

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Abteilung Neonatologie Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**UNTERSUCHUNG DER MIKROZIRKULATION
BEI NEUGEBORENEN
ALS MÖGLICHKEIT ZUM FRÜHSCREENING VON INFEKTIONEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dana Preußner

aus
Rostock

Jahr
2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andrej Khandoga
Prof. Dr. Andreas Holzinger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Alexandra Puchwein-Schwepcke

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2014

Für meine Eltern

... und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne.

(Hermann Hesse)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Infektionen des Neugeborenen	9
1.1.1	Epidemiologie	9
1.1.2	Definitionen und Pathogenese	10
1.1.3	Risikofaktoren	12
1.1.4	Immunantwort	13
1.1.5	Diagnostik	15
1.1.6	Therapie	21
1.2	Mikrozirkulation	22
1.2.1	Definition	22
1.2.2	Regulatorische Mechanismen	23
1.2.3	Besonderheiten beim Neugeborenen	25
1.2.4	Dysfunktionelle Mikrozirkulation	26
1.2.5	Techniken zur Observation	27
1.3	Screeningtests	34
1.4	Zielsetzung	35
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	Patientenkollektiv	36
2.2	Einverständniserklärung	36
2.3	Studiendesign	36
2.4	Patientengruppen	38
2.5	Untersuchung der Mikrozirkulation	39
2.5.1	Funktionsweise des MicroScan Mikroskops	39
2.5.2	Versuchsaufbau	40
2.5.3	Durchführung der Messungen	41
2.6	Auswertung	43
2.6.1	Datenverarbeitungssysteme	43
2.6.2	Vorgehensweise	44
2.6.3	Mikrozirkulatorische Parameter	47

2.6.4	Statistische Auswertung	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Patientenkollektiv	49
3.2	Patientenalter zum Messzeitpunkt	49
3.3	Klinische Daten	50
3.3.1	Geburtsmodus	51
3.3.2	Infektionsrisiken	52
3.3.3	Entzündungswerte	53
3.3.4	Mikrobiologie.....	54
3.3.5	Antibiotische Behandlung	54
3.3.6	Sonstige Medikation	54
3.4	Mikrozirkulatorische Ergebnisse	55
3.4.1	Sofortauswertung.....	55
3.4.2	Analyse mit AVA	57
3.4.2.1	Übersicht Mikrozirkulatorischer Parameter	57
3.4.2.2	Funktionelle Kapillardichte.....	58
3.4.2.3	Gefäßoberfläche	59
3.4.2.4	Verteilung der Gefäßdurchmesser	60
3.4.2.5	Flussqualität.....	61
3.4.3	Übersicht der Perfusions-Befunde.....	62
3.4.4	ROC-Analysen.....	63
3.4.4.1	Flussqualität.....	63
3.4.4.2	Mikrozirkulatorischer Fluss	64
3.4.4.3	Subjektiver Score.....	65
4	DISKUSSION.....	66
4.1	Zeigen sich Unterschiede in der Mikrozirkulation bei Neugeborenen mit Infektion im Vergleich zu gesunden Neugeborenen?	66
4.1.1	Funktionelle Kapillardichte.....	66
4.1.2	Gefäßoberfläche	68
4.1.3	Verteilung der Gefäßdurchmesser	69
4.1.4	Flussqualität.....	69
4.1.5	Subjektiver Score.....	72
4.1.6	Divergierende Befunde	72

4.2	Können auch Infektionen mit nur geringem Anstieg der Infektionsparameter erkannt werden?	73
4.3	Ist SDF-Imaging als Screeningmethode für Neugeboreneninfektionen geeignet und realisierbar?	73
4.4	Neugeboreneninfektionen.....	76
4.5	OPS und SDF-Imaging in der Neonatologie.....	78
4.6	Auswertung	81
4.6.1	Sofortauswertung.....	81
4.6.2	Analyse mit AVA.....	81
4.7	Kritik und Ausblick	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	ANHANG	87
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	87
6.2	ROC-Analyse der Gefäßoberfläche	88
6.3	Gefäßoberfläche im Gruppenvergleich	89
6.4	Flussqualität im Gruppenvergleich.....	89
6.5	Flussqualität nach Gefäßgrößen.....	90
6.6	Elterninformation und -einwilligung	91
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	DANKSAGUNG	103
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Fließender Übergang von der klinischen Sepsis bis zum Multiorganversagen	11
Abb. 2 Verlauf der IL-6 Ausschüttung im Vergleich zur CrP Sekretion ⁸¹	18
Abb. 3 Aufbau der Mikrozirkulation	22
Abb. 4 Axialmigration der Erythrozyten	23
Abb. 5 Entwicklung der Hautdurchblutung.	25
Abb. 6 Prinzip der LDF ¹¹⁷ (li.) mit Sender und Empfänger; Perfusions-Imaging mit LDI ¹¹³ (re.).....	28
Abb. 7 Konfokalmikroskop ³⁰	29
Abb. 8 Prinzip der NIRS-Technik ²³	29
Abb. 9 Nagelfalzvideokapillaroskopie ²⁵ (links)	30
Abb. 10 schematische Darstellung des Funktionsprinzips der OPS Technik ²⁹	32
Abb. 11 Konzentrisch angeordnete Leuchtdioden (LED´s) des Mikroskops (SDF-Imaging)	32
Abb. 12 Vergleich zwischen OPS- und SDF-Imaging ¹⁴	33
Abb. 13 Darstellung der Mikrozirkulation mittels SDF beim Neugeborenen	33
Abb. 14 Tragbares MicroScan Videomikroskop mit sterilen Schutzkappen	39
Abb. 15 Versuchsaufbau mit MicroScan Videomikroskop, Ladegerät, Bildwandler und PC	40
Abb. 16 Positionierung der Lichtquelle an der oberen Ohrmuschel.....	41
Abb. 17 Versuchsaufbau und Messsituation bei einem Neugeborenen	42
Abb. 18 Flussqualitäten des MFI und der Sofortauswertung im Zusammenhang	44
Abb. 19 Aufnahme der Mikrozirkulation	45
Abb. 20 Auswertung einer Sequenz mit dem Programm AVA.....	46
Abb. 21 Microcirculatory Report	46
Abb. 22 Patientenkollektiv.	49
Abb. 23 Verteilung der Geburtsmodi.	51
Abb. 24 Auftreten von Infektionsrisiken.....	52
Abb. 25 Maximale CrP und IL-6 Werte vor mikrozirkulatorischer Messung.....	53
Abb. 26 Verteilung der antibiotisch behandelten Patienten	54
Abb. 27 Mikrozirkulatorischer Fluss der Sofortauswertung	56
Abb. 28 Subjektiver Score der Sofortauswertung	56
Abb. 29 Funktionelle Kapillardichte im Vergleich	58
Abb. 30 Gefäßoberfläche im Vergleich	59
Abb. 31 Verteilung der Gefäßdurchmesser.....	60
Abb. 32 MFI der gesunden Kontrolle im Vergleich zur Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl.....	61
Abb. 33 ROC-Analyse des Microvascular Flow Index der AVA-Analyse.....	63
Abb. 34 ROC-Analyse des mikrozirkulatorischen Flusses der Sofortauswertung	64
Abb. 35 ROC-Analyse für den subjektiven Score der Sofortauswertung.....	65
Abb. 36 ROC-Analyse der Gefäßoberfläche	88
Abb. 37 Anteile an Microvascular Flow ≤3,0 und hyperdynamen MFI	89
Abb. 38 MFI der AVA-Analyse nach Gefäßgröße differenziert	90
Abb. 39 Informationsblatt für Eltern und Einwilligungserklärung.....	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Die häufigsten bakteriellen Sepsiserreger in der Neonatalperiode.....	12
Tab. 2 Das unreife Immunsystem des Neugeborenen ^{3, 5, 52, 53, 66}	15
Tab. 3 Einteilung des Studienkollektivs in Gruppen nach CrP Werten	38
Tab. 4 Definierte Gefäßdurchmesser für die Auswertung mit AVA.....	43
Tab. 5 Sofortauswertung der mikrozirkulatorischen Messung	44
Tab. 6 Analytierte mikrozirkulatorische Parameter mit zugehöriger Einheit.....	47
Tab. 7 Verwendete statistische Tests	48
Tab. 8 Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Messung im Gruppenvergleich	49
Tab. 9 Klinische Daten der Studiengruppe.....	50
Tab. 10 Infektionsrisiken im Gruppenvergleich	52
Tab. 11 CrP und IL-6 Werte im Gruppenvergleich.....	53
Tab. 12 Ergebnisse der Sofortauswertung.....	55
Tab. 13 Gruppenvergleich mikrozirkulatorischer Parameter.....	57
Tab. 14 Anteile positiver und negativer Befunde	62
Tab. 15 Gruppenvergleich der Gefäßoberfläche.....	89
Tab. 16 Flussqualitäten im Gruppenvergleich.....	89
Tab. 17 Ergebnisse der Flussqualität in der AVA-Auswertung	90

1 Einleitung

1.1 Infektionen des Neugeborenen

1.1.1 Epidemiologie

In der Neonatologie stellen bakterielle Infektionen die weltweit häufigste Ursache von Morbidität und Mortalität dar^{83, 90}. Neugeboreneninfektionen verursachen jährlich etwa 1,6 bis 2 Millionen Todesfälle. Täglich sterben über 4000 Neugeborene in Entwicklungsländern an Infektionsfolgen. Infektionen tragen so zu einem erheblich großen Teil der neonatalen Sterblichkeit in der dritten Welt bei^{33, 83, 109}. Obwohl die Letalität in den Industrieländern niedriger liegt, betreffen auch dort fast die Hälfte aller Infektionen Kinder im Säuglingsalter⁴¹.

Systemische Infektionen bei Neugeborenen werden mit einer Häufigkeit von 1,1-2,7 % angegeben⁹⁰. Die Letalität der schweren Neugeboreneninfektion liegt je nach Quelle zwischen 20 und 69 % und zeigte in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten nur eine geringe Reduktion^{3, 41, 54}.

Das bakterielle Spektrum neonataler Infektionen variiert von Region zu Region³³ und beeinflusst neben Dauer und Ausmaß die Prognose einer Neugeboreneninfektion maßgeblich. Zu den mit Infektionen assoziierten Folgeerkrankungen gehört die periventriculäre Leukomalazie, welche Paresen und Retardierung mit sich bringen kann^{90, 112}.

Neonatale Infektionen stellen somit ein weltweites Problem dar. Das durch frühe Diagnostik effektive therapeutisches Eingreifen zur Verbesserung der Prognose ist deshalb eine der Prioritäten in der Neonatologie⁹⁰.

1.1.2 Definitionen und Pathogenese

Für bakterielle Infektionen des Neugeborenen existieren keine klaren Klassifikationen, da es fließende Übergänge gibt und keine einheitlichen Definitionen bestehen¹¹⁰.

Unter einer *Infektion* im Allgemeinen wird eine vermutete oder nachgewiesene Invasion durch einen pathogenen Erreger verstanden. Auch ein für eine Infektion wahrscheinliches klinisches Erscheinungsbild kann bereits als solche eingestuft werden. Sowohl ein auffälliger klinischer Untersuchungsbefund, als auch mikrobiologische Nachweise, sowie erhöhte Entzündungsparameter und bildgebende Verfahren können als Nachweis einer Infektion dienen³⁸. Neben lokalen Infektionen, die sich auf eine Region beschränken, kann man zwischen Organinfektionen und solchen systemischer Art unterscheiden⁸⁵.

Systemische Entzündungsreaktionen kann man unterteilen in die klinische Sepsis, die Sepsis, sowie die schwere Sepsis und den septischen Schock. Die *klinische Sepsis* wird auch Systemic inflammatory response Syndrome (SIRS) oder Systemische Entzündungsreaktion (SER) genannt und zeichnet sich durch das klinische Bild einer Infektion aus³³. Erregernachweise sind hier, wenn überhaupt, nur in Haut- / Schleimhautabstrichen, definitionsgemäß aber nicht in der Blutkultur möglich. Für die Diagnose müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien zutreffen: Körperkerntemperatur über 38,5 °C oder unter 36 °C, Tachykardie oder Bradykardie sowie Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie jeweils bezogen auf die Altersnorm³⁸. Die Sepsis hingegen ist durch einen Erregernachweis im Blut mittels Blutkultur definiert⁹⁰. Eine Sauerstoffmangelversorgung durch Missverhältnis zwischen Sauerstoff-/Nährstoffangebot und -bedarf führt zu einer schweren Sepsis mit Organdysfunktion. Der septische Schock ist durch eine Insuffizienz des kardiovaskulären Systems gekennzeichnet, führt zu Blutdruckabfall mit metabolischer Azidose und kann einen foudroyanten Verlauf bis hin zum Multiorganversagen (Multiple Organ Dysfunction Syndrom; MODS⁵⁸) und Exitus letalis annehmen^{38, 86, 90}. Einen Überblick dazu zeigt nachstehende Abb. 1.

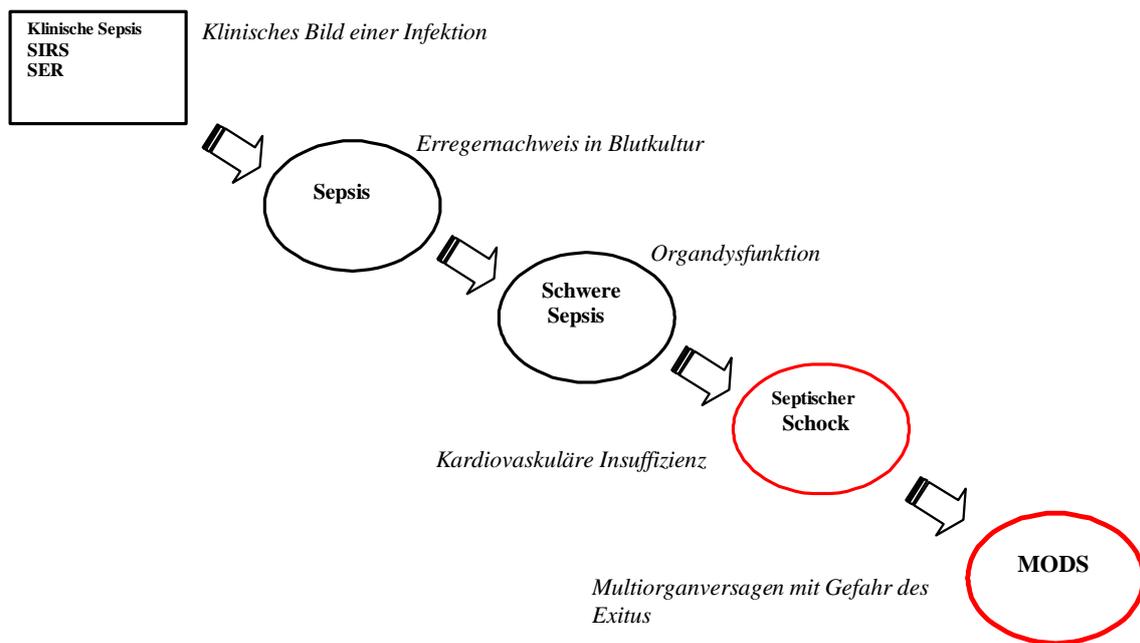


Abb. 1 Fließender Übergang von der klinischen Sepsis bis zum Multiorganversagen gemäß aktueller Definitionen der International pediatric sepsis consensus conference 2005 (frei nach ^{38, 41}). SIRS: Systemic inflammatory Response Syndrom; SER: Systemische Entzündungsreaktion; MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrom

Nach zeitlichem Einsetzen unterscheidet man in der Neonatologie zwischen einer early-onset Sepsis mit Beginn innerhalb der ersten drei bis sieben Lebenstage und der late-onset Sepsis mit späterem Auftreten^{3, 33, 52, 85, 106, 109}.

Die early onset Sepsis entsteht meist aus einer aufsteigenden Infektion (vertikale Transmission) der mütterlichen Rektovaginalflora^{85, 90}. Eine Ansteckung erfolgt somit vermutlich vor oder während der Geburt¹⁰⁹ über das Fruchtwasser (Amnioninfektionssyndrom). Erste Symptome zeigen sich in über 80% innerhalb der ersten sechs Lebensstunden⁵². Häufigste Erreger sind in Industrieländern β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B^{85, 106}. In Entwicklungsländern wie Afrika oder Asien sind hingegen Gruppe-B Streptokokken seltener Ursache neonataler Infektionen^{83, 109}.

Bei späterer, nosokomialer Infektion (late-onset-Sepsis) spielen Keime des Kindes bzw. dessen Umgebung die entscheidende Rolle (horizontale Transmission). Hier dominieren grampositive Kokken wie koagulasenegative Staphylokokken (CONS)^{59, 106}. In etwa 50% der Fälle liegt eine Infektion des Liquor cerebrospinalis vor⁵². Weitere wichtige Erreger sind in Tab. 1, Seite 12 aufgeführt.

Early-onset Sepsis (EOS)	Late-onset Sepsis (LOS)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>β-hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B (GBS)</i> • <i>Escherichia coli</i> • Staphylokokkus aureus • Klebsiellen • Enterokokken • Streptokokken anderer Gruppen • <i>Listeria monozytogenes</i> • Anaerobier, bes. <i>Bacteroides fragilis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Koagulasenegative Staphylokokken (CONS ; KNS)</i>, z. B: <i>S. haemolyticus</i>, <i>S. epidermidis</i> • <i>Staphylokokkus aureus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Enterobacter</i> • <i>Serratien</i> • Klebsiellen

Tab. 1 Die häufigsten bakteriellen Sepsiserreger in der Neonatalperiode

Quantitativ dominierende sind kursiv dargestellt^{19, 33, 59, 90, 106, 109}. Epidemiologisch betrachtet nehmen GBS tendenziell bei Early-onset Sepsis ab, CONS bei Late-onset Sepsis eher zu^{3, 59}

Aufgrund der Vielfalt der Erreger und der Variabilität der neonatalen Immunantwort können für Neugeboreneninfektionen keine definierten Inkubationszeiten angegeben werden. Gruppe B-Streptokokken indizieren erfahrungsgemäß eine sehr rasch beginnende Infektion innerhalb der ersten drei Lebenstage mit ersten Anzeichen oft bereits direkt nach der Geburt. Im Gegensatz dazu setzen Infektionen mit *E. coli* etwa am zweiten bis dritten Lebenstag ein⁸⁵.

Neben Bakterien sind eine Vielzahl von Viren, wie z. B. Adenoviren, Enteroviren, Herpesviren oder Coxsackieviren als Erreger denkbar. Auch sexuell übertragbare Erreger wie Gonorrhoe und Syphilis³ können eine Rolle bei der Infektion des Neugeborenen spielen. Pilze wie z. B. *Candida albicans* sind hingegen seltener als Ursache festzumachen und betreffen eher Frühgeborene⁵. Auf virale Erreger und Pilze soll in dieser Arbeit nicht genauer eingegangen werden.

1.1.3 Risikofaktoren

Aufsteigende Infektionen im Sinne eines Amnioninfektionssyndroms (AIS) sind assoziiert mit einem Blasensprung von länger als 18 Stunden beim Reifgeborenen und über 12 Stunden beim frühgeborenen Kind. Ein bereits vor Beginn der Wehentätigkeit einsetzender vorzeitiger Blasensprung stellt ebenso einen Risikofaktor dar. Nach vorzeitigem Blasensprung werden 3-5 % der Neugeborenen infiziert, ist die Mutter mit Gruppe- B Streptokokken besiedelt steigt das Risiko auf 15 %⁹⁰.

Frühgeburtlichkeit, d.h. ein Gestationsalter von unter 37 Schwangerschaftswochen ist mit einer höheren Infektions-Inzidenz vergesellschaftet⁵⁶. Auch eine protrahierte Geburt, Mekoniumaspirationssyndrom und Tachykardie des Feten >180/Min oder >160/Min über zwei Stunden erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten entscheidend⁹⁰. Zudem kann eine maternale Infektion mit Fieber über 38 °C sowie mütterliche CrP-Erhöhung ab 2 mg/dl eine Sepsis des Neugeborenen indizieren^{52, 83, 85, 90}.

Ein erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen haben Patienten mit (zentralen) Venenkathetern, Blasenkatheter, intratrachealer Beatmung und parenteraler Ernährung sowie langer Hospitalisierung⁵.

⁹⁰.

1.1.4 Immunantwort

Der Fetus befindet sich im Uterus in einer üblicherweise keimarmen Umgebung. Im Geburtskanal oder durch infektiöse Vorgänge vor oder während der Geburt ist das Neugeborene hingegen zahlreichen Mikroorganismen ausgesetzt³³.

Ein septisches Syndrom wird durch die Immunreaktion des Organismus und nicht durch den Erreger an sich ausgelöst. Durch freigesetzte Endotoxine wird eine Kaskade aktiviert, die eine metabolische und immunologische Entzündungsantwort auslöst. Neben exogenen Komponenten der Mikroorganismen können gramnegative und positive Bakterien sowie Pilze eine solche Reaktion bedingen^{57, 84}.

Beim Neugeborenen erfolgt die Immunreaktion verzögert, was durch die Unreife der einzelnen Komponenten seines Immunsystems erklärt werden kann. Die Ursache sind sowohl funktionelle als auch quantitative Einschränkungen in der humoralen und zellulären, spezifischen und unspezifischen Abwehr. Viele der im Folgenden beschriebenen relativen Schwächen des Immunsystems werden in den ersten sechs Lebensmonaten ausgeglichen⁵³.

► Zelluläre Immunität

Die neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) sind für die Phagozytose der Bakterien zuständig⁶⁶. Beim Neugeborenen ist deren Chemotaxis und Kapazität noch eingeschränkt³. Ihre Verformbarkeit, Adhäsionsfähigkeit und ihre Eignung zum Übertritt ins entzündete Gewebe (Diapedese) sind noch nicht voll ausgebildet^{5, 53}. Deshalb ist die Migration zum Ort des entzündlichen Geschehens beeinträchtigt⁵³. Zudem ist zwar ihre Gesamtzahl größer als beim Erwachsenen, die Menge mobilisierbarer Granulozytenreserven aufgrund der verzögerten Synthese im Knochenmark jedoch noch deutlich reduziert^{3, 52, 66}.

Monozyten haben die Fähigkeit zum Übertritt ins Gewebe und entwickeln sich bei diesem Vorgang zu Makrophagen⁶⁶. Trotz den Erwachsenenwerten gleichenden Monozytenkonzentrationen ist die Funktion der Makrophagen und deren Chemotaxis beim Neugeborenen noch vermindert^{3, 5}. Die Antigenpräsentation ist noch unzureichend und die verringerte Produktion von Cytokinen durch Makrophagen korrespondiert mit einer verminderten T-Zell-Produktion³.

T-Lymphozyten erkennen Erreger, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen markiert werden und aktivieren B-Zellen⁵². Noch unreif ausgebildete T-Zellen sind ineffektiv in der Cytokinproduktion und B-Zell Stimulation. Auch die zytotoxische Fähigkeit und Memoryfunktion ist noch defizient^{3, 53}.

Natürliche Killerzellen sind in neonatalem Blut nur in geringer Anzahl zu finden. Ihre Aufgabe ist die Abwehr von Viren und anderen intrazellulären Erregern wie z. B. Listerien^{52, 53}, sowie Tumorzellen⁶⁶. Ihre Interferon- γ Produktion ist noch nicht voll ausgebildet³ und dadurch die Aktivierung von Makrophagen vermindert⁵².

Auch die dendritischen Zellen sind beim Neugeborenen noch unreif. Ihre koordinative Funktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität ist deshalb noch erheblich eingeschränkt⁵².

► Humorale Immunität

Der erstmals von Paul Ehrlich beschriebene so genannte „Nestschutz“ soll die Schwächen des neonatalen Immunsystems partiell ausgleichen und besteht aus Immunglobulinen (Ig-G), die der Fetus über aktiven plazentaren Transfer von der Mutter erhält. Neben einem passiven Schutz bewirken diese Antikörper auch eine Aktivierung und Prägung des neonatalen Immunsystems. Die Übertragung erfolgt überwiegend im dritten Trimenon der Schwangerschaft^{52, 53}. Dies erklärt einen „physiologischen“ Immunglobulinmangel beim Frühgeborenen³. Die Eigenproduktion von Ig-G liegt unter dem Verbrauch der plazentar übertragenen Antikörper, wodurch etwa im dritten Lebensmonat ein physiologischer Tiefpunkt der Immunglobulin-Konzentration besteht^{52, 66}.

B-Lymphozyten sezernieren als aktivierte Plasmazellen Antikörper der fünf Immunglobulinklassen (Ig-M, Ig-D, Ig-G, Ig-A, Ig-E)⁵². Das Ungeborene kann ab der zehnten Gestationswoche Immunglobulin M synthetisieren, dennoch sind Ig-M Spiegel beim Neugeborenen noch niedrig. Ig-M bindet besonders effektiv an gramnegative Erreger. Die niedrigen Ig-M Spiegel erklären die Anfälligkeit für Infektionen mit Bakterien dieser Gruppe^{5, 53}. Ein effektiver Immunglobulin-Klassenwechsel von Ig-M auf Ig-G und Ig-A setzt eine Interaktion zwischen B- und T-Zellen voraus und ist erst ab der dritten Lebenswoche zu beobachten⁵³. Über die Muttermilch, insbesondere über das Kolostrum (Vormilch) erhält das Neugeborene Immunglobulin A von der Mutter^{3, 52}. Erst etwa im fünften Lebensjahr erreicht die Antikörperbildung die Effektivität eines Erwachsenen⁶⁶.

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Serumproteinen, die als Elemente einer Enzymkaskade an der Immunabwehr beteiligt sind. Dessen Aufgaben sind Zytolyse von Bakterien, Opsonierung und Aktivierung weiterer Komponenten des Immunsystems⁵². Konzentrationen einzelner Proteine dieses Systems sind beim Neugeborenen individuell unterschiedlich repräsentiert und erreichen mit etwa dem sechsten Lebensmonat normale Spiegel. Komplementfaktoren sind nicht plazentagängig, das heißt das Kind erhält sie nicht von der Mutter^{5, 52, 53}. Die Opsonierung von Erregern wie Gruppe B-Streptokokken (GBS), E. coli, S. pneumoniae und anderen gramnegativen Bakterien ist durch diese Unreife unzureichend⁵³.

Neben den Komponenten der Immunreaktion sind auch physiologische Barrieren wie die Haut und Mukosa weniger effektiv als beim Erwachsenen. Insbesondere Frühgeborene sind davon stark betroffen. Hinzu kommen invasive Maßnahmen, wie Katheter aller Art (Venenkatheter, Blasenkateter etc.) die als Eintrittspforten für Erreger fungieren³. Eine Übersicht über die Defizite des neonatalen Immunsystems zeigt Tab. 2 auf Seite 15.

Schwächen des neonatalen Immunsystems

- Erhöhte Permeabilität der Haut und Schleimhäute
 - Eingeschränkte Phagozytenfunktion (Anzahl↓; Verformbarkeit↓, Adhärenz↓, Diapedese↓, Phagozytosefähigkeit↓, Cytokinproduktion↓)
 - Unreife Makrophagen (Chemotaxis↓, Antigenpräsentation↓, Cytokinproduktion↓)
 - T-Lymphozyten stimulieren B-Zellen noch unzureichend
 - Gedächtnisfunktionen der T- und B-Zellen entstehen erst postnatal
 - Geringe Anzahl natürlicher Killerzellen (Abwehr intrazellulärer Erreger beeinträchtigt)
 - Eingeschränkte koordinative Funktion dendritischer Zellen
 - Geringe Antikörpervielfalt
 - Niedrige Konzentration an Komplementfaktoren (50-75% der Erwachsenenlevels)
 - Nestschutz vor 30. SSW gering (Immundefizienz des Frühgeborenen)
-

Tab. 2 Das unreife Immunsystem des Neugeborenen ^{3, 5, 52, 53, 66}

Die Folge des unreifen neonatalen Immunsystems ist neben einem allgemein erhöhtem Infektionsrisiko die Gefahr schwerer und chronischer Verläufe⁵². Eine frühzeitige Diagnostik und effiziente Therapie von Neugeboreneninfektionen ist aufgrund dieser Tatsache essentiell um die Prognose zu verbessern.

1.1.5 Diagnostik

Die möglichst frühzeitige Diagnose von Neugeboreneninfektionen ist alltägliches Bestreben jedes Neonatologen um Morbidität und Mortalität zu senken¹⁹. Zudem ist es wichtig, nur tatsächlich erkrankte Kinder antibiotisch zu behandeln, um Resistenzentwicklungen der Erreger zu minimieren⁹⁰.

Neben der klinischen Beurteilung durch Ärzte und Pflegepersonal spielen Laborparameter unterschiedlich große Rollen.

► Klinische Infektionszeichen

Durch Einschätzung des klinischen Gesamtzustandes wird häufig die Indikation für weitere Diagnostik gestellt. Dennoch sind Anzeichen für neonatale Infektionen unspezifisch und schwer objektivierbar³.

Richtungweisend sind nicht selten dezente Symptome wie Trinkschwäche, herabgesetzte Reaktivität oder Berührungsempfindlichkeit⁹⁰. Das nicht zu unterschätzende Gefühl erfahrener Pflegekräfte ein Kind „gefalle ihnen nicht“ spiegelt sich außerdem in folgenden Anzeichen wider:

Dysfunktionen der Hautdurchblutung zeigen sich durch Blässe, Zyanose, Marmorierung oder verlängerte kapilläre Füllungszeit (>3 Sekunden) und sind hinweisend auf zentralisierende Prozesse^{35, 85, 90, 98}. Auffälligkeiten im Atemmuster der Neugeborenen können neben Tachypnoe und Dyspnoe auch thorakale Einziehungen, Stöhnen und Nasenflügeln sein^{33, 90}. Sauerstoffsättigungsschwankungen und Apnoen sind ebenfalls mögliche Symptome einer Infektion⁵². Des Weiteren kann die Temperaturregulation beeinträchtigt sein. So kommen sowohl Fieber über 38 °C, als auch hypotherme Phasen < 36,5 °C vor⁸⁵. Auffallende Temperaturlabilität oder eine Temperaturdifferenz von über 2 °C zwischen der rektal gemessenen Körperkerntemperatur und peripheren Bereichen sind vor allem bei der Infektion Frühgeborener zu beobachten⁹⁰. Analog dazu fühlen sich auch subjektiv die Extremitäten von Neonaten mit Infektion häufig kühl an. Weitere klinische Zeichen einer Sepsis können den Magen-Darm-Trakt im Sinne von Blähungen, Erbrechen, verzögerter Magenentleerung und Diarrhoe betreffen⁵. Einzig beweisende Symptome sind Hauterscheinungen wie Petechien, Pusteln, Abszesse oder Omphalitis, während alle anderen nur als richtungweisend fungieren^{85, 90}.

► Hämatologische Veränderungen

Hinweisend auf eine bakterielle Infektion können Leukozytenzahlen von unter 6 G/l oder eine Granulozytopenie unter 2 G/l sein, sowie eine Leukozytose über 30 G/l nach Normoblastenkorrektur⁹⁰. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass diese Veränderungen zum einen erst bei progredientem Infektionsverlauf zu beobachten sind, zum anderen ein physiologischer Abfall der Leukozytenzahl ab dem vierten bis fünften Lebenstag deren diagnostischen Wert einschränkt⁸⁵. Normalwerte für die Gesamtleukozytenanzahl unterliegen bei Neugeborenen großen Schwankungen und erstrecken sich je nach Autor zwischen 10 und 36 G/l⁵².

Aufgrund des Geburtsstressses kann sich auch eine Linksverschiebung beim gesunden Neugeborenen ausbilden und ist deshalb erst ab dem zweiten Lebenstag als diagnostisches Werkzeug für Infektionen einsetzbar⁸⁵. Ein I/T-Quotient von über 0,2 kann ebenso hinweisend auf infektiöse Prozesse sein. Für diesen Wert werden unreife zu gesamten neutrophilen Granulozyten ins Verhältnis gesetzt (I/T; immature/total). Der Nutzen dieses Quotienten ist jedoch umstritten³³.

Die normale Anzahl an Thrombozyten liegt beim Neugeborenen in den ersten zehn Lebenstagen über 100 G/l. Eine Thrombozytopenie ist ein eher spätes Zeichen für eine Infektion mit geringer Sensitivität und Spezifität⁵².

► C-reaktives Protein (CrP)

Das CrP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, welche seit den 80er Jahren als Laborparameter zur Infektionsdiagnostik eingesetzt werden¹⁹. Den Namen erhielt das Protein aufgrund seiner Fähigkeit zur Präzipitatbildung mit dem C-Polysaccharid der Pneumokokkenzellwand^{67, 70, 83}.

Weitere Akute-Phase-Proteine sind beispielsweise Transferrin, Haptoglobin, Orosomucoid, Fibrinogen und Prealbumin, deren diagnostischer Wert derzeit nicht ausreichend evaluiert ist^{33, 83}.

Das C-reaktive Protein hat seine Funktion in der Aktivierung der unspezifischen Abwehrreaktion. Die Induktion des Komplementsystems und Stimulation von Cytokinen gehören dazu. Durch Opsonierung anhand Komplexbildung mit Polysacchariden bakterieller Oberflächen und geschädigten körpereigenen Zellen werden außerdem Phagozyten aktiviert⁶⁷.

Die Synthese und Abgabe des C-reaktiven Proteins findet bei Inflammation in den Hepatozyten der Leber innerhalb von sechs bis acht Stunden statt und wird durch den Einfluss proinflammatorischer Cytokine (wie Interleukin 6 und 8, Tumornekrosefaktor α) stimuliert⁷⁰. Die höchsten Werte erreicht das Protein nach 24 bis 48 Stunden und sinkt je nach Dauer der Infektion wieder ab¹⁹. Aufgrund der kinetischen Eigenschaften des Proteins ist etwa 8-12 Stunden nach ersten klinischen Symptomen mit einem positiven Befund zu rechnen. Der frühdiagnostische Wert dieses Markers ist deshalb unbefriedigend^{52, 90}.

Das C-reaktive Protein ist im Gegensatz zu den proinflammatorischen Cytokinen nicht plazentagängig und ist somit spezifischer für eine *kindliche* Infektion⁸⁵.

Beim Gesunden liegt die Konzentration des C-reaktiven Proteins unter 0,1 mg/dl⁷⁰. Das CrP ist als sehr spezifisch einzustufen, allerdings auf Kosten einer geringeren Sensitivität. Es ist, abhängig vom Cut off Wert, eine Falsch-Positivrate von etwa 8 % beschrieben^{33, 111}. Celik et al. empfehlen für die Infektionsdiagnostik ein Cut off Level von 0,58 mg/dl, insbesondere bei der Bestimmung in Kombination mit der Messung von Interleukin 6¹⁹. Am Institut für klinische Chemie der Universität München gelten CrP-Werte von über 0,5 mg/dl als pathologisch. Am ersten Lebenstag ist häufig ein physiologischer Anstieg zu beobachten⁷⁰. Chiesa et al. beschrieben die Korrelation zwischen der physiologischen CrP-Erhöhung und Lebensalter mit einem Maximum im Alter von 24 Stunden. So lagen in deren Studie die CrP-Werte der klinisch unauffälligen Kinder bei 0,5/1,4/0,97 mg/dl im Alter von 0/24/48 Stunden (95. Perzentile)²¹. Auch die Schwere der Infektion korreliert häufig nicht zuverlässig mit der Höhe der CrP-Konzentrationen im Serum³³.

Neben der Infektionsdiagnostik wird die CrP-Bestimmung für die Verlaufskontrolle bei Antibiotikatherapie eingesetzt. Bei einem weiteren Anstieg 48 Stunden nach Therapiebeginn ist die Wahl des Antibiotikums zu überdenken und eine Umstellung zu erwägen⁷⁰.

