

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Michael Zemlin

**Identifizierung volatiler organischer Substanzen als potentielle Biomarker von
Chorioamnionitis und von Infektionen bei Frühgeborenen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Thomas Christian Werner
geb. am: 28.03.1985 in Marburg

Tag der Promotion: 18.12.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Zemlin

Prof. Dr. T. Volk

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	vii
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Infektionen bei Früh- und Neugeborenen.....	5
2.2 Frühgeburtlichkeit und Infektionen.....	6
2.3 Geburtsgewicht, Morbidität und Mortalität.....	8
2.4 Frühgeborene auf neonatologischen Intensivstationen.....	9
2.5 Infektion und Sepsis bei Neugeborenen.....	10
2.5.1 Early-Onset- und Late-Onset-Sepsis.....	11
2.5.2 Nosokomiale Infektionen.....	12
2.6 Prädisponierende Risikofaktoren für Infektionen.....	13
2.7 Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen.....	13
2.7.1 Mikrobiologische Untersuchungen.....	15
2.7.2 Molekulargenetische Diagnostik.....	16
2.8 Chorioamnionitis.....	17
2.8.1 Diagnose der Chorionamnionitis.....	21
2.9 Diagnostik mittels Geruchsanalyse.....	22
2.9.1 Die elektronische Nase.....	23
2.9.2 Suche nach einem geeigneten Infektionsparameter und Limitationen.....	24
2.9.3 Neue Möglichkeiten der Infektionsdiagnostik.....	26
2.10 Ziel der Arbeit.....	27
2.10.1 Zielsetzung und Fragestellung.....	27
3 Material, Kollektiv und Methodik.....	28
3.1 Unterteilung der Arbeit.....	28
3.2 Klinischer Abschnitt der Arbeit.....	28
3.2.1 Patienten und Probengewinnung.....	28
3.3 Ethik.....	29
3.4 Datenschutz.....	29
3.5 Einverständnis.....	29
3.6 Einschlusskriterien.....	29
3.7 Ausschlusskriterien.....	30
3.8 Zeitrahmen der Probenasservierung.....	30
3.9 Dokumentation klinischer Parameter.....	30

3.9.1	Infektionsscore.....	31
3.10	Infektionsdiagnostische Ergebnisse.....	32
3.10.1	Antibiotische Therapie.....	35
3.11	Übersicht über die Gewinnung des Biomaterials.....	38
3.11.1	Gewinnung des Probenmaterials.....	38
3.11.2	Verarbeitung des Probenmaterials.....	40
3.12	Tierexperimenteller Abschnitt der Arbeit.....	41
3.12.1	Amnionproben von Schafen.....	41
3.12.2	Behandlungsprotokoll.....	43
3.12.3	Allgemeines Prinzip der eNose.....	43
3.13	Grundlagen der Ionenmobilitätspektrometrie.....	45
3.13.1	Allgemeines Prinzip.....	45
3.13.2	Funktion und Komponenten.....	46
3.14	Versuchsdurchführung zur Analyse der volatilen organischen compounds von Amnionproben.....	49
3.14.1	Versuchsdurchführung zur Analyse der Smellprints.....	49
3.14.2	Analyse der Proben mittels eNose.....	49
3.14.3	Versuchsdurchführung zur Analyse der VOC der Amnionproben.....	50
3.14.4	Vorseparation mittels Multikapillarsäulen.....	52
3.15	Statistik.....	53
3.15.1	Statistische Auswertung der Smellprints der eNose.....	53
3.15.2	Statistische Auswertung der IMS-Ergebnisse von Amnionproben.....	54
3.15.3	Box-and-Whisker-Plots.....	54
3.15.4	Heatmap.....	55
3.15.5	Entscheidungsbaum.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Ergebnisse der eNose an humanen Biomaterial.....	56
4.1.1	Patientenkollektiv des Biomaterials von Frühgeborenen.....	56
4.1.2	Mehrfachentnahmen von Probenmaterial.....	56
4.1.3	Geschlechterverteilung.....	56
4.1.4	Mehrlingsschwangerschaften.....	57
4.1.5	Gruppierung nach Reife.....	57
4.1.6	Gruppierung nach Geburtsgewicht.....	58
4.1.7	Auswertung der Trachealsekretproben durch die eNose.....	58
4.1.8	Auswertung der Stuhlproben durch die eNose.....	59
4.1.9	Auswertung der Urinproben durch die eNose.....	60

4.1.10	Probenkollektiv der Amnionproben von Schafen	61
4.1.11	Ergebnisse der Messungen mittels eNose	61
4.1.12	Gruppe 1 (Ureaplasma parvum).....	61
4.1.13	Gruppe 3 (IL-1 α)	62
4.1.14	Vergleich Gruppen 1, 2 und 3	63
4.1.15	Vergleich Gruppen 1, 2 und 3	64
4.2	IMS Vergleich	65
4.2.1	Ergebnisse der Messungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie	65
5	Diskussion.....	73
5.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	73
5.2	Volatile organische Komponenten (VOC)	73
5.3	2-Methylpentan.....	75
5.4	Patientenkollektiv der Frühgeborenen	76
5.4.1	Entnahmezeitpunkte der Proben und Blutentnahmen	76
5.4.2	Alter und Gewicht der Patienten.....	76
5.5	Auswahl des Probenmaterials	77
5.5.1	E Nose und Smellprints.....	78
5.5.2	Smellprints bei Infektionen von Frühgeborenen	79
5.6	Kollektiv der Amnionproben	79
5.6.1	Änderung des pH-Wertes.....	79
5.6.2	Stärken und Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	80
5.7	Ausblick.....	81
	Abbildungsverzeichnis.....	83
	Tabellenverzeichnis.....	85
6	Literaturverzeichnis	86
7	Publikation und Danksagung.....	106
7.1	Publikation.....	106
7.2	Danksagung	107
8	Lebenslauf.....	108
	Anhang.....	109
	SOP Dokumentation am Krankenbett des Patienten	109
	SOP Probenaufbereitung Labor	110

SOP Absaugen des Trachealtubus.....	111
Auflistung der Amnionproben	111

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CA-125	Cancer-Antigen 125
CFS	Colony stimulating factors
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CVV	Cross-validation value
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
ELBW	Extremely low birth weight
eNose	Elektronische Nase
EOS	Early-onset Sepsis
FIRS	Fetal inflammatory response syndrome
GA	Gestationsalter
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
NICU	Neonatal intensiv care unit (Neugeborenenintensivstation)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
KI	Konfidenzintervall
LBW	Low birth weight
LDA	Linearer Diskriminanzanalyse
LOS	Late-Onset Sepsis
MD	Mahalanobis-Distanz
MCC	Multikapillarsäule
MMP	Matrixmetalloproteasen
NaCl	Natriumchlorid
NAPh	Nabelarterien-pH
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NPV	Negativer prädiktiver Wert

PCR	Polymerase chain reaction
PCT	Procalcitonin
ppbv	Parts per billion by volume
pptv	Parts per trillion by volume
PPV	Positiver prädiktiver Wert
RIP	Reaktand-Ionen-Peak
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SIRS	Systemic inflammatory Response Syndrome
SpM	Schläge pro Minute
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UP	Ureaplasma urealyticum
VLBW	Very low birth weight
VOC	Volatile organic compounds; Volatile organische Komponenten

1 Zusammenfassung

Neugeboreneninfektionen gehören zu den bedrohlichsten Erkrankungen während der Neonatalperiode. Insbesondere die Frühgeburt trägt wesentlich zur perinatalen Morbidität und Mortalität bei.

Die Ätiologie der Frühgeburt ist multifaktoriell. Gründe können sowohl bei der Mutter, als auch beim Kind liegen. Die Chorioamnionitis und pränatale Infektionen sind wesentliche Risikofaktoren. Weltweit stellt die Chorioamnionitis eine der Hauptursachen für frühgeburtsbedingte Morbidität dar. Bei Frühgeborenen unter der 28. SSW ist eine Chorioamnionitis in bis zu 60 % der Fälle nachweisbar. Eine Diagnosesicherung wird häufig erst postnatal histologisch gesichert und führt zu Verzögerung von Interventionen.

Bis heute bereitet sowohl die Identifizierung von Schwangeren mit Chorioamnionitis, als auch von Infektionen bei Früh- und Neugeborenen aufgrund unspezifischer Symptome Schwierigkeiten.

Ein diagnostisches Hilfsmittel könnten die Analysen flüchtiger organischer Substanzen sein und der Erkennung und Überwachung von Erkrankungen dienen.

Flüchtigen organischen Substanzen sind kohlenstoffbasierte, gasförmige Stoffwechselprodukte physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, die in biologischen Proben nachgewiesen werden können.

Technischer Fortschritt erlaubt die zunehmend komplexe Analysen von Gasen und Gerüchen.

Durch Einsatz einer mobilen elektrischen Nase können individuelle Smellprints, vergleichbar mit Fingerabdrücken erstellt und graphisch dargestellt werden, die Ionenmobilitätsspektrometrie erlaubt zusätzlich die Analyse und Detektion von Stoffklassen selbst bei geringsten Konzentrationen.

In dieser Arbeit wurden zur Analyse flüchtiger organischer Verbindungen ein multikapillarsäulen – Ionenmobilitätsspektrometer und eine elektronische Nase verwendet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich einerseits mit der Frage, ob sich flüchtige organisch Verbindungen an Probenmaterial von trächtigen Schafen finden lassen, diese sich in ihrem Profil bei Amnionits differenter Ätiologie unterscheiden und ob ein spezifischer Biomarker der organischen Verbindungen identifiziert werden kann, der als potenzieller diagnostischer Marker für eine Amnionits dienen könnte.

Andererseits mit der Frage, ob sich Bioproben von Frühgeborenen mit und ohne Infektion unterscheiden lassen und welche Bioproben für die Prädiktion einer Infektion geeignet sind.

Ureaplasma parvum ist eines der am häufigsten aus dem Fruchtwasser schwangerer Frauen mit Chorioamnionitis isoliertes Bakterium. Interleukin-1 α nimmt eine Schlüsselrolle im Signalweg von Entzündungsreaktionen ein.

Anhand eines Tiermodells der Chorioamnionitis wurden Profile volatiler organische Substanzen von Amnionproben analysiert. Schafe erhielten intraamniotische Injektionen von Ureaplasma, Interleukin oder Kontrollmedium.

Es gelang einerseits bakterielle Chorioamnionitis von Kontrollen zu unterscheiden, andererseits sogar zwischen einer durch Ureaplasmen und Interleukin- α

induzierten Chorioamnionitis zu differenzieren. Die beste Differenzierung zwischen Amnionitis durch Ureaplasmen gegenüber Interleukin-1 α gelang durch 2-Methylpentan. Dies gelang mit einer Sensitivität von 96% und einer Spezifität von 95%.

2-Methylpentan konnte als möglicher diagnostischer Marker der Chorioamnionitis identifiziert werden. Darüber hinaus variierte die relative Konzentration von 2-Methylpentan mit dem zeitlichen Verlauf der Chorioamnionitis. Die Konzentration von 2-Methylpentan erreichte am Tag 7 nach Instillation von Ureaplasmen ihren Höhepunkt.

2-Methylpentan wurde nur im Fruchtwasser nach Infektion mit Ureaplasmen nachgewiesen, jedoch nicht in Interleukin-1 α induzierter Chorioamnionitis. Hieraus lässt sich folgern, dass 2-Methylpentan zeitabhängig und unabhängig vom Interleukin vermittelten Entzündungsweg mit der Ureaplasma-Infektion assoziiert war.

Dieser Stoff wurde bereits in der Literatur bei einer Vielzahl von inflammatorischen Reaktionen, malignen Neoplasien, oxidativem Stress oder beispielsweise der Sepsis beschrieben.

Durch Analyse des Probenmaterials mittels elektronischer Nase zeigte sich, dass sowohl Amnionflüssigkeit mit Ureaplasmen und Endotoxinen, als auch zwischen Interleukin-1 α und Endotoxin unterschieden werden konnte. Jedoch war der Kreuzvalidierungswert mit $\approx 50\%$ niedrig. Die Größte Differenzierung konnte zwischen Proben mit Ureaplasmen und Interleukin erreicht werden. Hierbei betrug der Kreuzvalidierungswert 76,32%.

456 Bioproben von Frühgeborenen wurden mittels elektronischer Nase analysiert. Diese setzten sich aus Trachealaspirat, Stuhl und Urin zusammen. In dieser Arbeit konnte nicht signifikant zwischen erkrankten und gesunden Patientenkollektiv unterschieden werden. Die größte Differenzierung konnte durch Analyse von Urinproben erreicht werden.

Summary

Neonatal infections are among the most life-threatening diseases during the neonatal period. Premature birth in particular contributes significantly to perinatal morbidity and mortality. The etiology of premature birth is multifactorial. The reasons can be both on the side of the mother and the child. Chorioamnionitis and prenatal infections are significant risk factors.

Worldwide, chorioamnionitis is one of the main causes of premature birth-related morbidity. In premature infants under 28 weeks of gestation, chorioamnionitis can be detected in up to 60% of cases. A diagnosis is often only confirmed postnatally by histology and leads to delays in interventions.

To date, the identification of pregnant women with chorioamnionitis as well as infections in premature and newborn babies has been difficult due to unspecific symptoms.

The analysis of volatile organic substances could be a diagnostic aid for the detection and monitoring of diseases.

Volatile organic substances are carbon-based, gaseous metabolic products of physiological and pathophysiological processes that can be detected in biological samples.

Technical progress allows increasingly complex analysis of gases and odors.

By using a mobile electric nose, individual smellprints, comparable to fingerprints, can be created and graphically displayed. Ion mobility spectrometry also allows the analysis and detection of substance classes even at the lowest concentrations.

In this work, a multicapillary column ion mobility spectrometer and an electronic nose were used to analyze volatile organic compounds.

On the one hand, the present work deals with the question of whether volatile organic compounds can be found in sample material from pregnant sheep, whether they differ in their profile in amnionitis of different etiology and whether a specific biomarker of the organic compounds can be identified, which can be used as a potential diagnostic marker for amnionitis.

On the other hand, with the question of whether biosamples from premature infants with and without infection can be distinguished and which biosamples are suitable for the prediction of an infection.

Ureaplasma parvum is one of the most frequently isolated bacteria from the amniotic fluid of pregnant women with chorioamnionitis. Interleukin-1 plays a key role in the signaling pathway of inflammatory reactions.

Using an animal model of chorioamnionitis, profiles of volatile organic substances from amnion samples were analyzed. The sheep received intraamniotic injections of ureaplasma, interleukin or control medium.

It was possible to distinguish bacterial chorioamnionitis from controls and even between ureaplasma and interleukin induces chorioamnionitis.

The best differentiation between ureaplasma-induced amnionitis and interleukin-1 was achieved with 2-methylpentane. This was achieved with a sensitivity of 96% and a specificity of 95%.

2-Methylpentane could be identified as a possible diagnostic marker of chorioamnionitis. In addition, the relative concentration of 2-methylpentane varied with the time course of chorioamnionitis. The concentration of 2-methylpentane peaked on day 7 after instillation of ureaplasma.

2-Methylpentane was only detected in amniotic fluid after infection with ureaplasma, but not in interleukin-1-induced chorioamnionitis. This suggests that 2-methylpentane was associated with ureaplasma infection in a time-dependent manner and independently of the interleukin-mediated inflammatory pathway.

This substance has already been described in the literature in a variety of inflammatory reactions, malignant neoplasms, oxidative stress or, for example, sepsis.

Analyses of the sample material using an electronic nose showed that amniotic fluid with ureaplasma and endotoxins as well as between interleukin-1 and endotoxin could be distinguished. However, the cross-validation value was low at 50%. The greatest differentiation was achieved between samples with ureaplasma and interleukin. The cross-validation value was 76.32%.

Analyses of 456 biosamples from premature infants using electronic nose, consisting of tracheal aspirate, stool and urine, could not significantly distinguish between diseased and healthy patient in this study. The greatest differentiation could be achieved by analyzing urine samples.

2 Einleitung

2.1 Infektionen bei Früh- und Neugeborenen

Globale Studien zeigen, dass von 7,6 Millionen Todesfällen bei Kindern unter 5 Jahren ca. 64 % auf einer infektiösen Ursache basierten und davon ca. 40 % bei Neugeborenen auftreten (BREIMAN et al., 2021; LIU et al., 2012).

Infektionen stellen trotz des stetigen medizinischen Fortschritts für Frühgeborene weiterhin eine große Gefahr dar und sind verbunden mit hoher Morbidität und Mortalität (BUNDY, NOOR, 2022; PATEL, 2016).

Frühgeborene sind aufgrund vielzähliger Einflüsse und eines abgeschwächten, noch nicht voll ausgebildeten Immunsystems besonders anfällig für Infektionen (KUMAR, BHAT, 2016; LE et al., 2021).

Im Regelfall wächst der Fetus intrauterin in einem sterilen Milieu auf. Die Perinatalperiode ist verbunden mit zahlreichen Möglichkeiten der Exposition gegenüber einer Vielzahl an bakteriellen, mykotischen oder viralen Erregern. Diese können potenziell infektiös sein und das Neugeborene besiedeln und ggf. erkranken lassen. Mögliche Quellen sind die Gebärmutter, der Geburtskanal und ein Aufenthalt auf der Intensivstation. Diese vielfältigen Möglichkeiten der Exposition gegenüber Krankheitserregern führen je nach geografischer Region zu unterschiedlichen Risiken. In Entwicklungsländern ist die neonatale Sepsis eine der häufigsten Gründe für Neugeborenensterblichkeit.

20% der Totgeburten sind auf Infektionen zurückzuführen (s. Abbildung 1)

In Industriestaaten stellt die Sepsis eine der Hauptursachen für einen Aufenthalt auf einer Neugeborenenintensivstation dar (SHITAYE et al., 2010).

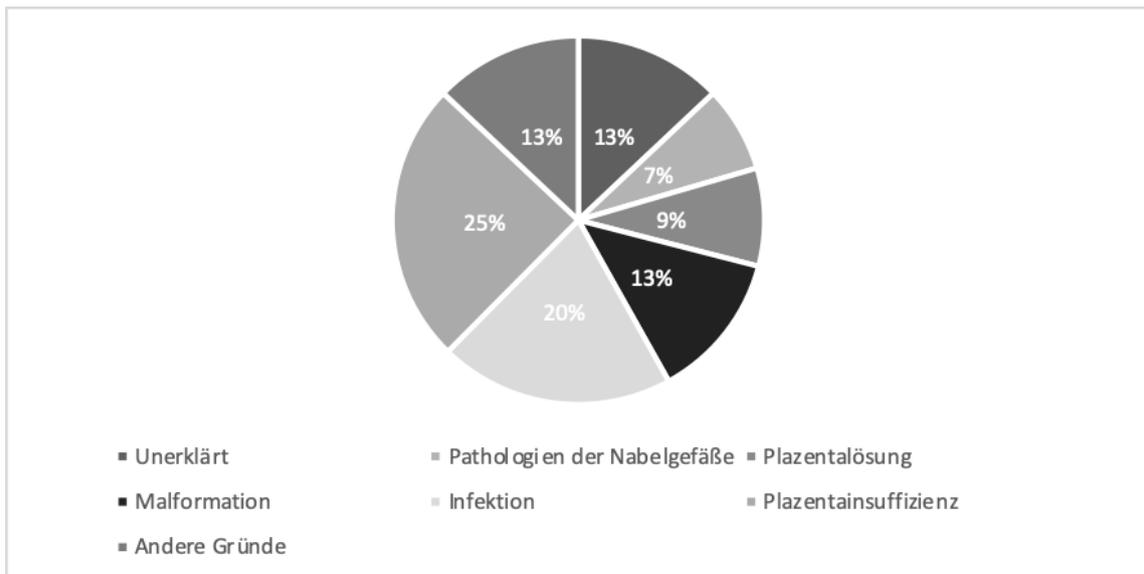


Abbildung 1: Gründe für Totgeburten; modifiziert nach Gravett et al. (GRAVETT et al., 2010)

Die unreife, angeborene Immunfunktion prädisponiert für invasive Infektionen (SIORIKI et al., 2020). Daher gehören Infektionen zu den häufigsten Erkrankungen bei Frühgeborenen (LETOUZEY et al., 2021). Bei Reifgeborenen kann diese unvollständige Ausreifung teilweise durch die Übertragung maternalen, plazentagängiger Immunglobuline kompensiert werden. Die Übertragung dieser Antikörper erfolgt ab etwa 13 Schwangerschaftswochen (SSW) und folgt bis zur Geburt beinahe einem linearen Anstieg, wobei der größte Teil dieser Antikörper im letzten Trimester übertragen wird (PALMEIRA et al., 2012). Frühgeborenen fehlen Teile dieses Nestschutzes (OHLSSON, LACY, 2020). Je frühzeitiger die Entbindung erfolgt, desto ausgeprägter ist dieser Effekt. Daher sind Frühgeborene besonders anfällig für Infektionen (COLLINS et al., 2018; FLANNERY et al., 2021).

Mikrobiologische Studien zeigen, dass 25 % - 40 % der Frühgeburten auf Infektionen zurückzuführen sein. Die Dunkelziffer könnte deutlich höher ausfallen (GOLDENBERG et al., 2000).

2.2 Frühgeburtslichkeit und Infektionen

Die Inzidenz der Frühgeburtenrate liegt in den westlichen Industrieländern bei 5 % - 15 % (DOM et al., 2021; GOLDENBERG et al., 2008). Die Pathogenese dieser Frühgeburtslichkeit ist vielfältig. Getrennt werden kann diese Pathogenese in iatrogene und spontane Frühgeburt (GOLDENBERG et al., 2008).

Bei der Gruppe der iatrogenen Frühgeburten führen mütterliche oder fetale Erkrankungen zur frühzeitigen Entbindung. Andererseits fallen besonders ascendierende genitale Infektionen der Mutter in der Gruppe der spontanen Frühgeburten auf.

Tabelle 1: Pathogenese der Frühgeburtlichkeit (GOLDENBERG et al., 2008)

Iatrogene Frühgeburt	Spontane Frühgeburt
HELLP-Syndrom	Infektionen
art. Hypertension, Präeklampsie	Vorzeitiger Blasensprung
Blutungen	Vorzeitige Wehentätigkeit
Diabetes mellitus	Multiparität
	Blutungen

HELLP: Haemolysis, Elevated Liver enzymes und Low Platelet count

Als Frühgeburt wird eine Geburt vor 37 + 0 SSW definiert (TORCHIN, ANCEL, 2016). Ein Großteil dieser Infektionen verteilt sich auf Frühgeborene (82 %) (VERGNANO et al., 2011). Ein ähnliches Bild zeigt sich in Bezug auf das Geburtsgewicht, wobei 81 % der Infektionen bei einem Geburtsgewicht unter 2500 g auftreten. Bei Early-Onset-Infektionen beträgt die Inzidenz ca. 1,5 % aller Frühgeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (WESTON et al., 2011).

Männliche Neugeborene sind mit 56 % häufiger betroffen, als weibliche. In Deutschland können unter den hauptsächlichen Todesursachen bei Frühgeborenen inflammatorische Erkrankungen inklusive nekrotisierende Enterokolitis (NEC) und die Sepsis subsummiert werden und stellen potenziell vermeidbare Faktoren dar (BELLODAS SANCHEZ, KADROFSKE, 2019; ROSE, PATEL, 2018; STICHTENOTH et al., 2012).

Aufgrund der weiterhin hohen Mortalität, Morbidität, den sozioökonomischen Folgen und der steigenden Inzidenz von Frühgeborenen bedarf das Thema der Infektionen bei Frühgeborenen weiterer Aufmerksamkeit und Forschung (BARFIELD, 2018; CLEMENTS et al., 2007).

Neben der steigenden Inzidenz von Frühgeburtlichkeit sorgten weiterhin der medizinische Fortschritt und die damit verbundenen erhöhten Überlebenschancen für ein immer größer werdendes Risikokollektiv für Infektionen in der Neonatologie und ein zunehmendes Interesse in der frühzeitigen, nichtinvasiven Diagnostik von Infektionen (CHEONG et al., 2020; ZEA-VERA, OCHOA, 2015).

Im europäischen Vergleich der Frühgeburtsraten nimmt Deutschland 2011 mit 9 % die Spitzenposition ein. Während diese Zahl in den letzten Jahren auf diesem Niveau relativ stabil stagniert, nimmt die Zahl der Frühgeburten unter 28 SSW zu.

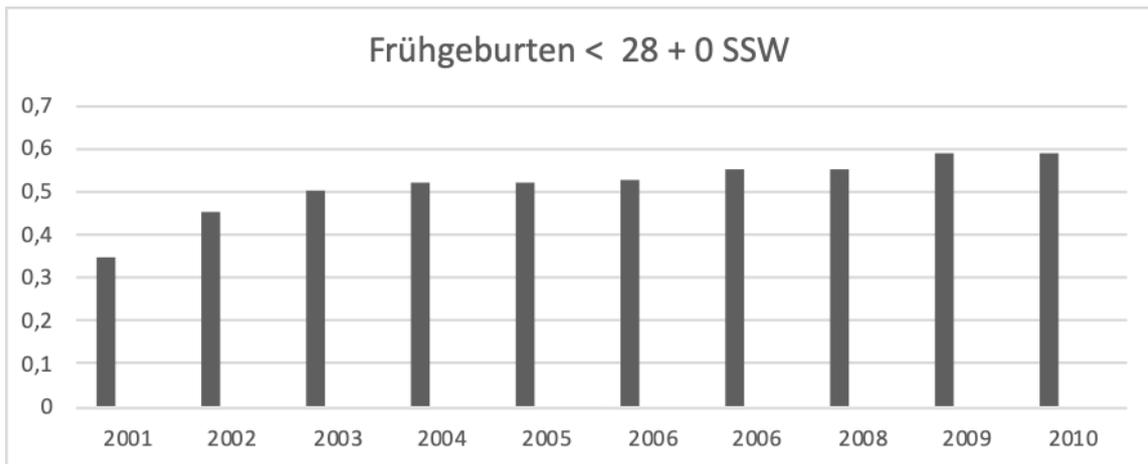


Abbildung 2: Frühgeburtenrate in % der Jahre 2001 bis 2010 in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt)

Als auslösende Faktoren werden unter anderem ein Anstieg des mütterlichen Alters, der Prävalenz des Diabetes mellitus und sozioökonomische Faktoren postuliert (KUREK EKEN et al., 2016).

2.3 Geburtsgewicht, Morbidität und Mortalität

Die neonatale Mortalität ist definiert als Anzahl der in den ersten 28. Lebenstagen verstorbenen Neugeborenen pro 1000 Lebendgeborenen. Aufgrund des medizinischen Fortschritts hat die Mortalität in den letzten Jahren stetig abgenommen und lag in Deutschland im Jahre 2014 bei 3,2 %.

In keiner anderen Lebensphase ist die Mortalität so hoch wie in der Neugeborenenperiode. Einen wichtigen Faktor für diese hohe Mortalität stellt das Gestationsalter des Neugeborenen und das damit verknüpften geringen Geburtsgewicht dar. Erwartungsgemäß korreliert die Schwangerschaftsdauer stark mit dem Geburtsgewicht (FENTON et al., 2013). Untergewichtige Neugeborene sind besonders in der Neonatalphase und im weiteren Verlauf ihres Lebens gefährdet (LAINA, STELLOS, 2018; MEYER et al., 2021; SPRACKLEN et al., 2017; TIAN et al., 2019).

Neben dem Gestationsalter ist das Geburtsgewicht ein weiterer wichtigerer Faktor für die Länge der Verweildauer im Krankenhaus (KUREK EKEN et al., 2016).

0,8 - 1,5 % der Neugeborenen in Deutschland haben bei Geburt ein Gewicht von < 1500 g, 0,3-0,6 % der Neugeborenen haben zum Zeitpunkt der Geburt ein Gewicht < 1000 g (JORCH, 2010; MAIER, 2011).

Tabelle 2: Definition der Geburtsgewichte

Geburtsgewicht	Definition
< 2.500 g	untergewichtige Neugeborene „low birth weight infants“ LBW
< 1.500 g	sehr untergewichtige Neugeborene „very low birth weight infants“ VLBW
< 1.000 g	extrem untergewichtige Neugeborene „extremely low birth weight infants“ ELBW

Als Risikofaktoren für ein geringes Geburtsgewicht gelten Mehrlingsschwangerschaften, ein Abstand der Schwangerschaftsfolge unter zwei Jahren, eine Schwangerschaft im niedrigen Lebensalter und Tabakkonsum (HEREDIA-OLIVERA, MUNARES-GARCIA, 2016). Weitere Studien aus den USA zeigen, dass niedriges Geburtsgewicht mit Luftverschmutzung während der Schwangerschaft assoziiert ist (LAURENT et al., 2016).

2.4 Frühgeborene auf neonatologischen Intensivstationen

Aufgrund von Unreife benötigen Frühgeborene oft medizinische Betreuung auf einer neonatologischen Intensivstation („neonatal intensiv care unit“, NICU), um ihre unreifen Funktionen (z.B. Wärmehaushalt, Atmung und Ernährung) adäquat unterstützen und therapieren zu können (CROOP et al., 2020).

Während dieses, nicht selten länger als 100 Tage dauernden Aufenthaltes, sind sehr unreife Frühgeborene einer Vielzahl von Umwelteinflüssen, Stressoren und invasiven Interventionen ausgesetzt (NIST et al., 2020). In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Neugeborenen auf einer NICU über 3000 Maßnahmen dokumentiert worden sind. Der Großteil der Patienten hatte ein Gestationsalter (GA) unter 31 Wochen. Bei einem Frühgeboren (GA 23 SSW) wurden 488 Maßnahmen während des stationären Aufenthaltes dokumentiert (BARKER, RUTTER, 1995). Zu den häufigsten Prozeduren gehörte die Blutabnahme (56 %), gefolgt von endotrachealen Absaugvorgängen. Durch jede dieser invasiven Maßnahmen werden natürliche oder mechanische Barrieren überwunden, durchbrochen und das Risiko für Infektionen erhöht (LEISTNER et al., 2013).

Aus der Umgebung kommende Infektionen werden unter horizontalen Infektionen subsummiert. Diese nosokomialen Infektionen kommen bei bis zu 20 % der Neugeborenen vor. Dies entspricht einer Inzidenz von 8,8 / 1000 Krankenhaustagen (OLSEN et al., 2009; SCHRÖDER et al., 2015).

Jedes Neugeborene auf der NICU wird im Schnitt pro Schicht 78 mal berührt, 55,4 % der Berührungen entfallen auf die versorgende Pflegekraft mit weiterem Risiko der Keimübertragung (COHEN et al., 2003).

2.5 Infektion und Sepsis bei Neugeborenen

Trotz großer medizinischer Fortschritte in der Neugeborenenversorgung stellt die Sepsis eine große Gefahr für das Neugeborene dar (HADFIELD, CANTEY, 2021; HALIS et al., 2016; ODABASI, BULBUL, 2020). Daten aus den USA zeigen, dass sich zwischen 1995 und 2002 die Inzidenz der Sepsis von 4,5 zu 9,7 Fällen pro 1000 Neugeborenen beinahe verdoppelt hatte (HARTMAN et al., 2013). Unterschiedliche Definitionen erschweren die Vergleichbarkeit von Ergebnissen (WYNN et al., 2014). Während es bei Erwachsenen eine klare Definition der Sepsis vorhanden ist, fehlt eine internationale Definition der neonatalen Sepsis (BRACHT et al., 2019; WYNN et al., 2014). Neugeborene weisen im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen Besonderheiten auf.

Häufig gelingt es nicht, eine klare Eintrittspforte des Erregers zu eruieren und initial zeigt sich eine unspezifische Symptomatik. Diese unspezifische, systemische Entzündungsreaktion entspricht einem „Systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) (JUNG et al., 2020). 1999 startete ein Pilotprojekt zur Erfassung, Vergleichbarkeit und Bereitstellung von Vergleichsdaten. Aus diesem entwickelte sich ein Surveillance System für nosokomiale Infektionen (Neo-KISS) (GEFFERS et al., 2008). Dieses Surveillance System definiert für Neugeborene < 1500 g in Tabelle 3 gezeigte Kriterien.

Tabelle 3: SIRS-Kriterien nach Neo-KISS in Anlehnung an Garner (GARNER et al., 1988)

SIRS-Kriterien nach Neo-KISS
<p style="text-align: center;">ALLE folgenden Kriterien:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Behandelnder Arzt beginnt eine geeignete antimikrobielle Therapie für die Behandlung der Sepsis für mind. 5 Tage2. Kein Erregernachweis in der Blutkultur oder nicht getestet3. Keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle
<p style="text-align: center;">UND zwei der folgenden Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Fieber (> 38°C) oder Temperaturinstabilität oder Hypothermie▪ Tachykardie (> 200/min) oder neu/vermehrte Bradykardien (< 80/min)▪ Verlängerte Rekapillarisierungszeit (> 2 Sekunden)▪ Neu aufgetretene oder vermehrte Apnoe(en) (> 20 Sekunden)▪ Unerklärte metabolische Azidose▪ Neu aufgetretene Hyperglykämie (> 140 mg/dl)▪ Anderes Sepsiszeichen, laborchemische Zeichen, erhöhter O₂-Bedarf

Je nach Manifestationsform kann man eine Sepsis in schwere Sepsis, septischen Schock oder das Multiorganversagen unterteilen (RANDOLPH, MCCULLOH, 2014; WYNN, 2016). Die Inzidenz beträgt 1-5 pro 1000 Lebendgeborenen (CORTESE et al., 2016). Trotz der eher geringen Inzidenz ist sie eine Erkrankung mit hohem Risiko für das

Neugeborene (GERDES, 2004). Dies ist unter anderem auf das noch nicht vollständig ausgereifte Immunsystem zurückzuführen. Während beim Fetus die Reaktion auf eine Infektion noch gering ausfällt und mit spontanen Aborten einhergehen kann, verschiebt sich in der Neugeborenenphase die Infektionsreaktion in Richtung einer stärkeren proinflammatorischen Reaktion (YGBERG, NILSSON, 2012).

Durch die Geburt wird das Neugeborene aus einem im Regelfall keimarmen intrauterinen Milieu schlagartig mit komplexen mikrobiologischen Systemen konfrontiert (RANDOLPH, MCCULLOH, 2014). Frühgeborene haben unter anderem aufgrund ihres unvollständigen Immunsystems die höchste Inzidenz und Mortalität über alle Altersgruppen hinweg. Daten aus den USA zeigen, dass 36 % der vor Abschluss der 28 SSW geborenen Frühgeborenen während ihres stationären Aufenthaltes unter mindestens einer Episode der Bakteriämie leiden (WYNN, 2016). Autopsien an verstorbenen Frühgeborenen belegen die hohe Zahl an klinisch apparenten Infektionen (HODGMAN et al., 2003). Führend sind Infektionen, gefolgt von respiratorischen Erkrankungen oder intraventrikulären Blutungen (BARTON et al., 1999). Neugeborene mit geringem Geburtsgewicht und Infektion haben ein erhöhtes Risiko einer längeren Sauerstoffbehandlung und einer längeren Krankenhausverweildauer als Patienten ohne Infektion (NG et al., 2004b; STOLL et al., 2002).

2.5.1 Early-Onset- und Late-Onset-Sepsis

Als Early-Onset-Sepsis (EOS) wird eine Sepsis mit Auftreten innerhalb der ersten 72 Stunden postpartal bezeichnet. Häufig treten Symptome bereits innerhalb der ersten 24 Lebensstunden auf (JOHNSON, MESSIER, 2016).

Eine EOS wird meist durch bakterielle, vertikale Übertragung vor oder während der Geburt hervorgerufen. Diese Übertragung findet meist bei Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft statt. Das Kind kann bereits vor Auftreten der Wehen durch aufsteigende Keime infiziert werden oder durch direkten Kontakt mit Mikroorganismen unter der Geburt. Die Inzidenz beträgt 1-2 pro 1000 Lebendgeborene und erreicht eine Mortalität von 3 % bei Neugeborenen und bis zu 16 % bei Frühgeborenen (CORTESE et al., 2016).

