.000$  / $\mu\text{l}$  (100)

- Rektovaginale Kolonisation mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe B (4/11/24/48)
- Fieber der Mutter bei der Geburt  $>37,9$  °C (11/75/162).

### **1.3 Die Late-onset-Infektion**

Zu unterscheiden von der Early-onset-Infektion ist die spät einsetzende Late-onset-Infektion, die nach 72 Lebensstunden auftritt. Sie verläuft für gewöhnlich schleichender, foudroyante Verläufe sind dennoch möglich und beschrieben. Die Inzidenz liegt bei 21 % (69), die Mortalität bei 13-25 % (69), bei Frühgeborenen noch höher. Ursächlich ist hierfür eine postnatale oder nosokomiale Infektion. Das Erregerspektrum stammt meist aus dem postnatalen Umfeld, kann jedoch auch der mütterlichen Genitalflora entsprechen: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella species*, *Enterobacter species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus species* und *Candida albicans* (88).

## Neonatale Infektion nach Erkrankungsbeginn:

Charakteristika	Early-onset-Infektion	Late-onset-Infektion
Erkrankungsbeginn	Geburt bis 7 Tage nach Geburt, normalerweise $\leq 72$ h	$>72$ h
Schwangerschaftskomplikationen	häufig	ungewöhnlich
Frühgeburtlichkeit	häufig	unterschiedlich
Manifestation	Systemisch (V.a. Pneumonie)	Systemisch oder fokal (v.a. Meningitis)
Herkunft der Erreger	Mütterlicher Genitaltrakt	Mütterlicher Genitaltrakt, postnatales Umfeld nosokomial
Sterblichkeit	15-50 %	13-25 %

Tab. 1: Early- vs. Late-onset-bacterial-infection (45/46/53/94/131/144/169/176)

### 1.4 Symptome der EOBI

Die Symptome sind unspezifisch und im Anfangsstadium nur schwer zu erkennen. Häufig ist das erste Symptom das „schlechte Aussehen“ des Kindes, was durch eine Veränderung der Mikrozirkulation entsteht und sich in Blässe, gräulichem Hautkolorit, Marmorierung, kalten Extremitäten und einer verlängerten Rekapillarierungszeit  $>2$  Sekunden äußern kann. Hinzu können Störungen der Temperaturregulation wie Hyperthermie ( $>37,8$  °C), Hypothermie ( $<36$  °C) oder auch Schwankungen der Körpertemperatur  $>1,5$  °C/3h (134) kommen.

Des Weiteren können Störungen der Atemfunktion wie Tachypnoe ( $>60$  /min) Dyspnoe („Nasenflügeln“, „Einziehungen“, „stöhnende Atmung“), vermehrte

Apnoephasen mit Sauerstoffabfällen <80 % oder erhöhter Sauerstoffbedarf (57/90/122) auftreten.

Außerdem kann es zu kardialen Symptomen wie Tachykardie (>160 /min) oder Bradykardie (<80 /min), gastrointestinalen Symptomen wie Nahrungsunverträglichkeit mit Erbrechen, Nahrungsrückstau, Diarrhoe und/oder geblähem Abdomen; zu neurologischen Auffälligkeiten wie Apathie, Hyperexzitabilität oder Hypotonie; Hepatomegalie oder insbesondere bei der Late-onset-Infektion auch zu lokalen Befunden wie Konjunktivitis oder Omphalitis führen. Im Vollbild der Sepsis kommt es letztendlich zu vermehrter Blutungsneigung, Schock und Multiorganversagen.

<b>Störungen der Zirkulation</b>	Periphere Mikrozirkulationsstörungen, Blässe, grau-marmoriertes Hautkolorit, septischer Schock, Multiorganversagen
<b>Temperaturinstabilität</b>	Hyper-, oder Hypothermie
<b>Störungen der Atmung</b>	Tachypnoe, Dyspnoe, Apnoe
<b>Kardiale Symptome</b>	Tachykardie, Bradykardie
<b>Gastrointestinale Symptome</b>	Trinkschwäche, Erbrechen, Diarrhoe, abdominelle Distension
<b>Neurologische Symptome</b>	Hyperexzitabilität, Lethargie, Krampfanfälle
<b>Lokalbefunde</b>	Z.B. Konjunktivitis, Omphalitis

Tab. 2: Wichtige Symptome der EOBI

## 1.5 Folgen der EOBI

Abgesehen von den oben beschriebenen, allgemeinen Krankheitsfolgen treten bei schweren Verläufen nicht selten Komplikationen bzw. Spätfolgen im Sinne



von Hirnblutungen (205) und u.a. durch Mikroembolien verursachte hypoxisch-ischämische Hirnläsionen (175) auf. Diese zentralen Komplikationen können im Extremfall auch zum Auftreten einer Zentralparese führen.

Des Weiteren werden Teilleistungsstörungen, Hörstörungen und eine höhere Neigung zu psychiatrischen Erkrankungen beschrieben (73/123). Hierbei spielen proinflammatorische Zytokine eine Rolle wie Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor-alpha, die eine direkte neurotoxische Wirkung besitzen und gleichzeitig für eine allgemeine Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Diesen Mechanismen wird eine Schlüsselrolle sowohl bei der periventrikulären Leukomalazie, bei der Retinopathia praematurorum (194), bei der nekrotisierenden Enterokolitis als auch bei der bronchopulmonalen Dysplasie (30/66/74/120/203) zuerkannt.

## 1.6 Besonderheiten des Immunsystems bei Früh- und Reifgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen

Das Immunsystem von Reif- und v.a. von Frühgeborenen ist noch unreif, dies begünstigt die Suszeptibilität gegenüber Infektionen und deren foudroyanten Verlauf (144/155). Vor allem die nachfolgenden tabellarisch aufgeführten Charakteristika zeichnen dafür verantwortlich:

Merkmal	Besonderheiten bei Früh- und Reifgeborenen	Folgen
<b>Granulozyten</b>	Granulozytenvorläuferzellen im Knochenmark (besonders bei SGA-Frühgeborenen)↓  G-CSF-Spiegel↓  Unzureichende Möglichkeit der Reaktivierung	Elimination von Erregern in Gewebe und Blutbahn↓  Hemmung von T-Zell-Stimulation↑

	<p>Adhäsion (L-Selektin, E-Selektin)↓</p> <p>Chemotaxis, Phagozytose und extrazelluläre Netzformen (NET)↓</p> <p>Myeloide Suppressorzellen (MDSC)↑</p>	
<b>Lösliche Faktoren der angeborenen Immunabwehr</b>	<p>Komplementaktivität C1, C4, Faktor B, Mannose bindendes Lektin, L-Ficolin,</p> <p>IgA-Produktion, Produktion antimikrobieller Peptide und Fibronektinproduktion↓</p>	<p>Opsonisationsfähigkeit↓</p> <p>Erregerelimination ↓</p>
<b>Monozyten</b>	<p>Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen↓</p> <p>Apoptose↓</p> <p>Interaktion mit Lymphozyten (Antigenpräsentation, HLA-DR, Kostimulation von CD80, CD86)↓</p> <p>Phagozytoseaktivität↓</p>	<p>Antiinflammatorische Gegenreaktion↓</p> <p>Angeborene und erworbene Immunität↓</p>
<b>Lymphozyten</b>	<p>T-Zellen: Proliferation, antigenspezifische Toxizität, Gedächtniszellen und B-Zell-Hilfe (CD40L)↓</p> <p>B-Zellen: Unreife; Antikörperproduktion↓</p> <p>Natürliche Killerzellen: Lytische Granula und Interferonproduktion↓</p>	<p>Zelluläre und humorale Immunabwehr einschließlich Immungedächtnis↓</p>
„Nestschutz“	<p>Transfer der mütterlichen Immunglobuline (IgG) größtenteils erst nach der 28. SSW</p>	<p>Leihimmunität↓</p>

iatrogene Einflüsse auf das Immunsystem	Einsatz von immunmodulierenden Substanzen (z.B. Kortikosteroide, nichtsteroidale Antiphlogistika)	iatrogene Immunsuppression
---	---	----------------------------

Tab. 3: Besonderheiten des Immunsystems Früh- und Reifgeborener (35/56/72/87/103/110/200)

## 1.7 Pathophysiologie der bakteriellen Infektion

Nach dem Eindringen in den Körper wandern neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen durch Chemotaxis angelockt ein. Diese Zellen binden an die Erreger und zerstören diese. Dabei werden Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  freigesetzt. Dies wiederum führt zur Sekretion von anderen Akute-Phase-Proteinen wie CrP in der Leber (106). Diese Proteine sind verantwortlich für die Akute-Phase-Reaktion. Diese soll einerseits die Gewebeschädigung durch eine lokale Reaktion eindämmen und dabei andererseits zeitgleich den Körper durch eine generalisierte Reaktion wie z.B. Fieber, Leukozytose, Aktivierung der Blutgerinnung, des fibrinolytischen Systems und danach einer Erhöhung der Akute-Phase-Proteine auf eine Ausbreitung der Erreger und daraus resultierende Schäden für den Gesamtorganismus vorbereiten.

Durch bestimmte Oberflächenmerkmale der Erreger wird das Komplementsystem aktiviert, das eine weitere Chemotaxis und Opsonierung der polymorphkernigen, neutrophilen Phagozyten bewirkt (112).

An diese initiale Phase der Abwehrreaktion schließt sich die adaptive Antwort durch die Lymphozyten, welche die Bildung spezifischer Antikörper beinhaltet, an.

## 1.8 Diagnostik der EOBI

### 1.8.1 Infektionsparameter

Wie bereits in Kap. 1.4 erwähnt, sind die klinischen Symptome einer neonatalen bakteriellen Infektion sehr unspezifisch und schwer zu erkennen. Da eine verzögerte Diagnosenstellung mit erhöhter Mortalität und Morbidität assoziiert ist (156), wird eine rasche klinisch valide und aussagekräftige Labordiagnostik benötigt.

Infektionsparameter	Vorteile	Nachteile
<b>Blutkultur</b>	Gilt nach wie vor als Goldstandard (157)  Sensitivität von 82 % bei einer Spezifität von 96 % (178)	Mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch eine bereits peripartal eingeleitete antibiotische Therapie der Mutter (161); nur transiente Bakteriämie (188) und geringes Probenvolumen (104); Verfügbarkeit des Ergebnisses in der Regel nicht vor 24 Stunden, bei Pilzinfektionen noch später (146)
<b>C-reaktives Protein</b> (>10 mg/l) (23/60/111)	Sensitivität steigt innerhalb von 48 h auf max. 80 % an (127), bei einer Spezifität von nahezu 100 % (126)	Später Infektparameter (am aussagekräftigsten 48 h nach Infektionsbeginn)

<p><b>Interleukin-8</b> (alternativ Interleukin-6) (&gt;60 pg/ml) (134)</p>	<p>Einer der frühesten Infektparameter</p> <p>Sensitivität beim ersten klinischen Infektionsverdacht von 80 % bei einer Spezifität von 90 % (60/61/126/134)</p>	<p>Sehr kurze Halbwertszeit, fällt bereits 12-14 h nach Infektionsbeginn wieder ab (134/61)</p>
<p><b>Leukozytenzahl</b> (&gt;30.000 /<math>\mu</math>l oder &lt;5.000 /<math>\mu</math>l) (84)</p>	<p>Lange etabliert</p>	<p>Beurteilung gestaltet sich im klinischen Alltag schwierig, da Neu- und Frühgeborene sowohl mit einer Leukozytose als auch mit einer Leukozytopenie auf eine Infektion reagieren können</p> <p>Leukozyten unterliegen starken physiologischen Schwankungen, gerade in den ersten Lebensstunden (84)</p> <p>Labormethodisch lassen sich Normoblasten bisher schwer von den Leukozyten abgrenzen, was eine Leukozytose vortäuschen kann (99)</p>

<b>IT-Quotient</b> (>0,2) (59)	sensitiver Parameter zur Früherkennung einer Neugeboreneninfektion (52/109)	Eine vergleichsweise niedrige Spezifität von <50 %, da die Granulozytenzahl auch von nicht-infektiösen Faktoren beeinflusst werden kann.
-----------------------------------	--	--

Tab. 4: Etablierte Infektionsparameter

Ein verlässlicher, hoch sensitiver und spezifischer Infektparameter, der eine klare Diagnose zeitnah gewährleistet, ist eine Kombination aus einem Interleukin (meist IL-6, alternativ IL-8) und dem CrP mit einer Sensitivität von 93 % bei einer Spezifität von 80 % (59).

Der TNF- $\alpha$  (15/16/17/54/89) wird als dem IL-6 unterlegen beschrieben (27/43/114). Der Spitzenwert von TNF- $\alpha$  wird bereits 90 Minuten nach Infektionsbeginn erreicht und weist nur eine kurze Halbwertszeit von zirka 60 Minuten auf (89).

Das IL-1 $\beta$  (127) ist bei einer Chorioamnionitis im Nabelschnurblut erhöht. Es findet sich postpartal jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen septischen und gesunden Kindern (30).

Die Sensitivität des Procalcitonins (PCT) (32/54/59/63) steigt, ähnlich der des CrP, erst mit einer Verzögerung von 24 Stunden an, erreicht dann aber Werte von bis zu 87,5 %, bei einer Spezifität von 88,9 % (2/199).

Das Lipopolysaccharid-binding-protein (136) zeigte sich mit einer Sensitivität von 79 % bei 24 Stunden nach Infektionsbeginn dem IL-8 unterlegen.

Die Leukozytenelastase (142/197) weist bei Reifgeborenen eine Sensitivität von 76 % auf (210), ist aber nicht geeignet als prädiktiver Infektparameter bei

Frühgeborenen (101), da sich bei Frühgeborenen die Referenzwerte zwischen Frühgeborenen mit und ohne EOBI nicht signifikant unterscheiden.

Zu den neuesten und vielversprechendsten Ansätzen gehört die broad-range 16S real-time PCR (105/121/133), die es ermöglicht, Keime via RT-PCR selbst in negativ getesteten Blutkulturen mit einer Sensitivität von 79 % bei einer Spezifität von 90 % nachzuweisen. Dies gelang in dieser Untersuchung nach begonnener antibiotischer Therapie (133).

Als zellulärer, durchflusszytometrisch bestimmter Marker hat sich ein Oberflächenrezeptor auf Granulozyten (CD 64) etabliert, welcher als prädiktiver Infektparameter (51/153) bei der EOBI eine Sensitivität von 78 % (190) - 88,6 % (47) bei einer Spezifität von 59 % erreicht (190). In Kombination mit CrP und IL-6 konnte sogar eine Sensitivität von 100 % erreicht werden (129).

## **1.9 Linksverschiebung entsprechend zur weißen auch in der roten Blutreihe? - Normoblasten als potentieller Infektparameter**

Bei Erwachsenen steigern inflammatorische Prozesse über eine Erhöhung des G-CSF die Zahl der neutrophilen Granulozyten. Ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten ist somit ein Indikator für inflammatorische Prozesse (204). Bei Neugeborenen kann eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten mit dem Auftreten einer Early-onset-Infektion (108), eines Atemnotsyndroms (132) oder einer zerebralen Schädigungen im Sinne einer hypoxisch-ischämischen Schädigung oder einer Hämorrhagie (208) assoziiert sein.

Entsprechend zur Linksverschiebung in der weißen Blutreihe wurde auch in der roten Blutreihe durch eine Erhöhung des Erythropoetins eine vermehrte Ausschüttung von Normoblasten ins periphere Blut beschrieben: Z.B. bei Neugeborenen mit niedrigem Nabelarterien-pH ( $\leq 7,0$ ) (22), intrauteriner Wachstumsretardierung (118), Neugeborenenkrämpfen (21) zerebralen

Schädigungen (91), bei chronischer intrauteriner Hypoxie (91), bei Kindern von Müttern mit Präeklampsie (3) und bei Kinder mit Gestationsdiabetes (70).

Minior et al zeigten in einer Studie mit 73 hypotrophen (<10. Perzentile) Neugeborenen mittels Regressionsanalysen, dass eine erhöhte Normoblastenzahl am ersten Lebenstag signifikant mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Versorgung, der Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation, respiratorischer Insuffizienz, Notwendigkeit einer Intubation, Thrombozytopenie, Hyperbilirubinämie, intraventrikulärer Hämorrhagie und neonatalem Tod assoziiert ist. (118)

Eine erhöhte Normoblastenzahl bei Geburt war dabei stärker mit den Morbiditäten des kurzfristigen Outcomes (Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung, Verabreichen von Katecholaminen) und der Mortalität assoziiert als Geburtsgewicht oder Gestationsalter (118).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Normoblastenzahl darüber hinaus mit Inflammationsprozessen assoziiert ist:

In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass bei Ratten eine einmalige intravenöse IL-6-Gabe zu einer Stimulation der erythropoetischen Progenitorzellen im Knochenmark führt und es so innerhalb von 12-24 Stunden zu einer signifikant höheren Normoblastenausschüttung in den Blutkreislauf kommt (198). Dies zeigt, dass IL-6 als Stimulus für die Erythropoese fungiert und somit auch eine Inflammationsreaktion, unabhängig von hypoxischen Prozessen, potentiell mit einer Normoblastenerhöhung assoziiert ist.

Eine Arbeitsgruppe um Stachon et al konnte den Zusammenhang zwischen IL-6-Erhöhung und gesteigerter Erythropoese auch für den Menschen zeigen. Sie wiesen mittels einer multinominalen logistischen Regressionsanalyse nach, dass eine erhöhte Normoblastenzahl bei Erwachsenen signifikant sowohl mit einer Erythropoetinerhöhung als Ausmaß einer Hypoxie als auch mit einer IL-6-Erhöhung im Sinne einer Inflammationsreaktion assoziiert ist. Die Autoren vermuteten daher, dass das Vorkommen von Normoblasten im peripheren Blut



eine Kombination aus hypoxischen und inflammatorischen Prozessen zum Ausdruck bringt. Darüber hinaus zeigten Probanden, die eine erhöhte Normoblastenzahl aufwiesen auch eine signifikant erhöhte Mortalität, was den Normoblasten auch eine Bedeutung als prädiktiver Wert bezüglich des Mortalitäts-Risikos zukommen lässt (181).

Die Zusammenhänge zwischen Inflammation und Normoblastenerhöhung ließen sich auch für das unreife und damit spezielle Immunsystem Frühgeborener reproduzieren. Romero et al wiesen in einer retrospektiven Beobachtungsstudie nach Amniozentese und Chordozentese, eine Erhöhung der fetalen Normoblasten im Zusammenhang mit erhöhtem IL-6 im Rahmen eines FIRS nach (154).

Auch Dulay et al zeigten, dass bei Frühgeborenen (<34 SSW), die nach histologisch nachgewiesener Chorioamnionitis geboren wurden, am ersten Lebenstag die Normoblastenwerte gegenüber gesunden Neugeborenen signifikant erhöht waren. Die Normoblastenerhöhung korrelierte dabei direkt mit erhöhten IL-6-Werten im Nabelschnurblut jedoch weder mit Erythropoetin- noch mit Nabelarterien-pH. Dies festigt die Annahme, dass Zytokine, unabhängig von hypoxischen Prozessen, eine wichtige Rolle bei der Stimulation der fetalen Normoblastenausschüttung ins periphere Blut spielen (50).

Diese Untersuchungen weisen insgesamt darauf hin, dass Inflammationsprozesse bei Früh- und Reifgeborenen einen Einfluss auf die Normoblastenzahl im peripheren Blut haben. Somit können sich Normoblasten potentiell als Infektparameter eignen.

## **1.10 Entstehung von Normoblasten - Erythropoese**

Erythrozyten entstehen aus Mesenchymzellen, die zunächst pluripotente Stammzellen darstellen. Nachdem die weitere Differenzierung eingeleitet wird wandeln sich diese in unipotente Stammzellen (erythropoetin responsive cells).

Es folgen eine frühe, Erythropoetin-unabhängige Entwicklungsphase und eine spätere, Erythropoetin-abhängige Phase. Die Produktion der Erythrozyten ist so limitiert, dass die Gesamtmenge an Erythrozyten im Körper konstant bleibt. Diese Kontrollmechanismen wurden v.a. für die späte Phase untersucht. Die Synthese wird hierbei hauptsächlich über das Glykoprotein Erythropoetin in Zusammenhang mit Hypoxie gesteuert (vgl. Kap. 1.11) (55). Erythropoetin wird in Leber, Nieren, Milz, Lunge und im Knochenmark gebildet. (85), Die Erythrozyten werden über verschiedene Vorläuferzellen (Proerythroblast - Erythroblast - Normoblast - Retikulozyt) im Knochenmark gebildet, welche zunehmend mehr Hämoglobin und weniger RNA in ihrem Zytoplasma enthalten. Während bei Neugeborenen in fast allen Knochen Blut gebildet wird, stehen bei Erwachsenen nur noch ca. 30 % des Knochenmarks für die Hämatopoese zur Verfügung. Bei chronisch erhöhtem Zellbedarf (z.B. hämatologische Systemerkrankungen) kann es erneut zur extramedullären Hämatopoese in Leber und Milz kommen (106). Lediglich bei Neugeborenen treten Normoblasten physiologisch im peripheren Blut auf. Der Entwicklungszyklus zum Retikulozyt dauert fünf bis neun Tage. Die normale Lebensdauer von Erythrozyten beträgt 120 Tage. Daraus folgt dass etwa 1 % der Zellen pro Tag abgebaut und durch Neuproduktion im Knochenmark ersetzt werden.

### **1.10.1 Proerythroblasten**

Proerythroblasten (griech. Blastos - „Keim“), sind runde Zellen von ca. 16-18 µm Durchmesser, die sich durch ihren großen, hellen Zellkern, zwei Nucleoli und zunehmend basophiles Zytoplasma auszeichnen. Aus einem Proerythroblast entstehen in der weiteren Differenzierung 16 Erythrozyten.

### **1.10.2 Erythroblasten**

Erythroblasten haben kleine Zellkerne und enthalten verklumptes Chromatin. Durch Abnahme der Basophilie und weiterer Verkleinerung der Kerngröße entstehen nun die polychromatischen Erythroblasten. Diese synthetisieren Hämoglobin an den Polyribosomen, wodurch das Zytoplasma azidophil wird.

### **1.10.3 Normoblasten**

Normoblasten enthalten einen grobschollig bis pyknotisch, kondensierten, runden Kern, der z.T. exzentrisch liegt. Sie sind noch teilungsfähig. Unter Normoblasten werden zwei Zellformen zusammengefasst – die polychromatischen und die orthochromatischen Erythroblasten. Ab der Entwicklungsstufe des polychromatischen Normoblasten beginnt die Zelle vermehrt Calcium, Eisen und Glucose aufzunehmen. Sie beginnt mit der Synthese von Transferrin- und Hämoglobinrezeptoren. Auf der Zelloberfläche werden die für Erythrozyten typischen Proteine exprimiert (80). Das Vorhandensein von Hämoglobin scheint eine Ursache für die Kerndegeneration zu sein, die bei den orthochromatischen Normoblasten stattfindet. Die Kernmembran wird mit der fortschreitenden Entwicklung der Normoblasten durchlässig für Hämoglobin. Wenn eine kritische Konzentration erreicht wird, interagiert das Hämoglobin vermutlich mit den Histonen, was zur Kondensation von Chromatin und damit zur Kerndegeneration führt. Der Kern wird anschließend nach ca. 5-60 Minuten ausgestoßen. So entstehen die Retikulozyten. Normoblasten haben eine große Ähnlichkeit mit reifen, kleinen Lymphozyten, was im Differentialblutbild zu einem falsch hohen Leukozytenwert führen kann.

### **1.10.4 Retikulozyten**

Retikulozyten sind kernlos, jedoch reich an Ribosomen. Im Gegensatz zu den reifen Erythrozyten enthalten sie Reste von Zellorganellen und RNA, die Hämoglobin produzieren können. Retikulozyten werden aus dem Knochenmark ins periphere Blut freigesetzt, wo sie innerhalb von 48 Stunden ihre RNA verlieren und zu Erythrozyten reifen. Da die peripheren Retikulozyten die 24-48-stündige Knochenmarksproduktion widerspiegeln, korrelieren sie in etwa mit der Geschwindigkeit der Erythropoese und stellen so ein Maß für die Knochenmarksaktivität dar (160).

## Erythropoese. Reifungsschema der Erythropoese.

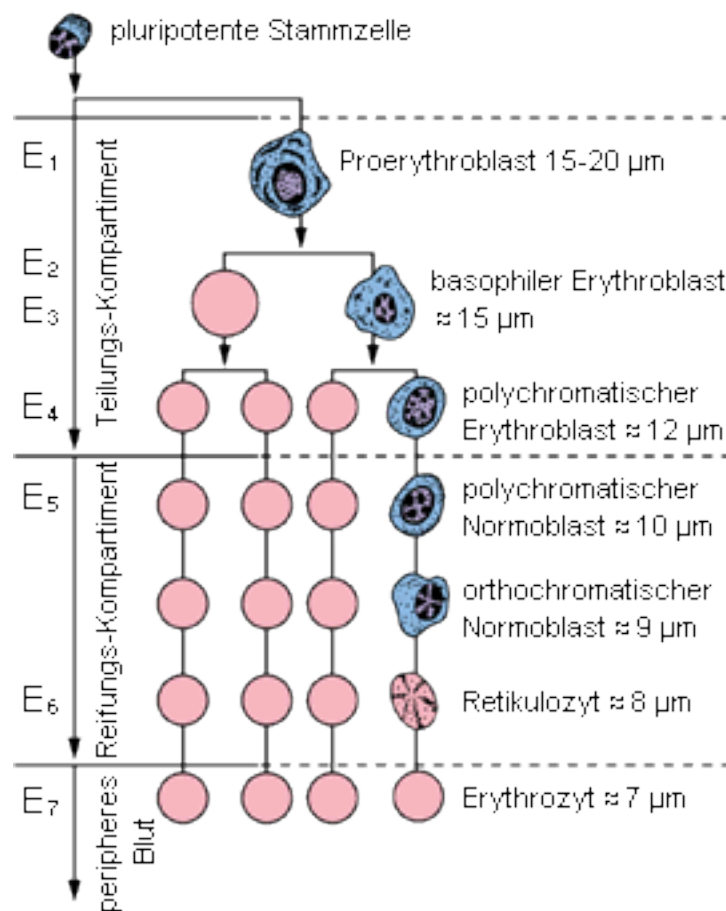


Abb. 1: Erythropoese (151)

### 1.11 Normoblasten - Vorkommen im peripheren Blut

Bei älteren Kindern oder Erwachsenen ist ein Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut ungewöhnlich und liefert Hinweise auf eine extramedulläre Blutbildung oder eine Schädigung des Knochenmarks. Normoblasten im peripheren Blut sind dadurch potentiell assoziiert mit einer Asplenie (40/170), mit Malignomen, hämatologischen Systemerkrankungen wie MDS oder Leukämien (137), hämolytischen Anämien/ Thalassämien (42), mit größeren Traumata (98) oder anderen schwerwiegenden Erkrankungen. (170/116).