Bei chronischen Erkrankungen wie Vaskulitis und rheumatoider Arthritis zeigen sich ebenso Erhöhungen dieses Akute-Phase-Proteins. Daneben wird eine leichte Erhöhung bei Arteriosklerose diskutiert⁶⁷. In der Neonatologie kann der CrP-Wert durch virale und nicht-infektiöse Ereignisse ansteigen. Krankheitsbilder wie Asphyxie, Mekoniumaspiration, Atemnotsyndrom oder Hirnblutungen sowie maligne Erkrankungen sind mögliche Ursachen^{19, 52, 54, 76, 83}.

► Interleukine

Systemische Entzündungsreaktionen werden durch zahlreiche proinflammatorische Cytokine als Entzündungsmediatoren getriggert. Es gibt wenige dieser Mediatoren, die von der noch eingeschränkten Funktionstüchtigkeit neonataler Immunzellen nicht betroffen sind. Die Interleukine 1, 6, 8 und der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) gehören dazu^{53, 90}. Für den Einsatz als Entzündungsmarker sind die Interleukine 6 und 8 (IL6; IL8) bisher am besten dokumentiert⁵².

Makrophagen und Monozyten sowie Endothelzellen und Fibroblasten schütten bei Bakterienkontakt IL6 (und IL8) aus^{52, 76}. Die Konzentration des Interleukin 6 steigt deshalb direkt nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen stark an. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit ist es jedoch bereits 24 Stunden nach Infektionsbeginn nahezu nicht mehr nachweisbar^{19, 83, 85}. Es induziert die Produktion von Fibrinogen und des C-reaktiven Proteins (CrP) in der Leber³³. Das CrP ist ein Akute-Phase-Protein und wird etwa 24 Stunden nach Stimulation von der Leber abgegeben⁵². Abb. 2 zeigt den Verlauf der Sekretion von IL6 und CrP.

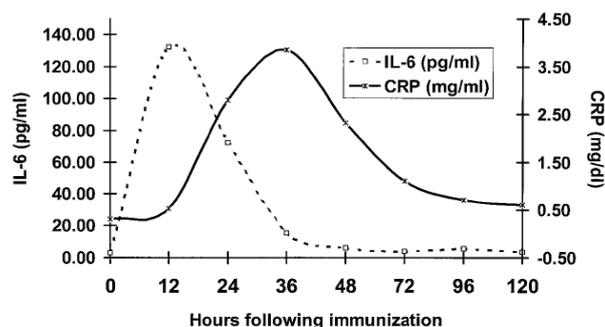


Abb. 2 Verlauf der IL-6 Ausschüttung im Vergleich zur CrP Sekretion⁸¹

Für Interleukin 6 empfiehlt Celik et al einen Cut off Wert von 24,65 pg/ml¹⁹. Am Institut für klinische Chemie der Universität München gilt für Neugeborene ein IL6 Wert von über 50 pg/ml als pathologisch. Die Interleukinmessung hat diagnostische Bedeutung als Frühmarker innerhalb von 24 Stunden nach Auftreten der Symptomatik. Die Schwere der Infektion kann mit der Konzentration des IL6 korrelieren und somit das Risiko für eine Gehirnbeteiligung aufzeigen¹¹². Nicht geeignet jedoch ist die Interleukinbestimmung als Verlaufskontrolle, da die physiologische Sekretion der Cytokine dann bereits wieder abfällt⁹⁰. Zu beachten ist zudem, dass die proinflammatorischen Cytokine plazentagängig sind und somit auch vom mütterlichen Organismus auf den Fetus übertragen werden können⁹⁰. Die Spezifität dieser Marker bezüglich der *kindlichen* Infektion ist deshalb eingeschränkt⁸⁵.

Des Weiteren ist die Erfassung hoher IL6 Konzentrationen nicht infektionsspezifisch und beispielsweise gleichermaßen bei Asphyxie erhöht¹¹². Ursache dafür ist, dass Entzündungsmediatoren auf eine Vielzahl von Reizen ausgeschüttet werden, neben Infektionen beispielsweise durch den Geburtsstress^{85, 90}.

Interleukin 8 trägt zur Aktivierung von Neutrophilen bei und spielt eine Rolle in der Chemotaxis⁸³. Von manchen Autoren wird seine Bestimmung gleichwertig neben der des IL6 empfohlen⁹⁰.

In der bisherigen Bewertung verschiedener Kombinationen von diagnostischen Parametern erscheint die gemeinsame Messung von CrP und IL6 als die Sinnvollste. Sensitivität und Spezifität können so maßgeblich erhöht, und die frühe Diagnostik von Neugeboreneninfektionen verbessert werden^{41, 52}.

► Procalcitonin (PCT)

Procalcitonin wird von verschiedenen Zelltypen als Antwort auf inflammatorische Prozesse synthetisiert und kann als Hormon oder Cytokin agieren. Im Wesentlichen wird es von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet. Liegt keine Infektion vor, ist die Synthese außerhalb dieser Region durch Suppression des entsprechenden Genes unterdrückt. Eine Entzündungsreaktion induziert die extrathyreoidale Synthese von Procalcitonin beispielsweise in Leber, Nieren, Pankreas und Leukozyten. Die Entzündungsreaktion durch PCT wird auf zwei Wegen aktiviert. Zum einen durch Lipopolysaccharide oder Toxine der Erreger, zum anderen mit Hilfe von Cytokinen⁴⁴.

Für die Neonatologie ist das Procalcitonin gemäß bisheriger Studien als Entzündungsmarker nur eingeschränkt geeignet. Dies liegt unter anderem daran, dass in der ersten Lebenswoche mit Maximum nach 24 Lebensstunden eine Erhöhung des PCT, ebenso wie es des CrPs physiologisch ist^{21, 110}. Ursache könnte eine Reaktion des Organismus auf die Ausbildung der physiologischen bakteriellen Darmflora sein⁴⁴. Procalcitoninmessungen könnten für die Diagnostik insbesondere der late-onset-Sepsis in Zukunft eine Rolle spielen und werden deshalb weiter evaluiert¹¹⁰.

Ursachen für einen PCT-Anstieg ohne vorliegende Infektion können große Traumen, wie etwa chirurgische Eingriffe sein, schwere Erkrankungen oder bestimmte maligne Geschehen. Auch die Behandlung mit Tumornekrosefaktor α , Antikörpern oder Interleukinen regt die Synthese proinflammatorischer Cytokine an^{33, 44}. Wesentlich ist laut Andreola et al die Korrelation des Anstiegs von Procalcitonin mit der Schwere der Infektion und somit des Outcomes, nicht mit dem Nachweis der Infektion an sich. Zudem steigt das Procalcitonin früher an als das C-reaktive Protein⁴. Die zukünftige diagnostische Bedeutung dieses Markers bleibt abzuwarten.

► direkter Erregernachweis

Als Goldstandard gilt nach wie vor der Nachweis von pathogenen Erregern in der Blutkultur^{52, 66}. Für die frühe Infektionsdiagnostik ist diese Untersuchung leider weniger hilfreich, da ein Ergebnis erst nach 48-72 Stunden zu erwarten ist¹⁹. Außerdem bleibt der positive Befund auch bei einem eindeutigen septischen Krankheitsbild in bis zu 80 % der Fälle aus⁹⁰. Falsch positive Befunde, beispielsweise mit koagulasenegativen Staphylokokken (CONS) durch Kontamination der Kultur sind ebenso in Betracht zu ziehen⁵². Ein weiteres Problem bei der Abnahme von Blutkulturen sind die relativ großen benötigten Blutmengen für ein zuverlässiges Ergebnis. Die verwendeten Abnahmesysteme erfordern für einen verlässlichen Befund ein bestimmtes Quantum an Blut. Den kleinen Patienten der Neonatologie können jedoch nicht dieselben Mengen entnommen werden wie etwa einem Erwachsenen. Die Folge sind häufig falsch negative Befunde⁴¹. Für den klinischen Alltag ist der mikrobiologische Erregernachweis dennoch wichtig, vor allem für den Einsatz einer kontrollierten Antibiotikatherapie mittels Antibiogramm. Da die Infektion vor allem bei der early onset Form über die Amnionflüssigkeit (Fruchtwasser) erfolgt, sollte die Erregersuche bei Infektionsverdacht neben Blutkulturen obligat in Magensaft, Abstrichen des

äußeren Gehörgangs und ggf. Trachealsekret erfolgen^{52, 90}. Je nach klinischem Erscheinungsbild sollte eine Liquorpunktion und Urinkultur erwogen werden, da insbesondere bei late-onset-Infektionen eine meningeale Beteiligung häufig ist⁵².

► Weitere diagnostische Möglichkeiten

Bei septischen Prozessen nimmt das Level des *Tumornekrosefaktors α* (TNF- α) zu. Dabei konnten höhere Anstiege bei Infektionen mit ausschließlich gramnegativen Bakterien im Gegensatz zu solchen mit grampositiven Erregern gezeigt werden⁸⁴. Für die Wahl der Antibiotika ist dieser Unterschied von großer Relevanz. Die Einsetzbarkeit von TNF- α als Entzündungsmarker wird derzeit weiter untersucht. *Fibronektin* kann auf Zelloberflächen und in extrazellulären Flüssigkeiten detektiert werden. Untersuchungen zeigten, dass Plasmakonzentrationen in septischen Zuständen signifikant abfallen. Der mögliche diagnostische Wert dieses Glycoproteins wird derzeit evaluiert³³.

Khassawneh et al zeigten eine gute diagnostische Qualität der kombinierten Messung von *Immunglobulin-M*-Konzentrationen und CrP⁵⁴. Ein klinischer Einsatz der Ig-M Messung wird derzeit dennoch nicht praktiziert.

Bisher ist keiner von allen diesen Markern optimal zur Infektionsdiagnostik in der Neonatologie geeignet¹⁹. Der Einführung adäquater, sowohl sensitiver als auch spezifischer Methoden ist deshalb große Bedeutung beizumessen.

Durch ein Monitoring der Hautdurchblutung können erhöhte Sympathikusaktivität und Hypoperfusion als früher Hinweis auf Infektion erkannt werden⁹⁹. Zur Einschätzung der Mikrozirkulation werden Untersuchungen wie die kapilläre Füllungszeit, Temperatur und die Bestimmung der Serum-Laktat Konzentration herangezogen^{98, 99}. Ein Laktatspiegel über 3 mmol/L ist mit Sepsis assoziiert und deutet auf eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff hin^{41, 51}.

Bildgebende Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation sind im Kapitel 1.2.5, ab Seite 27 vorgestellt.

1.1.6 Therapie

Die kalkulierte Antibiotikatherapie bei begründetem klinischem Infektionsverdacht sofort nach Abnahme der Blutkulturen ist entscheidend für das Outcome der Patienten. Je nach zu erwartendem Erregerspektrum sollte eine empirische Wahl der Antibiotika erfolgen, die an aktuelle Resistenzen angepasst ist³. Als Kombination werden der intravenöse Einsatz eines Aminopenicillins mit einem Cephalosporin der Gruppe 2/3 oder einem Aminoglycosid als initiale Standardtherapie bei Neugeboreneninfektionen empfohlen. Die Dauer der Therapie richtet sich nach der Schwere der Infektion und Art des Erregers. Eine zusätzliche perorale Candidaphylaxe mit Nystatin wird diskutiert und kann erwogen werden. Adjuvante intensivmedizinische Therapiemaßnahmen instabiler Patienten je nach Symptomatik sind ebenso obligat wie eine kontrollierte bzw. angepasste Antibiotikatherapie nach Vorliegen eines Antibiogramms oder bei Therapieversagen^{85, 90}.

Bei Vorliegen bestimmter Risikofaktoren werden der Mutter bereits intrapartal intravenös Antibiotika gegeben, um eine Infektion des Neugeborenen zu vermeiden bzw. einzudämmen⁵².

1.2 Mikrozirkulation

1.2.1 Definition

Als Mikrozirkulation wird das feine Netz zahlreicher Gefäße mit einem Durchmesser bis 100 μm bezeichnet. Aufsummiert ergibt deren Endotheloberfläche mehr als 0,5 km^2 . Eine funktionierende Mikrozirkulation ist Voraussetzung für die Gewebsversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff^{50, 102, 107}. Die einzelnen Gefäßtypen (siehe Abb. 3) des mikrozirkulatorischen Gefäßsystems haben charakteristische Merkmale und Aufgaben. Das nährstoffreiche arterielle Blut fließt von Arteriolen über Metarteriolen in die Kapillaren und von dort über Venolen in das venöse System zurück. Die Arteriolen haben eine muskuläre Wand, wodurch sie ihren Durchmesser aktiv ändern können. Jede Gewebeatart und somit jedes Organ kontrolliert den eigenen Blutfluss am individuellen Bedarf mithilfe von

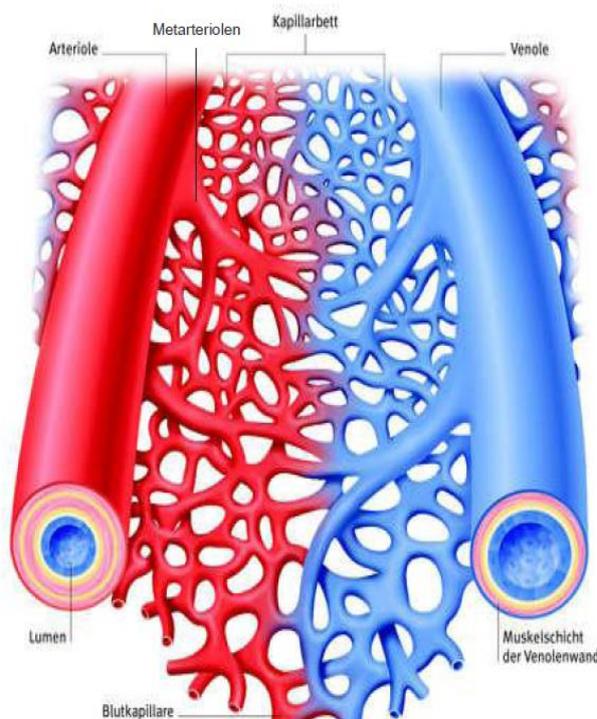


Abb. 3 Aufbau der Mikrozirkulation

(modifiziert nach¹¹⁴)

Änderungen der Arterioldurchmesser⁴⁰. Zudem findet der bedeutendste Abfall des Blutdrucks und der größte Anstieg des Flusswiderstands im Organismus entlang der Arteriolen statt⁷.

Die Verbindung zwischen Arteriolen und Kapillaren sind die Metarteriolen (terminale Arteriolen). Sie weisen nur schwache Muskelfasern auf, die intermittierend lokalisiert sind. Am Übergang der Metarteriolen in die Kapillaren befinden sich sog. präkapilläre Sphinktermuskeln⁴⁰. Durch die große Oberfläche der Kapillaren wird ein schneller Molekülaustausch gewährleistet⁴⁷. Venolen sind größer als Arteriolen und haben eine schwächere Muskelschicht. Sie transportieren das nährstoffarme Blut zurück ins venöse System.

Etwa zehn Milliarden Kapillaren versorgen die Zellen mit Sauerstoff sowie Nährstoffen und transportieren Abfallstoffe ab. Dieser Molekülaustausch wird durch die Interzellularspalte zwischen den Endothelzellen ermöglicht. Der Kapillardurchmesser reicht von etwa 4-9 μm . Weitere Funktionen sind Signalübertragung für das endokrine System, Wärmeregulation, Flüssigkeitsaustausch mit dem Interstitium (Regulation des Wasserhaushalts) und Träger des immunologischen Systems^{6, 40, 61, 104, 107}.

Durch den so genannten Fahraeus-Lindqvist Effekt ordnen sich die verformbaren Erythrozyten in Kapillaren intravaskulär im Zentrum an, was auch als Axialmigration bezeichnet wird (vgl. Abb. 4)⁹⁶. Die roten Blutkörperchen bewegen sich aufgrund erhöhter Schubspannung zylinderartig hintereinander und werden von einer zellarmen Randschicht umgeben.

Der Hämatokrit und die Viskosität werden dadurch lokal verringert, da die Erythrozyten weniger Reibung gegeneinander aufbringen. Auch an Zweigstellen im Gefäßnetz ist der Hämatokrit nicht gleichmäßig verteilt. Diese Heterogenität macht die Mikrozirkulation vulnerabler während hypoxischer Geschehen⁴⁷.

¹⁰⁷.

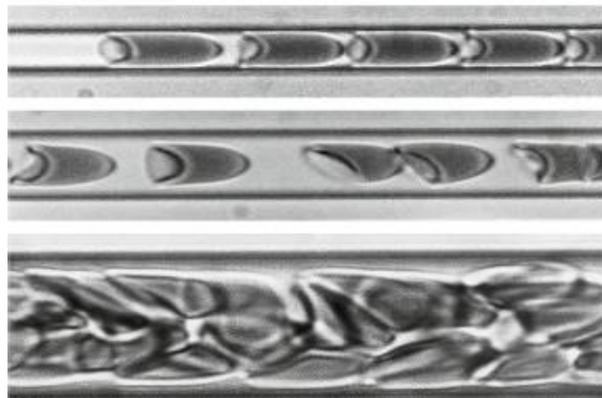


Abb. 4 Axialmigration der Erythrozyten

Parabolförmige rote Blutkörperchen in Kapillaren mit zellarmer Randschicht (Oben, Mitte). Schon in etwas größeren Gefäßen nehmen die Blutzellen diverse andere Formen an (unten)⁹⁶

Die Messung mikrozirkulatorischer Parameter mittels der für diese Arbeit verwendeten Sidestream Dark Field Technik erfolgt im Bereich der Endstrombahn der Gefäße.

1.2.2 Regulatorische Mechanismen

Um einen für das Gewebe angemessenen Fluss zu gewährleisten bestehen metabolische und myogene autoregulatorische Mechanismen auf regionaler und systemischer Ebene. Durch Interaktion zahlreicher Signalübertragungswege findet die Regulation des mikrozirkulatorischen Blutflusses statt. Die Mikrozirkulation ist ein hoch funktionelles aktives System, das mit zirkulierenden Zellen und Mediatoren dynamisch interagiert^{64, 94, 107}.

Aufgrund der so genannten Vasomotion findet der normale Blutfluss in der Mikrozirkulation kaum merklich intermittierend statt. Die Muskulatur der Metarteriolen und die kapillären Ein- und Ausgänge bedingen diese abwechselnde Öffnung und Schließung der feinen Gefäße. Der Sauerstoff- und Nährstoffaustausch wird so bei Bedarf durch längere Öffnungsdauer erhöht. Die Regulation der Vasomotion orientiert sich am minimal notwendigen Durchflussvolumen, wodurch keine Reserven unnötig verbraucht werden⁴⁰.

Die kurzfristige Kontrolle des Blutflusses findet über schnelle Vasodilatation oder -konstriktion der Arteriolen, Metarteriolen und präkapillären Sphinkteren innerhalb von Sekunden bis Minuten statt. Die dauerhafte Anpassung an einen erhöhten Bedarf erfolgt hingegen über eine Größenadaption sowie veränderte Anzahl der versorgenden Gefäße. Eine Langzeit-Regulation wird z. B. durch chronische Überaktivität oder niedrigen atmosphärischen Sauerstoffgehalt nötig. Je nach steigendem oder fallendem Bedarf findet eine Erhöhung oder Erniedrigung der Vaskularisierung statt. Faktoren, die eine Vaskulogenese ermöglichen, sind der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor (Vaskular Endothelial Growth Factor, VEGF) sowie Angiogenin. Die Vaskularisation ist am maximalen Blutflussbedarf orientiert. So sind zusätzliche Gefäße in normaler Situation konstringiert und dilatieren bei Auftreten lokaler Stimuli wie Sauerstoffmangel. Ist ein Gefäß blockiert, bilden sich Umgehungskreisläufe durch Kollateralen. Auch hierdurch wird der Blutfluss durch Ausbau des Gefäßnetzes sichergestellt⁴⁰.

Der Anpassung der Gefäßdurchmesser an den aktuellen Bedarf liegen verschiedene mögliche Mechanismen zugrunde. In der vasodilatorischen Theorie wird die Ansicht vertreten, dass bei großem metabolischem Umsatz auch die Menge vasodilatorischer Substanzen größer ist. Diese dringen an vorgeschaltete Gefäße und erweitern sie. Vasodilatorische Wirkung haben unter anderem Adenosin, Kohlenstoffdioxid, Histamin und Wasserstoff⁴⁰. Bei der Sauerstoffmangeltheorie oder Nährstoffmangeltheorie wird davon ausgegangen, dass vorhandene Nährstoffe Vasokonstriktion bedingen und bei deren Abwesenheit der Fluss durch Dilatation erhöht wird.⁴⁰

Bei steigendem arteriellem Blutdruck findet eine Autoregulation des Blutflusses in mikrozirkulatorischen Gefäßen statt. Der Fluss im Gewebe bleibt bei arteriellen Blutdruckwerten zwischen 70 und 175 mmHg nahezu gleich. Kleine Gefäße konstringieren bei steigendem arteriellem Blutdruck und halten somit ihren Fluss normal. Auch für diese wichtige Funktion gibt es zwei mögliche Erklärungen. Laut der metabolischen Theorie entsteht durch den erhöhten Blutdruck ein Überangebot an Nährstoffen und Sauerstoff und deshalb eine reaktive Vasokonstriktion. Die myogene Theorie hingegen geht von einer plötzlichen Dehnung kleiner Gefäße aus, die eine Kontraktion der Muskeln der Gefäßwände indiziert⁴⁰.

Als Antwort auf eine lokale Erhöhung des Nährstoffbedarfs können distale Kapillaren an deren proximalen Ursprungsarteriolen eine Dilatation induzieren. Dies wird durch Weiterleitung elektrischer Impulse von Endothelzelle zu Endothelzelle ermöglicht. Jener Vorgang zur Erhöhung des Sauerstoffangebots im Gewebe wird auch als geleitete Gefäßerweiterung (Conducted Vasodilatation, CVD) bezeichnet und durch Neurotransmitter des Sympathikus reguliert^{7, 94}.

Die Perfusion der kapillären Gefäße wird zudem über humorale Faktoren wie Hormone und Ionen kontrolliert⁷. Vasokonstriktorisches wirken Norepinephrin und Epinephrin (Noradrenalin und Adrenalin/Suprarenin). Norepinephrin ist ein besonders stark vasokonstriktorisches Hormon. Epinephrin wirkt etwas weniger gefäßverengend und induziert zusätzlich in bestimmten Gefäßen wie den Koronararterien eine leichte Vasodilatation. Beide werden bei Sympathikusaktivierung ausgeschüttet. Die stärkste bekannte vasokonstriktorisches Substanz ist Angiotensin, welches vor allem kleine Arteriolen verengt. Der Gesamtwiderstand im Organismus wird erhöht und damit der arterielle Blutdruck gesteigert. Vasopressin (antidiuretisches Hormon, ADH) aus dem Hypothalamus zeigt ebenso eine stark vasokonstriktorisches Wirkung und bedingt Wasserrückresorption der Nieren⁴⁰.

Zu den vasodilatatorisch wirkenden Hormonen gehören die Kinine. Bradykinin bewirkt eine starke Dilatation der Arteriolen sowie eine erhöhte Permeabilität und hat eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Von Mastzellen und basophilen Granulozyten aller Gewebe wird Histamin bei Verletzung, Entzündung oder allergischer Reaktion ausgeschüttet. Es bewirkt Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung und hat ödematöse Wirkung. Eine erhöhte Schubspannung durch schnellen Fluss in den Arteriolen kann eine Dilatation größerer Arterien auslösen, welche durch die Faktoren Stickstoffmonoxid (NO) oder des sog. Endothelial derived relaxing factor (EDRF) bewirkt wird⁴⁰.

1.2.3 Besonderheiten beim Neugeborenen

Die Hautdurchblutung des Neugeborenen zeichnet sich durch einen dichten subepidermalen Plexus aus. Im Gegensatz zum Erwachsenen zeigen sich außer an Handflächen, Fußsohlen und im Nagelfalzbereich noch keine vertikal angelegten papillären Schlingen. Die Mikrozirkulation des Neugeborenen zeigt nur wenig regionale Variabilität, ist aber bis in tiefe Hautschichten von einem noch relativ ungeordneten, horizontal verlaufenden Gefäßnetz durchsetzt. Bereits am Ende der ersten Lebenswoche beginnen sich die feinen Gefäße zu ordnen und die ersten Schlingen (Papillary Loops) zu bilden (siehe Abb. 5)^{34, 36, 79}.

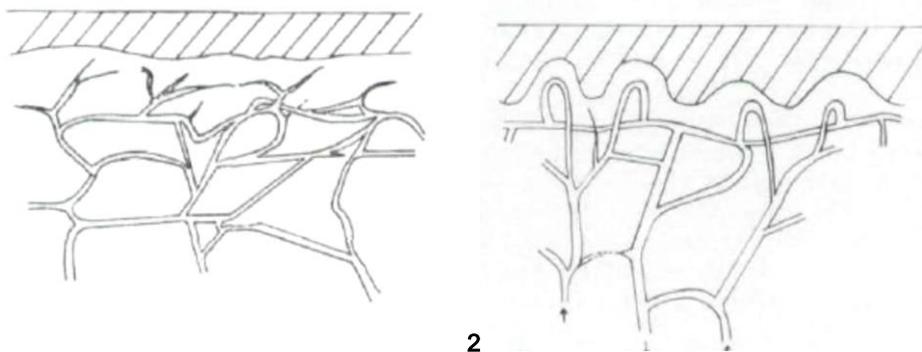


Abb. 5 Entwicklung der Hautdurchblutung.

(1) Mikrozirkulation eines Neugeborenen mit horizontalem subepidermalen Plexus

(2) Ausgebildete „Papillary Loops“ mit vertikaler Anordnung im dritten Lebensmonat⁷⁹

Die funktionelle kapilläre Dichte (functional capillary density, FCD) nimmt beim Frühgeborenen während des ersten Lebensmonats deutlich ab und korreliert mit sinkendem Hämoglobin und der Inkubortemperatur⁶¹. Bei reif geborenen Kindern kann man eine Abnahme der FCD innerhalb der ersten Lebenswoche beobachten¹⁰⁰.

Zur Thermoregulation bei warmer Außentemperatur fällt die Hauttemperatur durch Vasokonstriktion peripher stärker ab als zentral, was an einer peripher-zentralen Temperaturdifferenz erkennbar sein kann. Bei Vasodilatation nähern sich beide Temperaturen einander an. Gemeinsam mit der Messung der kapillären Füllungszeit ist die Erfassung der peripher-zentralen Temperaturdifferenz ein diagnostisches Werkzeug zur Beurteilung der kardiovaskulären Situation des Neugeborenen⁸⁷.

Beim Neugeborenen weist die Haut im Verhältnis zu ihrem Sauerstoffbedarf einen verhältnismäßig hohen Blutfluss auf³⁶. Die kardiovaskuläre Antwort auf hypoxische Geschehen ist beim Früh- und Neugeborenen aufgrund der schon im physiologischen Zustand hohen Herzfrequenz stark limitiert. In Stresssituationen findet eine Kompensation durch Vasokonstriktion arteriovenöser Shunts der Haut statt. Da dies unmittelbar eine insuffiziente Hautperfusion mit sich bringt, wird die Haut auch als „Schockorgan des Neugeborenen“ bezeichnet. Mikrozirkulatorische Veränderungen der Haut sind deshalb bei septischen Geschehen zu erwarten^{24, 111}.

1.2.4 Dysfunktionelle Mikrozirkulation

Nahezu alle Erkrankungen zeigen im Verlauf eine gewisse Beeinträchtigung der Mikrozirkulation. Sepsis verursacht strukturelle Beeinträchtigungen, Dysfunktionen und Störungen der Ordnung mikrozirkulatorischer Gefäßnetze. Es konnten eine verminderte Gefäßdichte (Vessel Density) und ein größerer Anteil nicht perfundierter oder intermittierend durchbluteter Kapillaren beobachtet werden. Diese Heterogenität der mikrovaskulären Perfusion wurde mehrfach bei septischen Geschehen beschrieben. Das bei einer Infektion entstehende Kapillarleck führt zu einem verringerten intravasalen Volumen mit Zentralisierung. Eine Katecholaminausschüttung bewirkt Vasokonstriktion. Klinische Zeichen wie verlängerte Rekapillarierungszeit und Thermolabilität sind dadurch erklärbar. Es entstehen Temperaturdifferenzen von zentral nach peripher, Akrozyanose und Hautmarmorierung⁵².

Die Veränderungen mikrozirkulatorischen Blutflusses mögen eine Schlüsselfunktion der Pathophysiologie der Sepsis einnehmen, wenn auch sie bisher nicht ausreichend verstanden sind. Beeinträchtigungen führen zu Ödemen, Hypoxie, Zellbeschädigung und Gewebsinflammation und scheinen ein ursächlicher Faktor für Multiorganversagen und Exitus zu sein. Deshalb könnte die Beurteilung des regionalen Blutflusses ein Prognostikum für das Outcome der Patienten sein, was sich in einigen Studien bereits bestätigte^{17, 28, 43, 58, 61, 88, 99-103, 107, 111}. Eine Assoziation zwischen früher Behandlung mikrozirkulatorischer Beeinträchtigung und verbessertem Outcome konnten Rivers et al herstellen. Sakr et al beschrieb die Korrektur gestörter Gewebsdurchblutung innerhalb von 24 Stunden sogar als nahezu unabhängigen Prädiktor⁵⁰.

Da die Mikrozirkulation Ort des Nährstoff- und Sauerstoffaustausches ist, sollten therapeutische Interventionen auf verbesserte Perfusion abzielen und somit die mikrozirkulatorische Perfusion verbessern^{28, 58}.

Das Monitoring der Kreislaufstabilität beschränkt sich routinemäßig auf die Bewertung von makrozirkulatorischen Parametern wie Blutdruck, Urinausscheidung, Herzfrequenz und Serum-Laktat Konzentration. Diese Messungen führen jedoch nur zu einer indirekten Einschätzung der Qualität systemischen Blutflusses. Weder die hämodynamische Stabilität noch Störeinflüsse können zuverlässig beurteilt werden⁹⁹.

Mikrozirkulatorische Diagnostik hat großes Potential für die frühe Erkennung pathologischer Prozesse wie Infektionen. Deshalb sollte das Augenmerk zunehmend auf Untersuchung und Therapie in diesem Bereich gelenkt werden.

1.2.5 Techniken zur Observation

Durch neue Technologien wird die direkte Beobachtung der Hautdurchblutung in vivo ermöglicht. Art und Ausmaß der mikrozirkulatorischen Veränderungen können so beispielsweise bei septischen Patienten eruiert werden. Neben Einschätzung der Erkrankungsschwere liegen die Erwartungen an neuen Untersuchungsmethoden in der Prognosestellung¹⁰⁷. Die Darstellung des mikrozirkulatorischen Blutflusses und die Beurteilung seiner Qualität kann als Indikator für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen dienen⁹⁹. Das mikrozirkulatorische Monitoring sollte leicht zu applizieren und nebenwirkungsfrei sein, sowie reproduzierbare Ergebnisse liefern⁹⁹.

Im Folgenden wird eine Auswahl an bisher entwickelten Techniken mit ihren Besonderheiten sowie Vor- und Nachteilen vorgestellt.

► Laser Doppler Fluxmetrie (LDF) und Laser Doppler Imaging (LDI)

Bei der Laser Doppler Fluxmetrie wird das Gewebe punktuell von einem monochromatischen Laser illuminiert. Durch die Interaktion der Strahlen mit sich bewegenden Erythrozyten wird Licht reflektiert und kann dann wieder erfasst werden (Vgl. Schema Abb. 6, Seite 28 links). Der entstehende Doppler Effekt wird bei dieser Technik ausgenutzt und ermöglicht eine Untersuchung des durchschnittlichen Erythrozytenflusses in der untersuchten Region. Eine Messung dauert einige Minuten. Die Interpretation der Aufzeichnung wird durch Bewegungsartefakte, die bei der Messung auftreten, erschwert. Weitere limitierende Faktoren sind die nicht darstellbare große Heterogenität kleiner Durchblutungsregionen (räumliche und zeitliche Variabilitäten) sowie eine geringe Eindringtiefe²⁰. Versorgende Gefäße können nicht dargestellt werden, vielmehr überwiegend arteriovenöse Anastomosen. Nicht möglich sind mit dieser Technik die Kalkulation des kapillären Blutflusses sowie die direkte bildliche Darstellung mikrozirkulatorischer Gefäße. Untersucht wurden mit der LDF mikrozirkulatorische Veränderungen bei chronisch venöser Insuffizienz und Ulzeration sowie beispielsweise am Epicard^{36, 102}.

Beim Laser Doppler Imaging wird mittels eines Laser Scans ein Bild der Perfusion erstellt (Beispiel siehe Abb. 6 rechts). Die zu untersuchende Region ist größer als beim LDF. Die Tiefe von Brandwunden und Aktivität der rheumatoiden Arthritis konnten mit dieser neueren Methode beispielsweise untersucht werden. Für beide Techniken gibt es keine Möglichkeit der Kalibrierung und Erfassung absoluter Werte, was den klinischen Einsatz limitiert^{25, 102}.

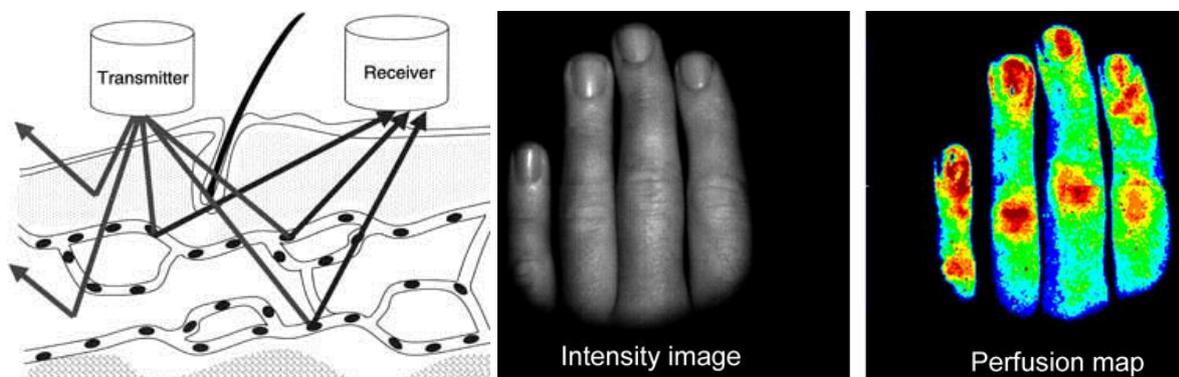


Abb. 6 Prinzip der LDF¹¹⁷(li.) mit Sender und Empfänger; Perfusions-Imaging mit LDI¹¹³ (re.)

► **Konfokalmikroskopie**



Die Konfokalmikroskopie (Reflectance-mode confocal laser scanning microscopy; RCLM) ermöglicht Echtzeitmessungen mit einer Lichtquelle mit 830 nm. Durch die sehr gute Kontrastqualität kann eine hochwertige Visualisierung der Mikrozirkulation erzielt werden¹⁰². Die Darstellung gleicht der eines klassischen Mikroskops, weshalb diese Untersuchung auch als „optische Biopsie“ bezeichnet wird³⁰. Ein Konfokalmikroskop ist auf Abb. 7 dargestellt. Aufgrund ihrer immens hohen Kosten ist der klinische Einsatz der RCLM derzeit kaum möglich¹⁰².