Risikofaktoren der EOS stellen unter anderem eine Besiedelung oder Infektion der Mutter mit Gruppe-B-Streptokokken, eine Chorioamnionitis, mütterliche Temperaturen $> +38,0^{\circ}\text{C}$ oder ein Blasensprung > 18 Stunden vor Geburt dar (SCHUCHAT et al., 2000). Zum häufigsten Erregerspektrum gehören Gruppe-B-Streptokokken (43 %), gefolgt von *E. coli* (29 %) (STOLL et al., 2011). Bei Frühgeborenen mit extrem niedrigem Geburtsgewicht konnten besonders Listerien, Klebsiellen oder bei nosokomialen Infektionen Koagulase-negative Staphylokokken gefunden werden (KLINGER et al., 2009).

Gruppe-B-Streptokokken entstammen meist aus vaginaler Besiedelung der Mutter. Problematisch ist hierbei besonders die Unfähigkeit von 10 % der Gruppe-B-Streptokokkenträgerinnen, plazentagängige Immunglobulin G (IgG) Antikörper zu bilden oder diese an den Fetus zu übertragen (MAIER, 2011). Gruppe-B-Streptokokken können nicht nur nach erfolgtem Blasensprung den Feten infizieren, sondern auch durch intakte Membranen einwandern.

Klinisch zeigen sich häufig respiratorische Symptome mit Apnoephasen. Führend bei der EOS sind Sepsis und Pneumonie.

Deutlich häufiger als die EOS tritt die Late-Onset-Sepsis (LOS) auf (10:1) und nimmt in ihrer Häufigkeit bei Frühgeborenen in den letzten Jahren zu (BIZZARRO et al., 2005). Die LOS wird als Auftreten einer Sepsis später als im Alter von 72 Stunden definiert. Ein typisches Beispiel einer LOS stellen die Typ B-Streptokokken-Meningitis dar. Die Inzidenz ist invers zum Reifegrad (DONG, SPEER, 2015).

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens einer Sepsis wird die EOS oder LOS unterschieden. Diese liegt darin begründet, dass sich sowohl das Erregerspektrum, als auch der Infektionsweg unterschiedlich präsentieren (SINGH et al., 2022).

2.5.2 Nosokomiale Infektionen

Nosokomiale Infektionen sind definiert als Infektionen, welche vor einer Krankenhausaufnahme weder vorhanden, noch in der Inkubationsphase waren. Erst im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder ambulanten Behandlung kommt es zu einer lokalen oder systemischen Reaktion auf in diesem Zeitraum erworbene Erreger. Aufgrund von längerer Krankenhausverweildauer und invasiven Prozeduren sind Frühgeborene häufiger betroffen (STOLL et al., 1996).

Meist findet hier eine Übertragung durch die Hände von medizinischen Personal statt, typischerweise durch Koagulase-negative Staphylokokken. Sie gehören zu residenten oder transienten Flora der Haut oder Schleimhaut und können über horizontale Transmission übertragen werden. Sie stellen eine Quelle für Koagulase-negative Staphylokokken-Sepsis dar (COSTA et al., 2004). Eine schwedische Studie zeigt, dass das Risiko einer LOS in Zusammenhang mit dem Vorhandensein von zentralen Zugängen und invasiver Beatmung steht (SAMUELSSON et al., 2014). Typischerweise zeigten sich hier eine Sepsis, Pneumonie oder Meningitis (PAOLUCCI et al., 2012).

Multifaktorielle Ursachen können zu einer Gefährdung durch nosokomiale Infektionen bei Früh- und Neugeborenen auf einer neonatologischen Intensivstation führen. Auf der Seite des Früh- und Neugeborenen besteht häufig die bereits erwähnte Unreife unterschiedlicher Komponenten des Immunsystems. Andererseits werden durch invasive Prozeduren im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung natürliche Barrieren

durchbrochen (z.B. Atemwege oder Haut) oder unphysiologische Bedingungen geschaffen (invasive Beatmung, Drainagen, Katheter) (SIMON et al., 2021).

2.6 Prädisponierende Risikofaktoren für Infektionen

Die Risikofaktoren für Infektionen können ein vorzeitiger Blasensprung (> 18 Stunden vor Geburt), Fieber unter der Geburt (> +38,0°C axillär), Einsetzen von vorzeitigen Wehen, eine Chorioamnionitis, erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) der Mutter (> 20 mg/l) oder der Nachweis von Bakterien sein (PUOPOLO et al., 2011; SU et al., 2014; VAN DE LAAR et al., 2009). Auch ein mütterliches Alter über 35 Jahre oder dunkle Hautfarbe sind prädisponierende Faktoren für eine Infektion (HEADLEY, 2004; KORTEKAAS et al., 2020). Die mütterliche Einnahme von Kortikosteroiden kann ebenfalls eine Infektion begünstigen. Man kann jedoch bei einer symptomatischen Mutter nicht zwangsläufig auf eine ebenfalls symptomatisches Neugeborenes schließen (SIRIWACHIRACHAI et al., 2014).

2.7 Infektionsdiagnostik bei Neugeborenen

Die frühzeitige Diagnosestellung einer Sepsis wird aufgrund unspezifischer Symptome des Neugeborenen erschwert (HALIS et al., 2016). Wegen des zum Teil raschen progredienten Verlaufs ist zeitnahes Handeln unerlässlich. Bei nicht adäquater Therapie ist ein Übergang zum septischen Schock innerhalb weniger Stunden möglich (NG et al., 1997). Einen ersten Hinweis auf eine beginnende Sepsis kann die Mitteilung über das „schlechte Aussehen“ des Neugeborenen einer erfahrenen Intensivpflegekraft sein (MAIER, 2011). Klinische Symptome können sehr vielgestaltig sein, abhängig von der Virulenz des Erregers: Temperaturlabilität (diese kann sowohl erhöht, normal, als auch erniedrigt sein), neurologische Auffälligkeiten (Apathie, Hyperexzitabilität), Herz-Kreislauf-Insuffizienz (kalte Akren, Verlängerung der Rekapillarisierungszeit > 2 Sekunden, marmorierte Haut, Tachykardie, Bradykardie, arterielle Hypotonie), gastrointestinale Symptome (Erbrechen, aufgeblähtes Abdomen, Trinkschwäche), Beeinträchtigung der Atmung (Stöhnen, Apnoe, Dyspnoe, Tachypnoe) sowie metabolische Funktionsstörungen mit Basendefizit (CORTESE et al., 2016; NG, 2004; NG, LAM, 2006).

Tabelle 4: Klinische Befunde und Symptome einer möglichen Infektion/ Sepsis (STEFANOVIC, 2011)

Herz, Kreislauf	Tachykardie, Bradykardie, arterielle Hypotension, verlängerte Rekapillarierungszeit, Zentralisation
Niere	Oligurie, Anurie
Leber	Ikterus, Hepatomegalie
ZNS	Hyperexzitabilität, Zitterigkeit, Lethargie, Koma, Krampfanfälle
Haut	Zyanose, kalte Akren, Rötungen um Einstichstellen, Abszesse
Atmung	Stöhnen, thorakale Einziehungen, Dyspnoe, Tachypnoe, Nasenflügeln, erhöhter Sauerstoffbedarf
Magen-Darm-Trakt	Erbrechen, Durchfall, Blutungen, Trinkunlust, verzögerte Magen-Darm-Passage

Mit Hilfe von Laboruntersuchungen können aus der großen Bandbreite der unspezifischen Symptome Patienten mit Infektionen identifiziert werden.

Infektionsverdächtige Parameter sind in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 5: Pathologische Befunde bei Infektionsverdacht, modifiziert nach Maier (Maier, 2011)

Differenzialblutbild	Leukozytenzahl: > 30.000 / μ l, < 4.000/ μ l Neutrophile: < 1.500 μ l I/T-Quotient: > 0,2
CRP	> 1mg / dl
IL-6	> 30 pg / ml

Hierbei beschreibt der I/T-Quotient das Verhältnis von unreifen neutrophilen Granulozyten zur Anzahl reifer neutrophiler Granulozyten im Differentialblutbild. Somit kann die Ausprägung einer möglichen Linksverschiebung abgebildet werden (I = immature/unreif; T = total/gesamt).

In Bezug auf die Infektionsdiagnostik haben diese Laborparameter unterschiedliche Wertigkeiten. Zu Beginn einer bakteriellen Infektion haben Interleukine (IL) die höchste Sensitivität (90 %) und sind bereits frühzeitig im Plasma messbar (MESSER et al., 1996). IL erreichen nach 24 bis 48 Stunden ihre maximale Konzentration und fallen rasch ab.

C-reaktives Protein (CRP) als Akute-Phase-Protein hingegen, steigt erst mit Verzögerung von 12 bis 24 Stunden nach Infektbeginn an, stellt aber einen guten Verlaufparameter dar (NG, 2004; NG et al., 1997). Hier beträgt die Sensitivität nur 40 % bei hoher Spezifität von 90 % (KALLMAN et al., 1999). CRP eignet sich zusätzlich zur Überprüfung des Therapieerfolges. Steigt das CRP beispielsweise ein bis zwei Tage nach eingeleiteter Therapie weiterhin an und es zeigt sich klinisch keine Besserung der Symptomatik, sollte das Antibiotikaregime überdacht werden. Die Höhe des CRP dient ebenfalls zur Abschätzung der antibiotischen Therapiedauer (BROWN et al., 2020; KHAN, 2019; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR, CHILDREN'S, 2012; QUADIR, BRITTON, 2018).

Procalcitonin (PCT) gehört ebenfalls in die Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Obwohl seine physiologische Funktion noch nicht vollständig geklärt ist, ist PCT spezifischer und sensitiver für eine bakterielle Infektion als CRP und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen bakteriellen oder viralen Infektionen (ENGUIX et al., 2001). Höchste Konzentrationen von PCT werden bei bakteriell bedingter Sepsis gesehen. Hier kann es zu einem Anstieg im Piktogramm-Bereich bis zu Plasmawerten im Nanogramm-Bereich kommen (KORDEK et al., 2016; VAN ROSSUM et al., 2004).

Bedacht werden muss der physiologische Anstieg des PCT nach der Geburt. Bei gesunden Neugeborenen kommt es nach wenigen Tagen zu einem Absinken des PCT (KORDEK et al., 2016). Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein einziger Infektionsmarker alle Eigenschaften eines idealen Infektionsmarkers besitzt (ARNON et al., 2005; NG et al., 2004a; RESCH et al., 2003). Aktuell erreicht man die höchste Sensitivität (im Rahmen der Infektionsdiagnostik) durch die Kombination der zur Verfügung stehenden Parameter CPR und IL-6 (LABORADA et al., 2003).

2.7.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Ergänzt werden muss die Infektionsdiagnostik durch mikrobiologische Untersuchungen. Hierzu eignen sich Hautabstriche (Ohr, Nabel, Brust), Trachealsekret, Urinkulturen, Liquor oder Blutkulturen. Aktuell stellt die Blutkultur den Goldstandard der Sepsisdiagnose dar (WYNN, 2016). Ein erfolgreicher Erregernachweis in Blut (oder Liquor) ist beweisend für eine Sepsis. Jedoch schließt ein unauffälliger Befund in der Blutkultur eine Sepsis nicht aus. Eine bereits vor Entnahme eingeleitete antibiotische Therapie, fehlerhafte Entnahme oder intermittierende Bakteriämie stellen mögliche Ursachen für negative Ergebnisse der Blutkultur dar. Trotz Weiterentwicklungen in der technischen Analyse von Blutkulturen gelingt ein Erregernachweis selten (BROMIKER et al., 2020).

Beispielsweise durch Einsatz von Massenspektren zur Keimidentifikation mittels Matrix-Assisted Laser Desorption – Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) kam es zu einer deutlichen Prozessbeschleunigung (ROBERT et al., 2021).

In rund 10 - 20 % einer klinisch ausgeprägten Sepsis findet sich eine positive Blutkultur (SINGH et al., 2020). Die Sensitivität der Blutkulturen wird durch mütterliche Behandlung mit Antibiotika, oder zu geringe Probenvolumina negativ beeinflusst (PAOLUCCI et al., 2012). Es erscheint logisch, dass eine Erhöhung des Probenvolumens zu verbesserten Detektionsraten führt. In der klinischen Praxis jedoch sind ein Großteil der Proben aufgrund zu geringer Probenvolumina nicht aussagekräftig und aufgrund der Anatomie und Physiologie des Frühgeborenen ist das abzunehmende Blutvolumen limitiert (CONNELL et al., 2007; ISAACMAN et al., 1996). Im Falle einer Bakteriämie mit weniger als vier koloniebildenden Einheiten / ml wird ein Blutvolumen von einem ml für eine akzeptable Sensitivität empfohlen (POLIN, , 2012; SCHELONKA et al., 1996).

Zum Ausschluss eines Infektfokus aus dem Harntrakt, muss zur Diagnosesicherung Urin gewonnen werden. Prädisponierend sind hierbei besonders urogenitale Fehlbildungen. Die Mehrheit der Kinder mit Harnwegsinfektionen weist jedoch eine regelrechte Anatomie auf (RUANGKIT et al., 2016).

Bei beatmeten Patienten bietet sich die mikrobiologische Untersuchung des Trachealsekrets an. Wenige Tage nach der Geburt wird die Lunge mit Keimen besiedelt. Eine Studie konnte zeigen, dass bei beatmeten Frühgeborenen (GA < 34 SSW, Gewicht zwischen 500 – 1250 g) hauptsächlich folgende Keime dominieren: Staphylococcus und Ureaplasma parvum (MOURANI et al., 2011).

In vielen Kliniken hat sich zur Vervollständigung der mikrobiologischen Diagnostik ein „Septic workup“ etabliert. Typischerweise beinhaltet dieses eine Blutuntersuchung, Blutkulturen, Urinkulturen und einer Lumbalpunktion (JOHNSON et al., 1997; SIMONSEN et al., 2014).

2.7.2 Molekulargenetische Diagnostik

Molekulargenetische Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden bereits seit Jahren erfolgreich bei der Identifizierung von Viren eingesetzt (JARROM et al., 2022; MEYER et al., 2017; SCHINDLER et al., 2017).

Mittels Sequenzierung von 16S-rRNA Genfragmenten ist eine bakterielle Diagnostik möglich (JORDAN, DURSO, 2000; NEL VAN ZYL et al., 2022). 16S-rRNA ist eine allen Bakterien gemeinsame Region in deren DNA, dessen Nachweis mittels 16S-rDNA-PCR identifiziert werden kann.

Studien zeigten, dass die Sensitivität und Spezifität der bakteriellen PCR Untersuchungen höher waren als jene von Blutkulturen (WU et al., 2007). Zudem liegen Ergebnisse

von PCR-Untersuchungen schneller vor, als konventionelle Kulturmethoden (MIDAN et al., 2016). Teilweise gilt die PCR bereits als Goldstandard beim Nachweis der durch Herpes-simplex-Viren ausgelösten Neugeborenenmeningitis (JORDAN, DURSO, 2000). Nachteilig ist jedoch der enorme apparative Aufwand, der fehlende Hinweis auf mögliche Antibiotikaempfindlichkeiten und die fehlende Differenzierung zwischen abgetöteten und lebenden Erregern, da durch diese molekulargenetischen Untersuchungen auch das Genom von bereits abgestorben Bakterien identifiziert werden kann. Ein Therapie-monitoring ist hierdurch limitiert (REIER-NILSEN et al., 2009).

2.8 Chorioamnionitis

Ein Chorioamnionitis (CA) stellt eine akute intrauterine Inflammation oder Infektion der Amnionhöhle samt Inhalt (fetale Membranen und Fruchtwasser) dar und führt zu einer Gefährdung von Mutter und Kind (KIM et al., 2015; REDLINE et al., 2003). Dies ist eine der Hauptursachen für Frühgeburt und assoziiert mit erhöhter Morbidität (GALINSKY et al., 2013; GANTERT et al., 2010). Die CA kann bei dem exponierten Fetus zu einer Sepsis, einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPB) oder beispielsweise einer periventrikulären Leukomalazie (PVL) führen (LEVITON et al., 1999; SCHRAG et al., 2006). In rund 1 % - 4 % aller Schwangerschaften kommt es zu einer CA (GIBBS, DUFF, 1991). Im Regelfall ist die Amnionhöhle steril und der Fetus ist durch die ihn umgebenden Eihäute vor Erregern geschützt. Die Isolierung von Bakterien stellt somit einen pathologischen Befund dar (AGRAWAL, HIRSCH, 2012).

Die vollständige Pathogenese der CA ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Es scheint bereits im Frühstadium einer Schwangerschaft zu einer asymptomatischen Besiedelung mit Bakterien zu kommen. Diese stumme Infektion könnte unter Umständen die weitere Schwangerschaft durch Inhibierung der plazentaren Angiogenese beeinflussen (KRAMER et al., 2005).

Intrauterine Infektionen wurden als eine der Hauptursachen für eine Frühgeburt identifiziert, vor allem bei einem Gestationsalter unter 30 SSW. Der Anteil Frühgeborener bei vorliegender CA steigt auf bis zu 80 % bei Abnahme der Schwangerschaftsdauer unter 28 SSW an (LAHRA et al., 2009). Ein vorzeitiger Blasensprung kommt bei ca. 15 % der Geburten vor.

Durch den vorzeitigen Blasensprung kann die Schutzfunktion der Eihäute nicht mehr aufrechtgehalten werden. Nun besteht die Gefahr, dass es zu einer Aszension von vaginalen Keimen kommen kann. Keime der vaginalen Flora können sich nun intrauterin ansiedeln und sich massenhaft im Fruchtwasser vermehren. Da der Fetus vollständig von Fruchtwasser umgeben ist und intrauterin Atembewegungen durchführt, kommt es laufend zur Aspiration von infiziertem Fruchtwasser. Durch den folgenden Kontakt der

fetalen Lungen mit diesem Fruchtwasser ist der Fetus gefährdet, oben genannte Symptome (Sepsis, BPD) zu entwickeln.

Bereits 24 Stunden nach erfolgtem Blasensprung sind 4 % der Kinder infiziert, nach 48 Stunden sind es 20 % (ROMERO et al., 2014; ROMERO et al., 2006; ROMERO et al., 1989b). Seltener tritt eine CA bei intakter Amnionhöhle auf. Hierbei ist eine hämatogene/tranplazentare Infektionsinduzierung möglich (TITA, ANDREWS, 2010b). 12,8 % der Patientinnen mit vorzeitigen Wehen und intakter Amnionhöhle hatten eine Keimbesiedelung dieser Höhle (ROMERO et al., 2003). Als häufigster Erreger bei dieser Art der Transmission, ausgehend von einer maternalen Bakteriämie oder Sepsis, wird *Listeria monocytogenes* gefunden (SILVER, 1998). Auch im Rahmen der Pränataldiagnostik kann es iatrogen (z.B. im Rahmen einer Amniozentese) zu einer Keimverschleppung in die Amnionhöhle kommen (GOLDENBERG et al., 2000). Aufsteigende bakterielle Invasionen scheinen aber der häufigste Weg der Infektion zu sein. Prinzipiell können alle bakteriellen Keime eine CA induzieren. Organismen, welche häufig mit der CA verbunden sind, haben eine eher geringe Virulenz (einschließlich *Ureaplasma species* und *Mycoplasma species*) (GANTERT et al., 2010).

Es gibt zwei Spezies von Ureaplasmen, welche den Menschen kolonisieren können. Hierzu gehört *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum*. Von diesen beiden Arten gehört *Ureaplasma parvum* zu den am häufigsten identifizierten Keimen im oberen Genitaltrakt von Frauen und bei Frühgeborenen (KALLAPUR et al., 2011). Mit einer Besiedelungsrate von 40 - 80 % gehören Ureaplasmen zur normalen Genitalflora und wird u. a. durch sexuellen Kontakt übertragen (CASSELL et al., 1993; ESCHENBACH, 1993). Bei Schwangeren mit vorzeitigen Wehen und intakter Fruchtblase wurde am häufigsten *Ureaplasma urealyticum* isoliert (GOLDENBERG et al., 2000). Die Prävalenz von Ureaplasmen bei Frauen mit vorzeitigem Blasensprung reicht bis zu 22 % (VISCARDI, 2010). Ureaplasmen sind atypische Bakterien. Sie lassen sich aufgrund einer fehlenden Zellwand nicht nach Gramfärbung anfärben, und nutzen Harnstoff als eine Energiequelle und sind abhängig vom Stoffwechsel des Wirts (GLASS et al., 2000).

Häufig findet man zudem β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B, Enterokokken, gramnegative Stäbchen (besonders *E. coli*) und Anaerobier. Zu welcher Zeit der Schwangerschaft eine Besiedelung der Amnionhöhle stattfindet, ist nicht abschließend geklärt. Im Rahmen von Chromosomenanalysen zwischen 15 und 18 SSW konnte in Proben von Amnionflüssigkeit bei schwangeren Frauen bereits *Ureaplasma urealyticum* gefunden werden. Der Großteil dieser Frauen entbunden ihrer Kinder um die 24 SSW (GOLDENBERG et al., 2000).

Die Pathogenese des Amnioninfektionssyndroms zeigt sich häufig wie folgt:

Nach bakterieller Besiedelung der Vagina (häufig Streptokokken der Gruppe B) und Veränderung der normalen Bakterienflora während der Schwangerschaft kann es zu einer intrauterinen Inflammation und Infektion kommen (FOWLER, SIMON, 2022; PENG et al., 2018). Durch die bakterielle Vaginose kommt es zu einem Aufsteigen dieser Keime durch die Zervix. Dieser Schritt kann Ergebnis einer erhöhten Virulenz der Keime sein, oder bedingt sein durch eine maternale, abgeschwächte Immunantwort. Innerhalb des Spaltraumes zwischen Dezidua und Chorionhöhle können sich die Bakterien nun massenhaft vermehren. Diese massenhafte Vermehrung kann eine mütterliche Entzündungsreaktion nach sich ziehen. Folgend kommt es zu einer intraamniotischen Infektion (Amnionitis) und einer möglichen Aspiration der Erreger durch den Fetus mit der Folge einer Sepsis. Neben der Lunge durch Aspiration ist der Gastrointestinaltrakt durch Schlucken infizierter Amnionflüssigkeit, die Haut durch direkten Kontakt mit Bakterien oder deren inflammatorischen Komponenten exponiert (NIKIFOROU et al., 2016)

Es muss zur Entstehung der CA nicht zwangsläufig ein vorzeitiger Blasensprung vorliegen. Ein Durchdringen der intakten Eihaut ist ebenso möglich (ELOVITZ, MRINALINI, 2004; ROMERO et al., 2003). Welches Ausmaß die CA annimmt, hängt von der Pathogenität der Keime, der Keimmenge und der Immunantwort der Mutter und des Fetus ab. Hierbei kommt es zu einer Assoziation zwischen Polymorphismus von immunmodulierenden Genen und dem Risiko, an einer CA zu erkranken (ANNELLS et al., 2005). Größtes Risiko für den Feten stellt das so genannte „fetal inflammatory response syndrome“ (FIRS) dar. Es ist charakterisiert durch eine systemische Entzündungsreaktion und einer begleitenden Erhöhung des Interleukin 6 im fetalen Blut (GANTERT et al., 2010; GOTSCH et al., 2007). Das FIRS kann Auswirkung auf den ganzen Organismus des Feten haben und wurde als Ergänzung zur SIRS gewählt. FIRS kann über Multiorganversagen, septischen Schock bis hin zum Tod des Feten führen. Nachweisbar ist eine solche Systembeteiligung unter anderem durch erhöhte Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9). Dieses Enzym ist bei der Verdauung von Kollagen Typ IV beteiligt.

Postnatal kann es durch eine manifeste CA mit Ausbildung eines FIRS zur folgenden Symptomen kommen: Hirnblutungen, Gastroenteritis, Otitis oder einer Pneumonie (NELSON, ELLENBERG, 1978; NIKIFOROU et al., 2016; ROMERO et al., 2007).

Vielzählige Risikofaktoren konnten für die Entstehung eines Amnioninfektionssyndroms gefunden werden. Neben einer unzureichenden Schwangerschaftsvorsorge, einem niedrigen sozioökonomischen Status der Schwangeren, gelten Rauchen und Mangelernährung als ein mögliches Risiko (FEFERKORN et al., 2022; GOTSCH et al., 2007). Weitere wichtige Faktoren stellen die klinische vaginale Untersuchung unter Geburt und eine Zeitspanne über 12 Stunden zwischen Blasensprung und Geburt dar (DARS et al.,

2014; SEAWARD et al., 1997). Frauen mit bakterieller Vaginose, besonders bei Besiedelung mit Ureaplasmen, haben ein doppelt erhöhtes Risiko vorzeitiger Wehen und einer Frühgeburt (TIBALDI et al., 2016; VINTURACHE et al., 2016).

Zytokine nehmen eine wichtige Rolle im Rahmen der Infekt-assoziierten-Frühgeburt ein. Interleukin-1(IL-1) spielt eine entscheidende Rolle bei der Induzierung von Wehen (ROMERO et al., 1989a). Dieses IL-1 wird als Antwort auf die bakterielle Besiedelung der Dezidua produziert. Der hierdurch ausgelöste Anstieg von Interleukin führt zur Produktion von Prostaglandin mit folgender Zervixreifung und möglicher Induzierung von vorzeitigen Wehen (BAGGIA et al., 1996; LAPPAS, 2016; WITCZAK et al., 2003).

Dies kann zur vorzeitigen Aktivität des Uterus führen, bedingt durch die Aktivität der Cyclooxygenase (COX), welche aus Arachidonsäure Prostaglandin herstellen kann (AGRAWAL, HIRSCH, 2012). Bei durch Infektionen bedingten vorzeitigen Wehen spielen proinflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle. Hierbei steht IL-1 im besonderen Interesse und ist an der Prostaglandinproduktion maßgebend beteiligt (GENC et al., 2002).

In Studien konnte bereits dargestellt werden, dass IL-1 eine zentrale Rolle im Verlauf von vorzeitigen Wehen und der fetalen Immunantwort spielt. IL-1 α wird fortwährend in beinahe allen Zellen gebildet, wird im Rahmen der Zellapoptose freigesetzt und stellt einen ersten Schritt der sterilen Entzündung dar (NADEAU-VALLEE et al., 2016). In der Plazenta sind IL-1-Rezeptoren und Rezeptorantagonisten kolokalisiert. Dies ist sowohl bei gesunden, als auch bei entzündlich betroffenen Plazenten der Fall (BAERGEN et al., 1994). Neben IL-1 spielten bei diesem Prozess Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-6 und IL-8 eine entscheidende Rolle (ROMERO et al., 2007).

Unter den zahlreichen inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die während einer CA im Fruchtwasser erhöht sind, wird IL-1 α eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort von Entzündungsreaktion des Frühgeborenen und beim Einsetzen vorzeitiger Wehen zugeschrieben (GENÇ et al., 2002; WOLFS et al., 2014).

Auch die Mutter kann durch eine CA in Mitleidenschaft gezogen werden (FOWLER, SIMON, 2022; PENG et al., 2018). Es kann zu intravasalen Gerinnungsstörungen (DIC), Endometritis oder Sepsis kommen. Als häufiger Entbindungsmodus konnte bei Schwangeren mit CA der Kaiserschnitt (aufgrund mangelndem Geburtsfortschritts) identifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass uterine Atonie, Bluttransfusionen und intensivmedizinische Behandlung in zeitlichem Zusammenhang mit der Dauer der CA stehen (ROUSE et al., 2004).

2.8.1 Diagnose der Chorionamnionitis

Neuerdings wird häufig auch von Triple I („intrauterine inflammation or infection or both“) als Oberbegriff für eine akute Infektion oder Inflammation von Plazenta, Fruchtwasser, des Feten oder deren Kombination gesprochen (MAKI et al., 2022).

Ein pathognomonisches Korrelat fehlt bei der Diagnose einer CA. Nicht selten verläuft eine CA asymptomatisch und subklinisch. Die Diagnose wird dann erst gehäuft postnatal gesichert.

Klinische Zeichen und Symptome der CA können bei der Mutter Fieber, eine Tachykardie ($> 100/\text{min}$), eine Leukozytose ($> 15000/\text{nl}$) mit Linksverschiebung, CRP-Erhöhung, ein druckdolenter Uterus, zunehmende Wehentätigkeit, ein vorzeitiger Blasensprung und eitrig oder faul riechendes Fruchtwasser sein (BURKE, CHIN, 2016; GILSTRAP, COX, 1989; TITA, ANDREWS, 2010a).

Untersuchte Amnionflüssigkeit von Frauen mit CA zeigte eine geringere Glukosekonzentration, eine erhöhte Anzahl an weißen Blutkörperchen und eine erhöhte Komplettkonzentration (GOLDENBERG et al., 2000). Neben der maternalen Tachykardie kann es ebenso beim Feten zu einem pathologischen Kardiotokogramm (CTG) (mit > 150 Schläge pro Minute (Spm)) kommen.

Es zeigt sich, dass in 56 % der Fälle von betroffenen Frauen mit einer CA eine milde fetale Tachykardie (160-179 Spm) und in 17 % eine schwere fetale Tachykardie (> 180 Spm) auftritt (WENDEL et al., 1994).

Unter Ruhebedingungen sollte ein CTG bei 110-150 Spm liegen. Es besteht jedoch keine strenge Assoziation zwischen einer Asphyxie und einer CA.

Temperatur $> +38^{\circ}\text{C}$ bei der Mutter stellt das wichtigste klinische Symptom dar und ist in 95 % -100 % der Fälle einer CA vorhanden.

Untersuchungen zeigten, dass Temperatur ($> +38^{\circ}\text{C}$) in 1,6 % der Fälle (> 11000) unter Geburt bei der Schwangeren auftrat. Dieses subpartale Fieber war ein Prädiktor für infektassoziierte Sterblichkeit beim Neonaten (GIBBS et al., 1982; PETROVA et al., 2001; TITA, ANDREWS, 2010a{Gibbs, 1982 #32}).

In 80,8 % von untersuchten Amnionproben mit Amnioninfektion konnten die bereits beschriebenen Leukozyten identifiziert werden, während dies nur in 28,8 % der Fälle bei Kontrollen auftrat (GIBBS et al., 1982).

Eine isolierte Leukozytose ist in Abwesenheit anderer Symptome der CA von begrenztem Wert und kann auch durch andere Umstände erklärt werden (TITA, ANDREWS, 2010a). Eine Applikation von Kortison im Rahmen der Lungenreifeinduktion, würde beispielsweise einen Anstieg der Leukozyten erklären und muss bei der Infektionsdiagnostik bedacht werden (DENISON et al., 1997).

Neuerdings konnte Cancer-Antigen-125 (CA-125) (bekannt als Tumormarker bei gynäkologischen Malignomen) als Marker der CA identifiziert werden. CA-125 steigt bei Patientinnen mit Amnioninfektionssyndrom an und kann als Prädiktor einer drohenden Frühgeburt gesehen werden. Es wird unter anderem vom Amnionepithel und der fetalen Zölonhöhle produziert (BISCHOF, 1993; SEONG, 2016).

Als diagnostischer Goldstandard gilt der histologische Nachweis nach der Entbindung. Hier zeigen sich polymorphkernige Infiltrate in Eihäuten und in der Plazenta (LAHRA et al., 2009).

Dieser Nachweis ist jedoch mit einer gewissen Latenz von Tagen verbunden. Eine frühzeitigere Diagnose könnte das Outcome des Frühgeborenen verbessern und eine gezielte Therapie ermöglichen (BEEN et al., 2012). In Studien wurde bereits versucht, anhand des IL-6-Spiegels aus Nabelschnurrblut eine Aussage bezüglich einer CA treffen zu können (TASCI et al., 2006). All diese Test sind jedoch weiterhin mit Limitationen bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität versehen (KIM et al., 2015; YOON et al., 1997).

2.9 Diagnostik mittels Geruchsanalyse

Die Diagnose einzelner Erkrankungen, ohne technische Hilfsmittel, alleine anhand typischer Gerüche zu deuten, hat in der Medizin lange Tradition. Bereits Hippokrates nutzte seinen Geruchssinn zur Analyse von Sputum oder Urin (GRAHAM, 2013). Es gibt beinahe pathognomonische Gerüche von Krankheiten, welche eine Diagnose ermöglichen. So tritt beispielhaft bei schweren hepatischen Erkrankungen ein typischer intensiver, süßlicher und azetonähnlicher Geruch auf, welcher als Foetor hepaticus bekannt ist. Der Geruch von Ammoniak kann hinweisend für eine Urämie sein (DAVIES et al., 1997). Auch eine schwere Komplikation des Diabetes mellitus, das ketoazidotische Koma, kann anhand ihres Geruchs detektiert werden (MINOCHA, RASHID, 1997). Aber auch mikrobiologische Besiedelung und Infektion mit anaeroben Erregern lassen sich durch einen putriden Geruch deuten (HAYASHIDA, YAMAKAWA, 2021; RAMASUBBU et al., 2017). Der menschliche Körpergeruch beispielsweise ist ein Ergebnis der Kombination von hunderten emittierten volatiler organischer Komponenten (VOC) (ISSITT et al., 2022). Diese entstammen aus verschiedensten Zellen des Körpers und werden über vielzählige Stoffwechselwege sezerniert. Hauptquellen solcher VOC sind Urin, Stuhl, Schweiß und die Atemluft (SHIRASU et al., 2009). In einer Atemprobe können etwa 3000 verschiedene VOC nachgewiesen werden (HAICK et al., 2014).

VOC werden von allen Mikroorganismen im Rahmen ihres Stoffwechsels produziert. Das VOC-Profil hängt folglich sowohl von der Wirtskomponente, als auch von der jeweils vorhanden mikrobiellen Spezies ab (THORN, GREENMAN, 2012).

In mehreren Studien werden zunehmend die Möglichkeit und der Nutzen von Analysen dieser flüchtiger organischer Komponenten durch Einsatz von elektronischen Nasen (e-Nose) oder Massenspektrometer aufgezeigt (OLIVEIRA et al., 2022).

Die Analyse dieser VOC kann auf zwei unterschiedlichen, wenn auch komplementären Ansätzen analysiert werden. Zum einen kann die VOC-Identifizierung genannt werden, zum anderen eine VOC-Mustererkennung.

Zur VOC-Identifizierung nutzt man die Möglichkeit der Massenspektrometrie, zur VOC-Mustererkennung eine eNose (CHOUDHURY et al., 2022; VAN DER SCHEE et al., 2015). Durch diese VOC-Identifizierung gelingt im Gegensatz zur VOC-Mustererkennung eine individuelle Identifizierung einzelner Analyte.

Beispielhaft sein hier erwähnt, dass einige VOC einzigartig in Bakterien vorkommen können. 1-Penten-3-ol und 2-Octyl-1-ol für *Pseudomonas aeruginosa* oder Butansäure und 5,5-Dodecadienyl-1-12-diol für *Klebsiella pneumoniae*. Durch diese Technik gelingt ein schnelles und zugleich spezifisches Nachweisverfahren für Bakterien (CHEN et al., 2017; KARAMI et al., 2017).

Die Klassen der produzierten VOC sind breit gestreut und entstammen u.a. Schwefelverbindungen, stickstoffhaltigen Verbindungen, Fettsäuren, Kohlenwasserstoffen oder Alkohol (SCHULZ, DICKSCHAT, 2007).

Studien zeigten, dass unter pathophysiologischen Bedingungen die Produktion der VOC signifikant ansteigen kann. Unter physiologischen Bedingungen betragen die VOC 10-12 mol/l in der Ausatemluft (HAKIM et al., 2012; XIANG et al., 2021).

2.9.1 Die elektronische Nase

Zunehmend halten Hilfsmittel, wie z.B. die eNose zur Geruchsanalyse, Einzug in die Medizin. Vorteile solcher Systeme sind objektive, unerschöpfliche und reproduzier- und speicherbare Analysen innerhalb kürzester Zeit und eine patientennahe Einsetzbarkeit (FARRAIA et al., 2019).

Auch ein Einsatz in potenziell schädlicher Umgebung oder die Untersuchung von kontaminierten Probenmaterial sind möglich.

Im Jahr 1982 wurde das menschliche Geruchssystem erstmals kopiert und als eNose nachgebaut (Persaud und Dodd an der Universität Warwick). Weitere Innovationen in der Elektrotechnik und Informatik ermöglichten ab den 1990er Jahren erste Entwicklungen der heute etablierten eNose (WILSON, BAIETTO, 2011).

Der Mensch ist in der Lage, tausende differente Düfte durch 10 bis 30 Millionen Sinneszellen in der Regio olfactoria wahrzunehmen (BUSHDID et al., 2014). Elektronische Nasen sind lediglich durch die Auswahl und Anordnung von Sensoren limitiert (YANG et al., 2021).