Stachon et al zeigten des Weiteren, dass bei Intensivpatienten, bei denen Normoblasten mehr als 10 Tage im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten, die Mortalität auf 80 % stieg, was einer 20-fach höheren Mortalität im Vergleich zu Intensivpatienten ohne Normoblastenerhöhung entsprach. Patienten, bei denen Normoblasten länger als 15 Tage im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten verstarben alle (180).

Bei Reifgeborenen befinden sich Normoblasten bis zum 5. Lebenstag physiologisch im peripheren Blut (116). Bei Frühgeburtlichkeit und fetaler Hypoxie kann es zu einer Erhöhung der Normoblastenkonzentration bei Geburt kommen. Bei Reif- und Frühgeborenen ist chronische (z.B. bei Z.n. chronischer intrauteriner Hypoxie) oder akute Hypoxie (98) der hauptsächliche Stimulus, um über eine Erythropoetinausschüttung eine gesteigerte Erythropoese zu erreichen. Dabei reagieren HIFs (Transkriptionsfaktoren) auf eine erniedrigte Sauerstoffsättigung (148). HIF-2- $\alpha$  reguliert die Erythropoetinproduktion in der fetalen Leber.

Ein Sauerstoffmangel im Lebergewebe führt zur Inhibition einer Prolyl-Hydroxylase, die Sauerstoff als Co-Substrat nutzt. Diese Inhibition führt zu einer Translokation von HIF-2- $\alpha$  in Richtung Zellkern, wo sich die Alpha-Einheit im Zellkern an das Regulationselement des EPO-Gens bindet. Diese Bindung bewirkt eine Steigerung der Transkriptions- und Translationsrate des EPO-Gens auf das über 1000-Fache. Dieser Prozess dauert ca. 4-5 Stunden. (38).

Das führt zu einem vermehrten Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut. Dies geschieht allerdings unabhängig vom aktuellen Hämoglobinwert. Dieser kann sowohl erhöht als auch erniedrigt sein. Vom hypoxischen Reiz bis zum Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut vergehen insgesamt ca. 28-29 Stunden (38)

Hypoxie schließt dabei chronische oder akute Ursachen ein, die eine verminderte Sauerstoffversorgung und damit einen verminderten Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ( $< pO_2$  40 mmHg) nach sich ziehen (207).

So kann eine erhöhte Normoblastenkonzentration im peripheren Blut Reif- und Frühgeborener mit vielen Faktoren vergesellschaftet sein (vgl. Tab. 5).

Neu- und Frühgeborene mit erhöhten Normoblastenwerten haben insgesamt eine erhöhte Morbidität im Hinblick auf Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation und der Notwendigkeit bzw. Dauer einer maschinellen Beatmung und einer damit verbundenen bis zu 10-fach höheren Mortalität (98/179/182).

<b>Normoblastenerhöhung bei Früh- und Reifgeborenen ist vergesellschaftet mit:</b>
Dystrophie (140), intrauteriner Wachstumsretardierung (118)
Pulmonalen Erkrankungen (z.B. Bronchopulmonaler Dysplasie, Atemnotsyndrom (12), Mekoniumaspiration (76))
Kardialen Erkrankungen (z.B. persistierender Ductus arteriosus (117), Z.n. Herzoperationen (33))
Gestörter Zirkulation (z.B. Sepsis (22))
Hypoxischen Hirnschädigungen (29), bzw. schlechtem Neurologischem Outcome (147)
Neugeborenenkrämpfe (21)
Intraventrikulären Hämorrhagien (71/183)
Asphyxie bzw. niedrigem Nabelarterien-pH ( $\leq 7,0$ ) (14/22/170)
Asplenie/ Hyposplenie (170)
(Hämolytische) Anämien/ Thalassämien (42)
Nekrotisierender Enterokolitis (91)
Mütterlichem Gestationsdiabetes (70)
Konnataler Lues (83)
Kinder von Müttern mit Präeklampsie (3)
Chronischer intrauteriner Hypoxie oder Stress (91)
Retinopathia praematurorum (36)

Tab. 5: Ursachen für eine Normoblastenerhöhung bei Früh- und Reifgeborenen

## **1.12 Methoden zur Normoblastenzählung**

### **1.12.1 Manuelle Zählung**

Für die manuelle Zählung wird ein Blutaussstrich nach der Reiß-Quetsch-Methode angefertigt. Es werden 5 µl Blut auf das Ende eines Objektträgers gegeben und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers so dünn wie möglich ausgestrichen. (114). Die Normoblastenzahl wird mikroskopisch aus dem Blutaussstrich ermittelt. Die Zahl wird angegeben pro 100 gezählte Leukozyten. Bei Wiederholungsbestimmungen kann es dabei zu statistisch signifikanten Abweichungen kommen. Wertet man 400 statt 100 Zellen aus, verdoppelt sich die Präzision. Die Zellverteilung ist bei manuellen Blutaussstrichen ungleichmäßig (insbesondere bei niedrigem Hämatokrit) auch ein variabler Anpressdruck des oberen Objektträgers, unterschiedliche Ausstrichdicke/ Ausstrichwinkel können zu verschiedenen Ergebnissen führen. Normoblasten haben Ähnlichkeit mit reifen, kleinen Lymphozyten, so dass selbst erfahrenes Personal zu unterschiedlichen am ehesten falsch niedrigen Werten kommen kann. Die manuelle Zählung ist somit durch einen Varianzkoeffizienten von ca. 40 % (2-110 %) (196) und durch den hohen zeitlichen und personellen Aufwand eine eher ungeeignete, unpräzise Methode. Mit Hilfe eines Hämatologie-Analysators können wesentlich kostengünstigere und bis zu fünfmal genauere Ergebnisse (180) erreicht werden.

### **1.12.2 Durchflusszytometrische Zählung**

Das Untersuchungsprinzip basiert darauf, dass zuvor markierte Zellen optische Signale abgeben, während sie einen Laserstrahl passieren. Die Probe wird durch einen Hüllstrom fokussiert und tritt dadurch in den Mikrokanal einer Mikrokanalküvette aus Glas oder Quarz ein, so dass die Zellen einzeln nacheinander durch den Messbereich des Lasers gesandt werden. Dabei entsteht Streulicht bzw. ein Fluoreszenzsignal, was ausgewertet werden kann. Als Ergebnis erhält man quantitative und qualitative (Sortierung nach Zellmerkmalen) Informationen über die analysierten Zellen. Die Menge des Streulichtes korreliert dabei mit der Komplexität und Größe der Zellen. Da



wenige Zellen per se Fluoreszenzsignale abgeben werden diese für die Bestimmung der Normoblasten antikörpervermittelt angefärbt. Dafür werden Antikörper gegen die Oberflächenmerkmale der Erythrozyten benutzt (z.B. CD 71), die mit einem Fluorchrom (z.B. Phycoerythrin) konjugiert werden. Danach wird die DNA mit den Farbstoffen DAPI (bindet an die DNA einer Zelle) oder auch Propidiumjodid (bindet in die DNA interskalierend, d.h. es lagert sich zwischen den Basen der DNA ein) angefärbt. Somit kann man die Zellen sortieren, z.B. je nachdem wieviel DNA eine Zelle enthält. Damit können u.a. reife Erythrozyten von unreifen unterschieden werden.

Diese Methode ist mit einer Sensitivität von bis zu  $1:10^5$  sensitiv (212), jedoch durch die Verwendung der Antikörper (ab ca. 275 €/ 100 Tests (z.B. bei [antikoerper-online.de](http://antikoerper-online.de), Stand 12/2014) kostenaufwändig.

### **1.12.3 Zählung an Hämatologie-Analysatoren der neueren Generation (z.B. Sysmex XN/ XE-2100)**

Seit der Einführung dieser Geräte (zur genauen Funktionsweise vgl. Kap. 2.2.1.), ist eine Normoblastenbestimmung routinemäßig, vollautomatisiert, ohne erhöhten Zeitaufwand (Messung von bis zu 150 Proben pro Stunde) und unabhängig vom Hämatokrit möglich (139). Hierbei werden die Normoblasten durchflusszytometrisch bestimmt, nachdem die Blutproben mit einem speziell entwickelten fluoreszierenden Reagenz, dem Stromatolyser diluent and dye verdünnt wurden. Das Reagenz färbt die RNA- und DNA-Bestandteile der Zellen an. Es lysiert die Zellmembran der Normoblasten vollständig (wodurch sich ausschließlich die DNA im Zellkern anfärbt), im Gegensatz zur Zellmembran der Leukozyten, diese wird durch das Reagenz nur leicht perforiert um das Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffes zu ermöglichen (wodurch sich zusätzlich die RNA-Bestandteile im Zytoplasma anfärben). So ist eine Trennung der Zellpopulationen (z.B. Normoblasten von Leukozyten und deren Subpopulationen) automatisiert und ohne Verwendung von Antikörpern möglich, was die Methode im Vergleich zu bisherigen durchflusszytometrischen Verfahren kostengünstiger und damit breiter einsetzbar macht. Ein Probenvolumen von 20 µl Vollblut (179) ist hierbei ausreichend. Das NRBC-

Detektionslimit liegt bei  $>0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . (179).

Nakul-Aquaronne et al verglichen die Ergebnisse von 500 untersuchten Blutproben, die sowohl mikroskopisch als auch mit dem Sysmex XE-2100 untersucht wurden. Hierbei zeigte sich bei der Messung der Leukozyten und ihren Subpopulationen eine Sensitivität von 96 % bei einem negativen prädiktiven Wert von 98 %. Entsprechend sensitiv zeigten sich die Messungen für die Zellen der roten Blutreihe (125).

Shiabata et al untersuchten mit dem Sysmex XE-2100 in einer Studie mittels Knochenmarksaspiration, das Knochenmark von 65 Patienten sowohl mikroskopisch als auch mit dem Sysmex XE-2100. Dabei ermittelten sie eine Sensitivität von 94,8 % für die Zählung der Normoblasten im NRBC-Kanal des Sysmex XE-2100, bei einer Spezifität von 92,2 %. (168).

### **1.13 Zielsetzung der Arbeit**

Die Early-onset-Infektion ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (19/171/183/184). Eine frühe Diagnosestellung ist wichtig für ein positives Outcome.

Laut der Fachgesellschaft für Neonatologie und pädiatrischer Intensivmedizin hat bezüglich der Diagnostik einer bakteriellen Infektion die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CrP) in Kombination mit einem Interleukin (IL-8 oder IL-6) die höchste Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität. (8)

Es sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

- 1.) Durch die automatisierte Bestimmung der Normoblastenkonzentration mit dem Sysmex XE-2100 lassen sich effizient die Kinetiken der Normoblasten bei Reif- und Frühgeborenen ermitteln.
- 2.) Die Kinetik der Normoblasten innerhalb der ersten 72 Lebensstunden unterscheidet sich bei Reif- und Frühgeborenen.

- 3.) Sowohl das Gestationsalter als auch das Geburtsgewicht beeinflusst die Anzahl der Normoblasten bei Reif- und bei Frühgeborenen.
- 4.) Im Rahmen einer Early-onset-Infektion erhöht sich die Anzahl der Normoblasten im peripheren Blut.
- 5.) Die Normoblasten eignen sich, möglicherweise auch in Kombination mit IL-8, als prädiktiver Marker einer Early-onset-Infektion bei Reif- und bei Frühgeborenen.

Sollten sich diese Hypothesen bestätigen könnten Neugeborene mit einer neonatalen bakteriellen Infektion, die auch klinisch inapparent sein kann, schneller diagnostiziert und einer adäquaten Therapie zugeführt werden. Bei nicht erkrankten Neugeborenen könnte auf eine nebenwirkungsreiche Antibiotikatherapie verzichtet werden.

## 2. Material und Methodik

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt. Eine elterliche Einverständniserklärung für die Durchführung der Untersuchungen sowie für die Verwendung der anonymisierten Daten zu Studienzwecken lag vor.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden im Zeitraum von Juli 2004 bis Juli 2005 in der Universitäts- Frauenklinik Tübingen geboren und im Kinderzimmer der Frauenklinik oder auf den Neugeborenenstationen der Abteilung für Neonatologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen betreut.

Das Gestationsalter der Neugeborenen bewegte sich zwischen 23 und 42 Schwangerschaftswochen. Aufgrund zu erwartender, klinischer und laborchemischer Abweichungen zwischen den Reif- und Frühgeborenen wurde zur besseren Vergleichbarkeit eine Unterteilung in 2 Gruppen vorgenommen:

- Reifgeborene  $\geq 37$  SSW
- Frühgeborene zwischen der 23. und 36. SSW

### 2.1 Patienten

Eingeschlossen wurden Früh- und Reifgeborene, bei denen aufgrund von definierten Risikofaktoren für eine bakterielle neonatale Infektion (z.B. vorzeitige Amnionruptur, Amnioninfektionssyndrom) oder aufgrund klinischer Auffälligkeiten (s. Tabelle) Blut zur Infektionsdiagnostik abgenommen wurde. Des Weiteren wurden Reif- und Frühgeborene eingeschlossen, bei denen aus anderen Gründen (z.B. Hypoglykämie, Hyperbilirubinämie u.a.) eine Blutabnahme erforderlich wurde. Die Blutentnahmen erfolgten ausschließlich aus medizinischen Gründen, eine Blutabnahme rein zu Studienzwecken wurde nicht durchgeführt.

Mit Hilfe von Erhebungsbögen (vgl. Kap 2.1.1) wurden die Patientendaten, die Laborwerte und der klinische Zustand prospektiv erfasst. Je nachdem, ob die Kinder die Kriterien für das Vorliegen einer Early-onset-Infektion erfüllten (vgl. Kap. 2.3) wurden sie in die Early-onset-Infektionsgruppe (EOBI) oder entsprechend in die Kontrollgruppe, die aus nicht infizierten Kindern (Ctr) bestand eingeteilt.

### 2.1.1 Erhebungsbogen

<b>Patientendaten</b>	Geschlecht
	Gestationsalter (Schwangerschaftswoche)
	Geburtsgewicht
	Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachtes
	Gesundheitszustand (Neugeborene mit EOBI vs. ohne EOBI)
	Art der antibiotischen Therapie
	Dauer der antibiotischen Therapie
	Ggf. Risikofaktoren einer bakteriellen Infektion wie z.B. vorzeitige Amnionruptur (>12 h)
<b>Mikrobiologie</b>	Blutkultur
	Abstriche bei Lokalbefunden (z.B. Rachen oder Nabelabstrich)
<b>Klinische Zeichen einer neonatalen bakteriellen Infektion (38/39/86)</b>	Temperatur (Hyperthermie (>37,8 °C), Hypothermie (<36 °C), Temperaturlabilität (Schwankungen >1 °C))
	Atmung (Tachydyspnoe (in Ruhe >60 /min), Dyspnoe (Einziehungen, Nasenflügeln, Stöhnen))
	Sättigung (Neuaufretende SpO2-Abfälle <80 %; steigender

	Sauerstoffbedarf)
	Perfusion (graues, marmoriertes Hautkolorit, verlängerte kapilläre Füllungszeit >2 s
	Kreislauf (Tachykardie (>160 /min in Ruhe), Bradykardie (< 80 /min))
	Nahrungsaufnahme (Trinkschwäche; Nahrungsrückstau (> 30%))
	Magen- Darmtrakt (geblähtes Abdomen, Erbrechen, Diarrhoe)
	Neurologie (Hyperexzitabilität, Apathie, muskuläre Hypotonie)
	Hepatomegalie
	Lokalbefund (z.B. Konjunktivitis, Omphalitis)
<b>Labor</b>	Differentialblutbild, Normoblasten
	CrP
	IL-8

Tab. 6: Erfasste Patientendaten

### 2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien für die Untersuchung waren neonatale Asphyxie/ Hypoxie mit Nabelarterien-pH <7,00, chromosomale Aberrationen, Fehlbildungen und erforderliche chirurgische Eingriffe.

### 2.1.3 Definition einer Early-onset-Infektion

In dieser Studie wurden folgende Kriterien für eine Early-onset-Infektion festgelegt:

- Innerhalb der ersten 72 Lebensstunden mindestens ein klinisches Zeichen (vgl. Tab. 3), was durch erfahrene Neonatologen und Intensivkrankenschwestern beobachtet wurde. Die Neugeborenen wurden hierfür mindestens dreimal am Tag untersucht.
- CrP-Erhöhung  $\geq 10,0$  mg/l ( $\leq 24$  Stunden nach klinischem Verdacht)
- IL-8  $\geq 60$  pg/ml
- und/ oder positive Blutkultur

Der Infektionsbeginn wurde als der Zeitpunkt des ersten klinischen Infektionsverdachtes festgelegt.

Bei klinischer Auffälligkeit ohne CrP-Erhöhung (CrP  $< 10$  mg/l) oder IL-8-Erhöhung (IL-8  $\geq 60$  pg/ml) innerhalb von 24 Stunden oder positiver Blutkultur sowie bei ausschließlich erhöhtem CrP-Wert (CrP  $\geq 10$  mg/l) und/ oder IL-8-Wert (IL-8  $\geq 60$  pg/ml) wurde der Patient in die Gruppe nicht eindeutig beurteilbarer Kinder eingeteilt, was lediglich wenige Kinder betraf und diese in dieser Studie daher keine Berücksichtigung fanden. Stellte sich bei klinischen und laborchemischen Kontrolluntersuchungen im weiteren Verlauf heraus, dass der Infektionsverdacht nicht aufrecht erhalten werden konnte, wurde das Neugeborene im Anschluss als nicht erkrankt bezeichnet und in die Kontrollgruppe aufgenommen.

#### **2.1.4 Procedere**

Die in der Studie festgelegten Entscheidungswerte der Kontrollgruppe wurden mit den erhobenen Werten der Kinder mit Early-onset-Infektion verglichen. Es sollte untersucht werden, ob sich die Normoblasten mit ihrer Bestimmungsmethode als früher, sensitiver Parameter in der Infektionsdiagnostik für Reif- und Frühgeborene eignen. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich mit den bisher etablierten Infektparametern wie CrP, IL-8 und Leukozyenzahl.

## 2.2 Messverfahren

### 2.2.1 Bestimmung der Normoblasten

Die Normoblasten wurden mit dem Sysmex XE-2100 (durchflusszytometrisch automatisiertes Mehrkanalgerät der Firma Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gemessen. Hierbei werden die Blutproben 1:51 mit einem speziell entwickelten fluoreszierenden Reagenz, dem Stromatolyser diluent (Verdünner) and dye (Farbstoff) verdünnt. Das Reagenz färbt die RNA- und DNA-Bestandteile der Zellen an. Es lysiert die Zellmembran der Erythrozyten und damit auch die Zellmembran der Normoblasten vollständig (wodurch sich ausschließlich die DNA im Zellkern anfärbt), im Gegensatz zur Zellmembran der Leukozyten. Diese wird durch das Reagenz nur leicht perforiert um das Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffes zu ermöglichen (wodurch sich zusätzlich die RNA-Bestandteile im Zytoplasma anfärben).

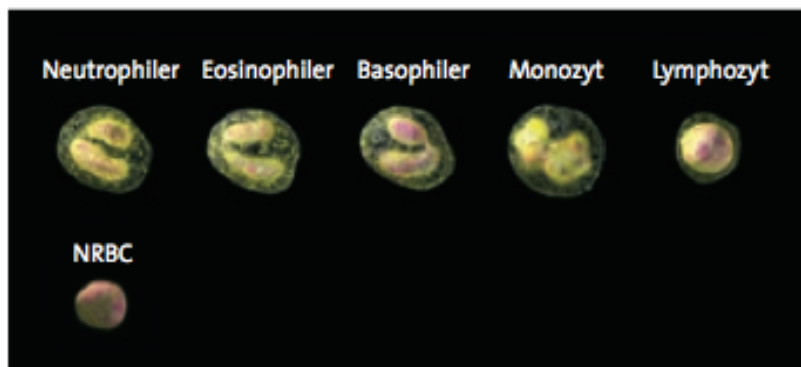


Abb. 2: Fluoreszenzverhalten im NRBC-Kanal nach Einwirkung von Stromatolyser (192)

Mittels Durchflusszytometrie werden das Vorwärts-Streulichtverhalten und die Fluoreszenzintensität der Zellen bestimmt. Bei den Normoblasten wird nur der Kern angefärbt; sie weisen also aufgrund der pyknotischen Struktur des Chromatins weniger Fluoreszenzintensität als die Leukozyten und ihre Subpopulationen auf. So ist eine Trennung der Zellpopulationen (z.B.



Normoblasten von Leukozyten und deren Subpopulationen) automatisiert möglich (191/193).

### **2.2.2 Bestimmung der Leukozyten**

Die Leukozytenzahl wurde im Rahmen der Blutbildbestimmung ebenfalls mit dem durchflusszytometrisch automatisierten Mehrkanalgerät der Firma Sysmex erfasst. Parallel dazu wurden die Leukozyten vergleichend im Differentialblutbild (in einem nach Pappenheim gefärbten Blutaussstrich) von erfahrenen medizinisch-technischen Assistentinnen ausgezählt.

### **2.2.3 Bestimmung des C-reaktiven Proteins**

Das C-reaktive Protein (CrP) wurde mit Hilfe eines kommerziellen immunologischen kinetischen Tests der Firma Ortho (Clinical Diagnostics, Neckargmünd) bestimmt. Bei dem Gerät handelte es sich um den Vitros 250 der Firma Ortho (Clinical Diagnostics, Neckargmünd). Diese Methode basierte auf dem Prinzip eines heterogenen Sandwich-Enzymimmunoassay-Formats. Der Messbereich des Testes betrug 0,7 - 11 mg/dl. Ein CrP- Wert  $\geq 10$  mg/l wurde als pathologisch definiert (111).

### **2.2.4 Bestimmung von Interleukin-8 in Plasma**

Das IL-8 wurde mit Hilfe eines kommerziellen Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay-Verfahrens (Immulite®, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) bestimmt. Die untere Messgrenze betrug 10 pg/ml. Als erhöht wurden IL-8-Werte definiert, die  $>60$  pg/ml lagen.

### **2.2.5 Mikrobiologische Untersuchung**

Bei Lokalbefunden (Konjunktivitis, Omphalitis) wurden von den entsprechenden Stellen Abstriche angefertigt. Bei anamnestischem Infektionsrisiko bzw. klinischem Infektionsverdacht wurde nach Geburt ein Rachen- und Ohrabstrich durchgeführt. Bei Verdacht auf Sepsis eine venöse Blutkultur entnommen. Die Blutmenge hierfür betrug  $<5$  ml. Die bakteriologischen Untersuchungen erfolgten im Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen.

## 2.3 Statistische Auswertung

Für die Normoblasten wurde als „neuer Infektparameter“ Spezifität, Sensitivität, positiver und negativer prädiktiver Wert mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen ermittelt. Ein Vergleich wurde diesbezüglich mit den bereits etablierten Infektparametern (CrP, IL-8 und Leukozyten) erstellt. Zur Berechnung hilft hierbei eine sogenannte Vierfeldertafel:

	Normoblastenwert normwertig (negativ)	Normoblastenwert erhöht (positiv)
Keine Infektion	Richtig negativ A	Falsch positiv B
Infektion	Falsch negativ C	Richtig positiv D

Tab. 7: Vierfeldertafel für den Normoblastenwert

**Spezifität** entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Gesunder als gesund erkannt wird, also die Anzahl aller korrekt als gesund identifizierten geteilt durch die Anzahl aller Gesunden.

Spezifität:  $A/(A+B)$

**Sensitivität** entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird, also die Anzahl aller korrekt als krank Identifizierten geteilt durch die Anzahl aller Kranken.

Sensitivität:  $D/(C+D)$

Die prädiktiven Werte wurden in Abhängigkeit der Prävalenz berechnet.

Der **positive prädiktive Wert** drückt die Wahrscheinlichkeit aus, inwieweit ein Patient mit positivem Ergebnis (erhöhtem Normoblastenwert) wirklich erkrankt

ist.

positiver prädiktiver Wert:

$(\text{Prävalenz} \times \text{Sensitivität}) : (\text{Prävalenz} \times \text{Sensitivität} + (1 - \text{Spezifität}) \times (1 - \text{Prävalenz}))$

Der **negative prädiktive Wert** drückt die Wahrscheinlichkeit aus, inwieweit ein Patient mit negativem Ergebnis (normwertiger Normoblastenwert) wirklich nicht erkrankt ist.

negativer prädiktiver Wert:

$(\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz})) : (\text{Spezifität} \times (1 - \text{Prävalenz}) + (1 - \text{Sensitivität}) \times \text{Prävalenz})$

Die Prävalenz einer Erkrankung bezeichnet ihre relative Häufigkeit. Die Ergebnisse wurden als Boxplot-Diagramme dargestellt: Die innerhalb der „Box“ liegenden Werte entsprechen dem 25. und 75. Quantil, der Strich in der Box entspricht dem Median. Demnach beinhaltet die „Box“ die Werte zwischen dem 25. und 75. Quantil. Durch die "Whiskers" wird der obere und untere Zaun dargestellt. Der obere Zaun entspricht dem 75 % Quantil + 1,5 x Interquartilsabstand, der unterer Zaun entsprechend dem 25 % Quantil - 1,5 x Interquartilsabstand. Der Interquartilsabstand wird aus dem 75 % Quantil – 25 % Quantil berechnet. Ausreißer wurden als Punkte über bzw. unter den Whiskers dargestellt. Bei den im Ergebnisteil aufgeführten Werten handelt es sich um Mediane. Die Daten wurden für eine bessere Darstellung in Gruppen gegliedert: Daten 0-6 Stunden nach Geburt wurden als 6 Stunden, Daten zwischen 6 und 12 Stunden nach Geburt wurden als 12 Stunden zusammengefasst etc.

Um die Mittelwerte zweier unterschiedlicher Stichproben miteinander zu vergleichen und die Unterschiede auf Signifikanz zu testen, wandten wir den t-Test für unabhängige Stichproben (Welch-Test) an.

Um den t-Test anwenden zu können müssen beide Stichproben aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen, oder aber die

Stichprobenumfänge müssen so groß sein, dass der zentrale Grenzwertsatz anwendbar ist. Das bedeutet, dass ab einer entsprechend großen Stichprobengröße die Verletzung der Normalverteilungsannahme trotzdem zu richtigen Ergebnissen führt.

Bei kleinen Stichprobenumfängen und starker Verletzung der Normalverteilungsannahme bietet sich die Anwendung eines nicht parametrischen Test zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte an. In diesem Fall wurden die Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht, der nicht parametrischen, d.h. verteilungsunabhängigen Alternative zum t-Test.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Stichproben zunächst jeweils grafisch mittels eines Quantile-Quantile-Plots (QQ-Plot) auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht (vgl. Anhang).

Hierbei werden die theoretischen Quantile der Normalverteilung auf der x-Achse, die errechneten Quantile der Stichprobe auf der y-Achse aufgetragen. Liegen die dabei entstehenden Punkte (näherungsweise) auf einer Geraden, so ist die Stichprobe (näherungsweise) normalverteilt.