Abb. 7 Konfokalmikroskop³⁰

► **Nah- Infrarot Photospektroskopie / Photoplethysmografie (NIRS / NIRP)**

Diese mit Laserstrahlen arbeitende Technik ermöglicht die Messung der Sauerstoffsättigung verschiedener Gewebe. Die Wellenlänge des verwendeten Lichts reicht vom sichtbaren bis zum Nah-Infrarot-Bereich (640-840 nm)⁹⁵, welches sauerstoffabhängig vom Hämoglobin absorbiert wird. Veränderungen im Hämoglobin, reduziertem Hämoglobin, Cytochrom aa3 und totalem Hämoglobin können erfasst werden²⁹. Mit dieser Methode, welche auf Abb. 8 schematisch dargestellt ist, wird nicht nur der Fluss der versorgenden Kapillaren dargestellt. Vor allem können subpapilläre Plexus in tieferen Schichten untersucht werden⁹⁵. Der bisherige Einsatz erstreckt sich von der fetalen Forschung über die Neonatologie³⁶ bis zur Anästhesie des Erwachsenen und zielt vor allem auf die Erfassung cerebraler Oxygenierung ab. Beispielsweise kann eine mikrovaskuläre Hypoperfusion mit der NIRS detektiert werden²⁵. Nachteilig ist jedoch, dass es noch keine Möglichkeiten der Kalibrierung gibt und nur relative Werte gemessen werden können. Zudem ist der so genannte Störabstand (signal-to-noise-ratio) schlecht²⁵.

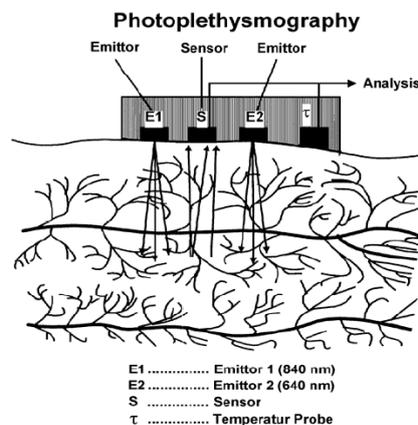


Abb. 8 Prinzip der NIRS-Technik²³

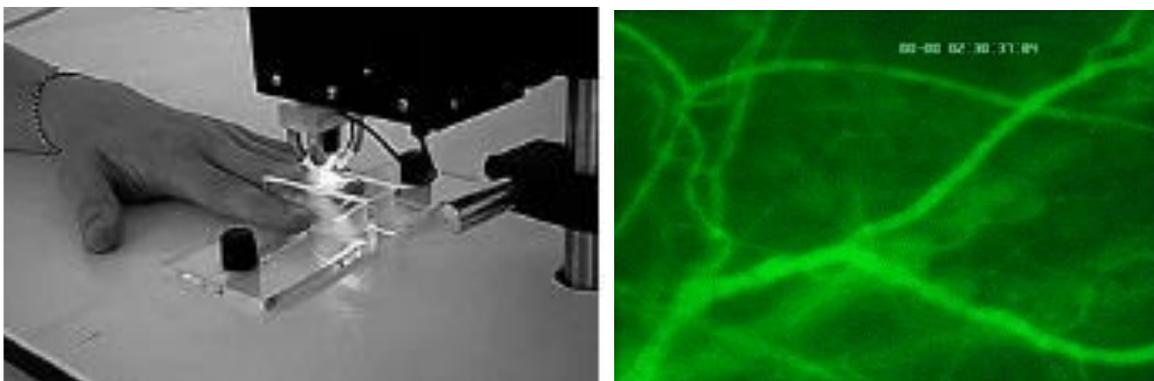
Darstellung des Blutflusses mittels zweier verschiedener Wellenlängen und einem dazwischen liegenden Sensor.

► Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie (IM) (auch: intravitale Fluoreszenzmikroskopie, IFM) lieferte in den letzten Jahren viel versprechende Daten zum Verständnis pathophysiologischer mikrozirkulatorischer Vorgänge. Diese Technik erlaubt eine quantitative Einschätzung mikrozirkulatorischer Ereignisse und visualisiert die Interaktion von Blutkomponenten wie Leukozyten und Thrombozyten sowie den Übergang von Makromolekülen in das Gewebe. So können Permeabilitätsstörungen und Gewebsdefekte dargestellt werden. Die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Gefäße werden mit einer bestimmten Wellenlänge angestrahlt und die entstehende Reflexion mit einem Auflicht-Mikroskop erfasst. Aufgrund des unverzichtbaren Einsatzes von Fluoreszenzfarbstoffen ist diese Technik jedoch nur für Tiermodelle geeignet und wird meist am narkotisierten Tier durchgeführt^{25, 102}.

Für den Einsatz am Menschen wurde die IM zur Nagelfalz- Videokapillaroskopie (nailfold videocapillaroscopy; NVC) weiterentwickelt. Derzeit bleibt die Intravitalmikroskopie beim Menschen auf diese sehr begrenzte Region limitiert. Zudem ist die Handhabung des Geräts mühsam und nicht für den bedside-Einsatz geeignet^{25, 43, 102}.

Abb. 9 zeigt die Anwendung der Nagelfalzkapillaroskopie und eine mikrozirkulatorische Darstellung mit Fluoreszenzfarbstoff.



**Abb. 9 Nagelfalzvideokapillaroskopie²⁵(links)
und Gefäßdarstellung mittels Fluoreszenzmikroskopie¹¹⁵ (rechts)**

► Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (OPS)

Die orthogonal polarisierte Spektralbildgebung wurde von Groner, Winkelmann und Mitarbeitern 1999 vorgestellt³⁹ und stellt eine Methode zur Darstellung des kapillären Netzes in vivo ohne Verwendung von Kontrastmitteln dar²⁵. Das mobile Mikroskop kann für die leicht durchführbare Untersuchung einer Vielzahl von Geweben verwendet werden^{25, 29, 99, 102}. Bisher wurden Messungen vor allem in der Wangentasche oder sublingual durchgeführt. Bei dieser optischen Technik wird das Gewebe mit grünem polarisiertem Licht der Wellenlänge 548 nm¹⁰² angestrahlt^{6, 28}.

Zur Erzeugung einer virtuellen Lichtquelle wird das monochromatische Kaltlicht durch einen Polarisator und anschließend auf einen Kippspiegel geleitet. Das nun um 90 °C orthogonal gedrehte Licht trifft im Gewebe auf und strahlt die Gefäße wie bei einer Transillumination von hinten her an. Dieses als Epiillumination bezeichnete Phänomen ermöglicht eine kontrastreiche Gefäßdarstellung⁸⁹. Das Licht wird nun vom oxygenierten und desoxygenierten Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert. Umliegendes Gewebe führt zu einer Depolarisation durch Lichtstreuung. Die depolarisierten Strahlen werden auf eine Kamera geleitet, die Charge- Coupled- Device- Kamera (CCD). Durch das vom Hämoglobin absorbierte Licht wird ein positives, dynamisches Bild der erythrozytenhaltigen perfundierten Gefäße vor negativem Kontrast erzeugt. Eine reflexionsarme Bilddarstellung wird dadurch möglich, dass der Analysator nur depolarisiertes Licht aufnimmt, nicht jedoch die direkt von der Hautoberfläche reflektierten, polarisierten Strahlen. Letztere werden herausgefiltert um die Bilddarstellung nicht zu beeinträchtigen^{20, 39}. (Zur Darstellung des Funktionsprinzips siehe Abb. 10, Seite 32).

OPS erfasst vor allem den oberflächlichen Plexus der versorgenden Kapillaren⁹⁵. Unter tierexperimentellen Bedingungen konnten Eindringtiefen von 0,2 bis 1 mm erreicht werden^{36, 42}. Die Auflösung dieser Aufzeichnungen beträgt 1 Pixel pro Mikrometer. Je nach Verwendung des 5x oder 10x Objektivs erhält man Vergrößerungen von 340 bzw. 650-fach^{39, 102, 111}. Die Aufnahmen werden direkt während der Messung auf dem Monitor des angeschlossenen PCs visualisiert und stellen so ein Echtzeitvideo dar. Die orthogonale Spektralbildgebung eignet sich zur Messung von Gefäßdurchmesser, Viskosität, funktioneller Kapillardichte und Flussqualität und wurde im Vergleich zur Intravital- Fluoreszenz- Mikroskopie mehrfach im Tiermodell validiert^{42, 43, 99, 111}. Sowohl die funktionelle Kapillardichte als auch die Gefäßdurchmesser konnten mit beiden Methoden auf vergleichbare Weise dargestellt werden³⁹. Auch der Vergleich von Messungen zwischen OPS-Imaging und Kapillaroskopie am Nagelfalz des Menschen zeigte gleiche Werte bei besserer Bildqualität des OPS⁶⁹. Außer der reinen Gefäßdarstellung ist die Visualisierung von Leukozyten möglich. Diese erscheinen als Lücken zwischen den Erythrozytengruppen und sind an ihren typischen langsamen Rollbewegungen zu erkennen²⁵.

Die quantitative Erfassung mikrozirkulatorischer Parameter mittels OPS wird seither in vielfältigen Bereichen zu Studienzwecken eingesetzt. Beispiele hierfür sind Untersuchungen an Gehirn, Leber, Brandwunden, Niere und Epicard²⁵. OPS wurde bereits am Früh- und Neugeborenen in verschiedenen Studien eingesetzt und lieferte überzeugende Ergebnisse mit guter qualitativer Gefäßdarstellung^{36, 61,}

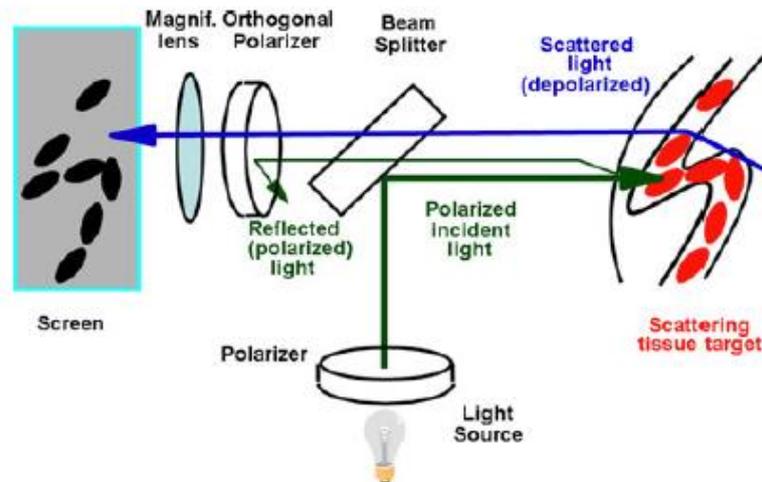


Abb. 10 schematische Darstellung des Funktionsprinzips der OPS Technik²⁹

► Sidestream Dark Field Imaging (SDF)

Die 2004 entwickelte Sidestream Dark Field Imaging Technik ist die verbesserte Form der OPS und stellt die derzeit neueste Technik mikrozirkulatorischer Forschung dar¹⁰².

Beim OPS Imaging handelt es sich um eine so genannte Mainstream Technik. Dies bedeutet, dass ein und derselbe Lichtleiter sowohl zur Aufnahme von reflektierten Strahlen dient, als auch für die Abgabe des monochromatischen Lichts. Dadurch entsteht eine Lichtstreuung, welche sich auf die Bildqualität negativ auswirkt. Vor allem bei der Darstellung von feinen Kapillaren ist dies von Nachteil⁵⁰. Um dieser Problematik entgegen zu wirken, wurde von Ince et al die Sidestream Dark Field Imaging Methode (SDF) entwickelt⁵⁰. Die Besonderheit besteht in der Anordnung der sechs Leuchtdioden, sog. Light Emitting Diodes (LED), welche konzentrisch einen Lichtleiter umgeben (siehe Abb. 12 und Abb. 11, Seite 32)^{14, 29, 99}. Dieser nimmt die reflektierten Strahlen auf, während die LEDs grünes Licht der Wellenlänge 530 nm abgeben (sog. Sidestream). Die Lichtstreuung wird so reduziert und die Bildqualität erheblich verbessert^{49, 102}.



Abb. 11 Konzentrisch angeordnete Leuchtdioden (LED's) des Mikroskops (SDF-Imaging)

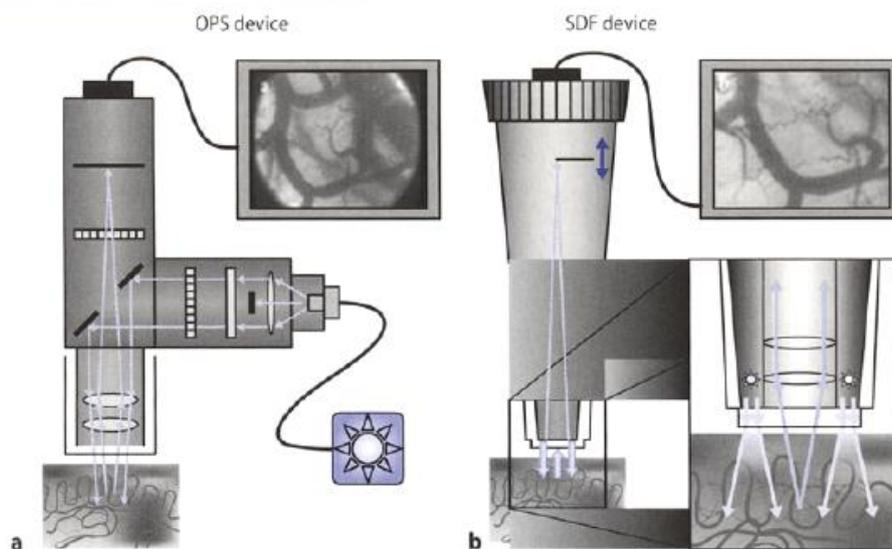


Abb. 12 Vergleich zwischen OPS- und SDF-Imaging¹⁴

Im Vergleich zu OPS liefert SDF gleiche Messergebnisse bei optimierter Kontrastierung. Wie auch beim OPS-Imaging sind Vorteile die verhältnismäßig geringen Kosten und der mobile Einsatz, der eine bedside-Untersuchung möglich macht^{6, 20, 102}. Das erhältliche 5x Objektiv bietet eine 380fache Vergrößerung der untersuchten Region¹⁰². Nachteilig ist wie beim OPS derzeit noch die fehlende Entwicklung absoluter Werte sowie messbedingte Artefakte durch Druck oder Bewegung²⁵.

Die SDF-Technik wurde in ein tragbares Videomikroskop namens MicroScan integriert¹⁰², welches für die vorliegende Studie verwendet wurde (siehe entsprechende mikrozirkulatorische Aufnahme auf Abb. 13, Seite 33 und Geräteabbildung Kapitel 2.5.1, Seite 39).

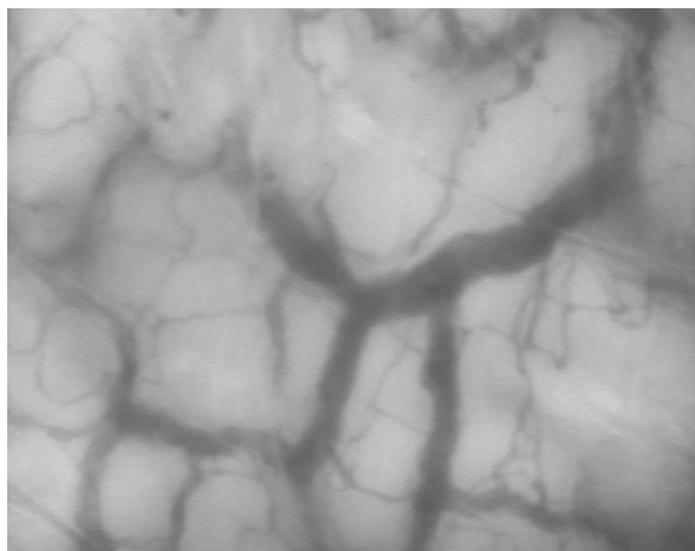


Abb. 13 Darstellung der Mikrozirkulation mittels SDF beim Neugeborenen

1.3 Screeningtests

Screening ist das Verfahren der Früherkennung, um bestimmte Krankheiten in einer großen Bevölkerungsgruppe im noch asymptomatischen Stadium zu erfassen. Ein Screeningtest wird routinemäßig, periodisch sowie systematisch durchgeführt und zeigt das Ergebnis „wahrscheinlich krank“ versus „wahrscheinlich nicht krank“. Bei diesem Verfahren geht das Angebot vom Untersucher aus, der es den Klienten der entsprechenden Bevölkerungsschicht anbietet. Gescreent werden also beschwerdefreie Personen, die zum größeren Teil nicht erkrankt sind. Der Test sollte deshalb nicht nur kosteneffektiv sondern auch für den Patienten zumutbar und wenig belastend sein. Ziel ist durch die Erkennung der Krankheit in seiner Frühform eine effektivere Behandlung mit Minimierung der Krankheitsfolgen, also eine Form der Sekundärprävention. Im Wesentlichen ist die Güte einer Früherkennungsuntersuchung durch die Senkung der Mortalität zu bewerten^{9-11, 72}.

Grundvoraussetzung für einen guten Screeningtest ist zum einen eine hohe Spezifität. Das bedeutet, dass Nichterkrankte auch einen negativen Test vorweisen. Darüber hinaus sollte die Untersuchung möglichst nebenwirkungsfrei sein. Zum anderen ist eine hohe Sensitivität wichtig. Erkrankte sollen zuverlässig als solche identifiziert werden, d. h. ein positives Testergebnis erhalten. Ein Screeningtest kann dennoch nie absolut sicher sein^{9, 10}.

Auch die Erkrankung selbst muss für ein Screeningprogramm geeignet sein. Sie sollte sowohl eine hohe Inzidenz, als auch einen hohen Krankheitswert bzw. eine relevante Mortalität aufweisen. Eine möglichst lange präklinische Phase erleichtert die Erkennung durch einen Screeningtest. Ebenso wichtig ist die wissenschaftliche Kenntnis der Erkrankung mit Ätiologie (Ursache), Pathogenese (Krankheitsentstehung) und Verlauf. Des Weiteren sollte eine empirische und effektive Therapie, vor allem für Frühformen der Erkrankung zur Verfügung stehen⁹.

Aufgrund ihrer hohen Inzidenz und den möglichen schwerwiegenden Folgen sowie den vorhandenen therapeutischen Ressourcen eignet sich das Krankheitsbild der neonatalen Infektion für die frühe Diagnostik durch Screeningtests.

1.4 Zielsetzung

Als größtes durchblutetes Organ des Neugeborenen kann man die Haut als „Schockorgan“ des Neugeborenen ansehen. Deswegen liegt das Augenmerk dieser Arbeit auf der Analyse dieser Region.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zu evaluieren, ob das Monitoring der Mikrozirkulation des Neugeborenen mittels Sidestream Dark Field Technik (SDF) zur Früherkennung neonataler Infektionen einsetzbar ist. In einer prospektiven Beobachtungsstudie wurde die Hautdurchblutung bei reifen Neugeborenen im Hinblick auf Veränderungen bei vorliegenden bakteriellen Infektionen untersucht.

Der routinemäßige Einsatz der SDF-Technik auf neonatologischen Stationen könnte in Zukunft eine effektive Diagnose früher Stadien neonataler Infektionen ermöglichen. Die Realisierbarkeit als Screeningmethode steht deshalb im Mittelpunkt der Bewertung.

Im Einzelnen sollen die im Folgenden aufgeführten Fragestellungen bearbeitet werden:

- ▶ Zeigen sich Unterschiede in der Mikrozirkulation bei Neugeborenen mit Infektion im Vergleich zu gesunden Neugeborenen?
 - ▶ Können auch Infektionen mit nur geringem Anstieg der Infektionsparameter erkannt werden?
 - ▶ Kann SDF-Imaging zum Frühscreening von Infektionen des Neugeborenen verwendet werden?
 - ▶ Wie kann man die Intravitalmikroskopie als Frühscreening – Methode realisierbar machen?
-

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die Studie wurden konsekutiv alle Geburten im Zeitraum zwischen 19.03.2011 (0 Uhr) und 12.04.2011 (12 Uhr) der 1. Universitätsfrauenklinik München erfasst. Eingeschlossen wurden alle Neugeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 37+0 und 42+0 Wochen und zudem einem Geburtsgewicht von über 2000 g. Als Ausschlusskriterien wurden schwere kongenitale oder erworbene Erkrankungen, sowie die fehlende elterliche Zustimmung festgelegt. Da bei dunkelhäutigen reifen Neugeborenen eine Darstellung der Mikrozirkulation mit der OPS/SDF-Technik in den meisten Fällen aufgrund der Überlagerung von Melanin nur unzureichend möglich ist, wurden diese ebenfalls nicht in die Studie einbezogen.

2.2 Einverständniserklärung

Die Eltern der Neugeborenen wurden ausführlich aufgeklärt und über die wissenschaftliche Fragestellung sowie den Ablauf der Messung informiert. Voraussetzung zur Durchführung der Messungen war die schriftliche elterliche Zustimmung. Den teilnehmenden Familien wurde zum Verbleib ein Informationsblatt (siehe Anhang 6.2 auf Seite 88) ausgehändigt. Je nach deren Wunsch waren die Eltern bei der Untersuchung anwesend.

Vor Studienbeginn wurde diese von der Ethikkommission der Ludwig- Maximilians- Universität München genehmigt.

2.3 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive kontrollierte Beobachtungsstudie mit dem Einschluss aller reifen, konsekutiv geborenen Neugeborenen über einen Zeitraum von knapp vier Wochen.

Mittels SDF-Imaging erfolgte die Messung einmalig zwischen erstem und drittem Lebenstag am Ohr des Kindes.

Die Behandlung der Patienten unterlag alleinig der Entscheidung der jeweiligen Ärzte, die auch keinerlei Information über deren mikrozirkulatorischen Status erhielten.

► Klinische Daten

Zum Untersuchungszeitpunkt wurden Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung jedes Patienten erhoben und das Alter notiert. Zusätzlich erfolgte die Erfassung des Tagesgewichts und Geburtsgewichts, sowie der letzten Körpertemperatur, des Gestationsalters und Geburtsmodus.

Eventuell vorhandene Infektionsrisiken wie maternales Fieber (Temperatur $>38\text{ °C}$) bzw. erhöhtes CrP der Mutter, grünes Fruchtwasser, tachykardes CTG sowie klinische Auffälligkeiten wurden aus der Patientenakte übernommen, ebenso wie die Dauer des Blasensprungs.

Als klinisch auffällig wurden Kinder eingestuft, welche einen allgemein beeinträchtigten Gesamteindruck zeigten, schrill schrien oder jammerig wirkten. Zudem wurden Unruhe und Hypotonie ebenso als klinische Zeichen einer möglichen Infektion gewertet wie unzureichendes Trinkverhalten. Eine beeinträchtigte Gewebsdurchblutung im Sinne von Blässe, Hautmarmorierung, Akrozyanose, blasses bzw. zyanotisches Munddreieck, kühle Extremitäten oder kapilläre Füllungszeit (KFZ) >3 Sekunden sind außerdem eventuelle Hinweise auf infektiöse Prozesse im Organismus. Auch unphysiologische Atmung jeglicher Art, wie Tachy- oder Dyspnoe, Stöhnen, Nasenflügeln oder Einziehungen gelten als Alarmzeichen. Offensichtliche Infektionsherde, insbesondere ein geröteter Nabel gehen natürlich ebenso mit in die Einschätzung als klinisch auffällig ein, wie zu hohe oder niedrige Körperkerntemperatur ($<36,5$ oder $>37,5\text{ °C}$).

Entzündungswerte wie CrP und IL6 wurden aus den Akten übernommen, sofern sie gemessen wurden. Es wurden keine zusätzlichen Infektionsparameter bestimmt, wenn keine klinischen Auffälligkeiten bestanden.

2.4 Patientengruppen

In Korrelation zu den mikrozirkulatorischen Untersuchungsergebnissen erfolgte die Analyse der Entzündungsparameter der Patienten.

Die Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe, eine Gruppe der Neugeborenen mit CrP 0,5-2 mg/dl und eine Gruppe der Kinder mit CrP >2 mg/dl. Die beiden Infektionsgruppen sind für manche Vergleiche zusammengefasst als CrP >0,5 mg/dl (siehe Tab. 3). Da die Messung der Interleukin 6 Werte zwar einen frühdiagnostischen Wert innehaben, aber dennoch falsch positiv sein können, wurden diese nicht in die folgende Klassifikation mit einbezogen (vgl. Interleukine in Kap. 1.1.5, ab Seite 15).

Patientengruppen

- **Kontrollgruppe:** Neugeborene ohne nachgewiesene Infektion
 CrP < 0,5 mg/dl oder
 keine Erhebung des CrP (aufgrund fehlender Infektionszeichen/Risiken)
-
- Kinder mit CrP 0,5 bis 2,0 mg/dl
 - Kinder mit CrP >2,0 mg/dl
- 

CrP >0,5mg/dl
-

Tab. 3 Einteilung des Studienkollektivs in Gruppen nach CrP Werten

Der Gesamtzustand der Neugeborenen wird täglich mindestens einmal pro Schicht vom Pflegepersonal eingeschätzt. Bei Kindern mit erhöhtem Risiko für Infektionen werden alle vier Stunden die entsprechenden Parameter von der Pflegeperson notiert. Bei klinischen Infektionszeichen (siehe Kapitel 1.1.5, Seite 15) wird der Stationsarzt hinzugezogen bzw. erfolgt eine Blutentnahme zur CrP- und ggf. IL6- Kontrolle.

Ist der Allgemeinzustand völlig unauffällig, werden keine Entzündungswerte bestimmt.

Bei Kindern mit erhöhten Entzündungswerten, d.h. CrP >0,5 mg/dl oder Il-6 >50 pg/ml erfolgt je nach Wert und Klinik eine antibiotische Therapie sowie Kontrollen der Werte nach 24 und 48 Stunden, bzw. bis zum Abfall der Entzündungsparameter. Bei Neugeborenen mit Infektion werden zudem Hautabstriche vorgenommen und eine Blutkultur angelegt. Bei Meningitisverdacht erfolgt eine Lumbalpunktion zur Liquoranalyse.

Die empirische initiale Behandlung mit Antibiotika erfolgt mit Ampicillin 150 mg/kg KG/Tag i. v. plus Cefotaxim 100 mg/kg KG /Tag i. v. in 2-3 Einzeldosen⁸⁶. Damit sind die häufigsten zu erwartenden Bakterien behandelt (vgl. Erregerspektrum in Kap. 1.1.2 ab Seite 10). Der Einsatz weiterer Antibiotika oder eine Dosiserhöhung kann je nach Erregerspektrum und klinischem Erscheinungsbild der Patienten notwendig sein. Die Dauer der Behandlung richtet sich nach Infektionsschwere und Erregernachweis und erstreckt sich zwischen 48 Stunden bei nicht bestätigtem Verdacht bis >10 Tage bei Meningitis⁸⁶. Während der antibiotischen Behandlung erhalten die Patienten zur Candidaprophylaxe zweimal täglich Nystatin 100000 I.E. per os. Dieses Vorgehen ist der derzeitige Standard der neonatologischen Station.

2.5 Untersuchung der Mikrozirkulation

2.5.1 Funktionsweise des MicroScan Mikroskops

Für die vorliegende Studie wurden nicht-invasive Messungen mit dem transportablen Gerät „MicroScan“ des Herstellers Microvision Medical (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt (siehe Abb. 14). Hierbei handelt es sich um ein Mikroskop, das Videoaufnahmen der Mikrozirkulation in vivo ermöglicht. Mittels integrierter Sidestream Dark Field (SDF) Imaging Technik können Echtzeitvideos in 380-facher Vergrößerung aufgezeichnet werden²⁹. SDF ist die weiterentwickelte und verbesserte Form der Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (OPS) (vgl. Kapitel 1.2.5, Seite 27).



Abb. 14 Tragbares MicroScan Videomikroskop mit sterilen Schutzkappen

2.5.2 Versuchsaufbau

Das MicroScan Videosystem besteht aus dem MicroScan Videomikroskop als eigentliche Messeinheit, einem Verbindungskabel, sowie einer Batterie-Einheit und sterilen Einweg-Schutzkappen.

Das Videomikroskop wird durch das Verbindungskabel mit der Batterie Einheit verbunden. Dieser Akku wiederum ist über einen Bildwandler (Analog-Digital-Wandler oder A/D-Wandler) mit einem Notebook konnektiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 15). Der A/D-Wandler digitalisiert das analoge Videosignal während der Messung, um es auf dem Computer speichern und weiterverarbeiten zu können. Die MicroScan Schutzkappen werden auf die Optik aufgesetzt und dienen neben deren Schutz auch der hygienischen Anwendung am Patienten. Der Akku ermöglicht einen durchgehenden Einsatz des Gerätes von mindestens 12 Stunden¹¹⁶. Der Anschluss am Stromnetz ist für die Versorgung des Bildwandlers dennoch stets notwendig, was im Klinikumfeld jedoch keine Einschränkung bedeutet.

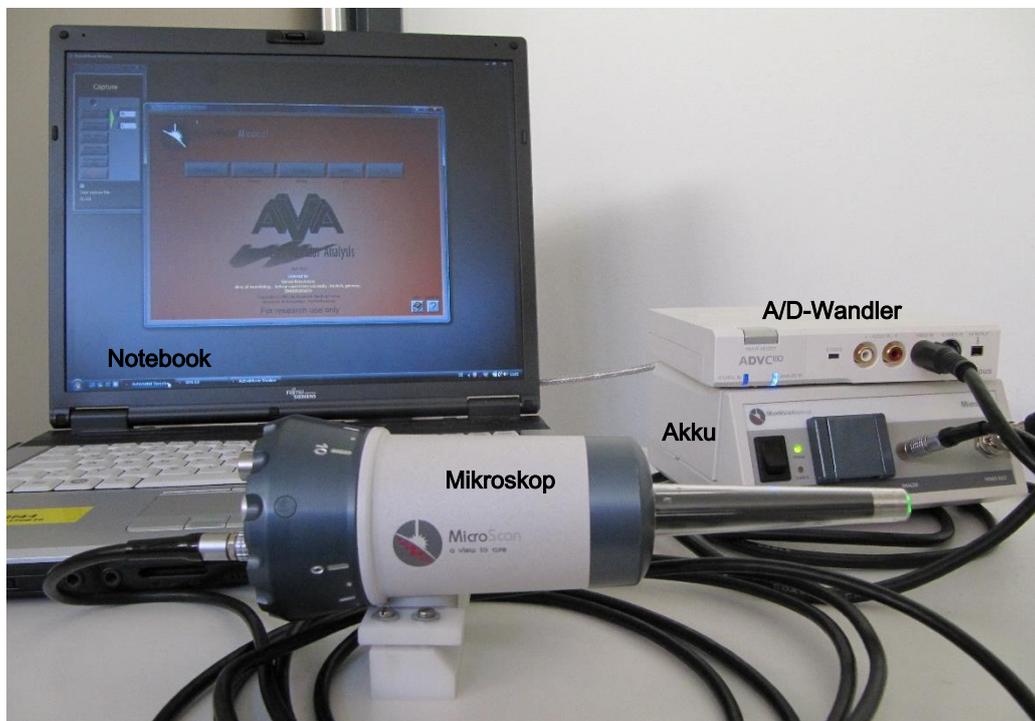


Abb. 15 Versuchsaufbau mit MicroScan Videomikroskop, Ladegerät, Bildwandler und PC

2.5.3 Durchführung der Messungen

Nach der Erteilung der elterlichen Einwilligung erfolgte die Messung einmalig zwischen 1. und 3. Lebenstag. Alle Aufzeichnungen wurden tagsüber zwischen 9 und 17 Uhr vom selben Untersucher durchgeführt.

Die Darstellung der Mikrozirkulation erfolgte mit „MicroScan“ mittels SDF-Technik nicht invasiv an der oberen rechten Ohrmuschel. Da keratinhaltige Haut den Kontrast der Erythrozyten vermindert, lässt sich OPS und SDF vorzugsweise an dünnen Häuten, wie Organoberflächen oder Schleimhäuten anwenden^{89, 102}. Beim Erwachsenen wurden Messungen sublingual bzw. in der Wangentasche bevorzugt. In der Neonatologie bietet sich die Darstellung durch die noch dünne, unverhornte Haut am Oberarm oder Ohr an^{36, 46, 111}.

Die Ohrmuschel ist beim reifen Neugeborenen besonders leicht zugänglich, wenig behaart und bei ruhigem Kind sind Bewegungsartefakte gering. Zudem ist das Kapillarnetz dort für die Messung optimal ausgeprägt². Seitendifferenzen bei der Messung an der Ohrmuschel sind zwar unwahrscheinlich, dennoch nicht untersucht, weshalb nur die rechte Seite zur Untersuchung ausgewählt wurde. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde ein Tropfen NaCl 0,9 % als Kontaktflüssigkeit verwendet.

Wenn möglich lagen die Neugeborenen schlafend im Bett, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Vor allem bei den ersten Messungen wurden einige der Untersuchungen auf dem Arm der Mutter durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass im Vergleich zur Messung im Bett eine schlechtere Bildqualität resultiert.

Auch druckinduzierte Störungen der Bildqualität können bei diesem Vorgehen vermindert werden. Durch die direkte Darstellung der Bilder auf dem Notebook hat der Untersucher die Kontrolle über die Messung und kann bestmögliche Sequenzen aufzeichnen.

Eine in den letzten Jahren entwickelte Halterung wurde für diese Studie nicht eingesetzt, da die Anwendbarkeit ohne dieser einfacher und flexibler erschien. So war beispielsweise auch die Messung im Patientenzimmer möglich. Zudem sind mit etwas Messerfahrung Artefakte bei händischer Anwendung leichter auszugleichen. Beispiele für die Anwendung sind auf Abb. 16 und Abb. 17 (S. 42) dargestellt.



Abb. 16 Positionierung der Lichtquelle an der oberen Ohrmuschel



Abb. 17 Versuchsaufbau und Messsituation bei einem Neugeborenen

Wie von De Backer et al empfohlen wurden mindestens drei Sequenzen pro Kind aufgezeichnet²⁸. Eine Sequenz dauert 10 Sekunden. Die gesamte Untersuchung nahm bei ruhigem Kind unter 5 Minuten in Anspruch.

Alle Messungen wurden mittels Bildwandler (Canopus Advanced A/D Converter Modell ADVC-110) direkt digitalisiert, auf dem Notebook (Fujitsu Siemens Lifebook E8310 2,60 GHz 3,32 GB RAM) visualisiert und im AVI-Format (Audio Video Intervealed) gespeichert. Die direkte elektronische Sicherung wurde automatisch über das Programm AVA (Automated Vascular Analysis, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Zusätzlich zum mikrozirkulatorischen Monitoring erfolgte die Messung von Puls und Sauerstoffsättigung am rechten Handgelenk (Philips Monitor M3 M3046A).

2.6 Auswertung

2.6.1 Datenverarbeitungssysteme

► Hardware

Zur Auswertung der Daten wurde ein Lenovo Notebook Thinkpad R500 mit 2,10 GHz und 2,96 GB RAM verwendet.

► Software

Die zur Auswertung der Videosequenzen verwendete Software namens „Automated Vascular Analysis“ (AVA) in der Version 3.0 stammt vom Academic Medical Center University of Amsterdam, Niederlande. AVA 3.0 ist für den Einsatz mit dem MicroScan Mikroskop des Herstellers MicroVision Medical entwickelt worden. Das Programm bietet eine halbautomatische Analyse von mikrozirkulatorischen Aufnahmen im AVI-Format.