Elektronische Nasen haben sich bereits in verschiedenen Bereichen bewährt, etwa beim Militär zur Detektion von biologischen oder chemischen Kampfstoffen oder in zivilen Anwendungen wie der Lebensmittelchemie zur Qualitätskontrolle (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2021; SHI et al., 2018; SHIRASU, TOUHARA, 2011).

Sie stellen eine Ergänzung und Alternative zur etablierten Massenspektrometrie und Gaschromatographie dar, welche seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts zur Identifizierung VOC genutzt werden (MANOLIS, 1983).

Eine Übersichtsarbeit zeigte, dass die Cyranose C320 die am häufigsten verwendete eNose bei Analysen im Rahmen von medizinischen Studien ist (OAKLEY-GIRVAN, DAVIS, 2017).

2.9.2 Suche nach einem geeigneten Infektionsparameter und Limitationen

Seit Jahrzehnten wird nach einem idealen Infektionsmarker für Frühgeborene geforscht. Bei den Kriterien für einen idealen Biomarker oder Test zur Diagnose einer neonatalen Sepsis kann in klinische Eigenschaften und Laboreigenschaften unterteilt werden (Tabelle 6) (EICHBERGER et al., 2022; LAM, NG, 2008; SHARMA et al., 2018; WOODFORD et al., 2021).

Tabelle 6: Kriterien für einen idealen Biomarker

Klinische Eigenschaften
Infektionen früh erkennen
Identifizierung von bestimmten Krankheitserregern (z.B. bakterielle, virale oder pflanzliche Organismen)
Überwachung des Krankheitsverlaufes
Steuerung einer antimikrobiellen Therapie
Vorhersage der Schwere einer Krankheit zu Beginn der Infektion
Vorhersage der Prognose (d.h. Sterblichkeit)

Laboreigenschaften
Stabile Verbindungen der Probe von Abnahmen bis zur Analyse
Automatische und einfache Messmethode, Etablierung als Routinemessung
Schnelle Durchlaufzeiten bis zur Ergebnismeldung
Quantitative Bestimmung der Biomarkerkonzentrationen
Geringes Probenvolumen
Tägliche Verfügbarkeit
Kostengünstiger Test

Wie bereits beschrieben, basiert die Diagnose einer Infektion des Früh- und Neugeborenen auf drei Säulen: Der klinischen Untersuchung, den laborchemischen Infektionsparametern und der mikrobiologischen Diagnostik (IROH TAM, BENDEL, 2017; MEMAR et al., 2019)

Trotz klinisch und laborchemisch eindeutigem Vorliegen einer Infektion oder sogar Sepsis gelingt häufig kein Keimnachweis in gewonnenen Blutkulturen (MUKHOPADHYAY et al., 2021).

In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass an bakterieller Infektion verstorbene Neugeborene in 13 % keine Auffälligkeiten im Blutbild hatten. Die Diagnosesicherung erfolgte im Rahmen von Autopsien. In 18 % dieser Fälle zeigte die Blutkultur einen negativen Befund (SQUIRE et al., 1979). Dies zeigt u.a. die Limitationen mikrobiologischer Untersuchungen.

Aber auch die klassischen laborchemischen Infektionsparameter weisen Limitationen auf. Aus der Gruppe der Akut-Phase-Proteine gehört das CRP zu einem der bekanntesten Parameter. Durch Inflammationen kommt es zur Bildung dieser Proteine. CRP konnte in diversen Studien mit einer neonatalen Sepsis in Zusammenhang gebracht werden (BENITZ et al., 1998; BERGER et al., 1995). Jedoch schließt ein negatives CRP bei anfänglichen Untersuchungen eine Infektion nicht aus (MATHERS, POHLANDT, 1987). Auch andere Krankheitsbilder wie Hirnblutungen, Asphyxie oder die Mekoniumaspiration können zu einer CRP-Elevation führen (OKUMUŞ et al., 2015).

Schwierigkeiten zeigen sich auch bei der Betrachtung des Blutbildes. Zum einen können die noch kernhaltigen Erythrozytenvorstufen die Differenzierung und Auszählung der Leukozyten beeinflussen, zum anderen ist die Gesamtzahl der Leukozyten von eingeschränkter Bedeutung (FORESTIER et al., 1991; MANROE et al., 1979; SQUIRE et al., 1979). Ebenfalls werden durch mütterliche Risikofaktoren Ergebnisse von diversen Entzündungsmarkern beeinflusst (EICHBERGER et al., 2022).

Auch die z.T. nur dezenten klinischen Hinweise im Rahmen von körperlichen Untersuchungen des Frühgeborenen zeigen, wie wichtig die Weiterentwicklung und Einführung weiterer diagnostischer Hilfsmittel ist (AKANGIRE et al., 2020; WRIGHT et al., 2021).

Für einen diagnostischen Test besteht die Notwendigkeit, eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen zu können. In Studien wurde daher eine Sensitivität und einen negativen prädiktiven Wert nahe 100 % vorausgesetzt. Dies sollte eine Behandlung nicht aufgrund falsch negativer Testergebnisse verzögern (NG, 2004; SMULIAN et al., 1999).

Bisher zeigt sich kein einzelner Biomarker als ideal (CELIK et al., 2022). Die Identifizierung eines idealen Biomarkers zur Diagnose einer neonatalen Sepsis ist immer noch die größte Herausforderung.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Diagnostik der CA. Auch hier stellt der Nachweis der CA einer Herausforderung dar.

Obwohl Matrix-Metalloproteinase-8 (MMP-8) der am besten geeignete Test für das Screening zu sein scheint, erfordert die Diagnose einer CA eine Kombination von Screening-Methoden und –Tests, sowie klinische Zeichen und Symptome, Biomarker der Mutter, Analysen von Fruchtwasser und die Histologie. Schnellere, einfacher, nichtinvasive und kostengünstigere Tests rechtfertigen weitere Forschungsbemühungen (CHARPENTIER et al., 2022; DU PLESSIS et al., 2022).

Der einzige vorgeburtliche diagnostische Test ist die Amniozentese, die Risiken für eine Früh- oder Fehlgeburt birgt (HALL et al., 2022).

2.9.3 Neue Möglichkeiten der Infektionsdiagnostik

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die bisherigen Möglichkeiten der Diagnostik von Infektionen bei Früh- und Neugeborenen oder der CA und den damit verbundenen Limitationen beschrieben. Es scheint bis dato nicht den perfekten Infektionsparameter zu geben (TIOZZO, MUKHOPADHYAY, 2022). Seit Jahren beschäftigen sich Forschungsgruppen mit der Suche nach einem geeigneten Infektionsparameter für Neugeborene (CANTEY, LEE, 2021). Weiterhin beruht die Diagnose einer Sepsis auf dem Ergebnis von Blutkulturen (DIERIKX et al., 2022). Jedoch ist diese Methode weiterhin langsam und durch falsch-negative Ergebnisse limitiert (WOODFORD et al., 2021).

Zahlreiche neuere Sepsis-Biomarker (16S rDNA, „granulocyte colony-stimulating factor (G-CFS), Tumornekrosefaktor (TNF), IL1 β , CD11b, CD64, Pentraxin 3, SCD 163) konnten für die Neugeborenensepsis evaluiert werden (KETTER et al., 2016). Jedoch konnte auch von diesen keiner als ideal bezeichnet werden (EICHBERGER et al., 2022; JYOTI et al., 2021; TZIALLA et al., 2018). Keiner der neueren, aktuellen diagnostischen Marker ist empfindlich und spezifisch genug, um die Entscheidung zum Absetzen einer laufenden Antibiotikatherapie, ohne Berücksichtigung klinischer Befunde treffen zu können (EICHBERGER et al., 2022).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der bisherigen Diagnostik der CA (LAGODKA et al., 2022).

Ein mögliches weiteres Hilfsmittel zur Diagnostik von Infektionen bei Früh- und Neugeborenen oder der CA könnte die Analyse von VOC darstellen (BERKHOUT et al., 2020; WRIGHT et al., 2021). Hierdurch wäre beispielsweise ein deutlicher Zeitgewinn, sequentielle Untersuchungen von Bioproben, geringer Kostenaufwand und einfache Durchführung möglich (TOMA et al., 2021).

Durch diese neuartigen Methoden der VOC-Analysen konnte eine Ergänzung zur bisherigen Diagnostik geschaffen werden (GOEDICKE-FRITZ et al., 2021).

2.10 Ziel der Arbeit

2.10.1 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit bereits etablierten und neuartigen Untersuchungen um zu prüfen, ob Bioproben von Frühgeborenen mit und ohne Zeichen einer Infektion unterschiedlich „riechen“ und sich differenzieren lassen.

Zusätzlich werden Bioproben aus Fruchtwasser von trächtigen Schafen mit Entzündungen unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Hierbei wird untersucht, ob sich die differenten Entzündungsätiologien voneinander trennen lassen und sich eine spezifische flüchtige organische Verbindungen identifizieren lässt.

Dazu wird auf folgende Fragen eingegangen:

Diagnose einer neonatalen systemischen Infektion

- Unterscheiden sich die Bioproben von Frühgeborenen mit und ohne klinische Zeichen einer Infektion?
- Ist die eNose für die Prädiktion von Infektionen bei unreifen Frühgeborenen geeignet?
- Eignen sich Urin, Stuhl und Trachealaspilat zur Diagnose von Infektionen bei unreifen Frühgeborenen?
- Welche Bioprobe ist besonders für die Prädiktion einer Infektion geeignet?
- Wie können Biosamples aufbereitet werden, damit sie für die Messung mittels e-Nose geeignet sind?
- Kann eine hohe „Cross Validation Value“ zur Erkennung einer invasiven Infektion anhand von Smellprints der Bioproben erreicht werden?

Prädiktion der Chorioamnionitis

- Finden sich flüchtige organische Verbindungen im Fruchtwasser trächtigen Schafen, die später zur einer CA führen?
- Lassen sich Biomarker dieser organischen Verbindungen identifizieren?
- Unterscheiden sich die Profile der organischen Verbindungen zwischen Amnionitis unterschiedlicher Herkunft?

3 Material, Kollektiv und Methodik

3.1 Unterteilung der Arbeit

Die Arbeit gliedert sich in einen klinischen Teil und einen tierexperimentellen Teil.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Kollektive betrachtet. Einerseits wurden in einem klinischen Teil dieser Arbeit Patienten des Universitätsklinikums Marburg betrachtet, andererseits Probenmaterial von Schafen analysiert. Dieses entstammt von Tierversuchen an Merinoschafen, gewonnen durch die University of Western Australia (Perth, Australien).

Tabelle 7: Übersicht über die tierexperimentellen und klinischen Teile dieser Arbeit

Untergliederung	Probenmaterial	Ort Probensammlung	Ort Probenmessung
Klinischer Teil	Bioproben von Frühgeborenen: Trachealsekret Stuhl Urin (Speichelproben)	Universitätsklinikum Gießen und Marburg Standort Marburg	Universitätsklinikum Gießen und Marburg Standort Marburg
Tierexperimenteller Teil	Amnionflüssigkeiten von Schafen	University of Western Australia Perth, Australien	Universitätsklinikum Gießen und Marburg Standort Marburg

3.2 Klinischer Abschnitt der Arbeit

3.2.1 Patienten und Probengewinnung

Die im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden an biologischen Materialien (Trachealspirat, Stuhl und Urin) von Frühgeborenen durchgeführt. Über einen Zeitraum von acht Monaten wurden über 500 Proben von 27 Patienten gesammelt und analysiert. Hierbei handelte es sich um auf der Intensivstation behandelten Frühgeborene. Aufgrund unterschiedlicher Krankheitsspektren erfolgte nicht bei allen Patienten eine Gewinnung aller biologischen Materialien. Beispielsweise ist die Gewinnung von Trachealspirat gebunden an die medizinische Indikation einer Intubation und erfolgte

nur im Rahmen dieser. Daher stellen in dieser Studie sequentielle Trachealsekrete die Ausnahme dar. Die Gewinnung des Sekrets erfolgte entweder bei einem längeren Beatmungsintervall oder bei klinischer Verschlechterung mit Indikation zur Re-Intubation. Die Entnahme von Stuhl- und Urinproben war ebenfalls an den klinischen Zustand des Patienten gebunden. Bei einzelnen Krankheitsbildern ist eine Probengewinnung z.B. im Rahmen einer nekrotisierender Enterokolitis oder eines akuten Nierenversagens nicht möglich gewesen.

Daher wurde vereinzelt das Intervall der Abnahme 1x / Woche überschritten. Somit erfolgte im Rahmen dieser Studie keinerlei zusätzliche Interventionen zur Gewinnung des Probenmaterials.

Die Probenverarbeitung erfolgte stets durch dieselbe Person.

3.3 Ethik

Die Probengewinnung, -verarbeitung und -auswertung erfolgte nach Einwilligung und im Einklang mit der Ethikkommission des Universitätsklinikums Marburg (Anschlussstudie an Studie 167/10, Erstantrag vom 06.12.2010 und Gutachten der Ethikkommission vom 28.08.2014).

3.4 Datenschutz

Die Daten werden pseudonymisiert gespeichert. Jedem Patienten wurde eine Identifikationsnummer zugeordnet, die für die Auswertung verwendet wurde.

Die Speicherung der erhobenen Datensätze wurden gemäß den Richtlinien zur Aufbewahrung von Patientendaten im Marburger Universitätsklinikum durchgeführt.

3.5 Einverständnis

Die Zustimmung zur Studienteilnahme erfolgte durch schriftliche Einwilligung der Erziehungsberechtigten nach entsprechender Aufklärung bei einer notwendigen stationären Aufnahme des Kindes.

3.6 Einschlusskriterien

Bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten handelte es sich um Patienten der neonatologischen Intensivstation und der peripheren neonatologischen Station des Universitätsklinikums Marburg.

Es erfolgte der Einschluss der Patienten, wenn sie folgende Bedingungen erfüllten:

- Frühgeborene mit einem Gestationsalter von $< 32+0$ SSW und/ oder einem Geburtsgewicht ≤ 1500 g

- Einwilligung der Erziehungsberechtigten innerhalb von 72 Stunden nach Geburt zur Teilnahme an der Studie.

3.7 Ausschlusskriterien

Ein Ausschluss aus der Studie erfolgte, falls eines der folgenden Kriterien erfüllt wurde:

- Fehlendes Einverständnis der Erziehungsberechtigten
- Palliatives Regime
- Schwere oder lebensbedrohliche Fehlbildungen
- Rücknahme der Einverständniserklärung

3.8 Zeitrahmen der Probenasservierung

Die Probensammlung bei den eingeschlossenen Frühgeborenen erfolgte wöchentlich im Zeitraum von 2015 bis 2016.

Bei Erfüllung eines der folgenden Punkte, wurde die Probensammlung beendet:

- Abschluss der 6. Lebenswoche
- Vorzeitige Entlassung des Patienten (vor Vollendung der 6. Lebenswoche)
- Tod des Patienten

3.9 Dokumentation klinischer Parameter

Zusätzlich und zur Verifizierung der in folgenden Abschnitten beschriebenen Messergebnissen und einer evtl. möglichen Korrelation der experimentell erhobenen Datensätze wurden standardisiert folgende Parameter der Patienten anhand der Krankenakte erhoben. Nicht alle in der folgenden Tabelle erhobenen Parameter hatten Einfluss auf die Auswertung in dieser Arbeit.

Tabelle 8: Erhobene klinische, laborchemische und mikrobiologische Parameter der Patienten

Erhobene Parameter
Geburtsdaten (Datum, Uhrzeit)
Gestationsalter bei Geburt in Wochen + Tagen
Geschlecht
Geburtsgewicht (in g)
Mehrlingsschwangerschaft
Geburtsmodus (vaginale Entbindung, Sectio caesarea)
Form der Sectio caesarea (primär, sekundär oder Notsectio)
Apgar-Werte des Neugeborenen (nach 1, 5 und 10 Minuten)

Nabelarterien-pH-Wert
Syndromale Erkrankungen / Fehlbildungen
Pulmonale / kardiovaskuläre Erkrankungen
Intubation (Erstversorgung, im Verlauf, elektiv)
Körpergewicht des Patienten bei Probenabnahme (in g)
Temperatur des Patienten bei Probenentnahme (in °C)
Inspiratorische Sauerstoffanteil (FiO ₂) bei Probenentnahme (in %)
Ernährung bei Probenentnahme
Medikation, Antibiotika bei Probenentnahme
Alter der Mutter (in Jahren)
Gravidität und Parität der Mutter
Anteil enteraler Ernährung (in %)
Muttermilch zugeführt
Beatmungsmodus
Beatmungsdauer in Stunden (invasiv)
Beatmungsintervall in Tagen (nichtinvasiv)
Surfactant-Applikation
Dauer erhöhter Sauerstoffzufuhr (in Tagen)
Laborchemische Entzündungsparameter (CRP und IL8)
Differentialblutbild
Mikrobiologische Ergebnisse (der Blutkulturen, Hautabstriche)
Laborwerte
Fieber (> +38,5°C) bei Probenentnahme
Hypothermie (< +36,5°C) bei Probenentnahme

3.9.1 Infektionsscore

Zur Sicherung einer Infektion wurden laborchemische Parameter erhoben und retrospektiv mit den gesammelten Probenmaterial korreliert. Diese umfassten Blutbild, CRP und das Ergebnis der Blutkulturen. Anhand des Differentialblutbildes kann man den I / T-Quotienten berechnen (Verhältnis unreifer und reifer neutrophiler Leukozyten).

Tabelle 9: Infektionsscore angelehnt an Neo-Kiss-Kriterien und modifiziert nach Maier und Obladen, 2011)

Infektionsscore
CRP > 10 mg/l
positive Blutkultur
I/T-Quotient > 0,2
IL-6 > 30pg/ml
Leukozytenzahl < 4.000/ μ l // > 30.000/ μ l

Wenn eines dieser Kriterien erfüllt war, lag ein positiver Infektionsscore vor. Die Probe wurde als systemische Infektion gewertet.

3.10 Infektionsdiagnostische Ergebnisse

Blutkultur:

Bei 24 Patienten wurde mindestens einmal im Verlauf des stationären Aufenthaltes eine Blutkultur angelegt. Bei zwei Patienten (8,3 %) fiel diese positiv aus. Nachgewiesen wurden Staphylococcus capitis und Staphylococcus epidermidis.

Zeitgleich zum Nachweis von Staphylococcus capitis lag ein erhöhtes CRP, eine Leukopenie und ein erhöhtes Interleukin zum Zeitpunkt der Probenerhebung vor.

20 Proben (Stuhl, Urin, Trachealspirat (TA)) wurden bei diesem Patienten mit Staphylococcus capitis Nachweis gesammelt. Bei 55 % dieser Proben lag ein positiver Infektionsscore vor.

Bei dem Patienten mit Staphylococcus epidermidis Nachweis (in der Blutkultur) zeigte sich eine Leukopenie und ein erhöhter IL-Spiegel. 15 Proben (Stuhl, Urin, TA) wurden bei diesem Patienten im Rahmen der Studie erfasst. 46,6 % der Proben bildeten einen positiven Infektionsscore ab.

Tabelle 10: Patienten mit positiver Blutkultur und Keimnachweis in der Mikrobiologie

Patient (Mikro- biologie)	Probentyp mit pos. In- fektionsscore	Klinische Symptome	Labor
L. O. (Staph. capitis)	TA: 6 Stuhl: 7 Urin: 7	Respiratorische Insuffizienz	CRP max.: 26 mg/l IL-8 max.: 333 ng/l Leukozyten: 3800 / μ l
M. D.	TA: 6 Stuhl: 5 Urin: 4	Respiratorische Verschlechterung im Rahmen invasiver Beatmung	CRP max.: 150 mg/l IL-8 max.: 246 ng/l Leukozyten: 3551 / μ l

(Staph. epidermidis)		NEC	
----------------------	--	-----	--

Trachealspirat:

Innerhalb des Studienintervalls wurde bei 11 Patienten mindestens einmalig eine Trachealspiratprobe gewonnen. Bei fünf Trachealspiratproben (45,4 %) erfolgte ein positiver Keimnachweis. Hierbei handelte es sich um Staphylococcus sp., Enterobacter cloacae, Enterococcus sp., Neisseria sp. und Ureaplasma urealyticum. Bei 22 dieser Proben lag zeitgleich ein positiver Infektionsscore vor.

Tabelle 11: Patienten mit Trachealspiratproben, Keimbefund und Labor

Patient (mikrobiologisches Ergebnis)	Probentyp mit pos. Infektions- score	Klinische Symp- tome	Labor
R. C.	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
S. C.	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
H. K.	TA: 3 Stuhl: 3 Urin: 3	Peritonitis Kathetersepsis	CRP max.: 60 mg/l. IL-8 max.: 117 ng/l Leukozyten: o.p.B.
N. Z.	TA: 3 Stuhl: 2 Urin: 4	Sepsis bei Peritonitis	CRP max.: 98 mg/l IL-8 max.: 565 ng/l Leukozyten: o.p.B.
M. D. (Staph. sp.)	TA: 4 Stuhl: 3 Urin: 4	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: 138 mg/l. IL-8 max.: 709 ng/l. Leukozyten: o.p.B.
L. O. (Enterobacter cloacae)	TA: 6 Stuhl: 3 Urin: 2	Kathetersepsis	CRP max.: 26 mg/l. IL-8 max.: 338 ng/l Leukozyten: o.p.B.
J. S. (Enterococcus sp.)	TA: 2 Stuhl: 0 Urin: 0	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: < 5mg /l. IL-8 max.: 111 ng/l Leukozyten: o.p.B.
E. G.	TA: 1 Stuhl: 1 Urin: 1	Pneumonie	CRP max.: 101 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
N. R. (Neisseria sp.; Staph. sp.)	TA: 1 Stuhl: 1 Urin: 1	Ventrikulitis	CRP max.: 54,2. IL-8 max.: 355 ng/l Leukozyten: o.p.B.
M. A.	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 1	Respiratorische Insuffizienz	CRP max.: 30 mg/l IL-8 max.: 11 ng/l Leukozyten: o.p.B.
E. J.	TA: 1	Konjunktivitis	CRP max.: 12,3 mg /l

	Stuhl: 0 Urin: 1		IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
--	---------------------	--	---

Urin:

Eine mikrobiologische Untersuchung des Urins erfolgte bei fünf Patienten. Bei zwei Patienten (40 %) lag ein positives mikrobiologisches Ergebnis vor. Es konnten Enterobacter cloacae und Staphylococcus spezie kultiviert werden.

Bei diesen fünf Patienten konnten insgesamt 27 Urinproben gewonnen werden, bei welchen zeitgleich ein positiver Infektionsscore vorlag.

Bei dem Patienten mit Enterobacter cloacae Nachweis zeigte sich begleitend ein erhöhtes CRP und Interleukin. Acht Urinproben wurden bei diesem Patienten im Erhebungszeitraum gesammelt. 50 % hiervon wiesen einen positiven Infektionsscore auf.

Bei dem Patienten mit Stapylococcus spezie Nachweis (in der Urinkultur) wurden sieben Urinproben während des Studieneinschlusses zusammengetragen. 14,2 % dieser Proben präsentierten einen positiven Infektionsscore. In diesem Fall zeigte sich ein erhöhter CRP-Spiegel.

Tabelle 12: Patienten mit Urinproben und positiven Infektionsscore

Patient (mikrobiologisches Ergebnis)	Probentyp mit pos. Infektions- score	Klinische Symp- tome	Labor
E. G. (Staphylococcus sp.)	TA: 0 Stuhl: 2 Urin: 7	Pneumonie	CRP max.: 101 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
H. K. (Enterobacter cloacae)	TA: 3 Stuhl: 3 Urin: 8	Peritonitis Kathetersepsis	CRP max.: 60 mg/l. IL-8 max.: 117 ng/l Leukozyten: o.p.B.
N. Z.	TA: 3 Stuhl: 2 Urin: 4	Sepsis bei Peritonitis	CRP max.: 98 mg/l IL-8 max.: 565 ng/l Leukozyten: o.p.B.
L. O.	TA: 6 Stuhl: 3 Urin: 4	Kathetersepsis	CRP max.: 26 mg/l. IL-8 max.: 338 ng/l Leukozyten: o.p.B.
K. D.	TA: 1 Stuhl: 3 Urin: 4	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: 138 mg/l IL-8 max.: 709 ng/l Leukozyten: o.p.B.

Stuhl:

Es wurden keine Stuhlproben zur weiteren Diagnostik in der Mikrobiologie verarbeitet.
19 von 201 (9,4 %) Stuhlproben erbachten einen positiven Infektionsscore.

Tabelle 13: Patienten mit Stuhlproben und positiven Infektionsscore

Patient	Probentyp mit pos. Infektionsscore	Klinische Symptome	Labor
H.B.	TA: 0 Stuhl: 2 Urin: 3	Konatale Infektion mit AIS	CRP max.: 21 mg/l IL-8 max.: 221 ng/l Leukozyten: o.p.B.
A.H.	TA: 0 Stuhl: 1 Urin: 0	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 139 ng/l Leukozyten: o.p.B.
H. K.	TA: 3 Stuhl: 3 Urin: 3	Peritonitis Kathetersepsis	CRP max.: 60 mg/l. IL-8 max.: 117 ng/l Leukozyten: o.p.B.
N. Z.	TA: 3 Stuhl: 2 Urin: 4	Sepsis bei Peritonitis	CRP max.: 98 mg/l IL-8 max.: 565 ng/l Leukozyten: o.p.B.
M. D.	TA: 5 Stuhl: 3 Urin: 4	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: 138 mg/l. IL-8 max.: 709 ng/l. Leukozyten: o.p.B.
L. O.	TA: 6 Stuhl: 3 Urin: 4	Kathetersepsis	CRP max.: 26 mg/l. IL-8 max.: 338 ng/l Leukozyten: o.p.B.
M.B.D.	TA: 1 Stuhl: 3 Urin: 4	Keine	CRP max.: 146 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
E. G.	TA: 0 Stuhl: 1 Urin: 7	Pneumonie	CRP max.: 101 mg /l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
N. R.	TA: 1 Stuhl: 1 Urin: 1	Ventrikulitis	CRP max.: 54,2. IL-8 max.: 355 ng/l Leukozyten: o.p.B.

3.10.1 Antibiotische Therapie

Während der intensivmedizinischen Betreuung erhielten 20 Patienten intravenös Antibiotika. Dies entspricht 74 % der Patienten. Sieben Patienten kamen ohne antibiotische Behandlung aus (26 %). Das häufigste Antibiotikaregime war Ampicillin kombiniert mit Gentamicin (95 %). In 55 % der Fälle einer antibiotischen Therapie lag

mindestens eine Probe (TA, Stuhl, Urin) mit positiven Infektionsscore vor. In 71,4 % der Fälle ohne antibiotische Therapie zeigten sich unauffällige Proben.

In 7,4 % der Fälle gelang ein mikrobiologischer Keimnachweis durch Abnahme von Blutkulturen.

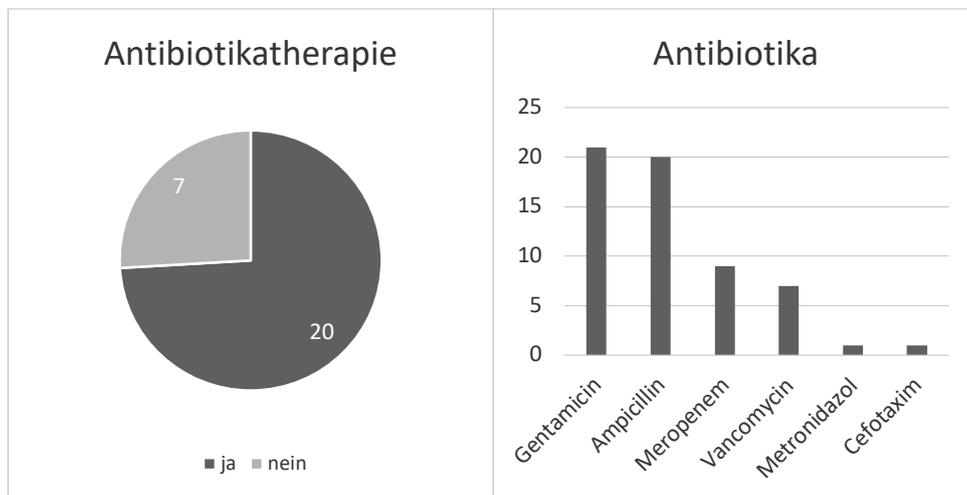


Abbildung 3: Antibiotikatherapie bei den Patienten; Anzahl der Patienten und Anzahl der Antibiotika-Therapien

Tabelle 14: Antibiotische Therapie, klinische Symptome und Laborparameter

Patient	Probenart	Antibiotische Therapie	Klinische Symptome	Labor
M.A	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 1	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische Insuffizienz	CRP max.: 30 mg/l IL-8 max.: 11 ng/l Leukozyten: o.p.B.
H.B:	TA: 0 Stuhl: 2 Urin: 3	Gentamicin Ampicillin Meropenem Vancomycin	Konnatale Infektion mit AIS	CRP max.: 21 mg/l IL-8 max.: 221 ng/l Leukozyten: o.p.B.
E.B.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	V.a. konnatale Infektion	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
L.B.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	V.a. konnatale Infektion	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
R.C.	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
S.C.	TA: 1 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B.
M.D.	TA: 5 Stuhl: 3 Urin: 4	Gentamicin Ampicillin Meropenem Vancomycin	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: 138 mg/l. IL-8 max.: 709 ng/l. Leukozyten: o.p.B. Positive Blutkultur

B.D.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 17 ng/l Leukozyten: o.p.B
K.D.	TA: 1 Stuhl: 3 Urin: 4	Gentamicin Meropenem Vancomycin	Gastrointestinale In- fektion	CRP max.: 138 mg/l IL-8 max.: 709 ng/l Leukozyten: o.p.B.
M.B.D.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B.: Leukozyten: o.p.B
A.F.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 363 ng/l Leukozyten: o.p.B
P.F.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 591 ng/l Leukozyten: o.p.B
E.G.	TA: 0 Stuhl: 1 Urin: 1	Gentamicin Ampicillin Meropenem Vancomycin	Pneumonie	CRP max.: 101mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B
A.H.	TA: 0 Stuhl: 1 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 139 ng/l Leukozyten: o.p.B
N.H:	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: 33 ng/l Leukozyten: o.p.B
E.J.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: 12,3 mg/l IL-8 max.: 33 ng/l Leukozyten: o.p.B
L.J.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische In- suffizienz	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B: Leukozyten: o.p.B
H.K.	TA: 3 Stuhl: 3 Urin: 3	Gentamicin Ampicillin Meropenem Vancomycin Metronidazol	Peritonitis Kathetersepsis	CRP max.: 60 mg/l. IL-8 max.: 117 ng/l Leukozyten: o.p.B.
L.O.	TA: 6 Stuhl: 3 Urin: 4	Gentamicin Ampicillin Meropenem Vancomycin	Kathetersepsis	CRP max.: 26 mg/l. IL-8 max.: 338 ng/l Leukozyten: o.p.B. Positive Blutkultur
D.R.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B: Leukozyten: o.p.B
N.R.	TA: 1 Stuhl: 1 Urin: 1	Gentamicin Ampicillin Cefotaxim Meropenem Vancomycin	Respiratorische In- suffizienz und Ventrikulitis	CRP max.: 54,2. IL-8 max.: 355 ng/l Leukozyten: o.p.B.

J.S.	TA: 2 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin Meropenem	Gastrointestinale Infektion	CRP max.: < 5mg /l. IL-8 max.: 111 ng/l Leukozyten: o.p.B.
T.S.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Gentamicin Ampicillin	Respiratorische Insuffizienz	CRP max.: 7 mg/l IL-8 max.: 107 ng/l Leukozyten: o.p.B
V.S.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B
M.S.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B
R.D.	TA: 0 Stuhl: 0 Urin: 0	Keine	Keine	CRP max.: < 5 mg/l IL-8 max.: o.p.B. Leukozyten: o.p.B
M.Z.	TA: 3 Stuhl: 2 Urin: 4	Gentamicin Ampicillin	Sepsis bei Peritonitis	CRP max.: 98 mg/l IL-8 max.: 565 ng/l Leukozyten: o.p.B.

3.11 Übersicht über die Gewinnung des Biomaterials

Die Probengewinnung erfolgte unter gleichbleibenden, standardisierten Bedingungen unter Einhaltung von „Standard Operation Procedure“ (SOP, siehe Anhang). Ärztliches und pflegerisches Personal wurde in dieser SOP unterwiesen und diese ausgehändigt. Das gewonnene Biomaterial wurde nach Entnahme bei +4°C auf der jeweiligen Station zwischengelagert. Täglich wurden ggf. neu gewonnene Proben gesammelt und innerhalb von < 12 Stunden im Labor der Klinik für Kinder und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg verarbeitet. Hier erfolgte eine Aliquotierung und Zuteilung einer pseudonymisierten Identifikationsnummer. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank des Labors asserviert.

Trachealaspiratproben wurde bei jedem anfallenden endotrachealen Absaugvorgang gewonnen und unmittelbar verarbeitet.

3.11.1 Gewinnung des Probenmaterials

Gewinnung der Stuhlproben

Alle Stuhlproben wurden entweder auf der neonatologischen Intensivstation oder auf einer peripheren neonatologischen Station der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universitätsklinik Marburg gewonnen.

Die Abnahme der Stuhlproben erfolgte aus den Windeln der Studienteilnehmer. Der erste Stuhl (Mekonium) und darauf folgend einmalig wöchentlich wurde Probenmaterial

gewonnen. Hierzu wurde die Windel vorsichtig geöffnet, um eine weitere Verunreinigung mit Urin zu verhindern. Ohne Berührung der Windel wurde mittels Löffel (integriert in den Deckel des Probenröhrchens) eine geringe Menge an Material entnommen und in ein entsprechendes Probenröhrchen gefüllt und dieses anschließend mit beiliegendem Deckel verschraubt, mit Abnahmezeitpunkt und Patientennamen versehen und bei +4 °C auf der jeweiligen Station verwahrt.

Im Regelfall würde der Stuhl außerhalb dieser Studie verworfen werden. Ausgenommen sind Patienten, bei welchem aus klinischer Indikation der Stuhl zur weiteren Diagnostik (z.B. auf pathogene Keime) in die Mikrobiologie und/ oder Virologie des Universitätsklinikums Marburg versandt werden würde.

Tabelle 15: Materialien zur Stuhlprobengewinnung und Verarbeitung

Material	Hersteller
Windel	Procter & Gamble Germany, Schwalbach im Taunus
Stuhlprobenentnahmeröhrchen	Paul Böttger oHG, Bodenmais
Handschuhe	Nobamed Paul Danz AG, Wetter

Gewinnung der Urinproben

Während des stationären Aufenthaltes in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universitätsklinik Marburg wird routinemäßig von den stationären Patienten Urin für die klinische Chemie gesammelt. Im Rahmen dieser Studie wurde eine zusätzliche Probe zur Analyse gewonnen.

Aus einem speziellen Urinbeutel für Säuglinge wurde mittels einer Urinmonovette Urin gewonnen. Auf diese Monovette wurde eine Entnahmespitze aufgesetzt und gesammeltes Probenmaterial aus dem Urinbeutel aspiriert. Die Lagerung und Beschriftung der Urinmonovette bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte nach Abnahme der Entnahmespritze analog zur Stuhlprobengewinnung (siehe Gewinnung der Stuhlproben).

Tabelle 16: Materialien zur Urinprobengewinnung

Material	Hersteller
Urinmonovette inkl. Entnahmespitze	Sarstedt, Nümbrecht, D
Urinbeutel für Säuglinge	Braun, Melsungen, D

Gewinnung des Trachealsekrets

Alle Trachealsekretproben wurde von endotracheal beatmeten Patienten auf der neonatologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Marburg gewonnen (Gewinnung siehe „SOP endotracheales Absaugen“ im Anhang).

Dies erfolgte meist im Rahmen der Erstversorgung. Ein Teil der Proben wurde jedoch bei länger andauerndem Beatmungsintervall oder re-intubierten Patienten gewonnen. Anschließend wurde die Trachealsekretfalle von dem Absaugsystem gelöst, verschlossen und mit Entnahmezeitpunkt sowie Patientennamen versehen und bei +4°C bis zu Weiterverarbeitung verwahrt.