Bei deutlichen Abweichungen der Punkte von der Geraden wurde der Mann-Whitney-U-Test anstelle des t-Tests angewandt (so vgl. Kap. 3.1: Mittlere Behandlungsdauer in Tagen; Kap. 3.5 – 3.11).

Wie auch beim t-Test deutet ein p-Wert kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau von 0.05 auf das Vorliegen von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte der Stichproben hin.

Um den optimalen Entscheidungswert der untersuchten Parameter zu bestimmen wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. ROC-Kurven berücksichtigen die Prävalenz einer Erkrankung in einem Kollektiv nicht. Der optimale Cut-off-Wert wurde so gewählt, dass er die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximiert. D.h. bei diesem Wert sollten die meisten Testpositiven entdeckt werden (hohe Sensitivität) mit einem Minimum an falsch-positiven Testergebnissen (hohe Spezifität).

Des Weiteren verwendeten wir zur Feststellung ob ein Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen (z.B. Normoblastenzahl und Gestationsalter) besteht, den Korrelationskoeffizienten (auch: Pearson-Korrelation). Dies ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen. Bei einem Wert von  $+1$  (bzw.  $-1$ ) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert  $0$  aufweist, gibt es keinen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen. Allerdings können diese ungeachtet dessen in nicht-linearer Weise, beispielsweise quadratisch oder exponentiell voneinander abhängen. Damit ist der Korrelationskoeffizient kein besonders geeignetes Maß für die (reine) stochastische Abhängigkeit von Merkmalen.

Der Korrelationskoeffizient wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Korrelationskoeffizient} = \frac{\text{Kovarianz}}{\sqrt{\text{Varianz}(\text{Gestationsalter}) \cdot \text{Varianz}(\text{Normoblasten})}} \quad (79).$$

Zur Veranschaulichung wurde in den Streudiagrammen, die auf einen linearen Zusammenhang schließen ließen eine Regressionsgerade erstellt. Die Regressionsgerade erlaubt es, aus einem bekannten x-Wert einen durch eine lineare Funktion gegebenen zugehörigen y-Wert zu berechnen. Zur Bestimmung der Regressionsgeraden wurde die Methode der kleinsten Quadrate verwendet. Das heißt, die Summe der quadrierten Abweichungen der Regressionsgeraden zu den bekannten Datenpunkten wird minimiert. Dabei lässt sich die Steigung der Geraden wie folgt berechnen:  $\text{Steigung} = \frac{\text{Kovarianz}}{\text{Varianz}(x\text{-Wert})} \quad (77).$

Alle Schaubilder wurden mit Hilfe des Programms R erstellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Excel und R.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenmerkmale

Nach Berücksichtigung der Ausschlusskriterien konnten 169 Früh- und Reifgeborene in die Studie aufgenommen werden. Die Neugeborenen wurden in zwei Gruppen nach Gestationsalter getrennt aufgeteilt:

- Reifgeborene nach  $\geq 37$  SSW n=104 (davon n=60 mit EOBI und n=44 in der Kontrollgruppe).
- Frühgeborene nach 23-36 SSW n=65 (davon n=27 mit EOBI und n=38 in der Kontrollgruppe).

#### Reifgeborene:

	Alle	EOBI	Ctrl.	p-Wert
<b>Anzahl Kinder</b>	104 (100 %)	60 (100 %)	44 (100 %)	
<b>Weiblich</b>	38 (37 %)	20 (33 %)	18 (41 %)	
<b>Männlich</b>	66 (63 %)	40 (66 %)	26 (59 %)	
<b>Mittleres Geburtsgewicht in Gramm (SD)</b>	3416,9 (500,17)	3479,9 (508,9)	3331,0 (480,4)	0,131
<b>Median Geburtsgewicht (Range)</b>	3380 (2340-4560)	3385 (2550-4560)	3310 (2340-4110)	
<b>Mittleres Gestationsalter in Tagen (SD)</b>	275,8 (9,1)	277,9 (8,4)	273,0 (9,8)	0,018
<b>Median SSW (Range)</b>	40 (37-42)	40 (37-42)	39 (37-42)	
<b>Mittlerer Infektionszeitpunkt in Stunden nach Geburt (SD)</b>	-	15,717 (15,1)	-	
<b>Median Infektionszeitpunkt</b>	-	9	-	
<b>Anzahl behandelter Patienten</b>	48	42	6	
<b>Mittlere Behandlungsdauer in Tagen</b>	3,7	5,3	4,2	6,21* 10 <sup>-9</sup>

Tab. 8: Deskriptive Statistik für Reifgeborene

## Frühgeborene:

	Alle	EOBI	Ctrl.	p-Wert
<b>Anzahl Kinder</b>	65 (100 %)	27 (100 %)	38 (100 %)	
<b>Weiblich</b>	27 (42 %)	13 (48 %)	14 (37 %)	
<b>Männlich</b>	38 (58 %)	14 (52 %)	24 (63 %)	
<b>Mittleres Geburtsgewicht in Gramm (SD )</b>	1578,6 (754,1)	1245,9 (619,3)	1815,1 (758,9)	0,002
<b>Median Geburtsgewicht (Range)</b>	1380,0 (530-3820)	1080,0 (530-2380)	1674,0 (590-3820)	
<b>Mittleres Gestationsalter in Tagen (SD)</b>	213,5 (27,3)	200,9 (26,6)	221,9 (24,5)	0,002
<b>Median SSW (Range)</b>	30,0 (23-36)	27,0 (23-36)	32,5 (26-36)	
<b>Mittlere Infektionszeitpunkt in Stunden nach Geburt (SD)</b>	-	6,9 (7,8)	-	
<b>Median Infektionszeitpunkt</b>	-	2,5	-	
<b>Anzahl behandelter Patienten</b>	40,0	30,0	10,0	
<b>Mittlere Behandlungsdauer in Tagen</b>	5,6	5,9	4,4	1,14* 10 <sup>-7</sup>

Tab. 9: Deskriptive Statistik für Frühgeborene

### 3.1.1 Gestationsalter

Die mittlere Schwangerschaftsdauer betrug insgesamt 252 Tage (SD: 16,1 Tage). In der Kontrollgruppe 249,3 Tage (SD: 16,6 Tage). In der EOBI-Gruppe betrug die mittlere Schwangerschaftsdauer 254 Tage (SD: 14,0 Tage).

### 3.1.2 Geburtsgewicht

Das mittlere Geburtsgewicht betrug 2709 g (SD: 597,8 g). In der Gruppe der Reifgeborenen 3417 g (SD: 500,2 g). In der Gruppe der Frühgeborenen betrug das mittlere Geburtsgewicht 1578 g (SD: 754,0 g). Dabei betrug das Geburtsgewicht in der Gruppe der Frühgeborenen mit EOBI 1246 g (SD: 619,3 g) und das Geburtsgewicht der Frühgeborenen der Kontrollgruppe 1815 g (SD: 759,0 g).

### 3.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Bei Früh- und Reifgeborenen mit Early-onset-Infektion konnte in 5 Fällen (5,6 %) eine **positive Blutkultur** nachgewiesen werden:

- *Serratia marcescens* (1x)
- $\beta$ -hämolisierende Streptokokken der Gruppe B (1x)
- *Escherichia coli* (1x)
- *Staphylokokkus epidermidis* (2x, wovon jedoch eine Kultur als kontaminiert gewertet wurde).

Des Weiteren fanden sich in **Ohrabstrichen**:

- Koagulase-negative Staphylokokken (4x)
- *Escherichia coli* (2x)

In **Rachenabstrichen** Nachweis von

- Ureaplasmen (1x)
- *Enterococcus faecalis* (2x)
- RS-Viren (1x)

Im **Stuhl** Nachweis von:

- Rota-Viren (1x)

### 3.3 Klinische Auffälligkeiten

Neugeborene mit Early-onset-Infektion hatten in 36,7 % (32 von 87) der Fälle eine auffällige Körpertemperatur, bei 5 dieser Neugeborenen fiel eine Hypothermie ( $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), bei 6 Neugeborenen eine Temperaturlabilität (Schwankungen  $>1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und bei 21 Neugeborenen eine Hyperthermie ( $>37,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) auf. 73,5 % (64 von 87) zeigten eine auffällige Atmung im Sinne einer Tachydyspnoe. Schwankungen der Sauerstoffsättigung traten bei 4,5 % (4 von 87) der Neugeborenen auf, ebenso Auffälligkeiten bei der Nahrungsaufnahme oder Probleme des Magen-Darmtraktes (4 Neugeborene



zeigten Erbrechen bzw. Nahrungsrückstau und ein geblähtes Abdomen). Weitere 21,8 % (19 von 87) der Neugeborenen zeigten neurologische Auffälligkeiten. 12 davon eine muskuläre Hypotonie. Bei 7 Neugeborenen fiel eine Hyperexzitabilität auf. Bei 65,5 % (57 von 87) der Neugeborenen fiel eine auffällige Perfusion (kapilläre Füllungszeit >2 s) auf, 29,9 % (26 von 87) der Neugeborenen zeigten Auffälligkeiten des Kreislaufs im Sinne einer Tachykardie und 6,9 % (6 von 87) der Neugeborene wiesen darüber hinaus einen auffälligen Lokalbefund auf (3 Neugeborene eine Omphalitis und 3 Neugeborene eine gerötete Eintrittsstelle durch periphere bzw. zentrale Venenkatheter).

### **3.4 Antibiotika-Therapie**

In der Gruppe der Neugeborenen mit EOBI wurden 68 Neugeborene mit Antibiotika behandelt. Die mittlere Behandlungsdauer betrug 5,2 Tage. In der Kontrollgruppe wurden 16 Neugeborene bis zum klinischen Ausschluss der Infektion mit einer antibiotischen Kombinationstherapie (in über 90 % der Fälle mit Ampicillin und Gentamycin) behandelt. Die mittlere Behandlungsdauer betrug 5,5 Tage. Die Behandlung wurde v.a. bei den Frühgeborenen aufgrund der klinischen Auffälligkeiten begonnen und nach rascher klinischer Besserung und ausbleibendem Anstieg der Infektparameter frühzeitig wieder beendet. Diese Kinder wurden als nicht infiziert betrachtet.

## 3.5 Kinetik der Normoblasten

### 3.5.1 Kinetik der Normoblasten bei Reifgeborenen ohne EOBI

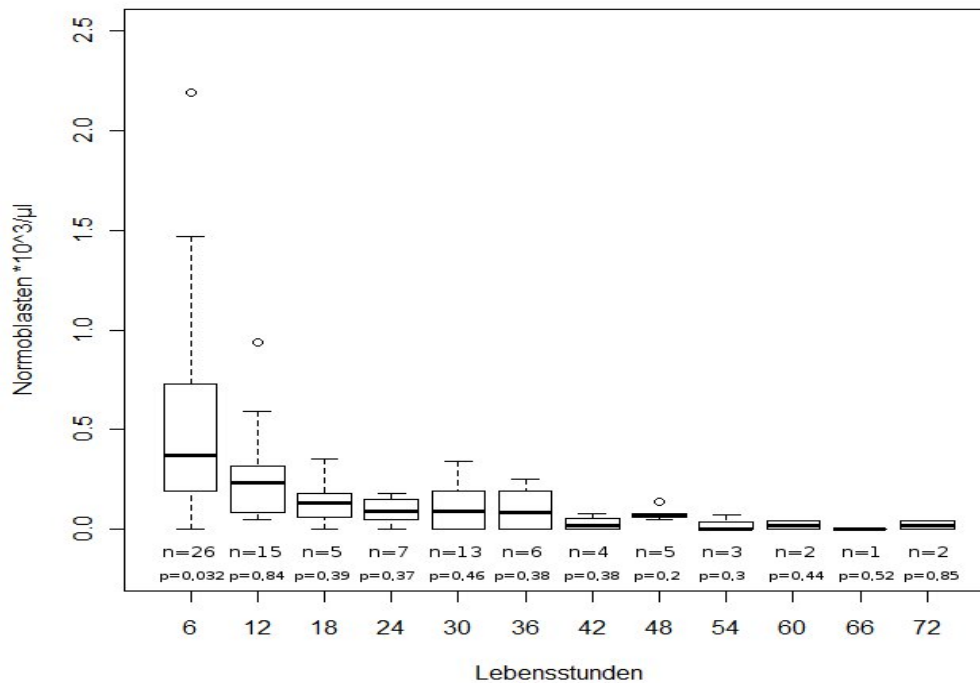


Abb. 3: Konzentration der Normoblasten, Reifgeborene ohne EOBI

Die Anzahl der Normoblasten im peripheren Blut, die durch den Sysmex XE-2100 bestimmt wurden, zeigten in der Gruppe der Reifgeborenen ohne EOBI einen abfallenden Verlauf. Während der ersten 72 Lebensstunden wurden 171 Werte von  $0-4,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bestimmt. Der Median der Normoblasten in den ersten 0-6 Stunden nach Geburt betrug  $0,37 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), nach 42-48 Stunden  $0,07 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Es konnte ein Abfallen der Normoblastenzahl über die ersten 42 Stunden post partum beobachtet werden. Danach bewegten sich die Normoblasten auf einem Plateau (vgl. Abb. 3).

### 3.5.2 Kinetik der Normoblasten bei Frühgeborenen ohne EOBI

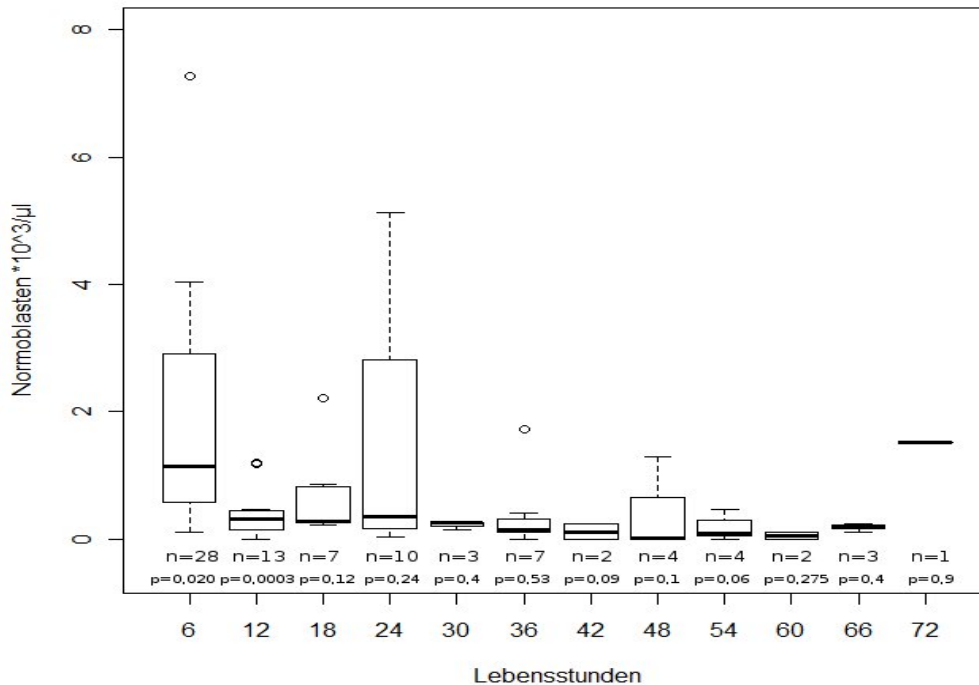


Abb. 4: Konzentration der Normoblasten, Frühgeborene ohne EOBI

Bei der Gruppe der Frühgeborenen ohne EOBI zeigte sich ebenfalls ein abfallender Verlauf der Normoblastenzahl im peripheren Blut. Es wurden während der ersten 72 Lebensstunden 83 Werte von 0-28,69  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  bestimmt. Der Median in den ersten 0-6 Stunden nach Geburt betrug 1,15  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR: 2,28  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), nach 42-48 Stunden 0,01  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR: 0,34  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Es konnte auch hier ein Abfallen der Normoblastenzahl über die ersten 42 Stunden nach der Geburt beobachtet werden. Danach bewegten sich die Normoblasten ebenfalls auf einem Plateau (vgl. Abb. 4).

### 3.6 Einfluss des Gestationsalters auf die Normoblasten

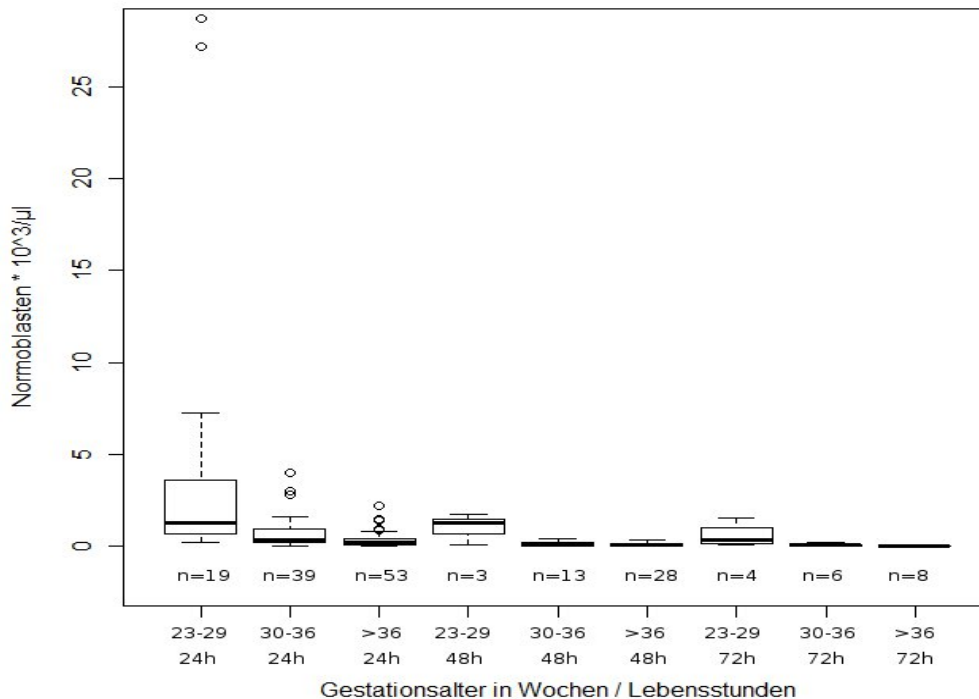


Abb. 5: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Neugeborenen ohne EOBI

Es sollte geprüft werden ob das Gestationsalter einen Einfluss auf die Normoblasten aufweist.

Zur Darstellung der Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter wurden die Neugeborenen in drei Gruppen unterteilt.

- Neugeborene mit einem Gestationsalter zwischen 161 und 203 Tagen (=23-29 SSW)
- Neugeborene mit einem Gestationsalter zwischen 204 und 252 Tagen (=30-36 SSW)
- Neugeborene mit einem Gestationsalter von mehr als 252 Tagen (>36 SSW)

In allen drei Gruppen zeigte die Normoblastenkonzentration einen abfallenden Verlauf mit einem maximalen Wert bei 0-24 Lebensstunden. Der Median für die Normoblastenkonzentration von 0-24 Lebensstunden betrug  $1,26 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $2,89 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 161 und 203 Tagen;  $1,30 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,82 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 204 und 252 Tagen; und  $0,34 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,55 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter von mehr als 252 Tagen.

Zwischen 49 und 72 Lebensstunden betrugen die Normoblastenwerte noch  $0,25 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 161 und 203 Tagen;  $0,08 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,16 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 204 und 252 Tagen; und  $0,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,04 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Gestationsalter von mehr als 252 Tagen.

In der Gruppe der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 161 und 203 Tagen lagen die Normoblasten-Werte stets höher als bei den anderen beiden Gruppen. Wobei die Werte bei den Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 204 und 252 Tagen höher lagen als bei den Neugeborenen mit einem Gestationsalter von mehr als 252 Tagen. Diese Unterschiede waren innerhalb der ersten 24 Lebensstunden zwischen allen drei Gruppen signifikant.

Insgesamt lag die Normoblastenkonzentration bei Neugeborenen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden umso höher, je geringer das Gestationsalter war

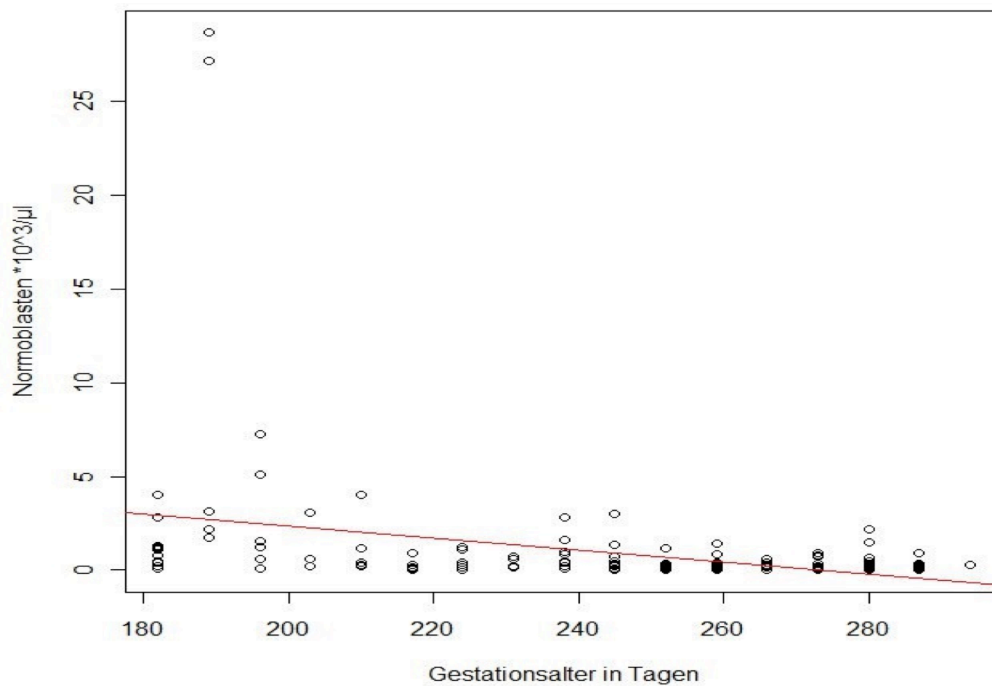


Abb. 6: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Neugeborenen ohne EOBI ( $r=-0,49$ )

Um die Abhängigkeit der Normoblastenkonzentration vom Gestationsalter darzustellen, wurde die absolute Normoblastenanzahl ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) gegen das Gestationsalter (d) aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Der Korrelationskoeffizient betrug  $r=-0,49$ . Die Normoblastenkonzentration war umso höher je geringer das Gestationsalter war.

### 3.7 Einfluss des Geburtsgewichts auf die Normoblasten

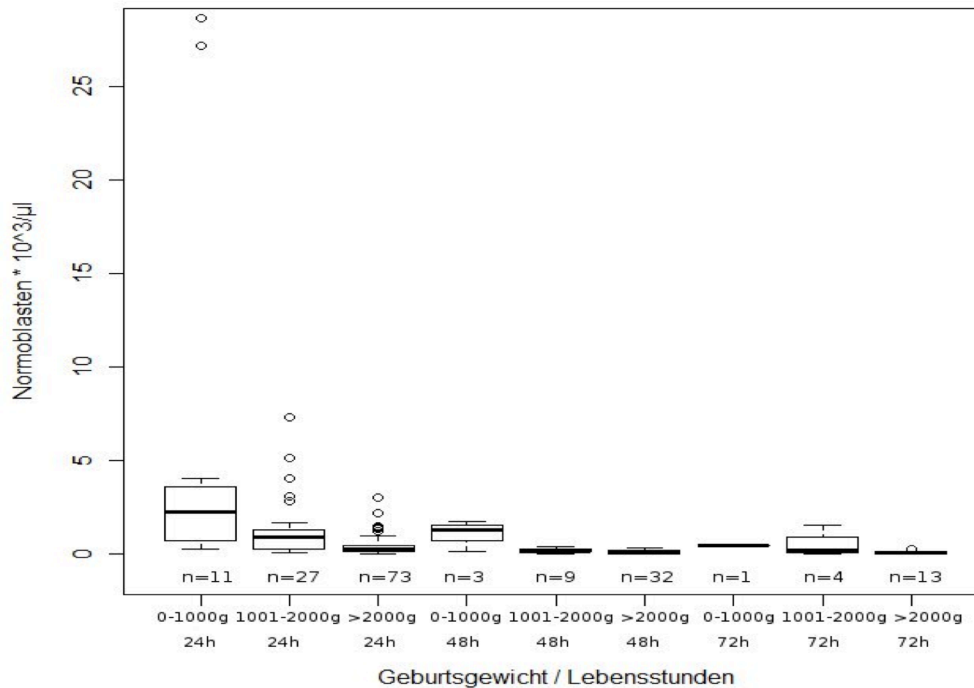


Abb. 7: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht bei Neugeborenen ohne EOBI

Zur Darstellung der Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht wurden die Kinder in drei Gruppen unterteilt.

- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g
- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 g und 2000 g
- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht über 2000 g

In allen drei Gruppen zeigte die Normoblastenkonzentration einen abfallenden Verlauf mit einem maximalen Wert bei 0-24 Lebensstunden. Der Median für die Normoblastenkonzentration von 0-24 Lebensstunden betrug  $2,22 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $2,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g;  $1,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,82 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht

zwischen 1000 g und 2000 g; und  $0,47 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von mehr als 2000 g.

Zwischen 49 und 72 Lebensstunden betragen die Normoblastenwerte noch  $0,27 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,34 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g;  $0,06 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,16 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 g und 2000 g; und  $0,04 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,09 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von mehr als 2000 g.

In der Gruppe der Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g lagen die Normoblastenwerte stets höher als bei den anderen beiden Gruppen. Wobei die Werte bei den Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 g und 2000 g höher lagen als bei den Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von mehr als 2000 g. Diese Unterschiede waren innerhalb der ersten 24 Lebensstunden signifikant zwischen den Neugeborenen unter 1000 g und den Neugeborenen über 2000 g ( $p=5,7 \cdot 10^{-5}$ ) sowie zwischen den Neugeborenen zwischen 1000 g und 2000 g und den Neugeborenen über 2000 g ( $p=0,0004$ ).

Insgesamt lag die Normoblastenkonzentration bei Neugeborenen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden umso höher, je geringer das Geburtsgewicht war.