Vor Auswertungsbeginn muss eine Kalibrierung vorgenommen werden, durch die eingestellt wird, wie viele Pixel auf dem Monitorbild einem Mikrometer entsprechen. Hardware und Software werden somit aufeinander abgestimmt³¹. Als Abstände ergaben sich nach durchgeführter Kalibrierung horizontal 1,46 μm / Pixel und vertikal 1,33 μm / Pixel.

Für die Erkennung von Gefäßen wurden vom Untersucher folgende Charakteristika definiert (Tab. 4):

Definition der Gefäßdurchmesser (Vessel Diameter)		
Klein: Small Vessels	0-10 μm	gelb
Mittel: Medium Vessels	10-20 μm	blau
Groß: Large Vessels	20-50 μm	rot
Sehr groß: Very large Vessels	>50 μm	pink

Tab. 4 Definierte Gefäßdurchmesser für die Auswertung mit AVA

2.6.2 Vorgehensweise

Ausgewertet wurden von jedem Patienten die qualitativ besten 3 Filmsequenzen à 10 Sekunden. Alle Aufnahmen wurden vom selben Untersucher analysiert.

Es erfolgte eine Sofortauswertung der ausgewählten Sequenzen direkt im Anschluss an die Messung. Die Videosequenzen wurden dafür mit dem Windows Media Player abgespielt. Mittels 4- Quadranten-Methode angelehnt an Boerma et al¹⁶ wurde der mikrozirkulatorische Fluss beurteilt, als auch ein subjektiver Score erfasst. Der mikrozirkulatorische Fluss wurde als normal, bzw. kontinuierlich fließend (=0) oder pathologisch (=1) bewertet (Tab. 5). Pathologische Flussqualitäten n. Boerma et al¹⁶ sind stehender, intermittierender, zäher oder hyperdynamer Blutfluss (vgl. Abb. 18 und Kap. 2.6.3). Der Bildausschnitt wurde in vier äquidistante Quadranten eingeteilt und jeder Quadrant für sich beurteilt^{16, 28}. Anschließend wurde ein Gesamtdurchschnittswert für alle drei Sequenzen gebildet.

Der subjektive Score wurde eingeteilt in unauffällig (=0), kontrollbedürftig (=1) und auffällig (=2) (Tab. 5). Diese Einteilung soll die Einschätzung „auf den ersten Blick“ darstellen. Hier erfolgte keine Aufteilung in Quadranten, stattdessen vielmehr die Befundung des Gesamtbildes.

Mikrozirkulatorischer Fluss (je Quadrant)	Subjektiver Score (Gesamtbild)
0= normal (kontinuierlich)	0= unauffällig
1= pathologisch (stehend, intermittierend, zäh, beschleunigt)	1= kontrollbedürftig
	2= auffällig

Tab. 5 Sofortauswertung der mikrozirkulatorischen Messung

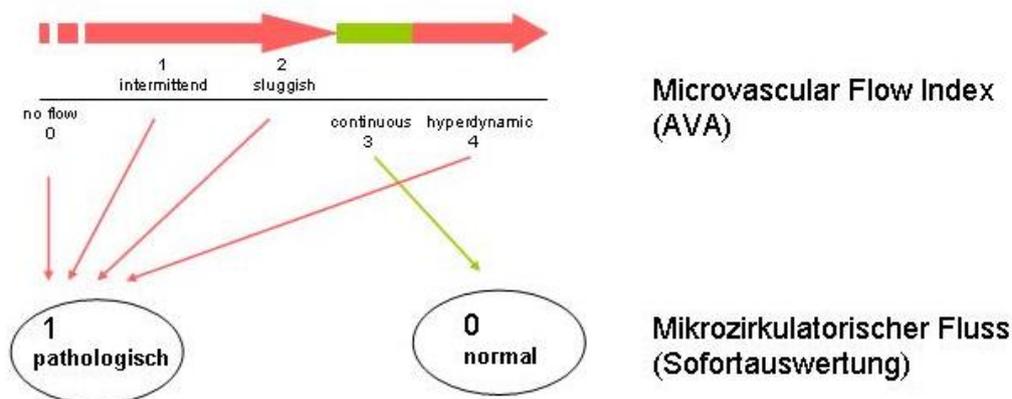


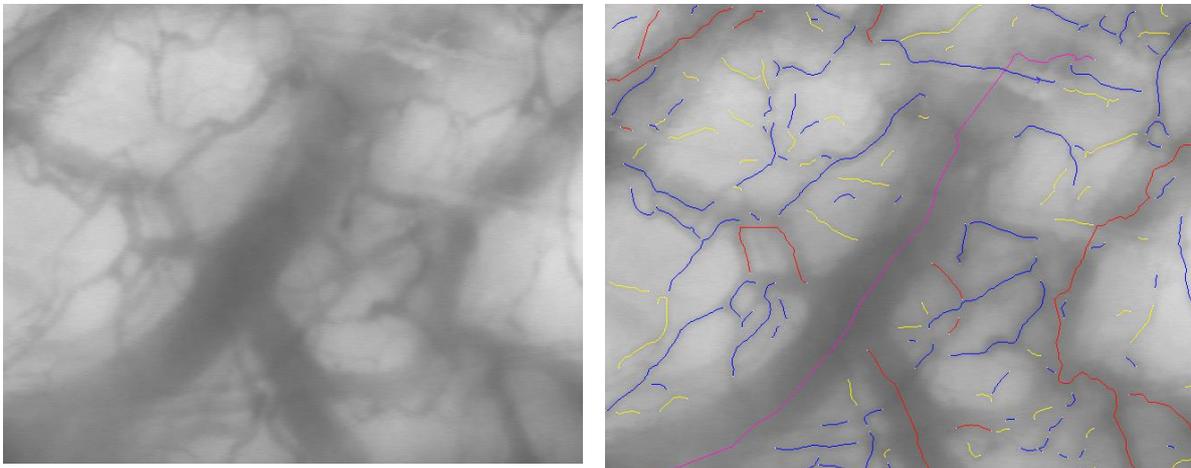
Abb. 18 Flussqualitäten des MFI und der Sofortauswertung im Zusammenhang

Beim mittels AVA ermittelten Microvascular Flow Index werden die fünf verschiedenen Flussqualitäten no flow, intermittend, sluggish, continuous und hyperdynamic unterschieden. In der Sofortauswertung erfolgte zudem eine Entscheidung lediglich nach pathologisch und normal, wobei die einzig als normal zu bewertende Flussqualität die kontinuierliche darstellt. Die anderen vier gelten als pathologisch (no flow, intermittend, sluggish, hyperdynamic).

Nach Ende der Studie wurden dieselben Sequenzen, welche für die Sofortauswertung verwendet wurden, verblindet. Erst nach randomisierter Verschlüsselung erfolgte die Analyse. Dem Auswertenden der Messergebnisse waren somit Klinik und Laborparameter der Probanden nicht bekannt. Für diese Analyse wurde nun die zuvor beschriebene Software AVA 3.0 (Kap. 2.6.1) verwendet. Der subjektive Score wurde kein zweites Mal erhoben. Die Flussbeurteilung erfolgte nun differenziert als Microvascular Flow Index (vgl. vorstehende Abbildung Abb. 18 und Kap. 2.6.3, Seite 47). Um die intraindividuelle Variabilität zu vermindern, wurden alle Sequenzen am Stück (innerhalb von drei Wochen) ausgewertet.

Zu Beginn führt der Anwender von AVA eine Stabilisierung der zu bearbeitenden Videosequenz durch. So werden Bewegungsartefakte gemittelt und die Auswertung erleichtert. AVA analysiert einen im Anschluss ausgewählten Bildausschnitt. Hierzu werden die Gefäße größenorientiert erkannt und markiert. Die Durchmesser und Linienfarben wurde zuvor vom Anwender festgelegt (vgl. Tab. 4 auf Seite 43 und Abb. 19 auf Seite 45). Anschließend korrigiert der Untersucher die vom Programm markierten Gefäße. So werden beispielsweise Haare vom System als Gefäß detektiert, was vom Anwender gelöscht werden kann (vgl. Abb. 20 auf Seite 46). Zudem gibt es die Funktion zur Suche nach einem Gefäß in einem kleineren Bereich, falls in jenem eine Kapillare nicht automatisch erkannt wurde. Diese halbautomatische Auswertung dauert pro Sequenz etwa 15 Minuten.

Zum Schluss erstellt das Programm einen Bericht (Microcirculatory Report, siehe Abb. 21, Seite 46), der per Mausklick in Microsoft Excel übertragen und abgespeichert werden kann.



**Abb. 19 Aufnahme der Mikrozirkulation
und dieselbe Sequenz während der Auswertung mit Farbkodierung nach Gefäßdurchmesser (rechts)**

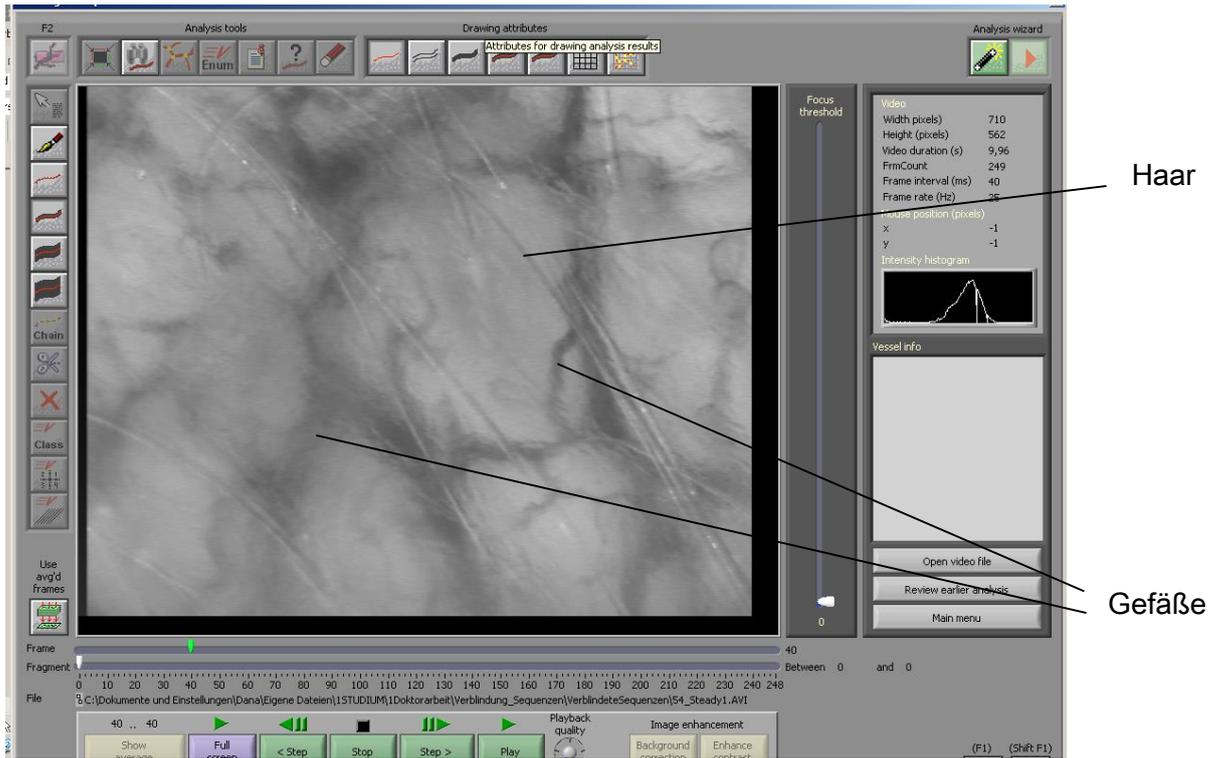


Abb. 20 Auswertung einer Sequenz mit dem Programm AVA

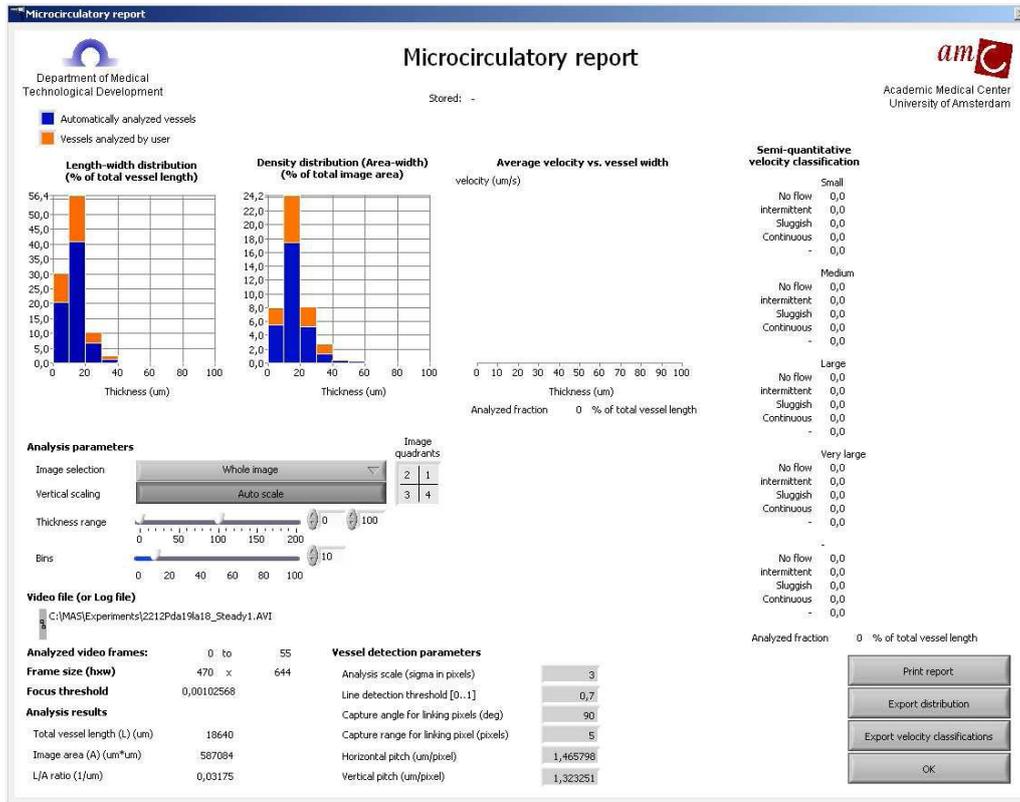


Abb. 21 Microcirculatory Report
Auswertungsbericht mit mikrozirkulatorischen Daten

2.6.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Die Analyse mit der AVA-Software beinhaltet folgende Parameter:

Mikrozirkulatorische Parameter der AVA-Analyse		
<i>Funktionelle Kapillardichte</i> ⁹⁹ (FCD, FVD)	Gesamtlänge der perfundierten Gefäße geteilt durch die Oberfläche der untersuchten Region ^{28, 74}	(cm/cm ²)
<i>Gefäßoberfläche</i> (Vessel surface)	Von Gefäßen bedeckte Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts	(mm ² /mm ²)x100%
<i>Gefäßdurchmesser</i> (Diam)	Verteilung der Gefäßdurchmesser, d. h. Anteil der jeweiligen Gefäßgröße an der Gesamtlänge aller Gefäße (siehe Tab. 4 auf Seite 43)	%
<i>Flussqualität</i> (Quality of Flow, Microvascular Flow Index, MFI)	Semi-Quantitativer Index mit fünf Flussqualitäten: 0= no Flow (kein Fluss) 1= intermittend Flow (intermittierend) 2= sluggish Flow (zäh) 3= continuous Flow (kontinuierlich, normal) 4= hyperdynamic Flow (beschleunigt)	Durchschnittswert (Index)

Tab. 6 Analyierte mikrozirkulatorische Parameter mit zugehöriger Einheit.

FCD/FVD: Functional Capillary/Vessel Density; Diam: Diameter Distribution; MFI: Microvascular Flow Index

Nach Auswertung der drei Sequenzen pro Patient wurde jeweils der Mittelwert statistisch untersucht.

2.6.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism 5.04 (La Jolla, USA) verwendet. Folgende statistische Tests wurden zur Untersuchung der Daten angewendet:

Statistischer Test	Beschreibung
<i>Column statistics</i>	Liefert eine deskriptive statistische Auswertung von Mittelwerten, Median und Konfidenzintervall
<i>Normality test</i>	Untersucht die Daten auf Normalverteilung
<i>Mann-Whitney-U-Test</i>	nonparametrischer Test zum Vergleich zweier ungepaarter Gruppen
<i>Unpaired t-test</i>	statistischer Test zweier unverbundener Stichproben, der jeweils eine Normalverteilung voraussetzt
<i>ROC-Analyse</i>	Einschätzung der Qualität als Screeningtest. Mit Berechnung der AUC (area under the ROC curve), Sensitivität, Spezifität und Likelihood Ratio

Tab. 7 Verwendete statistische Tests

Die Berechnungen und Angaben erfolgten stets im 95 % Konfidenzintervall (CI) mit Mittelwerten (Mean). Signifikanzniveaus sind als p-Werte stets mit angegeben.

Als graphische Darstellungen im Ergebnisteil sind Box-Whisker-Plots gewählt worden, die den Median mit erster und dritter Quartile, sowie Minimum und Maximum darstellen (Ausreißer ggf. als Punkte dargestellt).

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Studiengruppe umfasste 110 der 161 konsekutiv geborenen Kinder. Gründe für Nichtmessung sind in Abb. 22 aufgeführt. Das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen (51 % männlich, 49 % weiblich). Unter den untersuchten Neugeborenen fand sich ein Zwillingssäugling. Bei den verstorbenen Kindern handelte es sich um Totgeburten mit Gestationsalter unter der 24. Schwangerschaftswoche, welche korrekterweise in der konsekutiven Erfassung der Geburten mit einfließen.

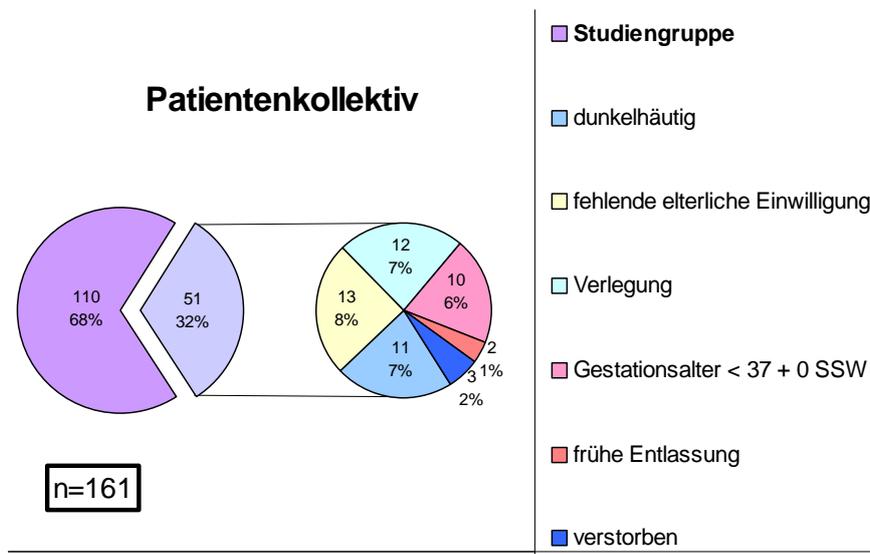


Abb. 22 Patientenkollektiv.

Von 110 rekrutierten Neugeborenen wiesen 29 (26 %) erhöhte CrP-Werte auf, 81 (74 %) gesunde Kinder bildeten die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe war bei 43 das CrP <0,5 mg/dl, bei 38 wurden keine Entzündungswerte bestimmt.

3.2 Patientenalter zum Messzeitpunkt

Die Untersuchung erfolgte zwischen 1. und 3. Lebenstag. In unserem Kollektiv ergab sich ein durchschnittliches Messalter von 28 Stunden bei frühester Messung mit 6 Stunden und spätester Erhebung im Alter von 64 Lebensstunden. Eine differenzierte Darstellung der Durchschnittsalter bei Messung der jeweiligen Gruppen zeigt untenstehende Tab. 8.

	CrP<0,5 mg/dl Kontrollgruppe n=81	CrP 0,5-2,0 mg/dl n=19	CrP>2,0 mg/dl n=10
Durchschnittsalter bei Messung in h [95% CI]	27 [24-30]	25 [19-30]	39 [28-50]

Tab. 8 Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Messung im Gruppenvergleich

3.3 Klinische Daten

Tab. 9 zeigt einen Überblick über die klinischen Daten der untersuchten Neugeborenen. Das Geschlechterverhältnis war im Gruppenvergleich weitgehend ausgeglichen.

Das Gestationsalter der Kinder mit erhöhtem CrP-Wert war im Durchschnitt signifikant höher als das der Kontrollgruppe. Ebenso einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte der 1-Min-Apgar Score.

Die Dauer des Blasensprungs lag bei Kindern mit CrP 0,5-2 mg/dl über der der Kontrollgruppe, was sich jedoch nicht signifikant auswirkte. Die am Messtag erhobenen Vitalparameter wie Temperatur, Sauerstoffsättigung und Puls lagen bei den Gruppen im gleichen Niveau.

Klinische Daten		Kontrollgruppe (n=81)	CrP 0,5-2,0 mg/dl (n=19)	CrP>2,0 mg/dl (n=10)
Geschlecht	Männlich	41	11	4
	Weiblich	40	8	6
Geburtsgewicht (g)		3373 [3275-3471]	3486 [3312-3660]	3574 [3221-3972]
Gestationsalter (SSW)		40 [39,5-40,1]	41 [40-41]*	40 [40-41]
Apgar Score	1 Min	9 [8,7-9,2]	8,4 [7,8-8,9]**	8,6 [7,9-9,3]
	5 Min	9,8 [9,7-9,9]	9,8 [9,4-10]	9,8 [9,5-10]
	10 Min	10 [9,9-10]	10	9,9 [9,7-10]
Nabelschnur pH-Wert		7,31 [7,29-7,33]	7,29 [7,23-7,34]	7,26 [7,2-7,33]
Nabelschnur BE		-3,9 [-4,6- -3,3]	-5,6 [-7,6- -3,7]	-3,7 [-5,3- -2]
Temperatur am Messtag (axillär, °C)		37 [36,9-37,1]	37 [36,9-37,2]	37 [36,8-37,3]
Dauer Blasensprung (h)		7,3 [5,6-9]	9,2 [5,9-13]	6,7 [0,4-13]
Sauerstoffsättigung (SaO ₂ %)		98 [97,9-98,3]	98 [97-99]	97 [95-99]
Puls (/Min)		117 [114-119]	116 [112-121]	124 [114-135]

Tab. 9 Klinische Daten der Studiengruppe

(Mittelwerte, [95% CI]); Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit * markiert

(*= $p < 0,05$, **= $p < 0,005$)

3.3.1 Geburtsmodus

Die Verteilung der Geburtsmodi zeigt Abb. 23. In beiden Studiengruppen wurde der größte Anteil der Kinder spontan entbunden. In der Gruppe der Kinder mit erhöhten CrP-Werten lag der Anteil von Vakuumextraktionen (VE) und Sectio caesarea höher. Forceps Entbindungen wurden im Studienzeitraum nicht durchgeführt.

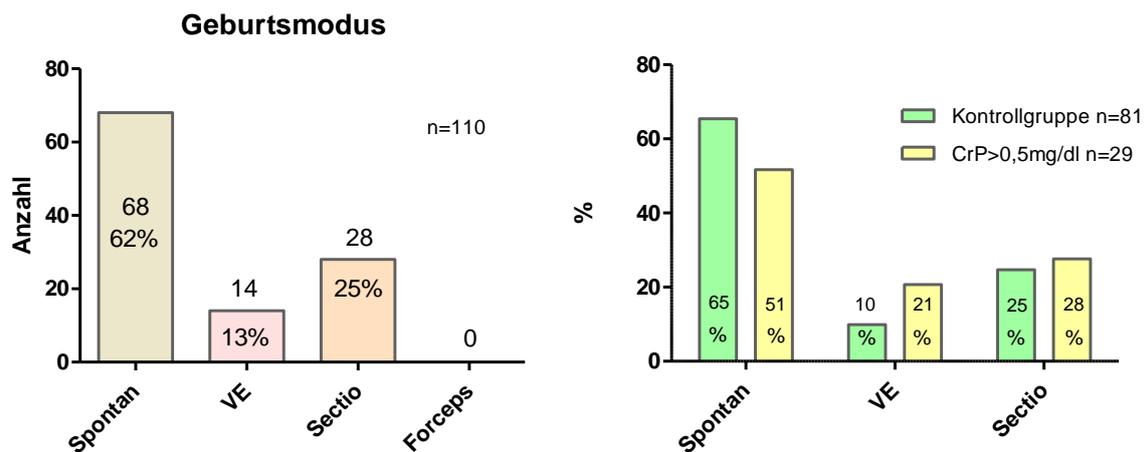


Abb. 23 Verteilung der Geburtsmodi.

Links: Anteil an gesamter Studiengruppe. Rechts: Gegenüberstellung von Kontrollgruppe zur Gruppe der Kinder mit CrP>0,5 mg/dl (Angabe in %). VE: Vakuumextraktion

3.3.2 Infektionsrisiken

Die Risikofaktoren für Neugeboreneninfektionen sind in Kapitel 1.1.5 auf Seite 15 und Kapitel 2.3, Seite 36 ausführlich beschrieben worden. Die Verteilung vorhandener Risiken in der Gruppe der rekrutierten Neugeborenen zeigt Tab. 10. Infektionsrisiken sind bei Kindern mit CrP>0,5 mg/dl häufiger zu finden als in der Kontrollgruppe (siehe hierzu Abb. 24, S. 52).

Bei 55 Kindern (50 %) wurden keinerlei Infektionszeichen dokumentiert, davon wiesen vier Neugeborene dennoch ein CrP>0,5 mg/dl auf.

Risikofaktoren	Kontrollgruppe (n=81)	CrP 0,5-2,0 mg/dl (n=19)	CrP >2,0 mg/dl (n=10)
Klinisch auffällig	12	11	9
Blasensprung > 18 h	12	3	1
Fieber / CrP-Erhöhung der Mutter	6	4	1
Grünes Fruchtwasser	7	8	3
Tachycardes CTG	6	4	2

Tab. 10 Infektionsrisiken im Gruppenvergleich

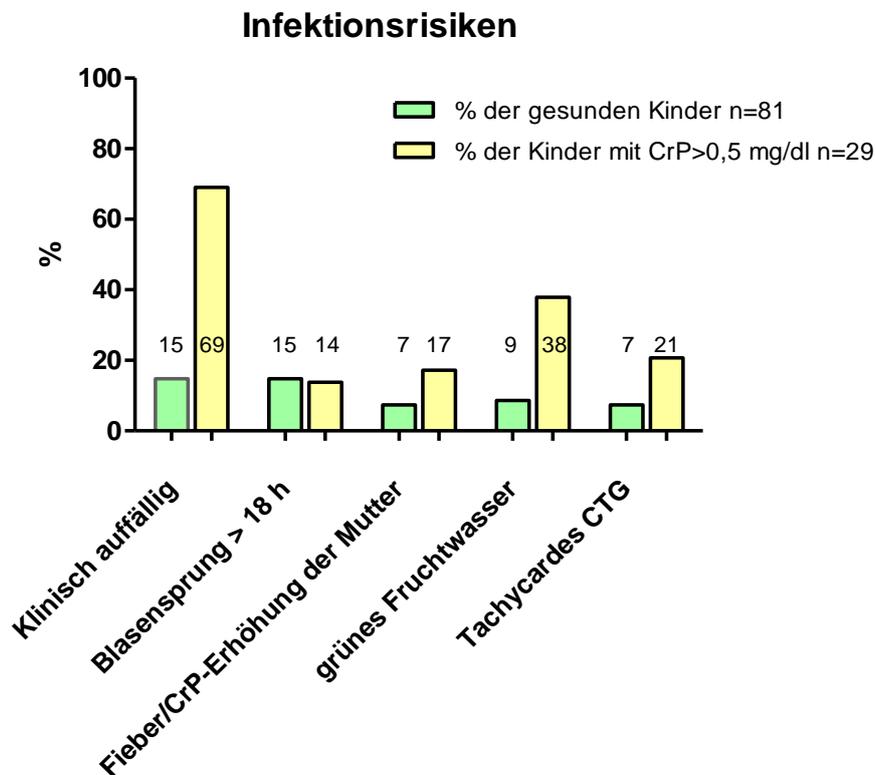


Abb. 24 Auftreten von Infektionsrisiken in der Kontrollgruppe im Vergleich zu Neugeborenen mit CrP>0,5 mg/dl; Angabe in %

3.3.3 Entzündungswerte

Die höchsten CrP- und IL6 Werte zeigten sich retrospektiv betrachtet stets noch vor der mikrozirkulatorischen Messung. Eine Erhebung der IL6 Werte nach der MicroScan- Untersuchung erfolgte nur bei einer sehr geringen Anzahl an Kindern, da dieser Parameter keinen verlaufdiagnostischen Wert hat. Nabelschnurwerte waren in den jeweiligen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Tab. 11 und Abb. 25 zeigen die erhobenen Entzündungsparameter.

Entzündungswerte		Kontrollgruppe (n=81)		CrP>0,5 mg/dl (n=29)
CrP (mg/dl)	Nabelschnur	0 [0-0,01] n=30	n.s.	0 [0-0,1] n=20
	Max Wert bei Blutentnahme vor Messung	0,1 [0,1-0,2] n=33	****	1,6 [1-2,1] n=27
IL-6 (pg/ml)	Nabelschnur	19 [10-29] n= 29	n.s.	65 [0-144] n=19
	Max Wert bei Blutentnahme vor Messung	28 [17-39] n=25	***	311 [108-514] n=21

Tab. 11 CrP und IL-6 Werte im Gruppenvergleich

(Mittelwert, [95% CI]); Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert (***=p<0,0005, ****=p<0,0001, n.s.= nicht signifikant)

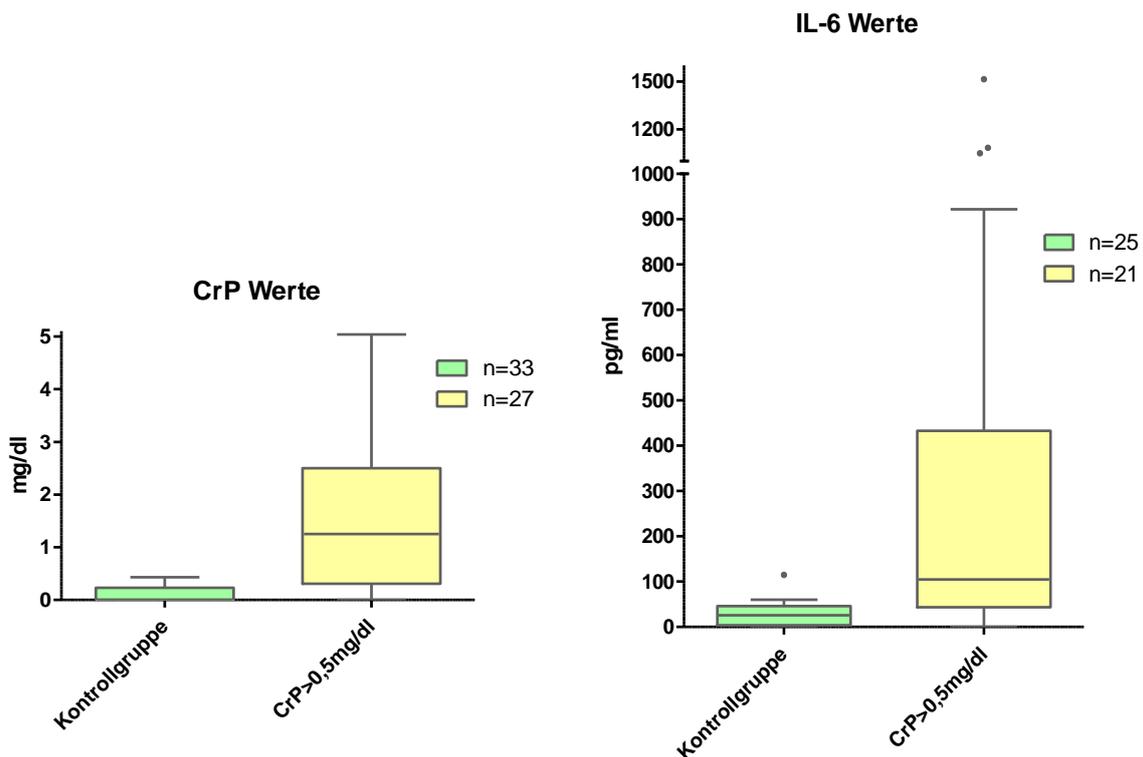


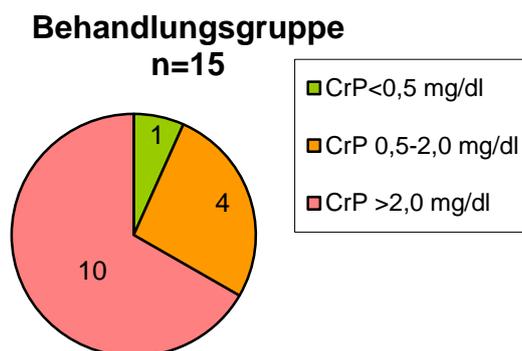
Abb. 25 Maximale CrP und IL-6 Werte vor mikrozirkulatorischer Messung

3.3.4 Mikrobiologie

Beim Großteil der Kinder mit Infektion wurde eine Blutkultur, Ohrabstriche und Magensaft abgenommen. Bei einem Kind wuchs in der Blutkultur *Staphylokokkus hominis*. Bei sieben Neugeborenen mit Infektion konnten koagulasenegative *Staphylokokken* im Ohrabstrich nachgewiesen werden. Weitere positive Ohrabstrichbefunde waren jeweils einmalig *E. coli* und *Streptokokkus agalactiae*. Bei einem Kind fand sich *Candida albicans* im Magensaft. Verunreinigungen können bei mikrobiologischen Befunden nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Keines der rekrutierten Kinder erhielt eine Lumbalpunktion.

3.3.5 Antibiotische Behandlung

In der Studienpopulation erhielten 15 von 110 Kindern eine antibiotische Therapie (14 %). Mit einer Ausnahme wurden diese Patienten standardmäßig mit Ampicillin und Cefotaxim i.v. über 4-8 Tage behandelt. Ein Neugeborenes mit Infektion erhielt zusätzlich Tobramycin i.v.. Alle Kinder der Behandlungsgruppe erhielten zusätzlich zweimal täglich 0,5 ml (entsprechend 100000 I.E) Nystatin per os zur Candidaprophylaxe.



Von den antibiotisch therapierten Neugeborenen hatte ein Kind kein erhöhtes CrP, wurde aber initial aufgrund dringenden Verdachts auf Amnioninfektionssyndrom behandelt. Alle 10 Patienten mit CrP > 2,0 mg/dl wurden therapiert, außerdem 4 der 19 mit CrP 0,5-2,0 mg/dl. Vergleichen Sie dazu Abb. 26.

Abb. 26 Verteilung der antibiotisch behandelten Patienten

3.3.6 Sonstige Medikation

Ein Kind mit CrP > 0,5 mg/dl erhielt Retrovir und Epivir. In der Kontrollgruppe wurde ein weiteres Neugeborenes mit Retrovir behandelt. Bei antibiotischer Behandlung der Mutter erhielten zwei Kinder Nystatin. Zwei Kinder bekamen am ersten Lebenstag intravenös Glucose.