Abbildung 4. : Gewinnung von Trachealsekret im Rahmen der Erstversorgung

- 1: Patient
- 2: Tubus
- 3: Absaugkatheter
- 4: Trachealsekretfalle

3.11.2 Verarbeitung des Probenmaterials

Verarbeitung der Stuhlproben

Innerhalb von < 12 Stunden wurden die Proben im Forschungslabor für Neonatologie und pädiatrische Immunologie weiterverarbeitet. Hier erfolgte eine Aliquotierung der Stuhlproben. In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurde 0,2 g Stuhl aus dem Stuhlprobenentnahmeröhrchen abgefüllt. Zu dieser Menge wurden 100 µl physiologische Kochsalzlösung (NaCl) pipettiert und anschließend über wenige Sekunden zentrifugiert. Abschließend

wurde das Gemisch aus Stuhl und NaCl mittels Vortexen homogenisiert, mit einer pseudonymisierten Identifikationsnummer beschriftet und bei -80°C tiefgefroren. Bei einer größeren Menge an Probematerial wurden mehrere Reaktionsgefäße nach oben geschilderten Verfahren aufgearbeitet.

Verarbeitung der Urinproben

Innerhalb oben genannter Frist wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäße 500 µl Urin pipettiert, pseudonymisiert und bei -80°C gelagert.

Verarbeitung des Trachealsekrets

Aus dem Röhrchen der Trachealsekretfalle wurde eine Menge von 250 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend pseudonymisiert und bei -80°C gelagert.

3.12 Tierexperimenteller Abschnitt der Arbeit

3.12.1 Amnionproben von Schafen

Die untersuchten Amnionproben der Schafe wurden von einem Kooperationslabor der Universität Maastricht (Medizinische Universität Maastricht, Abteilung für Pädiatrie, Maastricht 6202 AZ, Niederlande, Direktor der pädiatrischen Forschung Prof. Dr. B. Kramer) zur Verfügung gestellt.

Alle Tierversuche wurden von der Tierethikkommission der University of Western Australia (Referenznummer RA/3/100/312) genehmigt und an der University of Western Australia (Perth, Australien) durchgeführt. Diese Studie wurde von den Ethikkommissionen für Tiere des Children's Hospital Medical Center in Cincinnati und dem Landwirtschaftsministerium von Westaustralien genehmigt.

Die experimentellen Untersuchungen an Merinoschafen wurden in Perth durchgeführt (NIKIFOROU et al., 2016).

Ultraschallgesteuert wurden 53 trächtigen Mutterschafen nach Randomisierung einzelne intraamniotische Injektionen verabreicht. Hierbei handelte es sich um unterschiedliche Arten von Injektionen. In dieser Studie wurden Amnionproben untersucht, welche Ureaplasma parvum (UP), Interleukin 1- α (IL-1 α) oder Kontrollmedium enthielten.

Die UP-Gruppe, erhielt 2 ml Kochsalzlösung mit Ureaplasma parvum serovar 3 (2×10^7 koloniebildende Einheiten) oder ein Kontrollmedium 14 Tage (n = 5), 7 Tage (n = 11) oder 3 (n = 12) Tage vor operativer Entbindung.

Die IL1- α Gruppe erhielt rekombinantes Rinder -IL-1 α am 7 (n=7), 3 (n=5) oder 1 (n=7) Tag vor der Entbindung. Hierbei handelte es sich um eine Applikation von 100 μ g IL-1 α (Protein Express, Cincinnati, USA) (siehe Abbildung 5).

Am 124. Gestationstag wurden die Schafe entbunden. Der gewählte Entbindungstag entspricht etwa der 28. bis 32. SSW beim Menschen, einer kritischen Phase der Entwicklung. Dieser Zeitpunkt wurde basierend auf früheren Ergebnissen zur Kinetik von UP-induzierten Veränderungen in Lunge und Darm und der schnellen Reaktion auf rekombinantes IL-1 α gewählt (COLLINS et al., 2010).

Eine Probe Amnionflüssigkeit wurde jeweils während der chirurgischen Entbindung steril entnommen, schockgefroren und bis zu Analyse bei -80°C gelagert. Ureaplasmen konnten zu 100 % kulturell aus Amnionflüssigkeiten gewonnen und detektiert werden. In der Amnionflüssigkeiten mit Kontrollmedium gelang kein kultureller, mikrobiologischer Nachweis (ROBINSON et al., 2013).

Die CA wurde durch histologische Analyse bei allen Mutterschafen mit UP- und IL-1 α -Injektionen bestätigt (WOLFS et al., 2011)

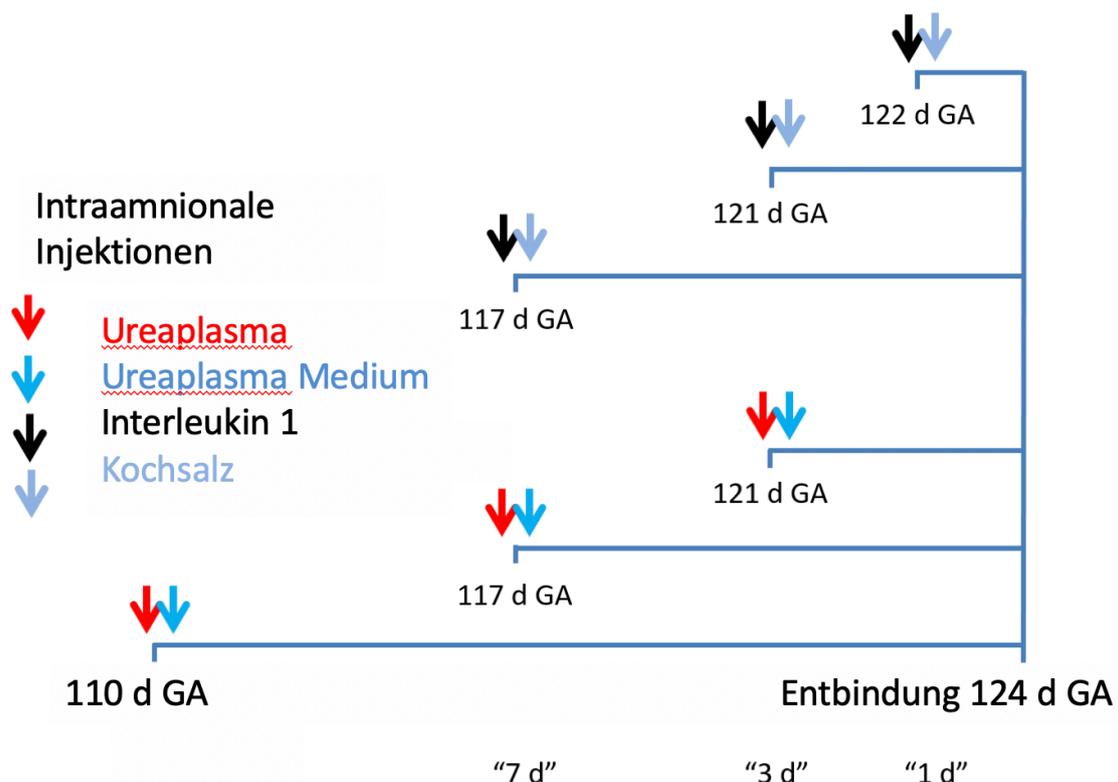


Abbildung 5: Studiendesign der Amnionproben

Eine vorgeburtliche Inflamationsreaktion wurde durch einzelne intraamniotische Injektionen induziert. Der Entbindungstermin wurde am Tag 124 gewählt.

(d= Tag; GA= Gestationsalter)

3.12.2 Behandlungsprotokoll

Für die Auswertung erfolgte eine Einteilung der Amnionproben in unterschiedliche Gruppen, abhängig von der Art und Zeitpunkt der Behandlung. Es wurden Proben unterschiedlicher Jahre analysiert. Hierbei kamen Proben aus den Jahren 2008 und 2010 zur Anwendung.

Schafe mit intraamniotischer Injektion von UP bildeten Gruppe 1.

Gruppe 2 wurde gebildet aus Merinoschafen, deren Amnionhöhle mittels Lipopolysacchariden von *Escherichia coli* (055:B5, Sigma Aldrich, USA, St Louis, Missouri) beimpft wurde.

Schafe welche IL-1 α ausgesetzt waren, bildeten Gruppe 3 (s. Tabelle 16).

Alle Schafe wurden vorzeitig (Gestationstag 124) operativ entbunden. Die physiologische Tragedauer beträgt 148 ± 2 Tage.

Gruppe 2 wurden nur durch die eNose analysiert. Dies war der geringen Fallzahl von Endotoxinproben geschuldet.

Tabelle 17: Übersicht der Protokolle

Gruppe 1	Ureaplasma parvum
Gruppe 2	Endotoxin (LPS)
Gruppe 3	IL-1a

3.12.3 Allgemeines Prinzip der eNose

Eine eNose stellt ein handliches, technisches System zur Messung volatiler organischer Verbindungen dar. VOCs sind ein Überbegriff für flüchtige, schon bei niedrigen Temperaturen (z.B. Raumtemperatur) vorkommende, organische (d.h. kohlenstoffhaltige) Verbindungen in Gasform.

Elektronische Nasen imitieren das menschliche Geruchsorgan und wandeln chemische Signale in elektronische um.

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung elektronischer Nasen war die Entdeckung und Entwicklung von geeignetem Material, welches eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien aufwies. Im Jahr 1950 wurden erste Studien über die Messung und Veränderung von Oberflächenspannungen nach Bindung von flüchtigen organischen Substanzen durchgeführt (PEARCE, 1997). Es gibt unzählig verschiedene Sensoren. Allen gemeinsam ist jedoch, dass jeder Sensor unspezifisch ist und erst die Summe aller Sensoren zusammen, ermöglicht die Identifizierung von Stoffen bzw. VOC, ohne jedoch Angaben zu ihrer spezifischen Zusammensetzung leisten zu können (SAKTIAWATI et al.,

2019). Prinzipiell können die Sensoren ausgetauscht und an das Probenmaterial angepasst werden. Dies ist Vorteilhaft, um komplexe Stoffen erfolgreich zu analysieren (KERMANI et al., 1999; MACHADO et al., 2005).

Theoretisch besteht eine eNose aus drei Komponenten: Ein System zur Aufnahme des Probenmaterials, einem Detektionssystem und einem System zur Datenspeicherung und -analyse. Jeder Sensor ist mit unterschiedlichen Polymerstrukturen bedeckt.

Gasförmige Moleküle werden vom (für diese flüchtige Verbindung sensiblen) Polymer reversibel absorbiert. Durch unterschiedliche Affinitäten der Polymere zu den organischen Verbindungen kommt es zu einer Änderung der elektrischen Leitfähigkeit, woraufhin komplexe Signalspektren der Sensoren resultiert. Diese Ausgangsdaten werden mit Hilfe mathematischer Algorithmen reduziert. Durch jeden dieser 32 Sensoren ergeben sich Zahlen zwischen null und eins. Folglich setzt sich ein smellprint aus 32 Zahlenwerten zusammen. Durch das Verhältnis und die Verteilung der verschiedenen Signalstärken untereinander ergeben sich verschiedene Muster. Diese Muster sind für jede Probe individuell und entsprechen digitalen Fingerabdrücken von Gerüchen (smellprints) (BOOTS et al., 2012) (siehe Abbildung 6).

Durch Musteridentifikation (pattern recognition) mittels mathematischer Algorithmen kann die eNose charakteristische (bisher unbekannte) smellprints erkennen, ähnlich wie das menschliche Gehirn Gerüche wiedererkennen kann (PERSAUD, DODD, 1982; THALER, HANSON, 2005). Hierdurch ist auch ein „Lernen“ der eNose möglich (FARRAIA et al., 2019). Wenn neue, unbekannte VOCs auf die eNose treffen, werden diese mit ihrer Datenbank verglichen und eine Zuordnung ermöglicht. Umso mehr Proben die eNose analysieren kann, desto größer ist ihr Lerneffekt und die Treffsicherheit wird erhöht.

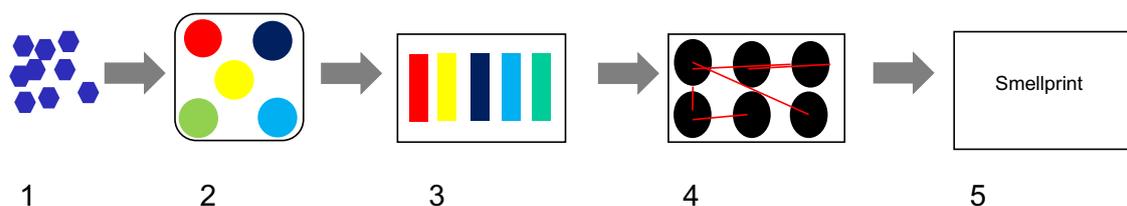


Abbildung 6: Funktionsweise einer eNose

- 1: Aufnahme der gasförmigen Moleküle
- 2: Absorption und Bindung der Moleküle am Polymer-Matrix
- 3: Änderung der Leitfähigkeit von Sensoren
- 4: Entstehen komplexer Signalspektren
- 5: Erstellung eines Smellprints

3.13 Grundlagen der Ionenmobilitätspektrometrie

3.13.1 Allgemeines Prinzip

Grundgedanke der IMS basiert auf der Tatsache, dass sich Ionen im elektrischen Feld gegen die Strömung eines Gases bewegen (driften). Dieser Drift ist anhängig von Masse und Struktur eines Ions. Dies ermöglicht ein Analyseverfahren zur Detektion chemischer Substanzen in Gasgemischen (ZHANG et al., 2021).

Die IMS-Technologie wurde um 1970 entwickelt und diente vor allem dem Militär zur Detektion von giftigen oder explosiven Substanzen (BAUMBACH, EICEMAN, 1999).

Prinzipiell setzt sich ein IMS aus folgenden drei Komponenten zusammen: Ionisationsraum, Driftraum und Detektor.

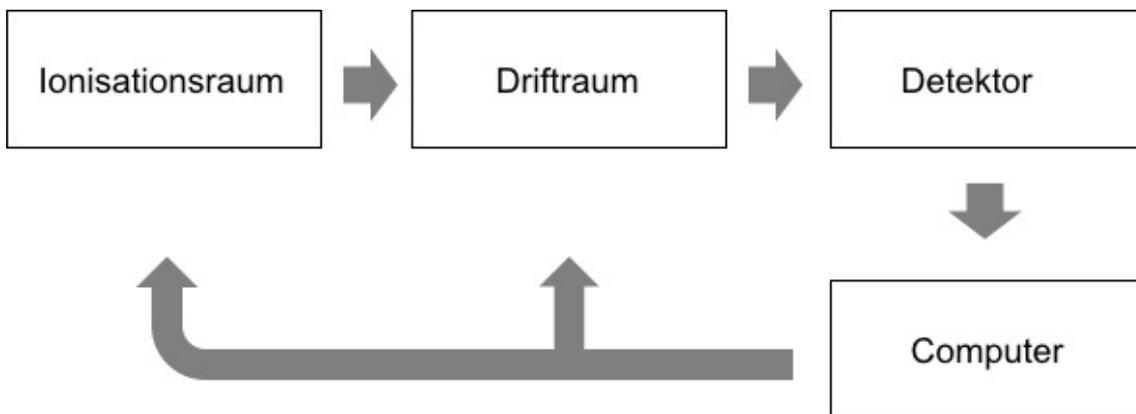


Abbildung 7: Skizze IMS

Ein gasförmiger Analyt wird innerhalb des Ionisationsraumes ionisiert und anschließend in einen Driftraum überführt. Innerhalb dieses Raumes liegt ein elektrisches Feld an, indem sich die Ionen in Richtung Detektor bewegen. Dieser Bewegung entgegen strömt ein Driftgas, welches für Kollision der Moleküle sorgt und die im Driftraum befindlichen Moleküle verlangsamt. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur und Masse erreichen die Ionen unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten und treffen zu unterschiedlichen Zeiten auf den Detektor, welcher die Ionenmobilität ermittelt. Nach Absorption im Detektor entstehen Spannungen. Durch eine Software werden die auftreffenden Stoffe in elektronischen Signalen transferiert, weiterverarbeitet und können graphisch als Ionenmobilitätspektrogramm abgebildet werden.

3.13.2 Funktion und Komponenten

Ein IMS besteht aus einer Messröhre, welche durch ein Einlassgitter in zwei Räume getrennt ist: Einen Reaktionsraum und den Driftraum.

Über diese beiden hinweg ist eine elektrische Spannung angelegt. Durch die eine Anordnung von Driftringen wird ein möglichst homogenes elektisches Feld erzeugt. Zu einer der Hauptkomponenten eines IMS gehört der Reaktionsraum. Dieser stellt den ersten Sektor dar, besteht aus einer Ionisationsquelle ist durch ein Einlassgitter vom Driftraum abgetrennt.

Im Reaktionsraum werden die zu analysierenden Moleküle durch eine Ionisationsquelle ionisiert. Bei diesem Ionisationsvorgang entstehen positive und negativ geladenen Ionen. Von Relevanz für die Messung sind primär die positiv geladenen Ionen.

Ionisierte Moleküle des Trägergases werden als Reaktionsionen bezeichnet und reagieren mit umgebenden Molekülen zu Produkten. Hierbei entstehen hauptsächlich Monomere (Reaktionsion reagiert mit einem Molekül des Analyts). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich Dimer bilden können. Dies ist bei sehr hohen Stoffkonzentrationen möglich. Diese Dimere können im Rahmen der Messung als „Nebenpeaks“ kenntlich werden.

Ionen des Trägergases werden Reaktand-Ionen genannt. Sie kommen in jedem Gasgemisch vor und erzeugen somit in jedem Spektrum einen sogenannten Reaktand-Ionen-Peak (RIP).

In dieser Studie wurde als Ionisationsquelle ein β -Strahler mit ^{63}Ni -Strahlenquelle verwendet.

Nach erfolgter Ionisation gelangen die ionisierten Moleküle in den Driftraum.

Das nun ionisierte Analyt ist von dem folgenden Driftraum durch ein Einlassgitter getrennt, welches periodisch geöffnet und geschlossen werden kann. Beispielsweise alle 100 ms kommt es zu einer Öffnung für einen Zeitraum von etwa 0.3 ms. Somit kann der Einlass der ionisierten Substanzen reguliert werden.

Bei Öffnung kommt es zu einem schwarmartigen Einstrom in den Driftraum, bis sich das Gitter durch ein aufgebautes elektrisches Feld erneut verschließt. In diesem liegt ein elektrisches Feld mit einer Stärke von $\approx 300 \text{ V/cm}$ vor.

Angetrieben durch ein angelegtes elektisches Feld gelangt der Analyt in Richtung Detektor und wird durch ein Gas „gezogen“. Der Minuspol befindet sich hinter dem Detektor.

Der Driftraum ist mit Driftgas gefüllt. Nach Beschleunigung wird eine konstante Geschwindigkeit (ca. 10m/s) im elektrischen Feld erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde synthetische Luft (N_2+O_2 Synthetische Luft Scientific; Air Liquid, Düsseldorf, Deutschland) als Driftgas verwendet.

Dieses Driftgas besitze eine Reinheit von >99,99 mol %, setzt sich aus Stickstoff (75,0 %) und Sauerstoff (20,5 %) zusammen, um eine potentielle Verunreinigung durch das zugeführte Trägergas zu verhindern.

Die Wanderung der Ionen entlang einer definierten Wegstrecke (aufgrund des elektrischen Feldes) erfolgt gegen die Strömungsrichtung eines Driftgases. Abhängig von ihrer Form, Masse und chemischen Eigenschaften kommt es permanent zu mehr oder weniger Kollisionen mit den neutralen, entgegenströmenden Driftgasmolekülen und es folgte so eine Separation des Ionengemischs.

Die entstehenden Reibungskräfte sind bei größeren Molekülen stärker, so dass sich kleinere Moleküle mit höherer Geschwindigkeit bewegen können. Durch Kollision nehmen die Ionen Energie auf und geben diese bei erneutem Zusammenstoß wieder ab. Durch entstehenden Kollisionen erreichen die Ionen unterschiedliche, für sie typische Driftgeschwindigkeiten.

Eine sogenannte Faraday-Platte diene als Elektrode und Detektor. Die hier auftreffenden Ionen werden detektiert, transferieren ihre Ladung und erzeugen ein Signal, welches durch einen Strom- Spannungswander verstärkt wird.

Die gemessene Spannung korreliert mit der Menge der auftreffenden identischen Analyte und kann gegen die Driftzeiten aufgetragen werden. Hierdurch erhält man ein zweidimensionales IMS-Spektrum (s. Abbildung 7).

Dieser ganze Vorgang dauert ungefähr 50 ms.

Die mittlere Geschwindigkeit wird als Ionenmobilität bezeichnet. Je länger die Driftzeit ist, desto höher ist auch das Molekulargewicht des Analyt-Ions.

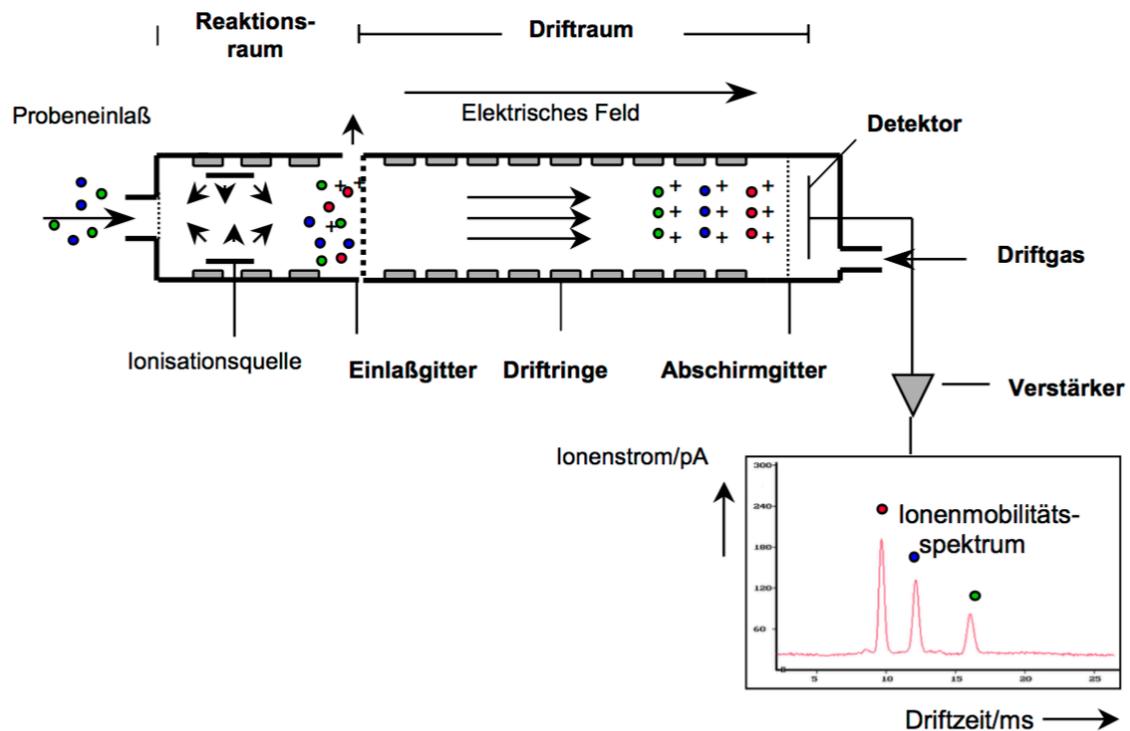


Abbildung 8: Skizze IMS, modifiziert nach B&S Analytik, (Schumann, 2001)

Die zu untersuchende Probe wird ionisiert und gelangt in den Driftraum. Durch die Ionisierung bewegt sich die Probe entlang eines elektrischen Feldes gegen das Gas im Driftraum. Durch Abbremsung und Kollision treffen die Proben je nach Größe der Ionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf den Detektor. Die hierdurch entstehende Spannung wird durch eine Software verarbeitet und als Ionenmobilitätsspektrum graphisch dargestellt.

In folgender Tabelle ist eine Zusammenfassung der Betriebsparameter des verwendeten MCC-IMS gelistet.

Tabelle 18: Betriebsparameter MCC-IMS

Parameter	Einstellung
Elektrische Feldstärke	$300 \frac{V}{cm}$
Ionisationsquelle	β -Strahler ($^{63}\text{Nickel}$)
Driftstrecke	12 cm
Druck	Umgebungsdruck
Driftgasfluss	$100 \frac{ml}{min}$

3.14 Versuchsdurchführung zur Analyse der volatilen organischen compounds von Amnionproben

Einerseits wurden Amnionproben der Merinoschafe mittels eNose untersucht, andererseits (im einem zweiten Schritt) mittels IMS analysiert.

3.14.1 Versuchsdurchführung zur Analyse der Smellprints

3.14.2 Analyse der Proben mittels eNose

Nach Erwärmung der Probe auf +37°C wurden die volatilen organischen Verbindungen des jeweiligen Biomaterials mittels eNose analysiert. Dazu wurde ein Probengas-Sampler der eNose in das Reagiergefäß geführt, ohne den Rand oder das Probenmaterial zu berühren. Ein bereits auf der eNose hinterlegtes Programm wurde gestartet und die jeweiligen VOCs der Proben aspiriert. Während dieses Vorgangs wurde über 60 sec. hinweg ein definiertes Gasvolumen angesaugt, über die verbauten Sensoren der eNose geführt und ein entsprechender Smellprint erstellt und digital gespeichert.

Nach jeder absolvierten Analyse folgte ein „Spülvorgang“ der eNose über eine angeschlossene Verbindung mittels Druckluft nach DIN 12021.

Innerhalb eines kurzen Zeitintervalls wurden die Bioproben gemessen und die äußeren Bedingungen so konstant wie möglich gehalten.

Hierdurch sollten mögliche Artefakte unterbunden werden, um homogene Messungen zu ermöglichen.



Abbildung 9: eNose Versuchsaufbau

- 1: Probenmaterial
- 2: Probengassamplifier der eNose
- 3: eNose
- 4: Druckluft,
- 5: Laptop
- 6: zuführender Luftschlauch zur „Spülung“ der eNose

In folgender Tabelle sind die benötigten Materialien und Software zur Probenanalyse der eNose gelistet.

Tabelle 19: Materialien und Software für die eNose

Material	Hersteller
Cyrano 320™	Smiths Detection Group Ltd., Watford, UK
PC Nose 6.9	Cyrano Sciences Inc. Smiths Detection, Watford, UK
Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Druckluft DIN 12021	Linde, Pullach, D
AccuBlock™ digital drybath	Labnet Int., Woodbridge, USA

3.14.3 Versuchsdurchführung zur Analyse der VOC der Amnionproben

Alle Messungen wurden unter Berücksichtigung der SOP bei gleichbleibenden und standardisierten Bedingungen durchgeführt.

Analyse der VOCs wurden mittels Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätssektrometers (MCC-IMS) durchgeführt.

Eine isotherme Vortrennung wurde bei 40°C mit einer OV-5-Multikapillarsäule bei einem Fluss von 150 ml/min durchgeführt. Während der Probenaufnahme wurde der Driftfluss auf 100 ml/min eingestellt und die Ionen im positiven Modus erfasst. Die Sammelzeit betrug 20 Sekunden. Die Messungen erfolgten unter Umgebungsdruck.

Als Probenbehälter diente eine auf 37°C erhitzte Laborflasche (100 ml).

Ein Temperierbecken wurde mittels Umwälzthermostat auf +37°C erhitzt und das Erreichen dieser Zieltemperatur mittels Thermometer verifiziert.

Zur Versuchsdurchführung wurde ein geschlossenes System erstellt. Ein Messschlauch und ein Gasschlauch wurden mit dem Deckelventil konnektiert und mit dem Probeneingang des MCC-IMS-Geräts verbunden. Beide Flaschen waren mit synthetischer Luft als Trägergas geflutet. Über einen externen Druckminderer erfolgte eine Flusssteuerung der zuführenden Luft.

Die Amnionproben wurden bei +4°C im Kühlschrank über eine fest definierte Zeit aufgetaut. 500 µl einer Amnionprobe wurden in die Laborflasche pipettiert und mittels Deckelventil verschlossen. Für jede Probe wurde eine neu, zuvor autoklavierte Laborflasche verwendet.

Ebenfalls erfolgte eine „Leermessung“ der Laborflasche mit synthetischer Luft zum Ausschluss von Artefakten und Kontaminationen im Analyseraum vor der endgültigen Probenmessung. Nach Probenmessung erfolgte ein Vorgang zur Spülung des Systems. Im Anschluss konnte eine neue Probenmessung erfolgen.

Die Steuerung des MMC-IMS erfolgte über einen angeschlossenen Laptop. Zur Probenanalyse wurde ein Softwareprogramm zur Datenvisualisierung und –auswertung gestartet, VOCs der Probe angesaugt und analysiert.

Nach Abschluss der Messreihe wurden die Messdaten selektiert und elektronisch verpackt. Der Datensatz wurde zur externen Auswertung an Prof. Dr. J. I. Baumbach (Hochschule Reutlingen) verschickt.



Abbildung 10: Frontansicht des MCC-IMS vom Typ „Breath Discovery“, Versuchsaufbau und Messanordnung

- 1: Laptop zur Datenaufnahme
- 2: MMC-IMS
- 3: Wasserbad mit Proben, Verbindungsschläuchen und Thermostat

In dieser Arbeit wurde ein MCC-IMS vom Typ „Breath Discovery“ (B&S Analytik) verwendet. Die zur IMS-Messung benötigten Materialien in folgender Tabelle gelistet.

Tabelle 20: Materialien IMS-Messungen

Material	Hersteller
MCC-IMS	BS-Analytik, Dortmund
Laptop	Dell, Round Rock USA

PC-Software Packet (VOCan, VisualNow)	BS-Analytik, Dortmund
Umwälzthermostat mit Temperierbecken	JULABO, Seelbach
GL 45 Laborflasche, 100ml	DURAN, Wertheim
Schraubverschluss GL 45 mit zwei Ports	DURAN, Wertheim
synthetischer Luft	AirLiquid, Düsseldorf
Pipette, 500 µl + Spitzen	Eppendorf, Hamburg
Aqua destillata	Braun, Melsungen
Gasdichte Leitungen	Bola, Grünsfeld
Reagiergefäß 2 ml	Eppendorf, Nümbrecht

3.14.4 Vorseparation mittels Multikapillarsäulen

Die alleinige Analyse komplexer Gasgemische mit der IMS kann Schwierigkeiten bereiten, wenn Ionen mit sehr ähnlichen Driftzeiten vorhanden sind und dies zu Überlagerungen der Signale führen könnte. Eine sichere Identifizierung wäre in diesem Fall nicht mehr möglich.

Um trotzdem aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, bedient man sich der Vorseparation mittels Multikapillarsäulen (multicapillary column, MCC).

Gewünscht ist z.T. die Analyse kleinster Teilmengen. Nur wenn auch diese Biomarker identifiziert werden können, ist evtl. ein Rückschluss auf Krankheiten oder auslösende Schlüsselsubstanzen möglich (BUSZEWSKI et al., 2007; SZYMANSKA et al., 2016).

Die verwendete Multikapillarsäule MCC-OV5 setzt sich aus ca. 1000 Kapillaren mit einem Durchmesser von jeweils 40 µm zusammen. Dies ergibt einen Durchmesser von 3 mm und ermöglichen einen hohen Probendurchfluss und zeitgleich eine schnelle Trennung.

Der für MCC optimale Durchfluss von bis zu 150 ml/s entspricht dem in der IMS üblicherweise verwendeten Trägerfluss.

Die Innenwände der Kapillaren sind mit einer sogenannten „stationären Phase“ ausgekleidet. Diese können aus unterschiedlichen Materialien bestehen, meistens aus einem Silikonpolymer. Die MCC werden beheizt und arbeiten im Temperaturbereich von 30°C oder 40°C.

Komponenten der Analyten mit hoher Affinität binden leichter an diese Phase und benötigen mehr Zeit beim Durchströmen der Kapillare, als andere.

Dies führt zu unterschiedlich langen Verweildauern. Die Länge der Verweildauer ist von der chemischen Beschaffenheit der Moleküle abhängig. Moleküle, welche sich durch die MCC bewegen, wechseln ständig zwischen der mobilen und stationären Phase.

Durch diese unterschiedlichen Retentionszeiten gelingt die gewünschte Vortrennung. Mittels MCC vortrennte Substanzen können im Anschluss ohne Verzögerung ins IMS überführt werden.

Durch diese Vorseparation der Proben wird letztendlich eine Reduzierung der Komplexität des Messsignals erreicht und auch kleinste Schlüsselsubstanzen können identifiziert werden (MADDULA et al., 2009).

In dieser Arbeit kam die MCC-IMS Technik zum Einsatz. Sie kombiniert diese zwei Technologien und wurde besonders für medizinische Zwecke entwickelt. Eine komplette MCC-IMS Messung dauert 10 Minuten (HAUSCHILD et al., 2013).

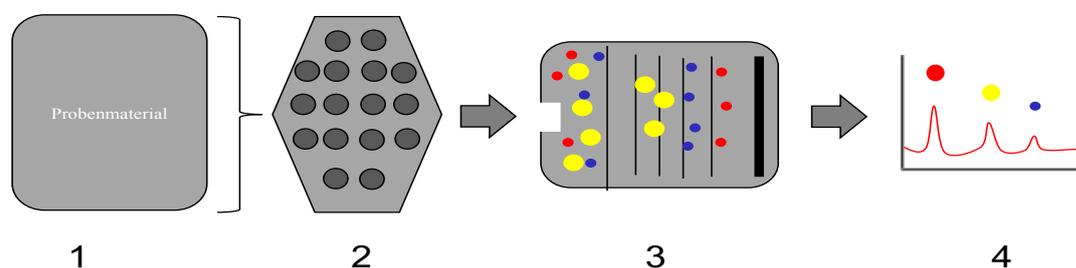


Abbildung 11: Versuchsaufbau MCC-IMS

Vortrennung der Probe mittels Multikapillarsäulen und Überführung in das Ionenmobilitätspektrometer mit anschließender graphischer Darstellung

- 1: Probenmaterial/ Analyt
- 2: Multikapillarsäule (MCC)
- 3: Ionenmobilitätspektrometer (IMS)
- 4: Ionenmobilitätspektrum

3.15 Statistik

3.15.1 Statistische Auswertung der Smellprints der eNose

Ziel der Auswertung von multiplen Messdaten der eNose ist eine Reduktion des ausgeworfenen Datensatzes (der komplexen Signalspektren) in einige wenige, virtuelle darstellbare Variablen oder Dimension zu beschränken. Die Datensätze der Messungen wurden mittels linearer Diskriminanzanalyse (LDA) statistisch ausgewertet.

Die LDA stellt eine Methode der Statistik dar, mittels derer zwischen zwei oder multiplen Stichprobengruppen differenziert werden kann. Dabei weisen die zu untersuchenden Gruppen z.T. mehrere Variable auf. Folglich gelingt somit eine adäquate Darstellung von Merkmalen durch Raumtransformation und dient als Diskriminanzfunktion.

Die in dieser Arbeit verwendeten Mahalanobis-Distanz (MD), dient als Distanzmaß zwischen Punkten im mehrdimensionalen Vektorraum

Eine Mahalanobis-Distanz größer als 1,96 (zwischen zwei Gruppen) wurde als signifikant angesehen (Konfidenzintervall > 95 %, $P < 0,05$).

Zusätzlich wurde eine Kreuzvalidierung zur Vorhersagegenauigkeit durchgeführt. Hierzu wurde der Kreuzvalidierungswert (CVV) mittels k-facher Kreuzvalidierung berechnet ($k = \text{Produkt der Gruppengröße}$). Der CVV zeigt die Wahrscheinlichkeit (in %) an, dass ein neuer hinzugefügter Punkt in das richtige Cluster zugeteilt wird. Mittels den Programmen R 3.0.2 (Prozess und Statistik, Dormagen, Deutschland), *Notepad++*, *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, USA) wurden die Analysen durchgeführt.

3.15.2 Statistische Auswertung der IMS-Ergebnisse von Amnionproben

Die statistische Auswertung der MCC-IMS Datensätze wurde mit der Software Visual Now-Software 2.5 (B & S Analytik, Dortmund Deutschland) durchgeführt.