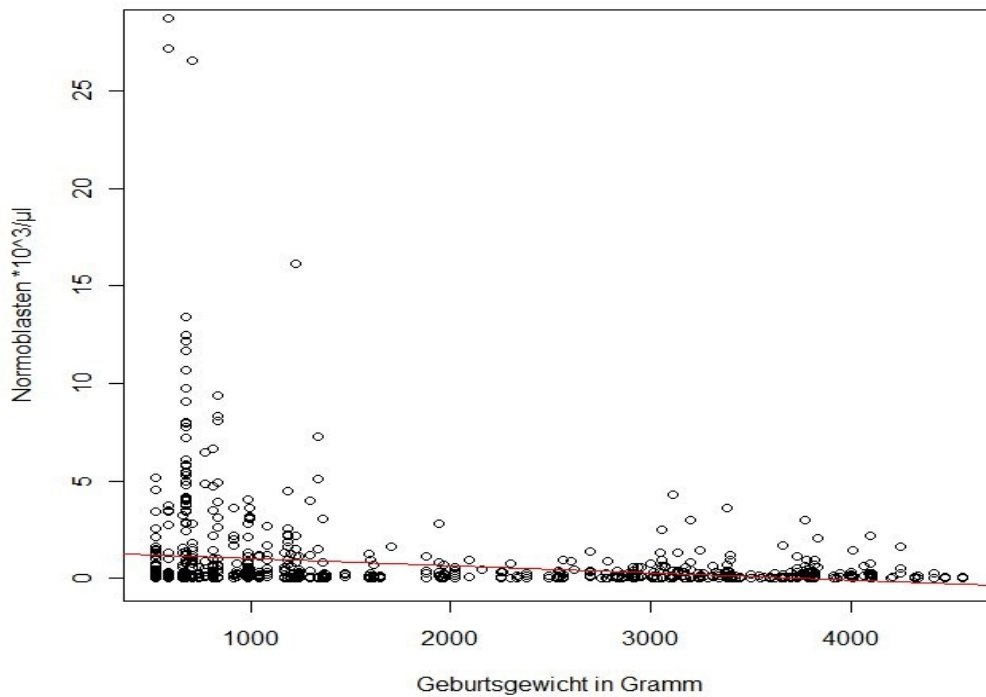


Abb. 8: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht bei Neugeborenen ( $r=-0,35$ ) ohne EOB

Es zeigte sich eine negative Abhängigkeit zwischen Normoblasten und Geburtsgewicht. Die Normoblastenkonzentration war umso höher desto geringer das Geburtsgewicht war. Der Korrelationskoeffizient betrug dabei  $r=-0,35$ .

### 3.8 Einfluss von Hypotrophie/ Hypertrophie auf die Normoblasten

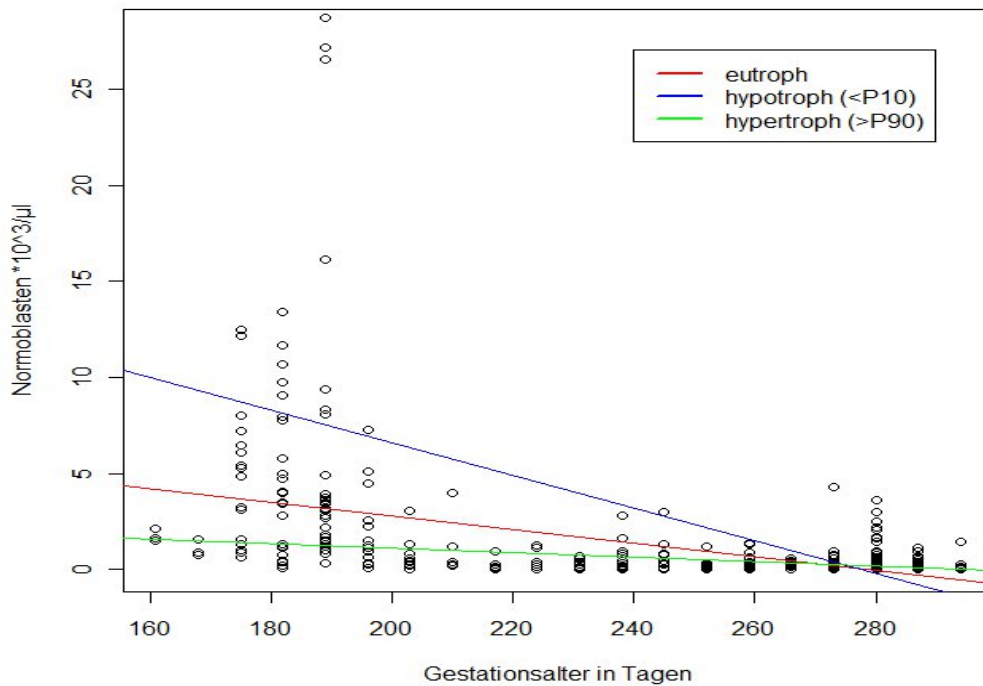


Abb. 9: Normoblastenkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei hypotrophen (<P10), eutrophen und hypertrophen (>P90) Neugeborenen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden

Um den Zusammenhang zwischen der Normoblastenkonzentration, der Gewichtsperzentile und des Gestationsalters darzustellen wurden die Kinder in drei Gruppen aufgeteilt:

- Hypotrophe Neugeborene (Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile)
- Eutrophe Neugeborene (Geburtsgewicht zwischen der 10. Und 90. Perzentile)
- Hypertrophe Neugeborene (Geburtsgewicht über der 90. Perzentile)

Die Normoblasten wurden nun jeweils für die Gruppen getrennt gegen das Gestationsalter in Tagen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Der

Korrelationskoeffizient betrug für die hypotrophen Neugeborenen  $r=-0,50$ ; für die eutrophen  $r=-0,52$ ; und für die hypertrophen Neugeborenen  $r=-0,33$ . Die Normoblastenkonzentration lag auch hier wie schon beschrieben umso höher je geringer das Gestationsalter war.

Lediglich bei den hypotrophen Neugeborenen zeigten sich gegenüber den eutrophen Neugeborenen ( $p=0,0004$ ) initial eine signifikant höhere Normoblastenkonzentration.

Der Unterschied zwischen hypotrophen und hypertrophen ( $p=0,056$ ) sowie zwischen den eutrophen und hypertrophen ( $p=0,08$ ) Neugeborenen war nicht signifikant.

### 3.9 Einfluss des Geschlechts auf die Normoblasten

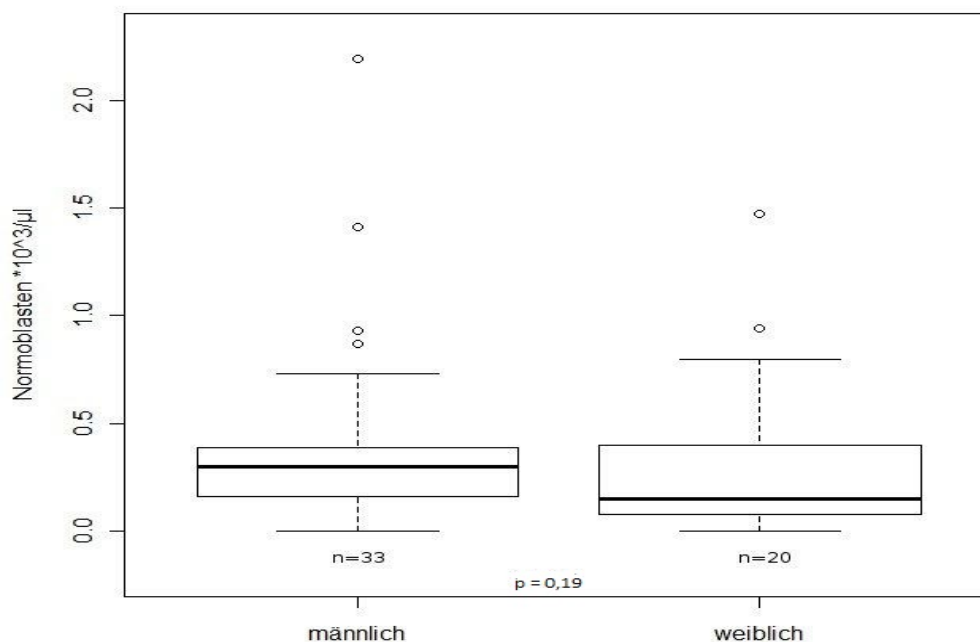


Abb. 10: Normoblasten innerhalb der ersten 24 Lebensstunden in Abhängigkeit vom Geschlecht

Beim Vergleich der Normoblasten in Abhängigkeit vom Geschlecht 24 Stunden

nach Geburt konnte weder in der EOBI-Gruppe noch in der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, jedoch lagen die Normoblastenwerte der männlichen Neugeborenen tendenziell höher.

### 3.10 Kinetik der Normoblasten bei Reifgeborenen mit EOBI im Vergleich zu Reifgeborenen ohne EOBI

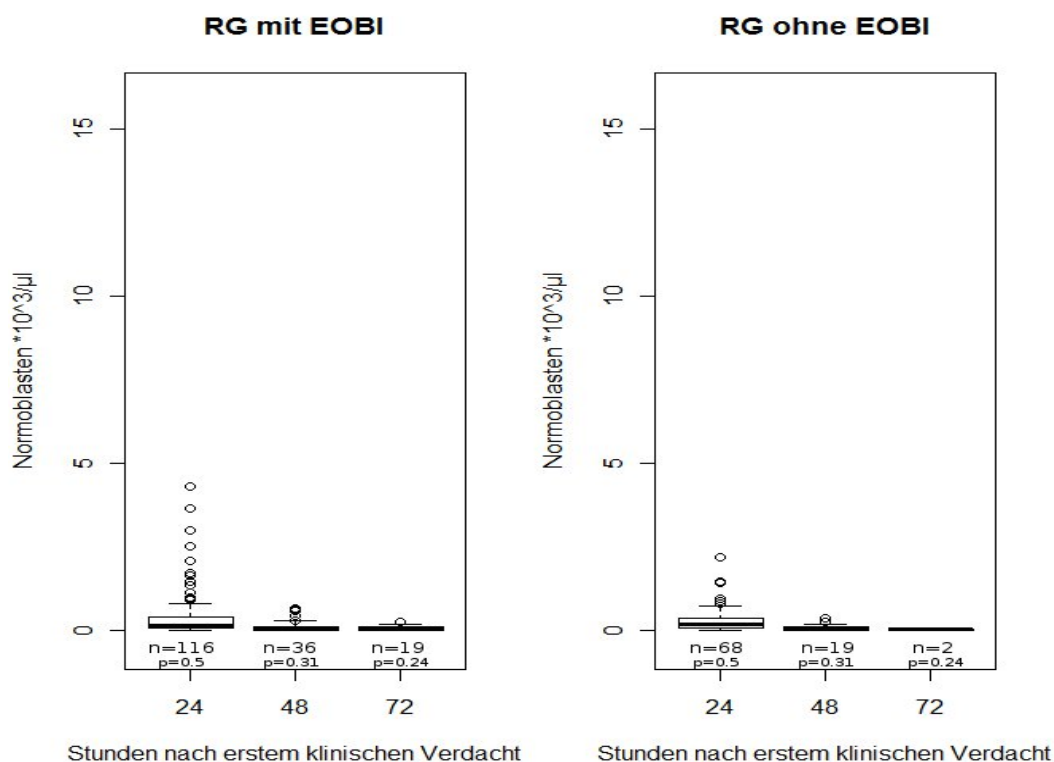


Abb. 11: Normoblasten nach erstem klinischen Verdacht bei Reifgeborenen

Die Anzahl der Normoblasten im peripheren Blut der Gruppe der Reifgeborenen mit Early-onset-Infektion zeigte entsprechend zur Kontrollgruppe der Reifgeborenen ohne EOBI, einen mit der Zeit abfallenden Verlauf. Es konnte ein Abfallen der Normoblastenzahl über die ersten 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht beobachtet werden. Danach bewegten sich die

Normoblasten auf einem Plateau (vgl. Abb. 11).

Der Median der Werte in den ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht betrug bei reifgeborenen Kindern mit EOBI  $0,13 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,69 \cdot 10^3/\mu$ ), nach 48 Stunden  $0,08 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,18 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) und nach 72 Stunden  $0,04 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,07 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne EOBI unterschieden sich die Werte nicht signifikant.

Die Gruppe der Reifgeborenen mit EOBI zeigte innerhalb von 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikant erhöhten Normoblastenwerte. Die Normoblasten zeigten sowohl in der Gruppe der Reifgeborenen mit EOBI, als auch in der Gruppe ohne EOBI einen nach dem ersten klinischen Verdacht abfallenden Verlauf mit einem Maximum bei 0-24 Stunden mit Erreichen des Plateaus nach 48 Stunden.

### 3.11 Kinetik der Normoblasten bei Frühgeborenen mit EOBI im Vergleich zu Frühgeborenen ohne EOBI

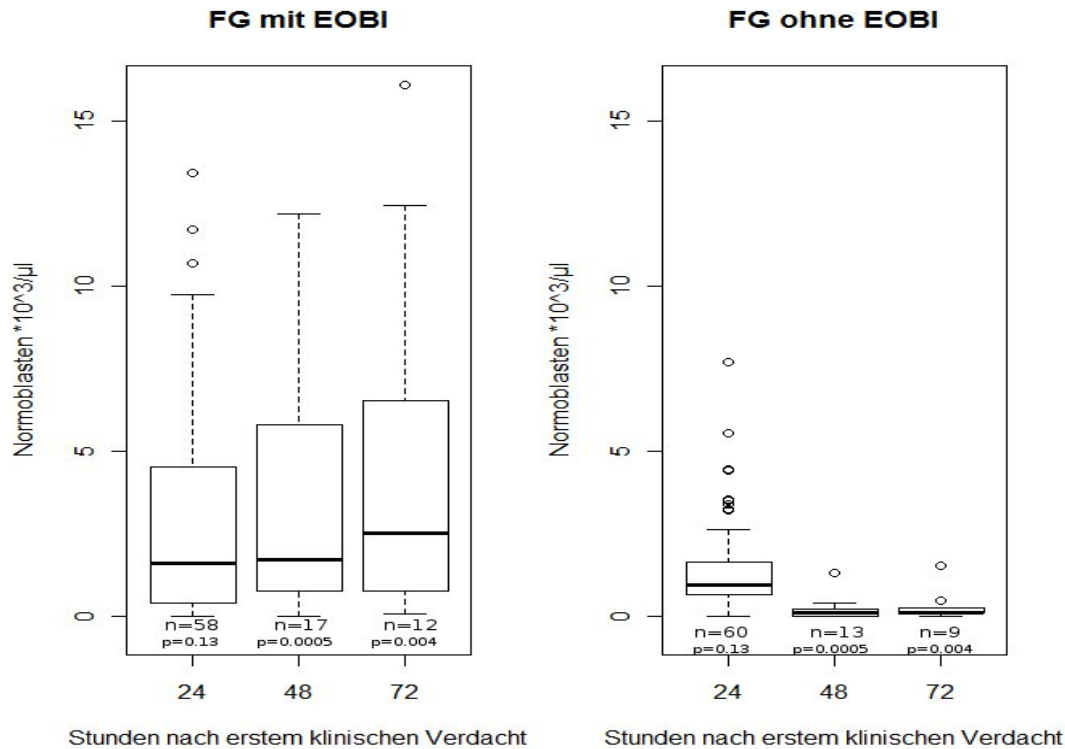


Abb. 12: Normoblasten nach dem ersten klinischen Verdacht bei Frühgeborenen

In der Gruppe der Frühgeborenen mit EOBI zeigte die Anzahl der Normoblasten im Differentialblutbild im Gegensatz zur Kontrollgruppe, der Frühgeborenen ohne EOBI, einen mit der Zeit ansteigenden Verlauf (vgl. Abb. 12).

Der Median der Werte in den ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht betrug bei frühgeborenen Kindern mit EOBI  $1,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $3,84 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), nach 48 Stunden  $1,69 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $5,05 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) und nach 72 Stunden  $2,52 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $4,93 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe

ohne EOBI unterschieden sich die Werte nach 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht signifikant.

Die Frühgeborenen mit Early-onset-Infektion (vgl. Abb. 12) wiesen innerhalb von 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht ( $1,69 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $5,05 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ )) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,12 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,13 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ )) signifikant höhere Normoblastenwerte auf ( $p=0,0005$  nach 48 Stunden und  $p=0,04$  nach 72 Stunden). Im Gegensatz zu den Frühgeborenen ohne EOBI sanken bei den Frühgeborenen mit EOBI die Normoblastenwerte nach dem ersten klinischen Verdacht nicht ab sondern stiegen weiter an.

### **3.12 Receiver operator characteristic (ROC)- Kurven**

Zur Bestimmung der Entscheidungsgrenzen für Normoblastenwerte ob das Reif- bzw. Frühgeborene an einer neonatalen bakteriellen Infektion erkrankte oder nicht wurden ROC-Kurven 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erstellt. Abhängig vom ersten klinischen Verdacht wurden unterschiedliche Sensitivitäten/ Spezifitäten für die Normoblasten bestimmt, somit auch unterschiedliche Cut-off-Werte.

#### **3.12.1 ROC-Kurven für Normoblasten bei Reifgeborenen**

24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht lag die Sensitivität bei einem Cut-off-Wert von  $>0,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bei 9,4 %, die Spezifität betrug 95,5 %. Nach 48 Stunden und einem Cut-off-Wert von  $>0,27 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  wurde eine Sensitivität von 14 % mit einer Spezifität von 95 % erreicht. Nach 72 Stunden betrug die Sensitivität 37 %, die Spezifität 100 % bei einem Cut-off-Wert von  $>0,05 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (vgl. Abb. 13).

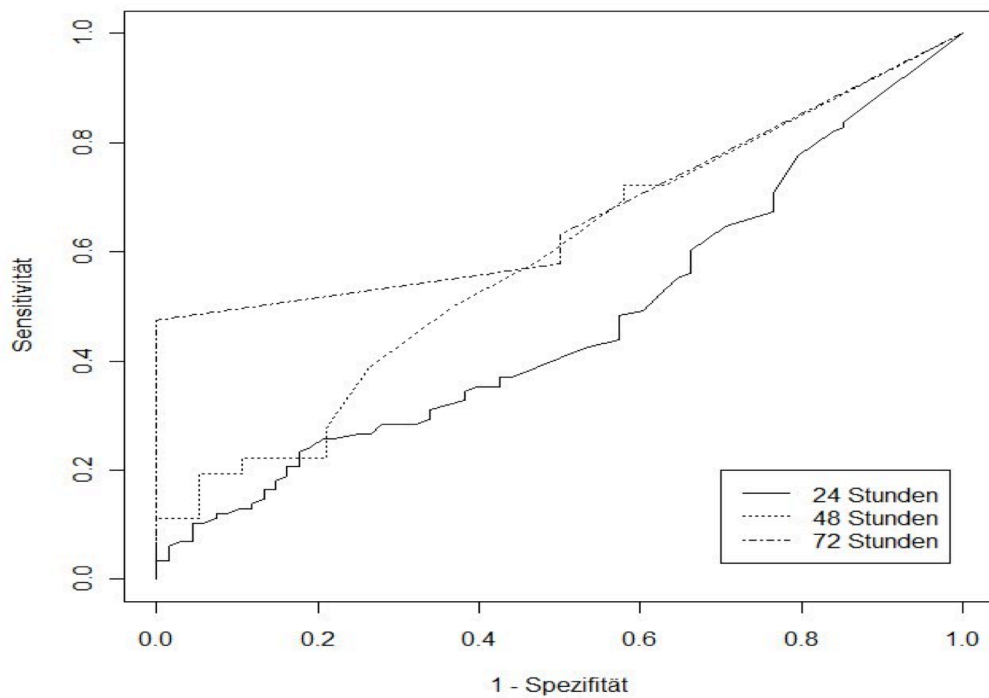


Abb. 13: ROC-Kurven für Normoblasten bei Reifgeborenen 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

### 3.12.2 ROC-Kurven für Normoblasten bei Frühgeborenen

24 Stunden nach Geburt lag die Sensitivität bei einem Cut-off-Wert von  $>1,31 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bei 55 %. Die Spezifität betrug 75 %. Nach 48 Stunden und bei einem Cut-off-Wert von  $>0,75 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  wurde eine Sensitivität von 70 % bei einer Spezifität von 92 % erreicht. Nach 72 Stunden betrug die Sensitivität 83 %, die Spezifität 77 % bei einem Cut-off-Wert von  $>0,39$  (vgl. Abb. 14).



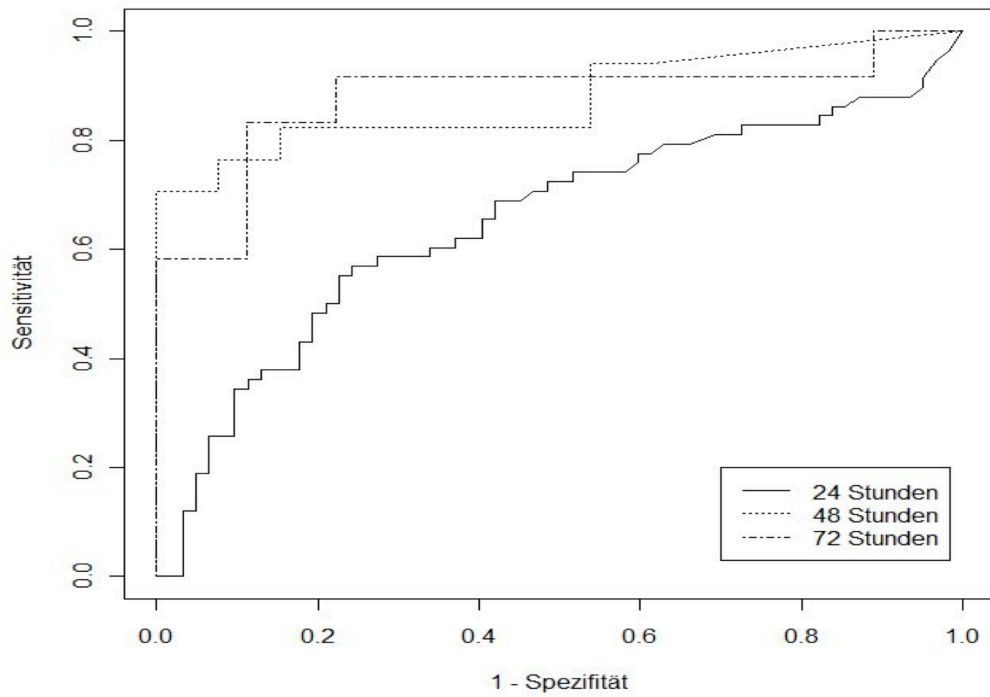


Abb. 14: ROC-Kurven für Normoblasten bei Frühgeborenen 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

### 3.13 Diagnostische Wertigkeit von Normoblasten bei der EOBI bei Reifgeborenen

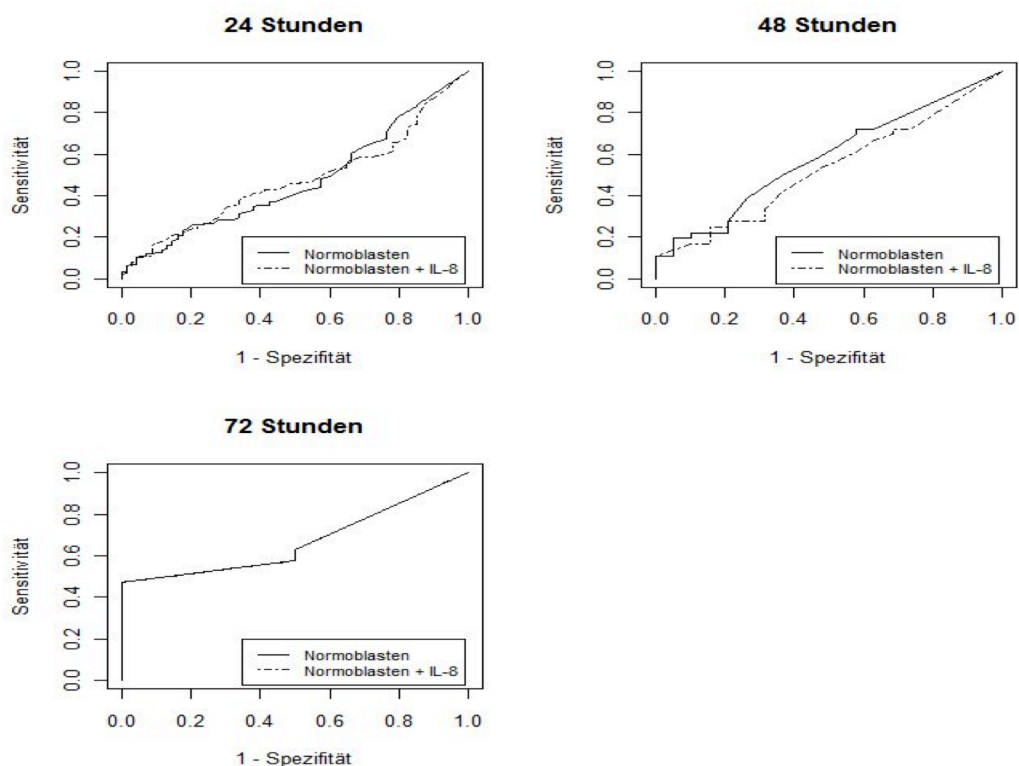


Abb. 15: ROC-Kurven für Normoblasten und Normoblasten kombiniert mit IL-8 Reifgeborener 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

Die ROC-Kurven der Normoblastenwerte und der Normoblastenwerte plus IL-8 wurden in Abhängigkeit des Infektionsalters, also ab dem Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachts verglichen. 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht konnten die Normoblasten (Cut-off-Wert  $>0,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) lediglich eine Sensitivität von 9,4 % bei einer Spezifität von 96 % erreichen. 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erreichten die Normoblasten (bei einem Cut-off-Wert von  $>0,39 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) die höchste Sensitivität von 37 % bei erhaltener Spezifität. Bei Betrachtung der Normoblasten (Cut-off-Wert von  $>0,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) in Kombination mit IL-8 ließ sich die Sensitivität innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht auf bis zu 84 % steigern, allerdings zu Lasten der Spezifität (15 %) (vgl. Abb. 15).

24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht betrug die Sensitivität für die Kombination von Normoblasten und IL-8 84 %. Die Sensitivität für die Normoblasten (9,4 %) lag deutlich darunter.