3.4 Mikrozirkulatorische Ergebnisse

In der ersten Sofortauswertung direkt im Anschluss an die Messung wurden eine Beurteilung der mikrozirkulatorischen Flussgeschwindigkeit und eine Gesamteinschätzung der Aufnahme erhoben. Nach abgeschlossener Untersuchung aller Kinder erfolgte die halbautomatische Analyse mit der Software AVA. Von den 110 Kindern wurden jeweils drei Sequenzen pro Kind und somit insgesamt 330 Messungen ausgewertet.

3.4.1 Sofortauswertung

Die am Tag der jeweiligen Messung erhobenen Parameter sind in Tab. 12 aufgeführt. Sowohl für den mikrozirkulatorischen Fluss, als auch für den subjektiven Score zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl. Abb. 27 und Abb. 28 auf Seite 56 verdeutlichen der folgenden Ergebnisse im Box-Plot.

Sofortauswertung	Kontrollgruppe (n=81)		CrP>2,0 mg/dl (n=10)
Mikrozirkulatorischer Fluss 0=normal 1=pathologisch	0,1 [0,1-0,2]	****	0,6 [0,3-0,9]
Subjektiver Score 0=unauffällig 1=kontrollbedürftig 2=auffällig	0,2 [0,1-0,3]	****	1,2 [0,7-1,7]

Tab. 12 Ergebnisse der Sofortauswertung
(Mittelwert, [95% CI]) des Mikrovaskulären Flusses und subjektiven Score.
Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert (****=p<0,0001)

Mikrozirkulatorischer Fluss Sofortauswertung

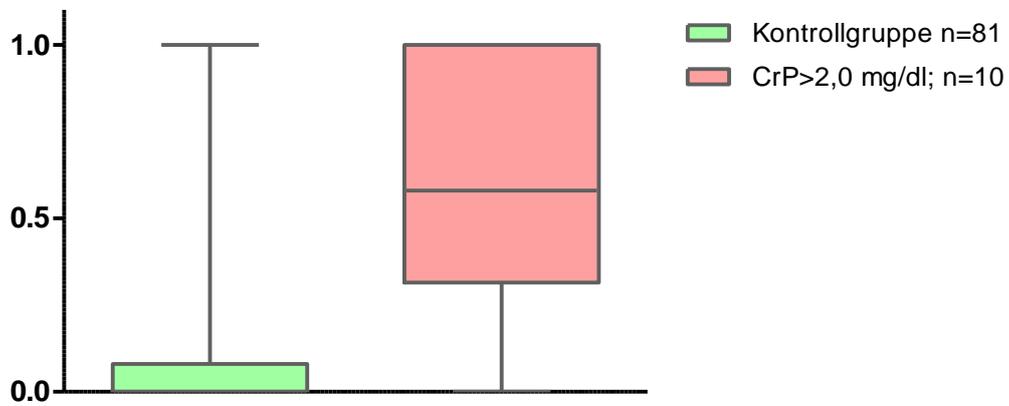


Abb. 27 Mikrozirkulatorischer Fluss der Sofortauswertung
(0=normal, 1=pathologisch); $p < 0,0001$

Subjektiver Score Sofortauswertung

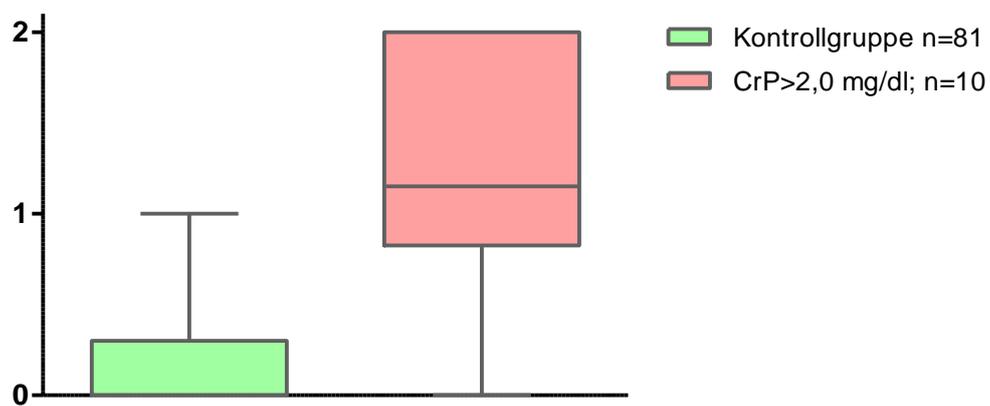


Abb. 28 Subjektiver Score der Sofortauswertung
(0=unauffällig, 1=kontrollbedürftig, 2=auffällig); $p < 0,0001$

3.4.2 Analyse mit AVA

3.4.2.1 Übersicht Mikrozirkulatorischer Parameter

Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Neugeborenen mit CrP>2,0 mg/dl konnten signifikante Unterschiede bei der Gefäßoberfläche (Vessel surface) festgemacht werden, die in der Gruppe der CrP-Erhöhung über 2,0 mg/dl kleiner ist. Beim Microvascular Flow Index zeigt sich eine hochsignifikante Differenz im Gruppenvergleich.

Eine Soforteinschätzung (subjektiver Score) wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde mit AVA nicht nochmals durchgeführt.

Bezüglich der Gefäßdurchmesser (Diameter) sind die sehr großen Gefäße bei Kindern mit CrP>2,0 mg/dl signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe.

Keine signifikanten Unterschiede sind bei der funktionellen Kapillardichte (FVD) sowie bei den Durchmessern kleiner und mittlerer Gefäße zu errechnen. Dennoch zeigt sich bei der FVD eine Tendenz zu geringeren Werten bei Infektion (Tab. 13).

		Kontrollgruppe (n=81)		CrP>2,0 mg/dl (n=10)
Functional Vessel Density (cm/cm²)		146 [143-148]	n.s.	140 [135-145]
Vessel surface (mm²/mm²)x100%		26 [26-27]	*	24 [23-26]
Vessel Diameter (%)	Small <10 µm	52 [50-53]	n.s.	54 [49-59]
	Medium 10-20 µm	30 [29-32]	n.s.	28 [25-31]
	Large 20-50 µm	17 [16-18]	n.s.	15 [12-18]
	Very Large >50 µm	1,1 [0,8-1,5]	*	2,9 [1,6-4,1]
Microvascular Flow Index 0=no flow 1=intermittend 2=sluggish 3=continuous 4=hyperdynamic		3,1 [3,0-3,1]	*	3,2 [3,0-3,3]

Tab. 13 Gruppenvergleich mikrozirkulatorischer Parameter (Mittelwert [95% CI]); Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert (*=p<0,05, **=p<0,005, *=p<0,0005, ****=p<0,0001, n.s. = nicht signifikant)**

Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Einzelnen grafisch dargestellt werden.

3.4.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Die Länge perfundierter Gefäße pro Bildfläche wird als funktionelle Kapillardichte oder –gefäßdicke (Functional Vessel Density, FVD) bezeichnet. Es konnten im Gruppenvergleich für die FVD keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Jedoch ist eine tendenziell geringere kapilläre Dichte bei Vorliegen eines CrP > 2,0 mg/dl grafisch erkennbar (Abb. 29).

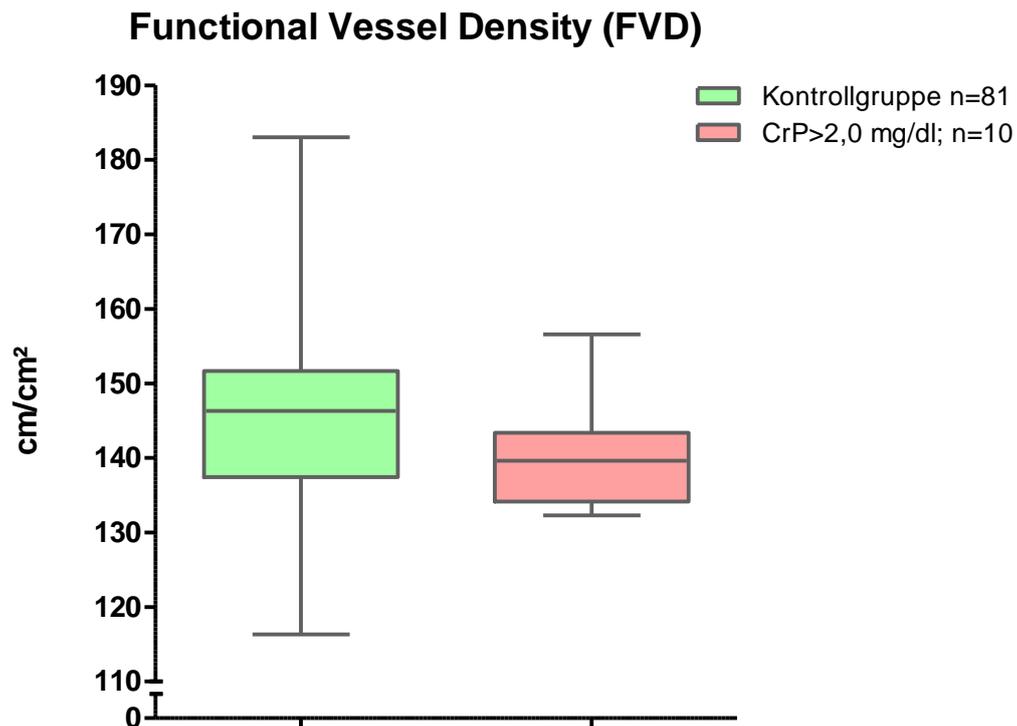


Abb. 29 Funktionelle Kapillardichte im Vergleich

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine tendenziell geringere FVD in der Gruppe der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl; p=0,218

3.4.2.3 Gefäßoberfläche

Im Unterschied zur zuvor beschriebenen Funktionellen Kapillardichte liegt bei der Gefäßoberfläche der Fokus auf allen auswertungsunabhängig erfassten Gefäßen. Anhand unterschiedlicher Grautöne erfolgte eine automatische Berechnung des Gefäßanteils am Bildausschnitt, ohne dass der Auswertende zuvor die Gefäße markiert hat. Bei dieser Gefäßoberfläche (Vessel surface) ergeben sich signifikante Unterschiede im Vergleich der Gesunden zur Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl im Sinne einer verringerten Gefäßoberfläche bei Infektion (siehe Diagramm Abb. 30). Die Ergebnisse im differenzierten Gruppenvergleich zeigt im Anhang Tab. 15 auf Seite 89.

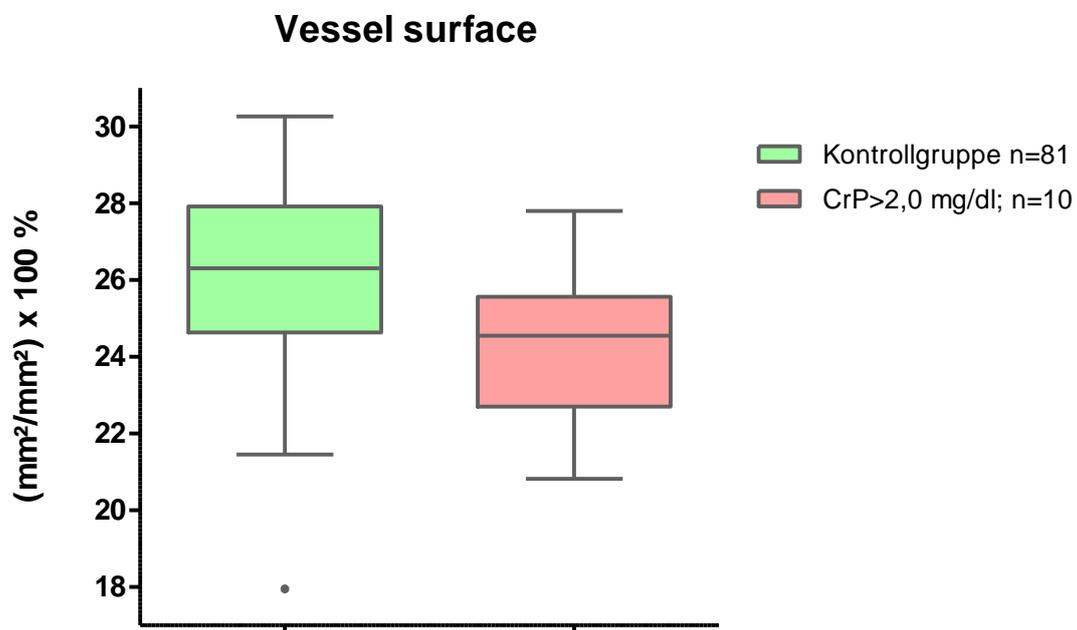


Abb. 30 Gefäßoberfläche im Vergleich

Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich mit $p < 0,05$

(Ausreißer als Punkt dargestellt)

3.4.2.4 Verteilung der Gefäßdurchmesser

Die Verteilung der Gefäßdurchmesser (Diameter Distribution) lässt einen signifikant geringeren Anteil großer Gefäße bei Kindern mit CrP >0,5 mg/dl erkennen. Dieselbe Population weist einen statistisch signifikant größeren Anteil sehr großer Gefäße auf. Eine graphische Darstellung der Diameter-Verteilung zeigt Abb. 31.

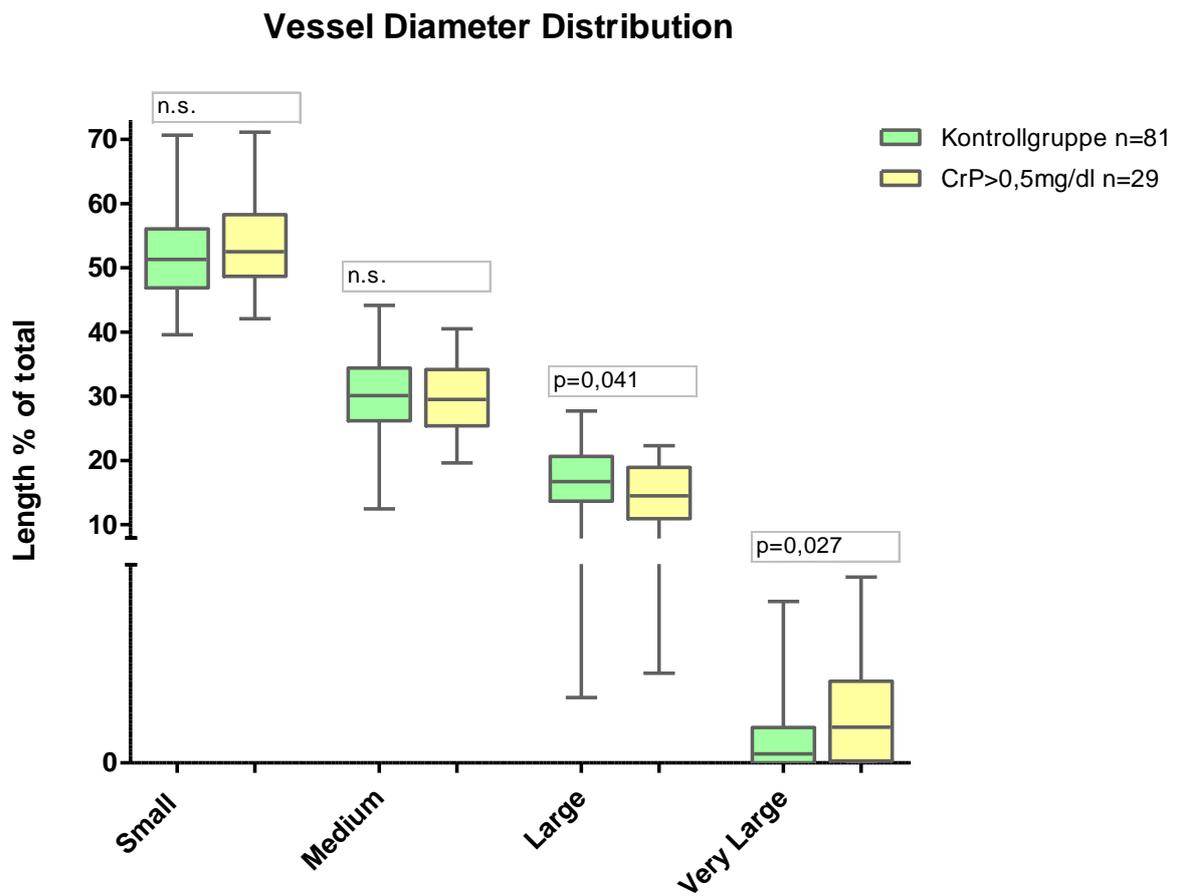


Abb. 31 Verteilung der Gefäßdurchmesser

Signifikante Unterschiede sind in Large/very Large Vessels vorhanden.

(Diam small: <10µm, Diam medium 10-20 µm, Diam large 20-50 µm, Diam very large >50 µm)

3.4.2.5 Flussqualität

Bei Befundung der Flussqualität mit dem Microvascular Flow Index (MFI) zeigten sich im Durchschnitt signifikante Unterschiede beim Vergleich der Kontrollgruppe zur Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl (Abb. 32). Bei Kindern mit Infektion wurde ein signifikant höherer MFI als bei gesunden Neugeborenen dokumentiert, somit zeigten diese einen hyperdynamen Fluss.

Da AVA die Differenzierung nach Gefäßgrößen ermöglicht, sind im Anhang die MFI Werte entsprechend unterschieden worden. Hier konnten bei allen Gefäßgrößen hochsignifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Kinder mit CrP>0,5 mg/dl gezeigt werden (vgl. im Anhang Kap 6.5, Seite 90).

Pathologische MFI Werte im Sinne eines stehenden, verlangsamten oder intermittierenden Flusses, sind nur in einem sehr kleinen Anteil der Patienten aufgefallen (vgl. im Anhang Kap.6.4 auf Seite 89).

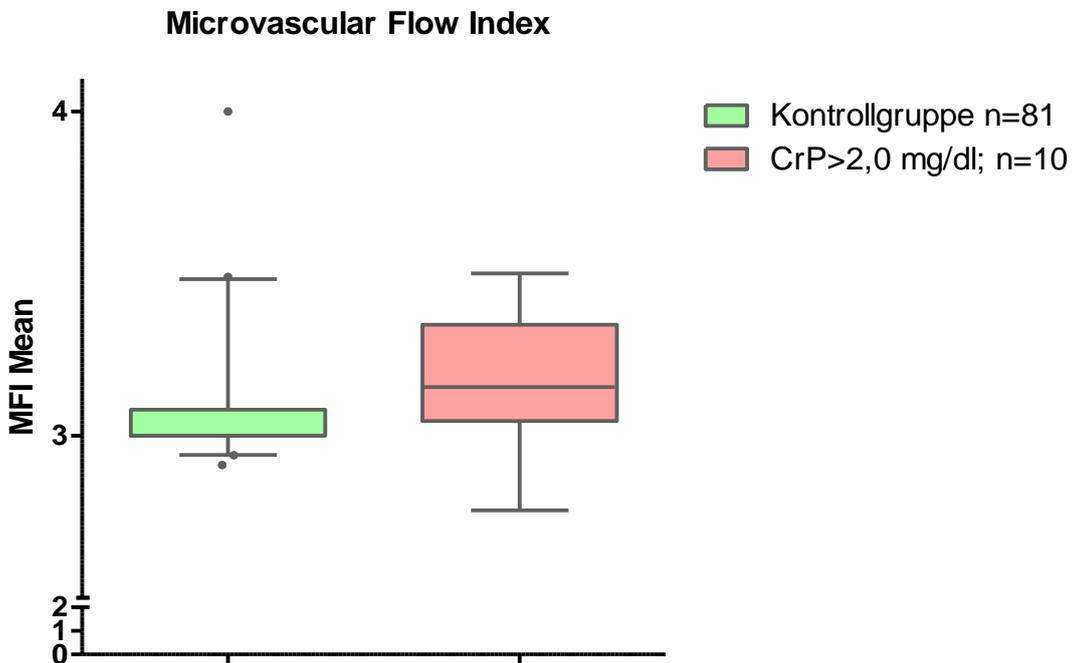


Abb. 32 MFI der gesunden Kontrolle im Vergleich zur Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl (Ausreißer als Punkte dargestellt); $p < 0,05$

3.4.3 Übersicht der Perfusions-Befunde

Im Folgenden ist eine Übersicht über positive und negative Befunde des subjektiven Scores und des mikrozirkulatorischen Blutflusses dargestellt (Tab. 14). Als negativ wurde hier ein subjektiver Score von 0 (= unauffällig) und ein MFI von 3,0 (= continuous) eingestuft. Analog dazu ergibt sich für den positiven Score-Befund jeder Wert über 0 und für den MFI Mittelwerte über 3,0. Zudem wurde die bei der Sofortauswertung erstellte Befundung des Flusses mit 0 (= negativ/normal) aufgeführt. Richtig positive bzw. richtig negative Ergebnisse des Patientenkollektivs sind hiermit transparent dargestellt.

Die Anteile richtig positiver und richtig negativer Befunde liegen bei allen drei Möglichkeiten der Perfusions-Beurteilung in vergleichbaren Bereichen.

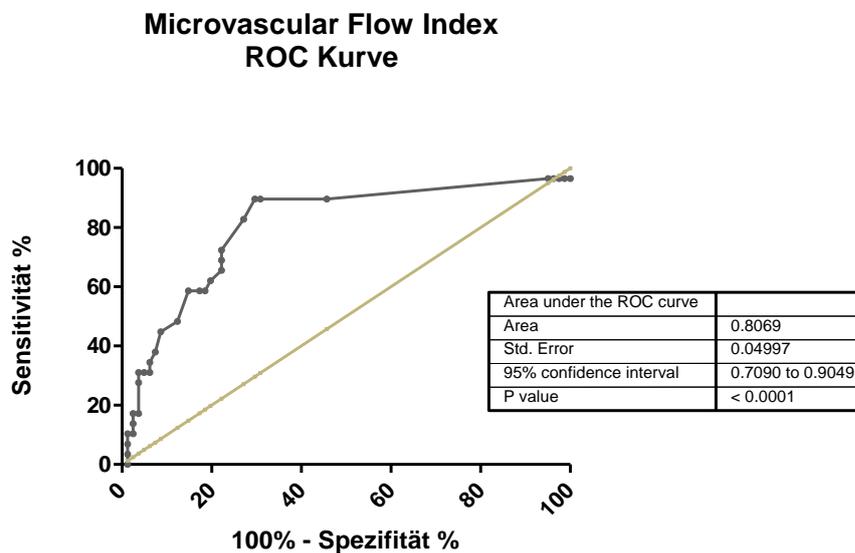
Parameter	Wert Ergebnis	Kontrollgruppe n=81	CrP>2,0 mg/dl n=10
Subjektiver Score Sofortauswertung	= 0 negativ	65 %	10%
	> 0 positiv	35 %	90%
Mikrozirkulatorischer Fluss Sofortauswertung	= 0 negativ	70%	20%
	> 0 positiv	30%	80%
Microvascular Flow Index AVA-Analyse	=3,0 negativ	67 %	10%
	> 3,0 positiv	31 %	80%

Tab. 14 Anteile positiver und negativer Befunde des subjektiven Scores, der mikrozirkulatorischen Sofortauswertung und MFI bezogen auf die jeweilige Patientengruppe. Fett gedruckt sind Anteile richtig positiver, bzw. richtig negativer Ergebnisse.

3.4.4 ROC-Analysen

3.4.4.1 Flussqualität

Die MFI- Werte der AVA-Analyse werden im Folgenden einer ROC-Analyse unterzogen. Die Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve, AUC) beträgt 0,8. Bei einem durchschnittlichen Microvascular Flow Index von 3,18 wird eine Spezifität von 85,5 % und eine Sensitivität von 58,6% erreicht. Das Erkrankungsrisiko ist bei diesem Index somit knapp 4-mal höher als mit negativem Test (Likelihood Ratio 3,96). Abb. 33 zeigt sämtliche Sensitivitäten und Spezifitäten nach unterschiedlichen MFI-Werten mit ROC-Kurve.

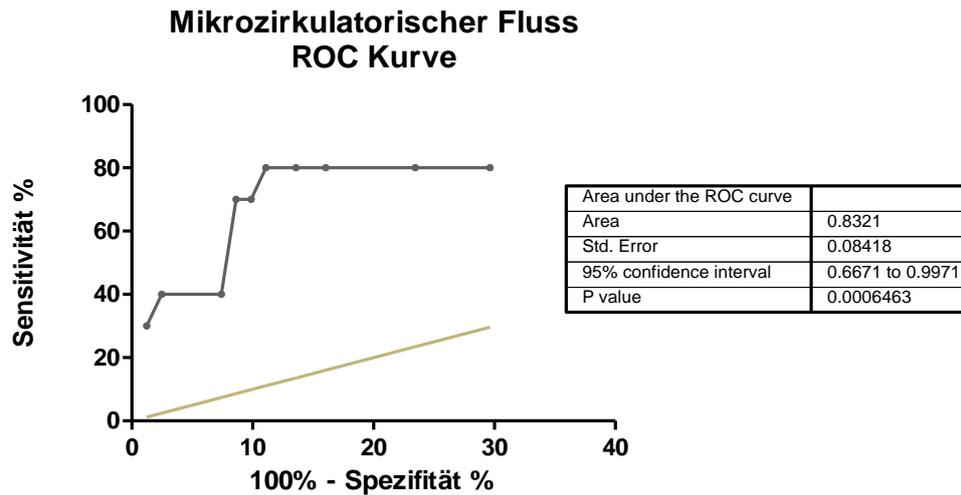


	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
> 3.010	89,66	72,65% to 97,81%	54,32	42,87% to 65,44%	1,96
> 3.030	89,66	72,65% to 97,81%	69,14	57,89% to 78,93%	2,90
> 3.050	89,66	72,65% to 97,81%	70,37	59,19% to 80,01%	3,03
> 3.070	82,76	64,23% to 94,15%	72,84	61,81% to 82,13%	3,05
> 3.085	72,41	52,76% to 87,27%	77,78	67,17% to 86,27%	3,26
> 3.100	68,97	49,17% to 84,72%	77,78	67,17% to 86,27%	3,10
> 3.120	65,52	45,67% to 82,06%	77,78	67,17% to 86,27%	2,95
> 3.135	62,07	42,26% to 79,31%	80,25	69,91% to 88,27%	3,14
> 3.150	58,62	38,94% to 76,48%	81,48	71,30% to 89,25%	3,17
> 3.165	58,62	38,94% to 76,48%	82,72	72,70% to 90,22%	3,39
> 3.180	58,62	38,94% to 76,48%	85,19	75,55% to 92,10%	3,96
> 3.195	48,28	29,45% to 67,47%	87,65	78,47% to 93,92%	3,91
> 3.205	44,83	26,45% to 64,31%	91,36	83,00% to 96,45%	5,19
> 3.215	37,93	20,69% to 57,74%	92,59	84,57% to 97,23%	5,12

Abb. 33 ROC-Analyse des Microvascular Flow Index der AVA-Analyse

3.4.4.2 Mikrozirkulatorischer Fluss

Bei der ROC-Analyse des mikrozirkulatorischen Flusses in der Sofortauswertung errechnet eine AUC von 0,83. Ab einem Durchschnittswert von 0,38 konnte eine Spezifität von 89 % bei einer Sensitivität von 80 % erreicht werden. Daraus ergibt sich ein gut 7 fach erhöhtes Risiko bei positivem Befund (Likelihood ratio). Siehe dazu untenstehende Abb. 34.

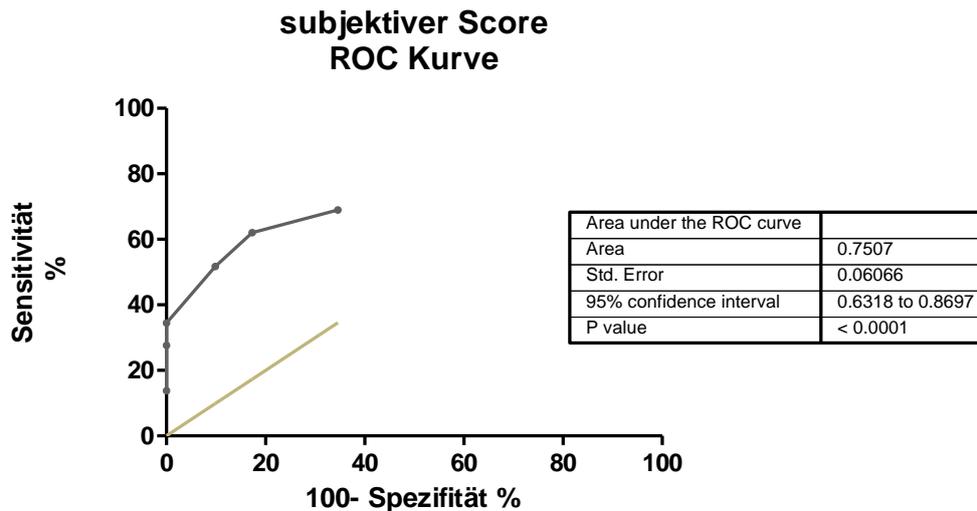


Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
> 0.0400	80,00	44,39% to 97,48%	70,37	59,19% to 80,01%	2,70
> 0.1250	80,00	44,39% to 97,48%	76,54	65,82% to 85,25%	3,41
> 0.2100	80,00	44,39% to 97,48%	83,95	74,12% to 91,17%	4,98
> 0.2900	80,00	44,39% to 97,48%	86,42	77,00% to 93,02%	5,89
> 0.3750	80,00	44,39% to 97,48%	88,89	79,95% to 94,79%	7,20
> 0.4600	70,00	34,75% to 93,33%	90,12	81,46% to 95,64%	7,09
> 0.5400	70,00	34,75% to 93,33%	91,36	83,00% to 96,45%	8,10
> 0.6250	40,00	12,16% to 73,76%	92,59	84,57% to 97,23%	5,40
> 0.7500	40,00	12,16% to 73,76%	97,53	91,36% to 99,70%	16,20
> 0.9150	30,00	6,674% to 65,25%	98,77	93,31% to 99,97%	24,30

Abb. 34 ROC-Analyse des mikrozirkulatorischen Flusses der Sofortauswertung

3.4.4.3 Subjektiver Score

Die ROC-Analyse des subjektiven Scores bei der Sofortauswertung ergibt eine AUC von 0,75. Ab einem Durchschnittswert von 1,15 konnte eine Spezifität von 100 % bei einer Sensitivität von 34,5 % erreicht werden. Für einen mittleren Score von 0,85 errechnet sich eine Spezifität von 90,1 % mit einer Sensitivität von 51,7 % und einem Likelihood Ratio von 5. Vergleichen Sie dazu Abb. 35.



Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
> 0.1500	68,97	49,17% to 84,72%	65,43	54,04% to 75,66%	2,00
> 0.5000	62,07	42,26% to 79,31%	82,72	72,70% to 90,22%	3,59
> 0.8500	51,72	32,53% to 70,55%	90,12	81,46% to 95,64%	5,24
> 1.150	34,48	17,94% to 54,33%	100,0	95,55% to 100,0%	
> 1.500	27,59	12,73% to 47,24%	100,0	95,55% to 100,0%	
> 1.850	13,79	3,889% to 31,66%	100,0	95,55% to 100,0%	

Abb. 35 ROC-Analyse für den subjektiven Score der Sofortauswertung

Zu den Werten der Gefäßoberfläche wurde ebenso eine ROC-Analyse durchgeführt, welche allerdings lediglich eine AUC von 0,64 aufweist. Werte sind im Anhang unter 6.2, Seite 88 einzusehen.

4 Diskussion

4.1 Zeigen sich Unterschiede in der Mikrozirkulation bei Neugeborenen mit Infektion im Vergleich zu gesunden Neugeborenen?

Die im Folgenden beschriebenen Differenzen im Gruppenvergleich beziehen sich auf die Gegenüberstellung der gesunden Kontrollgruppe mit der Gruppe der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl bzw. mit CrP 0,5-2,0 mg/dl. (Gruppeneinteilung siehe Tab. 3, Seite 38)

Wir wählten meistens den Gruppenvergleich der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl mit der Kontrollgruppe (CrP < 0,5 mg/dl), damit die klinische Relevanz deutlicher wird. So ist im Bereich 0,5-2,0 mg/dl das Vorliegen einer Infektion doch eher in Frage zu stellen, als bei einem darüber liegenden CrP-Wert. Für die bestmögliche Evaluation der Messmethode wurde deshalb überwiegend der Gruppenvergleich zwischen Kontrollgruppe und CrP > 2,0 mg/dl gewählt, da diese Probanden mit größerer Wahrscheinlichkeit tatsächlich eine Infektion aufweisen.

4.1.1 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Gefäßdichte (FVD) wurde von Nolte et al definiert als die Länge der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro beobachtete Region (cm/cm^2) und gilt als Qualitätsindikator für die Durchblutung des jeweiligen Gewebes⁷⁴. Die FVD wird als einer der besten quantitativen mikrozirkulatorischen Parameter beschrieben. Durch die Tatsache, dass technisch bedingt nur perfundierte Gefäße dargestellt werden, stellt die funktionelle Gefäßdichte ein indirektes Maß für den Sauerstofftransport in den Gefäßen dar^{36, 111}.

Beim Erwachsenen ist nach Messung in der Sublingualregion eine Differenzierung von Arteriolen und Venolen möglich. Beim Früh- und Neugeborenen erweist sich dies als schwierig, da diese dort in tieferen Hautschichten liegen³⁶. Der Fokus der Observation liegt hier deshalb bei den Kapillaren. Deshalb entspricht die funktionelle Gefäßdichte (functional vessel density, FVD)⁷⁴ hier der funktionellen Kapillardichte (functional capillary density, FCD) oder der funktionellen Dichte kleiner Gefäße (functional small vessel density, FSVD⁶¹). Die Begriffe werden deshalb als gleichbedeutend verwendet.

Beim Vergleich der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl mit der Kontrollgruppe konnten in unserer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede der funktionellen Gefäßdichte gefunden werden. Neugeborene mit CrP-Werten über 2,0 mg/dl wiesen eine tendenziell geringere FVD auf, die jedoch keine signifikante Differenz erreicht (Kap. 3.4.2.2, S. 58). Ursache für die nur geringe Beeinträchtigung der FCD bei Infektion könnte die insgesamt moderate Infektionsschwere bzw. das frühe therapeutische Eingreifen in unserem Patientenkollektiv sein. Keines der Kinder zeigte ein schwer septisches Krankheitsbild. Die dennoch vorhandene Tendenz zu einer Abnahme der Gefäßdichte bei infektiösen Geschehen ist konform mit früheren Untersuchungen. Weidlich und Mitarbeiter zeigten trotz einer großen individuellen Variabilität einen intraindividuellen signifikanten Abfall der FVD bei Frühgeborenen mit nachgewiesener Infektion mittels OPS¹¹¹. Diese Veränderungen traten bereits einen Tag vor dem Auftreten klinischer Infektionszeichen und Beginn antibiotischer Therapie auf.

Da dieser Abfall nicht mittels absoluter Werte dargestellt werden konnte, erwies sich vielmehr die tägliche Untersuchung zum Vergleich intraindividuelle Unterschiede als sinnvoll¹¹¹. Eine verminderte kapilläre Dichte ist in weiteren Studien mit septischen Patienten sowie im Tiermodell beschrieben worden^{48, 103, 108}. Sakr et al konnten zudem mittels OPS-Imaging einen Zusammenhang mikrozirkulatorischer Veränderungen mit dem Outcome der Patienten mit septischem Schock zeigen⁸⁸. Überlebende Patienten wiesen eine Erholung der beeinträchtigten Perfusion kleiner Gefäße auf, welche bei Verstorbenen Patienten persistierte⁸⁸. Gleiche Ergebnisse bezüglich der Reversibilität bei genesenden Patienten beschrieben De Backer et al und Top et al^{27, 101}. Trezeciak und Mitarbeiter zeigten beim Vergleich dieser beiden Gruppen zudem bei nicht überlebenden Sepsispatienten eine stärkere mikrozirkulatorische Beeinträchtigung durch auffallende Heterogenität regionaler Perfusion, deren Ausprägung mit der Schwere der kardiovaskulären Dysfunktion korrelierte^{6, 103}. In der Mikrozirkulation findet während infektiöser Geschehen eine Art Umverteilung der kleinen Gefäße statt. Durch eine Vasodilatation in der frühen septischen Phase findet eine Verteilung zu weniger betroffenen Bereichen statt, und somit eine Vergrößerung der regionalen Heterogenität⁵⁸.