Alle Peaks waren durch ihre spezifische Kombination aus Driftzeiten und Retentionszeiten gekennzeichnet.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Box-and-Whisker-Plots, Entscheidungsbäumen und Vierfeldertafeln.

In Kooperation mit Prof. Dr. Baumbach (Hochschule Reutlingen & BS-Analytik) erfolgte die Auswertung der durch MCC-IMS erfassten Datensätze.

3.15.3 Box-and-Whisker-Plots

Ein Box-and-Whisker-Plot (synonym Boxplot) ist eine Möglichkeit der graphischen Darstellung um Lage, Tendenz, Streuung oder potenzielle Ausreißer darstellen zu können. Begrenzt wird die Box (Rechteck) einerseits von 0,25 Quartil, andererseits vom 0,75 Quartil (auch Interquartilsabstand genannt). Innerhalb dieses Interquartilsabstand befinden sich die mittleren 50 % der Daten. Der Median wird durch eine horizontale Linie dargestellt. Verlängert wird die Box durch Whisker (vertikale Linien nach unten und oben), welche außerhalb der Box liegende Werte darstellt (ohne Ausreißer). Außerhalb der Whisker liegende Werte werden Ausreißer genannt. Die Whisker sind maximal 1,5 mal so lang wie die Box.

Ein Boxplot ermöglicht einen schnellen Überblick über die Verteilung von Werten. Folglich gibt die Box an, in welchem Bereich 50 % der Daten liegen. Mit Hilfe der Whisker wird deutlich, in welchem Bereich ein Großteil der Werte verteilt liegen und wie Ausreißer verteilt sind.

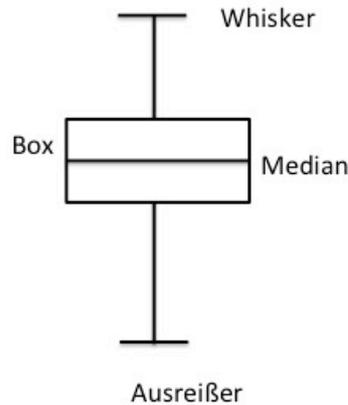


Abbildung 12: Box and-Whisker-Plot

3.15.4 Heatmap

Eine Heatmap ermöglicht eine graphische Darstellung der Signale für MCC-IMS-Messungen in Form eines zweidimensionalen Koordinationssystems. Die Darstellung der Signalintensitäten erfolgte als farbliche Kodierung. Hierzu wurde die Software „VisualNow“ verwendet. Software gestützt, besteht die Möglichkeit, Rohmessungen als Heatmap abzubilden, Filter anzuwenden oder Peak-Positionen manuell zu markieren und darzustellen.

Auf der x-Achse werden Driftzeiten in ms, auf der y-Achse die Retentionszeiten in sec. dargestellt. In einem solchen MMC-IMS-Chromatogramm ist die Identifizierung einzelner Peaks möglich.

In dieser Arbeit wurde folgende farbliche Klassifizierung der Signalintensitäten gewählt: weiß (niedrigste) < blau < lila < gelb (höchste).

3.15.5 Entscheidungsbaum

Entscheidungsbäume bezeichnen ein Diagramm, mit dem mehrstufige Entscheidungsprozesse graphisch abgebildet werden können. Einzelnen Ästen können Werte zugeordnet werden, welche die Wahrscheinlichkeit bestimmter Ereignisse angeben. Dies Verfahren wird üblicherweise verwendet, um „Data Mining“ durchzuführen. Dies ist ein Modell, welches auf der Basis von verfügbaren Daten (Eingangsvariablen), eine Voraussage über neue Daten (Zielvariablen) ermöglichen kann.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der eNose an humanen Biomaterial

4.1.1 Patientenkollektiv des Biomaterials von Frühgeborenen

Während der Studienphase wurden bei 27 Patienten über 500 Proben gewonnen und analysiert. 456 Proben gingen nach Abzug von doppelten Probenmaterial und Ausschluss der Speichelproben in die Auswertung ein. Die Gewinnung und Analyse von Speichelproben wurde aufgrund von Schwierigkeiten bei Abnahme und Probenaufbereitung nach wenigen Wochen eingestellt, nicht analysiert und aus der Studie ausgeschlossen.

Das Probenmaterial setzte sich zusammen aus 201 Stuhlproben, 198 Urinproben, 25 Trachealsekretproben und 32 Speichelproben.

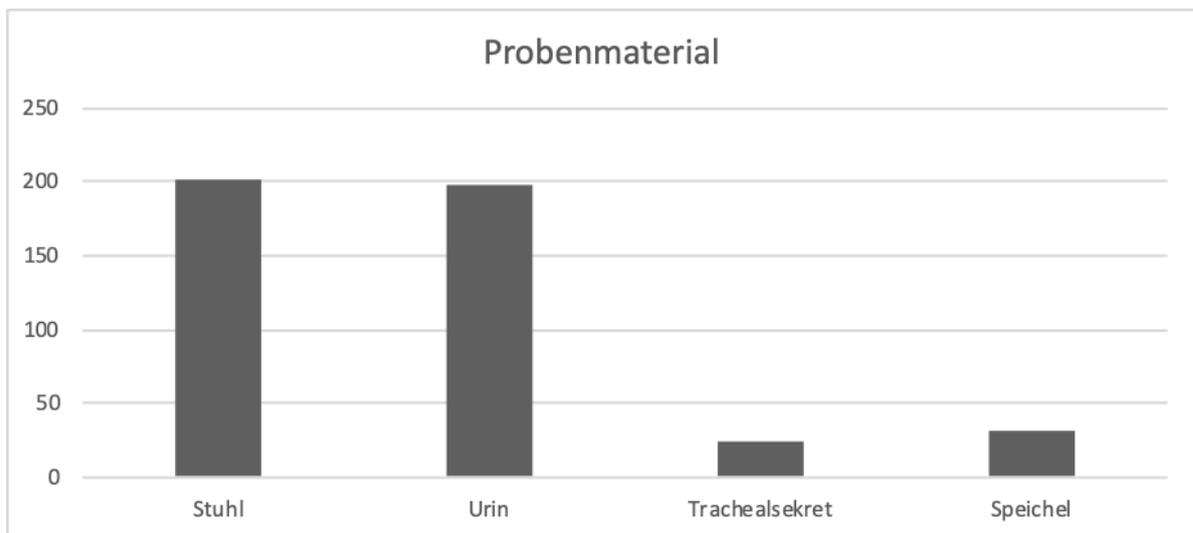


Abbildung 13: Zusammensetzung und Anzahl der Bioproben

4.1.2 Mehrfachentnahmen von Probenmaterial

In 55 Fällen wurden während des stationären Verlaufs (aufgrund von großer Menge an anfallendem Biomaterial) mehrere Proben gewonnen. Diese wurden ebenfalls analysiert, gingen jedoch nicht in die Auswertung ein.

4.1.3 Geschlechterverteilung

Die 27 Patienten setzten sich aus 12 weiblichen und 15 männlichen Studienteilnehmern zusammen.

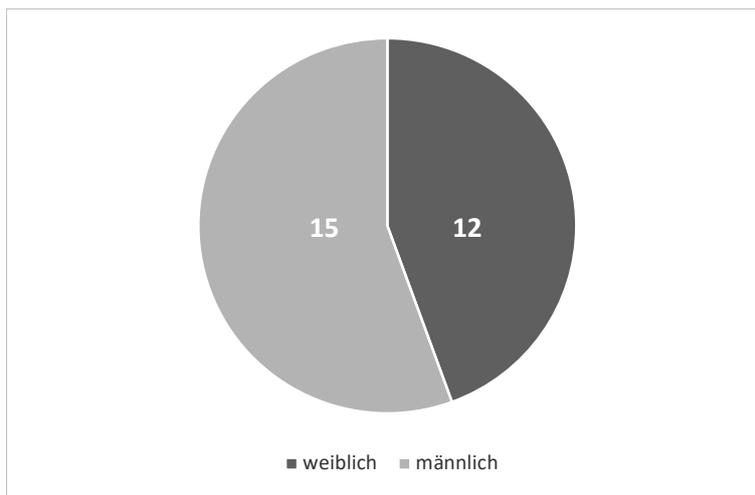


Abbildung 14: Geschlechtsverteilung der Patienten

4.1.4 Mehrlingsschwangerschaften

Im Patientenkollektiv kamen fünf Mehrlingsschwangerschaften vor. Diese bestanden aus sechs weiblichen und vier männlichen Patienten. In drei Fällen gab es gleichgeschlechtliche Zwillingsschwangerschaften, in zwei Fällen waren beide Geschlechter vertreten.

4.1.5 Gruppierung nach Reife

Zur besseren Übersicht erfolgte eine Einteilung der Patienten anhand des Gestationsalters in Schwangerschaftswochen:

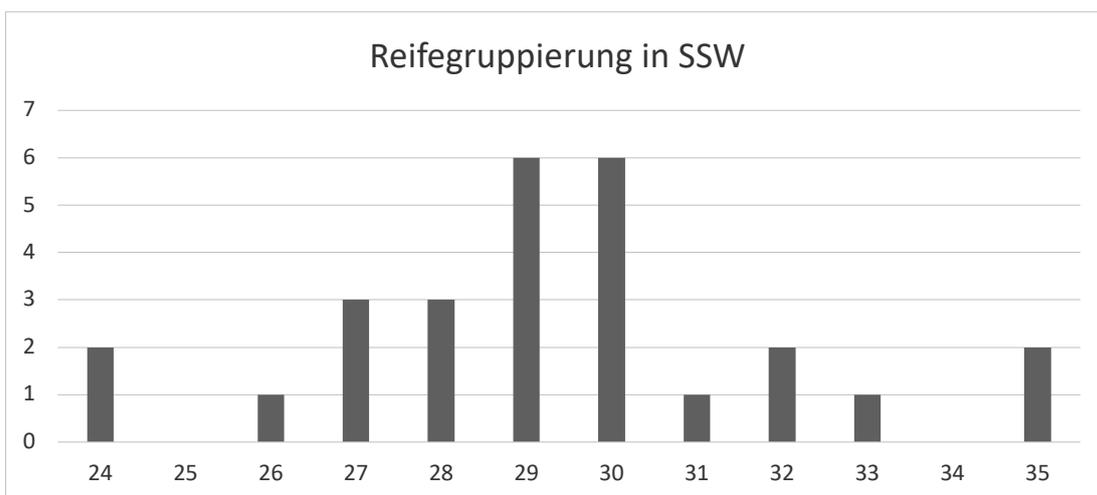


Abbildung 15: Reifegruppierung (Anzahl) in Schwangerschaftswochen

4.1.6 Gruppierung nach Geburtsgewicht

Die Spannweite des Geburtsgewichts reichte von 440 g bis 1815 g. 18 Patienten konnten in die Gruppe sehr untergewichtiger Frühgeborene (VLBW), acht in die Gruppe extrem untergewichtiger Frühgeborener (ELBW) zugeordnet werden, wobei zwei Studienteilnehmer ein Geburtsgewicht von unter 500 g hatten (Micropreemie). Ein Patient erreichte als Akzeptor im Rahmen eines fetofetalen Transfusionssyndroms ein Geburtsgewicht von 1815 g.

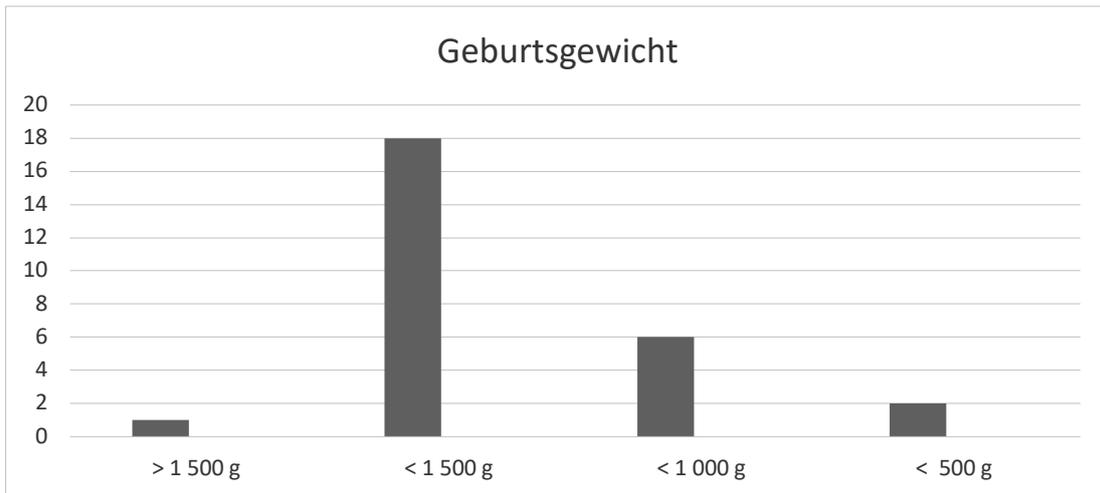


Abbildung 16: Geburtsgewicht der eingeschlossenen Patienten

4.1.7 Auswertung der Trachealsekretproben durch die eNose

Insgesamt wurden 25 Trachealsekretproben analysiert. Diese entstammten von 12 Patienten. Bei 6 Patienten erfolgte die Abnahme und Analyse von mehreren Proben. 14 der 25 Proben (56 % mit Infektion vs. 44 % ohne Infektion) wurden nach Anwendung des Infektionsscores als infektiös gewertet. Die Proben zeigten eine MD von 1,218 und eine CVV von 48,21 %.

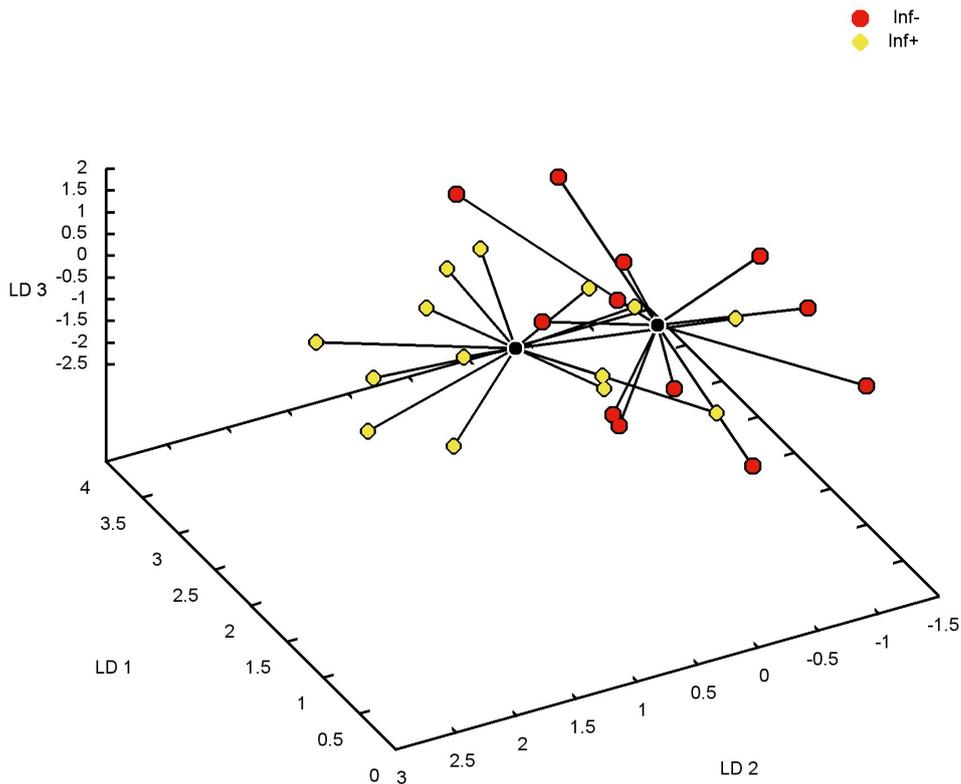


Abbildung 17: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse von Smellspints der Trachealsekretproben

Inf+ Infektion bestätigt
 Inf - keine nachgewiesene Infektion

Tabelle 21: MD und CVV der Trachealsekretproben

	Inf+
Inf-	MD: 1,218 CVV: 48,21 %

4.1.8 Auswertung der Stuhlproben durch die eNose

Von 27 Patienten entstammten 201 Stuhlproben. 19 dieser Proben wurden als infektiös klassifiziert (9 % mit Infektion vs. 91 % ohne Infektion). Es zeigte sich eine MD von 0,698 und die CVV lag bei 49,19 %.

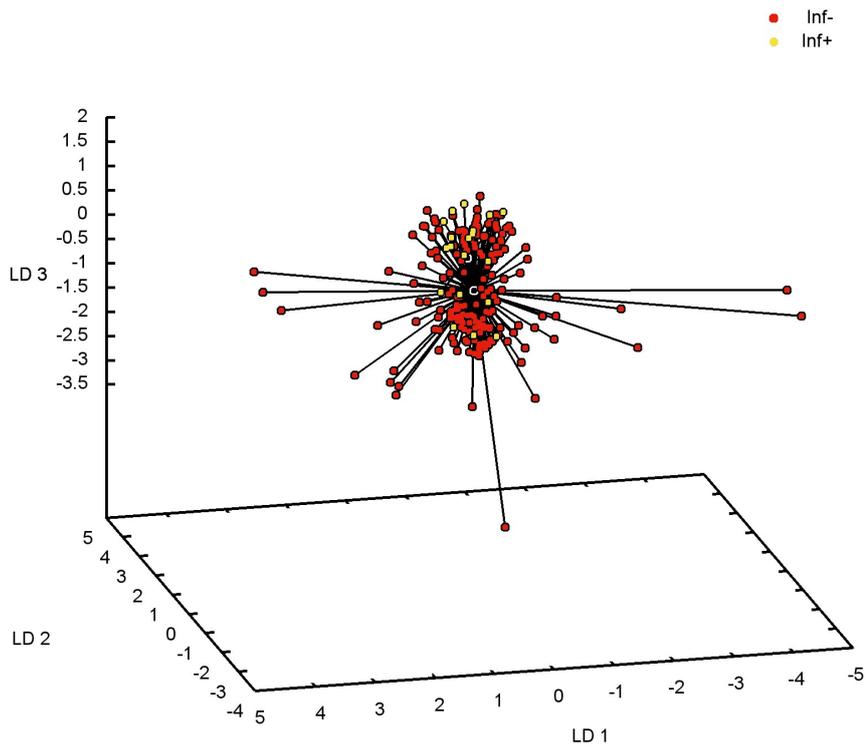


Abbildung 18: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellspints von Stuhlproben

Inf+ Infektion nachgewiesen
 Inf- keine nachgewiesene Infektion

Tabelle 22: M) und CVV der Stuhlproben

	Inf+
Inf-	MD: 0,698 CVV: 49,19 %

4.1.9 Auswertung der Urinproben durch die eNose

23 von 198 Urinproben bestätigten eine Infektion (12 % mit Infektion vs. 88 % ohne Infektion). Dieses Probenmaterial entstammte von 27 Studienteilnehmern. Diese Proben erbrachte eine MD von 1,638 und die CVV lag bei 58,05 %.

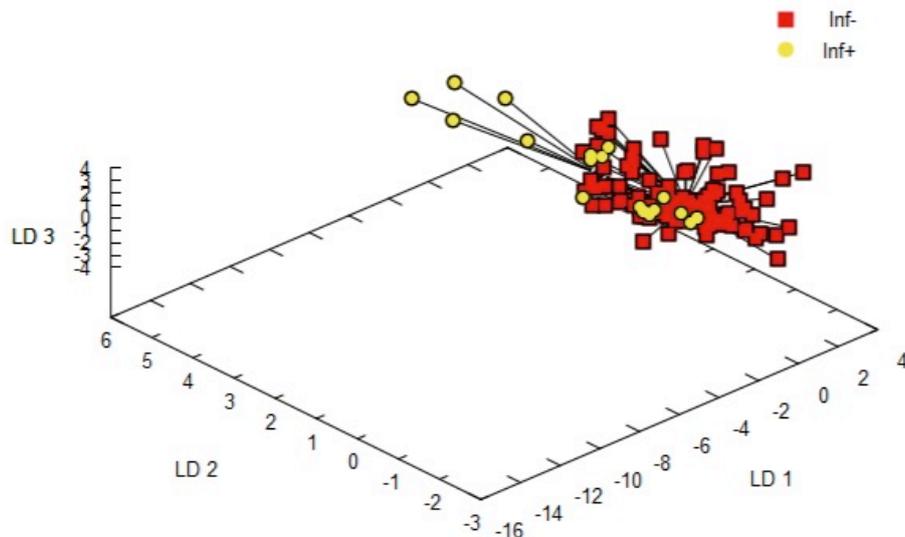


Abbildung 19: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse von Smellspints der Urinproben

Inf+ Infektion nachgewiesen
 Inf - keine Infektion nachgewiesen

Tabelle 23: MD und CVV der Urinproben

	Inf+
Inf-	MD: 1,638 CVV: 58,05 %

4.1.10 Probenkollektiv der Amnionproben von Schafen

Es wurden insgesamt 193 Proben mittels eNose analysiert. Von diesen Proben wurden in dieser Arbeit zusätzlich 62 Amnionproben durch MCC-IMS nachuntersucht.

4.1.11 Ergebnisse der Messungen mittels eNose

4.1.12 Gruppe 1 (*Ureaplasma parvum*)

Smellprints von Amnionproben unterschieden sich im Verlauf nach Induzierung einer Infektion mittels Ureaplasmen.

Tag 3 konnte von Tag 7 und 14 differenziert werden. CVV > 50 % und MD > 1.96), aber Tag 7 und 14 unterschieden sich nicht. MD > 1.96, CVV von 45,83 %.

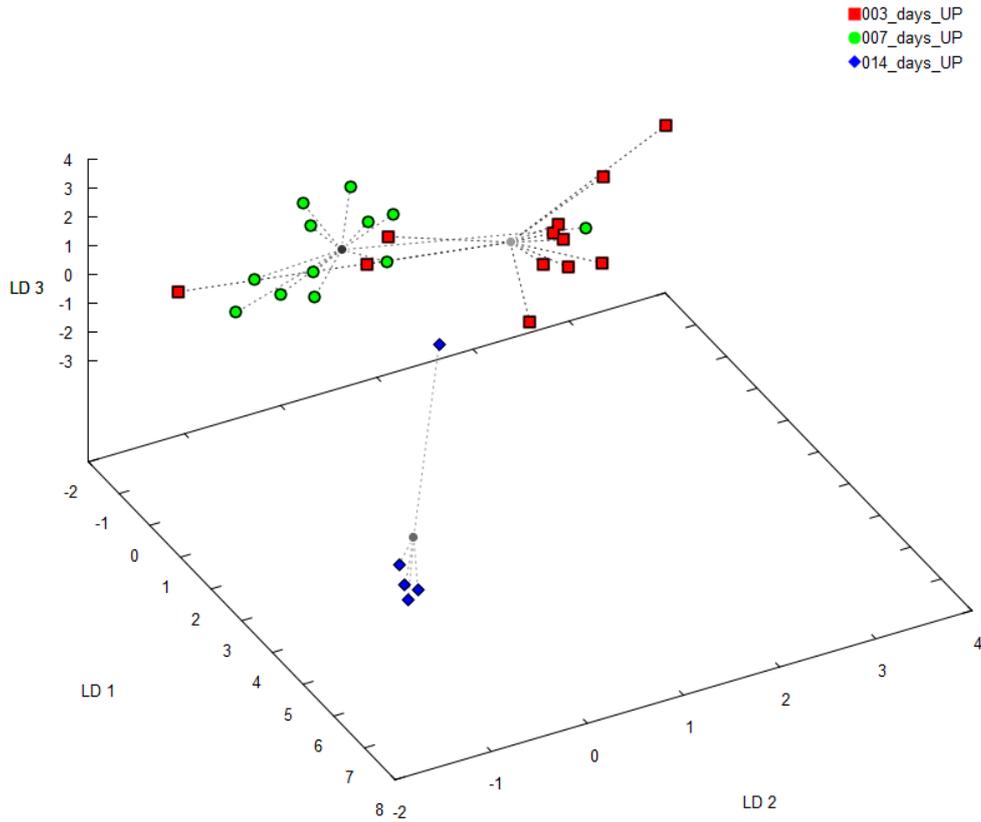


Abbildung 20: Diskriminanzanalyse der Smellspints der Gruppe 1

Unterscheidung der Ureaplasmen-Proben nach Tagen (3,7 und 14)

Tabelle 24: MD und CV, Protokoll 1 (UP)

	7 Tage UP	14 Tage UP
3 Tage UP	MD: 2,120 CVV: 61,46 %	MD: 3,193 CVV: 66,67 %
7 Tage UP		MD: 3,050 CVV: 45,83 %

4.1.13 Gruppe 3 (IL-1 α)

IL1- α behandelte Amnionflüssigkeiten zeigten folgende Messungen.

Die Differenzierung über die Tage erbrachte eine MD von < 1.96, bei einer CVV von > 53 %.

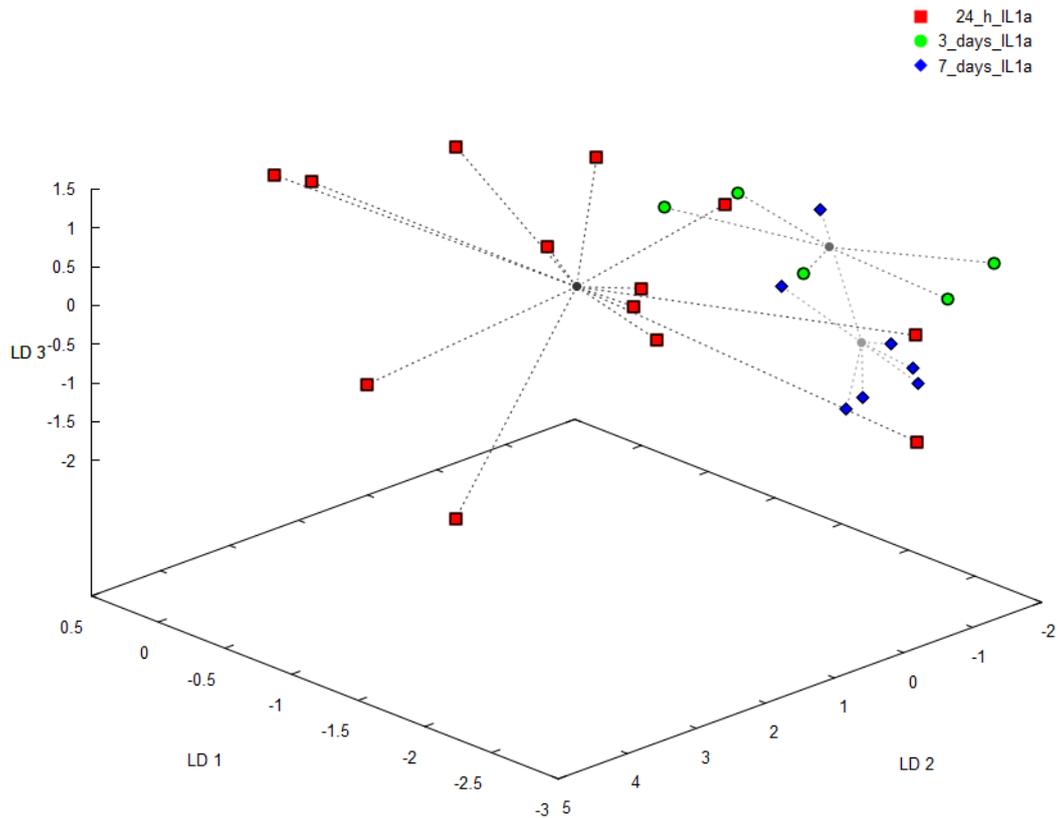


Abbildung 21: Diskriminanzanalyse der Smellprints Gruppe 3

Unterscheidung der IL-1-Proben nach Tagen (1,3 und 7)

Tabelle 25: MD und CVV, Protokoll 5 (IL-1 α)

	3 Tage IL-1α	7 Tage IL-1α
24 Stunden IL-1α	MD: 1,944 CVV: 62,23 %	MD: 1,521 CVV: 53,30 %
3 Tage IL-1α		MD: 1,662 CVV: 71,43 %

4.1.14 Vergleich Gruppen 1, 2 und 3

Der Vergleich der Amnionflüssigkeiten mit Ureaplasmen, Endotoxin und IL-1 α zeigte, dass Amnionflüssigkeit durch Ureaplasmen Instillationen von IL-1 α Proben differenziert wurden (MD von 2.039, CVV von 87,18 %).

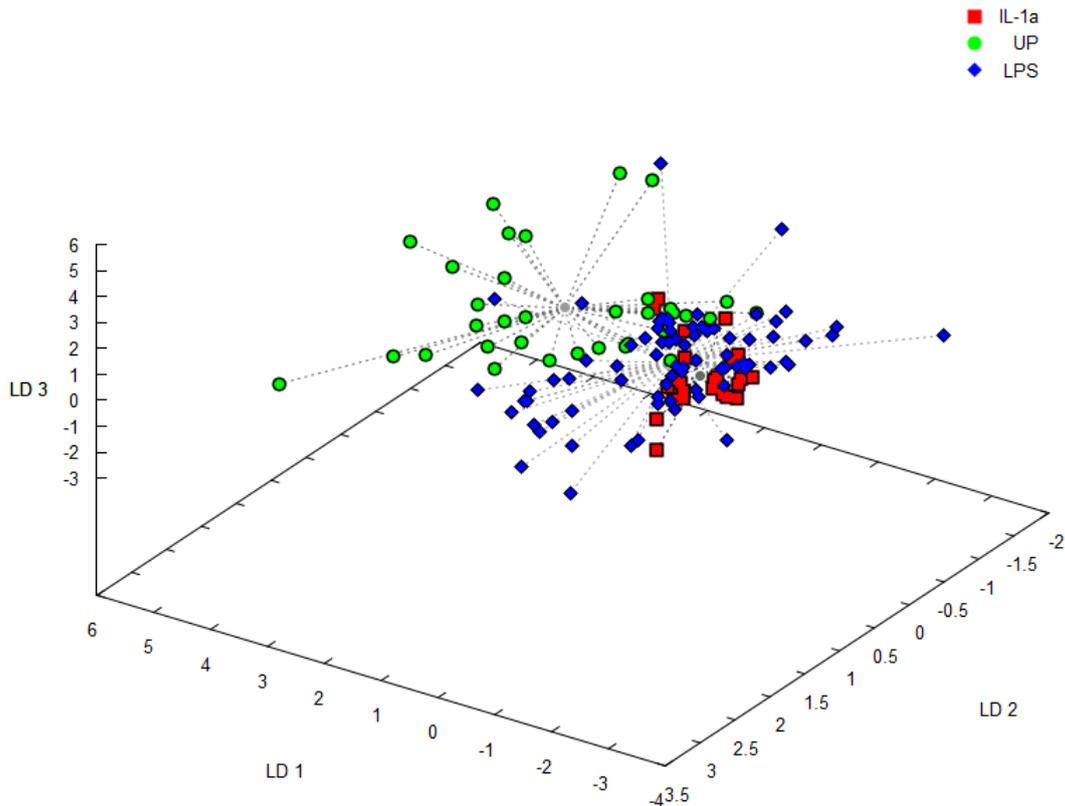


Abbildung 22: Diskriminanzanalyse der Smellprints Gruppe 1, 2 und 3

Protokoll 1,2 und 3, Proben aus 2008 und 2010

Tabelle 26: MD und CVV der Gruppen 1, 2 und 3

	UP	LPS
IL-1	MD: 2,039 CVV: 87,18 %	MD: 1,169 CVV: 62,47 %
UP		MD: 1,851 CVV: 76,35 %

4.1.15 Vergleich Gruppen 1, 2 und 3

Die Untersuchung von Probenmaterial aus Gruppe 1, 2 und 3 zeigte, dass sich die unterschiedlich behandelten Amnionproben mit UP, Endotoxinen oder IL unterscheiden lassen. Jedoch war die CVV sowohl zwischen den Amnionflüssigkeiten mit UP und Endotoxinen, als auch zwischen IL-1 α und Endotoxin-Proben mit \approx 50 % niedrig. Dies war wahrscheinlich der geringen Fallzahl von Endotoxinproben geschuldet. Die Proben mit UP und IL-1 konnten mit einer CVV von 76,32 % differenziert werden.

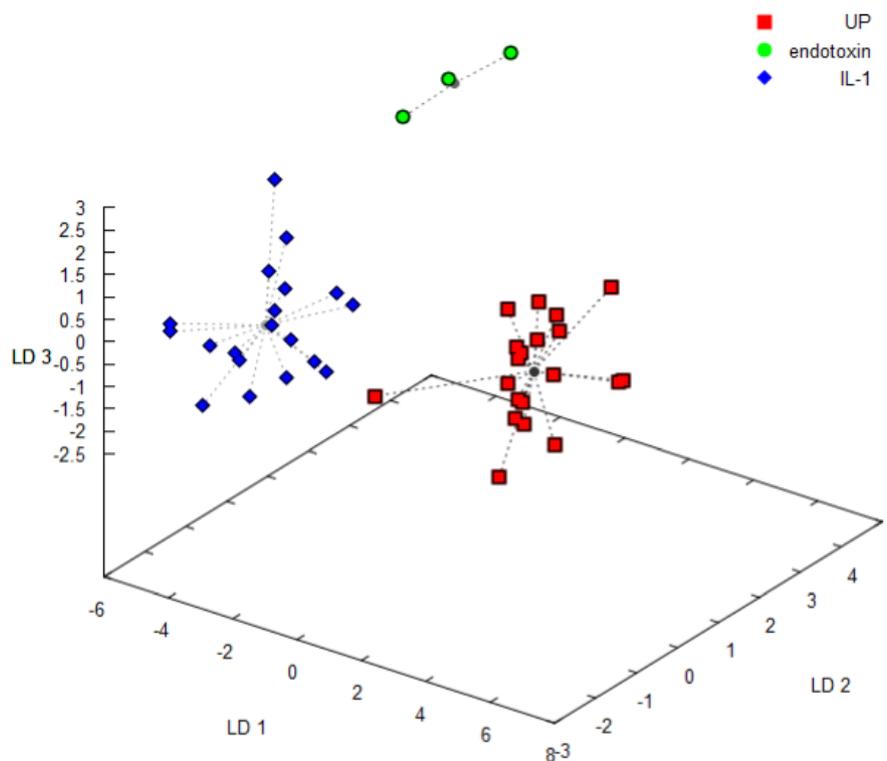


Abbildung 23: Diskriminanzanalyse der Smellprints Gruppe 1, 2 und 3

Protokoll 1,2 und 3 (Proben aus 2008)

Tabelle 27: MD und CVV der Gruppen 1, 2, 3

	Endotoxin	IL-1
UP	MD: 3,412 CVV: 49,17 %	MD: 1,996 CVV: 76,32 %
Endotoxin		MD: 3,288 CVV: 50,00 %

4.2 IMS Vergleich

4.2.1 Ergebnisse der Messungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie

Durch MCC-IMS wurden 62 Proben nach Vormessung durch die eNose analysiert. Die Proben setzten sich aus UP, IL-1 α behandelten Amnionflüssigkeiten (intraamnionische Instillation) von Schafen und Kontrollmedium zusammen. Endotoxin Proben wurden nicht mittels MCC-IMS analysiert.

Es konnten in jeder einzelnen Probe eine Vielzahl an volatilen organischen Komponenten identifiziert werden. Insgesamt konnten 127 verschiedene VOC Signal (Peaks) in der Amnionflüssigkeit identifiziert werden.

Alle gefundenen Peaks wurden durch ihre Lage mit Driftzeiten, Retentionszeiten sowie ihre Konzentration mit der Software Visual Now 2.2. (B&S Analytik, Dortmund, Deutschland) charakterisiert. Diese sind in folgender Abbildung mit Kreuzen dargestellt. Zur besseren Diskriminierung wurde ein reduzierter Datensatz erzeugt, der nur Signale mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ (95 % Konfidenzintervall (KI)), $p < 0,01$ (99 % KI), $p < 0,001$ (99,9 % KI) für die Trennung der Gruppen enthielt.