### 3.14 Diagnostische Wertigkeit von Normoblasten bei der EOBI bei Frühgeborenen

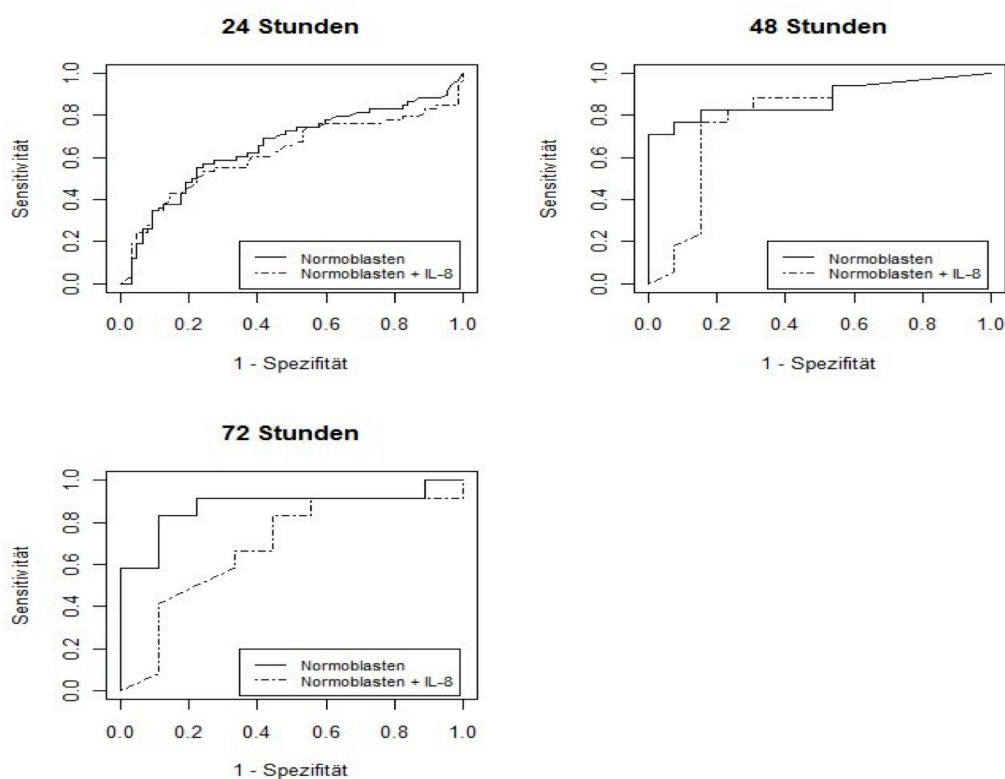


Abb. 16: ROC-Kurven für Normoblasten und Normoblasten kombiniert mit IL-8 Frühgeborener 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht

Die ROC-Kurven der Normoblastenwerte und der Normoblastenwerte plus IL-8 wurden auch bei den Frühgeborenen in Abhängigkeit vom Infektionsalter also ab dem Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachts verglichen. 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht konnten die Normoblasten (Cut-off-Wert  $>1,31 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) eine Sensitivität von 55 % bei einer Spezifität von 75 % erreichen. in

Kombination mit IL-8 ließ sich die Sensitivität innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektionsbeginn auf bis zu 69 % steigern, allerdings wiederum zu Lasten der Spezifität (51 %).

48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erreichten die Normoblasten (Cut-off-Wert von  $>0,75 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) eine Sensitivität von 70 % bei einer Spezifität von 92 %. In Kombination mit IL-8 konnte hier eine Sensitivität von 98 % erreicht werden, allerdings auch hier wiederum zu Lasten der Spezifität (8 %) (vgl. Abb. 16).

72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erreichten die Normoblasten (bei einem Cut-off-Wert von  $>0,39 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) die höchste Sensitivität von 83 % bei einer Spezifität von 77 %.

Innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht (dem bei der Betrachtung als möglichst frühen Infektparameter interessantesten Zeitpunkt) betrug die Sensitivität für die Kombination von Normoblasten und IL-8 69 %. Die Sensitivität für die Normoblasten (55 %) erzielte zwar einen höheren Wert als bei den Reifgeborenen, war aber, wie auch bei den Reifgeborenen der Kombination aus Normoblasten plus IL-8, deutlich unterlegen.

### **3.15 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Reifgeborenen**

Um die Wertigkeit der verschiedenen diagnostischen Parameter Normoblasten, CrP und IL-8 bei der Diagnostik der EOBI vergleichen zu können, wurden jeweils die Sensitivität, Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert für 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht berechnet. Des Weiteren wurden die 95 %-Konfidenzintervalle anhand von binominalen Tabellen bestimmt (vgl. Tabelle 10-15).

**Reifgeborene:**

<b>24 Stunden</b>	<b>Normoblasten</b> <b>&gt;0.97 *10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>CRP</b> <b>&gt;10 mg/l</b>	<b>Leuko- zyten</b> <b>&gt;30 oder</b> <b>&lt;5</b> <b>*10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>Il-8</b> <b>&gt;60 pg/ml</b>	<b>Normoblasten</b> <b>oder/und Il-8</b> <b>&gt;0.97 *10<sup>3</sup>/µl</b> <b>oder/und &gt;60</b> <b>pg/ml</b>
<b>Sensitivität</b>	0,094 [0.05;0.14]	0,69 [0.62;0.76]	0,04 [0.01;0.07]	0,17 [0.11;0.22]	0,84 [0.78;0.89]
<b>Spezifität</b>	0,96 [0.93;0.98]	1 [1;1]	0,95 [0.92;0.98]	0,8 [0.75;0.86]	0,15 [0.09;0.19]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	0,78 [0.73;0.84]	1 [1;1]	0,63 [0.55;0.69]	0,6 [0.53;0.67]	0,63 [0.55;0.69]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,38 [0.31;0.45]	0,65 [0.58;0.72]	0,37 [0.3;0.44]	0,36 [0.29;0.43]	0,34 [0.28;0.41]

Tab. 10: Gruppengröße n=184, Prävalenz=0,63

<b>48 Stunden</b>	<b>Normoblasten</b> <b>&gt;0.27 *10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>CRP</b> <b>&gt;10 mg/l</b>	<b>Leuko- zyten</b> <b>&gt;30 oder</b> <b>&lt;5</b> <b>*10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>Il-8</b> <b>&gt;60 pg/ml</b>	<b>Normoblasten</b> <b>oder/und Il-8</b> <b>&gt;0.27 *10<sup>3</sup>/µl</b> <b>oder/und &gt;60</b> <b>pg/ml</b>
<b>Sensitivität</b>	0,14 [0.05;0.23]	0,77 [0.66;0.88]	0 [0;0]	0 [0;0]	0,91 [0.84;0.98]
<b>Spezifität</b>	0,95 [0.88;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	0,1 [0.02;0.18]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	0,83 [0.73;0.93]	1 [1;1]	- -	0,8 [0.66;0.94]	0,66 [0.53;0.78]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,37 [0.23;0.5]	0,7 [0.58;0.82]	0,34 [0.22;0.47]	0,22 [0.07;0.36]	0,39 [0.26;0.52]

Tab. 11: Gruppengröße n=55, Prävalenz=0,65

72 Stunden	Normoblasten >0.05 *10 <sup>3</sup> /μl	CRP >10 mg/l	Leuko- zyten >30 oder <5 *10 <sup>3</sup> /μl	IL-8 >60 pg/ml	Normoblasten oder/und IL-8 >0.05 *10 <sup>3</sup> /μl oder/und >60 pg/ml
<b>Sensitivität</b>	0,37 [0.16;0.57]	0,79 [0.61;0.96]	0 [0;0]	0 [0;0]	0,94 [0.83;1]
<b>Spezifität</b>	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	0,01 [0;0.1]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	1 [1;1]	1 [1;1]	- -	- -	0,9 [0.77;1]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,14 [0;0.29]	0,33 [0.13;0.53]	0,09 [0;0.22]	0,09 [0;0.22]	0,02 [0;0.09]

Tab. 12: Gruppengröße n=21, Prävalenz=0,9

24 Stunden (dem hinsichtlich der Diagnostik einer EOBI relevantesten Zeitpunkt) nach dem ersten klinischen Verdacht zeigte CrP, als einzelner prädiktiver Parameter für eine EOBI betrachtet, die höchste Sensitivität. Eine Kombination von IL-8 und der Normoblastenkonzentration konnte eine noch höhere Sensitivität von bis zu 84 % erreichen, allerdings bei einer Spezifität von lediglich 15 %.

Ab 48 Stunden nach Geburt stieg die Sensitivität des CrP-Wertes bis auf 77 % bei erhaltener Spezifität.

Die Normoblastenkonzentration konnte weder den IL-8-Wert noch den CrP-Wert als prognostischer Parameter für eine Neugeboreneninfektion übertreffen. Die besten Ergebnisse für die Normoblasten als Infektparameter wurden bei den Reifgeborenen innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erreicht.

### 3.16 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Parameter bei Frühgeborenen

Frühgeborene:

24 Stunden	Normoblasten >1.31*10 <sup>3</sup> /µl	CRP >10 mg/l	Leuko- zyten >30 oder <5 *10 <sup>3</sup> /µl	Il-8 >60 pg/ml	Normoblasten oder/und Il-8 >1,31 *10 <sup>3</sup> /µl oder/und >60 pg/ml
<b>Sensitivität</b>	0,55 [0.46;0.64]	0,51 [0.42;0.6]	0.24 [0.16;0.3 2]	0,26 [0.18;0.34]	0,69 [0.6;0.77]
<b>Spezifität</b>	0,75 [0.68;0.83]	1 [1;1]	0,97 [0.94;1]	0,63 [0.54;0.48]	0,51 [0.42;0.6]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	0,68 [0.59;0.73]	1 [1;1]	0,88 [0.82;93]	0,39 [0.31;0.48]	0,57 [0.48;0.66]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,64 [0.56;0.73]	0,69 [0.6;0.77]	0,58 [0.49;0.6 7]	0,47 [0.38;0.56]	0,64 [0.55;0.73]

Tab. 13: Gruppengröße n=120, Prävalenz=0,48

48 Stunden	Normoblasten >0,75*10 <sup>3</sup> /µl	CRP >10 mg/l	Leuko- Zyten >30 oder <5 *10 <sup>3</sup> /µl	Il-8 >60 pg/ml	Normoblasten oder/und Il-8 >0.75 *10 <sup>3</sup> /µl oder/und >60 pg/ml
<b>Sensitivität</b>	0,7 [0.54;0.86]	0,7 [0.54;0.86]	0,53 [0.35;0.7]	0,06 [0;0,14]	0,98 [0.93;1]
<b>Spezifität</b>	0,92 [0.82;1]	1 [1;1]	0,84 [0.72;0.9 7]	0,92 [0.82;1]	0,08 [0;0.17]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	0,92 [0.82;1]	1 [1;1]	0,81 [0.68;0.9 6]	0,5 [0.32;0.68]	0,58 [0.4;0.76]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,7 [0.54;0.87]	0,72 [0.56;0.68]	0,58 [0.4;0.76]	0,42 [0.25;0.6]	0,78 [0.63;0.93]

Tab. 14: Gruppengröße n=30, Prävalenz=0,56

<b>72 Stunden</b>	<b>Normoblasten</b> <b>&gt;0.39 *10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>CRP</b> <b>&gt;10 mg/l</b>	<b>Leuko- zyten</b> <b>&gt;30 oder</b> <b>&lt;5</b> <b>*10<sup>3</sup>/µl</b>	<b>IL-8</b> <b>&gt;60 pg/ml</b>	<b>Normoblasten</b> <b>oder/und IL-8</b> <b>&gt;0.39 *10<sup>3</sup>/µl</b> <b>oder/und &gt;60</b> <b>pg/ml</b>
<b>Sensitivität</b>	0,83 [0.67;0.99]	0,58 [0.37;0.79]	0,5 [0.28;0.71]	0,17 [0.01;0.32]	1 [1;1]
<b>Spezifität</b>	0,77 [0.59;0.95]	1 [1;1]	1 [1;1]	0,77 [0.6;0.95]	0,02 [0;0.7]
<b>positiver prädiktiver Wert</b>	0,83 [0.67;0.99]	1 [1;1]	1 [1;1]	0,5 [0.29;0.71]	0,57 [0.37;0.78]
<b>negativer prädiktiver Wert</b>	0,77 [0.59;0.95]	0,64 [0.44;0.85]	0,6 [0.30;0.8]	0,41 [0.2;0.62]	1 [1;1]

Tab. 15: Gruppengröße n=21, Prävalenz=0,57

24 Stunden (dem hinsichtlich der Diagnostik einer EOBI relevantesten Zeitpunkt) nach dem ersten klinischen Verdacht zeigten die Normoblasten als einzelner prädiktiver Parameter für eine EOBI betrachtet, die höchste Sensitivität. Eine Kombination von IL-8 und der Normoblastenkonzentration konnte eine noch höhere Sensitivität von bis zu 69 % erreichen, allerdings bei einer Spezifität von lediglich 51 %.

Ab 48 Stunden nach Geburt stieg die Sensitivität der Normoblastenkonzentration bis auf 70 % bei einer Spezifität von 92 %. Insgesamt zeigte sich hier der CrP-Wert überlegen mit einer Sensitivität von ebenfalls 70 % bei jedoch erhaltener Spezifität.

Die Normoblastenkonzentration konnte in der Gruppe der Frühgeborenen im Gegensatz zu der Gruppe der Reifgeborenen sowohl den IL-8-Wert als auch den CrP-Wert als prognostischer Parameter für eine Neugeboreneninfektion übertreffen. Die besten Ergebnisse für die Normoblasten als Infektparameter



wurden bei den Frühgeborenen innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht erreicht, zu diesem Zeitpunkt zeigte sich allerdings das CrP bereits überlegen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Ziel der Arbeit

Bakterielle Infektionen, v.a. die Early-onset-Infektion, sind weiterhin, trotz wirksamer Antibiotikatherapie mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (19/186/187). Eine frühe Diagnosestellung ist daher entscheidend für das Überleben bzw. die Weiterentwicklung des Neugeborenen.

Es sollte geklärt werden, ob die Normoblasten neben bekannten laborchemischen Methoden als Infektparameter bei der Early-onset-Infektion dienen könnten. Dazu sollte geklärt werden:

- 1.) Ob mit dem Sysmex XE-2100 effizient die Kinetiken der Normoblasten im peripheren Blut bei Reif- und Frühgeborenen ermittelt werden können.
- 2.) Inwiefern sich die Kinetik der Normoblasten innerhalb der ersten 72 Lebensstunden bei Reif- und Frühgeborenen unterscheidet.
- 3.) Inwiefern das Gestationsalter oder das Geburtsgewicht einen Einfluss auf die Anzahl der Normoblasten im peripheren Blut haben.
- 4.) Ob es im Rahmen einer Early-onset-Infektion zu einer Erhöhung der Normoblasten im peripheren Blut kommt.
- 5.) Ob die Normoblasten, möglicherweise auch in Kombination mit IL-8 als prädiktiver Marker einer Early-onset-Infektion bei Früh- und Reifgeborenen geeignet sind.

Falls die Normoblasten die Anforderung eines Infektparameters erfüllen, der möglichst frühzeitig mit ausreichender Sensitivität und Spezifität eine Infektion bestätigen oder ausschließen soll, könnten Neugeborene mit einer neonatalen bakteriellen Infektion, die zu Beginn durchaus klinisch inapparent verlaufen kann, schneller diagnostiziert und einer adäquaten Therapie zugeführt werden. Bei nicht erkrankten Neugeborenen könnte auf eine nebenwirkungsreiche ex-juvantibus-Antibiotikatherapie verzichtet werden.

## 4.2 Normoblasten

### 4.2.1 Kinetik der Normoblasten bei Reif- und Frühgeborenen

Es galt die Hypothese zu prüfen, dass sich mit dem Sysmex XE-2100 effizient die Kinetiken der Normoblasten bei Reif- und Frühgeborenen bestimmen lassen. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, inwiefern sich die Kinetiken bei Reif- und Frühgeborenen unterscheiden.

Der Sysmex XE-2100 ermöglichte Messungen von bis zu 150 Proben pro Stunde. Dabei reichte hierfür ein Probenvolumen von max. 20 µl aus.

Die Anzahl der Normoblasten im peripheren Blut der Gruppe der Reifgeborenen ohne EOBI zeigte einen mit der Zeit abfallenden Verlauf (vgl. S. 50). Während die Normoblastenkonzentration innerhalb der ersten 6 Stunden nach Geburt bei einem Maximum von  $0,37 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) lag. Sank die Normoblastenkonzentration innerhalb von 48 Stunden auf  $0,07 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Danach bewegten sich die Normoblasten auf einem Plateau. Dieser mit der Zeit abfallende Verlauf steht im Einklang zu vorangegangenen Studien (36/69/123).

Die Normoblastenwerte der Gruppe der Frühgeborenen ohne EOBI zeigten ebenfalls einen mit der Zeit abfallenden Verlauf (vgl. S. 51). Ausgehend von einer initial signifikant höheren Normoblastenkonzentration von  $1,15 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $2,28 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) 6 Stunden nach Geburt, sank der Normoblastenwert innerhalb von 48 Stunden auf  $0,01 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,34 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ).

Innerhalb der ersten 24 Stunden waren die Normoblastenwerte der Frühgeborenen signifikant höher als die der reifgeborenen Kinder. Auch dies steht im Einklang zu vorangegangenen Studie (36/70; vgl. Kap. 4.2.3).

Der oben beschriebene, im Zeitverlauf absinkende Wert der Normoblastenkonzentration bedeutet für den klinischen Alltag Referenzwerte die sich je nach Lebensalter der Neugeborenen ändern. Zusätzlich gelten für Frühgeborene andere Referenzwerte. Diese Tatsache ist für den klinischen

Alltag umständlich, da mehrere Faktoren bei der Auswertung der Laborwerte Berücksichtigung finden müssen. Um die Referenzbereiche und Entscheidungsgrenzen (in Bezug auf das Vorliegen einer EOBI) für die Normoblasten festzulegen, wurden ROC-Kurven bezogen auf den Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachtes auf eine Early-onset-Infektion erstellt. Der optimale Cut-off Wert wurde dabei so gewählt, dass er die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximiert. Die Entscheidungsgrenzen wurden zu den relevanten Zeitpunkten bei den Reifgeborenen (0 bis 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht) auf  $>0,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  und bei den Frühgeborenen (0 bis 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht) auf  $>1,31 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  festgesetzt.

Im weiteren Verlauf sanken die Entscheidungsgrenzen sowohl bei den Reifgeborenen als auch bei den Frühgeborenen nach dem ersten klinischen Verdacht ab. Die Werte der Frühgeborenen lagen jeweils höher als die der Reifgeborenen (vgl. Kap. 3.12).

In anderen Studien wurden unterschiedliche Referenzbereiche für Normoblasten beschrieben.

Rolfo et al ermittelten als Referenzbereich in einer prospektiven Studie mit Nabelschnurblut von 131 gesunden Reifgeborenen mittels Messungen durch den Sysmex XE-2100, den Median plus/ minus Range von  $0,39 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $\pm 0,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ; Range: 0-1.8) (152). Dass die Normoblastenwerte dieser Studie niedriger als in unserer Studie liegen, mag nicht ausreichend durch den abweichenden Abnahmezeitpunkt bzw. –modus erklärt sein. Zu erwarten wären postnatal, entsprechend der Kinetik der Normoblasten, eher höhere Werte gewesen. Dieser Umstand ist vermutlich damit zu erklären, dass die Kontrollgruppe unserer Studie keine ideale Population (Neugeborene ohne Risikofaktoren) darstellt, da es ethisch nicht zu rechtfertigen gewesen wäre, von unauffälligen Neugeborenen ohne Risikofaktoren in der Anamnese Blut zu wissenschaftlichen Zwecken zu entnehmen.

Lee et al untersuchten retrospektiv aus einer öffentlichen Nabelschnur-Blutbank

stammende Blutproben von 2.129 gesunden Reifgeborenen mit dem Sysmex XE-2100. Hierbei ermittelten sie für koreanische Reifgeborene als Referenzbereich für Normoblasten den Mittelwert (plus/minus zwei Standardabweichungen) auf die Gesamtleukozytenzahl bezogen: 0,0-13,1 /100 Leukozyten (102). Die Angabe der Normoblasten auf die Leukozyten bezogen wird in den ersten Lebenstagen als unpräzise erachtet, da die Leukozyten während den ersten Lebenstagen noch starken Schwankungen unterworfen sind (36). In dieser Studie fanden mögliche Ursachen einer Normoblastenerhöhung keine Beachtung. Dies und die Verwendung des im Vergleich zum Median gegenüber Ausreißern weniger robusten Mittelwert, mag die große Spannweite des Referenzbereiches erklären.

Kil et al beschrieben in einer retrospektiven Studie mit Daten aus peripher venösen Blutabnahmen von 112 frühgeborenen Kindern, unterschiedliche Referenzwerte für Normoblasten in Abhängigkeit sowohl vom Lebensalter als auch vom Gestationsalter und vom Geburtsgewicht. Die Werte wurden mit einem Impedanzmessverfahren (dem Coulter-Counter) erhoben. Ermittelt wurden jeweils die Mittelwerte für Normoblasten (+/- eine Standardabweichung). Innerhalb der ersten zwei Lebensstunden lag der Mittelwert für die 112 Frühgeborenen bei  $2,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (+/-  $2,75 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Analog zu unserer Studie zeigten Kil et al ebenfalls einen mit der Zeit abfallenden Verlauf der Normoblasten (91). Dass der Wert höher als der initiale Normoblastenwert der Frühgeborenen unserer Studie liegt, mag daran liegen, dass Kil et al in ihrer Studie nur extreme Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht bis 1500 g einschlossen.

In einer Multicenter-Studie in Utah/ USA wurden über 8,5 Jahre Normoblastenwerte bei 35.396 Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 23 und 42 Schwangerschaftswochen erfasst. Als Referenzbereiche wurden die Mittelwerte (+/- eine Standardabweichung) festgelegt. Die Referenzbereiche wurden abhängig vom Lebens- und vom Gestationsalter als Diagramme dargestellt (36). Auch diese Gruppe um Christensen stand vor der Problematik, dass es ethisch nicht zu rechtfertigen gewesen wäre, unauffälligen

Neugeborenen ohne Risikofaktoren Blut zu entnehmen, wodurch auch hier keine ideale Population zur Verfügung stand. Hinzu kommt, dass die Normoblastenwerte durch unterschiedliche Methoden ermittelt wurden (manuelle Messungen, durchflusszytometrische Messungen, Messungen mit dem Sysmex XE-100 und Messungen mit dem Beckman Coulter), was die Normoblastenwerte nur eingeschränkt miteinander vergleichbar macht. Für Reifgeborene am ersten Lebenstag bewegte sich der Referenzbereich von ca.  $1,1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bis ca.  $3,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . Die im Vergleich zu unserer Studie höheren Normoblastenwerte sind auch hier vermutlich in den unterschiedlichen Einschlusskriterien der Studien begründet. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden hier z.B. Neugeborene mit Chromosomenaberrationen und/oder chirurgischen Eingriffen nicht ausgeschlossen.

Zusammenfassend gestaltet es sich schwierig, verschiedene Studien miteinander zu vergleichen, da sowohl Einschlusskriterien als auch Methodik stark variieren. Es muss gefordert werden, dass die hier erzielten Ergebnisse in einer größeren Studie/ Metaanalyse mit vergleichbarem Studiendesign überprüft werden.

Die Hypothese, dass sich mit dem Sysmex XE-2100 effizient die Kinetiken der Normoblasten bei Reif- und Frühgeborenen bestimmen lassen, konnte dennoch bestätigt werden.

#### **4.2.2 Einflussfaktoren auf die Normoblastenkonzentration**

Die Normoblastenkonzentration im peripheren Blut ist nicht infektionsspezifisch. Neben Infektionen konnten in der Literatur auch erhöhte Normoblastenwerte beschrieben werden in Zusammenhang mit:

- Chronischer intrauteriner Hypoxie (91) und/ oder akuter Hypoxie ante partum (67/96/98/107)
- Peripartaler Azidose (Nabelarterien-pH  $\leq 7,0$ ) (22)
- Intrauteriner Wachstumsretardierung (118)
- Dystrophie (141)

- Pulmonalen Erkrankungen wie bronchopulmonaler Dysplasie (12), Atemnotsyndrom (12) oder Mekoniumaspiration (76)
- Bei Frühgeborenen, die im weiteren Verlauf eine Retinopathia praematurorum (36) entwickelten
- Bei kardialen Erkrankungen wie z.B. bei einem persistierenden Ductus arteriosus (117) oder nach Herzoperationen (33)
- Hypoxischen Hirnschädigungen (29)
- Intraventrikulären Hämorrhagien (71/184), bzw. schlechtem neurologischem Outcome (147)
- Neonatalen Krampfanfällen (21/22)
- Bei Asplenie/ Hyposplenie (170)
- (Hämolytischen) Anämien/ Thalassämien (42)
- Nekrotisierender Enterokolitis (91)
- Mütterlichem Gestationsdiabetes (47)
- Konnataler Lues (83)
- Bei Neugeborenen von Müttern mit Präeklampsie (3)

Zusammenfassend finden sich erhöhte Normoblastenwerte bei Stress unterschiedlichster Genese jedoch v.a. bei akutem oder chronischem hypoxischen Stress. Insgesamt zeigten Neugeborene mit erhöhten Normoblastenwerten ein schlechteres Outcome mit erhöhter Morbidität und einer bis zu 10-fach erhöhten Mortalität als Neugeborene mit normwertigen Normoblasten (13/67/98/77/179/182).

Da in der vorliegenden Arbeit die Wertigkeit der Normoblasten als Infektparameter als Schwerpunktthema bearbeitet wurde, wurden Neugeborene mit peripartaler Asphyxie/ Hypoxie mit Nabelarterien-pH  $\leq 7,0$ , Fehlbildungen, Chromosomenaberrationen und Neugeborene nach erforderlichen chirurgischen Eingriffen aus der Studie ausgeschlossen. Dennoch stellt unsere Studie keine optimale Population dar (vgl. Kap 4.5.1).

### 4.2.3 Einfluss des Gestationsalters auf die Normoblasten

Um zu prüfen inwiefern das Gestationsalter einen Einfluss auf die Normoblastenkonzentration hat wurden die Neugeborenen zunächst in drei Gruppen eingeteilt.

- Neugeborene mit einem Gestationsalter zwischen 161 und 203 Tagen (=23-29 SSW)
- Neugeborene mit einem Gestationsalter zwischen 204 und 252 Tagen (=30-36 SSW)
- Neugeborene mit einem Gestationsalter von mehr als 252 Tagen (>36 SSW)

Die Normoblastenkonzentration lag bei Neugeborenen umso höher, desto geringer das Gestationsalter war (vgl. Kap. 3.6).

Die Unterschiede waren innerhalb der ersten 24 Stunden zwischen allen drei Gruppen signifikant. Im weiteren Verlauf lagen die Normoblastenwerte zwar tendenziell höher desto geringer das Gestationsalter war jedoch waren die Unterschiede nicht mehr signifikant.

Dieses Ergebnis liegt im Einklang mit anderen Studien (71/91). Auch hier wurden jeweils tendenziell höhere Normoblastenwerte beschrieben, desto geringer das Gestationsalter war. Jedoch waren die Unterschiede jeweils nicht signifikant, was auch an der Gruppeneinteilung liegen mag. In diesen Studien wurden die Frühgeborenen jeweils in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (71/91) jedoch auf Kosten der Gruppengröße, die Zahl der auswertbaren Proben fiel dabei zum Teil auf geringe Werte ab (z.B. n=26) (71). Um eine Mindestzahl von Werten zu gewährleisten wurden in dieser Studie zur Darstellung der Normoblasten in Abhängigkeit vom Gestationsalter die Frühgeborenen in nur zwei Gruppen unterteilt und im restlichen Teil der Studie in einer Gruppe zusammengefasst.

Um die Abhängigkeit der Normoblasten vom Gestationsalter besser darstellen zu können wurden die Normoblasten gegen das Gestationsalter in Tagen



aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Auch hier zeigte sich eine negative Abhängigkeit der Normoblastenkonzentration vom Gestationsalter (vgl. Abb. 6).