Die FVD verändert sich offenbar auch unter anderen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Kroth et al konnten bei Frühgeborenen eine abnehmende FSVD innerhalb der ersten vier Lebenswochen beobachten, welche direkt mit Hämoglobinwerten korrelierte^{60, 61}. Analog dazu zeigten Nadeau und Groner eine Abnahme der Gefäßdichte bei sublingualen Messungen anämischer Erwachsener⁷³. Zudem konnte eine ansteigende FSVD nach Transfusion Frühgeborener dokumentiert werden³⁷. Bei hämodynamisch signifikantem persistierendem Ductus arteriosus konnten wir kürzlich mittels SDF-Imaging eine signifikant niedrigere funktionelle Kapillardichte nachweisen, die mit einer Reduktion größerer Gefäße einher ging^{92, 93}.

4.1.2 Gefäßoberfläche

Die Software AVA berechnet vollautomatisch anhand der unterschiedlichen Grautöne den von Gefäßen bedeckten Anteil an der Gesamtfläche des Bildausschnitts (Vessel surface). Dieser Parameter ist also vom Untersucher unabhängig. Beim Gruppenvergleich der Gesunden zu Neugeborenen mit $\text{CrP} > 2,0$ mg/dl konnten wir signifikante Unterschiede der Vessel surface zeigen. Die gefäßbedeckte Fläche ist bereits bei Vorliegen eines $\text{CrP} > 0,5$ mg/dl kleiner als in der Kontrollgruppe. Hierbei steigt die statistische Relevanz mit der Schwere der Infektion, bzw. mit steigenden CrP-Werten. Siehe dazu Kap. 3.4.2.3, S. 59 und Tab. 15, S.89.

Da die funktionelle Gefäßdichte in die Berechnung der Vessel surface mit eingeht, war dieses Ergebnis aufgrund früherer Untersuchungen zu erwarten. Die in bisherigen Studien nachgewiesene verminderte FVD bei Infektion und Sepsis^{27, 88, 101, 111} und die Tendenz unserer Kinder mit $\text{CrP} > 2,0$ mg/dl zu einer ebenfalls geringeren Kapillardichte lassen eine verminderte Gefäßoberfläche in unserem Patientenkollektiv als nachvollziehbar erscheinen.

Die Vessel surface könnte neben der Bestimmung der Flussqualität ein schneller und wertvoller Parameter zur Erfassung des Status der Mikrozirkulation sein, da er verhältnismäßig schnell und vollautomatisch bestimmbar ist.

Der Unterschied der Gefäßoberfläche zur Funktionellen Kapillardichte liegt im Wesentlichen in der Abhängigkeit vom Auswertenden. Die Gefäßoberfläche wird auswertungsunabhängig vom Programm AVA anhand der Grauabstufungen automatisch bestimmt. Folglich sind alle Gefäße eines Bildausschnitts erfasst. Die funktionelle Kapillardichte hingegen wird erst nach der Markierung der Gefäße bestimmt. Diese Markierungen erfolgen durch den Auswertenden, bzw. werden von ihm präzisiert. Es besteht also durchaus ein enger Zusammenhang zwischen Vessel surface und Functional Vessel Density (FVD). Je weniger der Einfluss des Auswertenden durch die Korrektur der Gefäßmarkierungen, umso ähnlicher sind sich die beiden Parameter. Dies ergibt sich aus der technisch bedingten Tatsache, dass nur perfundierte (also Hämoglobin enthaltende) Gefäße dargestellt werden. In unserer Arbeitsgruppe haben wir in nach dieser Arbeit folgenden Studien auf ein korrigierendes Eingreifen durch den Auswertenden zunehmend verzichtet. Somit gleichen sich Vessel surface und FVD immer mehr an. Der hier beschriebene Vorteil der Vessel surface, der sich durch die Unabhängigkeit vom Untersucher auszeichnet könnte deshalb in Zukunft in den Hintergrund rücken. Da in dieser Arbeit jedoch noch das bis dahin etablierte Auswerten mittels manueller Korrekturen der vom Programm markierten Gefäße praktiziert wurde, ist hier die Gefäßoberfläche als der im Vergleich zur FVD objektivere Parameter anzusehen.

4.1.3 Verteilung der Gefäßdurchmesser

Für die Verteilung der Gefäßdurchmesser wurden die Anteile der unterschiedlichen Gefäßgrößen (klein, mittel, groß, sehr groß) am Gesamtgefäßanteil im Gruppenvergleich dargestellt. Gezeigt wurde ein signifikant größerer Anteil der sehr großen Gefäße ($>50\ \mu\text{m}$) in der Gruppe der Neugeborenen mit $\text{CrP} > 0,5\ \text{mg/dl}$. Bei den anderen Gefäßdurchmessern konnten wir keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich feststellen (siehe Ergebnisse in Kap. 3.4.2.4, S. 60). Die Zunahme sehr großer Gefäße bei erhöhtem CrP könnte als relativ angesehen werden, wenn man von einem geringeren Anteil Gefäße kleineren Durchmessers ausgeht. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Gefäßdurchmesser bereits um Arteriolen handelt. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten können hierzu jedoch keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Zu erwarten wäre in bei Infektion eine Durchmesser-Verteilung großer Variation, welche auf eine zunehmende Heterogenität perfundierter Gefäße hinweist. Zunehmende Heterogenität bei septischen Geschehen ist von De Backer et al beschrieben worden. Ebenso konnten sie bei Erwachsenen mit schwerer Sepsis eine signifikante Verkleinerung des Anteils von Gefäßen kleiner als $20\ \mu\text{m}$ feststellen. Möglicherweise konnten wir aufgrund der in unserem Studienkollektiv moderat ausgeprägten Infektionsschwere und frühen antibiotischen Therapie keine Tendenzen in diese Richtung nachweisen. Ebenso keinen Unterschied in der Durchmesser-Verteilung bei Frühgeborenen mit Infektion zeigten Weidlich et al. Zudem kann im Allgemeinen davon ausgegangen werden, dass die Erkennung besonders kleiner Gefäße durch Plasma-Gaps erschwert und somit eventuell das Ergebnis beeinflusst wird^{27, 28}. Diese feinen Gefäße werden gegebenenfalls nicht erkannt, da sie durch erythrozytenfreies Plasma in ihrer Darstellung unterbrochen werden. Insbesondere im stehenden Bild oder bei sehr kurzen Sequenzen kann sich diese Problematik gegebenenfalls auf die Auswertung auswirken.

4.1.4 Flussqualität

Bei Einschätzung der Flussqualität mit dem Microvascular Flow Index zeigten sich bei allen Gefäßgrößen sowohl in der Sofortauswertung als auch in der AVA-Analyse signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit $\text{CrP} > 2,0\ \text{mg/dl}$. Kinder mit erhöhtem CrP-Wert wiesen einen hyperdynamen Flow auf, bzw. zeigten eine Tendenz zu schnellerem Fluss mit einem Microvascular Flow Index von über 3,0. Die Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3.4.2.4 auf Seite 60 einzusehen. Je kleiner die Gefäße, umso deutlicher hat sich eine Beschleunigung der Flussqualität gezeigt (Tab. 17, Seite 90). In unserer Studiengruppe traten Qualitäten eines verlangsamten Flows im Sinne eines $\text{MFI} < 3,0$ bei einem zu vernachlässigenden Patientenanteil auf (vgl. Kap. 6.4 auf Seite 89). Aus diesem Grund wurden in diesem Bereich liegende Indices bei der weiteren Beurteilung vernachlässigt. Möglicherweise sind bei diesem kleinen Teil die beeinträchtigten Flüsse eher artefaktbedingt. Durch zu starken Druck bei der Messung kann ein mikrovaskulärer Fluss als langsam, intermittierend oder stehend erscheinen.

Das Vorkommen eines hyperdynamen Flusses wurde in den meisten bisherigen Studien nicht in den MFI integriert. Deshalb bestand der Index nur aus den Flussqualitäten fehlend/stehend (=0), intermittierend (=1), zäh (=2), und kontinuierlich/normal (=3) (entsprechend absent (=0),

intermittierend (=1), sluggish (=2), continuous (=3))^{16, 28}. Bei gesunden Probanden wurde bei sublingualen Messungen vor allem kontinuierlicher Fluss gemessen⁴⁸ und kann als Normalform eingestuft werden. Durch die zusätzliche Einführung des hyperdynamen Flusses (=4) ergeben sich jedoch Schwierigkeiten bei der Mittelwertbildung. So heben sich beispielsweise die Flussqualitäten zäh (=2) und hyperdynamic (=4), welche beide als pathologisch zu werten sind, bei Indexbildung fälschlich als normaler Flow (=3) auf. Zudem sollte beachtet werden, dass die Vorstellung des fließenden Übergangs der einzelnen Flussqualitäten ineinander nicht tatsächlich der Physiologie entspricht und eine Bezeichnung von 0 bis 4 kritisch zu überdenken ist (vgl. Abb. 18 auf Seite 44). Die Bildung des Mittelwerts ist jedoch aufgrund der halbautomatischen Auswertung bei der Benutzung des Programms AVA nicht zu umgehen. Um dieser Problematik entgegen zu treten, entschlossen wir uns, unsere Daten auf zweierlei Art auszuwerten. In der Sofortauswertung wurde ein neuer Parameter gebildet, welcher im Ergebnisteil als „mikrozirkulatorischer Fluss“ bezeichnet wird. Hier wird nur der kontinuierliche Fluss als normal mit dem Wert 0 eingestuft. Jegliche pathologischen Beurteilungen wie stehender, intermittierender, zäher und hyperdynamer Fluss erhielten alle den Wert 1. Erst bei der späteren Auswertung mit dem Programm AVA wurde der MFI wie oben beschrieben als Mittelwert berechnet. Beide Analysen erfolgten somit auf der Grundlage der Einteilungen nach Boerma et al¹⁶. Sowohl der von uns eingeteilte mikrozirkulatorische Fluss, als auch der MFI wiesen signifikante Unterschiede im Vergleich der gesunden Kontrolle zur Gruppe der gesicherten Infektion auf (siehe Kap. 3.4.1, Seite 55 und 3.4.2.5 auf Seite 61). In der Sofortauswertung konnte ein höheres Signifikanzniveau errechnet werden. Dies deutet darauf hin, dass verlangsamte Flussqualitäten unter Umständen auch in unserem Patientenkollektiv eine Rolle spielen. Aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl ist dies jedoch nicht mit Sicherheit zu sagen. Zudem sollte beachtet werden, dass eine Beeinträchtigung des Flusses artefaktbedingt durch zu starken Druck der Messsonde entstehen kann. Im Gegensatz dazu ist beim hyperdynamen Flow davon auszugehen, dass dieser nicht untersucherabhängig produziert werden kann, sondern Ausdruck pathophysiologischer Veränderungen der Mikrozirkulation ist.

Laut De Backer sind die Konsequenzen eines sehr schnellen Flows nicht bekannt. Theoretisch mag eine schnelle Flussgeschwindigkeit durch erhöhte Schubspannung Läsionen an den Kapillaren bedingen und somit den Sauerstoffaustausch beeinträchtigen²⁸. Ursächlich für den größeren Flussindex könnte der erhöhte Nährstoffbedarf während infektiöser Geschehen sein. Eine reaktive Erhöhung des Blutflusses bei steigendem Metabolismus ist die Folge⁴⁰. Auch ein allgemein verminderter peripherer Widerstand könnte eine Umverteilung mikrozirkulatorischer Gefäße⁶⁴ mit resultierender kurzfristiger Flussbeschleunigung indizieren.

Auch Klijn et al beschrieben kürzlich einen sublingual mit SDF gemessenen hohen Microvascular Flow Index bei erwachsenen Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock⁵⁵. Bereits davor berichteten Hermreck und Thal von einem erhöhten Blutfluss in infizierten Regionen während Sepsis⁶⁴. Zudem wurde von Ellis et al bei Ratten mit septischer Peritonitis ein sehr schneller Fluss in muskulären Kapillaren gezeigt³². Bonanno beschreibt eine kurze hyperdynamie Phase als eine kompensatorische Antwort auf eine bereits verringerte Sauerstoffausschöpfung, welche bei Aufbrauchen der Reserven ihr Ende nimmt¹⁷.

Im Gegensatz dazu konnten De Backer et al eine verminderte Perfusion als intermittierenden und fehlenden Blutfluss bei erwachsenen Patienten im septischen Schock nachweisen. Diese Reduktion der

Durchblutung bezog sich nur auf kleine, nicht aber auf größere Gefäße²⁷. Auch Trzeciak et al beschrieben signifikant niedrigere Flow-Scores bei septischen Patienten mit einer weiteren Verminderung bei nicht Überlebenden¹⁰³. Zudem berichteten Top et al von einer Verbesserung des durchschnittlichen MFI bei Genesenden schwerer Septitiden im Gegensatz zu Persistenz des langsamen oder fehlenden Flows bei später Verstorbenen¹⁰¹.

Alba-Alejandre et al beschrieben kürzlich einen signifikant geringeren Anteil an Gefäßen mit normalem, kontinuierlichem Blutfluss bei reifen Neugeborenen mit Infektion im Vergleich zu gesunden Neugeborenen².

Eventuell kann davon ausgegangen werden, dass zu Beginn des infektiösen Geschehens hyperdynamie mikrozirkulatorische Flussgeschwindigkeiten entstehen, während im progredienten Schockgeschehen ein hypodynamer Blutfluss entsteht. Dies könnte im Zusammenhang mit der so genannten „kalten Phase“ des Schocks mit Zentralisierung stehen, im Gegensatz zur vorher durchlaufenen „warmen Phase“ mit entsprechender Mehrdurchblutung^{45, 80}.

Die vielfachen Beeinträchtigungen peripheren Blutflusses im Sinne von geringerer Kapillardichte und verminderter Flows sind möglicherweise durch eine Konstriktion peripherer Gefäße als Antwort auf Hypotension erklärbar. Arteriolen sind die wesentlichen Zielorgane sympathischer Vasokonstriktion¹⁷. Ursache für die Diskrepanz zwischen dem von uns dargestellten schnellen Flow im Gegensatz zu den beschriebenen verlangsamten Flussqualitäten könnte die unterschiedliche Schwere der Infektionen in den beschriebenen Untersuchungen sein. In unserer Infektionsgruppe zeigten sich nur moderate Infektionen ohne schwere Verläufe wie septischer Schocks oder Multiorganversagen. Ein hyperdynamer Blutfluss könnte also eine initiale Reaktion des Organismus auf Inflammation darstellen, welcher bei schweren, hypotensiven Krankheitsbildern in einen langsamen bis fehlenden Flow in der Mikrozirkulation der Haut übergeht. Diese theoretische Erklärung sollte weiter untersucht werden. Allgemein ist ein schneller Blutfluss konform mit einem erhöhtem kardialen Output und beginnender systemischer Vasodilatation¹². Dominiert im Verlauf die Hypotension, könnte aufgrund der peripheren Vasokonstriktion ein langsamer bzw. intermittierender Fluss entstehen¹⁷.

Aufgrund der beschriebenen bisher untersuchten Unterschiede der Flussqualität im Zusammenhang mit septischen Geschehen, sind die Veränderungen des kapillären Blutflusses in unserer Infektionsgruppe höchstwahrscheinlich ursächlich durch die bakterielle Infektion bedingt.

Im Gegensatz zu reifen Neugeborenen ist bei Frühgeborenen der Microvascular Flow Index schwerer beurteilbar bzw. wenig beeinträchtigt. Bei Messungen mittels OPS und Auswertung mit einem anderen Auswertungsprogramm konnten Weidlich und Mitarbeiter keinen signifikanten Unterschied der Flussqualität bei Frühgeborenen mit Infektion nachweisen¹¹¹.

4.1.5 Subjektiver Score

Die in dieser Arbeit als subjektiver Score bezeichnete Soforteinschätzung des Gesamteindrucks mikrozirkulatorischer Aufnahmen wurde erstmalig in die Beurteilung von Aufnahmen mittels SDF-Imaging eingeschlossen. Optimalerweise erfolgt diese Untersuchung online, also im direkten Monitoring des Patienten als Bedsidetest (in der vorliegenden Studie direkt im Anschluss an die Aufnahme). Eine Beurteilung des Gesamtbildes der Mikrozirkulation bei einem Patienten setzt, wie auch die Flussbeurteilung, ein gewisses Maß an Erfahrung voraus. Wie bei nahezu jeder anderen (bildgebenden) Untersuchungsmethode wird ein geübter Untersucher adäquate Befunde erheben können. Bereits nach 10 bis 30 mit dieser Technik untersuchten Patienten bekommt der Anwender ein Gefühl für das typische und atypische dynamische Bild der Hautdurchblutung und wird zunehmend sicher in der direkten Korrektur von Artefakten. Es fällt somit nicht schwer, die Aufnahme als normal (=0), kontrollbedürftig (=1) oder auffällig (=2) einzuschätzen. Eine diffizilere Einteilung der Skala wurde bewusst nicht gewählt, um eine schnelle, einfache und demnach sichere Beurteilung zu ermöglichen. Die hier erhobenen Scores zeigten im Mittel hochsignifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl (vgl. Kap. 3.4.1 auf Seite 55). Es ist davon auszugehen, dass allein die subjektive Gesamteinschätzung einer mikrozirkulatorischen Aufnahme mit SDF-Imaging das Potential für eine effektive und schnell erlernbare Methode zur frühen Infektionsdiagnostik hat.

4.1.6 Divergierende Befunde

Eines der Kinder zeigte einen eindeutig hyperdynamen Blutfluss (MFI 4,0) in allen Sequenzen trotz normaler CrP- und IL6-Werten. Die Mutter des Mädchens leidet an systemischen Lupus Erythematoses. Zur Abklärung eines AV-Blocks, welcher bekanntermaßen durch übergetretene mütterliche Antikörper entstehen kann⁵², wurde das Kind mittels EKG untersucht und erhielt wiederholte Blutentnahmen. Zudem lag bis zum 2. Lebenstag eine Hypothermie vor. Ein möglicher Zusammenhang zwischen mütterlicher Lupuserkrankung und hyperdynamen Flow beim Kind wurde bisher nicht untersucht. Denkbar wäre auch eine Stressreaktion des Neugeborenen aufgrund der diagnostischen Maßnahmen.

Ein Neugeborenes zeigte trotz schwerer Infektion mit maximalem CrP von 8,99 mg/dl einen normalen Microvascular Flow Index und unauffälligen subjektiven Score. Die funktionelle Kapillardichte lag jedoch deutlich über dem Mittelwert außerhalb des Konfidenzintervalls. Das Kind wurde mit Ampicillin, Cefotaxim und zusätzlich mit Tobramycin i.v. behandelt. Dessen Mutter gab einen regelmäßigen Nikotin- und Cannabisgebrauch an. Bei dem neugeborenen Mädchen waren die Spiegelnachweise von Cannabis (THC) und Opiaten positiv. Eine veränderte Perfusion und Entzündungsreaktion bei nachweisbarem THC kann mangels bisheriger Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Können auch Infektionen mit nur geringem Anstieg der Infektionsparameter erkannt werden?

Im Vergleich der gesunden Kinder mit der Gruppe aller Kinder mit $\text{CrP} > 0,5 \text{ mg/dl}$ konnten beim Microvascular Flow Index hochsignifikante Unterschiede gezeigt werden (Kap. 6.5, S. 90). Die Gefäßoberfläche war bei diesem Gruppenvergleich ebenfalls signifikant unterschiedlich, jedoch in einem niedrigeren Signifikanzniveau (Kap. 6.3, S. 89).

Bei 55 Kindern wurden keinerlei klinische Infektionszeichen dokumentiert, davon entwickelten vier dennoch CrP-Werte über $0,5 \text{ mg/dl}$. Zwei von diesen vier Kindern hatten dennoch bereits bei der Sofortauswertung auffällige Flow-Werte, bei der AVA-Analyse hatten alle vier einen Microvascular Flow Index von $> 3,0$.

Mit Sidestream Dark Field Imaging können also sowohl mit der sofortigen subjektiven Methode als auch mit der differenzierten Einschätzung (AVA) des mikrozirkulatorischen Blutflusses Neugeborene mit gering erhöhtem CrP-Level detektiert werden.

4.3 Ist SDF-Imaging als Screeningmethode für Neugeboreneninfektionen geeignet und realisierbar?

In den ROC-Analysen zur Beurteilung des Microvascular Flow Index und des subjektiven Scores als Screeningtest zeichnen sich diese durch eine sehr hohe Spezifität aus, der jedoch eine geringe Sensitivität, also eine relativ hohe falsch positiv Quote, gegenüber steht (siehe Kap. 3.4.4.1, Seite 63 und Kap. 3.4.4.3, Seite 65). In unserem Patientenkollektiv wiesen 65% einen richtig negativen Scorebefund auf (subjektiver Score = 0,0), 90 % der Gruppe mit $\text{CrP} > 2,0 \text{ mg/dl}$ wurden als richtig positiv befundet (Score $> 0,0$). Bei der geblindeten Analyse hatten 80 % der Kinder mit $\text{CrP} > 2,0 \text{ mg/dl}$ einen MFI $> 3,0$ (vgl. Kapitel 3.4.3 auf Seite 62). Bei der Befundung nach dem mikrozirkulatorischen Fluss mit 0=normal (kontinuierlich), 1=pathologisch (beeinträchtigte und hyperdynamische Flows) sind die Sensitivitäten deutlich höher als bei den anderen Parametern. Auch die AUC weist mit 0,83 hier den besten Wert auf. Das Potential dieser neuen Möglichkeit sollte deshalb nicht unterschätzt werden. Die Wahl des Cut-off-Niveaus bei Bewertung des Mittelwerts beeinflusst die erreichte Sensitivität und Spezifität.

Eine schon sehr frühe Erfassung möglicher Infektionen bei geringer CrP-Erhöhung konnte vor allem beim MFI gezeigt werden (vgl. Kap. 6.5, S. 90 und Kap. 6.4, S. 89).

Möglicherweise wäre es jedoch vorzuziehen, den Schwerpunkt auf die sichere Erfassung der Gruppe mit $\text{CrP} > 2,0 \text{ mg/dl}$ zu setzen. Vor allem bei der subjektiven Gesamtbeurteilung können diese Kinder mit u. U. schwerer Infektion schneller identifiziert werden, als dies mit konventionellen Methoden wie der Bestimmung der Entzündungsmarker der Fall ist. Genau bei diesen Kindern wäre ein schnelleres therapeutisches Eingreifen essentiell. Deshalb wählten wir für diese Darstellung den entsprechenden Gruppenvergleich (Kontrollgruppe vs. $\text{CrP} > 2,0 \text{ mg/dl}$).

Eine unzureichende Sensitivität ist das Manko eines jeden Entzündungsmarkers, der derzeit verwendet wird. Dennoch kann eine Verbesserung durch Kombination mit anderen diagnostischen Werkzeugen erzielt werden. Die SDF-Imaging Methode kann die klinisch-chemische Diagnostik aktuell nicht ersetzen, aber sie wohl unterstützen. Die Stärke der Untersuchung liegt in der Erfassung der Flussqualität, die bei einem großen Anteil der Neugeborenen mit Infektion schon früh, also bei nur geringer CrP-Erhöhung verändert ist. Der Einsatz als zusätzliches Screeninginstrument im klinischen Alltag ist denkbar. Die Patienten können durch die nicht invasive Anwendung und frühe Diagnostik von dieser neuen Methode profitieren. Fällt also im Screening ein hyperdynamischer oder beeinträchtigter Fluss auf, sollten Laborkontrollen durchgeführt werden.

Der Microvascular Flow Index ist leicht und schnell zu bestimmen. Er gibt jedoch keine Information über die funktionelle Kapillardichte und Gefäßdurchmesserverteilung, deren Erfassung eine umfassendere Analyse notwendig macht. Zudem bewertet dieser Index über eine Ordinalskala, ist also eine semiquantitative und subjektive Methode²⁸. Wenngleich die Subjektivität einen Kritikpunkt von OPS und SDF darstellt, weist die Beurteilung des Blutflusses dennoch eine gute inter- und intraindividuelle Variabilität auf¹⁶.

Die Gefäßoberfläche wird mittels Software vollautomatisch ermittelt. Der große Vorteil der Benutzerunabhängigkeit könnte diesen Wert zu einem für das Screening gut geeigneten Parameter aufwerten. Die ROC-Analyse war in unserer Studie trotz signifikanter Werte allerdings unbefriedigend mit einer AUC von 0,64 (siehe Anhang 6.2, Seite 88).

Auf die Anwendung bezogen ist das Gerät als diagnostisches Screeninginstrument gut geeignet. Durch die nebenwirkungsfreie, noninvasive Applikation der Lichtquelle an der Ohrmuschel bei schlafendem Säugling wird dieser nicht belastet. Die Untersuchung selbst im Sinne einer Aufzeichnung (oder ggf. direkten Sofortauswertung als Bedsidetest) nimmt nur wenig Zeit in Anspruch. Für den Einsatz von SDF-Imaging als Screeningmethode sollte eine möglichst strukturierte Durchführung der Messungen angestrebt werden. Die Bildqualität ist am hochwertigsten beim schlafenden, im Bett liegenden Kind. Das Gerät ist zwar mobil, und somit auch für den Einsatz am Krankenbett geeignet. Dennoch beschleunigt ein fest installierter Messplatz die Untersuchung durch routiniertes Vorgehen. Die Handhabung von MicroScan ist schnell erlernbar und unkompliziert. Zum standardisierten Vorgehen ist dennoch eine gewisse Erfahrung im Umgang mit dem Messinstrument wünschenswert. Nach der Untersuchung von etwa 10 bis 30 Kindern ist ein Anwender schon sicher im Umgang mit MicroScan. In dieser Studie wurde z. B. nach einigen Tagen das Bettchen stets auf gleiche Weise platziert, das Gerät immer mit der linken Hand ruhig auf dem Ohr des Kindes gehalten und mit der rechten Hand das Bild scharf gestellt sowie die Aufnahme gestartet. Eine standardisierte Durchführung ist im Allgemeinen anzustreben, da auch die Untersuchungsdauer dadurch erheblich verkürzt werden kann.

Der Akku von MicroScan gewährleistet den Betrieb für etwa 12 Stunden¹¹⁶, was für den täglichen Gebrauch optimal ist. Das Gerät ist also für den klinischen Einsatz bereits in seiner derzeitigen Form gut geeignet.

Für den Screeningeinsatz sollten optimalerweise alle Kinder erfasst werden. Die Reduktion unnötiger Blutentnahmen ist ein wichtiges Ziel des SDF-Screenings. Die Neugeborenen sollten möglichst mehr als einmal am Tag gescreent werden, da sich Veränderungen der Mikrozirkulation auch kurzfristig ergeben können. Zudem könnten Untersuchungen bei klinisch auffälligen Kindern erfolgen, um den

eigenen Verdacht zu bestätigen oder zu verwerfen. Bei leicht erhöhten IL6 Werten ohne CrP Anstieg wäre zudem eine unterstützende Befundung durch das MicroScan möglich. Durch die Ausweitung der Anwendung durch Pflegekräfte zusätzlich zu ärztlichem Personal würde diese Art von Monitoring optimiert. Dies bedeutet im klinischen Alltag jedoch einen nicht unerheblichen Aufwand mit umfassender Einarbeitungszeit. Erst durch ein zunehmendes Maß an Erfahrung in der Befundung kann das Potential der SDF-Methode im Screeningbereich optimal ausgeschöpft werden. Kritisch betrachtet ist die klinische Beurteilung der Kinder an sich jedoch an ein ähnliches Maß an Erfahrung geknüpft, bei einem doch deutlich geringerem Aufwand.

Vorranging haben sich die Formen der Flowbeurteilung und die subjektive Gesamteinschätzung der Messung in unserer Studie bewährt. Es sollte angestrebt werden, diese Befundung online als Bedsidetest durchzuführen. Eine detaillierte Analyse aller hier aufgeführten Parameter mittels halbautomatischer Software (AVA) könnte bei erkrankten Kindern oder Neugeborenen mit schweren Krankheitsbild durchgeführt werden, insbesondere um das Outcome einzuschätzen. Hierzu gibt es in der Pädiatrie noch keine ausreichenden Daten, jedoch sind Untersuchungen mit Erwachsenen zum Outcome beschrieben^{58, 88}. Zwar ist nur eine semiquantitative und subjektive Befundung möglich, die laut unserer Untersuchungen jedoch nichtsdestotrotz ein gutes diagnostisches Potential zu haben scheint. Allgemein ist der Einsatz von SDF im klinischen Alltag als zukünftige additive Diagnostik zur Früherkennung bakterieller Infektionen ein neues Instrument mit vielen Vorteilen.

Aufgrund der nebenwirkungs- und belastungsfreien Anwendung am Säugling kann mit einer guten Akzeptanz bei den Eltern gerechnet werden. Diese war bereits in unserer Studie sehr groß und ist für einen etablierten Routineeinsatz in der Klinik als noch höher zu erwarten. Für den Einsatz als Screeningmethode ist die Messung an der Ohrmuschel optimal geeignet¹. Eine schnelle Untersuchung ohne Entkleiden des Kindes wird dadurch möglich.

4.4 Neugeboreneninfektionen

In der Literatur sind Infektionen des Neugeborenen mit einer Häufigkeit von 1,1-2,7 % beschrieben⁹⁰. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich ein Anteil von 26 % an Kindern mit erhöhten CrP-Werten. Behandlungsbedürftige Infektionen mit einem CrP > 2,0 mg/dl wurden bei 9 % der Probanden diagnostiziert. Dies spiegelt vor allem die hohe Anzahl der bei uns erhobenen Entzündungswerte wieder, jedoch nicht zwingend eine höhere Inzidenz neonataler Infektionen. In unserer Neugeborenenstation ist die frühe Erfassung der Entzündungswerte auch bei klinisch gering auffälligem Befund gängige Praxis.

Die mikrozirkulatorischen Messungen wurden zwischen dem 1. und 3. Lebenstag durchgeführt. Somit lag das Hauptaugenmerk auf early-onset Infektionen, da late-onset Septitiden erfahrungsgemäß erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten⁵² (vgl. Kap. 1.1.2, Seite 10).

Wir teilten die Gruppe der Kinder mit (formaler) CrP-Erhöhung über 0,5 mg/dl in zwei Gruppen ein „CrP 0,5-2,0 mg/dl“ und „CrP > 2,0 mg/dl“, entsprechend einer Aufteilung nach Schweregraden. Deshalb liegt der Prozentsatz der antibiotisch behandelten Kinder mit 48 % deutlich unter dem Gesamtanteil der Neugeborenen mit (gering) erhöhtem CrP. Dies liegt möglicherweise am physiologischen CrP-Anstieg des Neugeborenen. Wie bereits von Chiesa et al. beschrieben, weisen gesunde Neugeborene häufig einen moderaten CrP-Anstieg mit Maximum im Alter von 24 Lebensstunden auf²².

Der Anteil der antibiotisch behandelten Kinder (15 von 110) von 14% ist in unserem Kollektiv relativ hoch, was zum einen an der eher geringen Fallzahl liegen mag. Inwiefern dieser Anteil repräsentativ für die jeweilige Klinik ist, kann mit den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Zum anderen erfolgt in unserem Institut eine relativ frühe Indikationsstellung zur antibiotischen Therapie beim Vorliegen erhöhter Entzündungswerte mit auch nur moderatem klinisch auffälligem Befund, um einem rasanten Fortschreiten neonataler Infektionen frühzeitig entgegen zu wirken. Durch dieses Vorgehen erklärt sich auch die hohe Anzahl der erfassten CrP-Werte. So wurde bei 67 Kindern des Gesamtkollektivs der CrP-Wert erfasst. Die Messung der Entzündungswerte bei bereits geringem Verdacht auf eine Infektion ist auf unserer Station üblich, um eine möglichst frühe Therapie zu ermöglichen und ggf. den Verlauf besser beurteilen zu können. Durch diese Praxis ergeben sich zwar eine hohe Anzahl an CrP-Messungen und ein nicht unerheblich großer Anteil antibiotisch behandelter Kinder. Auf der anderen Seite werden durch dieses Vorgehen weniger schwere Infektionen bzw. septische Krankheitsbilder mit ggf. letalem Ausgang beobachtet. Zudem hat die Erfassung auch geringer CrP-Erhöhlungen den Vorteil einer umfassenden Evaluation der mikrozirkulatorischen Messungen. Interleukin 6 Werte spielten in dieser Studie eine untergeordnete Rolle, wenngleich ihr frühdiagnostischer Wert keinesfalls außer Acht gelassen werden sollte^{41, 52}. Zur Einteilung der Patientengruppen vgl. 3.1, Seite 49.

Bei nur einem Kind mit CrP > 2,0 mg/dl konnte eine Staphylokokkus ssp. in der Blutkultur nachgewiesen werden. Obwohl die Blutkultur nach wie vor als Goldstandard in der Infektionsdiagnostik gesehen wird, ist regelhaft in bis zu 80 % der Septikämien mit einem negativen Befund zu rechnen^{52, 66, 90}. Im Fachbereich der Neonatologie ist zudem in Betracht zu ziehen, dass den für Erwachsene entwickelten Blutkulturmedien nur verhältnismäßig geringe Blutmengen (<1 ml) beigefügt werden können. Deshalb kann hier nur mit einer diagnostischen Sensitivität von unter 40 % gerechnet werden⁴¹.

Als häufigster Prädiktor für Infektion erwies sich im Patientenkollektiv die klinische Auffälligkeit, die 69% der Kinder mit CrP>0,5 mg/dl zeigten. In der Literatur ist vielfach die hohe Sensitivität der klinischen Symptomatik beschrieben⁸⁵, welche erheblich von der Erfahrung des Pflegepersonals abhängig ist. Der Anteil der Neugeborenen mit grünem Fruchtwasser bei Geburt lag in der Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl viermal höher als in der Kontrollgruppe, was möglicherweise mit der Mekoniumaspiration assoziiert ist, welche als Risikofaktor für Infektionen gilt^{83, 90}. Die Dauer des Blasensprungs lag mit durchschnittlich 8,4 Stunden in der Gruppe mit CrP>2,0 mg/dl knapp über dem Mittel der Gesunden (7,3 Stunden). Auch wenn dieser Unterschied keine statistische Relevanz erreichte, ist die Tendenz konform mit der Beschreibung als häufiger Risikofaktor für Neugeboreneninfektion^{71, 91}. Kapitel 3.3.2 auf Seite 52 zeigt die Verteilung der Infektionsrisiken im Studienkollektiv.

Das Gestationsalter in der Gruppe mit CrP>0,5 mg/dl lag signifikant höher als das der Kontrollgruppe (40,5 versus 39,8 SSW). Das Risiko übertragener Kinder für Septikämien wird als erhöht beschrieben^{18, 77}. Wenngleich in dieser Studie Neugeborene mit einem Gestationsalter >42+0 SSW nicht eingeschlossen waren, ist die Differenz zwischen den beiden Gruppen möglicherweise als Tendenz für ein erhöhtes Risiko übertragener Kinder zu sehen. Dennoch stellen typischerweise niedriges Geburtsgewicht und Frühgeburtlichkeit Risiken für Neugeboreneninfektionen dar^{56, 83, 97}.