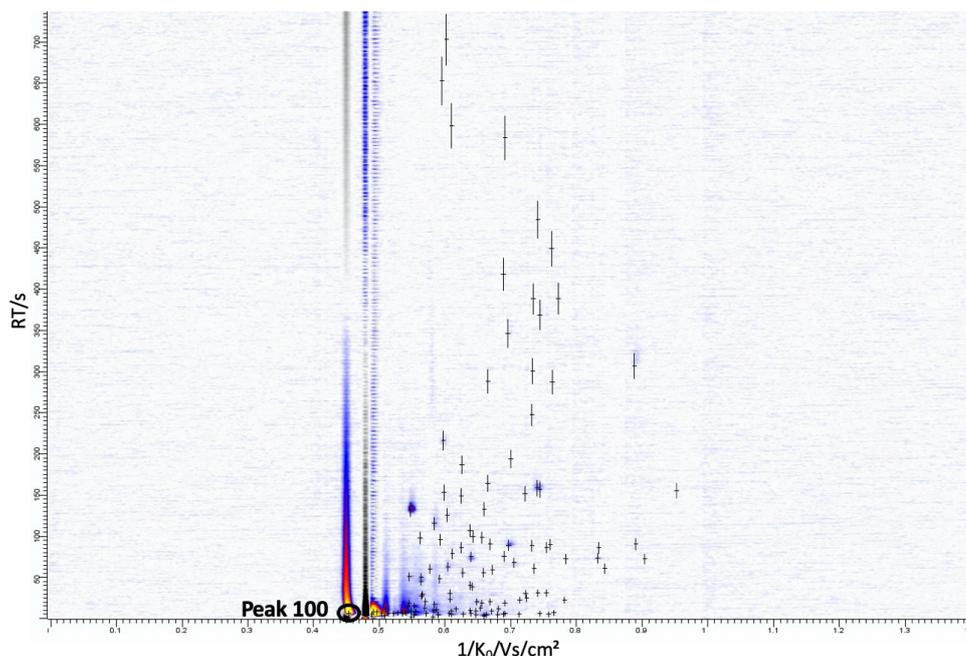


Abbildung 24: Heatmap

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zemin, Software Visual Now 2.2. (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

Alle 127 im Fruchtwasser identifizierten Peaks sind mit Kreuzen markiert worden. Die y-Achse dieser Heatmap repräsentiert die Retentionszeit und die x-Achse die drift-Zeit. Die Farben zeigen die Signalintensitäten mit zunehmenden Werten vom weiß über blau bis zu rot an.

Beim Vergleich der Kontrollproben mit Proben von UP „infizierten“ Tieren wurden 27 Substanzen identifiziert, die sich signifikant unterschieden ($p < 0,005$ (95 % KI)). Im Folgenden sind eine Auswahl dieser Stoffanalyse gelistet.

Tabelle 28: Auswahl der Stoffanalyse relevanter Peaks

Peak	Stoff
2	Dodecane
105	Cyclohexanol
100	2-Methylpentan
122	(-)-Carvone
5	Disulfide, dimethyl

81	Acetophenone
52	2-Butanone
41	Acetoin
51	Benzene, 1,3-dimethyl
56	Disulfide, dimethyl
14	3-Pentanone
57	3-Pentanone
38	Pentane, 2methyl
49	Heptanal
37	Acetoin
39	Pentane, 2-methyl
28	Acetylvaleryl
19	Acetylvaleryl

Ein einzelner Peak erreichte eine Signifikanz von $p < 0,05$ für die Unterscheidung von UP und Kontrollproben.

Anhand der BS-MCC-IMS Datenanalyse (Version 1209, IMS-VOC-Datenbank, Visual Now-Datenbank (BS-Analytik, Dortmund)) konnte diese Verbindung mit Hilfe von Retentionszeit und Driftzeit als 2-Methylpentan identifiziert werden.

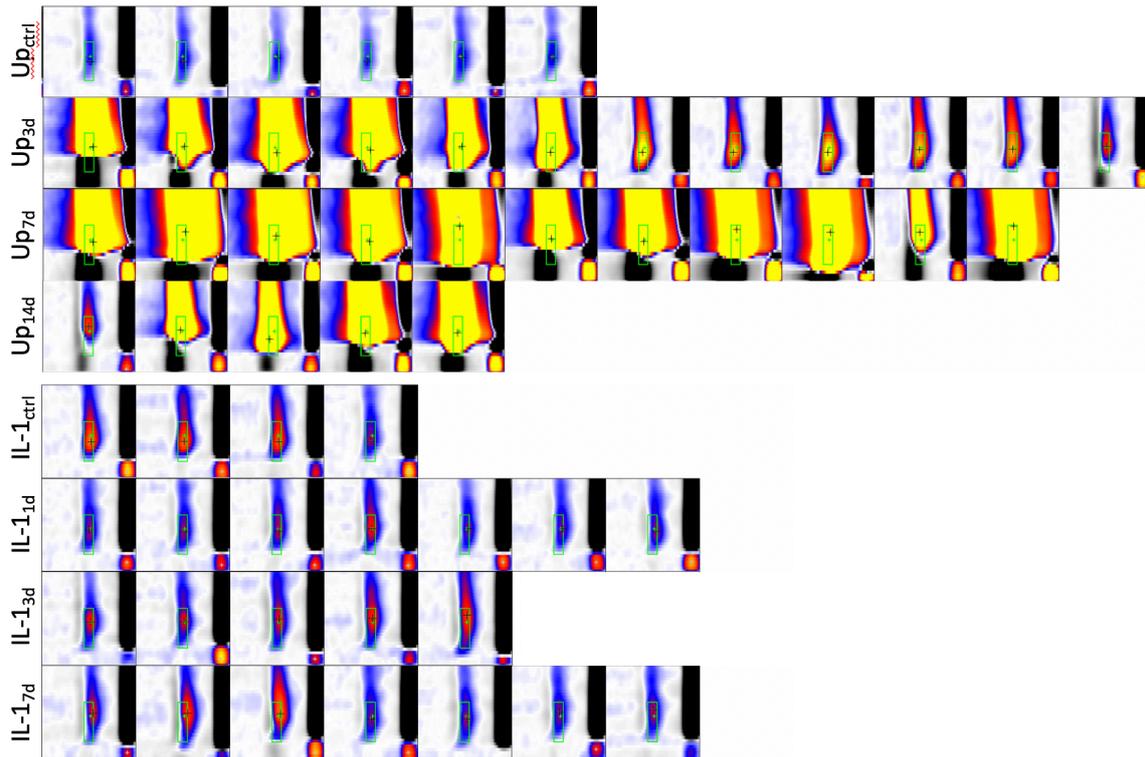


Abbildung 25: Ausschnitt des MCC-IMS-Chromatogramms von Peak 100

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zemin (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

unterschiedliche Signalstärken: Weiß = kein Signal, blau = mittlere Signalstärke, gelb = hohe Signalstärke.

Für 2-Methylpentan betrug die Sensitivität und Spezifität für UP-Proben von jeweils 100 %. Auch der positive und negative Vorhersagewert betrug jeweils 100 %.

Tabelle 29: Statistische Analyse des Peak 100 (2-Methylpentan)

	Kontrollen < UP	UP > IL1 α
Sensitivität %	100	96
Spezifität %	100	95
Richtig klassifiziert	34	45
Falsch klassifiziert	0	2
Richtig positiv	6	27
Falsch positiv	0	1
Richtig negativ	28	18
Falsch negativ	0	1
Positiver Vorhersagewert	100	96
Negativer Vorhersagewert	100	95

Genauigkeit	100	96
Signifikanz (n. Bonferroni-Korrektur)	< 0,05	< 0,001

In folgenden Abbildung ist der Box-Whisker-Plot von Peak 100 von allen UP-Proben und Kontrollproben dargestellt. Die Signalstärke von 2-Methylpantan war in UP höher als in den UP-Kontrollmedium (UP-Proben n = 28, UP-Kontrollmedium n = 6).

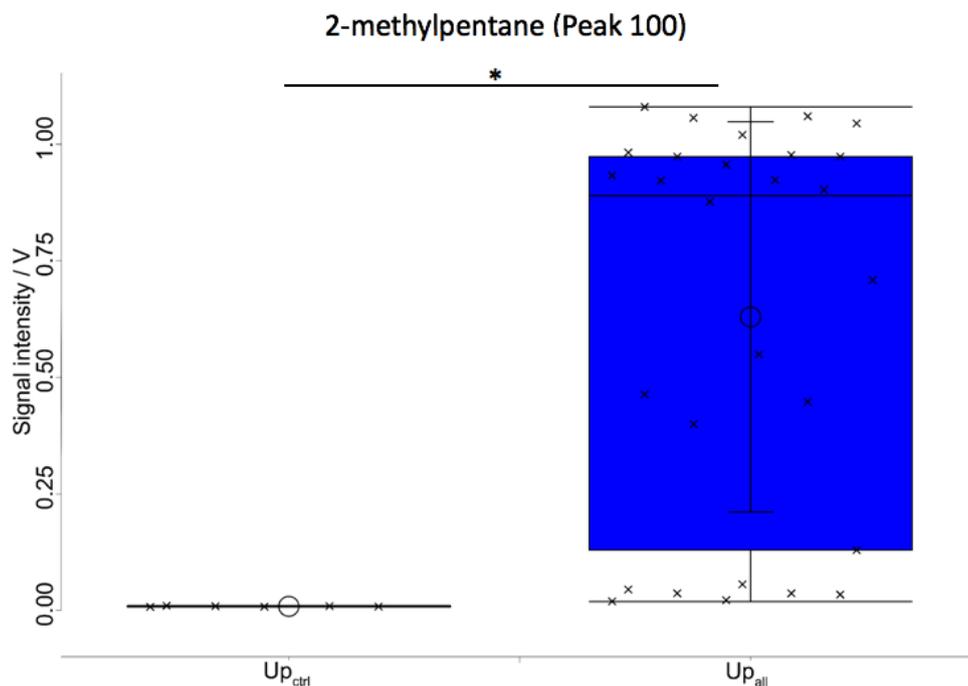


Abbildung 26: Box-Whisker-Plot von Peak 100

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zmlin Software Visual Now 2.2. (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

Links Kontrollproben, rechts Ureaplasma parvum Proben. Messungen sind als Kreuze dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein Quantil Box Plot mit erweiterter Darstellung der Probenverteilung.

Durch einen Entscheidungsbaum (Abbildung 27) wurden die Proben nach dem Mittelwert ihrer Signalintensitäten jeder Verbindung eingruppiert. Jede Messung wurde korrekt ihrer Klasse zugeordnet. Die relativen Zahlen der klassifizierten UP-Kontrollmedien Proben sind blau, die der UP-Proben rot dargestellt. Eine Diskriminierung der beiden Gruppen war möglich. Sensitivität und Spezifität betragen jeweils 100 %. Positiver und negativer Vorhersagewert 100 %.

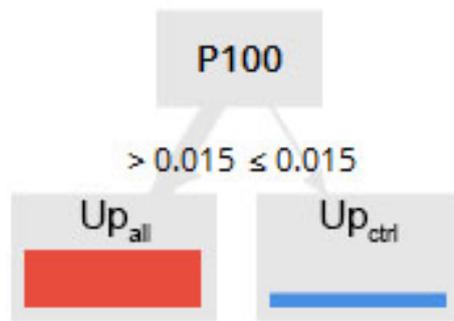


Abbildung 27: Entscheidungsbaum für Peak 100

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

Mithilfe eines Entscheidungsbaums kann anhand von Peak 100 (2-Methylpentan) eine Unterscheidung zwischen UP-Proben und Kontrollproben erfolgen. Dies erfolgt anhand der Signalintensitäten (Signalintensität > 0,015 V = UP, Signalintensität < 0,015 V = Kontrolle)

Die relative Anzahl der Kontrollgruppen ist blau, die Anzahl der Ureplasma parvum Proben rot klassifiziert.

Im nächsten Schritt wurde 2-Methylpentan im Fruchtwasser der infizierten Schafe über den zeitlichen Verlauf untersucht. Analysiert wurden insgesamt 28 Proben.

Die Analyse erfolgte von Fruchtwasserproben vom 3, 7 und 14 Tag nach intra-amniotischer Instillation von UP (UP 3 (n = 12), UP 7 (n = 11), UP 14 (n = 5)). Über alle Zeiträume hinweg war 2-Methylpentan vorhanden. Es zeigte sich eine Variabilität der Signalintensitäten im zeitlichen Verlauf, jedoch mit permanent erhöhten Signalintensitäten (signifikant) im Vergleich zum Kontrollmedium. Höchste Signalintensität schien am Tag 7 nach Infektion erreicht zu werden und nahm um Tag 14 wieder an Intensität ab (siehe Abbildung 28).

Tabelle 30: Wahrscheinlichkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten

Tag nach Infektion	Kontrolle vs. Interventionsgruppe	Wahrscheinlichkeit
Tag 3 nach Infektion	UP Kontrollen vs. UP Tag 3	p<0,001
Tag 7 nach Infektion	UP Kontrollen vs. UP Tag 7	p<0,001
Tag 14 nach Infektion	UP Kontrollen vs. UP Tag 14	p<0,01

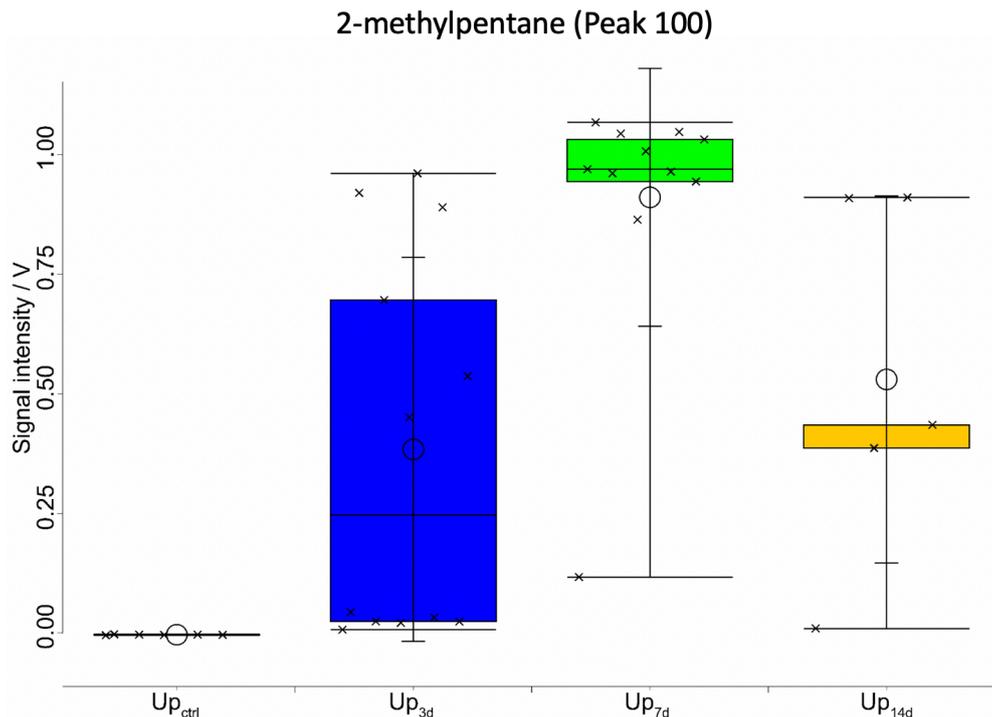


Abbildung 28: Signalintensitäten im zeitlichen Verlauf

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zemin (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

Die 2-Methylpentan-Konzentrationen waren im Vergleich zu Kontrollproben im zeitlichen Verlauf variabel, mit einem Höhepunkt der Signalintensität um Tag 7, bevor es erneut zu einer Abnahme der Intensitäten um Tag 14 kam. Auch am Tag 3 war die Signalintensität im Vergleich zu Kontrollproben signifikant erhöht.

Zur Klärung der Fragestellung, ob 2 Methylpentan eine direkte Folge einer Infektion durch UP war, oder mit einer IL1- α induzierten Entzündung assoziiert sein könnte, wurden die Proben der UP (n = 6) induzierten Chorioamnionits mit den von IL1- α induzierter Chorioamnionits (n = 19) verglichen. Insgesamt 9 Peaks konnten nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,05$) signifikant unterschieden werden.

Die 2-Methylpentan Signalintensität unterschied sich zwischen allen UP-Proben im Vergleich zu IL1- α Proben und erreichten eine Sensitivität von 96 %, eine Spezifität von 95 % mit einem positivem Vorhersagewert von 96 % und einem negativen Vorhersagewert von 95 %.

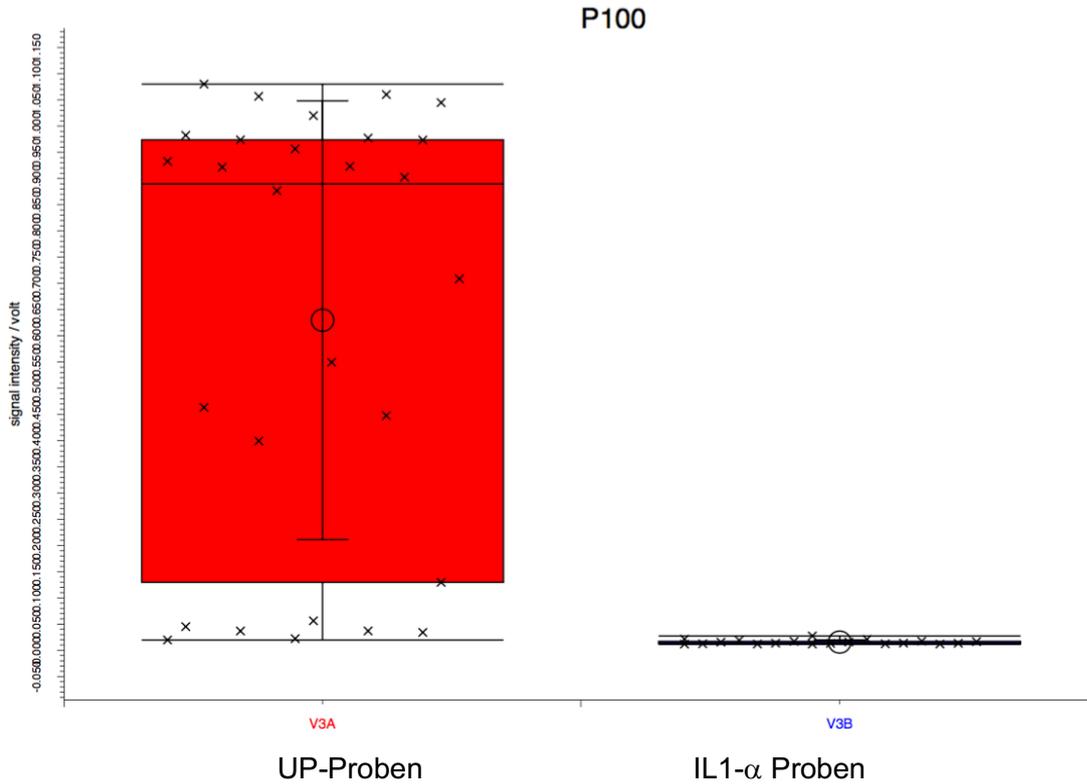


Abbildung 29: Box-and-Whisker Plot

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zemlin (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

Box-and-Whisker-Plot von Peak 100 (2-Methylpentan). 2-Methylpentan war in allen Proben signifikant höher, als in allen IL1- α Proben ($p < 0,001$ nach Bonferroni-Korrektur)

Mit Hilfe eines Entscheidungsbaumes konnte eine 100 % Trennung von UP und IL1- α Proben erreicht werden. Hier zeigte sich, dass die durchschnittlichen Signalintensitäten von 2-Methylpentan bei UP-Proben höher waren, als in IL1- α Proben. Peak 100 (2-Methylpentan) konnte mit einer Signalintensität von $> 0,031$ V den UP-Proben zugeordnet werden.

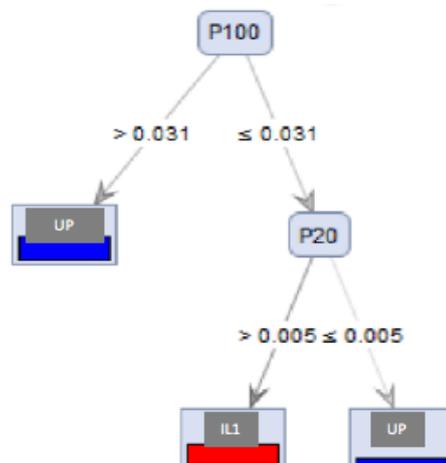


Abbildung 30: Entscheidungsbaum P100

(erstellt durch J. I. Baumbach für die AG Zemlin (B&S Analytik, Dortmund Deutschland))

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei differente Kollektive untersucht. Einerseits wurden humane Bioproben von Frühgeborenen untersucht, andererseits Amnionproben von Schafen, welche intraamniotischen Injektionen unterschiedlicher Protokolle erhielten.

Alle 27 humanen Patienten befanden sich zeitweise in intensivmedizinischer Betreuung. Bei den 62 infizierten Amnionproben von Schafen handelte es sich um unterschiedlich behandelte Amnionproben aus verschiedenen Jahrgängen. Die CA wurde mikrobiologisch und histologisch gesichert.

Der Zeitpunkt der Entbindung der Schafe wurde am 124. Gestationstag gewählt.

Bei einer üblichen Tragdauer von ca. 150 Tagen entspricht dies bei Menschen einer Frühgeburt (COLLINS et al., 2010).

5.2 Volatile organische Komponenten (VOC)

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Messung von VOC-Profilen durch MCC-IMS ein diagnostisches Potenzial für die CA haben könnte. Mit dieser Technik war es möglich, VOC-Profile bei nachgewiesener CA unterschiedlicher Herkunft (UP vs. IL-1 induzierter CA) zu differenzieren. Zusätzlich konnte die Dauer der Entzündung in einem experimentellen Schafsmodell abgeschätzt werden. Diese Strategie könnte nützlich sein, um einen Schnelltest am Krankenbett zum Nachweis ursachenspezifischer CA unter Verwendung von Fruchtwasseranalysen zu entwickeln.

Diese Studie wurde konzipiert, um zwischen den häufigsten Bakterien, welche eine relevante Rolle bei der CA spielen und einem wesentlichen Signalweg, der durch Bakterien induziert wird, zu unterscheiden. Mit diesem Ansatz war es möglich, zwischen Kontrollen und CA zu unterscheiden. Es konnte sogar zwischen einer CA, welche durch UP induziert wurde und einer CA die durch IL-1 α induziert wurde, differenziert werden. Daher wurden VOCs gesucht, die es ermöglichen, bei ähnlichen Endpunkten einer CA, zwischen einer bakteriellen Ursache und einer durch Zytokinen induzierten CA zu unterscheiden. Üblicherweise erlaubt der gemeinsame Endpunkt einer CA keine Unterscheidung verschiedener Ursachen.

Alle Organismen produzieren VOCs als Teil ihres normalen Stoffwechsels (FILIPIAK et al., 2008; ORHAN, 2007). Durch Atem-Analysen beim Menschen konnten bereits VOCs untersucht werden, die von bestimmten Bakterienarten oder -stämmen bei septischen Patienten produziert werden (BOOTS et al., 2012).

Übelriechendes Fruchtwasser ist ein typisches Kennzeichen einer CA (TITA, ANDREWS, 2010a). Dies kann ein Indiz dafür sein, dass bestimmte VOCs freigesetzt werden könnten, die durch IMS-Messungen nachgewiesen werden können.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit IMS-Headspace-Messungen durchgeführt, die VOC-Messungen unabhängig von der Umgebungsluft und anderen exogenen Einflüssen ermöglichten (FENG et al., 2022).

Während einer Infektion können VOCs vom Wirt selber oder von infektionsauslösenden Bakterien stammen. Im Rahmen einer Infektion sind am häufigsten Ammoniak, Aceton, Stickstoffmonoxid oder Methan die am stärksten erhöhten Biomarker, welche vom Menschen entstammen. Andererseits können Krankheitserreger eine Vielzahl von VOCs produzieren, einschließlich verschiedener Fettsäuren und ihrer Derivate. Ebenfalls können oft Alkohole und Ketone nachgewiesen werden (STEPPERT et al., 2021).

In dieser Studie wurde ein validiertes UP-induziertes CA-Modell bei Schafen verwendet (COLLINS et al., 2010). Es wurde bestätigt, dass die Infektion mit UP mit Veränderungen des VOC-Profiles im Fruchtwasser einhergeht. Hierbei wurden Medium-Proben als Kontrollen verwendet. In allen UP-Proben war die durchschnittliche Signalintensität von 2-Methylpentan höher als bei Medium-Proben.

Bemerkenswerterweise war die gemessene Sensitivität, Spezifität sowie der positive und negative Vorhersagewert 100 %. Darüber hinaus variierte die relative Konzentration von 2-Methylpentan mit dem zeitlichen Verlauf der CA. Am Tag 7 war die Signalintensität am höchsten. 2-Methylpentan wurde nur im Fruchtwasser nach Infektionen mit UP und nicht in IL-1 α induzierter CA nachgewiesen. Daher kann man die Hypothese aufstellen, dass 2-Methylpentan zeitabhängig und unabhängig vom IL-1 α vermittelten Entzündungsweg der mit UP-Infektionen assoziiert war.

Bisher stützt sich die Labordiagnostik der CA auf Protein-Biomarker und histologischen Untersuchungen. Jedoch führt ihre begrenzte Spezifität und die Zeitverzögerung zu einer kontinuierlichen Suche nach neuen Biomarkern (TITA, ANDREWS, 2010a).

Die Identifizierung flüchtiger organischer Substanzen zur nichtinvasiven Diagnostik gewinnt immer größeres medizinisches Interesse. Eine Herausforderung ist die Identifizierung derjenigen Komponenten, die in Hinblick einer medizinischen Fragestellung als möglicher Marker einer Krankheit angesehen werden können.

Ziele dieser Arbeit war u.a. die Beantwortung der Fragestellungen, ob sich das untersuchte Biomaterial (Stuhl, Urin und Trachealaspirat) von Frühgeborenen zur Diagnose einer Infektion eignet und ob durch Einsatz der Ionenmobilitätssepektrometrie volatile organische Marker für das Amnioninfektionssyndrom identifiziert werden können.

Bisher gibt es nur wenig Erkenntnisse zu diesen Fragen. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die frühzeitige Diagnosestellung bei Frühgeborenen und beim Amnioninfektionssyndrom zu verbessern. Durch die vorliegende Arbeit konnten der Nutzen einer eNose zur nichtinvasiven Diagnostik nicht vollständig bestätigt werden.

Es gelang die Identifizierung nichtinvasiver, flüchtiger Marker des Amnioninfektionssyndroms durch die MCC-IMS.

Durch Untersuchungen mit der MCC-IMS konnten nicht nur unterschiedlich infizierte Amnionflüssigkeiten differenziert werden, sondern Analysen der Amnionproben zeigten, dass sich die volatilen organischen Komponenten während des zeitlichen Verlaufes unterscheiden werden konnten.

5.3 2-Methylpentan

Durch neuartige Untersuchungen mit der MCC-IMS konnten unterschiedliche volatile organische Komponenten identifiziert werden. Bei dem Vergleich UP und IL-1 α behandelten Amnionflüssigkeiten konnten nach Bonferroni-Korrektur 21 *Peaks* mit einer Signifikanz von > 99,9 % aufgezeigt werden. Eine Komponente konnte als 2-Methylpentan identifiziert werden. 2-Methylpentan konnte als vielversprechendsten Biomarker für den Nachweis von UP induzierter Amnionitis identifiziert werden.

2-Methylpentan gehört zu einer Gruppe von Pentanen, welche bei der Oxidation von zellulären Lipiden produziert wird (RIELY et al., 1974). In Ausatemluftanalysen konnten Pentane u.a. bei oxidativem Stress, ischämischer Herzkrankheit, Sepsis, Arthritis, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder Asthma bronchiale identifiziert werden (PAREDI et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass diese zum Teil chronischen Entzündungen oder der oxidative Stress zur Ausscheidung von volatilen organischen Komponenten mit einem einzigartigen Muster führen kann (BOOTS et al., 2012)

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte mittels Atemanalysen 2-Methylpentan als VOC bei Patienten mit Lungenkrebs identifizieren (FILIPIAK et al., 2014).

In-vitro Analysen an Zellreihen von Lungenkrebszellen konnten die Existenz und Freisetzung von VOC zeigen. Tumorzelllinien (NCI-H2087) wurden in einer Arbeit kultiviert und mittels Headspace-Verfahren an einem GC-MS analysiert. Es konnte ein signifikanter Anstieg von 2-Methylpentan im Vergleich zu Kontrollmedien aufgezeigt werden. Bei gesunden Patienten konnte ein Anstieg von 2-Methylpentan nicht festgestellt werden (SPONRING et al., 2009).

2-Methylpentan konnte ebenfalls bei Patienten mit kolorektalem Karzinom identifiziert werden. Es wurden Atemanalysen am Vortag der Operation durchgeführt. Die Analyse der VOC erfolgte durch GC-MS mit einer Erkennungsfähigkeit in der Analyse von 87 % bezüglich 2-Methylpentan (ALTOMARE et al., 2013).

Aber auch bei der BPD des Frühgeborenen konnten u.a. erhöhte Pentan Konzentrationen identifiziert werden (SAUGSTAD, 1997).

Des Weiteren wurde 2-Methylpentan bereits in der Literatur im Rahmen nicht-invasiver Untersuchungen von weiteren volatilen organischen Komponenten beschrieben. In einer Arbeit wurden Atemanalysen an schwangeren Frauen und entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Zum Einsatz kam in dieser Studie eine Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS). Durch Entwicklung eines dreidimensionalen Gradienten konnte das Verhältnis von C4 bis C20-Alkanen und monomethylierte Alkane analysiert werden. Ziel dieser Arbeit war die Differenzierung von Risikoschwangerschaften (im Rahmen einer Präeklampsie) und regelrechten Schwangerschaften anhand von oxidativem Stress. In dieser Arbeit konnte 2-Methylpentan als einer der Diskiminatoren zwischen Präeklampsie und normaler Schwangerschaften identifiziert werden. In der Gruppe von Patientinnen mit Präeklampsie waren die volatilen Marker des oxidativen Stresses erhöht (MORETTI et al., 2004). Eine weitere Arbeit konnte ebenfalls den Einfluss oxidativen Stresses im Rahmen einer Präeklampsie zeigen (HUBEL, 1999; SHIN et al., 1997).

Ebenfalls durch Einsatz einer GC-MS konnte in einer Arbeit 2-Methylpentan als einer der volatilen organischen Bestandteil von *Helicobacter pylori* detektiert werden (SOHRABI et al., 2014).

5.4 Patientenkollektiv der Frühgeborenen

5.4.1 Entnahmezeitpunkte der Proben und Blutentnahmen

Im Rahmen der Erstversorgung oder frühestmöglich wurde das erste Biomaterial des Patienten gesammelt. Im weiteren stationären Verlauf erfolgte an definierten Wochentagen die Entnahme der Proben. Aufgrund diverser Einflüsse erfolgte nicht in allen Fällen die Entnahme am festgesetzten Tag und musste teilweise verschoben werden. Trotzdem gelang in beinahe allen Fällen die wöchentliche Gewinnung des Probenmaterials. Unabhängig von dieser Gewinnung erfolgte die Blutentnahme am Patienten, so dass es teilweise zeitliche Differenzen zwischen den Ergebnissen der eNose und der Erstellung des Infektionsscores anhand der klinischen Chemie gab.

5.4.2 Alter und Gewicht der Patienten

In dieser Studie wurden Patienten bis zu 32+0 SSW und/oder einem Geburtsgewicht bis 1500 g eingeschlossen. Der Grund für die Wahl dieses Kollektivs bestand darin, dass mit abnehmenden Geburtsgewicht die Rate an Infektionen zunimmt (STOLL et al.,

2011). In der Literatur wird nicht nur beschrieben, dass die Raten an Infektionen ansteigen, sondern auch das Risiko für schwere Folgeschäden oder letalen Verlauf bei abnehmenden Geburtsgewicht steigt (GLASS et al., 2015). Die Überlebenschancen nach Infektion erhöhte sich am deutlichsten für Frühgeborene ab 24+0 SSW und das gesunde Überleben ab 25+0 bis 28+0 SSW (STOLL et al., 2015).

In einer Arbeit, die ein sehr ähnliches Gewichtsspektrum wie diese vorliegende Arbeit abdeckte, konnte die inverse Korrelation zwischen Infektionsraten zum Geburtsgewicht und Gestationsalter bestätigt werden (STOLL et al., 2002).

5.5 Auswahl des Probenmaterials

Es wurden Stuhl-, Urin-, und Trachealproben gesammelt und analysiert. In mehreren Studien konnte die Eignung dieses Probenmaterials zur Analyse von VOCs aufgezeigt werden.

Eine Arbeit konnte zeigen, dass sich die volatilen organischen Komponenten der Stuhlproben zur Analyse mittels eNose eignen. Es wurden Stuhlproben von Frühgeborenen unter einem Gestationsalter von 30+0 SSW täglich gesammelt. Dies erfolgte bis zum Abschluss des 28. Lebenstags. Ziel war es, anhand der VOC der Stuhlproben, frühzeitig eine NEC identifizieren zu können. Bereits 2-3 Tage vor Auftreten einer klinischen NEC unterschieden sich die VOC von Patienten mit NEC von Kontrollen (DE MEIJ et al., 2015).

Es wurde das gleiche Modell einer elektronischen Nase wie in der vorliegenden Arbeit verwendet. Im Unterschied zu dieser NEC-Studie, wurde das Probenmaterial in der vorliegenden Arbeit bis zu Analyse bei -80°C und nicht -20°C gelagert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung bei -80°C zu einem geringeren Verlust an biochemischen Signalen führt (ESFAHANI et al., 2016).

Eine weitere Arbeit konnte den Nutzen der Analysen von Stuhlproben bestätigen. In diesem Fall konnte die eNose Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von einem gesunden Kollektiv unterscheiden (DE MEIJ et al., 2014). Hierbei handelte es sich allerdings um ein Kollektiv erwachsene Patienten.

In einer Studie wurden VOC-Analysen von Stuhlproben bei Frühgeborenen analysiert. Hier wurde der Einfluss von Ernährung auf Änderungen des VOC-Profiles untersucht. Die Art der Entbindung und das Gestationsalter scheint keinen Einfluss auf das VOC-Profil von Stuhlproben zu haben (DEIANOVA et al., 2020).

Den Nutzen, Trachealaspirat zur Analyse einzusetzen, konnte durch eine Studie bereits erfolgreich dargestellt werden. Es wurde Trachealaspirat in Hinblick einer Sepsis und Entwicklung einer BPD analysiert. Es zeigte sich, dass sich die Smellprints von

Trachealaspirat bei Patienten mit laborchemisch bestätigter Sepsis und die von Patienten mit BPD unterschieden (ROGOSCH et al., 2014).

Auch die Möglichkeit, Urin zur Diagnostik von Krankheiten einzusetzen, konnte in mehreren Studien erfolgreich dargestellt werden (DI LENA et al., 2016). In einer Studie konnten Patienten mit Harnwegsinfektion von Patienten ohne Harnwegsinfektion identifiziert werden. Hierbei wurden Urinproben von Patienten vom Neugeborenenalter bis zur Vollendung des 18. Lebensjahres gesammelt und mittels eNose analysiert (VISSER et al., 2020).

5.5.1 E Nose und Smellprints

In der Vergangenheit erfolgte die Analyse volatiler organischer Komponenten im Rahmen klinischer Forschung und Diagnostik mehrheitlich durch Einsatz der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wie beispielsweise in Arbeiten von Jiang et al. oder Noto et al. (JIANG et al., 2016; NOTO et al., 2016). Zunehmend findet die eNose als zusätzliches Hilfsmittel Einzug in die klinische Forschung (WASILEWSKI et al., 2016).

In dieser Arbeit kam die eNose Cyranose 320 zum Einsatz. Diese wurde ohne technische Modifikationen oder Austausch von Sensoren verwendet. Folglich erfolgte die Analyse verblindet, ohne zu wissen, welcher Sensor auf unterschiedliche volatile Substanzen reagiert. Die Analyse erfolgt nicht durch Ansprechen eines einzelnen Sensors, sondern durch die Kombination des Ansprechverhaltens aller 32 Sensoren (LEWIS, 2004; THALER, HANSON, 2005).