Diese Zusammenhänge stehen ebenfalls im Einklang mit anderen Untersuchungen (9/71/91), auch hier wurde ein Zusammenhang zwischen Normoblastenwert und Gestationsalter in einer Regressionsanalyse gezeigt, ohne einen Korrelationskoeffizienten zu benennen.

Dass die Normoblastenwerte höher sind desto geringer das Gestationsalter ist, mag daran liegen, dass die fetale Erythropoese zunächst in der Leber stattfindet. Fetale hämatopoetische Stammzellen werden dort gebildet und wandern im Verlauf der Schwangerschaft in das Knochenmark und in die weiteren hämatopoetisch tätigen Organe aus. Vermutlich geschieht die Ausstoßung des Zellkernes bei den in der Leber gebildeten Erythrozyten weniger effizient (36). Darüber hinaus treten bei Frühgeborenen mit geringerem Gestationsalter und/ oder Geburtsgewicht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit potentielle Ursachen für eine Normoblastenerhöhung (wie z.B. ein Atemnotsyndrom) (12) auf.

#### **4.2.4 Einfluss des Geburtsgewichts auf die Normoblasten**

Um zu prüfen inwiefern das Geburtsgewicht einen Einfluss auf die Normoblastenkonzentration hat wurden die Neugeborenen ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt.

- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g
- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht zwischen 1000 g und 2000 g
- Neugeborene mit einem Geburtsgewicht über 2000 g

Die Normoblastenkonzentration lag bei Neugeborenen umso höher, desto geringer das Geburtsgewicht war (vgl. Kap. 3.7).

Diese Unterschiede waren innerhalb der ersten 24 Lebensstunden signifikant

zwischen den Neugeborenen unter 1000 g und den Neugeborenen über 2000 g ( $p=5,7 \cdot 10^{-5}$ ) sowie zwischen den Neugeborenen zwischen 1000 g und 2000 g und den Neugeborenen über 2000 g ( $p=0,0004$ ). Die Normoblastenwerte lagen zwar tendenziell höher desto geringer das Geburtsgewicht war, jedoch waren die Unterschiede im weiteren Verlauf, bzw. zwischen der Gruppe der Neugeborenen unter 1000 g und der Gruppe der Neugeborenen zwischen 1000 g und 2000 g nicht mehr signifikant.

Ähnliche Resultate beschrieben Kil et al. Sie zeigten in einer Studie mit Frühgeborenen ebenfalls jeweils tendenziell höhere Normoblastenwerte, desto geringer das Geburtsgewicht war (91). Der Normoblastenwert für Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht  $<1000$  g lag am dritten Lebenstag bei  $2,49 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $\pm 3,49 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Dieser Wert lag signifikant höher als Werte von Frühgeborenen mit höherem Geburtsgewicht. Nachdem jedoch zwei Frühgeborene mit weiteren Ursachen für potentiell erhöhte Normoblastenwerte (intraventrikuläre Hämorrhagie und Tod) aus der Studie eliminiert worden waren zeigten sich auch die Normoblastenwerte der Frühgeborenen  $<1000$  g nicht mehr signifikant erhöht (91). Kil et al schlossen in ihre Studie lediglich Frühgeborene bis zu einem Geburtsgewicht von 1500 g ein, was die Gruppeneinteilung mit unserer Studie nicht vergleichbar macht.

Um die Abhängigkeit der Normoblasten vom Geburtsgewicht besser darstellen zu können wurden die Normoblasten gegen das Geburtsgewicht in Gramm aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Auch hier zeigte sich eine negative Abhängigkeit der Normoblastenkonzentration vom Geburtsgewicht (vgl. Abb. 8).

Diese Zusammenhänge stehen ebenfalls im Einklang mit anderen Untersuchungen (9/91). Auch hier wurde ein Zusammenhang zwischen Normoblastenwert und Gestationsalter in einer Regressionsanalyse gezeigt, ohne einen Korrelationskoeffizienten zu benennen.

#### 4.2.5 Einfluss von Hypotrophie/ Hypertrophie auf die Normoblasten

Um den Zusammenhang zwischen der Normoblastenkonzentration, der Gewichtsperzentile und dem Gestationsalter genauer zu untersuchen wurden die Neugeborenen in drei Gruppen eingeteilt:

- Hypotrophe Neugeborene (<10. Perzentile)
- Eutrophe Neugeborene (10.-90. Perzentile)
- Hypertrophe Neugeborene (>90. Perzentile)

Für alle drei Gruppen wurden die Normoblasten gegen das Gestationsalter in Tagen aufgetragen und eine Regressionsgerade gesetzt (vgl. Abb. 9). Lediglich bei den hypotrophen Neugeborenen zeigten sich gegenüber den eutrophen Neugeborenen ( $p=0,0004$ ) innerhalb der ersten 24 Lebensstunden eine signifikant höhere Normoblastenkonzentration.

In anderen Studien wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten Normoblastenwerten und Dystrophie (9/43/140) gezeigt.

Im Einklang zu unserer Studie zeigten Philip et al in einer Studie, die 374 Frühgeborene, davon 61 dystroph, mit einem Geburtsgewicht zwischen 500 g und 1500 g einschloss, eine signifikante Korrelation zwischen Dystrophie und erhöhten Normoblastenwerten. Die Frühgeborenen wurden dabei entsprechend ihrer Gestationswoche gematcht (140).

Axt-Fliedner et al zeigten darüber hinaus dass sich die Gruppe der dystrophen Neugeborenen (<10. Gewichtsperzentile) bezüglich der Normoblastenwerte noch weiter unterteilen lässt. So waren die Normoblastenwerte im Nabelschnurblut von dystrophen Neugeborenen, die vor der Geburt im Duplexsonogramm pathologische Dopplerflüsse aufwiesen gegenüber dystrophen Neugeborenen ohne pathologische Dopplerflüsse signifikant erhöht (9).

Eine andere Studie mit 23 dystrophen Neugeborenen und 48 eutrophen Neugeborenen zeigte ebenfalls signifikant erhöhte Normoblastenwerte im

Nabelschnurblut dystropher Neugeborener. In dieser Studie wurden Neugeborene von Müttern mit Risikofaktoren wie Hypertonus, Anämie, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen sowie Neugeborene mit bekannter chronischer intrauteriner Hypoxie, als bekannte Ursachen einer potentiellen Normoblastenerhöhung ausgeschlossen (43).

Bei den hypertrophen Neugeborenen zeigte im Gegensatz zu unserer Studie eine Studie, die 30 eutrophe sowie 31 hypertrophe Reifgeborene von Müttern ohne Gestationsdiabetes einschloss, signifikant erhöhte Normoblastenwerte bei hypertrophen Reifgeborenen. Zu Beginn der Untersuchung wurde zwischen der 24. und 28. Gestationswoche ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt um Mütter mit manifestem oder latentem Gestationsdiabetes ausschließen zu können (49). Dieser Test wurde allerdings nicht im weiteren Verlauf der Schwangerschaft wiederholt, was das Auftreten eines Gestationsdiabetes als bekannte Ursache einer Normoblastenerhöhung beim Neugeborenen (70) nicht gänzlich ausschließt. Auch wurde der mütterliche Risikofaktor Adipositas, welcher ebenfalls sowohl mit Makrosomie als auch mit erhöhten Normoblastenwerten beim Neugeborenen assoziiert ist (168) bei dieser Studie nicht berücksichtigt, was bei einem Patientenkollektiv mit ca. 50% Hypertrophen Neugeborenen jedoch eine Rolle spielen mag.

Dass die Normoblastenwerte in unserer Studie lediglich bei dystrophen Neugeborenen und nur innerhalb der ersten 24 Lebensstunden signifikant erhöht sind, liegt ursächlich vermutlich an dem chronischen intrauterinen hypoxischen Reiz, der bei dystrophen Neugeborenen deutlich stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei hypertrophen Neugeborenen.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass eine Normoblastenerhöhung in den ersten Lebenstagen zwar zu einem gewissen Prozentsatz durch mütterliche Normoblasten hervorgerufen wird (ca. 23 % bei unauffälligen Schwangerschaften) (43), jedoch konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es sich bei Neugeborenen mit intrauteriner Wachstumsretardierung v.a. um kindliche Normoblasten handelt (172). Dennoch sei als Kritikpunkt an unserer Studie zu erwähnen, dass präpartale Risikofaktoren hier keine

Berücksichtigung fanden.

#### **4.2.6 Einfluss des Geschlechts auf die Normoblasten**

Ergänzend wurde in dieser Studie noch untersucht, inwiefern das Geschlecht einen Einfluss auf die Normoblastenkonzentration hat. Der Median der Normoblastenkonzentration lag innerhalb der ersten 24 Stunden bei den männlichen Neugeborenen zwar tendenziell höher, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,19$ ). Die tendenziell erhöhte Normoblastenkonzentration bei männlichen Neugeborenen ist passend zu einem in der Literatur beschriebenen schlechteren Outcome (niederer APGAR, längerer Klinikaufenthalt, längere Intubationsdauer und höhere Mortalität) als Ursache für eine Normoblastenerhöhung bei männlichen Reif- und Frühgeborenen (184).

### **4.3 Verhalten der Normoblasten im Rahmen einer Early-onset-Infektion**

Es galt zu klären, ob es im Rahmen einer Early-onset-Infektion zu einer Erhöhung der Normoblasten im peripheren Blut kommt.

In der Gruppe der reifgeborenen Kinder zeigten die Normoblastenwerte bei den Reifgeborenen mit einer Early-onset-Infektion analog zu den Reifgeborenen ohne Early-onset-Infektion einen mit der Zeit abfallenden Verlauf innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht. Die Werte der Reifgeborenen mit EOBI lagen zwar tendenziell etwas höher, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Wodurch sich die Normoblasten für die Gruppe der Reifgeborenen nicht als Infektparameter eignen.

In der Gruppe der Frühgeborenen zeigten die Normoblastenwerte bei Frühgeborenen mit einer Early-onset-Infektion im Gegensatz zu den Frühgeborenen ohne Early-onset-Infektion einen mit der Zeit ansteigenden Verlauf. Tendenzuell lagen die Normoblastenwerte bei Frühgeborenen mit EOBI

bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht höher als bei der Kontrollgruppe, aber erst 48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht unterschieden sich die Normoblastenwerte signifikant ( $p=0,0005$ ).

Da es in der Gruppe der Frühgeborenen erst 24-48 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer Early-onset-Infektion zu einem signifikanten Anstieg der Normoblasten kam, können sich die Normoblasten für die Gruppe der Frühgeborenen laut unserer Studie zumindest nicht als früher Infektparameter eignen.

Andere Studien kamen bezüglich des Verhaltens der Normoblastenwerte im Rahmen einer Early-onset-Infektion zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Kil et al fanden in ihrer Studie mit frühgeborenen Kindern keinen Zusammenhang zwischen der Normoblastenkonzentration und dem Vorliegen einer neonatalen Sepsis. Allerdings bezog sich die Studie nur auf die Late-onset-Infektion, da bei keinem Frühgeborenen, das in dieser Studie eingeschlossen war eine Early-onset-Infektion vorlag (91).

Romero et al wiesen in einer retrospektiven Beobachtungsstudie, die 152 Feten einschloss, mittels Amniozentese und Chordozentese, eine tendenzielle Erhöhung der fetalen Normoblasten im Zusammenhang mit erhöhtem IL-6 im Rahmen eines FIRS nach. Diese Erhöhung war jedoch nicht signifikant (154). In der Studie wurden Feten von Schwangeren mit vorzeitigen Wehen und vorzeitigem Blasensprung untersucht, eine Konstellation, die ebenfalls ursächlich für erhöhte Normoblastenwerte sein kann (3), wodurch die Feten der Kontrollgruppe ebenfalls mit einer höheren Wahrscheinlichkeit erhöhte Normoblastenwerte aufweisen. Auch wurden hier die Normoblastenwerte nicht im Verlauf, sondern nur zu einem definierten Zeitpunkt bestimmt.

Dulay et al untersuchten 68 Frühgeborene (nach weniger als 34 Gestationswochen). Bei 19 dieser Frühgeborenen wurde innerhalb der ersten Lebensstunde (Mittels Blut- oder Liquorkultur) eine Early-onset-Sepsis

diagnostiziert oder der dringende Verdacht auf das Vorliegen einer Early-onset-Sepsis gestellt. (Klinischer Verdacht plus einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten und/ oder ein erhöhter I/T-Quotient und/ oder Thrombozytopenie). Innerhalb der ersten Lebensstunde durchgeführte Blutentnahmen zeigten signifikant höhere Normoblastenwerte bei Frühgeborenen mit EOS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus konnte eine direkte Korrelation zwischen einem erhöhten Normoblastenwert innerhalb der ersten Lebensstunde und einem erhöhten IL-6-Wert im Nabelschnurblut gezeigt werden, diese Korrelation zeigte sich unabhängig vom Erythropoetin-Wert (50). Dass in dieser Studie Frühgeborenen mit EOS bereits innerhalb der ersten Lebensstunde signifikant höhere Normoblastenwerte aufwiesen, ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass diese Studien septische Frühgeborene (positiver Keimnachweis in Liquor oder Blutkultur bei 15 von 19 Frühgeborenen mit EOS) einschloss, was eine Steigerungsform der EOBI darstellt. In unserer Studie wiesen lediglich 5 Reif- und Frühgeborene eine positive Blutkultur auf.

Wie bereits oben beschrieben gestaltet es sich auch hier schwierig, die Studien miteinander zu vergleichen, da es große Abweichungen bezüglich der Einschlusskriterien, der Methodik, der Definition einer Early-onset-Infektion und der Verwendung unterschiedlicher Referenzwerte für Normoblasten gab.

#### **4.4 Normoblasten als prädiktiver Marker einer Early-onset-Infektion bei Früh- und Reifgeborenen**

Es galt zu klären ob Normoblasten, möglicherweise auch in Kombination mit IL-8 als prädiktiver Marker einer Early-onset-Infektion bei Früh- und Reifgeborenen geeignet sind.

Um die diagnostische Wertigkeit der Normoblasten zu ermitteln wurden ROC-Kurven bezogen auf den Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachtes auf eine Early-onset-Infektion erstellt (vgl. Kap. 3.13 und 3.14).

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht lag die Sensitivität bei 9,4 % [0.05;0.14], die Spezifität bei 96 % [0.93;0.98]. Die Sensitivität stieg innerhalb der ersten 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht auf 37 %. Die Spezifität stieg dagegen auf bis zu 100 %. Der positive prädiktive Wert lag innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht bei 60 % [0.53;0.67] und stieg im weiteren Verlauf auf 80 %, der negative prädiktive Wert lag innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht bei 36 % [0.29;0.43].

Bei den Frühgeborenen zeigten die Normoblasten innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht eine höhere Sensitivität mit 55 % [0.46;0.64], bei einer Spezifität von 75 % [0.68;0.83]. Im weiteren Verlauf stieg die Sensitivität innerhalb der ersten 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht sogar auf 83 % [0.67;0.99] bei einer Spezifität von 77 % [0.59;0.95].

Der Normoblastenwert eignet sich somit nicht in ausreichendem Maß als prädiktiver Parameter zur Diagnostik einer EOBI. Neben der zu geringen Sensitivität und Spezifität sowohl in der Gruppe der Reifgeborenen als auch in der Gruppe der Frühgeborenen, ist auch die Tatsache, dass der Normoblastenwert sich bei den reifgeborenen Kindern mit EOBI nicht signifikant von den Normoblastenwerten der Kontrollgruppe unterscheidet ein wichtiges Ausschlusskriterium.

Als Verlaufsparemeter der Infektionsdiagnostik eignen sich die Normoblasten ebenfalls nicht. Hier ist das CrP mit einer Sensitivität von 79 % bei einer Spezifität von 100 % (in der Gruppe der Reifgeborenen) den Normoblasten überlegen.

In der Gruppe der Frühgeborenen lag die Sensitivität des CrP-Wertes mit 58 % zwischen 49 und 72 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht etwas niedriger bei ebenfalls erhaltener Spezifität. Dies ist ursächlich auf eine initial noch eingeschränkte Leberfunktion zurückzuführen, die gerade bei den Frühgeborenen und dystrophen Neugeborenen noch ausgeprägter ist (59/126). Das CrP eignet sich Dank seines hohen prädiktiven Wertes (100 %) gut als



Verlaufparameter und zur Kontrolle des Therapieerfolges.

Bei Betrachtung der Normoblasten (als zellulärer Marker) zur Verwendung als früher prädiktiver Parameter in der Diagnostik einer EOBI in Kombination mit IL-8 (einem humoralen Marker) konnte innerhalb der ersten 24 Stunden (dem hinsichtlich der Diagnostik einer EOBI relevantesten Zeitpunkt) nach dem ersten klinischen Verdacht eine Steigerung der Sensitivität auf bis zu 84 % (in der Gruppe der Reifgeborenen) erreicht werden, allerdings zu Lasten der Spezifität (15 %; vgl. Kap. 3.15).

In der Gruppe der Frühgeborenen konnte bei der Kombination des Normoblastenwertes mit dem IL-8-Wert innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht eine Steigerung der Sensitivität auf bis zu 69 % erreicht werden, allerdings ebenfalls zu Lasten der Spezifität (51 %; vgl. Kap. 3.16).

Somit eignet sich auch diese Kombination nicht in ausreichendem Maße zur frühen Diagnostik einer Early-onset-Infektion.

Das IL-8 bleibt den Normoblasten als früher prädiktiver Parameter für eine EOBI überlegen, auch aufgrund der einfacheren Handhabung und der einheitlicheren Referenzwerte. In dieser Studie konnte, die in der Literatur beschriebene Sensitivität bezüglich einer EOBI von 71-97 % innerhalb der ersten 6 Lebensstunden (60/126) für das IL-8 nicht bestätigt werden. Hier lag die Sensitivität für das IL-8 innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht lediglich bei 17 % bei den Reifgeborenen und bei 26 % bei den Frühgeborenen. Dies liegt einerseits vermutlich an der raschen Kinetik des IL-8, so wurde in anderen Studien nachgewiesen, dass IL-8 bereits nach weniger als 4 Stunden wieder abgebaut wird und somit nur von einer biologischen Halbwertszeit von 1 Stunde ausgegangen werden kann (149/150), andererseits vermutlich auch an der rasch eingeleiteten antibiotischen Therapie der Neugeborenen mit klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer EOBI.

Darüber hinaus wurde das IL-8 als Akute-Phase-Protein bei den Probanden

unserer Studie v.a. zum Zeitpunkt des ersten klinischen Verdachtes bestimmt. Im weiteren Verlauf wurde es nur noch in Einzelfällen bestimmt so dass uns im zeitlichen Verlauf nur noch vereinzelt IL-8-Werte zur Verfügung standen, was diese Studie hinsichtlich des IL-8-Wertes nur eingeschränkt aussagekräftig macht.

Aufgrund der raschen Kinetik der Normoblastenwerte, falls ergänzend bestimmt, bzw. aufgrund der kurzen Halbwertszeit des IL-8 sollten bei der Infektionsdiagnostik beide Werte immer mit dem CrP-Wert kombiniert werden (49). Dies im Bewusstsein, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeiten des IL-8 weiterhin eine diagnostische Lücke bestehen bleibt, da das CrP in der Regel initial noch negativ ist und erst nach 24 Stunden eine Sensitivität von bis zu 94 % erreicht. (58/60/113).

## **4.5 Methodenkritik**

### **4.5.1 Patientenkollektiv**

Insgesamt wiesen von den 169 untersuchten Reif- und Frühgeborenen deutlich mehr Kinder (51,5 %) eine neonatale bakterielle Infektion auf als die übliche Inzidenz von 0,1-1 %, wie sie in der Literatur beschrieben ist (65/94).

Dies liegt daran, dass es sich bei dem untersuchten Patientenkollektiv um Patienten eines Perinatalzentrums und somit nicht um ein allgemein-repräsentatives Kollektiv handelte. Insbesondere kann die Gruppe der Frühgeborenen aufgrund der vielfältigen Probleme Frühgeborener keine ideale Population darstellen. Zum anderen war es aus ethischen Gründen nicht zu rechtfertigen, bei gesunden Neugeborenen ohne Vorliegen eines klinischen Verdachtsmomentes Blut abzunehmen, so dass nur Patienten die vorübergehende klinische Auffälligkeiten zeigten, wie z.B. bei einer respiratorischen Anpassungsstörung, bei negativen Infektparametern (CrP <10 mg/l; IL-8  $\geq$ 60 pg/ml), in die Studie aufgenommen werden konnten.

Bei den reifgeborenen Kindern entwickelten doppelt so viele männliche wie weibliche Reifgeborene eine Early-onset-Infektion. Bei den Frühgeborenen hingegen war dies nicht in dieser Deutlichkeit zu erkennen. Dieser Sachverhalt wird auch in der Literatur beschrieben, andere Autoren sehen das männliche Geschlecht als Risikofaktor, eine Early-onset-Infektion zu entwickeln (185).

Das mittlere Gestationsalter war in beiden Gruppen bei Neugeborenen mit EOBI signifikant geringer. Bei den Frühgeborenen war dieser Unterschied noch ausgeprägter. Ein niedriges Gestationsalter gilt auch in anderen Studien als Risikofaktor für eine neonatale Infektion (17). Je geringer das Gestationsalter ist, desto ausgeprägter ist auch das Defizit des Immunsystems (39/68/94/136).

Beim mittleren Geburtsgewicht gab es in der Gruppe der reifgeborenen Kinder keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Entwicklung einer EOBI. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass in der Literatur sowohl für makrosome Neugeborene (49/167) als auch für dystrophe Neugeborene (117) ein erhöhtes Infektionsrisiko beschrieben wird.

In der Gruppe der Frühgeborenen hingegen war der Unterschied weitaus deutlicher. Während das mittlere Geburtsgewicht bei den Frühgeborenen mit EOBI bei 1245,9 g (SD: 619,3 g) war, lag es bei den Frühgeborenen der Kontrollgruppe bei 1815,1 g (SD: 758,9 g). Hier treffen beide Risikofaktoren aufeinander: Niedriges Gestationsalter mit dem damit verbundenen niedrigen Geburtsgewicht.

#### **4.5.2 Messung mit dem Sysmex XE-2100**

Die Normoblasten wurden mit dem Sysmex XE-2100 (durchflusszytometrisch automatisiertes Mehrkanalgerät der Firma Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gemessen. Ein NRBC (Nucleated Red Blood Cells) -Kanal diente zur Zählung der Normoblasten. Diese konnten so routinemäßig und ohne erhöhten Zeit- oder Personalaufwand bestimmt werden. Das Gerät ermöglichte Messungen von bis zu 150 Proben pro Stunde. Dabei reichte hierfür ein Probenvolumen von max. 20 µl aus. Die

Sensitivität für die Zählung der Normoblasten im NRBC-Kanal des Sysmex XE-2100 beträgt 94,8 % bei einer Spezitivität von 92,2 % (168). Die Messung des Normoblastenwertes ist somit fünfmal sensitiver als eine manuelle Normoblastenbestimmung (180) (vgl. Kap. 1.12.2).

Bei der manuellen Normoblasten-Bestimmung bestand bisher die Problematik darin, dass Normoblasten Ähnlichkeit mit reifen, kleinen Lymphozyten haben, so dass selbst erfahrenes Personal zu unterschiedlichen, am ehesten falsch niedrigen Werten kommen konnte. Darüber hinaus war diese Methode personal- und zeitaufwändig und damit auch vergleichsweise teuer.

Die durchflusszytometrische Zählung ist im Vergleich zur Normoblastenbestimmung mit dem Sysmex XE-2100 zwar mit einer Sensitivität von bis zu  $1:10^5$  sensitiver, aber da diese Methode antikörpervermittelt funktioniert auch kostenintensiver (der Preis pro Messung liegt ca. 20 Mal höher) (vgl. Kap.1.12).

#### **4.5.3 Diagnose der Early-onset-Infektion**

Wie in anderen Studien (27/64/145/170) hatten auch wir das Problem der Definition einer Early-onset-Infektion. Bei nur fünf der Neugeborenen mit EOBI gelang ein Erregernachweis in der Blutkultur. Ursächlich dafür kommt eine bereits peripartal begonnene antibiotische Therapie der Mutter (81) sowie vor allem bei den Frühgeborenen ein geringes Probenvolumen in Frage. Die Diagnose einer EOBI musste sich daher im Einklang mit anderen Studien (31/59/136/138) auf weitere Parameter stützen.

Eine EOBI wurden in dieser Studie definiert als mind. ein klinisches Zeichen einer Infektion plus eine CrP-Konzentration von  $\geq 10$  mg/l und/ oder ein IL-8-Wert von  $\geq 60$  pg/ml und/oder eine positive Blutkultur innerhalb von 24 Stunden nach diesem ersten klinischen Verdacht. Die klinischen Symptome wurden von erfahrenen Neonatologen erfasst, wobei kalkuliert werden musste, dass bei dieser Entscheidung stets eine subjektive Komponente enthalten sein kann.

Bei den reifgeborenen Kindern traten die ersten klinischen Infektzeichen im

Mittel nach 15,7 Lebensstunden auf, bei den weniger immunkompetenten Frühgeborenen bereits 6,9 Stunden nach Geburt.

Neugeborenen mit Early-onset-Infektion fielen klinisch am Häufigsten durch Tachydyspnoe (73,5 %), einer verlängerten kapillären Füllungszeit ( $>2s$ ; 65 %), Tachykardie (29,9 %) und Hyperthermie ( $>37,8\text{ °C}$ ; 24,1 %) auf (Vgl. Kap. 3.3).

Alle klinischen Zeichen zeigten eine große Varianz und in keinem der Fälle konnte sicher von einem klinischen Symptom auf eine neonatale bakterielle Infektion geschlossen werden. Dies bestätigen auch andere Studien mit ähnlichen Fragestellungen (56/90/122/134).

#### **4.5.4 Anforderung an Infektparameter**

Infektparameter, die sich zur möglichst frühzeitigen Diagnostik einer Early-onset-Infektion eignen sollten:

- Nach Infektionsbeginn schnell ansteigen (bei den Reifgeborenen im selben Maß wie bei den Frühgeborenen)
- Durch andere Noxen bzw. Cofaktoren wie z.B. durch Stress/ Hypoxie nicht beeinflussbar sein
- Einen signifikanten Unterschied zeigen zwischen Neugeborenen mit und ohne EOBI
- Eine Korrelation zur Schwere der Erkrankung aufweisen
- Nach Genesung rasch wieder abfallen
- Innerhalb kürzester Zeit laborchemisch zur Verfügung stehen
- Kostengünstig in der Durchführung sein

#### 4.5.5 Statistische Auswertung

Wie in anderen Studien (27/36/64/91/102/145/152/170) handelte es sich bei dieser Studie nicht um ein allgemeinrepräsentatives Kollektiv. Darüber hinaus war es aus ethischen Gründen nicht zu rechtfertigen, bei gesunden Neugeborenen ohne Vorliegen eines klinischen Verdachtmomentes Blut abzunehmen (vgl. Kap. 4.5.1). Dies führte dazu, dass die Datensätze aus Blutentnahmen zu bestimmten Zeitpunkten z.T. sehr klein wurden ( $n \leq 30$ ). Was die statistische Auswertung eingeschränkt aussagekräftig macht.

Bei den im Ergebnisteil aufgeführten Werten wurde der Median sowie der Interquartilsabstand zur Beurteilung der Daten verwendet. Der Vorteil gegenüber dem arithmetischen Mittel liegt in der größeren Robustheit gegenüber Ausreißern und darin dass sich der Median auch auf ordinal skalierte Variablen anwenden lässt. Andere Studien lösten dies unterschiedlich. Während Rolfo et al (152) ebenfalls den Median verwandte, benutzten andere Studien das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung (26/91/102).

Um die Mittelwerte zweier unterschiedlicher Stichproben miteinander zu vergleichen und die Unterschiede auf Signifikanz zu testen, wandten wir den t-Test für unabhängige Stichproben (Welch-Test) an.

Hierzu müssen beide Stichproben aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen, oder aber die Stichprobenumfänge müssen so groß sein, dass der zentrale Grenzwertsatz anwendbar ist. Zur Überprüfung, ob die zu testenden Stichproben einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen lassen sich statistische Tests (z.B. Shapiro Wilk Test) oder grafische Methoden (z.B. Quantile-Quantile-Plot) anwenden. Da geringe Abweichungen von der Normalverteilung das Ergebnis des t-Tests nicht entscheidend beeinflussen, genügt die grafische Überprüfung. Alternativ besteht die Möglichkeit durch eine Transformation des Datensatzes eine Normalverteilung zu erzeugen. Eine geeignete Transformation ist die Anwendung des natürlichen Logarithmus.

Die Messungen der Normoblasten in unserer Studie (vgl. Kap. 4.5.2) ergaben mehrfach Werte von  $0,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , was eine Messungenauigkeit darstellt, da die Erythropoese ein kontinuierlicher Prozess ist. Dementsprechend ist eine

Anwendung des natürlichen Logarithmus nur nach einer vorherigen Korrektur der Werte möglich, da der natürliche Logarithmus nur für positive Zahlen definiert ist.

Alternativ verwandten wir für den Fall, dass keine Normalverteilung der Daten vorlag, den Mann-Whitney-U-Test. Dies stellt eine nicht parametrische, d.h. verteilungsunabhängige Alternative zum t-Test dar. Der Nachteil im Vergleich zum t-Test liegt in einer geringeren Teststärke.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen besteht die Möglichkeit mittels einer Varianzanalyse (z.B. ANOVA) mehrere Stichproben simultan zu vergleichen. Der Vorteil liegt in einer größeren Teststärke für den Vergleich mehrerer Gruppen durch eine geringere Fehleranfälligkeit, da nur ein Test durchgeführt werden muss. Im Vergleich zum t-Test oder zum Mann-Whitney-U-Test hängt die Teststärke in noch größerem Ausmaß vom Stichprobenumfang ab. Da der Stichprobenumfang in dieser Studie zum Teil sehr klein ist und es sich bei dieser Studie mehrheitlich um den Vergleich von nur zwei Stichproben handelte beschränkten wir uns auf die Anwendung des t-Tests bzw. des Mann-Whitney-U-Tests.

Auch diese Problematik wurde in anderen Studien unterschiedlich gelöst. Während z.B. Neunhoefer et al (126) den t-Test benutzten, verwandten andere Studien den Mann-Whitney-U-Test (50). Kil et al (91) wiederum verwandten zum Vergleich von zwei Stichproben den t-Test und um mehr als zwei Stichproben zu vergleichen ANOVA. Die Studien variieren jedoch stark im Studiendesign was eine Vergleichbarkeit erschwert.

Um den optimalen Entscheidungswert der untersuchten Parameter zu bestimmen wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Dieser Methodik bedienen sich auch zahlreiche andere Studien (91/126/149/150).

Des Weiteren verwendeten wir zur Feststellung ob ein Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen besteht (z.B. Normoblastenzahl und Gestationsalter) den Korrelationskoeffizienten (auch: Pearson-Korrelation). Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, gibt es keinen linearen

Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen. Allerdings können diese ungeachtet dessen in nicht-linearer Weise, beispielsweise quadratisch oder exponentiell voneinander abhängen. Damit ist der Korrelationskoeffizient kein besonders geeignetes Maß für die (reine) stochastische Abhängigkeit von Merkmalen.

Zusammenfassend variieren ähnliche Studien stark in ihrer statistischen Methodik was eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig macht und keine Metaanalyse erlaubt.

Somit muss gefordert werden, dass in einer größeren Studie/ Metaanalyse mit vergleichbarem Studiendesign die erzielten Ergebnisse bestätigt werden.

#### **4.6 Normoblasten als Infektparameter: Schlussfolgerung**

Bei der Diagnostik der bakteriellen Infektion kann auch die Normoblastenkonzentration die diagnostische Lücke zwischen der 12. (Abfall der Normoblasten/ des IL-8) und der 24. Lebensstunde (max. Sensitivität des CrP-Wertes) nicht schließen. Selbst bei Betrachtung der Kombination aus Normoblasten und IL-8-Wert gelingt dies nicht.

Der Normoblastenwert im peripheren Blut ist nicht infektionsspezifisch. Neben Infektionen konnten auch bei hypoxischem Stress unterschiedlicher Genese sowie zahlreicher anderer Krankheitsbilder erhöhte Werte beobachtet werden (vgl. Kap.4.2.2).

Insgesamt zeigten Neugeborene mit erhöhten Normoblastenwerten jedoch ein schlechteres Outcome als Neugeborene mit normwertigen Normoblasten. (13/62/67/118).

Somit sollte, auch wenn die Normoblasten sich nicht als früher prädiktiver Parameter für eine EOBI eignen, über eine Eingliederung der Normoblastenbestimmung in die Routinediagnostik nachgedacht werden. Dies



auch aufgrund der Tatsache, dass die Normoblastenzählung mittlerweile ein schnelles, kostengünstiges Verfahren darstellt und nur ein sehr geringes Blutvolumen bereitgestellt werden muss.

Die Unterschiede im Studiendesign ähnlicher Studien machen eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig und erlauben keine Metaanalyse.

Somit muss gefordert werden, dass in einer größeren Studie/ Metaanalyse mit vergleichbarem Studiendesign die erzielten Ergebnisse bestätigt werden und zusätzlich zur Early-onset-Infektion die Late-onset-Infektion in die Studie miteinbezogen wird.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mittels einer automatisierten Methodik die Kinetik der Normoblastenzahl bei Früh- und Reifgeborenen in den ersten Lebenstagen zu untersuchen, da die bisherigen publizierten Ergebnisse oft nur mit mikroskopischen Methoden ermittelt wurden. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich die Normoblastenzahl bei der Early-onset-Infektion (Early Onset Bacterial Infection, EOBI), deren Mortalität und Morbidität hoch sind, als Parameter eignet und wie er sich in Bezug zu anderen Infektionsparametern (Interleukin-8, IL-8) verhält. Eine EOBI wurde definiert als mindestens ein klinisches Symptom plus eine CrP-Erhöhung  $\geq 10$  mg/l und/ oder ein erhöhtes IL-8  $\geq 60$  pg/ml und/ oder eine positive Blutkultur innerhalb der ersten 72 Lebensstunden, die eine mehrtägige antibiotische Behandlung erforderte. Die Bestimmung der Normoblasten erfolgte mittels eines durchflusszytometrisch automatisierten Mehrkanalgeräts Sysmex XE-2100.

In einer prospektiven Studie wurden 169 Neugeborene (104 Reifgeborene, 65 Frühgeborene) eingeschlossen. 27 Frühgeborene und 60 Reifgeborene entwickelten eine EOBI. Die postpartale Normoblastenzahl war bei Früh- und Reifgeborenen ohne EOBI abfallend: Die Werte sanken innerhalb von 42 Stunden auf ein Plateau (bei Reifgeborenen ohne EOBI von  $0,37 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) auf  $0,07 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,02 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), bei Frühgeborenen ohne EOBI von  $1,15 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $2,28 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) auf  $0,01 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (IQR:  $0,34 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ )). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem ersten klinischen Verdacht zeigten Frühgeborene, im Gegensatz zu Reifgeborenen mit EOBI, signifikant höhere Normoblastenzahlen als die Frühgeborenen der Kontrollgruppe. Die Sensitivität für Reifgeborene lag bei einem Cut-off von  $>0,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bei 9,4 % [5-14 %], bei Frühgeborenen bei einem Cut-off von  $>1,31 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bei 55 % [46-64 %]. Entsprechend betrug die Spezifität bei Frühgeborenen 75 % [68-83 %], bei Reifgeborenen 96 % [93-98 %].

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Messung von Normoblasten nicht unmittelbar als prädiktiver Parameter bei der EOBI von Termin- und

Frühgeborenen eignet. Sensitivität und Spezifität sind deutlich geringer als sie beim IL-8 beschrieben werden. Auch in Kombination mit IL-8 ergeben sich keine Steigerungen. Erschwerend kommen Referenzbereiche hinzu, die sich nach Gestations- und Lebensalter unterscheiden.

## Anhang:

Überprüfung der Normalverteilungsannahmen mittels Quantile-Quantile-Plot (QQ-Plot):

Zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden im Rahmen der deskriptiven Statistik, kann für das Geburtsgewicht bei reifgeborenen Kindern der t-Test angewandt werden da die Stichproben näherungsweise normalverteilt sind.

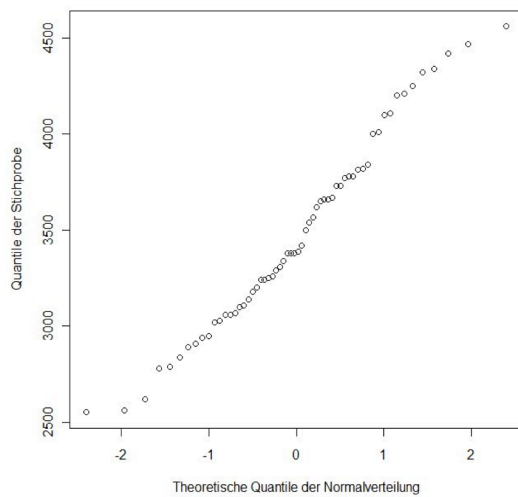


Abb. 17: QQ-Plot Geburtsgewicht Reifgeborene mit EOB1

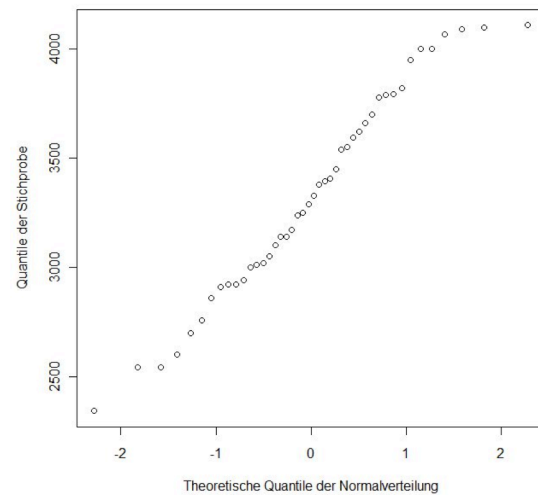


Abb. 18: QQ-Plot Geburtsgewicht Reifgeborene ohne EOB1

In allen anderen Fällen wurde bei starker Verletzung der Normalverteilungsannahme, zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte, der Mann-Whitney- U-Test verwandt, der nicht parametrischen, d.h. verteilungsunabhängigen Alternative zum t-Test.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams WG, Kinney JS, Schuchat A, Collier CL, Papasian CJ, Kilbride HW, Riedo FX, Broome CV: Outbreak of early onset group B streptococcal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 565-570.
2. Adib M, Bakhshiani Z, Navaei F, Saheb Fosoul F, Fouladi S, Kazemzadeh H: Procalcitonin: a reliable marker for the diagnosis of neonatal sepsis. *Iran J Basic Med Sci.* 2012 Mar;15(2):777-82.
3. Akercan F1, Cirpan T, Saydam G: Nucleated red blood cells in infants of women with preterm labor and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005 Aug;90(2):138-9.
4. Allardice JG, Baskett TF, Seshia MM, Bowman N, Malazdrewicz R: Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 617-620.
5. Anderson DC: Neonatal neutrophil dysfunction. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 816-187.
6. Anderson B, Kelly AM, Kerr D, Clooney M, Jolley D: Impact of patient and environmental factors on capillary refill time in adults. *Am J Emerg Med* 2008; 26(1): 62-65.
7. Ansari-Lari MA, Kickler TS, Borowitz MJ: Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. Relationship to infection and sepsis. *Am J Clin Pathol.* 2003 Nov;120(5):795-9.
8. AWMF - S2-Leitlinie Neonatologie: Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen.
9. Axt-Fliedner R, Hendrik HJ, Schmidt W: Nucleated red blood cell counts in growth-restricted neonates with absent or reversed-end-diastolic umbilical artery velocity. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2002;29(4):242-6.
10. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/ interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-1049.
11. Baltimore RS, Huie SH, Meek JI, Schuchat A, O'Brien KL: Early Onset Neonatal Sepsis in the Era of Group B Streptococcal Prevention. *Pediatrics* 2001; 108:1 094-1098.
12. Baschat AA1, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Harman CR: Neonatal nucleated red blood cell count and postpartum complications in growth restricted fetuses. *J Perinat Med.* 2003;31(4):323-9.
13. Baschat AA, Gungor S, Kush ML, Berg C, Gembruch U, Harman CR: Nucleated red blood cell counts in the first week of life: a critical appraisal of relationships with perinatal outcome in preterm growth-restricted neonates. *Am*

J Obstet Gynecol. 2007 Sep;197(3):286.e1-8.

14. Bayram F, Ozerkan K, Cengiz C, Develioğlu O, Cetinkaya M: Perinatal asphyxia is associated with the umbilical cord nucleated red blood cell count in pre-eclamptic pregnancies: J Obstet Gynaecol 2010 May;30(4):383-6.

15. Belady-PH, Farkouh-LJ, Gibbs-RS: Intra-amniotic infection and premature rupture of the membranes. Clin Perinatol 1997; 24: 43-57.

16. Bender L, Thaarup J, Varming K, Krarup H, Ellermann-Eriksen S, Ebbesen F: Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. Dan Med Bull. 2008 Nov;55(4):219-23.

17. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P: Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. Pediatrics 1998; 102: 41.

18. Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, Richter K, Tawfeek MS, Clad A, Brandis M: Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. Pediatr-Res. 1998 Oct; 44(4): 469-77.

19. Berner R, Tuxen B, Clad A, Forster J, Brandis M: Elevated gene expression of interleukin-8 in cord blood is a sensitive marker for neonatal infection European Journal of Pediatrics 2000, 159: S.205-210.

20. Betty C, Inderpreet: Early onset neonatal sepsis. Indian J Pediatr 2005; 72(1): 23-26.

21. Blackwell SC1, Refuerzo JS, Wolfe HM, Hassan SS, Berry SM, Sokol RJ, Sorokin Y: The relationship between nucleated red blood cell counts and early-onset neonatal seizures. Am J Obstet Gynecol. 2000 Jun;182(6):1452-7.

22. Blackwell SC, Refuerzo JS, Hassan SS, Wolfe HM, Berry SM, Sorokin Y: Nucleated red blood cell counts in term neonates with umbilical artery pH < or = 7.00. Am J Perinatol 2001;18(2):93-8.

23. Boonkasidecha S, Panburana J, Chansakulporn S, Benjasuwantep B, Kongsomboon K: An optimal cut-off point of serum C-reactive protein in prediction of neonatal sepsis. J Med Assoc Thai. 2013 Jan;96 Suppl 1:S65-70.

24. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP: Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B-streptococcal early-onset disease. 1. Epidemiologic rationale. J Infect Dis 1983; 148: 795-801.

25. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP: Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B-streptococcal early-onset disease. 2. Predictive value of prenatal cultures. J Infect Dis 1983;148(5): 802-809.

26. Brown DW1, Ford ES, Giles WH, Croft JB, Balluz LS, Mokdad AH:

Associations between white blood cell count and risk for cerebrovascular disease mortality: NHANES II Mortality Study, 1976-1992. *Ann Epidemiol.* 2004 Jul;14(6):425-30.

27. Buck C, Bundschu J, Galatti H, Matis J, Simeoni U: Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 1994, 93: 54-58.

28. Buonocore G, de Filippo M, Gioia D, Picciolini E, Luzzi E, Bocci V, Bracci R: Maternal and neonatal plasma cytokine levels in relation to mode of delivery. *Biology of the Neonate* 1995; 68: 104-110.

29. Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R, Bracci R: Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Dec;181(6):1500-5.

30. Buscher U, Chen F, Pitzen A, Menon R, Vogel M, Obladen M, Dudenhausen JW: IL-1 beta, IL-6, IL-8 and G-CSF in the diagnosis of early-onset neonatal infections. Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage. *J Perinat Med* 2000; 28: 383-88.

31. Buttery JP: Blood cultures in newborn and children: optimising an everyday test *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 2002, 87: S.25-28.

32. Chiesa C, Scheen AJ, Rossi N, Stegagno M, De Giusti M, Osborn JF, et al: Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 664-72.

33. Chock VY1, Reddy VM, Bernstein D, Madan A: Neurologic events in neonates treated surgically for congenital heart disease. *J Perinatol.* 2006 Apr;26(4):237-42.

34. Constantino BT, Cogionis B: Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film. *Lab Med* 2000, 31 : 223 – 229.

35. Christensen RD and Rothstein G: Efficiency of neutrophil migration in the neonate *Pediatr Res*, 1980. 14(10): p. 1147-9.

36. Christensen RD, Henry E, Andres RL, Bennett ST: Reference ranges for blood concentrations of nucleated red blood cells in neonates. *Neonatology.* 2011; 99(4):289-94. doi: 10.1159/000320148. Epub 2010 Dec 4.

37. Christensen RD1, Lambert DK1, Richards DS2: Estimating the nucleated red blood cell 'emergence time' in neonates. *J Perinatol.* 2014 Feb;34(2):116-9. doi: 10.1038/jp.2013.113. Epub 2013 Sep 12.

38. Cimenti C, Erwa W, Herkner KR, Kasper DC, Müller W, Resch B: The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Feb 23; 50(8):1429-32. doi: 10.1515/cclm-2011-0656.
39. Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O: Role of Innate Immunity in Neonatal Infection. *Am J Perinatol*. 2013 Jan 7.
40. Custer RP: *An Atlas of the Blood and Bone Marrow*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1974:22-25, 123-136.
41. Da Silva O, Ohlsson A, Kenyon C: Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr. Infect. 1995 Dis. J.* 14, 362-366.
42. Danise P, Amendola G, Di Concilio R, Cillari E, Goia M, Di Palma A Avino D, Rigano P, Maggio A: Nucleated red blood cells and soluble transferrin reseptor in thalassemia syndromes relationship with global and ineffective erythropoesis. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1539-42.
43. Davari-Tanha F1, Kaveh M2, Nemati S3, Javadian P3, Salmanian B3: Nucleated red blood cells count in pregnancies with idiopathic intra-uterine growth restriction. *J Family Reprod Health*. 2014 Jun;8(2):77-81.
44. De Bont ESJM, Martens A, Raan J van Samson G, Fetter WPF, Okken A, Leij LHFM, De Kimpen JLL: (1994) Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosos factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatrics* 83: 696-9.
45. Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e. V.: *Handbuch, Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Neonatale bakterielle Infektionen* S 598-607 Futuramed Verlag, München 1995.
46. Diekmann L, Kotzur J: Sepsis im Neugeborenen und Säuglingsalter. *Klin. Pädiatrie*; 188: 135-45.
47. Dilli D, Oğuz ŞS, Dilmen U, Köker MY, Kızılgün M: Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis. *J Clin Lab Anal*. 2010; 24(6):363-70.
48. Dillon HC, Khare S, Gray BM: Croup B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr* 1987; 110:31-36.
49. Dollberg S1, Marom R, Mimouni FB, Yeruchimovich M: Normoblasts in large for gestational age infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000 Sep;83(2):F148-9.
50. Dulay AT, Buhimschi IA, Zhao G, Luo G, Abdel-Razeq S, Cackovic M, Rosenberg VA, Pettker CM, Thung SF, Bahtiyar MO, Bhandari V, Buhimschi CS: Nucleated red blood cells are a direct response to mediators of inflammation in newborns with early-onset neonatal sepsis. *Am J Obstet*



Gynecol. 2008 Apr;198(4):426.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2008.01.040.

51. Elawady S, Botros SK, Sorour AE, Ghany EA, Elbatran G, Ali R: Neutrophil CD64 as a Diagnostic Marker of Sepsis in Neonates. *J Investig Med*. 2014 Jan 23. [Epub ahead of print]

52. Engle WA: A recommendation for the definition of "late preterm" (near-term) and the birth weight-gestational age classification system *Seminars in Perinatology* 2006; 30: 2-7.

53. Ericson M: Neonatal septicemia. *Acta Paediat Scand* 1983; 72:1.

54. Fan Y, Yu JL: Umbilical blood biomarkers for predicting early-onset neonatal sepsis. *World J Pediatr*. 2012 May;8(2):101-8. doi: 10.1007/s12519-012-0347-3. Epub 2012 May 10.

55. Ferber A, Fridel Z, Weissmann-Brenner A, Minior VK, Divon MY: Are elevated fetal nucleated red blood cell counts an indirect reflection of enhanced erythropoietin activity? *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190:1473–5.

56. Flier A, Gerards LJ and Verhoef J: Host defence to bacterial infection in the neonate *J Hosp Infect*, 1988. 11 Suppl A: p. 320-7.

57. Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moennig MJ, Bartels DB, Dammann O, von Kries R, Berner R: German Pediatric Surveillance Unit Study Group: Incidence and Clinical Presentation of Invasive Neonatal Group B Streptococcal Infections in Germany. *Pediatrics* 2006; 117: 1139-1145.

58. Franz AR, Steinbach G, Pohlandt F: Interleukin 8 (IL-8) is a sensitive marker for early-onset bacterial infections (EOBI) and nosocomial bacterial infections (NBI) in preterm infants. *Pediatr Res* 1997; 42: 401.

59. Franz AR, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G: 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* 1999 Aug; 18(8): 666-71.

60. Franz AR, Steinbach G, Kron M, Pohlandt F: Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* 1999 Sep; 104(3 Pt 1): 447-53.

61. Franz, A.R., Steinbach, G., Kron, M., Pohlandt, F: Interleukin-8: a valuable tool to restrict antibiotic therapy in newborn infants. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1025-1032.

62. Frey B1, Duke T, Horton SB: Nucleated red blood cells after cardiopulmonary bypass in infants and children: is there a relationship to the

systemic inflammatory response syndrome? *Perfusion*. 1999 May;14(3):173-80.

63. Gendrel D, Assicot M, Raymond J, Moulin F, Francoul C, Badoual J et al: Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatrics* 1996; 128: 570-73.

64. Gerdes JS, Polin RA: Sepsis screen in neonates with evaluation of plasma fibronectin *Pediatric Infectious Disease Journal* 1987, 6: S.443-446.

65. Gerdes JS: Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 1991; 18: 361-81.

66. Ghezzi F, Gomez R, Romero R, Yoon BH, Edwin SS, David D, Janisse J, Mazor M: Elevated Interleukin-8 concentrations in amniotic fluid of mother whose neonates subsequently developed bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998 ; 78 : 5-10.

67. Ghosh B, Mittal S, Kumar S, Dadhwal V: Prediction of perinatal asphyxia with nucleated red blood cells in cord blood of newborns. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003 Jun;81(3):267-71.

68. Gille C, Dreschers S, Leiber A, Lepiorz F, Krusch M, Grosse-Opphoff J, Spring B, Haas M, Urschitz M, Poets CF, Orlikowsky TW: The CD95/CD95L pathway is involved in phagocytosis-induced cell death of monocytes and may account for sustained inflammation in neonates. *Pediatr Res* 2012 Dec 26. doi: 10.1038/pr.2012.196.

69. Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG (2009): *Neonatology, Management, Procedures, On-Call Problems, Diseases, and Drugs*; 6 th Edition, Mc Graw, Hill, Lange; p. 665-667

70. Green DW, Mimoui G: Nucleated erythrocytes in healthy infants and in infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 1990; 166: 129-31.

71. Green DW, Hendon B, Mimouni FB: Nucleated erythrocytes and intraventricular Hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics* 1995; 96:475-8.

72. Haertel C, Gille C, Orlikowsky TW: Kolonisation oder Infektion bei Früh- und Neugeborenen. Warum sind sie so gefährdet? *Monatsschr Kinderheilkunde* 2014.162:394-402. Doi 10.1007/s00112-013-2973-9. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.

73. Hagberg H1, Gressens P, Mallard C: Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol*. 2012 Apr;71(4):444-57. doi: 10.1002/ana.22620. Epub 2012 Feb 14.

74. Hallmann M: Cytokines, pulmonary surfactant and consequences of intrauterine infection. *Biol Neonate* 1999; 76 (Suppl. 1): 2-9.

75. Hakansson S, Kallen K: Impact and risk factors for early onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. *BJOG* 2006; 113: 1452-1458.
76. Hanlon-Lundberg KM1, Kirby RS: Nucleated red blood cells as a marker of acidemia in term neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Jul;181(1):196-201.
77. Harms, Volker: *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*, 7.Auflage, Harms Verlag 1998, S.136 f.
78. Harris MC, Costarino AT, Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L, Butler S, Kilpatrick L: Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr* 2004; 124:105-11.
79. Hartung, Joachim: *Statistik*, 12. Auflage, Oldenbourg Verlag 1999, S. 561 f.
80. Hoffman R: *Hematology: Basic Principles and Practice*. 2000 Philadelphia, Churchill Livingstone.
81. Hsu KK, Pelton SI, Shapiro DS: Detection of group B streptococcal bacteremia in simulated intrapartum antimicrobial prophylaxis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003 Jan;45(1):23-7.
82. Hyde BT, Hilger TM, Reingold A, Farley MM, O'Brien KL, Schuchat A: Trend in Incidence and Antimicrobial Resistance of Early-Onset Sepsis: Population-Based Surveillance in San Francisco and Atlanta. *Pediatrics* 2002; 110: 690-695.
83. Ingall D, Sanchez PJ. Syphilis: In Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5 th Philadelphia, WB Saunders 2001; 654.
84. Insenberg H: *Meningitis im Kindesalter und Neugeborenenensepsis*. 4., überarb. und erw. Aufl., 1998; Steinkopf, Darmstadt.
85. Jelkmann W: Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.* 2007 Mar;78(3):183-205. Epub 2007 Jan 23.
86. Jeon JH, Namgung R, Park MS, Park KI, Lee C: Positive maternal C-reactive protein predicts neonatal sepsis. *Yonsei Med J.* 2014 Jan;55(1):113-7. doi: 10.3349/ymj.2014.55.1.113.
87. Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, La Pine TR and Hill HR: Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion *J Infect Dis*, 2000; 182(3): p. 974-7.
88. Källmann J, Kihlström E, Sjöberg L, Schollin J: Increase of staphylococci in neonatal septicaemia: a fourteen-year study. *Acta Paediatr* 1997; 86: 533-38.

89. Kashlan F, Smulian J, Shen-Schwarz S, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T: Umbilical vein interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha plasma concentrations in the very preterm infant. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:238-43.
90. Kerur BM, Vishnu Bhat B, Harish BN, Habeebullah S, Uday Kumar C: Maternal Genital Bacteria and Surface Colonisation in Early Neonatal Sepsis. *Indian J Pediatr* 2006; 73: 29-32.
91. Kil TH, Han JY, Kim JB, Ko GO, Lee YH, Kim KY, Lim JW: A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights. *Korean J Pediatr*. 2011 Feb; 54(2):69-78.
92. Kirschbaum-T: Antibiotics in the treatment of preterm labor. *AM J Obstet Gynecol* 1993 Apr; 168: 1239-46.
93. Klein J: Current concepts of infectious diseases in the newborn infant. *Curr Prob Pediatr* 1986; 31: 405.
94. Klein J, Marcy M: Bacterial sepsis and meningitis Klein-JRJ, ed. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4th edn. Saunders, Philadelphia 1995: 835-90.
95. Kohse KP et al: Whole blood Interleukin-8 concentrations in capillary and cord blood of neonates for the diagnosis of systemic inflammatory states. *Clin Lab* 2002; 48: 497-503.
96. Krajewski P, Welfel E, Kalinka J, Pokrzywnicka M, Kwiatkowska M: Evaluation of the relationship between circulating nucleated red blood cells count and inborn infection in neonates. *Ginekol Pol* 2008 Jan;79(1):17-22.
97. Krediet T, Gerards L, Fleer A, van-Stekelenburg G: The predictive value of CRP and I/T-ratio in neonatal infection. *J-Perinat-Med* 1992; 20(6): 479-85.
98. Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A: Association of nucleated red blood cells in the blood and arterial oxygen partial tension. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:257-263.
99. Kunz D, Kohse KP: Entzündungsdiagnostik in der Pädiatrie. *J. Lab. Med* 2002; 26, 335-340.
100. Krohn MA, Hillier SL, Baker CJ: Maternal Peripartum Complications Associated with Vaginal Group B Streptococci Colonisation. *J Infect Dis* 1999; 179: 1410-5.
101. Laskowska-Klita T1, Czerwi ska B, Maj-Pucek M: Neutrophil elastase level in cord blood and diagnosis of infection in mature and premature neonates. *Med Wieku Rozwoj*. 2002 Jan-Mar;6(1):13-21.
102. Lee HR1, Shin S, Yoon JH, Kim BJ, Hwang KR, Kim JJ, Roh EY:

Complete blood count reference values of donated cord blood from Korean neonates.

Korean J Lab Med. 2009 Jun;29(3):179-84. doi: 10.3343/kjlm.2009.29.3.179.

103. Lepenies J: Knochenmark in Allgemeine und spezielle Pathologie, Bühling KJ, Lepenies J and Witt K, Editors 2000, Urban&Fischer: München, Jena. p. 377-390.

104. Li J, Plorde JJ, Carlson LG: Effects of volume and periodicity on blood cultures. J.Clin. Microbiol 1994; 32: 2829-31.

105. Liu C, Ai H, Wang W, Chen L, Hu H: Comparison of 16S rRNA gene PCR and blood culture for diagnosis of neonatal sepsis. Arch Pediatr. 2014 Feb;21(2):162-9. doi: 10.1016/j.arcped.2013.11.015. Epub 2013 Dec 30.

106. Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.

107. Lubetzky R, Stolovitch C, Dollberg S, Mimouni FB, Salomon M, Mandel D: Nucleated red blood cells in preterm infants with retinopathy of prematurity. Pediatrics 2005 Nov;116(5):e619-22. Epub 2005 Sep 30.

108. Manroe BL, Rosenfeld CR, Weinberg AG, Browne R: The differential leukocyte count in the assessment and outcome of early-onset neonatal group B streptococcal disease. J Pediatr. 1977 Oct;91(4):632-7.

109. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfield CR, Browne R: The neonatal blood count in health and disease. 1. Reference values for neutrophilic cells. J Pediatr 1979; 95, 98-98.

110. Marodi L: IL-12 and IFN-gamma deficiencies in human neonates Pediatr Res, 2001. 49(3): p. 316.

111. Mathers NJ, Pohlandt F: Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection. Eur J Pediatr 1987; 146: 147-51

112. Mc Cracken GH, Eichenwald HF: Leukocyte function and the development of opsonic complement activity in the neonate. Am J Dis Child 1971; 121: 120-26.

113. Mehr SS, Doyle LW, Rice GE, Vervaart P, Henschke P: Interleukin-6 and Interleukin-8 in newborn Bacterial Infection. Am J of Perinat 2001; 18: 313-23.

114. Mertelsmann, R., D. Berger, et al: Das Rote Buch. Landsberg, Ecomed. 2006.

115. Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U: (1996) Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for

early diagnosis of neonatal infection. *J. Pediatr.* 129:574-80.

116. Miller DR, Baehner RL: *Blood Diseases of Infancy and Childhood*. 7th ed. St Louis, MO: Mosby; 1995:39-40.

117. Minior VK, Shatzkin E, Divon MY: Nucleated red blood cell count in the differentiation of fetuses with pathologic growth restriction from healthy small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 2000 May;182(5):1107-9.

118. Minior VK, Bernstein PS, Divon MY: Nucleated red blood cells in growth-restricted fetuses: associations with short-term neonatal outcome. *Fetal Diagn Ther* 2000 May-Jun;15(3):165-9.

119. Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, Garland SM: Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006 ; 91: F208-F212.

120. Munshi UK, Niu JO, Siddiq MM, Parton LA: Elevation of interleukin-8 and interleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24: 331-36.

121. Mussap M, Molinari MP, Senno E, Gritti P, Soro B, Mannelli S, Fabris C: New diagnostic tools for neonatal sepsis: the role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *J Chemother.* 2007 Oct;19 Suppl 2:31-4.

122. Mussi-Pinhata MM, Nobre RA, Martinez FE, Jorge SM, Ferlin MLS, Goncalves AL: Early-onset Bacterial Infection in Brazilian Neonates with Respiratory Distress: A Hospital-based study. *J Trop Pediatr* 2004; 50(1): 6-11.

123. Mwaniki MK1, Atieno M, Lawn JE, Newton CR: Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet.* 2012 Feb 4;379(9814):445-52. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61577-8. Epub 2012 Jan 13.

124. Naeye RL, Localio AR: Determining the time before birth when ischemia and hypoxemia initiated cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 1995 Nov;86(5):713-9.

125. Nakul-Aquarone D1, Sudaka-Sammarcelli I, Ferrero-Vacher C, Starck B, Bayle J: Evaluation of the Sysmex Xe-2100 hematology analyzer in hospital use. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(4):113-23.

126. Neunhoeffer F: Wertigkeit von IL-8 in Plasma und lysiertem Vollblut bei neonataler bakterieller Infektion 2005: 9-11.

127. Ng PC, Cheng SH, Chui KM et al: Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child* 1997; 77: 221-27.

128. Ng PC, Li K, Wong RP: Proinflammatory and antiinflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal.* ED 2003; 88, 209-213.
129. Ng PC: Diagnostic markers of infection in Neonates. *Arch. Dis. Child. Neonatol.* ED 2004; 89, 229-235.
130. Ng PC, Li G, Chui KM, et al: Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatric Research.* 2004;56(5):796–803.
131. Niedersächsische Neonatalerhebung: NP Extra 1997: 73.
132. Nupponen I1, Pesonen E, Andersson S, Mäkelä A, Turunen R, Kautiainen H, Repo H: Neutrophil activation in preterm infants who have respiratory distress syndrome. *Pediatrics.* 2002 Jul;110(1 Pt 1):36-41.
133. Ohlin A, Bäckman A, Ewald U, Schollin J, Björkqvist M: Diagnosis of neonatal sepsis by broad-range 16S real-time polymerase chain reaction. *Neonatology.* 2012;101(4):241-6. doi: 10.1159/000334655. Epub 2011 Dec 28.
134. Orlikowsky TW, Neunhoeffler F, Goelz R, Eichner M, Henkel C, Zwirner M, Poets CF: Evaluation of IL-8-Concentrations in Plasma and Lysed EDTA-Blood in Healthy Neonates and Those with Suspected Early Onset Infection. *Pediatr Res* 2004; 56(5): 804-809.
135. Orlikowsky et al. University Hospital Dept. of Neonatology Tübingen, Germany. Poster: Automatische Differenzierung des weißen Blutbildes bei Neugeborenen mit neonataler bakterieller Infektion (NBI), 2004.
136. Orlikowsky TW, Trüg C, Neunhoeffler F, Deperschmidt M, Eichner M, Poets CF: lipopolysaccharide-binding protein in noninfected neonates and those with suspected early-onset bacterial infection. *J Perinatol* 2006; 26(2): 115-119.
137. Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y: Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2005 Aug;27(4):242-6.
138. Ottolini MC, Lundgren K, Mirkinson LJ, Cason S, Ottolini MG: Utility of complete blood count and blood culture screening to diagnose neonatal sepsis in the asymptomatic newborn *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 430-34.
139. Papa F, Rongioletti M, Majolini MB, Collegiani V, Vaccarella C, Notarmuzi ML, Cortesi M, Pasqualetti P, Cicchese M, Agostino R, Liunbruno GM: Fast bedside measurement of blood count and C-reactive protein in newborns compared with conventional methods. *Clin Lab.* 2012;58(9-10):951-7.

140. Philip AG1, Tito AM: Increased nucleated red blood cell counts in small for gestational age infants with very low birth weight. *Am J Dis Child*. 1989 Feb;143(2):164-9.
141. Philip AG, Allan WC, Tito AM, Wheeler LR: Intraventricular hemorrhage in preterm infants: declining incidence in the 1980s. *Pediatrics* 1989 Nov;84(5):797-801.
142. Philip AG, Tito AM, Gefeller O, Speer CP: Neutrophil elastase in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatr Infect Dis J* 1994 Apr;13(4):323-6.
143. Philip AG, Mills PC: Use of C-reactive protein in minimizing antibiotic exposure: experience with infants initially admitted to a well-baby nursery. *Pediatrics* 2000; 106, E4.
144. Polin RA et al: Neonatal sepsis. *Adv Pediatr Infect Dis*. 1992; 7: 25-33
145. Pourcyrous M, Bada HS, Korones SB, Baselsli V, Wong SP: Significance of serial C-reactive protein response in neonatal infection and other disorders. *Pediatrics* 1993; 92: 431-35
146. Prashant A, Vishwanath P, Kulkarni P, Sathya Narayana P, Gowdara V, Nataraj SM, Nagaraj R: Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. *PLoS One*. 2013 Jul 15;8(7):e68426. doi: 10.1371/journal.pone.0068426. Print 2013.
147. Rai R1, Tripathi G, Singh DK: Nucleated RBC count as predictor of neurological outcome in perinatal asphyxia. *Indian Pediatr*. 2014 Mar;51(3):231-2.
148. Rankin EB1, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH: Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):1068-77.
149. Redl H, Schlag G, Bahrami S, Schade U, Ceska M, Stutz P: Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis* 1991; 164(2): 383-88.
150. Redl H, Schlag G, Bahrami S, Dinges HP, Schade U, Ceska M: Markers of endotoxin related leukocyte activation and injury mechanisms. *Prog Clin Biol Res* 1991; 367: 83-100.
151. Roche Lexikon Medizin, 4. Aufl. Urban & Fischer, 1999.
152. Rolfo A, Maconi M, Cardaropoli S, Biolcati M, Danise P, Todros T: Nucleated red blood cells in term fetuses: reference values using an automated analyzer. *Neonatology* 2007;92(3):205-8. Epub 2007 Apr 30.
153. Romero R, Mazor M, Marotti R, Avila C, Oyarzun E, Insunza A, Parra M,



Behnke E, Montiel F, Cassell GH: Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 129-33.

154. Romero R1, Savasan ZA, Chaiworapongsa T, Berry SM, Kusanovic JP, Hassan SS, Yoon BH, Edwin S, Mazor M: Hematologic profile of the fetus with systemic inflammatory response syndrome. *J Perinat Med*. 2011 Sep 30;40(1):19-32. doi: 10.1515/JPM.2011.100.

155. Rowen JL, Smith CW, Edwards MS: Group B streptococci elicit leukotriene B4 and interleukin-8 from human monocytes: neonates exhibit a diminished response. *J Infect Dis* 1995 Aug; 172(2): 420-6.

156. Russel GA, Smyth A, Cooke RW: Receiver operating characteristics curve for comparison of serial neutrophil band forms and C-reactive protein in neonates at risk of infection. *Arch Dis Child* 1992; 67: 808-12.

157. Sabui T, Tudehope DI, Tilse M: Clinical significance of quantitative blood cultures in newborn infants. *J Pediatr Child Health* 1999; 35: 578-581.

158. Salzer HR, Genger H, Weninger M, Pollack A: Prognostische Bedeutung des Beginns einer Sepsis beim Neugeborenen. *Wien Klein Wochenschr* 1988; 100: 564-67.

159. Schaer C1, Schmutz M, Frey B: Prognostic value of nucleated red blood cells in critically ill children. *Swiss Med Wkly*. 2014 Mar 28;144:w13944. doi: 10.4414/smw.2014.13944. eCollection 2014.

160. Schmidt/Lang - Physiologie des Menschen, Springer-Verlag, 30. Auflage, S.531, 69)

161. Schrag SJ, Phil D, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, Harrison LH, Lefkowitz LB, Hadler JL, Danila R, Cieslak PR, Schuchat A: Group B Streptococcus Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *N Engl J Med* 2000; 342: 15-20.

162. Schrag SJ, Hadler JL, Arnold KE, Martell-Cleary P, Reingold A, Schuchat A: Risk Factors for Invasive, Early-Onset Escherichia coli Infections in the Era of Widespread Intrapartum Antibiotic Use. *Pediatrics* 2006; 118: 570-576.

163. Schuchat A, Oxtobody M, Cochi S, Sikes RK, Hightower AW, Plikaytis B, Broom CV: Population based risk-factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study on metropolitan Atlanta. *J Infect Dis* 1990; 162: 672-677.

164. Schuchat A, Deaver- Robinson K, Plikaytis BD, Zangwill K, Mohle-Boetani J, Wenger JD: Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis* 1994; 13: 623-629.

165. Schuchat A, Zywicki SS, Dinsmoor MJ, Mercer B, Romaguera J, O'Sullivan MJ, Patel D, Peters MT, Stoll B, Levine OS: Risk Factors and Opportunities for Prevention of Early-onset Neonatal Sepsis: A Multicenter Case Control Study. *Pediatrics* 2000; 105: 21-26.
166. Seghaye MC, Heyl W, Grabitz RG, Schumacher K, von-Bernuth G, Rath W, Duchateau J: The production of pro- and anti-inflammatory cytokines in neonates assessed by stimulated whole cord blood culture and by plasma levels at birth. *Biol-Neonate* 1998; 73(4): 220-7.
167. Sheffer-Mimouni G, Mimouni FB, Dollberg S, Mandel D, Deutsch V, Littner Y: Neonatal nucleated red blood cells in infants of overweight and obese mothers. *J Am Coll Nutr* 2007 Jun;26(3):259-63.
168. Shibata H1, Yamane T, Yamamura R, Ohta K, Takubo T, Kamitani T, Hino MJ *Clin Lab Anal: Automatic analysis of normal bone marrow blood cells using the XE-2100 automated hematology analyzer.* 2003;17(1):12-7.
169. Siegel JD, McCracken GH: Sepsis neonatorum. *N Engl J Med* 1981; 304: 642-47.
170. Sills RH, Hadley RA: The significance of nucleated red blood cells in the peripheral blood of children. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1983 Summer;5(2):173-7.
171. Silveira RD, Procianoy RS: Immunoinflammatory prognostic markers of early-onset neonatal sepsis in critically ill preterm newborns. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2012 Mar;24(1):4-5.
172. Simchen MJ, Barkai G, Lusky A, Guetta E: Fetal hemoglobin-expressing nucleated red blood cell frequencies in pregnancies with intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2001 Jan; 21(1):31-5.
173. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD: Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jan;27(1):21-47. doi: 10.1128/CMR.00031-13.
174. Soni S, Wadhwa N, Kumar R, Faridi MM, Sharma S, Chopra A, Singh S: Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Jan;32(1):e33-7. doi: 10.1097/INF.0b013e31826faede.
175. Sonntag W, Wagner MH, Strauss E, Obladen M: Complement and contact activation in term neonates after fetal acidosis. *Arch Dis Child* 1998; 78:125-8.
176. Speer CP, Gahr M, Schröter W: Early diagnosis of neonatal infection. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 133 (1985), 665-68.
177. Speer CP, Gahr M: *Pädiatrie.* 2001; Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

178. Squire E, Favara B; Todd J: Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fetal and nonfetal cases. *Pediatrics* 1979; 64: 60-64.
179. Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M: Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med* 2002 Dec;140(6):407-12.
180. Stachon A1, Holland-Letz T, Krieg M: High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(8):933-8.
181. Stachon A1, Bolulu O, Holland-Letz T, Krieg M: Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock*. 2005 Jul;24(1):34-9.
182. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M.: Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007;11(3):R62.
183. Steurer MA, Berger TM: Massively elevated nucleated red blood cells and cerebral or pulmonary hemorrhage in severely growth-restricted infants--is there more than coincidence? *Neonatology* 2008; 94(4):314-9. doi: 10.1159/000151654. Epub 2008 Sep 11.
184. Stevenson DK1, Verter J, Fanaroff AA, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Donovan EF, Wright LL, Lemons JA, Tyson JE, Korones SB, Bauer CR, Stoll BJ, Papile LA: Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000 Nov;83(3):F182-5.
185. St Geme JW, Murray DL, Carter J: Perinatal bacterial infection after prolonged rupture of amniotic membranes: an analysis of risk and management *J Pediatr* 1984; 104: 608.
186. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Thyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL: Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human Development neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996:72-80.
187. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB et al: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human Development neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996: 63-71.
188. Stoll BJ, Hansen N: Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol* 2003; 27(4): 293-301.

189. Stoll BJ, Hansen NI, Higgins RD, Fanaroff AA, Duara S, Goldberg R, Laptook A, Walsh M, Oh W, Hale E: Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(7): 635-639.
190. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz RA, Rinder HM, Bhandari V: Neutrophil CD64 with Hematologic Criteria for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Am J Perinatol*. 2013 Mar 1.
191. Sysmex: XE 2100 Bedienungsanleitung.
192. Sysmex: Fall des Halbjahres 4/9 Sysmex Xtra 2/2006
193. Sysmex: Die klinische Relevanz der Bestimmung von NRBC im kleinen Blutbild durch die XN-Serie. *Xtra Schweiz*; März 2012; Nr. 10.
194. Tolsma KW1, Allred EN, Chen ML, Duker J, Leviton A, Dammann O: Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity: the ELGAN study. *Arch Ophthalmol*. 2011 Dec;129(12):1555-63. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.319.
195. Trijbels-Smeudels M, de Jonge GA, Pasker-de Jonge PCM, Gerards LJ, Adriaanse AH, von Lingen RA, Kollee LAA: Epidemiology of neonatal group B streptococcal disease in the Netherlands before and after introduction of guidelines for prevention. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92: F271-F276.
196. Tsuji T, Sakata T, Hamaguchi Y, Wang F, Houwen B: New rapid flow cytometric method for enumeration of nucleated red blood cells. *Cytometry* 1999; 37:291-301.
197. Tsaka T, Herkner KR: Infectious diseases in the neonates: diagnosis and monitoring by quantitative plasma polymorphonuclear leukocyte-elastase determination. *J Pediatr* 1990; 117: 968-70.
198. Ulich TR1, del Castillo J, Guo KZ: In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood*. 1989 Jan;73(1):108-10.
199. Vasilcan G, Avasiloiu A, Moscalu M, Dimitriu AG, Stamatin M: Procalcitonin - early marker of neonatal infection. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011 Oct-Dec;115(4):1243-50.
200. Velaphi S, Siegel JD, Wendel GD, Cushion N, Walid M, Sanchez E and PJ: Early-Onset Group B Streptococcal Infection After a Combined Maternal and Neonatal Group B Streptococcal Chemoprophylaxis Strategy. *Pediatrics* 2003; 111: 541-547

201. Vogtmann C: Wertigkeit perinataler Charakteristika für die Diagnostik perinataler Infektionen. Zentr Gynäk 1993; 115: 61-67
202. Wakasugi N, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Rothhut B, Huerta JM, Russo-Marie F and Fiers W: Defective IFN-gamma production in the human neonate. II. Role of increased sensitivity to the suppressive effects of prostaglandin E J Immunol, 1985. 134(1): p. 172-6.
203. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S: Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops Pediatrics 1996; 97: 210-15.
204. Weiss ST1, Segal MR, Sparrow D, Wager C: Relation of FEV1 and peripheral blood leukocyte count to total mortality. The Normative Aging Study. Am J Epidemiol. 1995 Sep 1;142(5):493-8; discussion 499-503.
205. Weisman LE, Stoll BJ, Kueser TJ, Rubio TT, Frank CG, Heimann HS, Subramanian KN, Hankins CT, Anthony BF, Cruess DF: Intravenous immunoglobulin therapy for early-onset sepsis in premature neonates. J. Pediatr 1992; 121(3): 434-443.
206. Wijdicks EF, Silbert PL, Jack CR, Parisi JE: Subcortical hemorrhage in disseminated intravascular coagulation associated in sepsis. Am J Neuroradiol 1994; 15: 763-65.
207. Wintrobe, M., J. Greer, et al: Wintrobe's Clinical Hematology. 2004 Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
208. Wirbelauer J1, Thomas W, Speer CP: Response of leukocytes and nucleated red blood cells in very low-birth weight preterm infants after exposure to intrauterine inflammation. J Matern Fetal Neonatal Med. 2011 Feb;24(2):348-53. doi: 10.3109/14767058.2010.497568. Epub 2010 Jul 7.
209. Wojsyk-Banaszak I, Szczapa J: Reliability of polymorphonuclear elastase for the diagnosis of neonatal sepsis. Przegl Lek. 2002;59 Suppl 1:43-5.
210. Wojsyk-Banaszak I, Szczapa J: Neutrophil elastase level in cord blood and diagnosis of infection in mature and premature neonates. Med Wieku Rozwoj. 2002 Jan-Mar;6(1):13-21.
211. Wolf H, Schaap AHP, Smit BJ, Spanjaard L, Adriaanse AH: Liberal Diagnosis and treatment of Intrauterine Infection Reduces Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Infection but not Sepsis by Other Pathogens. Infect Dis Obstet Gynecol 2000; 8:1 43-150.
212. Wörmann B: Empfehlung der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Stand 8/2014.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Dr. med. Thorsten Orlikowsky, Leiter der Sektion Neonatologie der Uniklinik RWTH Aachen.

Die Überwachung der Studie erfolgte ebenfalls durch Herrn Professor Dr. med. Thorsten Orlikowsky in Zusammenarbeit mit Dr. med. Jan Vagedes, Oberarzt der Abteilung Neonatologie der Filderklinik.

Sämtliche klinischen Daten wurden von mir mit Unterstützung der Ärzte und Schwestern der Abteilung für Neonatologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter der Leitung von Professor Dr. med. Christian Poets erhoben.

Die notwendigen Blutentnahmen wurden von den Ärzten der Abteilung für Neonatologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchgeführt.

Sämtliche Laborwerte wurden durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Professor Dr. Dr. h.c. Hans-Ulrich Häring ermittelt und von mir zusammengetragen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung von Prof. Dr. rer. nat Klaus Dietz, emeritierter Professor, ehemaliger geschäftsführender Direktor des Instituts für medizinische Biometrie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen sowie von Anna Stöcken, studentische Hilfskraft des Fachbereichs Mathematik und Statistik der Universität Konstanz, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. Thorsten Orlikowsky sowie durch Dr. med. Felix Neunhoeffler, Funktionsoberarzt der interdisziplinären Intensivstation der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Konstanz, den 12. Februar 2015

## 8. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer dieser Arbeit Herrn Professor Dr. med. Thorsten Orlikowsky bedanken, der das Thema vorschlug und mir geduldig mit seiner Erfahrung und Wissen zur Seite stand.

Mein weiterer Dank gilt allen Ärzten und Schwestern der Abteilung für Neonatologie für die freundliche Unterstützung bei der Erhebung der Daten sowie dem Leiter der Abteilung, Herrn Professor Dr. med. C. F. Poets.

Für die spontane Unterstützung mit vielen Anregungen, Rat und konstruktiver Kritik im entscheidenden Moment möchte ich mich bei Anna Stöcken und Herrn Dr. med. Felix Neunhoeffler bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Jan Vagedes, für die Mühe, Geduld und Beratung.

Für hilfreiche Diskussionen, Verbesserungsvorschläge und unermüdetes sorgfältiges Lesen dieser Arbeit danke ich ferner Herrn Dr. dent. Dr. med. Martin Roser und Herrn Trutz Rendtorff.

Zum Schluß möchte ich mich noch besonders bei meiner Mutter bedanken, die mir dies alles ermöglicht hat.

## 9. Lebenslauf

---

### Zur Person

---

Nicole Heiner

Geboren am 02.10.1979 in Stuttgart

---

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 04/2013	Assistenzärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Luisenlinik in Bad Dürkheim
05/09 - 03/13	Assistenzärztin in der Kinderklinik Singen
04/08 - 04/09	Assistenzärztin in der Kinderklinik Friedrichshafen
03/08 - 04/08	Assistenzärztin im Hegau Jugendwerk Gailingen
05/07 - 12/07	Studentische Hilfskraft BG Unfallklinik Tübingen
06/00 - 09/00	Tätigkeit als Pflegehilfe im Kreiskrankenhaus Kirchheim u. Teck
04/00 - 05/00	Krankenpflegedienst Kreiskrankenhaus Kirchheim u. Teck
09/99 - 10/99	Krankenpflegedienst Kreiskrankenhaus Nürtingen

---

### Studium

---

04/12/07	<u>2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung</u>
	<u>Praktisches Jahr:</u>
10/06 - 01/07	Wahlfach: Neonatologie
06/06 - 10/06	Innere: Kardiologie, Gastroenterologie
02/06 - 05/06	Chirurgie: Kinderchirurgie, Unfallchirurgie
	<u>Famulaturen:</u>
08/05	Gynäkologie (Raxaul, Indien)
03/05	Allgemeinmedizin (Allgemeinarztpraxis Dr. med. I. Dabrunz, Hagelloch)
08/04	Neonatologie (Tübingen)
03/04	Pädiatrie (Nürnberg)



---

03/03 Physikum

10/00 - 12/07 Studium der Humanmedizin an der  
Eberhard Karls Universität Tübingen

---

### **Schule**

---

1990 - 1999 Ludwig-Uhland-Gymnasium, Kirchheim u. Teck,  
Abitur im August 1999