In der vorliegenden Untersuchungsreihe zeigt sich ein signifikanter Unterschied beim 1-Minuten Apgar zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit CrP>2,0 mg/dl. Obschon beim 5/10 Minuten Apgar kein weiterer Unterschied auffällt, ist dieses Ergebnis konform mit der Beschreibung, dass niedrige Apgarscores mit einem erhöhten Sepsisrisiko assoziiert sind⁵⁶. Klinische Daten der Studiengruppe sind in Tab. 9 auf Seite 50 zu finden.

In bisherigen Studien zur bakteriellen Sepsis des reifen Neugeborenen ist eine Prädominanz des männlichen Geschlechts zu beobachten⁸³. Im hier vorliegenden Patientenkollektiv ist das Geschlechterverhältnis nahezu ausgeglichen mit nur minimalem Überwiegen männlicher Kinder mit CrP>0,5 mg/dl bei 52 % (15 Jungen, 14 Mädchen). Möglicherweise kann aufgrund relativ geringer Fallzahlen und mäßiger Infektionsschwere keine eindeutige Tendenz festgemacht werden (siehe Tab. 9, Seite 50).

4.5 OPS und SDF-Imaging in der Neonatologie

Es gibt im Bereich mikrozirkulatorischer Forschung bisher wesentlich mehr Studien mit OPS. Beide Methoden können jedoch als gleichwertig angesehen werden, da SDF die weiterentwickelte Form von OPS-Imaging darstellt^{20, 102}. (Zur Beschreibung der Techniken siehe Kap. 1.2.5 auf Seite 9 und Kap. 2.5.1 auf Seite 39)

Für die Anwendung am Neugeborenen gibt es nur wenige Untersuchungen mit anderen Methoden zur Observation der Mikrozirkulation. Von Norman et al wurde die Nagelfalzkapillaroskopie beim Neugeborenen eingesetzt⁷⁵. Diese Technik ist jedoch durch die sehr kleine und weit peripher liegende Untersuchungsregion limitiert.

► Validierung der Technik

Orthogonal Polarisation Spectral Imaging wurde im Vergleich zur Fluoreszenz- Intravitalmikroskopie mehrfach validiert^{43, 111}. Beispiele hierfür sind Studien an der Rückenhautkammer des Hamsters^{39, 42}, der Rattenleber⁶² oder zur Tumorangio-genese am Hamster⁷⁸. Neben der Darstellung des Gefäßdurchmessers konnte die funktionelle Gefäßdichte mit beiden Techniken vergleichbar gut dargestellt werden³⁹. Auch die Gegenüberstellung von Messungen mit OPS-Imaging und der Nagelfalzkapillaroskopie am Menschen zeigte gleiche Werte bei besserer Bildqualität der OPS⁶⁹. Beim Vergleich der beiden Techniken OPS und SDF konnte mittels SDF eine Verbesserung durch schärfere Kapillardarstellung und Kontrastierung gezeigt werden, während sie gleiche quantitative Ergebnisse mikrozirkulatorischer Parameter lieferten¹³. Zur Beurteilung des Blutflusses (Quality of flow) weist die Anwendung von OPS eine geringe Inter- und Intraindividuelle Untersuchervariabilität auf^{16, 48}.

► OPS und SDF im klinischen Einsatz

Orthogonal Polarisation Spectral Imaging wird als einfach in vivo anwendbare, nicht-invasive Monitoringmaßnahme der Mikrozirkulation für den bedside-Einsatz beschrieben¹⁶. Der große Vorteil gegenüber der Intravitalmikroskopie ist der Verzicht auf Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch die Anwendung am Menschen erst möglich wird²⁰. Das für die Untersuchung dieser Arbeit verwendete Gerät MicroScan ist verhältnismäßig klein, mobil und geräuschlos. Verwendetes Kaltlicht verursacht keine Hautirritationen und kann nebenwirkungsfrei angewendet werden^{36, 61, 68}. Voraussetzung für die Darstellung der Mikrozirkulation ist die Anwendung an dünnen, unverhornten Epithelien^{48, 89, 102}. Bei Erwachsenen wurde OPS vor allem sublingual und auf Organoberflächen während chirurgischer Eingriffe verwendet^{6, 36}. So wurde beispielsweise die Untersuchung cerebraler Mikrozirkulation während neurochirurgischer Operationen am Menschen erstmals mittels OPS möglich¹⁰⁵. Die orthogonale Spektralbildgebung wurde ebenso wie das Sidestream Dark Field Imaging bereits in der Neonatologie erfolgreich angewandt^{2, 36, 46}. Beim Neugeborenen untersuchten erstmalig Genzel-Boroviczény und Mitarbeiter die Perfusion von Hautgefäßen³⁶. Bei ihren Messungen erwies sich OPS-Imaging für die noninvasive Beurteilung quantitativer Parameter der Mikrozirkulation beim Früh- und Neugeborenen als eine gut geeignete Methode^{36, 61}.

Der Einsatz von MicroScan war in der vorliegenden Studie analog zu deren Erfahrungen ebenso gut durchführbar. Wir erzielten eine adäquate Bildqualität bei kurzer Messdauer ohne Belastung für den Patienten. Durch die Noninvasivität konnte eine hohe Akzeptanz bei den Eltern der Probanden erreicht werden. Mittels eines Tropfens steriler Kochsalzlösung als Kontaktflüssigkeit wurde die Gefäßdarstellung wie auch in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zusätzlich verbessert³⁷.

► Messort, Lagerung und Vermeidung von Bewegungsartefakten

Wie beschrieben wurden beim Erwachsenen vielfach mikrozirkulatorische Veränderungen in der sublingualen Region beobachtet²⁸. Beim Neugeborenen ist dieser Bereich weder vergleichbar vaskularisiert noch gut zugänglich²⁷. Zudem würden Messungen durch den einsetzenden Saugreflex verfälscht oder nicht praktikabel. Alternativ bietet sich die transdermale Anwendung aufgrund der noch dünnen Haut des Neugeborenen an.

In unserer Studie hatten wir mit der Darstellung der Hautdurchblutung an der Ohrmuschel keine erheblichen Probleme. Während der Aufnahme sollte das Bild möglichst weder durch den Untersucher noch durch den Patienten verwackelt werden. Bei unruhigem Kind können sich Bewegungsartefakte aufgrund der starken Vergrößerung des Mikroskops ergeben. Es stellte sich heraus, dass im Bett liegende, schlafende Neugeborene am einfachsten zu untersuchen sind. Für die Messung am Ohr² muss das Kind nicht entkleidet werden; und so dauerte eine Messung nicht selten nur etwa drei Minuten. Von einer Belastung des Patienten durch Stress kann deshalb nicht ausgegangen werden. Aufgrund der Mobilität des Gerätes ist eine Messung auf dem Arm der Eltern zwar möglich, jedoch mit einem vermeidbaren Qualitätsverlust der Aufnahmen verbunden. Bewegungsartefakte durch die Atmung der Eltern spielen hier die größte Rolle.

Genzel-Boroviczény et al beobachteten die besten Aufnahmen mit OPS beim Frühgeborenen am inneren Oberarm³⁶. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Minderung von Bewegungsartefakten durch Atemexkursionen und ein geringes Ausmaß an Lanugobehaarung sowie die Vermeidung einer Irritation des Kindes durch die Applikation der grünen Lichtquelle, wie sie beispielsweise an der Stirn auftreten kann³⁶. Die Haut reifer Neugeborener ist dicker als die beim Frühgeborenen und zeigt bei der Messung häufiger Falten³⁶. In Zusammenhang damit konnte gezeigt werden, dass signifikante Veränderungen der Perfusion beim reifen Neugeborenen mit Infektion zwar an der Ohrmuschel, nicht aber am Oberarm darstellbar sind¹. Wie auch die hier vorliegende Studie bestätigt, kann als optimaler Messort für die Visualisierung der Mikrozirkulation mit OPS / SDF beim reifen Neugeborenen die Ohrmuschel gesehen werden¹. Zudem liegt diese weniger peripher als der Arm und spiegelt so möglicherweise die Situation des Kreislaufs in größerem Maße wider.

Im Gegensatz zur Untersuchung der Mikrozirkulation an der Rückenhautkammer des Hamsters⁴² ist es beim Menschen nicht möglich, exakt dieselbe Gefäßregion abermals zu untersuchen. Eine Markierung der erstmals untersuchten Stelle bzw. Gefäße ist nicht praktikierbar³⁶. Für die Untersuchung der Mikrozirkulation in Hinblick auf eine systemische Entzündungsreaktion ist diese Maßnahme jedoch auch nicht notwendig. Zudem stellt die Ohrmuschel des Neugeborenen eine begrenzte Region dar, sodass man bei wiederholter Anwendung davon ausgehen kann, nahezu dieselben Kapillarbetten zu untersuchen.

► Vermeidung von Druckartefakten

Durch zu starken Druck bei der Messung kann eine beeinträchtigte Perfusion vorgetäuscht werden, weshalb dieser unbedingt vermieden werden sollte^{26, 28, 48, 68}. Ein sicherer Umgang mit dem Videomikroskop ermöglicht eine druckartefaktarme Darstellung der Mikrozirkulation durch nur leichte Berührung der Messsonde mit der Haut¹⁴. Ein Tropfen steriler Kochsalzlösung als Kontaktflüssigkeit kann die Anwendung zusätzlich erleichtern³⁷. Durch die direkte Visualisierung des Gefäßbetts auf dem PC während der Messung kann der Untersucher Stellung und Druck des Gerätes unmittelbar regulieren und Artefakte ausgleichen. Eine explizit für die Handhabung mit MicroScan entwickelte Halterung wurde für die vorliegende Studie nicht verwendet, da auch bei händischer Anwendung qualitativ hochwertige Aufnahmen erzielt werden konnten⁶⁸.

► Funktionelle Gefäßdarstellung

Das Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert das grüne Licht und wird somit visualisiert. Die Gefäße sind also darstellbar, wenn sie Erythrozyten enthalten. Nicht sichtbar werden hingegen die Gefäßwände. Deshalb kann der tatsächliche Gefäßdurchmesser (Diameter) nicht angegeben werden^{28, 102}. Die Diameter im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie sind deshalb etwa 4 μm kleiner⁴³. Vorteil dieser Tatsache ist, dass sich ein funktionelles Bild ergibt. Nur perfundierte Gefäße werden erfasst und stellen somit ein indirektes Maß für die Sauerstoffversorgung des Gewebes dar^{6, 61}.

► Bildstabilisierung

Eine Verbesserung der SDF Technik durch einen Bildstabilisator (Image Acquisition Stabilizer; IAS) wurde kürzlich von Balestra et al vorgestellt und validiert⁸. Ein sterilisierbarer Metallring kann am Gerät angebracht werden und erzeugt einen leichten negativen Druck bei Applikation. Dies hat den Effekt, dass sowohl die axiale als auch die laterale Bildstabilität verbessert werden. Mikrozirkulatorische Parameter werden dadurch nicht beeinträchtigt. Zudem wird die Aufnahmedauer einer stabilen Sequenz deutlich verlängert⁸. Für den Einsatz des MicroScan in Kombination mit dem IAS am Früh- und Neugeborenen gibt es jedoch keine Daten. Somit bleibt fraglich, ob die Anwendung des negativen Drucks an der empfindlichen Haut dieser speziellen Patientengruppe bedenkenlos möglich ist. Bereits für das Vorgängermodell Cytoscan mit der OPS-Technik wurde eine ähnliche Vorrichtung zur Vermeidung von Druckartefakten und Stabilisierung entwickelt⁶⁵. Auch hier wurde die Anwendbarkeit am Frühgeborenen kritisch hinterfragt und deshalb auf deren Einsatz verzichtet¹¹¹.

Bewegungsartefakte durch Verwackeln bei Applikation der Lichtquelle können durch den geübten Umgang minimiert werden. Auch ein leichtes Aufstützen der messenden Hand schafft hier Abhilfe.

4.6 Auswertung

4.6.1 Sofortauswertung

In dieser Studie wurde erstmalig eine sofortige Befundung mikrozirkulatorischer Aufnahmen durchgeführt. Die Sofortauswertung kann direkt im Anschluss an die Messung durch wiederholtes Abspielen der Sequenz (mittels Windows Media Player) oder direkt online während der Untersuchung erfolgen. Hierfür ist der Einsatz eines Auswertungsprogramms nicht notwendig. Somit wird eine schnelle Gesamteinschätzung des untersuchten Gefäßbetts im Sinne eines Bedside-Tests möglich. Eine genaue Einteilung nach Gefäßgröße ist durch den Anwender selbst jedoch nicht realistisch. Bewertet wird nur nach einer Ordinalskala, also semiquantitativ und bleibt somit eine subjektive Einschätzung. Dennoch sollte nicht vergessen werden, dass jedes bildgebende Verfahren ein gewisses Maß an Subjektivität mit sich bringt, wie beispielsweise auch die Doppler Sonografie⁸². Zudem wird die Qualität der Befundung durch den Untersuchenden mit zunehmender Erfahrung entscheidend erhöht.

4.6.2 Analyse mit AVA

Die derzeit neueste Software zur Auswertung mikrozirkulatorischer Parameter von Aufnahmen mit dem Gerät MicroScan stellt das halbautomatische Automated Vascular Analysis- Programm (AVA 3.0) dar. Es ist die optimierte Form der früheren Software namens Microvision Analysis Software (MAS). Beide Programme sind zwar nicht explizit für den Einsatz am Früh- und Neugeborenen entwickelt, nichtsdestotrotz haben wir mit MAS bereits gute Erfahrungen in der Auswertung früherer Studien gemacht^{6, 15, 46}.

Zunächst wird die aufgerufene Sequenz stabilisiert, d. h. eventuelle Bewegungsartefakte werden verringert. Durch diesen Vorgang wird die spätere Auswertung erleichtert. Dennoch muss dafür bei einem Teil der Sequenzen eine Größenverkleinerung der Aufnahme mit Verlust peripherer Bildbezirke in Kauf genommen werden. Diese Problematik wurde ebenfalls bereits von De Backer et al kritisiert²⁸. Nach anschließender automatischer Erfassung von Gefäßen durch AVA und Korrektur durch den Anwender werden die mikrozirkulatorischen Parameter berechnet (beschrieben in Tab. 6, S. 47). Es können vom Programm fälschlich markierte Gefäße demarkiert oder nicht erkannte nachträglich gekennzeichnet werden. Bei guter Bildqualität ist nur wenig Intervention durch den Untersucher notwendig. Berechnet werden anschließend die funktionelle Gefäßdichte und die Durchmesser- und Durchmesserverteilung sowie die Gefäßoberfläche. Die Flussqualität wird vom Anwender bewertet und von der Software gemittelt. Die gesamte Auswertung dauert pro Sequenz etwa 15 Minuten und wird offline durchgeführt.

Aufgrund der schon physiologisch großen Variabilität, die das kapilläre Netz des Neugeborenen aufweist⁷⁹, wurde in dieser Studie auf die von De Backer et al empfohlene Bestimmung der vaskulären Heterogenität des Bildausschnitts²⁸ verzichtet. Auch die Flussgeschwindigkeit (RBC-Velocity³⁶) haben wir nicht explizit berechnet, da diese bereits mit dem Microvascular Flow Index evaluiert wird, der mit der Flussqualität indirekt die Geschwindigkeit angibt²⁸.

4.7 Kritik und Ausblick

Die Messung erfolgte in unserem Patientenkollektiv bei konsekutiv geborenen Neugeborenen einmalig zwischen der 6. und 64. Lebensstunde. Dies stellt eine relativ große Zeitspanne dar. Beim Vergleich des Lebensalters im Kollektiv sind die Kinder der Gruppe mit CrP > 2,0 mg/dl älter als die der anderen Gruppen, solche mit CrP 0,5-2,0 mg/dl zu jüngster Lebensstunde gemessen worden (vgl. Kap. 3.2, S. 49). Streng genommen ist die Vergleichbarkeit unserer Daten dadurch eingeschränkt, insbesondere durch einen häufig bestehenden physiologischen CrP-Anstieg am ersten Lebenstag²¹. Beachten sollte man dabei jedoch die ungleich verteilten Fallzahlen der jeweiligen Gruppen, die sich aus der konsekutiven Erhebung mit retrospektiver Auswertung ergeben haben. Bei insgesamt längerem Studienzeitraum und größerer Gesamtfallzahl hätten sich die Alterszeitpunkte bei Messung möglicherweise angeglichen. Wünschenswert wäre für folgende Studien eine Messung bei allen Probanden in möglichst exakt gleichem Lebensalter. Dennoch wurde in der vorliegenden Untersuchung die kritische Phase für early-onset Infektionen wie vorgesehen erfasst.

In unserer Studie kann keine Aussage über Infektionsverläufe mit schweren Folgen oder Exitus getroffen werden. Die rekrutierten Neugeborenen zeigten eine moderate Infektionsschwere und wurden nur einmalig untersucht. In unserem Kollektiv wiesen retrospektiv betrachtet alle Kinder bereits vor der Messung erhöhte CrP-Werte auf. Weitere Studien könnten eventuell den Messzeitpunkt schon zu einem noch früheren Zeitpunkt erwägen.

Unterschiedliche Erreger aktivieren verschiedene Signaltransduktionswege bei der Entstehung der Sepsis. Da in unserer Studie nur early-onset Neugeboreneninfektionen untersucht wurden, ist eher mit gramnegativem Erregerspektrum zu rechnen (vgl. Tab. 1, Seite 12). Eine spezifische mikrozirkulatorische Antwort durch gramnegative versus grampositive Bakterien ist möglich, aber hier nicht untersucht worden⁶³.

Nicht alle Parameter der mikrozirkulatorischen Messungen mit SDF sind objektivierbar und liefern absolute Parameter. Wie jede Art der Bildgebung ist somit auch die intravitale Mikroskopie eine zum Teil subjektive Methode und somit untersucherabhängig. Demnach können je nach Parameter schwer Normwerte ausgearbeitet werden. Hubble et al beschrieben zwar eine moderate intraindividuelle Variabilität sublingualer Mikrozirkulation beim Erwachsenen⁴⁸. Wichtig ist dennoch vor allem in der Neonatologie bei dieser Untersuchung der intraindividuelle Vergleich im Verlauf. Ratsam ist also eine wiederholte Messung am selben Patienten.

Kritisiert an der Anwendung von OPS und SDF wird vor allem die Problematik der Artefaktentstehung durch Bewegung und Druck. Ein zu starker Applikationsdruck kann den Blutfluss des untersuchten Gefäßbetts beeinträchtigen und fälschlich als insuffizient erscheinen lassen. Dieser ist jedoch zum größeren Teil vom Anwender ausgleichbar. Durch direkte Digitalisierung und Visualisierung auf dem PC noch während der Messung können Artefakte unmittelbar korrigiert oder minimiert werden. Die Qualität der Untersuchung ist somit noch während deren Durchführung transparent für den Anwender. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass der in unserer Studie festgestellte beschleunigte Blutfluss im Gegensatz zur zähen Flussqualität nicht untersucherindiziert auftreten kann. Ein hyperdynamer Flussindex ist also ein Stück weit objektiver. Auch Bewegungsartefakte wirken sich aufgrund der

Vergrößerung des Videomikroskops erheblich auf die Aufnahmequalität aus. Durch einen ruhigen Probanden und den geübten Umgang mit dem Gerät kann ein Verwackeln minimiert werden. Eine Form der Bildstabilisierung wäre von Vorteil, muss für den Einsatz am Früh- und Neugeborenen jedoch kritisch betrachtet werden.

Es wurde beschrieben, dass eine zeitraubende offline- Auswertung zur Erfassung mikrozirkulatorischer Parameter erforderlich ist³⁶. Für Werte wie die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßoberfläche und Gefäßdurchmesserverteilung ist die damit gemeinte halbautomatische Analyse notwendig, welche pro Sequenz mit der von uns verwendeten Software AVA 3.0 etwa 15 Minuten in Anspruch nimmt. Eine Gesamteinschätzung wie hier mit dem subjektiven Score, sowie die Bewertung des Flows können jedoch sogar noch online während laufender Untersuchung erfolgen. Erstrebenswert ist dennoch die Weiterentwicklung einer vollautomatischen Software, bei der keine Benutzereingriffe notwendig werden²⁸ und die eine objektivierbare und exaktere Bewertung der untersuchten Gefäße ermöglicht.

Ein weiterer Kritikpunkt ist die niedrige Sensitivität des Tests. Wiederholte Untersuchungen und ggf. die Kombination mit anderen diagnostischen Möglichkeiten kann zu einer Verbesserung der Sensitivität beitragen. Auch eine optimierte Messsituation wirkt sich positiv aus.

In unserer Studiengruppe wurden dunkelhäutige Kinder nicht mittels SDF-Imaging untersucht. Stark melaninhaltige Haut lässt die Darstellung der Mikrozirkulation nur sehr eingeschränkt zu. Zum einen reduziert Melanin das Ausmaß der Lichtreflektion. Zum anderen weist es zudem selbst ein charakteristisches Absorptionsspektrum auf, welches jedoch individuell variiert. Wir hatten beim Versuch der Messung mittels SDF beim dunkelhäutigen reifen Neugeborenen keine Erfolge bei der Gefäßdarstellung.

Insgesamt ist es hochwahrscheinlich, dass die mikrozirkulatorischen Veränderungen unserer Studiengruppe ursächlich durch den Zustand der Infektion bedingt sind. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Faktoren eine Rolle spielen, welche eventuell in unserer Studie nicht erhoben wurden. Zudem ist es nicht einfach, Zusammenhänge zwischen der Hautmikrozirkulation und der Innerer Organe einzuschätzen.

Aufgrund der allenfalls viel versprechenden Ergebnisse ist es anzustreben, weitere Studien größerer Patientenkollektive mit mehreren Untersuchungen pro Proband durchzuführen, um durch zahlreiche Daten die statistische Qualität zu erhöhen. Sowohl der intra- als auch ein interindividueller Vergleich würde durch eine größere Population verbessert.

5 Zusammenfassung

Neugeboreneninfektionen gehören aufgrund ihrer hohen Inzidenz nach wie vor zu den Hauptproblemen der Neonatologie. Die möglichen progredienten Verläufe und Folgeerkrankungen machen eine frühe Diagnostik und Therapie unumgänglich. Klinische Symptome sind nur unspezifisch oder können sogar fehlen. Bisher routinemäßig verwendete diagnostische Marker mangeln an der sicheren frühen Erfassung Erkrankter und weisen eine nicht unerhebliche Falsch-Positiv-Rate auf. Zudem sind notwendige Blutentnahmen eine Belastung für den Patienten.

Mikrozirkulatorische Dysfunktion spielt eine besonders große Rolle in der Pathogenese der Sepsis und des septischen Schocks und frühe Beeinträchtigungen des mikrozirkulatorischen Blutflusses sind mit geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert. Das Ausmaß mikrozirkulatorischer Schädigung ist nicht nur ein funktioneller Wert sondern auch ein prognostischer Parameter. Da zudem die Haut vor allem beim Neugeborenen eine Art Schockorgan darstellt, könnte eine Routineuntersuchung der Mikrozirkulation in dieser Region frühdiagnostischen Wert für Neugeboreneninfektionen haben.

Zum Monitoring der Hautdurchblutung wurde in unserer prospektiven Beobachtungsstudie Sidestream Dark Field Imaging (SDF) verwendet. Diese weiterentwickelte Technik der orthogonalen Spektralbildgebung (OPS) nutzt die Eigenschaft des Hämoglobins, polarisiertes Kaltlicht zu absorbieren und kann so mittels Epiillumination perfundierte Gefäße darstellen. Diese nicht invasive Methode benötigt keine Kontrastmittel und kann nebenwirkungsfrei angewandt werden. OPS und SDF wurden bereits erfolgreich in der Neonatologie eingesetzt. Unser Hauptaugenmerk lag auf der Evaluation der Technik als Screeningtest am reifen Neugeborenen.

Die Untersuchung kann auf sämtlichen mukosabedeckten Oberflächen angewandt werden, intraoperativ an inneren Organen, sowie in der sublingualen Region beim Erwachsenen. Wir führten die Messung an der vergleichbar dünnen Haut der Ohrmuschel der Neugeborenen durch, wie bereits in früheren Studien evaluiert wurde.

In einer prospektiven Beobachtungsstudie untersuchten wir 110 konsekutiv geborene reife Neugeborene einmalig zwischen 1. und 3. Lebenstag. Die Einteilung in Kontrollgruppe und Gruppe mit CrP-Erhöhung erfolgte retrospektiv. In der Kontrollgruppe wurden 81 Neugeborene mit einem CrP < 0,5 mg/dl bzw. ohne CrP- Bestimmung rekrutiert. Die Gruppe mit CrP > 0,5 mg/dl umfasste 29 Kinder mit (formaler) early onset Infektion und wurde unterteilt in die Untergruppen CrP 0,5-2,0 mg/dl und CrP > 2,0 mg/dl. Eine antibiotische Behandlung erhielten 15 Kinder des Gesamtkollektivs.

Die mikrozirkulatorischen Aufnahmen wurden direkt im Anschluss an die Aufzeichnung nach ihrer Flussqualität und nach dem Gesamteindruck (subjektiver Score) beurteilt. Nach der Rekrutierung aller Neugeborenen erfolgte die randomisierte geblindete Analyse mittels der Automated Vascular Analysis Software (AVA 3.0), welche neben der Erhebung des Microvascular Flow Index (MFI) auch die Erfassung der funktionellen Kapillardichte (Functional Vessel Density, FVD), Gefäßoberfläche (Vessel Surface) sowie der Gefäßdurchmesserverteilung (Diameter Distribution) beinhaltet.

Bei Einschätzung der Flussqualität in der Sofortauswertung zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit CrP > 2,0 mg/dl. In der anschließenden Analyse des Microvascular Flow Index waren signifikant schnellere, hyperdynamische Flussqualitäten in der Gruppe aller

Kinder mit CrP > 0,5 mg/dl zu verzeichnen. Je kleiner die Gefäße, umso deutlicher hat sich diese Beschleunigung des Flows dargestellt. Auch bei nur geringen CrP-Erhöhungen sind diese Auffälligkeiten bereits erkennbar. Insbesondere konnten wir eine sichere Identifikation der Kinder mit behandlungsbedürftiger Infektion zeigen. Vor allem bei der subjektiven Einschätzung des Gesamtbildes zeigten sich bei den erhobenen Scores hochsignifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Kindern mit CrP > 2,0 mg/dl. Dennoch sollte bedacht werden, dass für die sichere Beurteilung mit der SDF-Methode ein vergleichbar großes Maß an Erfahrung des Untersuchers erforderlich ist wie eine entsprechende klinische Expertise.

Anhand der unterschiedlichen Grautöne berechnet die Software automatisch den von Gefäßen bedeckten Anteil an der Gesamtfläche des Bildausschnitts (Vessel Surface). Beim Gruppenvergleich der Gesunden zu Neugeborenen mit erhöhtem CrP konnten wir signifikante Unterschiede der Vessel surface zeigen. Die gefäßbedeckte Fläche war in der Gruppe der Kinder mit CrP > 2,0 mg/dl kleiner als in der Kontrollgruppe. Hierbei steigt die statistische Relevanz mit der Schwere der Infektion, bzw. mit der Höhe des CrP-Wertes.

Die Verteilung der Gefäßdurchmesser zeigt in der Gruppe mit CrP > 0,5 mg/dl einen statistisch signifikant größeren Anteil sehr großer Gefäße (> 50 µm). Bei den anderen Gefäßgrößen konnten wir keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich feststellen.

Im Vergleich der Gruppe mit CrP > 2,0 mg/dl mit der Kontrollgruppe konnten in unserer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede der funktionellen Gefäßdichte gefunden werden. Neugeborene mit CrP > 2,0 mg/dl wiesen tendenziell geringere Werte auf, jedoch ohne signifikante Differenz. Ursache für die nur geringe Beeinträchtigung der FVD bei Infektion könnte die insgesamt moderate Infektionsschwere bzw. das frühe therapeutische Eingreifen sein.

Die detaillierte Auswertung der genannten Parameter ist laut unserer Ergebnisse für die schnelle Einschätzung der mikrozirkulatorischen Situation des Patienten im Sinne eines Screeningtests zunächst verzichtbar. Für den Einsatz zum Frühscreening bietet sich die online-Befundung als Bedsidetest der Flussqualität bzw. des Gesamtbildes des Kapillarnetzes an, welche eine hohe Testspezifität aufweisen. Zudem könnte in Zukunft die „Vessel surface“ ein wertvoller Parameter zur Erfassung des Status der Mikrozirkulation sein, da diese den offline am schnellsten und benutzerunabhängig bestimmbarsten Wert darstellt.

Der Einsatz von SDF-Imaging am Neugeborenen erwies sich als gut geeignet für die Darstellung der Mikrozirkulation. Für den Screeningeinsatz hat sich als optimale Messstelle die Ohrmuschel der Neugeborenen durchaus bestätigt. Diese Untersuchungsmethode kann als Bildgebung gesehen werden, deren Anwendung leicht erlernbar ist und deren diagnostischer Wert mit der Erfahrung des Untersuchers zunimmt. Die Tatsache, dass bisher keine definierten Absolut- und Normwerte existieren kann durch den geübten Umgang teilweise aufgewogen werden.

Die Problematik auftretender Druck- und Bewegungsartefakte erfordert jedoch eine geduldige und versierte Durchführung der Messung. Ein ruhiger Proband und die nur leichte Berührung des Mikroskops mit der Haut sind Voraussetzungen für hochwertige Aufnahmen. Sensitivität und Spezifität können durch den geübten Umgang ebenso noch erhöht werden. Die mikrozirkulatorische Untersuchung mittels SDF-Imaging gehört zudem zu den relativ kostengünstigen Methoden der Intravitalmikroskopie.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen das große Potential dieser Technik, Neugeboreneninfektionen früh zu diagnostizieren oder ggf. auszuschließen und somit die Anzahl eventuell unnötiger Blutentnahmen und antibiotischer Therapien zu vermindern. Anzustreben wäre der Einsatz als Diagnostikum bzw. Screeningtest im klinischen Routineeinsatz bei allen Neugeborenen. Um einen intraindividuellen Vergleich zu ermöglichen, ist die mehrmalige Untersuchung pro Patient sinnvoll.

Anlass für weitere Studien gibt die Tatsache, dass wir schon bei leichter Infektion i.S. von geringer CrP-Erhöhung Veränderungen der Flussqualität im Sinne eines schnellen Flusses zeigen konnten, sowie insbesondere eine gute Detektion behandlungsbedürftiger Infektionen. Das Augenmerk könnte in folgenden Studien eventuell mehr auf die Korrelation der mikrozirkulatorischen Dysfunktion mit der Schwere der Infektion gerichtet werden bzw. auf den intraindividuellen Vergleich der mikrozirkulatorischen Parameter. Nicht unproblematisch sind die einerseits frühe Erfassung geringgradiger Infektionen in den ersten Lebenstagen und der andererseits häufig zu beobachtende physiologische CrP-Anstieg mit Maximum im Alter von 24 Lebensstunden. Im klinischen Alltag ist jedoch ohnehin eine Zusammenschau jeglicher erhobener Parameter mit dem klinisch imponierenden Befund essentiell.

Zudem rückt das Vorliegen des beschleunigten mikrozirkulatorischen Blutflusses bei Infektion in den Vordergrund. Diese Flussqualität, welche durchaus pathophysiologische Relevanz infektiöser Geschehen zu haben scheint, wurde bei bisherigen Studien eher vernachlässigt.