Ein möglicher Grund, dass die Differenzierung der Amnionproben (im zeitlichen Verlauf und vom Kontrollmedium) nicht in allen Fällen gezeigt werden konnte, liegt wohlmöglich in der Auswahl und Anordnung der Sensoren (siehe Abbildung 20). Es gibt diverse Möglichkeiten, die Sensoren innerhalb einer eNose auszutauschen und an die Analyten anzupassen (LEWIS, 2004; STITZEL et al., 2011).

Benutzerdefinierte Sensoren sind für die Steckplätze der Sensoren vom Hersteller verfügbar und können die Sensitivität und Spezifität erhöhen. Hierdurch könnte eine Optimierung der Messung erfolgen. Die Messungen der eNose erfolgten alle unter Raumtemperatur (+22°C). Das Probenmaterial wurde zuvor auf +37°C erwärmt. Hierdurch sollte die Freisetzung von VOC aus dem Probenmaterial verbessert werden. Ein weiterer Grund für die Auswahl von +37°C bestand darin, dass ein zukünftiger Einsatz der eNose (am Patientenbett) an frischem Biomaterial, ebenfalls bei +37°C durchgeführt werden wird (DE MEIJ et al., 2015). Mehrere Studien zeigten, dass einige Sensoren abhängig von der Temperatur arbeiten. Einige benötigen beispielsweise erhöhte Temperaturen, welches ebenfalls Einfluss auf die Analysen genommen haben könnte (HANNON et al., 2016; MEYYAPPAN, 2016). Dies scheint jedoch bei Stuhlproben nicht relevant zu sein.

In einer Arbeit konnte kein Unterschied in den gemessenen VOC-Profilen gefunden werden, welche eine Temperaturspanne von +15°C bis +35°C aufwiesen (DE MEIJ et al., 2014).

5.5.2 Smellprints bei Infektionen von Frühgeborenen

Alle Smellprints der Patienten wurden anhand des Infektionsscore in zwei Gruppen unterteilt. Wurde zum Zeitpunkt der Probenerhebung ein oder mehrere der im o.g. Infektionsscore laborchemischen Zeichen erfüllt, wurde von einer systemischen Infektion ausgegangen und die analysierte Probe in die Gruppe der „Infektion +“ (positiv) zugeteilt. Wurde kein Kriterium erfüllt, fiel die Probe in die Kategorie „Infektion –“ (negativ). Weder in der Gruppe der Trachealsekretproben, noch in der Gruppe der Urin- oder Stuhlproben konnten systemische Infektionen durch Analyse der eNose signifikant von gesunden Patienten differenziert werden. Die besten Ergebnisse konnten bei den Urinproben mit einer MD von 1,638 erreicht werden. In dieser Gruppe war die Anzahl (n = 23) an Proben mit systemischer Infektion am höchsten.

Aufgrund von Voruntersuchungen wäre zu erwarten gewesen, dass sich zumindest Trachealsekret zur Analyse von systemischen Infektionen eignen würde (ROGOSCH et al., 2014). Ein möglicher Grund stellt die unterschiedliche „Verdünnung“ des Trachealsekretes mit Kochsalzlösung dar. Abhängig von Größe und Gewicht des Neugeborenen werden nach Applikation von ca. 1 ml Kochsalzlösung unterschiedliche Mengen an Sekret gewonnen. In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung des Trachealsekrets nicht analysiert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Abnahme der Urin und Stuhlproben wöchentlich. Eine Studie konnte zeigen, dass bei täglicher Abnahme von Stuhlproben und Analyse dieser, eine NEC vor Auftreten klinischer Symptome identifiziert werden konnte (DE MEIJ et al., 2015). Evtl. könnte die Sensitivität der Smellprints von Bioproben durch tägliche Analysen erhöht werden.

Bei allen Proben kann eine Kontamination durch bearbeitendes Personal oder verunreinigtes Material nicht ausgeschlossen werden.

5.6 Kollektiv der Amnionproben

5.6.1 Änderung des pH-Wertes

Studien zeigen, dass sich der pH-Wert im Rahmen einer UP-Amnionitis verändert. In einer Arbeit konnte dargestellt werden, dass ein wichtiger Regulator für das Wachstum von UP der pH-Wert sein könnte. Diese erfordern einen pH-Wert von 6,0 für ein optimales Wachstum (SHEPARD, LUNCEFORD, 1965). Der pH-Wert von Schafen reicht von 8,4 am Tag 70 bis zu 7,4 am Tag 145 der Schwangerschaft (PRESTES et al., 2001).

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass es initial keinen Unterschied im Rahmen einer akuten UP-Infektion und Kontrollen gibt. Analysen des Fruchtwassers zum Zeitpunkt der Geburt zeigten eine alkalische Verschiebung durch chronische Exposition von UP. UP hydrolysieren Harnstoff als eine wichtige Energiequelle. Im Rahmen dessen entstehen Ammoniumionen, als ein Nebenprodukt dieser Hydrolyse (ROBINSON et al., 2013). Veränderungen dieses pH-Wertes könnten eine Ursache für Änderung der volatilen organischen Komponenten im zeitlichen Verlauf sein. Jedoch gibt es dazu bisher keine Daten. In dieser Studie wurden im Rahmen der VOC-Analysen keine pH-Werte bestimmt.

5.6.2 Stärken und Limitationen der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit gelang die Identifizierung volatiler organischer Bestandteile von unterschiedlich behandelten Amnionproben und zum Teil eine Differenzierung dieser Proben. Eine eNose ist jedoch nicht in der Lage, einzelne Stoffe identifizieren zu können. Sie ist lediglich in der Lage, mit ihren unterschiedlichen Sensoren auf das Probenmaterial zu reagieren und dies als Werte darzustellen. Die Analyse der Proben lässt keine Rückschlüsse auf den Ursprung der volatilen organischen Komponenten zu.

Zudem konnte in mehreren Fällen negative Kontrollen (Medium) nicht signifikant von den Positivkontrollen (UP oder IL-1 α) durch die eNose unterschieden werden. Die CVV und die MD erreichten in diesen Fällen kein Signifikanzniveau.

Die MCC-IMS zeichnet sich durch eine extrem hohe Sensitivität aus und erlaubt die Nachweisbarkeit von Substanzen im *parts per billion by volume* (ppbv) (ng/L) bis pptv (pg/L) Bereich. Bereiche unterhalb von 1 ppm entsprechen dem Ultraspurenbereich. Dies würde in einer flüssigen Phase etwa 1 mg/l entsprechen.

In diesem Spurenbereich können geringfügige Störquellen wie Veränderungen der Raumluft oder verwendete Materialien Einfluss auf die Messergebnisse nehmen und zu Überlagerungen während der Analyse führen.

Bisher ist noch unbekannt, welcher Geruchsstoff für eine Infektion spricht, oder ob es sich um eine Kombination von Geruchsstoffen handelt.

Durch Analyse des verwendeten Materials (beispielsweise Gefäß, Deckel, Handschuhe oder Desinfektionsmittel) wurde versucht, weitere Artefakte auszuschließen. Trotzdem können durch die extrem hohe Sensitivität der MCC-IMS Kontaminationen während der Analyse oder bereits während der Tierversuche nicht völlig ausgeschlossen werden. Somit wäre es möglich, dass die Herkunft einiger analysierter VOC aus der Umwelt stammt. Bei einer Infektion könnten VOC vom Wirt selber oder vom infektiösen Organismen entstammen, sein Ursprung bleibt unbekannt.

Ebenfalls können Pentane (als Marker für oxidativen Stress) bei einer Vielzahl von Erkrankungen erhöht sein und sind somit nur unspezifische Krankheitsmarker.

Zusätzlich gab es eine mehrjährige Latenz zwischen Gewinnung der Proben und abschließender Analyse.

Limitierend in dieser Studie ist zudem, dass sie sich auf einen einzigen Erreger der CA beschränkt. Einschränkend ist zudem die z.T. lange Lagerdauer der zu untersuchenden Amnionflüssigkeiten. Zudem wurden die Amnionproben in unterschiedlichen Jahren gewonnen.

Stärken dieser Studien sind die Verwendung einer genau vorbekannten Menge des jeweils injizierten Probenmaterials und sterile Kautelen bei Entnahme. Zusätzlich sind die exakten Zeiträume dieser Injektionen im Rahmen der Schwangerschaft der trächtigen Schafe bekannt. Durch kontrollierte Umgebungsbedingungen des etablierten Tiermodells konnten Störfaktoren wie Verhaltens- und Ernährungseinflüsse minimiert werden. Eine weitere Stärke dieser Arbeit ist, dass die Amnionproben von einer Einzelperson in einem kurzen Zeitintervall am MCC-IMC gemessen wurden

Beide Messmethoden erfolgten gemäß SOP.

5.7 Ausblick

In ferner Zukunft könnten die Technik der Analyse von volatilen organischen Substanzen mit all ihren Vorteilen Einzug in den klinischen Alltag erhalten (BIKOV et al., 2015; SETHI et al., 2013). Hervorzuheben sind hierbei die nicht-invasive Diagnostik und der Zeitgewinn bis zum Vorhandensein von Ergebnissen (VAN GEFFEN et al., 2019). In aktuellen Studien wird die eNose am häufigsten zur diagnostischen Erkennung von Tumoren in der Ausatemluft verwendet. Eine Metaanalyse zeigt jedoch auf, dass es sich hierbei im Allgemeinen aus Machbarkeitsstudien handelt. In Zukunft müssten multizentrische Validierungsstudien durchgeführt werden (Scheepers, 2022).

Mittelfristig wäre beispielweise ein Einsatz elektronischer Nasen im Rahmen von Screeninguntersuchungen bei spezifischen Störungen oder Krankheiten denkbar (SAKTIAWATI et al., 2021).

Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie wurde intensiv an alternativen, schnelleren und genauerer Diagnostik dieser Infektion geforscht. Auch hier stellt die elektronische Diagnostik mit ihrer elektrochemischen Detektion einen vielversprechenden Ansatz dar. In Zukunft könnte die Kombination von Sensoren mit künstlicher Intelligenz sich als zusätzliches Diagnosetool zum Nachweis von COVID-19 erweisen (SAKI et al., 2021).

In dieser Arbeit konnte 2-Methylpentan als potenziell flüchtige organische Verbindung identifiziert werden, die ein nützlicher Biomarker für UP induzierte CA sein könnte (SPRONG et al., 2020). Somit könnte dieses Ergebnis als präklinische Studie zur nicht-invasiven Diagnostik von VOCs in gewonnen Fruchtwasserproben dienen, um eine frühzeitige Diagnose einer CA stellen zu können (GOEDICKE-FRITZ et al., 2021). Neben

der Diagnosestellung durch VOC-Analysen kann ggf. sogar der Ursprung einer CA identifiziert werden und eine gezielte antibiotische Therapie eingeleitet werden.

Zusammenfassend weisen MCC-IMS-Messungen darauf hin, dass flüchtige organische Verbindungen ein nützliches Werkzeug sein können, um eine CA nachzuweisen und zwischen CA unterschiedlicher Ätiologie zu unterscheiden und abzuschätzen, wie lange die Entzündung bereits präsent sein könnte. 2-Methylpentan wurde identifiziert, die ein nützlicher Biomarker für UP-induzierte CA sein könnte.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gründe für Totgeburten; modifiziert nach Gravett et al. (GRAVETT et al., 2010).....	6
Abbildung 2: Frühgeburtenrate in % der Jahre 2001 bis 2010 in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt)	8
Abbildung 3: Antibiotikatherapie bei den Patienten; Anzahl der Patienten und Anzahl der Antibiotika-Therapien	36
Abbildung 4. : Gewinnung von Trachealsekret im Rahmen der Erstversorgung.....	40
Abbildung 5: Studiendesign der Amnionproben	42
Abbildung 6: Funktionsweise einer eNose	44
Abbildung 7: Skizze IMS.....	45
Abbildung 8: Skizze IMS, modifiziert nach B&S Analytik, (Schumann, 2001).....	48
Abbildung 9: eNose Versuchsaufbau.....	49
Abbildung 10: Frontansicht des MCC-IMS vom Typ „Breath Discovery“, Versuchsaufbau und Messanordnung	51
Abbildung 11: Versuchsaufbau MCC-IMS	53
Abbildung 12: Box and-Whisker-Plot	55
Abbildung 13: Zusammensetzung und Anzahl der Bioproben.....	56
Abbildung 14: Geschlechtsverteilung der Patienten.....	57
Abbildung 15: Reifegruppierung (Anzahl) in Schwangerschaftswochen.....	57
Abbildung 16: Geburtsgewicht der eingeschlossenen Patienten.....	58
Abbildung 17: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse von Smellspints der Trachealsekretproben	59
Abbildung 18: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse der Smellspints von Stuhlproben	60
Abbildung 19: Grafische Darstellung der linearen Diskriminanzanalyse von Smellspints der Urinproben	61
Abbildung 20: Diskriminanzanalyse der Smellspints der Gruppe 1	62
Abbildung 21: Diskriminanzanalyse der Smellspints Gruppe 3.....	63
Abbildung 22: Diskriminanzanalyse der Smellspints Gruppe 1 ,2 und 3	64
Abbildung 23: Diskriminanzanalyse der Smellspints Gruppe 1, 2 und 3	65
Abbildung 24: Heatmap	66
Abbildung 25:Ausschnitt des MCC-IMS-Chromatogramms von Peak 100	68
Abbildung 26: Box-Whisker-Plot von Peak 100.....	69
Abbildung 27: Entscheidungsbaum für Peak 100	70
Abbildung 28: Signalintensitäten im zeitlichen Verlauf.....	71

Abbildung 29: Box-and-Whisker Plot	72
Abbildung 30: Entscheidungsbaum P100	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pathogenese der Frühgeburtlichkeit (GOLDENBERG et al., 2008).....	7
Tabelle 2: Definition der Geburtsgewichte	9
Tabelle 3: SIRS-Kriterien nach Neo-KISS in Anlehnung an Garner (<i>GARNER et al., 1988</i>).....	10
Tabelle 4: Klinische Befunde und Symptome einer möglichen Infektion/ Sepsis (STEFANOVIC, 2011)	14
Tabelle 5: Pathologische Befunde bei Infektionsverdacht, modifiziert nach Maier (Maier, 2011).....	14
Tabelle 6: Kriterien für einen idealen Biomarker	24
Tabelle 7: Übersicht über die tierexperimentellen und klinischen Teile dieser Arbeit ..	28
Tabelle 8: Erhobene klinische, laborchemische und mikrobiologische Parameter der Patienten	30
Tabelle 9: Infektionsscore angelehnt an Neo-Kiss-Kriterien und modifiziert nach Maier und Obladen, 2011).....	32
Tabelle 10: Patienten mit positiver Blutkultur und Keimnachweis in der Mikrobiologie	32
Tabelle 11: Patienten mit Trachealaspilatproben, Keimbefund und Labor.....	33
Tabelle 12: Patienten mit Urinproben und positiven Infektionsscore	34
Tabelle 13: Patienten mit Stuhlproben und positiven Infektionsscore	35
Tabelle 14: Antibiotische Therapie, klinische Symptome und Laborparameter	36
Tabelle 15: Materialien zur Stuhlprobengewinnung und Verarbeitung	39
Tabelle 16: Materialien zur Urinprobengewinnung	39
Tabelle 17: Übersicht der Protokolle	43
Tabelle 18: Betriebsparameter MCC-IMS	48
Tabelle 19: Materialien und Software für die eNose.....	50
Tabelle 20: Materialien IMS-Messungen.....	51
Tabelle 21: MD und CVV der Trachealsekretproben.....	59
Tabelle 22: M) und CVV der Stuhlproben	60
Tabelle 23: MD und CVV der Urinproben	61
Tabelle 24: MD und CV, Protokoll 1 (UP)	62
Tabelle 25: MD und CVV, Protokoll 5 (IL-1 α).....	63
Tabelle 26: MD und CVV der Gruppen 1, 2 und 3	64
Tabelle 27: MD und CVV der Gruppen 1, 2, 3	65
Tabelle 28: Auswahl der Stoffanalyse relevanter Peaks	66
Tabelle 29: Statistische Analyse des Peak 100 (2-Methylpentan).....	68
Tabelle 30: Wahrscheinlichkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten	70

6 Literaturverzeichnis

1. Agrawal V, Hirsch E (2012) Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med* 17:12-19
2. Akangire G, Simpson E, Weiner J, Noel-MacDonnell J, Petrikin J, Sheehan M (2020) Implementation of the neonatal sepsis calculator in early-onset sepsis and maternal chorioamnionitis. *Adv Neonatal Care* 20:25-32
3. Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, Trizio L, Travaglio E, Tutino M, Dragonieri S, Memeo V, de Gennaro G (2013) Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 100:144-150
4. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, McDonald HM (2005) Polymorphisms in immunoregulatory genes and the risk of histologic chorioamnionitis in Caucasoid women: a case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 5:1-9
5. Arnon S, Litmanovitz I, Regev R, Bauer S, Lis M, Shainkin-Kestenbaum R, Dolfin T (2005) Serum amyloid A protein is a useful inflammatory marker during late-onset sepsis in preterm infants. *Biol Neonate* 87:105-110
6. Baergen R, Benirschke K, Ulich TR (1994) Cytokine expression in the placenta. The role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist expression in chorioamnionitis and parturition. *Arch Pathol Lab Med* 118:52-55
7. Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Novy MJ (1996) Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production, and preterm contractions in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig* 3:121-126
8. Barfield WD (2018) Public health implications of very preterm birth. *Clin Perinatol* 45:565-577
9. Barker DP, Rutter N (1995) Exposure to invasive procedures in neonatal intensive care unit admissions. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 72:F47-48
10. Barton L, Hodgman JE, Pavlova Z (1999) Causes of death in the extremely low birth weight infant. *Pediatrics* 103:446-451
11. Baumbach JI, Eiceman GA (1999) Ion mobility spectrometry: arriving on site and moving beyond a low profile. *Appl Spectrosc* 53:338a-355a
12. Been JV, Vanterpool SF, de Rooij JD, Rours GI, Kornelisse RF, van Dongen MC, van Gool CJ, de Krijger RR, Andriessen P, Zimmermann LJ, Kramer BW (2012) A clinical prediction rule for histological chorioamnionitis in preterm newborns. *PLoS One* 7:e46217
13. Bellodas Sanchez J, Kadrofske M (2019) Necrotizing enterocolitis. *Neurogastroenterol Motil* 31:e13569
14. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P (1998) Serial serum c-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 102:E41

15. Berger C, Uehlinger J, Ghelfi D, Blau N, Fanconi S (1995) Comparison of c-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicaemia. *Eur J Pediatr* 154:138-144
16. Berkhout DJC, Niemarkt HJ, Andriessen P, Vijlbrief DC, Bomers MK, Cossey V, Hulzebos CV, van Kaam AH, Kramer BW, van Lingen RA, Wicaksono AN, Covington JA, van Weissenbruch MM, Benninga MA, de Boer NKH, de Meij TGJ (2020) Preclinical detection of non-catheter related late-onset sepsis in preterm infants by fecal volatile compounds analysis: A prospective, multi-center cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 39:330-335
17. Bikov A, Lázár Z, Horvath I (2015) Established methodological issues in electronic nose research: how far are we from using these instruments in clinical settings of breath analysis? *J Breath Res* 9:034001
18. Bischof P (1993) What do we know about the origin of CA 125? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 49:93-98
19. Bizzarro MJ, Raskind C, Baltimore RS, Gallagher PG (2005) Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. *Pediatrics* 116:595-602
20. Boots AW, van Berkel JJ, Dallinga JW, Smolinska A, Wouters EF, van Schooten FJ (2012) The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *J Breath Res* 6:027108
21. Bracht H, Hafner S, Weiß M (2019) [Sepsis update: definition and epidemiology]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 54:10-20
22. Breiman RF, Blau DM, Mutevedzi P, Akelo V, Mandomando I, Ogbuanu IU, Sow SO, Madrid L, El Arifeen S, Gareil M, Thwala NB, Onyango D, Siteo A, Basseya IA, Keita AM, Alemu A, Alam M, Mahtab S, Gethi D, Varo R, Ojulong J, Samura S, Mehta A, Ibrahim AM, Rahman A, Vitorino P, Baillie VL, Agaya J, Tapia MD, Assefa N, Chowdhury AI, Scott JAG, Gurley ES, Kotloff KL, Jambai A, Bassat Q, Tippet-Barr BA, Madhi SA, Whitney CG (2021) Postmortem investigations and identification of multiple causes of child deaths: An analysis of findings from the Child Health and Mortality Prevention Surveillance (CHAMPS) network. *PLoS Med* 18:e1003814
23. Bromiker R, Elron E, Klinger G (2020) Do neonatal infections require a positive blood culture? *Am J Perinatol* 37:S18-s21
24. Brown JVE, Meader N, Wright K, Cleminson J, McGuire W (2020) Assessment of C-Reactive Protein diagnostic test accuracy for late-onset infection in newborn infants: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Pediatr* 174:260-268
25. Bundy LM, Noor A (2022). Neonatal meningitis. In *StatPearls (Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.)*.
26. Burke C, Chin EG (2016) Chorioamnionitis at term: definition, diagnosis, and implications for practice. *J Perinat Neonatal Nurs* 30:106-114
27. Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller A (2014) Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343:1370-1372
28. Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A (2007) Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 21:553-566

29. Cantey JB, Lee JH (2021) Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 48:215-227
30. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R (1993) *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 6:69-87
31. Celik IH, Hanna M, Canpolat FE, Mohan P (2022) Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future. *Pediatr Res* 91:337-350
32. Charpentier C, McDonald S, Elwood C, Ting J, Grigoriu A, Pylypjuk C, Yudin M, Van Schalkwyk J, Boucoiran I (2022) A survey on variation in diagnosis and treatment of chorioamnionitis in tertiary centres in Canada. *J Obstet Gynaecol Can* 44:28-33
33. Chen J, Tang J, Shi H, Tang C, Zhang R (2017) Characteristics of volatile organic compounds produced from five pathogenic bacteria by headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *J Basic Microbiol* 57:228-237
34. Cheong JLY, Burnett AC, Treyvaud K, Spittle AJ (2020) Early environment and long-term outcomes of preterm infants. *J Neural Transm (Vienna)* 127:1-8
35. Choudhury FK, Pandey P, Meitei R, Cardona D, Gujar AC, Shulaev V (2022) GC-MS/MS profiling of plant metabolites. *Methods Mol Biol* 2396:101-115
36. Clements KM, Barfield WD, Ayadi MF, Wilber N (2007) Preterm birth-associated cost of early intervention services: an analysis by gestational age. *Pediatrics* 119:e866-874
37. Cohen B, Saiman L, Cimiotti J, Larson E (2003) Factors associated with hand hygiene practices in two neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* 22:494-499
38. Collins A, Weitkamp JH, Wynn JL (2018) Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 103:F391-f394
39. Collins JJ, Kallapur SG, Knox CL, Nitsos I, Polglase GR, Pillow JJ, Kuypers E, Newnham JP, Jobe AH, Kramer BW (2010) Inflammation in fetal sheep from intra-amniotic injection of *Ureaplasma parvum*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299:L852-860
40. Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N (2007) How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics* 119:891-896
41. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, De Giorgi E, Schettini F, Laforgia N, Ciccone MM (2016) Early and late infections in newborns: Where do we stand? A review. *Pediatr Neonatol* 57:265-273
42. Costa SF, Miceli MH, Anaissie EJ (2004) Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis* 4:278-286
43. Croop SEW, Thoyre SM, Aliaga S, McCaffrey MJ, Peter-Wohl S (2020) The Golden Hour: a quality improvement initiative for extremely premature infants in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 40:530-539

44. Dars S, Malik S, Samreen I, Kazi RA (2014) Maternal morbidity and perinatal outcome in preterm premature rupture of membranes before 37 weeks gestation. *Pak J Med Sci* 30:626-629
45. Davies S, Spanel P, Smith D (1997) Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure. *Kidney Int* 52:223-228
46. de Meij TG, de Boer NK, Benninga MA, Lentferink YE, de Groot EF, van de Velde ME, van Bodegraven AA, van der Schee MP (2014) Faecal gas analysis by electronic nose as novel, non-invasive method for assessment of active and quiescent paediatric inflammatory bowel disease: Proof of principle study. *J Crohns Colitis*
47. de Meij TG, van der Schee MP, Berkhout DJ, van de Velde ME, Jansen AE, Kramer BW, van Weissenbruch MM, van Kaam AH, Andriessen P, van Goudoever JB, Niemarkt HJ, de Boer NK (2015) Early detection of necrotizing enterocolitis by fecal volatile organic compounds analysis. *J Pediatr* 167:562-567. e561
48. Deianova N, El Manouni El Hassani S, Niemarkt HJ, Cossey V, van Kaam AH, Jenken F, van Weissenbruch MM, Doedes EM, Baelde K, Menezes R, Benninga MA, de Jonge WJ, de Boer NK, de Meij TG (2020) Fecal volatile organic compound profiles are not influenced by gestational age and mode of delivery: A longitudinal multicenter cohort study. *Biosensors (Basel)* 10
49. Denison FC, Elliott CL, Wallace EM (1997) Dexamethasone-induced leucocytosis in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 104:851-853
50. Di Lena M, Porcelli F, Altomare DF (2016) Volatile organic compounds as new biomarkers for colorectal cancer: a review. *Colorectal Dis* 18:654-663
51. Dierikx TH, van Kaam A, de Meij TGJ, de Vries R, Onland W, Visser DH (2022) Umbilical cord blood culture in neonatal early-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Res* 92:362-372
52. Dom AM, Mather A, Seligman NS (2021) Prevention of preterm birth in multiples. *Curr Opin Obstet Gynecol* 33:72-77
53. Dong Y, Speer CP (2015) Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100:F257-263
54. Du Plessis AH, van Rooyen DRM, Jardien-Baboo S, Ten Ham-Baloyi W (2022) Screening and diagnosis of women for chorioamnionitis: An integrative literature review. *Midwifery* 113:103417
55. Eichberger J, Resch E, Resch B (2022) Diagnosis of neonatal sepsis: The role of inflammatory markers. *Front Pediatr* 10:840288
56. Elovitz MA, Mrinalini C (2004) Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab* 15:479-487
57. Enguix A, Rey C, Concha A, Medina A, Coto D, Dieguez MA (2001) Comparison of procalcitonin with c-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensive Care Med* 27:211-215
58. Eschenbach DA (1993) *Ureaplasma urealyticum* and premature birth. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1:S100-106

59. Esfahani S, Sagar NM, Kyrou I, Mozdiak E, O'Connell N, Nwokolo C, Bardhan KD, Arasaradnam RP, Covington JA (2016) Variation in gas and volatile compound emissions from human urine as it ages, measured by an electronic nose. *Biosensors (Basel)* 6
60. Farraia MV, Cavaleiro Rufo J, Paciência I, Mendes F, Delgado L, Moreira A (2019) The electronic nose technology in clinical diagnosis: A systematic review. *Porto Biomed J* 4:e42
61. Feferkorn I, Badeghiesh A, Baghlaf H, Dahan MH (2022) The relation between cigarette smoking with delivery outcomes. An evaluation of a database of more than nine million deliveries. *J Perinat Med* 50:56-62
62. Feng X, Wang H, Wang Z, Huang P, Kan J (2022) Discrimination and characterization of the volatile organic compounds in eight kinds of huajiao with geographical indication of China using electronic nose, HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS. *Food Chem* 375:131671
63. Fenton TR, Nasser R, Eliasziw M, Kim JH, Bilan D, Sauve R (2013) Validating the weight gain of preterm infants between the reference growth curve of the fetus and the term infant. *BMC Pediatr* 13:92
64. Filipiak W, Sponring A, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J (2008) Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell Int* 8:17
65. Filipiak W, Filipiak A, Sponring A, Schmid T, Zelger B, Ager C, Klodzinska E, Denz H, Pizzini A, Lucciarini P, Jamnig H, Troppmair J, Amann A (2014) Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. *J Breath Res* 8:027111
66. Flannery DD, Edwards EM, Puopolo KM, Horbar JD (2021) Early-onset sepsis among very preterm infants. *Pediatrics* 148
67. Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP (1991) Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 77:2360-2363
68. Fowler JR, Simon LV (2022). Chorioamnionitis. In *StatPearls (Treasure Island (FL), StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.)*.
69. Galinsky R, Polglase GR, Hooper SB, Black MJ, Moss TJ (2013) The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. *J Pregnancy* 2013:412831
70. Gantert M, Been JV, Gavilanes AW, Garnier Y, Zimmermann LJ, Kramer BW (2010) Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? *J Perinatol* 30 Suppl:S21-30
71. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM (1988) CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 16:128-140
72. Geffers C, Piening B, Schwab F, Gastmeier P (2008) [Surveillance of nosocomial infections among very low birth weight infants in NEO-KISS: from a voluntary system to a mandatory regulation]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 212:170-175

73. Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS (2002) Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 187:157-163
74. Genç MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS (2002) Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 187:157-163
75. Gerdes JS (2004) Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. *Pediatr Clin North Am* 51:939-959, viii-ix
76. Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS (1982) Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 145:1-8
77. Gibbs RS, Duff P (1991) Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 164:1317-1326
78. Gilstrap LC, 3rd, Cox SM (1989) Acute chorioamnionitis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 16:373-379
79. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ (2015) Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg* 120:1337-1351
80. Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell GH (2000) The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407:757-762
81. Goedicke-Fritz S, Werner T, Niemarkt HJ, Wolfs T, Baumbach JI, Kemp MW, Jobe AH, Rogosch T, Bous M, Kaiser E, Stutz R, Meyer S, Maier RF, Koczulla AR, Spiller OB, Kramer BW, Zemlin M (2021) Detection of volatile organic compounds as potential novel biomarkers for chorioamnionitis - Proof of experimental models. *Front Pediatr* 9:698489
82. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW (2000) Intrauterine infection and preterm delivery. *New England Journal of Medicine* 342:1500-1507
83. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371:75-84
84. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, Espinoza J, Hassan SS (2007) The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 50:652-683
85. Graham JE (2013) Bacterial volatiles and diagnosis of respiratory infections. *Adv Appl Microbiol* 82:29-52
86. Gravett MG, Rubens CE, Nunes TM (2010) Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science. *BMC Pregnancy Childbirth* 10 Suppl 1:S2
87. Hadfield BR, Cantey JB (2021) Neonatal bloodstream infections. *Curr Opin Infect Dis* 34:533-537
88. Haick H, Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A (2014) Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chem Soc Rev* 43:1423-1449

89. Hakim M, Broza YY, Barash O, Peled N, Phillips M, Amann A, Haick H (2012) Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem Rev* 112:5949-5966
90. Halis H, Gunes T, Korkut S, Saraymen B, Sen A, Bastug O, Ozturk A, Kurtoglu S (2016) In the diagnosis of neonatal sepsis importance of gelsolin and relationship with mortality and morbidity. *Med Hypotheses* 94:77-80
91. Hall M, Hutter J, Suff N, Avena Zampieri C, Tribe RM, Shennan A, Rutherford M, Story L (2022) Antenatal diagnosis of chorioamnionitis: A review of the potential role of fetal and placental imaging. *Prenat Diagn* 42:1049-1058
92. Hannon A, Lu Y, Li J, Meyyappan M (2016) A sensor array for the detection and discrimination of methane and other environmental pollutant gases. *Sensors (Basel)* 16
93. Hartman ME, Linde-Zwirble WT, Angus DC, Watson RS (2013) Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis*. *Pediatr Crit Care Med* 14:686-693
94. Hauschild AC, Kopczynski D, D'Addario M, Baumbach JI, Rahmann S, Baumbach J (2013) Peak detection method evaluation for ion mobility spectrometry by using machine learning approaches. *Metabolites* 3:277-293
95. Hayashida K, Yamakawa S (2021) Topical odour management in burn patients. *Burns Trauma* 9:tkab025
96. Headley AJ (2004) Generations of loss: contemporary perspectives on black infant mortality. *J Natl Med Assoc* 96:987-994
97. Heredia-Oliviera K, Munares-Garcia O (2016) [Maternal factors associated with low birth weight]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54:562-567
98. Hodgman JE, Barton L, Pavlova Z, Fassett MJ (2003) Infection as a cause of death in the extremely-low-birth-weight infant. *J Matern Fetal Neonatal Med* 14:313-317
99. Hubel CA (1999) Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:222-235
100. Iroh Tam PY, Bendel CM (2017) Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatr Res* 82:574-583
101. Isaacman DJ, Karasic RB, Reynolds EA, Kost SI (1996) Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *J Pediatr* 128:190-195
102. Issitt T, Wiggins L, Veysey M, Sweeney S, Brackenbury W, Redeker K (2022) Volatile compounds in human breath: critical review and meta-analysis. *J Breath Res*
103. Jarrom D, Elston L, Washington J, Prettyjohns M, Cann K, Myles S, Groves P (2022) Effectiveness of tests to detect the presence of SARS-CoV-2 virus, and antibodies to SARS-CoV-2, to inform COVID-19 diagnosis: a rapid systematic review. *BMJ Evid Based Med* 27:33-45
104. Jiang H, Liu J, Wang T, Gao JR, Sun Y, Huang CB, Meng M, Qin XJ (2016) Urinary metabolite profiling provides potential differentiation to explore the mechanisms of adjuvant-induced arthritis in rats. *Biomed Chromatogr* 30:1397-1405

105. Johnson CE, Whitwell JK, Pethe K, Saxena K, Super DM (1997) Term newborns who are at risk for sepsis: are lumbar punctures necessary? *Pediatrics* 99:E10
106. Johnson K, Messier S (2016) Early onset sepsis. *S D Med* 69:29-33
107. Jorch G, & Hübler, A (2010) *Neonatologie: Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen* (Stuttgart, Thieme).
108. Jordan JA, Durso MB (2000) Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 38:2574-2578
109. Jung E, Romero R, Yeo L, Diaz-Primera R, Marin-Concha J, Para R, Lopez AM, Pacora P, Gomez-Lopez N, Yoon BH, Kim CJ, Berry SM, Hsu CD (2020) The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications. *Semin Fetal Neonatal Med* 25:101146
110. Jyoti A, Kumar S, Kumar Srivastava V, Kaushik S, Govind Singh S (2021) Neonatal sepsis at point of care. *Clin Chim Acta* 521:45-58
111. Kallapur SG, Kramer BW, Knox CL, Berry CA, Collins JJ, Kemp MW, Nitsos I, Polglase GR, Robinson J, Hillman NH, Newnham JP, Chougnet C, Jobe AH (2011) Chronic fetal exposure to *Ureaplasma parvum* suppresses innate immune responses in sheep. *J Immunol* 187:2688-2695
112. Kallman J, Ekholm L, Eriksson M, Malmstrom B, Schollin J (1999) Contribution of interleukin-6 in distinguishing between mild respiratory disease and neonatal sepsis in the newborn infant. *Acta Paediatr* 88:880-884
113. Karami N, Karimi A, Aliahmadi A, Mirzajan F, Rezadoost H, Ghassempour A, Fallah F (2017) Identification of bacteria using volatile organic compounds. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 63:112-121
114. Kermani BG, Schiffman SS, Nagle HT (1999) Using neural networks and genetic algorithms to enhance performance in an electronic nose. *IEEE Trans Biomed Eng* 46:429-439
115. Ketter P, Yu JJ, Cap AP, Forsthuber T, Arulanandam B (2016) Pentraxin 3: an immune modulator of infection and useful marker for disease severity assessment in sepsis. *Expert Rev Clin Immunol* 12:501-507
116. Khan F (2019) C-reactive protein as a screening biomarker in neonatal sepsis. *J Coll Physicians Surg Pak* 29:951-953
117. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM (2015) Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 213:S29-52
118. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Reichman B, Lerner-Geva L (2009) Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low-birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 201:38.e31-36
119. Kordek A, Torbe A, Tousty J, Loniewska B, Podraza W, Nikodemski T, Rudnicki J (2016) The determination of procalcitonin concentration in early-onset neonatal infection: A valuable test regardless of prenatal antibiotic therapy. *Clin Pediatr (Phila)*

120. Kortekaas JC, Kazemier BM, Keulen JKJ, Bruinsma A, Mol BW, Vandebussche F, Van Dillen J, De Miranda E (2020) Risk of adverse pregnancy outcomes of late- and postterm pregnancies in advanced maternal age: A national cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 99:1022-1030
121. Kramer BW, Kaemmerer U, Kapp M, Herbst D, Marx A, Berg D, Groneck PA, Speer CP (2005) Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatr Res* 58:607-612
122. Kumar SK, Bhat BV (2016) Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol Lett* 173:42-54
123. Kurek Eken M, Tuten A, Ozkaya E, Dincer E, Senol T, Karatekin G, Karateke A (2016) Evaluation of the maternal and fetal risk factors associated with neonatal care unit hospitalization time. *J Matern Fetal Neonatal Med* 29:3553-3557
124. Laborada G, Rego M, Jain A, Guliano M, Stavola J, Ballabh P, Krauss AN, Auld PA, Nesin M (2003) Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 20:491-501
125. Lagodka S, Petrucci S, Moretti ML, Cabbad M, Lakhi NA (2022) Fetal and maternal inflammatory response in the setting of maternal intrapartum fever with and without clinical and histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol MFM* 4:100539
126. Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE (2009) Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 123:1314-1319
127. Laina A, Stellos K (2018) Low birth weight: A novel cardiovascular risk factor? *Circ Genom Precis Med* 11:e002163
128. Lam HS, Ng PC (2008) Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology* 40:141-148
129. Lappas M (2016) RAF1 is increased in labouring myometrium and modulates inflammation-induced pro-labour mediators. *Reproduction* 151:411-420
130. Laurent O, Hu J, Li L, Kleeman MJ, Bartell SM, Cockburn M, Escobedo L, Wu J (2016) Low birth weight and air pollution in California: Which sources and components drive the risk? *Environ Int* 92-93:471-477
131. Le BL, Sper R, Nielsen SCA, Pineda S, Nguyen QH, Lee JY, Boyd SD, MacKenzie TC, Sirota M (2021) Maternal and infant immune repertoire sequencing analysis identifies distinct Ig and TCR development in term and preterm infants. *J Immunol* 207:2445-2455
132. Leistner R, Piening B, Gastmeier P, Geffers C, Schwab F (2013) Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: current data from the National surveillance system NEO-KISS. *Klin Padiatr* 225:75-80
133. Letouzey M, Foix-L'Hélias L, Torchin H, Mitha A, Morgan AS, Zeitlin J, Kayem G, Maisonneuve E, Delorme P, Khoshnood B, Kaminski M, Ancel PY, Boileau P, Lorthe E (2021) Cause of preterm birth and late-onset sepsis in very preterm infants: the EPIPAGE-2 cohort study. *Pediatr Res* 90:584-592

134. Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, Kuban K, Van Marter LJ, Pagano M, Hegyi T, Hiatt M, Sanocka U, Shahrivar F, Abiri M, Disalvo D, Doubilet P, Kairam R, Kazam E, Kirpekar M, Rosenfeld D, Schonfeld S, Share J, Collins M, Genest D, Shen-Schwarz S, et al. (1999) Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res* 46:566-575
135. Lewis NS (2004) Comparisons between mammalian and artificial olfaction based on arrays of carbon black-polymer composite vapor detectors. *Acc Chem Res* 37:663-672
136. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE (2012) Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379:2151-2161
137. Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC (2005) Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1286-1291
138. Maddula S, Blank LM, Schmid A, Baumbach JI (2009) Detection of volatile metabolites of *Escherichia coli* by multi capillary column coupled ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394:791-800
139. Maier RF, & Obladen, M. (2011) *Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung, Vol 8. Ausgabe* (Berlin, Springer).
140. Maki Y, Furukawa S, Nakayama T, Oohashi M, Shiiba N, Furuta K, Tokunaga S, Sameshima H (2022) Clinical chorioamnionitis criteria are not sufficient for predicting intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 35:52-57
141. Manolis A (1983) The diagnostic potential of breath analysis. *Clin Chem* 29:5-15
142. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R (1979) The neonatal blood count in health and disease. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 95:89-98
143. Martínez-García R, Moreno J, Bellincontro A, Centioni L, Puig-Pujol A, Peinado RA, Mauricio JC, García-Martínez T (2021) Using an electronic nose and volatilome analysis to differentiate sparkling wines obtained under different conditions of temperature, ageing time and yeast formats. *Food Chem* 334:127574
144. Mathers NJ, Pohlandt F (1987) Diagnostic audit of c-reactive protein in neonatal infection. *Eur J Pediatr* 146:147-151
145. Memar MY, Alizadeh N, Varshochi M, Kafil HS (2019) Immunologic biomarkers for diagnostic of early-onset neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 32:143-153
146. 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* 129:574-580
147. Meyer S, Zemlin M, Poryo M (2017) Editorial: Biomarkers in neonatology. *Early Hum Dev* 105:23-24

148. Meyer S, Maas S, Bay J, Zemlin M, Poryo M (2021) Morbidity and mortality in extremely premature infants with a birth weight ≤ 500 g. *Acta Paediatr* 110:2873-2874
149. Meyyappan M (2016) Carbon nanotube-based chemical sensors. *Small* 12:2118-2129
150. Midan DA, Abo El Fotoh WM, El Shalakany AH (2016) The potential role of incorporating real-time PCR and DNA sequencing for amplification and detection of 16S rRNA gene signatures in neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med*:1-25
151. Minocha A, Rashid S (1997) Reliability and reproducibility of breath hydrogen and methane in male diabetic subjects. *Dig Dis Sci* 42:672-676
152. Moretti M, Phillips M, Abouzeid A, Cataneo RN, Greenberg J (2004) Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 190:1184-1190
153. Mourani PM, Harris JK, Sontag MK, Robertson CE, Abman SH (2011) Molecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants. *PLoS One* 6:e25959
154. Mukhopadhyay S, Puopolo KM, Hansen NI, Lorch SA, DeMauro SB, Greenberg RG, Cotten CM, Sanchez PJ, Bell EF, Eichenwald EC, Stoll BJ (2021) Neurodevelopmental outcomes following neonatal late-onset sepsis and blood culture-negative conditions. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 106:467-473
155. Nadeau-Vallee M, Obari D, Quiniou C, Lubell WD, Olson DM, Girard S, Chemtob S (2016) A critical role of interleukin-1 in preterm labor. *Cytokine Growth Factor Rev* 28:37-51
156. National Collaborating Centre for Ws, Children's H (2012). National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. In *Antibiotics for Early-Onset Neonatal Infection: Antibiotics for the Prevention and Treatment of Early-Onset Neonatal Infection* (London, RCOG Press
Copyright © 2012, National Collaborating Centre for Women's and Children's Health.).
157. Nel Van Zyl K, Matukane SR, Hamman BL, Whitelaw AC, Newton-Foot M (2022) Effect of antibiotics on the human microbiome: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 59:106502
158. Nelson KB, Ellenberg JH (1978) Epidemiology of cerebral palsy. *Adv Neurol* 19:421-435
159. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, Wong RP, Cheung KL (1997) Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 77:F221-227
160. Ng PC (2004) Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:F229-235
161. Ng PC, Li G, Chui KM, Chu WC, Li K, Wong RP, Chik KW, Wong E, Fok TF (2004a) Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatr Res* 56:796-803

162. Ng PC, Wong HL, Lyon DJ, So KW, Liu F, Lam RK, Wong E, Cheng AF, Fok TF (2004b) Combined use of alcohol hand rub and gloves reduces the incidence of late onset infection in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:F336-340
163. Ng PC, Lam HS (2006) Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 18:125-131
164. Nikiforou M, Kemp MW, van Gorp RH, Saito M, Newnham JP, Reynaert NL, Janssen LE, Jobe AH, Kallapur SG, Kramer BW, Wolfs TG (2016) Selective IL-1alpha exposure to the fetal gut, lung, and chorioamnion/skin causes intestinal inflammatory and developmental changes in fetal sheep. *Lab Invest* 96:69-80
165. Nist MD, Harrison TM, Pickler RH, Shoben AB (2020) Measures of stress exposure for hospitalized preterm infants. *Nurs Res* 69:S3-s10
166. Noto A, Fanos V, Dessi A (2016) Metabolomics in newborns. *Adv Clin Chem* 74:35-61
167. Oakley-Girvan I, Davis SW (2017) Breath based volatile organic compounds in the detection of breast, lung, and colorectal cancers: A systematic review. *Cancer Biomark* 21:29-39
168. Odabasi IO, Bulbul A (2020) Neonatal sepsis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 54:142-158
169. Ohlsson A, Lacy JB (2020) Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 1:Cd000361
170. Okumuş N, Beken S, Aydın B, Erol S, Dursun A, Fettah N, Dilli D, Zenciroğlu A (2015) Effect of therapeutic hypothermia on c-reactive protein levels in patients with perinatal asphyxia. *Am J Perinatol* 32:667-674
171. Oliveira LF, Mallafré-Muro C, Giner J, Perea L, Sibila O, Pardo A, Marco S (2022) Breath analysis using electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry: A pilot study on bronchial infections in bronchiectasis. *Clin Chim Acta* 526:6-13
172. Olsen AL, Reinholdt J, Jensen AM, Andersen LP, Jensen ET (2009) Nosocomial infection in a Danish Neonatal Intensive Care Unit: a prospective study. *Acta Paediatr* 98:1294-1299
173. Orhan H (2007) Analyses of representative biomarkers of exposure and effect by chromatographic, mass spectrometric, and nuclear magnetic resonance techniques: method development and application in life sciences. *J Sep Sci* 30:149-174
174. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M (2012) IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol* 2012:985646
175. Paolucci M, Landini MP, Sambri V (2012) How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? *Int J Pediatr* 2012:120139
176. Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ (2000) Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162:369-373

177. Patel RM (2016) Short- and long-term outcomes for extremely preterm infants. *Am J Perinatol* 33:318-328
178. Pearce TC (1997) Computational parallels between the biological olfactory pathway and its analogue 'the electronic nose': Part II. Sensor-based machine olfaction. *Biosystems* 41:69-90
179. Peng CC, Chang JH, Lin HY, Cheng PJ, Su BH (2018) Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol* 59:231-237
180. Persaud K, Dodd G (1982) Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature* 299:352-355
181. Petrova A, Demissie K, Rhoads GG, Smulian JC, Marcella S, Ananth CV (2001) Association of maternal fever during labor with neonatal and infant morbidity and mortality. *Obstet Gynecol* 98:20-27
182. Polin RA, (2012) Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. *Pediatrics* 129:1006-1015
183. Prestes NC, Chalhoub MC, Lopes MD, Takahira RK (2001) Amniocentesis and biochemical evaluation of amniotic fluid in ewes at 70, 100 and 145 days of pregnancy. *Small Rumin Res* 39:277-281
184. Puopolo KM, Draper D, Wi S, Newman TB, Zupancic J, Lieberman E, Smith M, Escobar GJ (2011) Estimating the probability of neonatal early-onset infection on the basis of maternal risk factors. *Pediatrics* 128:e1155-1163
185. Quadir AF, Britton PN (2018) Procalcitonin and c-reactive protein as biomarkers for neonatal bacterial infection. *J Paediatr Child Health* 54:695-699
186. Ramasubbu DA, Smith V, Hayden F, Cronin P (2017) Systemic antibiotics for treating malignant wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 8:Cd011609
187. Randolph AG, McCulloh RJ (2014) Pediatric sepsis: important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents. *Virulence* 5:179-189
188. Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C (2003) Amniotic infection syndrome: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol* 6:435-448
189. Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M (2009) Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr* 9:5
190. Resch B, Gusenleitner W, Muller WD (2003) Procalcitonin and interleukin-6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. *Acta Paediatr* 92:243-245
191. Riely CA, Cohen G, Lieberman M (1974) Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 183:208-210
192. Robert MG, Cornet M, Hennebique A, Rasamoelina T, Caspar Y, Pondérand L, Bidart M, Durand H, Jacquet M, Gamaud C, Maubon D (2021) MALDI-TOF MS in a medical mycology laboratory: On stage and backstage. *Microorganisms* 9

193. Robinson JW, Dando SJ, Nitsos I, Newnham J, Polglase GR, Kallapur SG, Pillow JJ, Kramer BW, Jobe AH, Payton D, Knox CL (2013) Ureaplasma parvum serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. PLoS One 8:e62746
194. Rogosch T, Herrmann N, Maier RF, Domann E, Hattesoehl A, Koczulla AR, Zemlin M (2014) Detection of bloodstream infections and prediction of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates with an electronic nose. J Pediatr 165:622-624
195. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK (1989a) Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. Am J Obstet Gynecol 160:1117-1123
196. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, Sabo V, Athanassiadis AP, Hobbins JC (1989b) Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. Am J Obstet Gynecol 161:817-824
197. Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J (2003) Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. J Nutr 133:1668s-1673s
198. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK (2006) Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Fetal Neonatal Med 11:317-326
199. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP (2007) Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. Nutr Rev 65:S194-202
200. Romero R, Dey SK, Fisher SJ (2014) Preterm labor: one syndrome, many causes. Science 345:760-765
201. Rose AT, Patel RM (2018) A critical analysis of risk factors for necrotizing enterocolitis. Semin Fetal Neonatal Med 23:374-379
202. Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, Leindecker S, Varner MW, Caritis SN, O'Sullivan MJ, Wapner RJ, Meis PJ, Miodovnik M, Sorokin Y, Moawad AH, Mabie W, Conway D, Gabbe SG, Spong CY (2004) The maternal-fetal medicine units cesarean registry: chorioamnionitis at term and its duration-relationship to outcomes. Am J Obstet Gynecol 191:211-216
203. Ruangkit C, Satpute A, Vogt BA, Hoyen C, Viswanathan S (2016) Incidence and risk factors of urinary tract infection in very low birth weight infants. J Neonatal Perinatal Med 9:83-90
204. Saki EF, Setiawan SA, Wicaksono DHB (2021) Portable tools for COVID-19 Point-of-Care detection: A review. IEEE Sens J 21:23737-23750
205. Saktiawati AMI, Putera DD, Setyawan A, Mahendradhata Y, van der Werf TS (2019) Diagnosis of tuberculosis through breath test: A systematic review. EBioMedicine 46:202-214
206. Saktiawati AMI, Triyana K, Wahyuningtias SD, Dwihardiani B, Julian T, Hidayat SN, Ahmad RA, Probandari A, Mahendradhata Y (2021) eNose-TB: A trial study protocol of electronic nose for tuberculosis screening in Indonesia. PLoS One 16:e0249689

207. Samuelsson A, Isaksson B, Hanberger H, Olhager E (2014) Late-onset neonatal sepsis, risk factors and interventions: an analysis of recurrent outbreaks of *Serratia marcescens*, 2006-2011. *J Hosp Infect* 86:57-63
208. Saugstad OD (1997) Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD? *Acta Paediatr* 86:1277-1282
209. Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP (1996) Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 129:275-278
210. Schindler TI, Wagner JJ, Goedicke-Fritz S, Rogosch T, Coccejus V, Laudenschach V, Nikolaizik W, Härtel C, Maier RF, Kerzel S, Zemlin M (2017) T(H)17 cell frequency in peripheral blood is elevated in overweight children without chronic inflammatory diseases. *Front Immunol* 8:1543
211. Schrag SJ, Hadler JL, Arnold KE, Martell-Cleary P, Reingold A, Schuchat A (2006) Risk factors for invasive, early-onset *Escherichia coli* infections in the era of widespread intrapartum antibiotic use. *Pediatrics* 118:570-576
212. Schröder C, Schwab F, Behnke M, Breier AC, Maechler F, Piening B, Dettenkofer M, Geffers C, Gastmeier P (2015) Epidemiology of healthcare associated infections in Germany: Nearly 20 years of surveillance. *Int J Med Microbiol* 305:799-806
213. Schuchat A, Zywicki SS, Dinsmoor MJ, Mercer B, Romaguera J, O'Sullivan MJ, Patel D, Peters MT, Stoll B, Levine OS (2000) Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics* 105:21-26
214. Schulz S, Dickschat JS (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24:814-842
215. Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL, Farine D, Ohlsson A, Wang EE, Haque K, Weston JA, Hewson SA, Ohel G, Hodnett ED (1997) International multicentre term prelabor rupture of membranes study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 177:1024-1029
216. Seong WJ (2016) Amniotic fluid CA-125 as a marker of intra-amniotic inflammation associated with preterm delivery: a preliminary single center study. *Arch Gynecol Obstet* 293:55-59
217. Sethi S, Nanda R, Chakraborty T (2013) Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 26:462-475
218. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S, Sharma P (2018) Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 31:1646-1659
219. Shepard MC, Lunceford CD (1965) Effect of pH on human mycoplasma strains. *J Bacteriol* 89:265-270
220. Shi H, Zhang M, Adhikari B (2018) Advances of electronic nose and its application in fresh foods: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:2700-2710
221. Shin YK, Collea JV, Kim YD, Kim SY (1997) Breath pentane concentrations during labor and the effect of epidural analgesia on the pentane concentration. *Int J Obstet Anesth* 6:82-86

222. Shirasu M, Nagai S, Hayashi R, Ochiai A, Touhara K (2009) Dimethyl trisulfide as a characteristic odor associated with fungating cancer wounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2117-2120
223. Shirasu M, Touhara K (2011) The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J Biochem* 150:257-266
224. Shitaye D, Asrat D, Woldeamanuel Y, Worku B (2010) Risk factors and etiology of neonatal sepsis in Tikur Anbessa University Hospital, Ethiopia. *Ethiop Med J* 48:11-21
225. Silver HM (1998) Listeriosis during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 53:737-740
226. Simon A, Zemlin M, Geipel M, Gärtner B, Armann J, Meyer S (2021) [Infection prevention in neonatal intensive care units]. *Gynakologe* 54:428-434
227. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD (2014) Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev* 27:21-47
228. Singh M, Alsaleem M, Gray CP (2022). Neonatal sepsis. In *StatPearls* (Treasure Island (FL), StatPearls Publishing).
229. Singh MP, Balegar VK, Angiti RR (2020) The practice of blood volume submitted for culture in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 105:600-604
230. Sioriki AA, Gkentzi D, Papadimitriou E, Dimitriou G, Karatza A (2020) Vaccinations in infants born preterm: An update. *Curr Pediatr Rev* 16:148-155
231. Siritwachirachai T, Sangkomkamhang US, Lumbiganon P, Laopaiboon M (2014) Antibiotics for meconium-stained amniotic fluid in labour for preventing maternal and neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:Cd007772
232. Smulian JC, Vintzileos AM, Lai YL, Santiago J, Shen-Schwarz S, Campbell WA (1999) Maternal chorioamnionitis and umbilical vein interleukin-6 levels for identifying early neonatal sepsis. *J Matern Fetal Med* 8:88-94
233. Sohrabi M, Zhang L, Zhang K, Ahmetagic A, Wei MQ (2014) Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clin Microbiol* 3
234. Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J (2009) Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Res* 29:419-426
235. Spracklen CN, Ryckman KK, Robinson JG, Stefanick ML, Sarto GE, Anton SD, Wallace RB (2017) Low birth weight and risk of later-life physical disability in women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72:543-547
236. Sprong KE, Mabenge M, Wright CA, Govender S (2020) Ureaplasma species and preterm birth: current perspectives. *Crit Rev Microbiol* 46:169-181
237. Squire E, Favara B, Todd J (1979) Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. *Pediatrics* 64:60-64
238. Stefanovic IM (2011) Neonatal sepsis. *Biochem Med (Zagreb)* 21:276-281

239. Steppert I, Schönfelder J, Schultz C, Kuhlmeier D (2021) Rapid in vitro differentiation of bacteria by ion mobility spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:4297-4307
240. Stichtenoth G, Demmert M, Bohnhorst B, Stein A, Ehlers S, Heitmann F, Rieger-Fackeldey E, Olbertz D, Roll C, Emeis M, Mogel M, Schiffmann H, Wieg C, Wintgens J, Herting E, Gopel W, Hartel C (2012) Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klin Padiatr* 224:276-281
241. Stitzel SE, Aernecke MJ, Walt DR (2011) Artificial noses. *Annu Rev Biomed Eng* 13:1-25
242. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL (1996) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 129:63-71
243. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK (2002) Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110:285-291
244. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID, 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD (2011) Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics* 127:817-826
245. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, Laptook AR, Sanchez PJ, Van Meurs KP, Wyckoff M, Das A, Hale EC, Ball MB, Newman NS, Schibler K, Poindexter BB, Kennedy KA, Cotten CM, Watterberg KL, D'Angio CT, DeMauro SB, Truog WE, Devaskar U, Higgins RD (2015) Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *Jama* 314:1039-1051
246. Su H, Chang SS, Han CM, Wu KY, Li MC, Huang CY, Lee CL, Wu JY, Lee CC (2014) Inflammatory markers in cord blood or maternal serum for early detection of neonatal sepsis-a systemic review and meta-analysis. *J Perinatol* 34:268-274
247. Szymanska E, Tinnevelt GH, Brodrick E, Williams M, Davies AN, van Manen HJ, Buydens LM (2016) Increasing conclusiveness of clinical breath analysis by improved baseline correction of multi capillary column - ion mobility spectrometry (MCC-IMS) data. *J Pharm Biomed Anal* 127:170-175
248. Tasci Y, Dilbaz B, Uzmez Onal B, Caliskan E, Dilbaz S, Doganci L, Han U (2006) The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 128:34-39
249. Thaler ER, Hanson CW (2005) Medical applications of electronic nose technology. *Expert Rev Med Devices* 2:559-566
250. Thorn RM, Greenman J (2012) Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *J Breath Res* 6:024001

251. Tian M, Reichetzeder C, Li J, Hocher B (2019) Low birth weight, a risk factor for diseases in later life, is a surrogate of insulin resistance at birth. *J Hypertens* 37:2123-2134
252. Tibaldi C, Cappello N, Latino MA, Polarolo G, Masuelli G, Cavallo F, Benedetto C (2016) Maternal risk factors for abnormal vaginal flora during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 133:89-93
253. Tiozzo C, Mukhopadhyay S (2022) Noninfectious influencers of early-onset sepsis biomarkers. *Pediatr Res* 91:425-431
254. Tita AT, Andrews WW (2010a) Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol* 37:339-354
255. Tita ATN, Andrews WW (2010b) Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clinics in perinatology* 37:339-354
256. Toma K, Suzuki S, Arakawa T, Iwasaki Y, Mitsubayashi K (2021) External ears for non-invasive and stable monitoring of volatile organic compounds in human blood. *Sci Rep* 11:10415
257. Torchin H, Ancel PY (2016) [Epidemiology and risk factors of preterm birth]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 45:1213-1230
258. Tzialla C, Manzoni P, Achille C, Bollani L, Stronati M, Borghesi A (2018) New diagnostic possibilities for neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 35:575-577
259. van de Laar R, van der Ham DP, Oei SG, Willekes C, Weiner CP, Mol BW (2009) Accuracy of c-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature rupture of membranes: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 147:124-129
260. van der Schee MP, Paff T, Brinkman P, van Aalderen WMC, Haarman EG, Sterk PJ (2015) Breathomics in lung disease. *Chest* 147:224-231
261. van Geffen WH, Lamote K, Costantini A, Hendriks LEL, Rahman NM, Blum TG, van Meerbeeck J (2019) The electronic nose: emerging biomarkers in lung cancer diagnostics. *Breathe (Sheff)* 15:e135-e141
262. van Rossum AM, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM (2004) Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis* 4:620-630
263. Vergnano S, Menson E, Kennea N, Embleton N, Russell AB, Watts T, Robinson MJ, Collinson A, Heath PT (2011) Neonatal infections in England: the NeonIN surveillance network. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 96:F9-f14
264. Vinturache AE, Gyamfi-Bannerman C, Hwang J, Mysorekar IU, Jacobsson B (2016) Maternal microbiome - A pathway to preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 21:94-99
265. Viscardi RM (2010) Ureaplasma species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol* 37:393-409
266. Visser EH, Berkhout DJC, Singh J, Vermeulen A, Ashtiani N, Boer NK, Wijk J, Meij TG, Bökenkamp A (2020) Smell - Adding a new dimension to urinalysis. *Biosensors (Basel)* 10

267. Wasilewski T, Gebicki J, Kamysz W (2016) Bioelectronic nose: Current status and perspectives. *Biosens Bioelectron* 87:480-494
268. Wendel PJ, Cox SM, Roberts SW, Dax J, Gilstrap LC (1994) Chorioamnionitis: association of nonreassuring fetal heart-rate patterns and interval from diagnosis to delivery on neonatal outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2:162-166
269. Weston EJ, Pondo T, Lewis MM, Martell-Cleary P, Morin C, Jewell B, Daily P, Apostol M, Petit S, Farley M, Lynfield R, Reingold A, Hansen NI, Stoll BJ, Shane AL, Zell E, Schrag SJ (2011) The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. *Pediatr Infect Dis J* 30:937-941
270. Wilson AD, Baietto M (2011) Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors (Basel)* 11:1105-1176
271. Witczak M, Torbe A, Czajka R (2003) [Maternal serum and amniotic fluid IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-8 levels in preterm and term labor complicated by PROM]. *Ginekol Pol* 74:1343-1347
272. Wolfs TG, Kallapur SG, Polglase GR, Pillow JJ, Nitsos I, Newnham JP, Chougnat CA, Kroon E, Spierings J, Willems CH, Jobe AH, Kramer BW (2011) IL-1 α mediated chorioamnionitis induces depletion of FoxP3+ cells and ileal inflammation in the ovine fetal gut. *PLoS One* 6:e18355
273. Wolfs TG, Kramer BW, Thuijls G, Kemp MW, Saito M, Willems MG, Senthamarai-Kannan P, Newnham JP, Jobe AH, Kallapur SG (2014) Chorioamnionitis-induced fetal gut injury is mediated by direct gut exposure of inflammatory mediators or by lung inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306:G382-393
274. Woodford EC, Dhudasia MB, Puopolo KM, Skerritt LA, Bhavsar M, DeLuca J, Mukhopadhyay S (2021) Neonatal blood culture inoculant volume: feasibility and challenges. *Pediatr Res* 90:1086-1092
275. Wright H, Bannaga AS, Iriarte R, Mahmoud M, Arasaradnam RP (2021) Utility of volatile organic compounds as a diagnostic tool in preterm infants. *Pediatr Res* 89:263-268
276. Wu YD, Shang SQ, Li JP, Yang ZQ, Zheng ZB, Du LZ, Zhao ZY (2007) [A broad-range 16S rRNA gene real-time PCR assay for the diagnosis of neonatal septicemia]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 45:446-449
277. Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA (2014) Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 15:523-528
278. Wynn JL (2016) Defining neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 28:135-140
279. Xiang L, Wu S, Hua Q, Bao C, Liu H (2021) Volatile organic compounds in human exhaled breath to diagnose gastrointestinal cancer: A meta-analysis. *Front Oncol* 11:606915
280. Yang HY, Chen WC, Tsai RC (2021) Accuracy of the electronic nose breath tests in clinical application: A systematic review and meta-analysis. *Biosensors (Basel)* 11
281. Ygberg S, Nilsson A (2012) The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr* 101:120-127

282. Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST, Chi JG (1997) Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 177:797-802
283. Zea-Vera A, Ochoa TJ (2015) Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr* 61:1-13
284. Zhang JD, Baker MJ, Liu Z, Kabir KMM, Kolachalama VB, Yates DH, Donald WA (2021) Medical diagnosis at the point-of-care by portable high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: a systematic review and meta-analysis. *J Breath Res* 15

7 Publikation und Danksagung

7.1 Publikation

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorgan veröffentlicht.

Frontiers in pediatrics, Jul. 2021 („Detection of Volatile Organic Compounds as Potential Novel Biomarkers for Chorioamnionitis – Proof of Experimental Models“).

7.2 Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Zemlin und Frau Dr. S. Goedicke-Fritz für ihre beständige, zuverlässige Hilfe, Unterstützung, herzliche Art und Geduld, welche jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung standen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Baumbach für die tatkräftige statistische Unterstützung danken. Ohne ihn wäre die Analysen der Amnionproben nicht möglich gewesen.

Der Klinik für Pneumologie, besonders Herrn Prof. Dr. R. Koczulla und Dr. Dr. T. Bösit möchte ich für die Möglichkeit der Messungen am IMS danken. Dank gebührt Herrn Prof. Dr. B. Kramer für die Zurverfügungstellung des Probenmaterials.

Im Labor der Kinderklinik Marburg möchte ich mich für die Hilfe, Unterstützung und freundliche Art bei Frau S. Jennemann und Frau R. Stöhr herzlich bedanken. Ein riesen-großes Dankeschön geht an das Pflegepersonal und die Ärzte der neonatologischen Intensivstation Marburg. Ohne sie wäre die Sammlung des Probenmaterials nicht möglich gewesen. Danke!

Bei Carolin Blüml möchte ich mich für ihre liebevolle, tatkräftige und geduldige Unterstützung in allen Bereichen auf das Herzlichste bedanken.

Und nicht zuletzt möchte ich Dankbarkeit meinen Eltern gegenüber ausdrücken, auf deren Unterstützung und Verständnis ich mich jederzeit verlassen konnte und die mir nicht nur diese Arbeit, sondern mein gesamtes Studium ermöglicht haben. Auch meinen Brüdern und Arkan von der Urff gebührt mein Dank für ihre stets hilfsbereite Unterstützung und Rückendeckung.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Anhang

SOP Dokumentation am Krankenbett des Patienten

Trachealspirat (TA) – Studie

Name: _____

Geburtsdatum / Zeit: _____ / _____ Geburtsgewicht: _____

Lebensalter	Aktion	Erledigt ?
bis 2 Tage	Screening: GA < 32 SSW und/oder < 1500g	
	Studienverantwortlichen informieren: Prof. Dr. Zemlin Fr. Göbert - Elterninformation aushändigen	
bis 72 Stunden	Einwilligung einholen	
1. Intubation	Trachealspirat gewinnen	
bis 10 Tage	Mekoium gewinnen	

Bitte immer beachten: **Wöchentlich**

Jeden Montag	Trachealspirat gewinnen
--------------	-------------------------

Jeden Donnerstag	Stuhl + Urin gewinnen
------------------	-----------------------

Bei Infektionsverdacht:

Mit Beginn der antibiotischen Therapie	Stuhl + Urin gewinnen
---	-----------------------

Mit Ende der antibiotischen Therapie	Stuhl + Urin gewinnen
---	-----------------------

Montags

Trachealspirat	Datum
1. Intubation	
1. Woche	
2. Woche	
3. Woche	
4. Woche	
5. Woche	
6. Woche	
Extubation	

Donnerstags

Stuhl / Urin	Datum Stuhl	Datum Urin
Mekonium		
1. Woche		
2. Woche		
3. Woche		
4. Woche		
5. Woche		
6. Woche		

Bitte IMMER die Probe mit DATUM + UHRZEIT beschriften !!!

SOP Probenaufbereitung Labor

SOP Probenaufarbeitung Labor Kinderklinik

Stuhl/ Mekonium

1. NaCl-bereitstellen
2. 2,0 ml Reagiergefäß
 - -wiegt 1,1 g
3. Zu den 1,1 g mit Spaten 0,2 g Stuhl auffüllen
 - -Gesamtgewicht 1,3 g
4. Zu diesem Gewicht 100 Mikroliter NaCl pipettieren
5. kurzzeitig in Zentrifuge stellen
6. Vortexen
7. Beschriften und bei -80°C lagern

Urin

1. 500ml Urin aus Monovette in 2 ml Reagiergefäß pipettieren

Trachealaspirat

1. 250 Mikroliter in 2 ml Reagiergefäß pipettieren
2. Beschriften und bei -80°C lagern

Bei größere Probenmenge mehrere Proben anlegen

SOP Absaugen des Trachealtubus

(Durchführung gemäß Maier, Obladen, Neugeborenenintensivmedizin 2011)

Die Absaugung des Patienten richtet sich nach der klinischen Notwendigkeit. Feste Absaugintervalle sind mittlerweile obsolet. Es folgt unter Überwachung des Patienten der Absaugvorgang durch zwei Personen.

- Sterile Kautelen
- Bds. Auskultation der Lungen
- Begrenzung des Sog der Absaugpumpe
- Passender Absaugkatheter mit Fingertip an Absaugung konnektieren
- Ventilation des Pat. mit 5-10 Beatmungen
- Zur „Streckung“ des kontralateralen Hauptbronchus den Kopf zur Gegenseite wenden
- Applikation einer 0,5 -1,0 ml 0,9 % NaCl-Lösung in den Trachealtubus
- 10 bis 15 sec. Beatmung
- Ohne Sog einen zuvor abgemessenen sterilen Absaugkatheter einführen, unter Sog und drehenden Bewegungen den Katheter zurückziehen
- Erneute manuelle Ventilation für ca. 1 Minute
- Zur Absaugung der Gegenseite Kopf entsprechend o.g. Vorgang lagern
- Wie zuvor Beschrieben den Absaugvorgang wiederholen
- Pat. an Beatmungsgerät anschließen, abschließend Absaugung der oberen Atemwege
- Abschließende Lungenauskultation bds.

Auflistung der Amnionproben

Australia 2009

Kodierung	Behandlung	Gestationsalter (Tage)
IMS-Australia2009/68	Media (keine Antibiose)	123
IMS-Australia2009/71	Media (keine Antibiose)	123
IMS-Australia2009/81	Media (keine Antibiose)	124
IMS-Australia2009/82	Media (keine Antibiose)	124
IMS-Australia2009/131	MBA Medium	139
IMS-Australia2009/144	MBA Medium	140
IMS-Australia2009/145	MBA Medium	140
IMS-Australia2009/152	MBA Medium	142

Australia 2010

Kodierung	Behandlung	Gestationsalter (Tage)
IMS-Australia2010/200	Ureaplasma parvum 3d	123

IMS-Australia2010/201	Ureaplasma parvum 3d	123
IMS-Australia2010/202	Ureaplasma parvum 3d	123
IMS-Australia2010/203	Ureaplasma parvum 3d	123
IMS-Australia2010/204	Ureaplasma parvum 3d	123
IMS-Australia2010/205	Ureaplasma parvum 3d	123
IMS-Australia2010/208	Ureaplasma parvum 3d	124
IMS-Australia2010/207	Ureaplasma parvum 7d	124
IMS-Australia2010/213	Ureaplasma parvum 3d	124
IMS-Australia2010/214	Ureaplasma parvum 7d	124
IMS-Australia2010/215	Ureaplasma parvum 7d	125
IMS-Australia2010/218	Ureaplasma parvum 7d	124
IMS-Australia2010/219	Ureaplasma parvum 7d	125
IMS-Australia2010/220	Ureaplasma parvum 7d	125

Australia 2008 (Protocol 1)

Kodierung	Behandlung	Gesationsalter (Tage)
IMS-Australia2008/50	Ureaplasma parvum 3d	100
IMS-Australia2008/51	Ureaplasma parvum 3d	100
IMS-Australia2008/52	Ureaplasma parvum 3d	100
IMS-Australia2008/53	Ureaplasma parvum 3d	100
IMS-Australia2008/54	Ureaplasma parvum 3d	100
IMS-Australia2008/208	media	100
IMS-Australia2008/209	media	100
IMS-Australia2008/212	media	100
IMS-Australia2008/66	Ureaplasma parvum 7d	100
IMS-Australia2008/67	Ureaplasma parvum 7d	100
IMS-Australia2008/68	Ureaplasma parvum 7d	100
IMS-Australia2008/69	Ureaplasma parvum 7d	100
IMS-Australia2008/70	Ureaplasma parvum 7d	100
IMS-Australia2008/217	Ureaplasma parvum 14d	100
IMS-Australia2008/218	Ureaplasma parvum 14d	100
IMS-Australia2008/219	Ureaplasma parvum 14d	100
IMS-Australia2008/220	Ureaplasma parvum 14d	100
IMS-Australia2008/221	Ureaplasma parvum 14d	100

Australia 2008 (Protocol 5)

Kodierung	Behandlung	Gestationsalter
IMS-Australia2008/71	Control	
IMS-Australia2008/91	Control 7 +1 day	
IMS-Australia2008/119	7 day control 7 + 3 day saline	
IMS-Australia2008/56	Control 1 day saline	
IMS-Australia2008/61	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/72	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/73	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/74	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/75	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/76	II-1 1 Tag	
IMS-Australia2008/77	II-1 1 Tag	

IMS-Australia2008/92	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/109	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/110	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/111	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/112	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/113	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/114	II-1 7 Tage	
IMS-Australia2008/94	II-1 3 Tage	
IMS-Australia2008/120	II-1 3 Tage	
IMS-Australia2008/121	II-1 3 Tage	
IMS-Australia2008/124	II-1 3 Tage	
IMS-Australia2008/126	II-1 3 Tage	