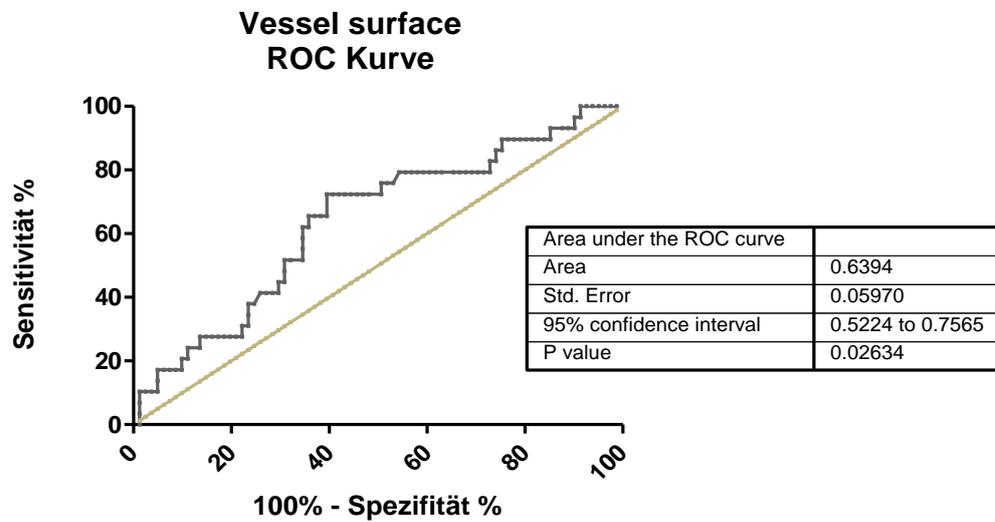
In Voraussicht auf weitere Untersuchungen mit der Sidestream Dark Field Imaging Methode dürfen wir weiteren Fortschritten für das Verständnis der Pathophysiologie mikrozirkulatorischer Dysfunktionen bei Infektionen entgegenblicken. Diese neue Methode birgt eventuell das Potential eines wertvollen frühdiagnostischen Instruments in der Neonatologie.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
AUC	Area under the ROC-Curve
AVA	Automated Vascular Analysis (Auswertungs-Software)
BE	Base Excess
CI	Konfidenzintervall
CONS	Koagulasenegative Staphylokokken
CrP	C-reaktives Protein
CTG	Cardiotokografie
Diam	Diameter (Gefäßdurchmesser)
EOS	Early Onset Sepsis
FCD	Functional Capillary Density (funktionelle Kapillardichte)
FSVD	Functional Small Vessel Density (entspricht der FCD und FVD)
FVD	Functional Vessel Density (funktionelle Gefäßdichte, entspricht FCD / FSVD)
GBS	Gruppe B Streptokokken (β -hämolisierend)
IAS	Image Acquisition Stabilizer (Bildstabilisator für SDF)
Ig	Immunglobulin z.B. Ig-G; Immunglobulin G
IL	Interleukin
IM	Intravitalmikroskopie
KFZ	Kapilläre Füllungszeit
LDF	Laser Doppler Fluxmetrie / Laser Doppler Flowmetrie
LDI	Laser Doppler Imaging
LED	Light Emitting Diodes (Leuchtdioden)
LOS	Late Onset Sepsis
MFI	Microvascular Flow Index (mikrozirkulatorische Flussqualität)
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom (Multiorganversagen)
NVC	Nailfold Videocapillaroscopy (Nagelfalz-Videokapillaroskopie)
OPS	Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (orthogonale Spektralbildgebung)
PCT	Procalcitonin
ROC	Receiver Operating Characteristic
SDF	Sidestream Dark Field Imaging
SER	Systemische Entzündungsreaktion
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom (entspricht SER)
ssp	Spezies
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VE	Vakuumextraktion

6.2 ROC-Analyse der Gefäßoberfläche



	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
< 25.33	48,28	29,45% to 67,47%	69,14	57,89% to 78,93%	1,56
< 25.38	51,72	32,53% to 70,55%	69,14	57,89% to 78,93%	1,68
< 25.41	51,72	32,53% to 70,55%	67,90	56,60% to 77,85%	1,61
< 25.44	51,72	32,53% to 70,55%	65,43	54,04% to 75,66%	1,50
< 25.48	55,17	35,69% to 73,55%	65,43	54,04% to 75,66%	1,60
< 25.51	58,62	38,94% to 76,48%	65,43	54,04% to 75,66%	1,70
< 25.54	62,07	42,26% to 79,31%	65,43	54,04% to 75,66%	1,80
< 25.59	62,07	42,26% to 79,31%	64,20	52,77% to 74,55%	1,73
< 25.64	65,52	45,67% to 82,06%	64,20	52,77% to 74,55%	1,83
< 25.67	65,52	45,67% to 82,06%	62,96	51,51% to 73,44%	1,77
< 25.71	65,52	45,67% to 82,06%	61,73	50,26% to 72,32%	1,71
< 25.81	65,52	45,67% to 82,06%	60,49	49,01% to 71,19%	1,66
< 25.90	72,41	52,76% to 87,27%	60,49	49,01% to 71,19%	1,83
< 25.93	72,41	52,76% to 87,27%	59,26	47,77% to 70,05%	1,78
< 25.94	72,41	52,76% to 87,27%	58,02	46,54% to 68,91%	1,73
< 25.98	72,41	52,76% to 87,27%	56,79	45,31% to 67,76%	1,68
< 26.04	72,41	52,76% to 87,27%	55,56	44,09% to 66,60%	1,63
< 26.14	72,41	52,76% to 87,27%	54,32	42,87% to 65,44%	1,59
< 26.25	72,41	52,76% to 87,27%	53,09	41,67% to 64,27%	1,54
< 26.29	72,41	52,76% to 87,27%	51,85	40,47% to 63,10%	1,50
< 26.33	72,41	52,76% to 87,27%	49,38	38,08% to 60,73%	1,43
< 26.36	75,86	56,46% to 89,70%	49,38	38,08% to 60,73%	1,50
< 26.38	75,86	56,46% to 89,70%	48,15	36,90% to 59,53%	1,46
< 26.42	75,86	56,46% to 89,70%	46,91	35,73% to 58,33%	1,43
< 26.51	79,31	60,28% to 92,01%	45,68	34,56% to 57,13%	1,46

Abb. 36 ROC-Analyse der Gefäßoberfläche

6.3 Gefäßoberfläche im Gruppenvergleich

	Kontrollgruppe (n=81)	CrP 0,5-2,0 mg/dl (n=19)	CrP >2,0 mg/dl (n=10)
Vessel surface (mm ² /mm ²)x100%	26 [26-27]	25 [24-27] *	24 [23-26] **

Tab. 15 Gruppenvergleich der Gefäßoberfläche

(Mittelwert, [95% CI]). Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert

*=p<0,05 Kontrollgruppe vs. CrP 0,5-2,0 mg/dl

**=p<0,005 Kontrollgruppe vs. CrP>2,0 mg/dl

6.4 Flussqualität im Gruppenvergleich

	CrP<0,5 mg/dl Kontrollgruppe n=81	CrP 0,5-2,0 mg/dl n=19	CrP>2,0 mg/dl n=10
MFI <3,0	2 2%	0 0%	1 10%
MFI = 3,0	55 68%	1 5%	1 10%
MFI > 3,0	24 30%	18 95%	8 80%

Tab. 16 Flussqualitäten im Gruppenvergleich

(0= No flow, 1=intermittend, 2= sluggish, 3= continuous, 4= hyperdynamic flow)

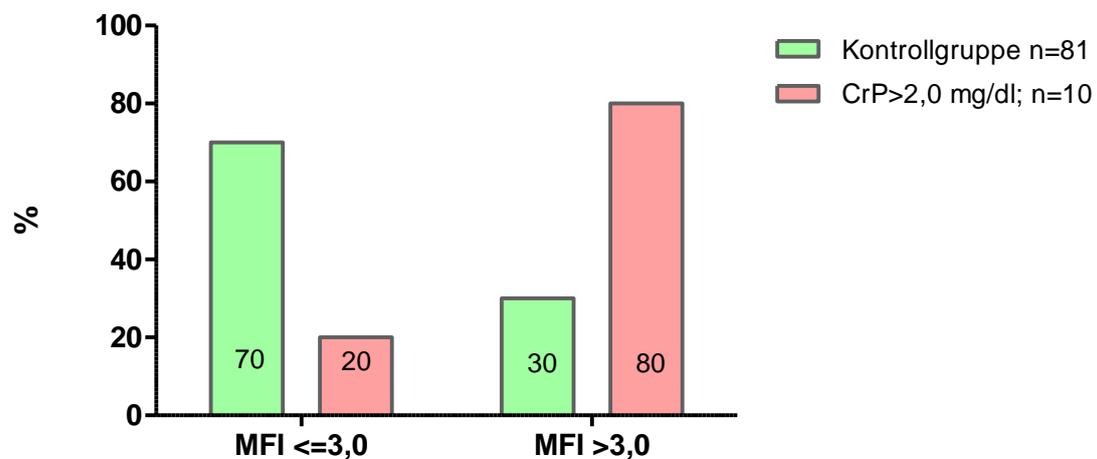


Abb. 37 Anteile an Microvascular Flow ≤3,0 und hyperdynamen MFI in der Kontrollgruppe und der Gruppe der Kinder mit CrP>2,0 mg/dl

6.5 Flussqualität nach Gefäßgrößen

		Kontrollgruppe (n=81)		CrP>0,5 mg/dl (n=29)
Microvascular Flow Index 0=no flow 1=intermittend 2=sluggish 3=continuous 4=hyperdynamic	Small <10 µm	3,1 [3,1-3,2]	****	3,4 [3,3-3,5]
	Medium 10-20 µm	3 [3,0-3,1]	****	3,2 [3,1-3,3]
	Large 20-50 µm	3 [3-3,1]	****	3,1 [3,0-3,1]

Tab. 17 Ergebnisse der Flussqualität in der AVA-Auswertung

(Mittelwert, [95% CI]); Signifikante Ergebnisse sind mit * markiert; ****=p<0,0001

Microvascular Flow Index (MFI)

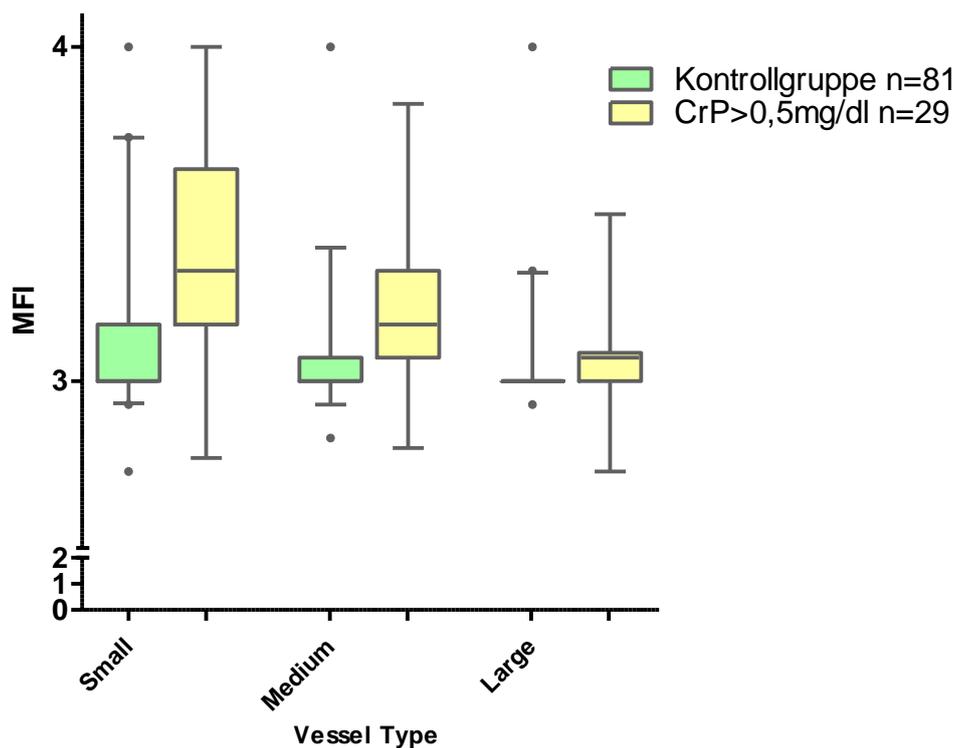
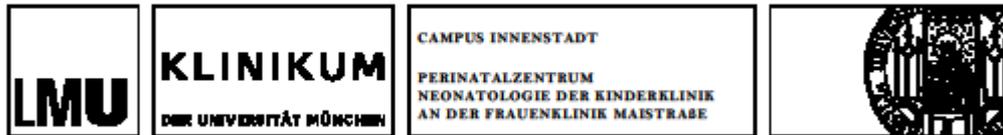


Abb. 38 MFI der AVA-Analyse nach Gefäßgröße differenziert

Gruppenunterschiede sind jeweils hochsignifikant mit p<0,0001, (Ausreißer als Punkte dargestellt);

(0= No flow, 1=intermittend, 2= sluggish, 3= continuous, 4= hyperdynamic flow)

6.6 Elterninformation und -einwilligung



Klinikum der Universität München - Klinik und Poliklinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe -
Neonatologie - Innenstadt - Maistrabe 11 - 80337 München

Prof. Dr. med. Orsolya Gessel-Borovicsfalvy
gessel@med.uni-muenchen.de

Telefon +49 (0)89 5160 - 45 55
Telefax +49 (0)89 5160 - 46 89

www.klinikum.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Maistrabe 11
D-80337 München

Ihr Zeichen

Unser Zeichen

München, 07.07.2011

Untersuchung der Mikrozirkulation bei Früh- und Neugeborenen

Liebe Eltern,

wir dürfen Ihnen ganz herzlich zu Ihrem Nachwuchs gratulieren.

Wie Sie bereits im Gespräch mit uns erfahren haben, führen wir derzeit Untersuchungen zur Hautdurchblutung bei Neugeborenen durch. Wir möchten Ihnen im Folgenden weitere Informationen zur Verfügung stellen, die Sie für die Entscheidung über eine Teilnahme Ihres Kindes an dieser Studie benötigen.

Methoden, Ablauf und Dauer der Teilnahme:

Wir legen Ihrem Baby einen kleinen Messfühler auf die Haut. In dem Messfühler befindet sich eine Lichtquelle, die normales Licht mit einer Wellenlänge von 660 nm aussendet und daher grün leuchtet. Die Lichtquelle ist so konzipiert, dass es zu keiner Erwärmung oder anderen Auswirkungen auf die Haut kommt. Das grüne Licht ermöglicht die Darstellung von Blutgefäßen direkt unter der Haut, indem das reflektierte Licht durch eine kleine Videokamera erfasst und in einem Computer analysiert wird. Dadurch kann die Hautdurchblutung beurteilt werden. In *Abbildung 1 und 2* sehen Sie unser Messgerät.

Die Messung ist für Ihr Kind schmerzlos, ohne Risiko und dauert ungefähr 10 min. Sie können selbstverständlich gerne bei der Untersuchung anwesend sein. Bei einer Nichtteilnahme an der Studie entstehen Ihnen und Ihrem Kind keinerlei Nachteile.

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik:
öffentl. Verkehr:

Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt (Kinderklinik) Prof. Dr. med. Klaus Friess (Frauenklinik)
Verkehrsweg: U1, U4, U4, U6, U7, U8, 16, 17, 18, 47, 91 o. 96 bis Haltestelle Sendlinger Tor
Verkehrsweg: U4, U6 oder 28 bis Haltestelle Goetheplatz



Abb. 1: Abbildung unseres Messgerätes



Abb. 2: Messung der Hautdurchblutung bei einem frühgeborenen Kind

Mit diesen Messungen möchten wir mehrere Fragestellungen bearbeiten:

1. **Reife Neugeborene:** Früherkennung von Infektionen
2. **Frühgeborene:**
 - a) Hautdurchblutung und Kreislauf in den ersten 3 Tagen nach Geburt.
 - b) Offener Ductus arteriosus ab dem 3. Lebenstag bis mindestens 7. Lebenstag
 - c) Hautdurchblutung vor und nach Transfusion

Datenschutz:

Nur die Ärzte der Studie haben im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt sind. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Weitergabe der Daten im In- und Ausland erfolgt zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken, und Ihr Kind wird darin nicht namentlich genannt. Die Daten werden zur Auswertung verschlüsselt (d.h. die Daten werden ohne Namensnennung mit einer Nummer versehen).

Durch die Studie wird die Behandlung Ihres Kindes nicht verändert oder beeinflusst.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und Sie können jederzeit die Teilnahme Ihres Kindes ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Behandlung, zurückziehen.

Falls Sie weitere Fragen zu dieser Studie haben, wenden Sie sich bitte an uns.

Wir danken Ihnen für Ihr Interesse und wünschen Ihnen und Ihrem Kind alles Gute!

Prof. Dr. med. O. Genzel-Boroviczény
Leiterin der Neonatologie des Perinatalzentrums des Klinikums Innenstadt -
Maistraße
Tel.: 089-5160-4535

Dr. med. Alexandra Schwepcke
Ärztin der Neonatologie der Frauenklinik - Maistraße
Alexandra.Schwepcke@med.uni-muenchen.de

Studiendurchführung: Dana Preußner
Doktorandin der Neonatologie der Frauenklinik Maistraße
dana.preusser@campus.lmu.de

Einwilligungserklärung

Name des Patienten
(in Druckbuchstaben):.....

Geb. Datum:-.....-.....

Patient Nr.:.....

Ich erkläre mich freiwillig bereit, dass mein Kind an der klinischen
Untersuchung mit dem Titel:

Untersuchung der Mikrozirkulation bei Früh- und Neugeborenen

teilnimmt.

- Ich bin durch den Arzt/ die Ärztin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über die Untersuchung und den Studienablauf sowie über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Untersuchung aufgeklärt worden.
- Ich habe darüber hinaus den Text des Informationsblattes für Eltern/Erziehungsberechtigte und diese Einwilligung gelesen und verstanden.
- Aufgetretene Fragen wurden mir vom Prüfarzt/ärztin verständlich und ausreichend beantwortet.
- Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.
- Ich habe das Recht, jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme meines Kindes an der Prüfung zurückzuziehen, ohne dass mir und meinem Kind daraus Nachteile entstehen.

- Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Untersuchung erhobene Daten meines Kindes anonymisiert (d.h. ohne Nennung des Namens) aufgezeichnet werden, zur wissenschaftlichen Auswertung der klinischen Prüfung und zur Verwendung für weitere mit der Prüfung dieser Untersuchungen im Zusammenhang stehende wissenschaftlichen Fragenstellungen weitergegeben werden, sowie zur Überprüfung an die zuständigen Überwachungsbehörden oder an die Ethikkommission übermittelt werden.

- Ferner erkläre ich mein Einverständnis, dass die Studienleitung und vorgenannte Fachleute und Beauftragte in personenbezogene Daten meines Kindes Einsicht nehmen. Dies dient einer vollständigen Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der klinischen Untersuchung. Beim Umgang mit personenbezogenen Daten werden die Grundsätze des Datenschutzrechtes beachtet.

Datum.....

Unterschrift des 1.
Sorgeberechtigten.....

Unterschrift des 2.
Sorgeberechtigten.....

Unterschrift des aufklärenden
Studienarztes.....

Abb. 39 Informationsblatt für Eltern und Einwilligungserklärung

7 Literaturverzeichnis

1. Alba-Alejandre I, Hiedl S, Genzel-Boroviczeny O. Microvascular flow is compromised early in neonatal infection. *J Vasc Res* 43:89. Abstract 2006
2. Alba-Alejandre I, Hiedl S, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculatory changes in term newborns with suspected infection: an observational prospective study. *Int J Pediatr* 2013:768784 2013
3. Anderson-Berry AL. Neonatal Sepsis. Medscape. <http://emedicine.medscape.com/article/978352-overview#showall>. 2010
4. Andreola B, Bressan S, Callegaro S, Liverani A, Plebani M, Da Dalt L. Procalcitonin and C-reactive protein as diagnostic markers of severe bacterial infections in febrile infants and children in the emergency department. *Pediatr Infect Dis J* 26:672-677 2007
5. Avery GB. Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn. Philadelphia, Pa. 1999
6. Awan ZA, Wester T, Kvernebo K. Human microvascular imaging: a review of skin and tongue videomicroscopy techniques and analysing variables. *Clin Physiol Funct I* 30:79-88 2010
7. Bagher P, Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiol (Oxf)* 202:271-284 2011
8. Balestra GM, Bezemer R, Boerma EC, Yong ZY, Sjauw KD, Engstrom AE, Koopmans M, Ince C. Improvement of sidestream dark field imaging with an image acquisition stabilizer. *BMC Med Imaging* 10:15 2010
9. Becker N. Screening from the epidemiological viewpoint. *Radiologe* 42:592-600 2002
10. Becker N. Screening from an epidemiologic perspective. *Radiologe* 48:10, 12-16 2008
11. Becker N, Junkermann H. Benefit and Risk of Mammography Screening. Considerations from an Epidemiological Viewpoint. *Dtsch Arztebl International* 105:131-136 2008
12. Bellomo R, Di Giandomasso D, May CN. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest* 124:1053-1059 2003
13. Bezemer R, Goedhart P, Khalilzada M, Ince C. Sidestream dark-field imaging versus orthogonal polarization spectroscopic imaging: a comparative study. *Critical Care* 12:P63. Abstract 2008
14. Bezemer R, Khalilzada M, Ince C. Recent Advancements in Microcirculatory Image Acquisition and Analysis. In: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Heidelberg. 2008
15. Bezemer R, Dobbe I, Holland W, Boerma C, Ince C. Rapid Automated Quantification of Microvascular Density in Sidestream Dark Field Images. *Intensive Care Med* 36:S153. Abstract 2010
16. Boerma EC, Mathura KR, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C. Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care* 9:R601-606 2005
17. Bonanno FG. Physiopathology of shock. *J Emerg Trauma Shock* 4:222-232 2011
18. Briscoe D, Nguyen H, Mencer M, Gautam N, Kalb DB. Management of pregnancy beyond 40 weeks' gestation. *Am Fam Physician* 71:1935-1941 2005

19. Celik İH, Demirel FG, Uras N, Oguz SS, Erdeve O, Biyikli Z, Dilmen U. What are the cut-off levels for IL-6 and CRP in neonatal sepsis? *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 24:407-412 2010
20. Černý V, Turek Z, Parazikova R. Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Physiol Res* 56:2007
21. Chiesa C, Signore F, Assumma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, Pacifico L. Serial Measurements of C-Reactive Protein and Interleukin-6 in the Immediate Postnatal Period: Reference Intervals and Analysis of Maternal and Perinatal Confounders. *Clinical Chemistry* 47:6:1016–1022 2001
22. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, Pacifico L. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem* 49:60-68 2003
23. Christ F, Athelougu M, Niklas M, Baschnegger H, Moser CM, Peter K, Messmer K. Time discrete, near infrared photoplethysmography (NIRP) for non-invasive investigation of the volume pulse in man. *European journal of medical research* 1:237-243 1996
24. Christ F, Genzel-Boroviczeny O, Schaudiga S, Niklas M, Schiessler C, Strötgen J, Eifert S, Reichenspurner H, Harris AG, Messmer K. Monitoring of the Microcirculation in Cardiac Surgery and Neonates Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Prog Appl Microcirc* 24:82-93 2000
25. Christ F, Bauer A, Brügger D. Different Optical Methods for Clinical Monitoring of the Microcirculation. *Eur Surg Res* 34:145-151 2002
26. De Backer D, Creteur J, Vincent J-L. Use of Orthogonal Polarization Spectral Imaging in Intensive Care. *Prog Appl Microcirc* 24:104-109 2000
27. De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:98-104 2002
28. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Buchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 11:R101 2007
29. De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, Favory R, Creteur J, Vincent J-L. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 36:1813-1825 2010
30. Diaconeasa A, Boda D, Neagu M, Constantin C, Caruntu C, Vladau L, Gutu D. The role of confocal microscopy in the dermatology practice. *J Med Life* 4:63-74 2011
31. Dobbe JGG. User Manual AVA 3.0. Amsterdam 2007
32. Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, Sibbald WJ, Gill R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *Am J Physiol-Heart C* 282:H156-H164 2002
33. Feigin RD, Cherry JD. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia, Pa. 2009
34. Fluhr JW, Darlenski R, Taieb A, Hachem JP, Baudouin C, Msika P, De Belilovsky C, Berardesca E. Functional skin adaptation in infancy - almost complete but not fully competent. *Exp Dermatol* 19:483-492 2010

35. Gale C. Is Capillary Refill Time a Useful Marker of Haemodynamic Status in Neonates? *Arch Dis Child* 95:395-U114 2010
36. Genzel-Boroviczeny O, Strötgen J, Harris AG, Messmer K, Christ F. Orthogonal Polarization Spectral Imaging (OPS): A Novel Method to Measure the Microcirculation in Term and Preterm Infants Transcutaneously. *Pediatric Research* 51:386-391 2002
37. Genzel-Boroviczeny O, Christ F, Glas V. Blood Transfusion Increases Functional Capillary Density in the Skin of Anemic Preterm Infants. *Pediatric Research* 56:751-755 2004
38. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine* 6:2-8 2005
39. Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG. Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation. *Nature Medicine* 5:1209-1213 1999
40. Guyton AC, Hall JE, Guyton H. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, Pa. 2000
41. Haque KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care Med* 6:S45-49 2005
42. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Quantitative Analysis of Orthogonal Polarization Spectral Images: Validation in the Hamster Dorsal Skinfold Chamber. *Prog Appl Microcirc* 24:21-31 2000
43. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. The Cytoscan (TM) model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: Comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res* 37:469-476 2000
44. Hatzistilianou M. Diagnostic and Prognostic Role of Procalcitonin in Infections. *TheScientificWorldJOURNAL* 10:1941–1946 2010
45. Herold G. *Innere Medizin Köln*. 2012
46. Hiedl S, Schwepcke A, Weber F, Genzel-Boroviczeny O. Microcirculation in Preterm Infants: Profound Effects of Patent Ductus Arteriosus. *The Journal of pediatrics* 156:191-196 2009
47. Huang T-C, Lin W-C, Wu C-C, Zhang G, Lin K-P. Experimental estimation of blood flow velocity through simulation of intravital microscopic imaging in micro-vessels by different image processing methods. *Microvascular Research* 80:477-483 2010
48. Hubble SMA, Kyte HL, Gooding K, Shore AC. Variability in sublingual microvessel density and flow measurements in healthy volunteers. *Microcirculation* 16:183-191 2009
49. Ince C. Sidestream dark field imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. *Critical Care* 9:S 29 2005
50. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care* 9:S13 2005
51. Jansen TC, van Bommel J, Schoonderbeek FJ, Sleswijk Visser SJ, van der Klooster JM, Lima AP, Willemsen SP, Bakker J. Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182:752-761 2010
52. Jorch G, Arenz S. *Neonatologie: die Medizin des Früh- und Reifgeborenen*. Stuttgart. 2010
53. Kemp AS, Campbell DE. The neonatal immune system. *Seminars in Neonatology*. 1996. 67-75

54. Khassawneh M, Hayajneh WA, Kofahi H, Khader Y, Amarin Z, Daoud A. Diagnostic markers for neonatal sepsis: Comparing C-reactive protein, interleukin-6 and immunoglobulin M. *Scand J Immunol* 65:171-175 2007
55. Klijn E, Moeksim K, Ince C, Bakker J, Van Bommel J. Hyperdynamic Microcirculatory Alterations in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *Intensive Care Med* 36:S242. Abstract 2010
56. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Reichman B, Lerner-Geva L, Network IN. Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low-birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol* 2012009
57. Koh IHJ, Liberatore AMA, Menchaca-Diaz JL, Ruiz-Silva M, Vilela-Oliveira L, Watanabe AY, Salomao R, Fagundes-Neto U, Silva RM. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:143-150 2006
58. Koh IHJ, Menchaca-Diaz JL, Koh TH, Souza RL, Shu CM, Rogerio VE, Liberatore AMA. Microcirculatory Evaluation in Sepsis: A Difficult Task. *Shock* 34:27-33 2010
59. Krediet TG, van den Hoogen A, Gerards LJ, Verboon-Macielek MA, Fleer A. Long-Term Trends in the Epidemiology of Neonatal Sepsis and Antibiotic Susceptibility of Causative Agents. *Neonatology* 97:22-28 2010
60. Kroth J, Weidlich K, Hiedl S, Bauer A, Christ F, Genzel-Boroviczeny O. Functional capillary density in the first month of life in preterm neonates. *Pediatric Research* 58:425. Abstract 2005
61. Kroth J, Weidlich K, Hiedl S, Nussbaum C, Christ F, Genzel-Boroviczeny O. Functional vessel density in the first month of life in preterm neonates. *Pediatric Research* 64:567-571 2008
62. Langer S, Dobschuetz Ev, Harris AG, Krombach F, Messmer K. Validation of the Orthogonal Polarization Spectral Imaging Technique on Solid Organs. *Prog Appl Microcirc* 24:32-46 2000
63. Legrand M, Klijn E, Payen D, Ince C. The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: does the pathogen matter? *J Mol Med (Berl)* 88:127-133 2010
64. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *Journal of Pathology* 190:373-386 2000
65. Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR. OPS Imaging of human microcirculation: A short technical report. *J Vasc Res* 39:368-372 2002
66. Long SS, Pickering LK, Prober CG. Principles and practice of pediatric infectious diseases. New York. 1997
67. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology* 117:104-111 2005
68. Mathura KR, Ince C. First Clinical Use of Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Prog Appl Microcirc* 24:94-101 2000
69. Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *J Appl Physiol* 91:74-78 2001
70. McWilliam S, Riordan A. How to use: C-reactive protein. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* 95:55-58 2010
71. Mercer BM, Goldenberg RL, Das AF, Thurnau GR, Bendon RW, Miodovnik M, Ramsey RD, Rabello YA. What we have learned regarding antibiotic therapy for the reduction of infant

- morbidity after preterm premature rupture of the membranes. *Seminars in Perinatology* 27:217-230 2003
72. Morrison AS Screening in chronic disease. *Monographs in epidemiology and biostatistics*. Oxford University Press, New York Oxford 1992
73. Nadeau RG, Groner W. The Role of a New Noninvasive Imaging Technology in the Diagnosis of Anemia. *The Journal of nutrition*:1610-1614 2001
74. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 15:244-249 1995
75. Norman M, Herin P, Fagrell B. An evaluation of skin capillary blood flow determinations in neonates using a computerized videophotometric method. *Microvascular Research* 43:276-284 1992
76. Oguz SS, Sipahi E, Dilmen U. C-reactive protein and interleukin-6 responses for differentiating fungal and bacterial aetiology in late-onset neonatal sepsis. *Mycoses* 54:212-216 2011
77. Olesen AW, Westergaard JG, Olsen J. Perinatal and maternal complications related to postterm delivery: A national register-based study, 1978-1993. *Am J Obstet Gynecol* 189:222-227 2003
78. Pahernik S, Harris A, Schmitt-Sody M, Krasnici S, Goetz A, Dellian M, Messmer K. Orthogonal polarisation spectral imaging as a new tool for the assessment of antivascular tumour treatment in vivo: a validation study. *British Journal of Cancer* 86:1622 – 1627 2002
79. Perera P, Kurban AK, Ryan TJ. The development of the cutaneous microvascular system in the newborn. *Br J Dermatol* 82 (suppl 5):86-91 1970
80. Pinsky MR. Septic Shock. *Medscape*. <http://emedicine.medscape.com/article/168402-overview#showall>. 2011.
81. Pourcyrus M, Korones SB, Crouse D, Bada HS. Interleukin-6, C-reactive protein, and abnormal cardiorespiratory responses to immunization in premature infants. *Pediatrics* 101:E3 1998
82. Rednic N, Tamas MM, Rednic S. Contrast-enhanced ultrasonography in inflammatory arthritis. *Med Ultrason* 13:220-227 2011
83. Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia, Pa. 2001
84. Rizvi M, Kumar S. Serum tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in pediatric patients with sepsis and its correlation with microbiologic findings. *Indian J Pathol Microbiol* 53:494-497 2010
85. Roos R. *Vorwiegend perinatal und postnatal erworbene Infektionen*. Bonn, pp 496-509. 2007
86. Roos R, Genzel-Boroviczeny O, Proquitté H. *Checkliste Neonatologie*. Stuttgart. 2010
87. Rutter N. The dermis. *Semin Neonatol* 5:297-302 2000
88. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:1825-1831 2004
89. Schießler C, Schaudig S, Harris AG, Christ F. Orthogonal polarization spectral imaging. *Der Anaesthesist* 51:576-579 2002
90. Scholz H, Belohradsky BH, Bialek R, Heininger U, Kreth HW, Roos R. *DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen; 5. Auflage*. 5. Stuttgart. 2009
91. Schuchat A, Schrag S, Phil D. Prevention of neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 32:601-615 2005

92. Schwepcke A, Hiedl S, Genzel-Boroviczeny O. Altered microcirculation in premature neonates with hemodynamically significant patent ductus arteriosus. *Acta Paediatr* 96:169. Abstract 2007
93. Website. Effects of a patent ductus arteriosus on the microcirculation in preterm infants. <Go to ISI>://000270557100045. 2009
94. Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation (New York)* 12:33-45 2005
95. Seidl T, Genzel-Boroviczeny O, Abicht J-M, Christ F. Does red blood cell transfusion change the near infra red photoplethysmography signal in infants? *Intensive Care Med* 30:2004
96. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Alzheimer C, Speckmann Hescheler K. Physiologie. München. 2008
97. 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 L-A, Poole WK. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110:285-291 2002
98. Strozik KS, Pieper CH, Cools F. Capillary refilling time in newborns--optimal pressing time, sites of testing and normal values. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 87:310-312 1998
99. Top AP, Tasker RC, Ince C. The microcirculation of the critically ill pediatric patient. *Crit Care* 15:213 2011
100. Top AP, van Dijk M, van Velzen JE, Ince C, Tibboel D. Functional capillary density decreases after the first week of life in term neonates. *Neonatology* 99:73-77 2011
101. Top APC, Ince C, de Meij N, van Dijk M, Tibboel D. Persistent low microcirculatory vessel density in nonsurvivors of sepsis in pediatric intensive care. *Crit Care Med* 39:8-13 2011
102. Treu CM, Lupi O, Bottino DA, Bouskela E. Sidestream dark field imaging: the evolution of real-time visualization of cutaneous microcirculation and its potential application in dermatology. *Arch Dermatol Res* 303:69-78 2011
103. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, Arnold RC, Colilla S, Zanotti S, Hollenberg SM. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med* 49:88-98, 98.e81-82 2007
104. Tsai AG, Johnson PC, Intaglietta M. Oxygen gradients in the microcirculation. *Physiol Rev* 83:933-963 2003
105. Uhl E, Lehmerberga J, Steiger H-J, Messmer K. Intraoperative Observation of Human Cerebral Microcirculation. *Prog Appl Microcirc* 24:72-81 2000
106. van den Hoogen A, Gerards LJ, Verboon-Macielek MA, Fleer A, eacute, Krediet TG. Long-Term Trends in the Epidemiology of Neonatal Sepsis and Antibiotic Susceptibility of Causative Agents. *Neonatology* 97:22-28 2010
107. Verdant C, De Backer D. How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside. *Curr Opin Crit Care* 11:240-244 2005
108. Verdant CL, De Backer D, Bruhn A, Clausi CM, Su FH, Wang Z, Rodriguez H, Pries AR, Vincent JL. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: A quantitative analysis. *Crit Care Med* 37:2875-2881 2009

109. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child* 90:F220-F224 2005
110. Vouloumanou EK, Plessa E, Karageorgopoulos DE, Mantadakis E, Falagas ME. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 37:747-762 2011
111. Weidlich K, Kroth J, Nussbaum C, Hiedl S, Bauer A, Christ F, Genzel-Boroviczeny O. Changes in Microcirculation as Early Markers for Infection in Preterm Infants—An Observational Prospective Study. *Pediatric Research* 66:2009
112. Xanthou M, Fotopoulos S, Mouchtouri A, Lipsou N, Zika I, Sarafidou J. Inflammatory mediators in perinatal asphyxia and infection. *Acta Paediatr* 91:92-97 2002
113. International society for optics and photonics. http://spie.org/Images/Graphics/Newsroom/Imported/31_260_0_2005-11-02/31_image2.jpg. Bellingham. November 2013.
114. WissenMediaVerlag. <http://www.wissen.de/medizin/kapillare?keyword=kapillarbett>. Gütersloh/München. November 2013.
115. Klinikum und Fachbereich Medizin J. W. Goethe-Universität Frankfurt a. M. <http://www.kgu.de/typo3temp/pics/3600a006d1.gif>. Frankfurt a.M. August 2011.
116. Microvisionmedical. <http://www.microvisionmedical.com/index.php/15-demo-content/roknewspager/23-the-microscan-instrument-the-microscan-instrument>. Amsterdam. November 2013.
117. University of Alabama Education. <http://education.ua.edu/faculty-staff/gary-j-hodges/>. Tuscaloosa. August 2011.

8 Danksagung

Herzlichen Dank möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény aussprechen, die mir schon im ersten Gespräch das richtige „Bauchgefühl“ gegeben hat, dass dieses Thema einfach „meins“ ist und mich persönlich zur experimentellen Arbeit motiviert hat. Vielen Dank für Ihre Unterstützung, Ihr Vertrauen, die konstruktive Kritik und Ermunterung zur Veröffentlichung dieser Daten.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Dr. med. Alexandra Puchwein-Schwepcke, die mich von Beginn an Schritt für Schritt geleitet und motiviert hat und mich durch die Zeit der Erstellung dieser Arbeit begleitet hat.

Großer Dank gebührt den Eltern meiner kleinen Probanden, die mir schnell ihr Vertrauen schenkten und ohne derer diese Arbeit niemals entstanden wäre. Des Weiteren danke ich den Schwestern der Neugeborenenstation Maistraße für ihre Geduld, ihr Interesse und ihren Einsatz, durch den so manche Aufnahme deutlich schneller durchgeführt werden konnte. Danke, dass ich in der Zeit der Messungen ein Teil Eures Teams sein durfte!

Ich danke aus tiefsten Herzen meiner Mama und meinem Papa, die zunehmend an mich geglaubt und mich unterstützt haben. Danke für eure Anerkennung; und dass ihr stets so verlässlich für mich da seid! Ein weiterer Dank gebührt auch meiner Schwester Sandy und ihrer Familie für so viele liebe Worte und Umarmungen!

Lieben Dank an Heidi. Unsere Begegnung in der ersten Studienwoche war wohl die wichtigste im Studium- bist du und John doch aus diesen Jahren nicht mehr wegzudenken. Ich danke dir für das gemeinsame Durchstehen, die unzähligen gemütlichen Abende und Unterstützungen in jeder Lebenslage. Du hast mich ermutigt, das erste Wort dieser Arbeit zu schreiben („nun fang halt einfach an, ich weiß gar nicht, was du hast...“)!

Danke an Rolf - Mille Grazie per *tutto*!

Außerdem danke ich allen guten Freunden, Bekannten und Kollegen, die mich begleitet haben und mir Akzeptanz und Verständnis entgegen gebracht haben. Ihr habt an mich geglaubt, das ein oder andere aufmunternde oder motivierende Wort am Rande gesprochen und mich häufig auch entbehren müssen.

Geh soweit das Auge reicht. Und wenn du dort bist, siehst du weiter.
(Unbekannt)

*Wir alle müssen daran arbeiten,
dass die Welt ihrer Kinder würdig wird.*

(Pablo Casals)

9 Eidesstattliche Versicherung

Preußner, Dana

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der Mikrozirkulation bei Neugeborenen als Möglichkeit zum Frühscreening von Infektionen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin