

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin (Department)  
Tübingen  
Abteilung IV  
(Schwerpunkte: Neonatologie, Neonatologische Intensivmedizin)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Ch. Poets

Die HLA-DR-Beladung von Monozyten bei Neu- und  
Frühgeborenen:  
Referenzwerte, Determinanten und diagnostische  
Wertigkeit bei der early-onset Infektion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Till Alexander Spreemann  
aus  
Reutlingen  
2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter:

Professor Dr. T. Orlikowsky

2. Berichtstatter:

Professor Dr. S. Stevanovic

*Für meine Mutter, †10.08.2008, und Emma Lou, \*02.10.2008  
die uns wieder das Lachen lehrte,  
für Judith, meinen Vater, Saskia und Sina.*

*„Ich möchte Leuchtturm sein  
in Nacht und Wind,  
für Dorsch und Stint  
und jedes Boot –  
und bin doch selbst:  
Ein Schiff in Not!“  
Wolfgang Borchert*

## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis .....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1.	Einleitung.....	1
1.1	Monozyten und ihre Funktion.....	1
1.2	Oberflächenrezeptoren der Monozyten.....	4
1.2.1	MHC-Moleküle.....	5
1.3	Monozyten, HLA-DR und Sepsis beim Erwachsenen .....	7
1.3.1	SIRS, CARS, MARS und Sepsis .....	7
1.4	Das Immunsystem in der Neonatalzeit .....	10
1.4.1	Neonatale Infektion .....	11
1.4.2	Laborchemische Diagnostik einer EOBI .....	13
1.4.2.1	Interleukin-8 .....	13
1.4.2.2	C-reaktives Protein .....	14
1.4.2.3	Leukozytenzahl.....	14
1.4.2.4	I/T-Quotient.....	15
1.4.3	Studien bei Neugeborenen.....	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	16
2.	Patienten, Material und Methoden.....	17
2.1	Patientenkollektive .....	17
2.1.1	Neugeborene .....	17
2.1.2	Gesunde Erwachsene .....	19
2.2	Verarbeitung der erhobenen Daten und Definitionen.....	19
2.2.1	Vorgehensweise.....	19
2.2.2	Definitionen .....	20
2.2.2.1	Early-onset neonatale bakterielle Infektion (EOBI) .....	20
2.3	Messverfahren .....	21

# I. Inhaltsverzeichnis

---

2.3.1 Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter (FACS®) .....	21
2.3.1.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	21
2.3.1.2 Messverfahren und Auswertung .....	23
2.3.1.2.1 Quantifizierung von HLA-DR auf Monozyten.....	23
2.3.1.2.2 Ex vivo-Stimulation .....	27
2.4 Statistische Auswertung.....	28
2.4.1 Referenzwerte der HLA-DR-Beladung peripherer Blutmonozyten ...	28
2.4.1.1 Modell .....	29
2.4.1.2 Referenzbereich .....	30
2.4.2 Sonstige Messungen.....	30
2.5 Tabellarische Auflistung der Materialien und Geräte .....	31
3. Ergebnisse .....	34
3.1 HLA-DR: Referenzwerte bei nicht infizierten Reifgeborenen .....	34
3.1.1 HLA-DR: nicht infizierte Reifgeborene vs. Erwachsene .....	34
3.1.2 Kinetik der HLA-DR-Beladung von Monozyten .....	35
3.1.3 Einflussfaktoren auf die HLA-DR-Beladung .....	39
a) Geschlecht .....	39
b) Geburtsgewicht.....	40
c) Geburtsmodus .....	41
3.1.4 Vergleich zu etablierten Infektionsparametern .....	42
a) HLA-DR versus CrP .....	42
b) HLA-DR versus Leukozytenzahl.....	43
c) HLA-DR versus I/T-Quotient.....	43
d) HLA-DR versus IL-8 .....	44
3.2 HLA-DR-Beladung bei reifen Neugeborenen mit EOBI.....	45
3.3 Kurzer Ausblick: Vergleich Reif- und Frühgeborene .....	47
3.4 Methodenkritischer Teil.....	48
3.4.1 Probenvolumen .....	48
3.4.2 Einfluss der Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Verarbeitung.	49
3.4.3 Ex vivo-Stimulationskinetik.....	49
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	50

## I. Inhaltsverzeichnis

---

4. Diskussion .....	52
4.1 Methodik .....	52
4.2 HLA-DR-Beladung unter ex vivo-Stimulation mit Zytokinen .....	54
4.3 Patientenkollektive .....	55
4.4 Lebensaltersabhängige Kinetik der HLA-DR-Beladung bei Neonaten ....	55
4.5 HLA-DR auf Monozyten im Rahmen einer EOBI .....	58
4.6 Schlussfolgerung .....	60
5. Zusammenfassung .....	63
III.    Literaturverzeichnis .....	VII
IV.    Abbildungsverzeichnis .....	XVIII
V.    Tabellenverzeichnis .....	XVIII
VI.    Danksagung .....	IXXVIII
VII.   Lebenslauf .....	XX

## II. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CARS	counter anti-inflammatory response syndrome
CD	cluster of differentiation
CrP	C-reaktives Protein
CV	Variationskoeffizient
Cy	Cyanin
d	Tage
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (A für engl. acetic acid = Essigsäure)
EOBI	early-onset bacterial infection
et al.	et alteri (lat. für "und andere")
etc.	et cetera
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystalline = kristallines Fragment eines Immunglobulins
FG	Frühgeborene
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoff(O <sub>2</sub> )-Fraktion
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	forward light scatter
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
G-mean	geometrischer Mittelwert
HLA	humanes Leukozytenantigen
I.E.	internationale Einheiten
IL1RA	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

IL1RII	Interleukin-1 Rezeptor II
i. S.	im Sinne
I/T-Quotient	immature/total-Quotient
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IMI	immature myeloid information
insb.	insbesondere
IP-10	interferon- $\gamma$ -inducible protein 10
kD	Kilodalton
l	Liter
log	Logarithmus
mAb/c	monoclonal antibodies / cell = gebundene Antikörper (in unserem Falle Anti-HLA-DR-PE-Antikörper) / Zelle
MARS	mixed antagonistic response syndrome
MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein
MIP-1-alpha	macrophage inflammatory protein 1-alpha
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
$\mu$ l	Mikroliter
NBI	neonatale bakterielle Infektion
NG	Neugeborene
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OKT3	monoklonaler Anti-CD3-Antikörper
PE	Phycoerythrin
Perc.	Percentile
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PRR	pattern recognition receptor
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient



## II. Abkürzungsverzeichnis

---

RANTES	regulated on activation, normal T expressed and secreted
resp.	respektive
RNI	reactive nitrogen intermediate (reaktive Stickstoffintermediate)
ROI	reactive oxygen intermediate (reaktive Sauerstoffintermediate)
RG	Reifgeborene
s.	siehe
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
sec.	Sekunde
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SSC	side light scatter
ssp.	Subspecies
SSW	Schwangerschaftswoche
sog.	sogenannte
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
u. a.	unter anderem
VB	Vollblut
VE	Vakuumentraktion
VLBWI	very low birth weight infants

## 1. Einleitung

### 1.1 Monozyten und ihre Funktion

Das Immunsystem wird in zwei Bestandteile gegliedert: das angeborene, unspezifische Immunsystem, welches u. a. durch das Komplementsystem, die Granulozyten sowie natürliche Killerzellen gebildet wird, daneben das spezifische Abwehrsystem mit B- und T-Lymphozyten, humoralen Antikörpern und Zytokinen.

Monozyten bilden eine Schnittstelle zwischen spezifischem und unspezifischem Immunsystem und gehören zu den ersten Immunzellen, die im Rahmen des Eindringens eines Erregers in den Körper aktiviert werden [45]. Diese Aktivierung von Makrophagen, also gewebständigen, ausdifferenzierten Monozyten, erfolgt u. a. durch Komplementspaltprodukte und mikrobielle Oberflächenstrukturen (s. auch Zusammenstellung in Tab. 1.1). Hierzu besitzen sie sogenannte PRRs (pattern recognition receptors) wie das CD14-Molekül, mit Hilfe derer sie eine Vielzahl von pathogenen (z. B. Endotoxin) und endogenen Strukturen (z. B. abgestorbene, apoptotische Zellen) erkennen [52].

<b>Makrophagenaktivierung:</b>	
immunologisch	IFN- $\gamma$ (aktivierte T-Zellen)
	TNF
	IL-3
	MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
	M-CSF
	GM-CSF
nicht immunologisch	Komplementspaltprodukte:
	C5a, C5adeArg (Chemotaxine)
	C3b, iC3b, C4b (Opsonine)
	Akute-Phase-Proteine:
	CRP, MLP (Mannose bindendes Lektin), Fibrin
	Fibronectin
	Rezeptorligation an:
	CD14 (Lipopolysaccharid (Endotoxin))
	TLR (Toll-like receptors)
	IL1-Rezeptor
	IL18-Rezeptor
	Mannoserezeptor
	FcRezeptor
CR (C-Typ Lektin-Rezeptoren)	
SR (Scavenger-Rezeptoren)	

**Tab. 1.1: Aktivierung von Makrophagen**

Nach Aktivierung produzieren die Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin-6, was wiederum die Bildung diverser Plasmaglykoproteine, den sogenannten Akute-Phase-Proteinen [32], in der Leber induziert. Dadurch sind Makrophagen mit verantwortlich für die im Rahmen von Entzündungsreaktionen typischen pathophysiologischen Veränderungen (Fieber, Proteolyse im Muskel, Lipolyse, Leukozytose und Lymphozytenaktivierung).

Neben der Zytokinsekretion erfolgt nach Aktivierung der Makrophagen die Phagozytose und intrazellulär das Abtöten von Bakterien. Diese werden „zerkleinert“ (processing), woraufhin über MHC Klasse II-Moleküle (HLA-DR, s. u.) die hieraus resultierenden Proteinfragmente der Krankheitserreger an der Zelloberfläche anderen Zellen präsentiert werden. So kommt es zur Aktivierung u. a. von T-Helferzellen, also Teilen des spezifischen Immunsystems.

Auch eine - bspw. IFN- $\gamma$  vermittelte - vermehrte Expression von CD80 und CD86 auf Makrophagen führt zur Aktivierung von T-Zellen. Sind diese Oberflächenmarker nur in geringer Anzahl vorhanden, wie es durch IL-10 induziert sein kann, so kommt es im Gegenzug zum vermehrten Abtöten aktivierter T-Zellen durch die Makrophagen selbst und damit einer Hemmung der Immunantwort [76].

Eine Zusammenstellung der verschiedenen Funktionen von Makrophagen ist der folgenden Übersicht zu entnehmen:

# 1. Einleitung

Funktion	Spezifikation
<b>Phagozytose</b>	Opsonierte Bakterien, Candida ssp., Aspergillus ssp., apoptotische Zellen
<b>Sauerstoffabhängiger Respiratory Burst</b>	Sekretion von zytotoxischen, freien Radikalen, Superoxiden, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . → Mikrobiozide und tumorizide Wirkung
<b>Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase</b>	Induzierbare NO-Sekretion → nitrogene Radikale → mikrobiozide und tumorizide Wirkung. Immunregulation, Vasodilatation, neuronale Kommunikation
<b>Tumorizide Funktion</b>	ADCC-vermittelte und komplementinduzierte Lyse Konjugatabhängige, antikörperunabhängige Lyse Bildung von Sauerstoffradikalen (ROI) / Stickstoffradikalen (RNI) (s. o.) Sekretion von TNF-α und zytotoxischen Enzymen
<b>Antigenpräsentation</b>	MHC Klasse II-Expression (HLA-DR), Antigenaufnahme und -präsentation
<b>Positive und negative Immunregulation</b>	T-Zell-Stimulation und -Kostimulation, -Aktivierung, -Anergie, -Deletion, Th1-/ Th2-Differenzierung
<b>Zytokinsekretion</b>	Pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ) Inhibitorische Zytokine (IL-4, IL-10, TGF-β) Anti-inflammatorische Effektoren (löslicher TNF-Rezeptor, IL-1RA, IL-1RII) Chemokine (SDF-1, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1-α, RANTES, Eotaxin)
<b>Interaktion mit anderen Systemen</b>	Induktion des FVII-Rezeptors (extrinsische Gerinnungskaskade) Arachidonsäuremetabolite des Cyclooxygenase- und Lipoxigenase-Stoffwechselweges (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene) Induktion von proteolytischen Enzymen und Inhibitoren

**Tab. 1.2: Zusammenstellung der Funktionen von Makrophagen**

Aufgrund dieser zentralen Rolle im Rahmen der Infektabwehr sind Monozyten auch im Blickpunkt des Interesses, wenn es um die verzögerte Immunantwort und erhöhte Infektanfälligkeit von Neugeborenen geht [50].

Es konnte nachgewiesen werden, dass die chemotaktischen, phagozytären und bakteriziden Funktionen neonataler Monozyten im Vergleich zu denen Erwachsener vermindert sind, ohne dass in allen Fällen die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt sind [78], [104], [21], [35].

Andererseits zeigten Hallwirth et al. bei einer Gruppe von 20 VLBWI (very low birth weight infants) mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 31 Schwangerschaftswochen, dass die Expression von CD64 sowie die phagozytäre Kompetenz von Monozyten deutlich höher waren als in einer vergleichbaren Gruppe von 25 Reifgeborenen, wohingegen die HLA-DR-Expression und damit die Fähigkeit zur Antigenpräsentation in dieser

Population vermindert war. Hieraus leiteten die Autoren ab, dass Monozyten auch abhängig vom Gestationsalter verschiedene funktionelle Eigenschaften aufweisen [41].

Orlikowsky et al. beschreiben des Weiteren, dass Monozyten von Neugeborenen sensibler auf äußere Eingriffe in das Wechselspiel der Immunzellen reagieren. So war bei Neugeborenen die Dexamethason-vermittelte Herabregulation der CD80/CD86-Expression deutlich ausgeprägter als bei Erwachsenen.

Dies zeigt, wie schwierig es ist, aufgrund der unterschiedlichen Ausgangslage einerseits und der gesteigerten Reagibilität andererseits im Neugeborenenalter therapeutisch auf dieses System Einfluss zu nehmen [77].

### **1.2 Oberflächenrezeptoren der Monozyten**

Monozyten zeichnen sich durch charakteristische Oberflächenproteine aus, anhand derer sich verschiedene Funktionszustände bestimmen lassen [55], [65]. Diese Oberflächenmoleküle sind in der so genannten CD-Nomenklatur klassifiziert, wobei CD für „cluster of differentiation“ steht.

Für Monozyten charakteristisch ist der CD14-Rezeptor, welcher Lipopolysaccharid binden und so zur Aktivierung der Monozyten führen kann. Zudem dient CD14 der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen [38], [16], [64].

Neben CD14 exprimieren Monozyten auch CD86 und nach Stimulation CD80, welche durch Bindung an CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen die Stimulation der CD4-positiven Th-Zellen durch die an MHC II (s. u.) präsentierten Antigene verstärken [88], [36], [91], [10], [43].

Monozyten gehören neben B-Lymphozyten und Dendritischen Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen und exprimieren hierzu HLA-DR, ein zu den MHC Klasse II-Molekülen zählendes Oberflächenprotein.

Aufgenommene und zu Peptiden fragmentierte Antigene werden an HLA-DR gebunden und so an der Zelloberfläche weiteren in die Immunantwort eingebundenen Zellen präsentiert. Die Expression von HLA-DR an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen unterliegt der Regulation immunmodulatorischer Transmitter, da sie ein äußerst potentes Mittel zur Induktion einer Immunantwort darstellt.

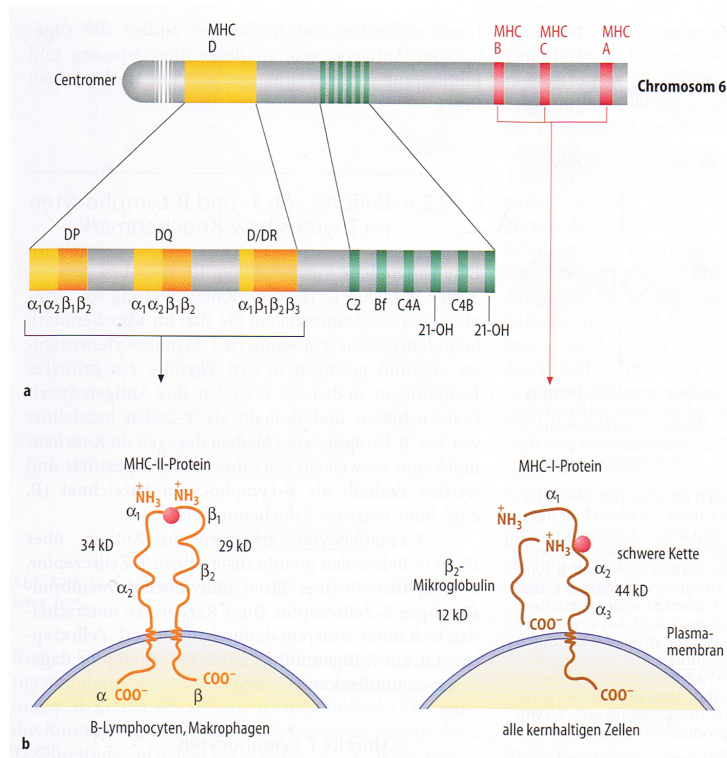
### 1.2.1 MHC-Moleküle

Ursprünglich bei Transplantationsexperimenten entdeckt und infolgedessen auch als Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC-Komplex) bezeichnet werden Peptidrezeptoren, welche besonders auf Lymphozyten vorkommen und daher auch humane Leukozytenantigene (HLA) genannt werden. Diese lassen sich in zwei Klassen unterteilen.

MHC Klasse I-Peptidrezeptoren finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, wohingegen MHC Klasse II-Peptidrezeptoren nur auf B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen, aktivierten T-Zellen und Langerhans-Zellen exprimiert werden.

Die für die Peptide des MHC-Komplexes codierenden Gene liegen auf Chromosom 6. Es existieren drei Hauptgene der Klasse I (MHC-A, -B, -C) sowie ein  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Gen auf Chromosom 15. Für die Klasse II stehen drei Genloci für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (MHC-DR, -DP und -DQ) zur Verfügung. Diese sind extrem polymorph, so dass die Zahl der verschiedenen MHC-Allele entsprechend hoch ist (bis zu 70 verschiedene Allele je Locus) und damit auch die immunologische Vielfalt der Menschen erklärbar wird.

# 1. Einleitung



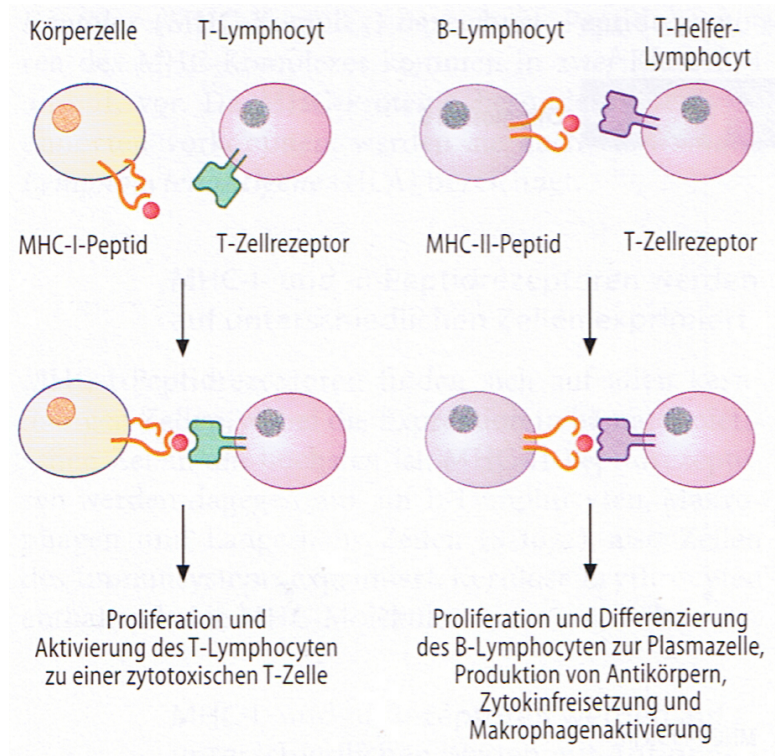
**Abb. 1.1:** **Aufbau des MHC-Komplexes und der MHC-Proteine**  
a Genloci auf Chromosom 6  
b Struktur der MHC-Rezeptormoleküle mit präsentiertem Peptid (rote Kugel) [82]

Das MHC I-Protein ist ein Membranprotein, welches aus einer  $\alpha$ -Kette besteht und für seine Funktion die Assoziation an das  $\beta_2$ -Mikroglobulin benötigt. Es präsentiert Peptidfragmente der intrazellulären Proteolyse im Proteasom. So präsentiert jede Zelle ihrer Umgebung Peptide, welche der Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremd oder entartet dienen: Im Falle einer viralen Infektion bspw., wenn das infektiöse Agens den zelleigenen Proteinbiosyntheseapparat in seinen Dienst stellt, werden körperfremde, virale Eiweißbausteine präsentiert, was die Identifikation und Eliminierung infizierter Zellen durch das Immunsystem ermöglicht.

Demgegenüber präsentiert das MHC II-Molekül in sauren Endosomen zu Peptiden gesplattene, fremde Antigene. Der MHC II-Peptidkomplex wird von einem spezifischen Rezeptor auf T-Zellen (sog. T-Zell-Rezeptor) erkannt und

## 1. Einleitung

gebunden, was wie oben erwähnt eine Aktivierung der T-Zellen zur Folge haben kann [82], [85], [58].



**Abb. 1.2: Interaktion zwischen TCR und MHC-Komplexen**

links: T-Zellen erkennen mit dem T-Zellrezeptor fremde Peptide, die über den MHC I-Komplex präsentiert werden.

rechts: ein B-Lymphocyt (als antigenpräsentierende Zelle analog zum Monozyten) präsentiert einer T-Zelle ein prozessiertes extrazelluläres Antigen [82]

### 1.3 Monozyten, HLA-DR und Sepsis beim Erwachsenen

#### 1.3.1 SIRS, CARS, MARS und Sepsis

Die unter 1.1 beschriebenen Fähigkeiten von Monozyten, pro-inflammatorische Zytokine auszuschütten und durch Aktivierung von T-Lymphocyten eine Immunantwort zu forcieren, unterliegen einer Autoregulation, um ein



Überschießen der Entzündungsantwort zu verhindern. Es existieren verschiedene Mechanismen der Gegenregulation [45]:

Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  induzieren die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 [95]. Zudem wirkt die Phagozytose von apoptotischen Zellen im Entzündungsgebiet hemmend auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [5]. Auch die im Gewebe entstehenden Immunkomplexe wirken hemmend auf phagozytierende Zellen.

Gelingt es nun dem Organismus im Rahmen einer lokalisierten Infektion nicht, das infektiöse Agens zu beseitigen, erreicht die Immunantwort die Stufe einer systemischen Entzündungsreaktion: der anhaltende Entzündungsreiz führt zu vermehrter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , G-CSF und IL-6, welche systemisch wirksame Konzentrationen erreichen und somit systemische Entzündungsreaktionen induzieren (Produktion von Akute-Phase-Proteinen, Fieber, katabole Stoffwechsellage). Diese Ausweitung spiegelt sich klinisch in der Manifestation eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) wider.

Die Definition des SIRS umfasst sowohl sterile Entzündungsreaktionen infolge massiver Gewebeschädigung als auch infektiös bedingte [45].

Ein infektiöses SIRS wird auch als Sepsis bezeichnet und ist – sofern es mit Schock und Multiorganversagen einhergeht – mit einer hohen Mortalität behaftet. Die durch den hyperinflammatorischen Zustand bedingte Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine führt dann zu systemischer Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität und Aktivierung des Gerinnungssystems mit konsekutivem Volumenmangel und Verbrauchskoagulopathie.

Diese Hyperinflammation induziert zugleich gegenregulatorisch eine systemische Anti- oder Hypoinflammation [51] nach oben erwähnten Prinzipien. Monozyten wechseln hierbei in ein anti-inflammatorisches Reaktionsmuster,

noch ehe sie das Gewebe als Makrophagen erreichen, da hohe Spiegel an TNF- $\alpha$  und Prostaglandinen das inhibitorische Zytokin IL-10 induzieren und die systemische Stressreaktion ebenfalls pro-inflammatorische Prozesse hemmt. Dies wird als CARS (Counter Anti-inflammatory Response Syndrome) oder auch Immunparalyse bezeichnet.

Klinisch sind diese beiden eigentlich kontradiktorischen Zustände häufig gleichzeitig nachweisbar i. S. eines MARS (Mixed Antagonistic Response Syndrome) [51].

Die Beladung der Monozyten mit HLA-DR, welche einer Regulation durch Zytokine unterliegt, wurde zum Zeitpunkt unserer Versuchsdurchführung bei erwachsenen Patienten im Rahmen einer Sepsis als Marker der „Immunologischen Fitness“ betrachtet [80]. Eine geringe Expression des Oberflächenmoleküls war Zeichen für ein Überwiegen der anti-inflammatorischen Zytokine i. S. der o. g. Immunparalyse [1], [3] und machte die Patienten therapieresistent für die Gabe von pro-inflammatorischen Stimuli [101]. Dieser Zustand war bei den erwachsenen Patienten assoziiert mit einem signifikant erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen und Multiorganversagen mit hoher Letalität [19]. Keiner der von Döcke et al. untersuchten Patienten im Stadium der systemischen Hypoinflammation nach Operation, Trauma oder Sepsis überlebte ohne einen messbaren Wiederanstieg der HLA-DR-Expression auf Monozyten i. S. einer Rekonvaleszenz der pro-inflammatorischen Funktion.

Neuere Studien schätzen den Vorhersagewert der HLA-DR-Beladung als eher gering bis nicht vorhanden ein [48, 81].

### 1.4 Das Immunsystem in der Neonatalzeit

Eine Schwangerschaft dauert 280 Tage bzw. 40 Wochen, wobei man bei Entbindung nach Ende der 37. SSW von einer Reif-, vor vollendeter 37. SSW von einer Frühgeburt spricht.

In der 11. SSW siedeln sich die Stammzellen der Lymphopoese im Knochenmark an, die Stammzellen der Myelopoese folgen in der 12. SSW. Die in die Blutbahn gelangten Lymphozyten differenzieren sich ebenfalls ab der 11. SSW im Thymus zu T-Lymphozyten, welche von dort wieder ins Blut ausgeschwemmt werden [22].

Obwohl das Immunsystem bereits so früh angelegt ist, findet sich wie unter 1.1 erwähnt zum Zeitpunkt der Geburt durch dessen Unreife bedingt noch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen [83].

So ist auf der Ebene der angeborenen, unspezifischen Abwehr (s. 1.1) die Aktivität des Komplementsystems im Vergleich zu Erwachsenen auf 50-80% reduziert und dessen Aktivierung beim Neugeborenen verlangsamt [27]. Zudem ist die Zahl der Granulozytenvorläuferzellen im Knochenmark Neugeborener vermindert und dadurch die Bildung funktionstüchtiger Granulozyten verlangsamt. Das hat zur Folge, dass im Falle eines Verbrauchs im Rahmen einer Infektion die Leukozytenzahl absinkt (Leukopenie) und die beim Erwachsenen beobachtete Leukozytose meist ausbleibt [13], [9], [89].

Die neutrophilen Granulozyten besitzen bei Neugeborenen eine verminderte chemotaktische Wirkung [54], [14], und deren Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu bilden, um phagozytierte Bakterien zu töten, ist unvollständig ausgebildet [94], [27], [83] [69] [68].

Andererseits verglichen Spittler et al. die Expression von toll-like Rezeptor 4 sowie die LPS-induzierte Zytokinsekretion als Zeichen der Funktionsfähigkeit von PRRs (s. o.) von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g

(very low birth weight infants) mit Neugeborenen, die nach der vollendeten 30. SSW auf die Welt gekommen waren, und gesunden Erwachsenen. TLR4-Expression und ex vivo-Sekretion auf LPS von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  waren im Vergleich zu Erwachsenen nur bei VLBWI vermindert.

Auch Anzahl und Aktivität der T-Lymphozyten sind bei Neugeborenen in einigen Tier- und in vitro-Modellen derjenigen von Erwachsenen ebenbürtig, allein das Verhältnis verschiedener T-Zell-Subtypen zueinander ist verschieden [72] [99]. B-Lymphozyten ihrerseits entwickeln jedoch erst in den ersten Lebenswochen die Fähigkeit, spezifische Antikörper zu bilden [83]. Außerdem weisen neonatale CD4- und CD8 positive T-Zellen signifikante Defizite in der Expression verschiedener Zellrezeptoren, der Zytokinsekretion sowie der Reaktion auf bestimmte Zytokine und andere Stimuli auf [62], [49], [25], [102], [99].

Demgegenüber stehen wiederum zu Erwachsenen äquivalente Serumkonzentrationen an spezifischen Immunglobulinen, welche pränatal diaplazentar von der Mutter auf den Feten übertragen werden und zum sogenannten Nestschutz oder auch Leihimmunität führen.

### **1.4.1 Neonatale Infektion**

Die neonatale bakterielle Infektion ist nach wie vor weltweit Hauptursache für Morbidität und Mortalität im Neugeborenenalter: bei einer neonatalen Gesamtsterblichkeit von 0,4 ‰ im Jahr 1994 in den USA zeichnete in 25 % eine neonatale Sepsis als Todesursache verantwortlich [98]. Die Inzidenz einer early-onset (s. u.) neonatalen bakteriellen Infektion lag 1995/96 bei 3,5 auf 1000 Lebendgeburten [92].

Unterschieden wird zwischen der sog. early-onset und der late-onset Infektion. Die Bezeichnungen beziehen sich auf das Alter des Neugeborenen bei Beginn der Symptome. Ursprünglich galt als Grenze die vollendete 1. Lebenswoche,

## 1. Einleitung

---

heutzutage orientiert sich die Terminologie an der peripartalen Pathogenese der Infektion: early-onset Infektionen entstehen vor oder unter der Geburt, bei postpartaler Ansteckung spricht man von late-onset.

Daher ist die early-onset Infektion (EOBI) inzwischen definiert durch Symptome innerhalb der ersten 72 Lebensstunden, die late-onset Sepsis bei Erkrankungsbeginn erst nach den ersten 3 Lebenstagen.

Im Rahmen dieser Arbeit galt das Augenmerk den ersten 72 Lebensstunden, weshalb wir uns im Folgenden auf Aussagen über die early-onset Infektion beschränken.

**Neonatal Infection by Age of Onset**

Characteristics	Early Onset	Late Onset
Age at onset	Birth to 7 days usually <72 h	7 to 30 days
Maternal obstetric complications	Common	Uncommon
Prematurity	Frequent	Varies
Organism source	Maternal genital tract	Maternal genital tract/ environment
Manifestation	Multisystem	Multisystem or focal
Site	Normal nursery, NICU, community	NICU, community

*NICU = neonatal intensive care unit.*

### **Tab. 1.3: Early-onset versus late-onset Infektion [6]**

Die Problematik neonataler Infektionen besteht u. a. darin, dass nur wenige Neugeborene spezifische Symptome zeigen. Die Diagnose lässt sich meist erst in Zusammenschau von klinischem Untersuchungsbefund, laborchemischen Entzündungsparametern und den Ergebnissen der Blutkultur stellen [34].

Als klinische Zeichen einer EOBI gelten Blässe, graues Hautkolorit, capillary refill > 2 Sekunden, Bradykardie, Apnoe, Tachypnoe > 60/min, Dyspnoe, muskuläre Hypo- oder Hypertonie, Hyperexzitabilitätssyndrom, Lethargie und Fieber [33], [24] (s. auch 2.2.2.1).

## 1.4.2 Laborchemische Diagnostik einer EOBI

Als in der Diagnostik der EOBI etablierte Parameter gelten IL-8, CrP, die Leukozytenzahl und der I/T-Quotient.

	IL-8 [pg/ml]	CrP [mg/dl]	Leukozytenzahl [/ $\mu$ l]	I/T-Quotient
Referenz für Neugeborene	$\leq 70$ [28]	$\leq 1,0$ [66]	16.200 – 31.500 [90]	$< 0,2$ [2]

**Tab. 1.4:** Referenzwerte der etablierten Infektparameter mit gültigem Referenzbereich im Neugeborenenalter.

### 1.4.2.1 Interleukin-8

Interleukin-8 ist ein aus 72 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches nach Stimulation durch Bakterienendotoxin (LPS) und Zytokine (IL-1 oder TNF- $\alpha$ ) von Monozyten und Endothelzellen produziert wird [4]. Es besitzt chemotaktische Wirkung auf T-Lymphozyten sowie eosinophile und basophile Granulozyten [61].

Erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-8 werden unter anderem bei an einer Sepsis erkrankten Patienten gefunden und spielen laut Hack eine mutmaßliche Rolle in der Pathogenese der Sepsis [40], [39], wobei eine positive Korrelation zwischen der gemessenen Konzentration und dem Schweregrad der Erkrankung besteht [30], [40].

Bei Neugeborenen mit einer neonatalen bakteriellen Infektion wurden im Vergleich zu Gesunden schon in den ersten Krankheitsstunden fünffach höhere Werte gemessen [63].

Da ein Großteil des IL-8 im Blut zellgebundenen an Erythrozyten und Leukozyten vorliegt [15], [46], [8], [31], hat sich die Messung in lysiertem Vollblut als präziser herausgestellt. Im Vergleich zur Messung im Plasma fanden sich um bis zu vierzigfach höhere Konzentrationen von IL-8 in lysiertem

Vollblut [61], so dass sich auf diese Weise auch geringere Konzentrationsänderungen erkennen lassen [84].

### **1.4.2.2 C-reaktives Protein**

Das C-reaktive Protein ist ein unter Stimulation durch TNF- $\alpha$  und IL-6 [39] von Hepatozyten gebildetes, 107,5 kD schweres Akute-Phase-Protein, welches aus 5 identischen Untereinheiten besteht [75].

Als Opsonin vermittelt es direkten Schutz gegenüber mikrobiellen Pathogenen [70]. Auch die gemessenen CrP-Spiegel im Rahmen einer neonatalen Sepsis sind erhöht, jedoch fand sich im Rahmen einer early-onset bacterial infection bei Neugeborenen kein Anstieg der Serumspiegel [20].

### **1.4.2.3 Leukozytenzahl**

Die weiße Blutzellreihe lässt sich unterteilen in polymorphkernige Leukozyten (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) und mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) [106]. Im Rahmen einer Entzündung kommt es zu einer vermehrten Ausschwemmung junger Leukozytenformen aus dem Pool des Knochenmarks (sog. Linksverschiebung), was eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl zur Folge hat.

Durch den fetalen Stress unter der Geburt finden sich bei Neugeborenen im Vergleich zu durch Sectio caesarea entbundenen Kindern in den ersten 12 Lebensstunden erhöhte Leukozytenzahlen [11], was den üblicherweise im Rahmen von Infektionen wertvollen Parameter der Leukozytose für die Diagnostik einer neonatalen bakteriellen Infektion unzureichend macht.

Andererseits ist wie oben erwähnt die Knochenmarkreserve Neugeborener gering, so dass im Falle eines peripheren Verbrauchs nicht adäquat Granulozyten mobilisiert werden können [13], [9], [89].

### 1.4.2.4 I/T-Quotient

Der I/T-Quotient (immature/total-Quotient) ist ein Maß für die unter 1.3.2.3 erwähnte Linksverschiebung, indem er das Verhältnis der unreifen bzw. jungen Granulozytenformen (stabkernige Granulozyten) zur Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten angibt.

Mehrere Studien zeigen eine altersabhängige Verteilung des Quotienten [60], [2], als cut-off für pathologische Werte wird ein Quotient von 0,20 betrachtet. Im Falle einer neonatalen Sepsis wird ein deutlicher Anstieg des I/T-Quotienten beschrieben [12], [86].

### 1.4.3 Studien bei Neugeborenen

Analog den bei Erwachsenen gefundenen und unter 1.3.1 beschriebenen Immunphänomenen zeigen Neugeborene, die an einer Sepsis erkranken, nach einer ersten Phase der Produktion von immunstimulatorischen, proinflammatorischen Transmittern (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , etc.) eine durch antiinflammatorische Substanzen (IL-10) vermittelte erniedrigte Expression von HLA-DR auf Monozyten, was sich als über das nötige Maß gesteigerte Inhibition des Immunsystems interpretieren lässt [18], [1]. Im Rahmen dieser Immunparalyse können die Neonaten nicht mehr effektiv gegen das infektiöse Agens ankämpfen.

Dieser Zustand erfordert daher Strategien der Immunstimulation von ärztlicher Seite und so ist es von entscheidender Bedeutung, den Aktivierungsgrad des Immunsystems überwachen zu können.

Hierzu sollte im Rahmen unserer Untersuchungen die quantitative Messung der HLA-DR-Beladung von Monozyten aus lysiertem Vollblut herangezogen werden, denn zwar wurde die Korrelation zwischen verminderter HLA-DR-Expression und schlechterem Outcome der Patienten beschrieben [1], jedoch wurde die HLA-DR-Beladung der peripheren Blutmonozyten in keiner der Studien quantifiziert.



Erst die Quantifizierung eines Parameters ermöglicht das Erstellen von Referenzwerten und damit die Festlegung eines cut-offs als Grenze zwischen gesund und pathologisch, was für den Einsatz im Klinikalltag unabdingbar ist.

Zudem werden durch eine Quantifizierung auch geringfügige Unterschiede zwischen den gemessenen Fluoreszenzintensitäten beurteilbar und damit für die Verlaufsbeobachtung nützlich.

Und nicht zuletzt für die Standardisierbarkeit der Untersuchungsergebnisse ist eine Quantifizierung notwendig.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Unsere Arbeitshypothese war, dass die Bestimmung der HLA-DR-Beladung von Monozyten aus Vollblut im Neugeborenenalter eine Einschätzung des Immunstatus erlaubt.

1. Es wurde beurteilt, ob die HLA-DR-Beladung auf Monozyten quantitativ verschieden war zu der von gesunden Erwachsenen.

2. Durch Stimulationskinetiken wurde der Einfluss von Interleukin-10 und Interferon- $\gamma$  auf die HLA-DR-Beladung von Monozyten quantitativ erfasst.

3. Anhand der Messung bei gesunden Neugeborenen mit pränatal bekannten Risikofaktoren aber ohne klinische Anzeichen einer Infektion, die im Rahmen der Klinikroutine einer Blutentnahme bedurften, wurden Referenzwerte für die ersten 72 Lebensstunden erstellt und perinatale Einflussgrößen bestimmt.

4. Durch den Vergleich der erstellten Referenzwerte mit Messungen bei an einer early-onset Sepsis erkrankten Neugeborenen wurde die diagnostische Wertigkeit der quantitativen HLA-DR-Messung auf Monozyten beurteilt.

## 2. Patienten, Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Reagenzien sind am Ende dieses Kapitels in Tabellenform aufgeführt.

### 2.1 Patientenkollektive

#### 2.1.1 Neugeborene

Im Rahmen der Studie wurden im Zeitraum von Februar 2002 bis August 2003 260 Neugeborene im Alter von 0 bis 4 Lebenstagen erfasst, welche nach ihrer Geburt auf einer der neonatologischen Stationen des Universitätsklinikums Tübingen aufgenommen worden waren. Ausgeschlossen waren Neugeborene mit angeborenen Fehlbildungen, chromosomalen Anomalien sowie neonataler Asphyxie.

Alle Kinder benötigten entweder routinebedingt oder im Rahmen der Diagnostik zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer eventuellen neonatalen bakteriellen Infektion Blutentnahmen. Das für die Messungen erforderliche Restblut betrug 25 µl Vollblut. Sämtliche Eltern waren mit der Untersuchung einverstanden; die Studie war von der Ethikkommission genehmigt (Votum vom 21.04.2002). Folgende anamnestische bzw. serologische Parameter wurden erhoben und anonymisiert ausgewertet:

Patienten- & Abnahmedaten	<ul style="list-style-type: none"><li>• Personalien</li><li>• Geschlecht</li><li>• Gestationsalter</li><li>• Geburtsgewicht (Perc.)</li><li>• Geburtsmodus</li><li>• Alter (Tage) zum Zeitpunkt der Blutentnahme</li><li>• Antibiotische Therapie (ja/nein)</li><li>• Zeitpunkt nach Beginn der Antibiose</li></ul>
---------------------------	---

Serologische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukozytenzahl</li> <li>• CrP-Konzentration im Serum</li> <li>• IL-8-Konzentration im Plasma</li> <li>• I/T-Quotient</li> <li>• IMI-Kanal</li> <li>• Ergebnis Blutkultur/Lumbalpunktion</li> <li>• Zielparameter: HLA-DR-Beladung</li> </ul>
------------------------	---

**Tab. 2.1: Erfasste Parameter**

Das erfasste Patientenkollektiv (260 NG) setzte sich zusammen aus 189 Neugeborenen (105 männlich), bei welchen klinisch und serologisch eine EOBI ausgeschlossen werden konnte. Unter diesen waren 158 Reifgeborene (Gestationsalter  $\geq 37+0$  SSW, 91 männlich), 24 Frühgeborene, welche mit einem Gestationsalter  $\geq 33+0$  jedoch  $\leq 36+6$  SSW zur Welt gekommen waren (9 männlich) sowie 7 Frühgeborene mit einem Gestationsalter  $\geq 29+0$  und  $\leq 32+6$  SSW (5 männlich).

Die Gruppe der an einer EOBI erkrankten Neugeborenen (71 NG, nur Messungen  $<72$  Lebensstunden) umfasste 47 Reifgeborene (30 männlich), 9 Frühgeborene mit einem Gestationsalter  $\geq 33+0$  und  $\leq 36+6$  SSW (6 männlich), 9 Frühgeborene mit einem Gestationsalter  $\geq 29+0$  und  $\leq 32+6$  SSW (5 männlich) sowie 6 Frühgeborene mit einem Gestationsalter  $\leq 28+6$  SSW (5 männlich). Keine der in der EOBI-Gruppe abgenommenen Blutkulturen war positiv.

261 Neugeborene im Alter von 0-4 Tagen			nicht infiziert	EOBI
n nach Gestationsalter:	<b>RG (&gt;37. SSW)</b>	206	158	47
	<b>FGI (33. - 37. SSW)</b>	33	24	9
	<b>FGII (29. - 33. SSW)</b>	16	7	9
	<b>FGIII (&lt;29. SSW)</b>	6	0	6

**Tab. 2.2: Patientenkollektive**

### 2.1.2 Gesunde Erwachsene

57 freiwilligen, gesunden, erwachsenen Probanden, welche ebenfalls der Untersuchung zustimmten, wurde Blut abgenommen und dieses analog den Blutproben der Neugeborenen innerhalb von 60 min nach Blutentnahme verarbeitet. Die Ergebnisse dieser Kontrollpopulation dienten dem Vergleich der bei Neugeborenen gemessenen Werte.

## 2.2 Verarbeitung der erhobenen Daten und Definitionen

### 2.2.1 Vorgehensweise

Mit Hilfe der bei nicht infizierten Reifgeborenen gemessenen HLA-DR-Beladung wurden Referenzwerte erstellt. Folgende Einflussgrößen wurden untersucht:

- Lebensalter
- Geschlecht
- Geburtsgewicht
- Geburtsmodus

Anhand der bei Frühgeborenen gewonnen Daten wurde als weitere Einflussgröße auf die HLA-DR-Beladung untersucht:

- Gestationsalter

Die Messergebnisse der EOBI-Gruppe wurden mit den erstellten Referenzwerten verglichen und mit den in der Routinediagnostik erfassten serologischen Parametern (s. Tab. 2.1) verglichen.

## 2.2.2 Definitionen

### 2.2.2.1 Early-onset neonatale bakterielle Infektion (EOBI)

Das Vorliegen einer EOBI wurde definiert durch das Auftreten eines oder mehrerer klinischer Zeichen innerhalb der ersten 72 Lebensstunden, die eine bakterielle Infektion wahrscheinlich machen (Tabelle 2.3), in Kombination mit entweder einer positiven Blut- oder Liquorkultur oder zusätzlich zur Klinik bestehender CrP-Erhöhung auf >1 mg/dl im Zeitraum von 12 - 60 h nach Infektionsverdacht [28].

Klinische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blässe</li> <li>• Graues Hautkolorit/Munddreieck</li> <li>• Schlechte Perfusion (capillary refill &gt; 2 sec.)</li> <li>• Bradykardie und/oder Apnoe</li> <li>• Tachypnoe (&gt;60/min)</li> <li>• Dyspnoe (Stöhnen, Nasenflügeln, Einziehungen)</li> <li>• Ansteigender FiO<sub>2</sub> bei initial stabilen Neugeborenen</li> <li>• Respiratorische Insuffizienz</li> <li>• Muskuläre Hypotonie/Hypertonie</li> <li>• Hyperexzitabilität</li> <li>• Irritabilität</li> <li>• Lethargie</li> <li>• Fieber &gt; 38,5 °C rektal</li> </ul>
Serologische Parameter	IL-8 > 60 pg/ml CrP > 1 mg/dl (12-60 h nach Infektionsverdacht) Positive Blutkultur/Liquorkultur I/T-Quotient > 0,2

**Tab. 2.3: Zuteilungskriterien**

### 2.3 Messverfahren

#### 2.3.1 Fluoreszenz-Aktivierter-Zell-Sorter (FACS®)

##### 2.3.1.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Im Fluoreszenz-Aktivierten-Zell-Sorter oder Durchflusszytometer (FACSScan, Becton Dickinson, Heidelberg) können eine große Anzahl Zellen aus einer Suspension einzeln untersucht werden. Diese passieren hierzu den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488 nm. Anhand ihrer Durchlässigkeit (Vorwärtsstreuung (FSC, „Forward Light Scatter“)) für das Laserlicht, welches mit Hilfe eines Photodetektors aufgefangen wird, lässt sich die Zellgröße ermitteln. Die ebenfalls mit einem Photodetektor bestimmte Streuung des Laserlichts (Seitwärtsstreuung (SSC, „Side Light Scatter“)) ermöglicht die Beurteilung der Homogenität des Zytoplasmas.

Drei weitere Messkanäle (FL1:  $\lambda = 525$  nm, FL2:  $\lambda = 575$  nm, FL3:  $\lambda = 660$ - $675$  nm) ermöglichen das Aufzeichnen von Licht verschiedener Wellenlängen und damit die Messung der Expression von Oberflächenmolekülen, an welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper gebunden haben.

Da hierbei die Intensität des von den Fluochromen emittierten Lichtes proportional zur Höhe der Antigenexpression ist, lässt sich die Antigenexpression durch Vergleich mit Partikeln bekannter Antigenbeladung, sog. Beads, quantifizieren.

Für die 3 Messkanäle werden Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsmaxima verwendet:

FL1	FITC = Fluorescein-Isothiocyanat
FL2	PE = Phycoerythrin
FL3	PerCP = Peridin-Chlorophyll-Protein

**Tab. 2.4: Farbstoffe**

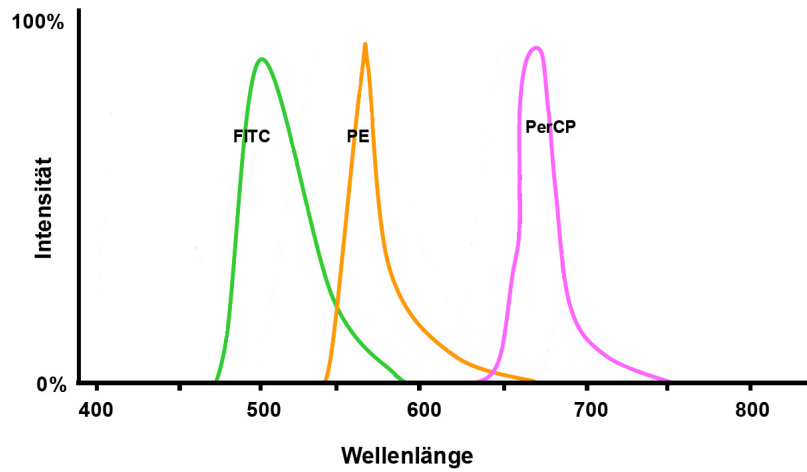


Abb. 2.1: Emissionsspektrum der verwendeten Fluochrome

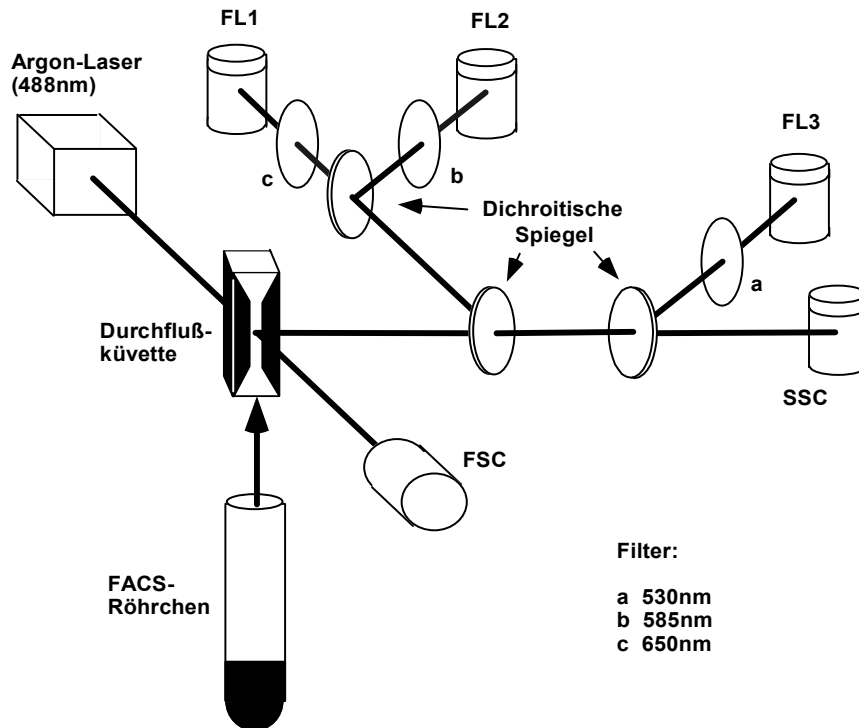


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

### 2.3.1.2 Messverfahren und Auswertung

Alle Messungen wurden mit einem FACSScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt und mit Hilfe der Software CellQuest ausgewertet.

Die Versuche zur Quantifizierung der HLA-DR-Beladung auf Monozyten wurden mit QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 in Verbindung mit QuantiBRITE PE beads (beides Firma Becton Dickinson, Heidelberg) zur Kalibrierung des Durchflusszytometers durchgeführt.

#### 2.3.1.2.1 Quantifizierung von HLA-DR auf Monozyten

Die im Kombinationsfarbstoff QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 der Firma Becton Dickinson enthaltenen PE markierten Anti-HLA-DR-Antikörper bilden mit den Antigenstrukturen auf der Monozytenoberfläche 1:1-Konjugate und zeigen nur geringe unspezifische Bindung.

Mit Hilfe der Anti-Monozyten PerCP-Cy5.5 wird die Monozytenpopulation markiert, wozu 3 Eigenschaften des Farbstoffes genutzt werden:

1. Die Anti-CD14-Antikörper binden an das 55 kD große Oberflächenmolekül CD14, welches den Großteil der Monozytenpopulation identifiziert.
2. Der Cyaninfarbstoff bindet an CD64 und gewährleistet so, dass auch Monozyten mit nur geringer CD14-Expression detektiert werden können.
3. Das Emissionsspektrum des PerCP-Farbstoffs zeigt keine wesentliche Überstrahlung in die PE-Fluoreszenz, d.h. den anhand der Fluoreszenzintensität quantifizierten Parameter (s. auch Abb. 2.1).

Da mit Hilfe dieses Kombinationsfarbstoffes die Monozytenpopulation in Vollblut markiert werden kann, ist keine Zellseparation nötig, eine EDTA-Vollblutprobe wird lediglich nach Färbung mit dem Assay lysiert, ehe die durchflusszytometrische Messung erfolgt (Abb. 2.4 und 2.5).

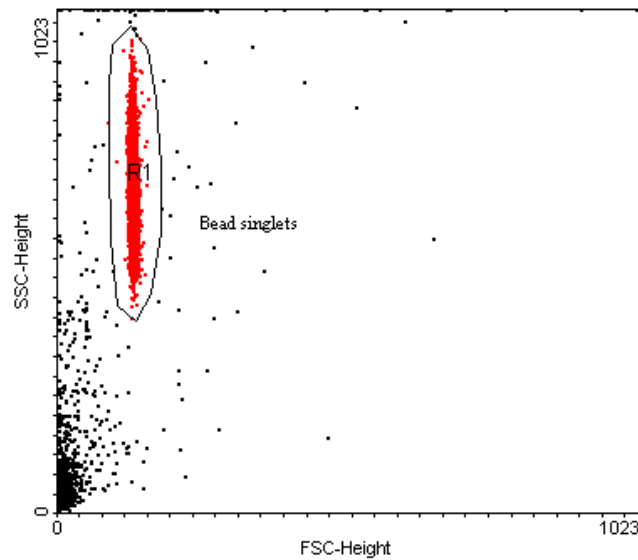


## 2. Material und Methoden

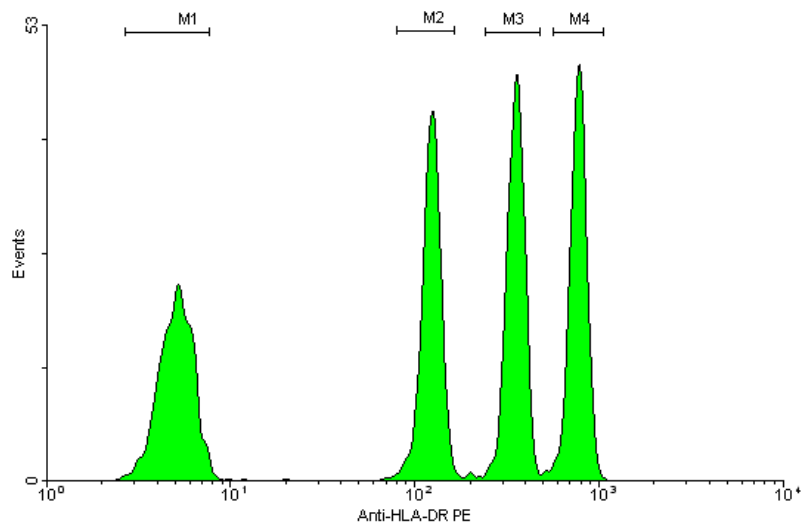
---

Um aus der zunächst qualitativen Intensität der Fluoreszenz eine quantitative Aussage machen zu können, wird mit Beads einer definierten Beladung mit PE-Molekülen eine Eichgerade erstellt, anhand derer die CellQuest-Software in der Lage ist, die lineare Regression für die Phycoerythrin-Werte zu errechnen. Damit wird eine Quantifizierung der medianen monozytären HLA-DR-Antikörperbindung möglich mit dem Ergebnis „pro Zelle gebundene PE-Antikörper“ (Abb. 2.3).

(a)



(b)



## 2. Material und Methoden

---

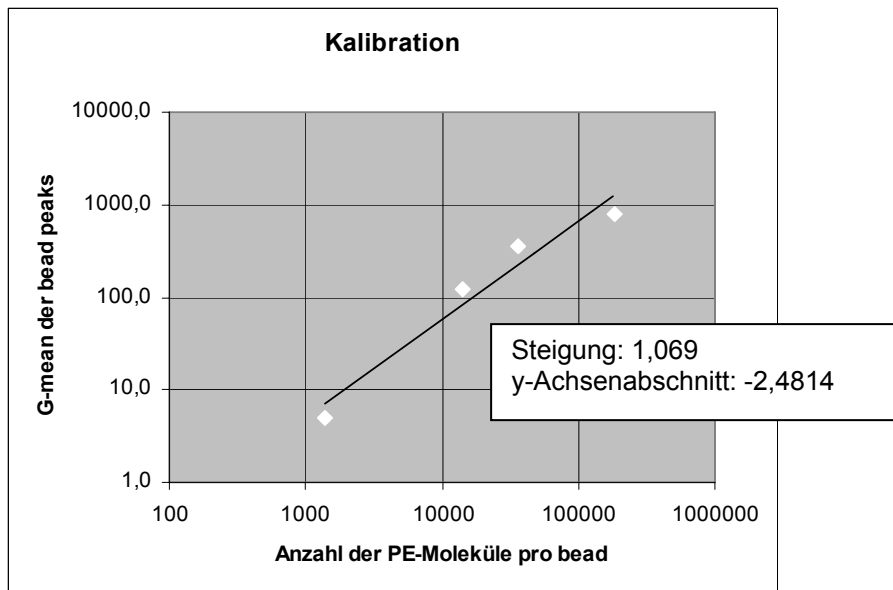
(c) WinMDI Version 2.8 - Windows 3.95/DOS 5.0

Gates: beads singlets

Total Events 10000 Gated Events 5399 53.99%

Parametername	M	Low, High	Events	Median	G-mean	CV
Anti-HLA-DR	1 = Low	110, 229	1288	5.14	5.04	12.43
	2 = Med-Low	488, 570	1309	124.09	123.28	2.41
	3 = Med-High	611, 687	1386	355.45	354.21	1.79
	4 = High	705, 775	1324	777.37	776.12	1.48

Anzahl PE-Moleküle pro bead (Packungsangabe)	G-means der bead peaks
1400	5,0
14000	123,3
36600	354,2
182000	776,1

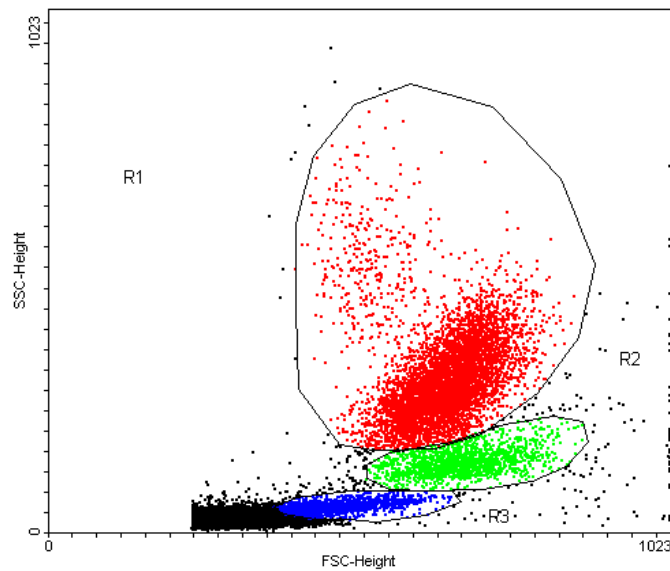


Regression: PE-Moleküle/Zelle =  $10^{((\lg(\text{Fluoreszenzmedian}) - (\text{y-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}))}$

**Abb. 2.3: Beads und Regression:**

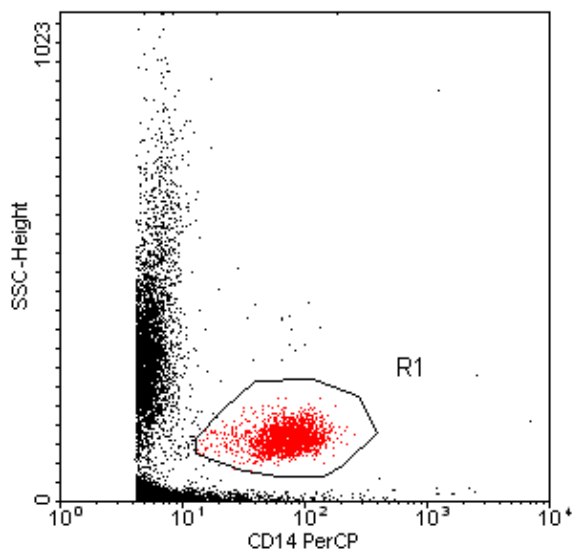
- (a) Beads im FSC/SSC Dot Plot, die Region R1 entspricht den bead singlets
- (b) Histogramm der Anti-HLA-DR-PE-Fluoreszenz der in (a) markierten beads (R1); es zeigen sich 4 „Bead-Populationen“ mit unterschiedlichen Beladungen (M1-M4)

- (c) Die 4 Peaks im Histogramm werden auf ihre geometrischen Mittelwerte untersucht; mit Hilfe der Mittelwerte wird über die vorgegebenen PE-Beladungen der beads (chargenabhängig) die Regressionsgerade erstellt.

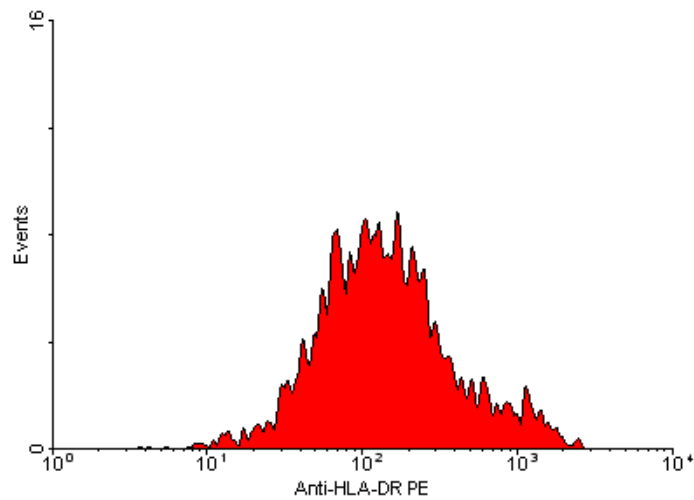


**Abb. 2.4:** Vollblutprobe im FSC/SSC Dot Plot mit Zellpopulationen  
R1 entspricht der Granulozytenpopulation, R2 den Monozyten und R3 den Lymphozyten.

(a)



(b)



WinMDI Version 2.8 - Windows 3.95/DOS 5.0

Gates: R1

Total Events 23270 Gated Events 2011 8.64%

Parametername	M	Low, High	Events	Median	G-mean	CV
Anti-HLA-DR	0	0,1023	2011	130.97	142.81	20.20

**Abb. 2.5: Mit QuantiBRITE™-Assay markierte Blutprobe**

- (a) Dot Plot; R1 = Monozytenpopulation
- (b) Histogramm der HLA-DR-PE-Fluoreszenz der in (a) markierten Population sowie die zugehörige Statistik mit Angabe des Median

**2.3.1.2.2 Ex vivo-Stimulation: Kinetik der HLA-DR-Expression bei Monozytenstimulation mit IFN- $\gamma$ , OKT3 und IL-10**

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ist ein von aktivierten Lymphozyten synthetisiertes Polypeptid, welches sowohl antivirale als auch wichtige immunmodulatorische Funktionen besitzt. Unter anderem ist es ein starker Aktivator der Phagenpopulationen und somit u. a. der Monozyten.

OKT3 ist ein Maus-Antikörper gegen den CD3-Rezeptor humaner T-Lymphozyten. Monozyten sind in der Lage, die Antikörper an ihre Fc-

Rezeptoren zu binden und mit den Lymphozyten Zellkonjugate zu bilden. Je nach Aktivierungsgrad der Monozyten können die T-Zellen dadurch zerstört oder aktiviert und zur Proliferation angeregt werden. Nach Vermittlung der OKT3-Wirkung auf die gebundenen Lymphozyten gehen die Monozyten selbst zugrunde.

Interleukin-10 (IL-10) ist ein von reifen T-Zellen und aktivierten Monozyten synthetisiertes Peptid und das wichtigste inhibitorische Zytokin. Es hemmt die Synthese anderer Mediatoren, in Monozyten insb. von IL-1 und -6 sowie TNF- $\alpha$ . Außerdem inhibiert es die Präsentation prozessierter Antigene auf der Zelloberfläche und damit die Expression von HLA-Molekülen.

Durch Stimulation der Monozyten mit diesen Substanzen sollte die in der Einleitung dargestellte Zykokinabhängigkeit der HLA-DR-Expression quantitativ erfasst werden.

Je 200  $\mu$ l Vollblut wurden hierzu mit 20  $\mu$ l IFN- $\gamma$  (Endkonzentration 500 I.E./ml), IL-10 (Endkonzentration 50 ng/ml) oder OKT3 (Endkonzentration 5  $\mu$ g/ml) versetzt. Diese Ansätze wurden im Brutschrank bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre, 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 0, 3 und 6 Stunden erfolgte die quantitative Bestimmung der HLA-DR-Beladung der Monozyten.

### **2.4 Statistische Auswertung**

#### **2.4.1 Referenzwerte der HLA-DR-Beladung peripherer Blutmonozyten**

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Martin Eichner vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen. In die Erstellung der Referenzwerte für die HLA-DR-Beladung der Monozyten gingen 186 Messungen der 158 nicht infizierten Reifgeborenen bis zum Lebensalter von 96 Stunden ein, um das für die EOBI relevante Intervall der ersten 72 Lebensstunden abbilden zu können.

Da von 23 Probanden mehrere (17 Patienten mit 2 Messungen, 6 Patienten mit 3 Messungen) Messwerte zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorlagen, wurden die einzelnen Messwerte zunächst mit einem Gewichtungsfaktor ( $1/\text{Anzahl der Werte pro Kind}$ ) versehen, der sicherstellte, dass eine unverhältnismäßige Einflussnahme der Werte einzelner Neugeborener auf das Gesamtergebnis verhindert würde.

Die Summe der Gewichtungsfaktoren der einzelnen Messwerte eines Probanden ergab den Wert 1.

Für die Erstellung von Referenzbändern für nicht infizierte Reifgeborene wurde zunächst der altersabhängige Mittelwert mit einer mathematischen Funktion (siehe unten) beschrieben und dann die 2,5. und 97,5. Percentile der altersabhängigen Verteilung bestimmt.

### 2.4.1.1 Modell

Es wurde von folgenden Annahmen ausgegangen:

1. Die Beladung der Monozyten mit HLA-DR streut gemäß einer logarithmischen Normalverteilung, wobei sich die Standardabweichung der Logarithmen über das Lebensalter nicht ändert (diese Annahme konnte mit der Verteilung der beobachteten Daten empirisch bestätigt werden).
2. Die altersabhängigen Mittelwerte der Zehnerlogarithmen der HLA-DR-Beladung lassen sich am besten mit einem Polynom 4. Grades beschreiben: Vorhersagewert (Alter) =  $a * (\text{Alter})^4 + b * (\text{Alter})^3 + c * (\text{Alter})^2 + d * (\text{Alter}) + e$ . Die Koeffizienten a, b, c, d und e wurden aus den Daten geschätzt, indem der Vorhersagewert (Alter) mit dem Zehnerlogarithmus der beobachteten HLA-DR-Beladung zum gleichen Alter [h] verglichen wurde (Verfahren der kleinsten Quadrate). Da bei der gegebenen Datenlage die Vorhersagewerte bei einem Lebensalter von über 96 Stunden recht ungenau würden und für die Fragestellung einer

EOBI die ersten 72 Lebensstunden relevant sind, beschränkten wir unsere Auswertung auf die ersten 4 Lebensstage.

### 2.4.1.2 Referenzbereich

Als Referenzbereich wurde der Bereich definiert, in welchem 95% der Werte um den logarithmischen Mittelwert der HLA-DR-Beladung streuen. Dieser Referenzbereich errechnet sich wie folgt:

95%-Referenzbereich der Zehnerlogarithmen = Vorhersagewert (Alter)  $\pm$  1,96 \* SD

Dabei entspricht der Vorhersagewert immer dem geometrischen Mittelwert (welcher bei Log-Normalverteilung mit dem Median identisch ist). Die Konstante 1,96 entspricht dem 97,5%-Quantil der Gauß'schen Normalverteilung und SD ist die Standardabweichung der Residuen (Residuum =  $_{10}\log(\text{gemessene HLA-DR-Beladung eines Kindes mit einem bestimmten Alter}) - \text{Vorhersagewert (Alter)}$ ).

Den 95%-Referenzbereich für die nicht logarithmierten Werte erhält man durch De-logarithmieren, also folgendermaßen:

95%-Referenzbereich =  $10^{\text{95\%lg-Referenzbereich}}$

### 2.4.2 Sonstige Messungen

Die übrigen statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot 9.0 durchgeführt. Hierzu wurden mit Hilfe der Statistikfunktion der CellQuest-Software Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messungen berechnet und in SigmaPlot übertragen.

Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Messreihen festzustellen, wurde in SigmaPlot 9.0 der Student t-Test angewandt, das geforderte Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt.

Die Auswertung der Messwerte zur Erstellung des Referenzbereichs erfolgte mit der Software JMP 3.

Die in dieser Arbeit abgebildeten Dot Plots, Histogramme und Plot-Statistiken wurden mit der Software WinMDI Version 2.8 aus den Originalmesswerten des FACSScan erstellt.

Die Arbeit wurde mit Microsoft Word 2003, Excel 2003, SigmaPlot 9.0 und EndNote X verfasst.

### 2.5 Tabellarische Auflistung der Materialien und Geräte

Antikörper	Hersteller
CD4-FITC (Maus IgG1, Klon SK3)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-FITC (Maus IgG1, Klon SK1)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD14-FITC (Maus IgG2b, Klon MΦP9)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD86-FITC (Maus IgG1, Klon 331 (FUN-1))	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
HLA-DR-FITC (Maus IgG2a, Klon L243)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-PE (Maus IgG1, Klon SK3)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD14-PE (Maus IgG2b, Klon MΦP9)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CD80-PE (Maus IgG1, Klon L307.4)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE / Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiBRITE PE	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Simultest Control y1/y2 (Maus IgG1/IgG1, MOPC-21, Klon X40)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

**Tab. 2.5: Monoklonale Antikörper**



## 2. Material und Methoden

Reagenz/Substanz	Hersteller
Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg
FACS Flow	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Lysing Solution	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Lipopolysaccharid (LPS), E. coli. Serotyp O55:B5 (5mg)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Monoklonale Maus-Antikörper (IgG2a) gegen humanes CD3 (OKT3) (5mg)	Fa. CRAG GmbH, Orthoclone
Rekombinantes Humanes IL-10 (5µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinantes Humanes IFN-γ, E. coli (100µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Polyglobin (10%)	Fa. Bayer, Leverkusen
Bovines Serum Albumin (BSA), lyophilisiert	Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
PBS-Dulbecco (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Fa. Biochrom, Berlin
Heparin-Natrium (5000 I. E./0,5ml)	Fa. B. Braun, Melsungen
Fötales Kälberserum (FCS), (inaktiviert im 60°C Wasserbad für 45 Minuten)	Fa. Biochrom, Berlin
NaCl 0,9%	Fa. Fresenius, Bad Homburg

**Tab. 2.6: Reagenzien/Substanzen**

## 2. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
FACSScan (Fluorescence-activated cell sorter)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
CellQuest-Software	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
SigmaPlot 9.0 Software	Fa. SPSS Inc., Chicago
WinMDI 2.8 Software	Joseph Trotter, San Diego
JMP 6.0 Software	SAS Institute, Cary, USA
EndNote X	Thomson Scientific, Stamford, USA
Microsoft Word 2003	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Excel 2003	Microsoft Corp., Redmond, USA
Brutschrank (5% CO <sub>2</sub> )	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Schüttelmixer	Fa. Schütt, Göttingen
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Zentrifuge Rotanta 46 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

**Tab. 2.7: verwendete Geräte**

Artikel	Hersteller
Pipetten	Fa. Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	Fa. Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (2,5ml, 15ml, 50ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Butterfly-21 Venisystems	Fa. Abbott, Sligo (Irland)
Monovetten	
24-well-Kulturplatten	Fa. Costar, Bodenheim
Einmalkanülen (Gr.1)	Fa. Braun, Melsungen
Einmalspritzen (5, 10 ml)	Fa. Braun, Melsungen

**Tab. 2.8: Sonstige Materialien**

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 HLA-DR auf Monozyten: Referenzwerte bei nicht infizierten Neugeborenen

In die Erstellung der Referenzwerte flossen 186 Messungen der 158 nicht infizierten Reifgeborenen ein (s. Tab. 3.1 Zusammensetzung des Kollektivs). Wie unter 2.4.1 dargelegt, lagen von 23 Probanden mehrere Messwerte vor: 17 Patienten mit 2 Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten, 6 Patienten mit 3 Messungen.

	<b>Nicht infizierte Reifgeborene</b>	
<b>Anzahl n</b>	158	
	n	%
♀	67	42,4
♂	91	57,6
<b>Gestationsalter [d]: Median (range)</b>	280 (259-298)	
<b>Geburtsgewicht [g]: Median (range)</b>	3.400 (2.050-5.350)	

**Tab. 3.1: Zusammensetzung des Kollektivs zur Erstellung der Referenzwerte**

##### 3.1.1 HLA-DR-Beladung von nicht infizierten Reifgeborenen versus erwachsene Kontrollpopulation

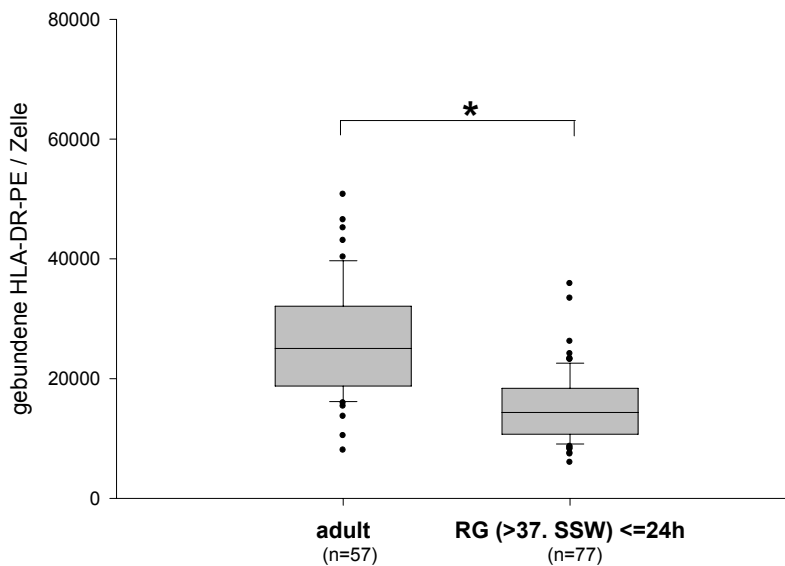
Für den Vergleich mit den Messungen bei einer erwachsenen Kontrollpopulation wurden die innerhalb der ersten 24 Lebensstunden gewonnen Messwerte der 158 untersuchten nicht infizierten Reifgeborenen

### 3. Ergebnisse

---

zusammengefasst: Dies waren 77 Messwerte bei 77 Kindern (keine Mehrfachmessungen).

Die bei 57 erwachsenen Probanden gemessene Beladung der Monozyten mit HLA-DR (25.955 mAb/c (SD 9.250)) unterschied sich signifikant von der HLA-DR-Expression der 77 nicht infizierten, reifen Neugeborenen im Lebensalter  $\leq 24$  h (15.380 mAb/c (SD 5.785) ( $p=0,0000$ )).



**Abb. 3.1: HLA-DR-Beladung von Monozyten:**  
Erwachsene im Vergleich zu gesunden Reifgeborenen innerhalb der ersten 24 Lebensstunden. \*  $p < 0,005$

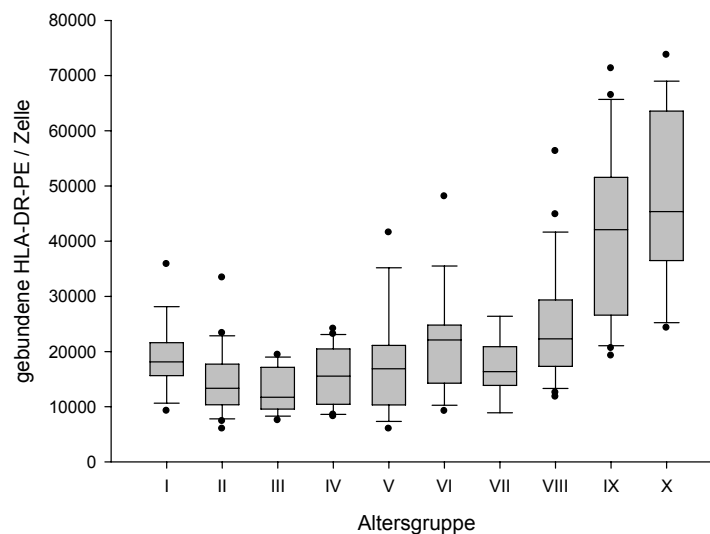
#### 3.1.2 Kinetik der HLA-DR-Beladung von Monozyten

Wir beobachteten eine Änderung der monozytären HLA-DR-Expression über das Lebensalter. Aus diesem Grund ordneten wir die 186 Messungen der 158 nicht infizierten Reifgeborenen gemäß dem Lebensalter bei Messung 10 Zeitintervallen zu:

### 3. Ergebnisse

Intervall	Alter bei Messung [h]	n	Median der HLA-DR-Expression [mAb/c]	SD
I	0-6	17	18.936	6.122
II	6-12	24	14.531	5.997
III	12-18	16	12.726	3.908
IV	18-24	20	15.499	5.339
V	24-30	14	17.639	9.415
VI	30-36	18	21.649	9.496
VII	36-42	9	17.100	5.102
VIII	42-48	28	25.098	10.358
IX	48-72	26	41.553	15.023
X	72-96	14	47.382	15.350

**Tab. 3.2: Messungen nach Lebensalter**  
(n = Anzahl der Messungen, mAb/c = gebundene Anti-HLA-DR-PE-Antikörper/Zelle)



**Abb. 3.2: HLA-DR-Beladung von Monozyten nicht infizierter Reifgeborener, aufgetragen nach Lebensalter**

Aus dieser Beobachtung schlossen wir, dass die HLA-DR-Expression von Monozyten einer vom Lebensalter abhängigen Kinetik folgt: Unmittelbar nach

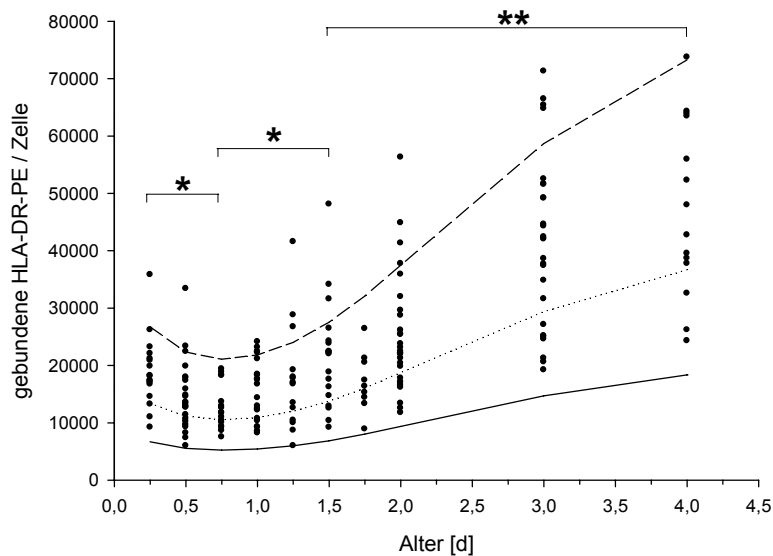
### 3. Ergebnisse

Geburt fiel die Beladung zunächst ab bis zu einem Minimum im Alter von 18 Stunden, daraufhin fand sich ein sukzessives Ansteigen der Werte (s. o.):

HLA [I] vs. HLA [III]:  $p = 0,0016$

HLA [III] vs. HLA [VI]  $p = 0,0019$

HLA [VI] vs. HLA [X]  $p = 0,0000$



**Abb. 3.3: HLA-DR-Beladung von Monozyten nach Lebensalter**  
(186 Messungen 158 nicht infizierter, reifer Neugeborener)  
(durchgezogene Linie 2,5. Perzentile, gepunktet 50. Perzentile,  
gestrichelt 97,5. Perzentile). \*  $p < 0,005$ , \*\*  $p < 0,0005$

Gemäß der im Material- und Methodenteil aufgeführten Überlegungen wurde ein Polynom 4. Grades zu Hilfe genommen, um die Kinetik während der ersten 4 Lebenstage zu beschreiben (s. auch 2.4.1.1).

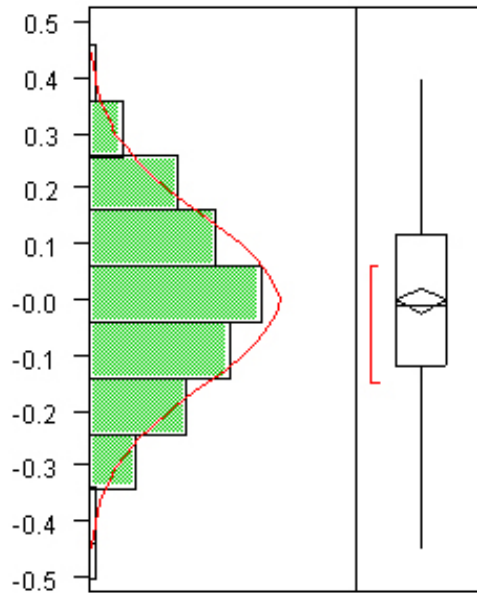
Ansichts der mit zunehmendem Alter größer werdenden Streuung wurden die gemessenen Beladungen logarithmiert ( $_{10}\log$ ).

Empirisch ließ sich anhand der gemessenen Beladungen zeigen, dass die Differenzen (Residuen) der logarithmierten Werte der gemessenen HLA-DR-Beladung von den mit Hilfe des Polynoms 4. Grades errechneten Werten (den

### 3. Ergebnisse

---

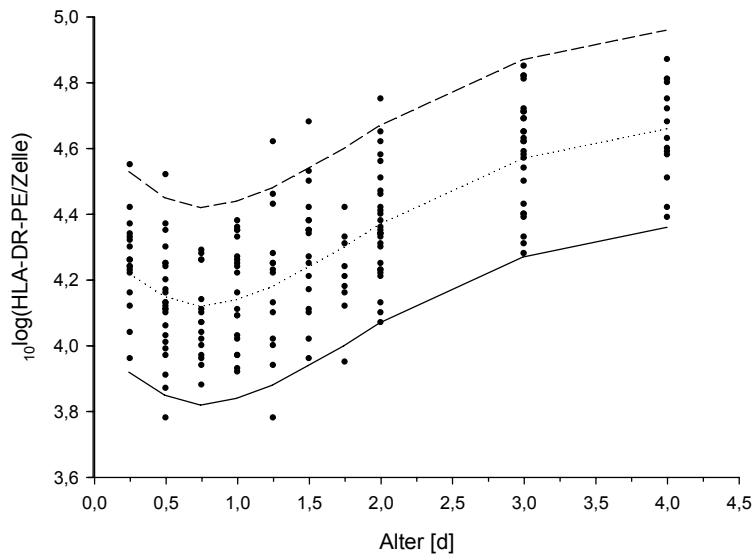
in 2.4.1.2 beschriebenen Residuen) näherungsweise gemäß einer log-Normalverteilung streuen:



**Abb. 3.4: Log-Normalverteilung der Residuen**  
(Differenzen der logarithmierten HLA-DR-Beladung der Messwerte der 156 gesunden, reifen Neugeborenen von den gemäß der Näherungsformel zu erwartenden Werten).

Somit konnten wir die Vorhersagewerte der vom Lebensalter abhängigen Kinetik während der ersten 4 Lebenstage näherungsweise mit folgender Funktion beschreiben:

$${}_{10}\log(\text{HLA}) = 4.37322 - 0.75557 \times \text{Alter}[\text{d}] + 0.69817 \times \text{Alter}[\text{d}]^2 - 0.19815 \times \text{Alter}[\text{d}]^3 + 0.01884 \times \text{Alter}[\text{d}]^4$$



**Abb. 3.5: Logarithmische Darstellung HLA-DR-Beladung**  
(186 Messungen von 156 nicht infizierten, reifen Neugeborenen)  
(durchgezogene Linie 2,5. Perzentile, gepunktet 50. Perzentile,  
gestrichelt 97,5. Perzentile).

#### 3.1.3 Einflussfaktoren der HLA-DR-Beladung

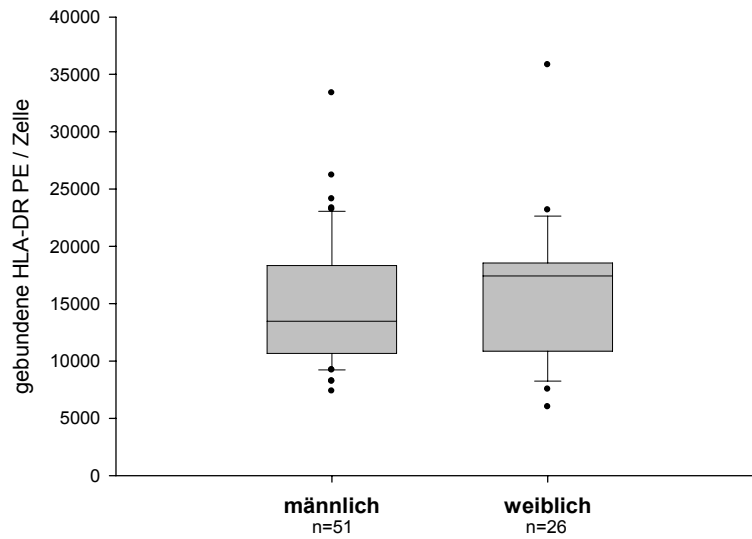
##### a) Geschlecht

Für nicht infizierte Reifgeborene galt in Bezug auf die Messungen der ersten 24 Lebensstunden ( $n=77$ ): Die Beladung der Monozyten mit HLA-DR zeigte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden keine Abhängigkeit vom Geschlecht.

Für männliche Neugeborenen ( $n=51$ ) lag die mittlere Beladung bei 15.165 mAb/c (SD 5.567), bei weiblichen Neugeborenen ( $n=26$ ) bei 15.802 mAb/c (SD 6.282). Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,65$ ).



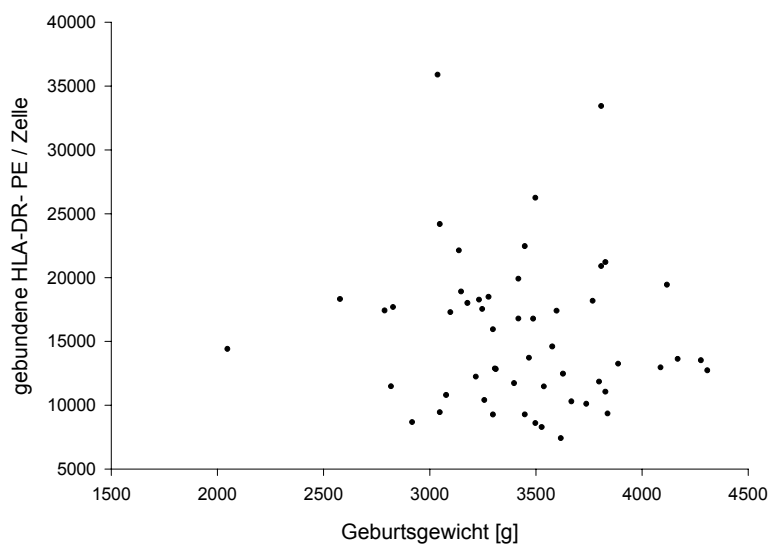
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.6:** HLA-DR-Beladung der Monozyten von nicht infizierten Reifgeborenen innerhalb der ersten 24 Lebensstunden in Abhängigkeit vom Geschlecht (n = Anzahl der Messwerte).

#### b) Geburtsgewicht

Für die Innerhalb der ersten 24 Stunden gemessenen Werte (n=77, s. o.) war keine Abhängigkeit der HLA-DR-Beladung der Monozyten vom Geburtsgewicht erkennbar ( $R^2=0,0084$ ).



**Abb. 3.7:** HLA-DR-Beladung versus Geburtsgewicht

#### c) Geburtsmodus

Da der Geburtsmodus einen nicht unwesentlichen Stressfaktor für das Neugeborene darstellt, betrachteten wir die HLA-DR-Beladung in Abhängigkeit vom Geburtsmodus. Auch für diesen Vergleich wurden alle innerhalb der ersten 24 Lebensstunden gemessenen HLA-DR-Beladungen zusammengefasst (n=77). 2 Messwerte konnten nicht verwendet werden, da retrospektiv der Geburtsmodus nicht aus der Aktenlage ersichtlich war.

Die Mittelwerte der HLA-DR-Beladung lagen für spontan geborene Kinder (n=50) bei 15.860 mAb/c (SD 5.335), für mittels Vakuumentraktion entbundene (n=10) bei 14.148 mAb/c (SD 5.792), bei Sectio caesarea (n=15) lag die Beladung im Mittel bei 15.484 mAb/c (SD 7.229).

Zwischen spontan geborenen, nicht infizierten Reifgeborenen und solchen, die durch eine Sectio caesarea (p=0,83) oder Vakuumentraktion (p=0,36) entbunden wurden, fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Beladung der Monozyten mit HLA-DR. Auch für den Vergleich von Sectio caesarea und Vakuumentraktion ließ sich keine signifikant verschiedene Beladung feststellen (p=0,63).

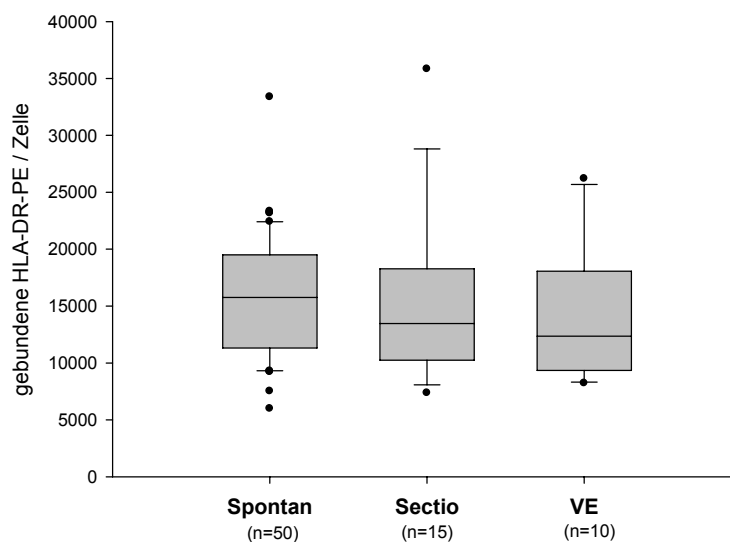
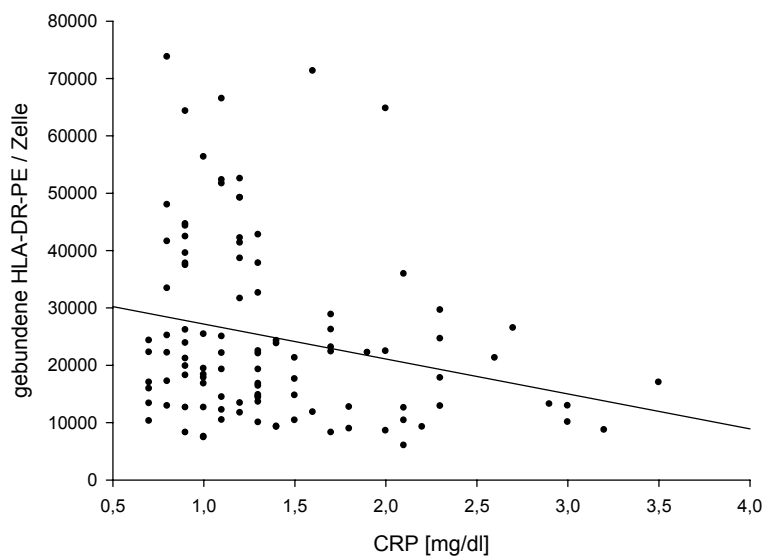


Abb. 3.8: HLA-DR-Beladung gesunder Reifgeborenen vs. Geburtsmodus.

#### 3.1.4 Vergleich zu etablierten Infektionsparametern

##### a) HLA-DR und CrP

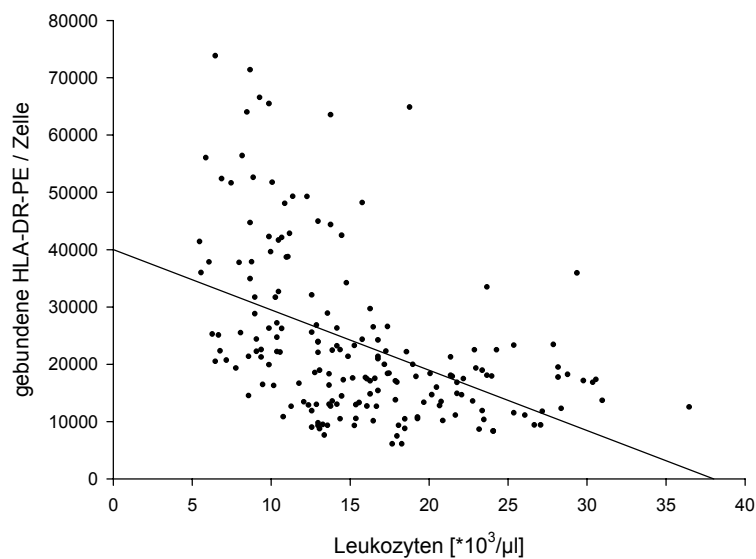
Für den Vergleich der HLA-DR-Beladung mit dem im Serum gemessenen CrP wurden die 186 zur Erstellung der Referenzwerte verwendeten Messungen herangezogen. Labortechnisch lag die Messgrenze des CrP bei 0,7 mg/dl, daher wurden Messungen, für welche das CrP mit <0,7 mg/dl angegeben war, nicht im Vergleich gewertet (n=81). Für die restlichen 105 Werte zeigte sich empirisch eine negative Korrelation: je höher der CrP-Wert, desto geringer schien die gemessene Beladung der Monozyten mit HLA-DR. Rechnerisch konnten wir diese Beobachtung nicht bestätigen (Korrelationskoeffizient  $R^2=0,055$ ).



**Abb. 3.9:** HLA-DR-Beladung versus CrP (n=105); eingezeichnet zudem die „optische“ Regressionsgerade.

#### b) HLA-DR und Leukozytenzahl

3 der 186 Messungen waren diesbezüglich nicht verwertbar, da die Blutproben zur Leukozytenzahlbestimmung im Routinelabor geronnen waren. Mit zunehmender Leukozytenzahl fand sich optisch wiederum eine tendenzielle Abnahme der HLA-DR-Beladung der Monozyten, rechnerisch ließ sich aber eine Korrelation für diese Parameter bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2=0,21$  nicht beschreiben.



**Abb. 3.10: HLA-DR-Beladung versus Leukozytenzahl**  
(n=183); eingezeichnet zudem die „optische“ Regressionsgerade.

#### c) HLA-DR versus I/T-Quotient

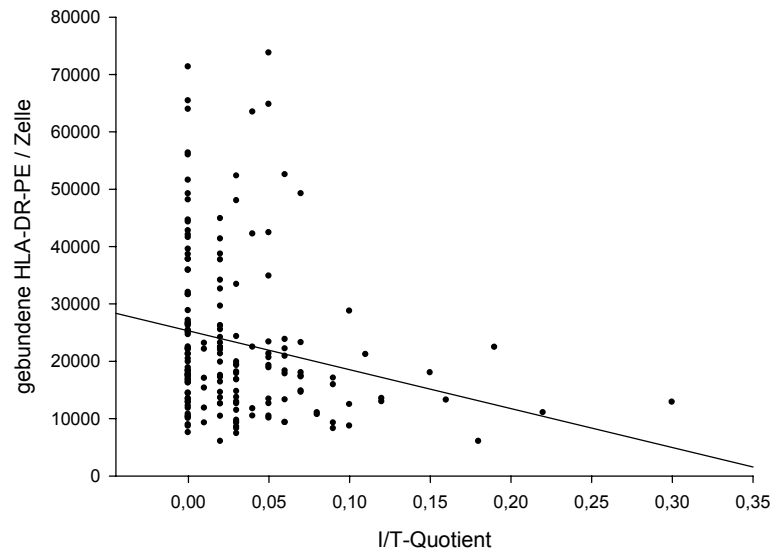
Bei fehlendem Differentialblutbild waren 9 der 186 Messungen für diesen Vergleich nicht zu verwenden. Die Bestimmung des Verhältnisses von unreifen Leukozytenformen zu reifen als Maß der Linksverschiebung ist ein weiteres Kriterium in der Diagnostik einer early-onset bacterial infection des Neugeborenen (s. 1.4.2).

Die erwartete negative Korrelation, nach welcher bei höherem I/T-Quotienten, d.h. mehr unreifen Leukozytenformen im Blut, die

### 3. Ergebnisse

---

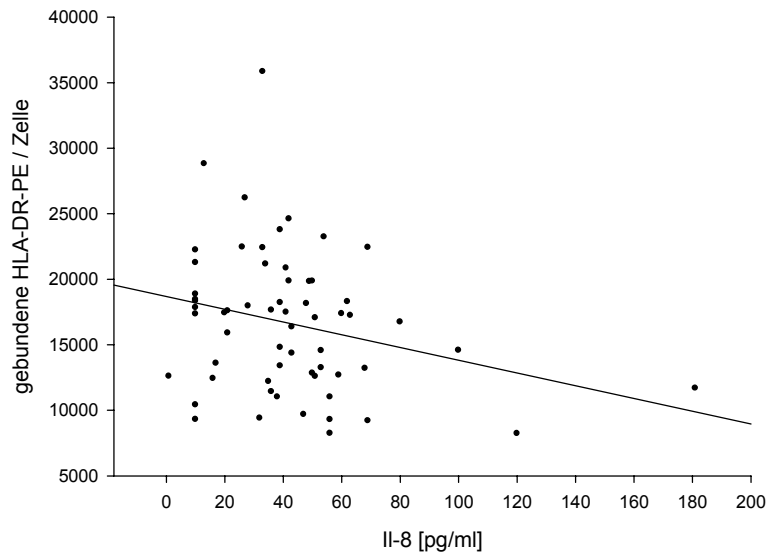
gemessene HLA-DR-Beladung der Monozyten niedriger sein müsste, ließ sich rechnerisch nicht nachweisen ( $R^2=0,045$ ).



**Abb. 3.11: HLA-DR-Beladung versus I/T-Quotient**  
eingezeichnet zudem die „optische“ Regressionsgerade.

#### d) HLA-DR versus IL-8

Für den Vergleich der Beladung der Monozyten mit HLA-DR mit IL-8 standen nur von 61 Proben IL-8-Messwerte zur Verfügung, bei den übrigen 125 war keine Bestimmung des IL-8 erfolgt. Auch hier fand sich rechnerisch keine lineare Korrelation ( $R^2=0,0069$ ).



**Abb. 3.12:** HLA-DR-Beladung der Monozyten versus IL-8  
eingezeichnet die „optische“ Regressionsgerade.

### 3.2 HLA-DR-Beladung bei reifen Neugeborenen mit EOBI

Die Frage, welche wir letztlich beantworten wollten, war, ob sich die Quantifizierung der HLA-DR-Beladung von Monozyten als diagnostischer Marker für das Vorliegen einer EOBI eignen würde.

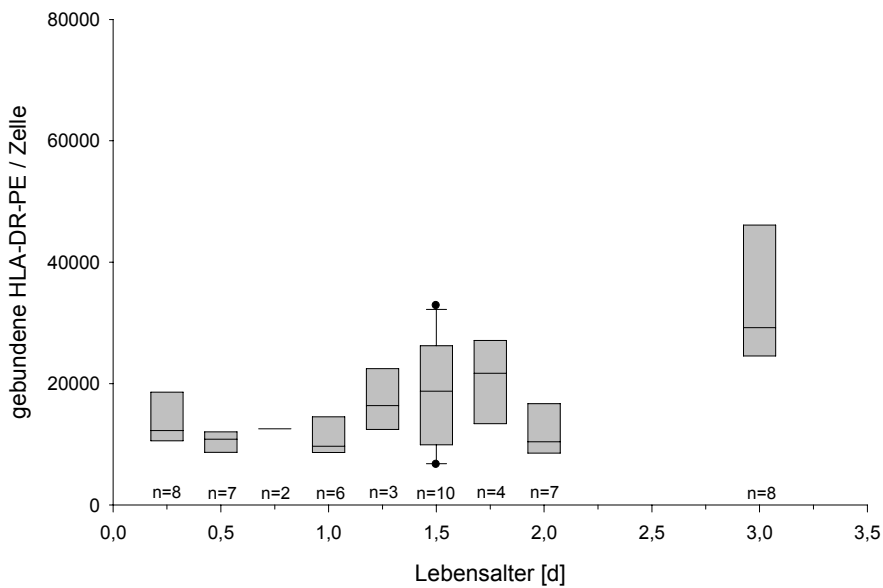
Analog zu den bisher untersuchten nicht infizierten, reifen Neugeborenen wurde eine Kinetik der HLA-DR-Beladung bei an EOBI erkrankten reifen Neugeborenen aufgestellt (n=47, Zusammensetzung s. Tab. 3.3).

Von diesen 47 Patienten konnten bis zum Lebensalter von 72 h (s. Definition EOBI) nur insgesamt 55 Messungen verwertet (8 Patienten mit 2 Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten).

### 3. Ergebnisse

Anzahl n	EOBI	
	47	
	n	%
♀	17	36,2
♂	30	63,8
<b>Gestationsalter [d]: Median (range)</b>	278 (262-293)	
<b>Geburtsgewicht [g]: Median (range)</b>	3.430 (2.790-4.520)	

**Tab. 3.3:** Zusammensetzung des EOBI-Kollektivs



**Abb. 3.13:** HLA-DR-Beladung des EOBI-Kollektivs (n = Anzahl der Messwerte der 47 Patienten) innerhalb der ersten 72 Lebensstunden.

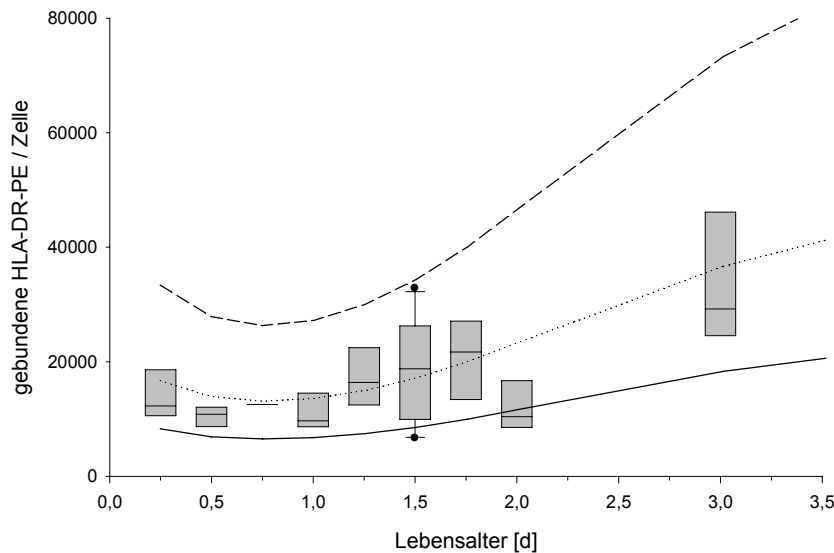
Der Versuch, einen geeigneten cut-off festzulegen, ab welchem eine HLA-DR-Beladung als pathologisch zu werten sei, scheiterte: Von den bei an EOBI

### 3. Ergebnisse

---

erkrankten Reifgeborenen gemessenen Werten befanden sich 89,1 % innerhalb des 95%-Intervalls zwischen 2,5. und 97,5. Perzentile der für nicht infizierte Reifgeborene erstellten Referenzwerte (6 der 55 Messwerte lagen unterhalb der 2,5. Perzentile).

Somit ließ sich die Quantifizierung der HLA-DR-Beladung von Monozyten im Rahmen unserer Messreihen nicht zur Diagnostik einer neonatalen early-onset bacterial infection heranziehen.



**Abb. 3.14:** HLA-DR-Beladung von an EOBi erkrankten Reifgeborenen innerhalb der ersten 3 Lebenstage sowie die 2,5. (durchgezogen), 50. (gepunktet) und 97,5. (gestrichelt) Perzentile der bei nicht infizierten Reifgeborenen gemessenen Werte.

#### 3.3 Kurzer Ausblick: Vergleich Reif- und Frühgeborene

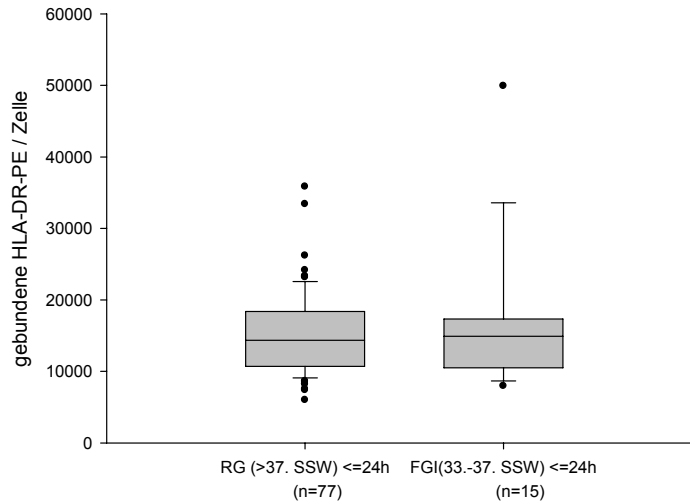
Die Messung der HLA-DR-Beladung bei nicht infizierten Frühgeborenen (33.-37. SSW) (n=15; 16.438 mAb/c (SD 10.073)) zeigte innerhalb der ersten 24 Lebensstunden keinen signifikanten Unterschied von der Beladung der



### 3. Ergebnisse

---

Monozyten nicht infizierter Reifgeborener (n=77; 15.380 mAb/c (SD 5.785)) (p=0,57).



**Abb. 3.15: HLA-DR-Beladung der Monozyten von nicht infizierten Reifgeborenen im Vergleich zu Frühgeborenen der 33.-37. SSW innerhalb der ersten 24 Lebensstunden.**

### 3.4 Methodenkritischer Teil

#### 3.4.1 Probenvolumen

Um das Verfahren der Quantifizierung von HLA-DR auf Monozyten für den Routineeinsatz zu testen, wurde ermittelt, wie weit sich das Probenvolumen an EDTA-Vollblut sowie die Menge des zugesetzten QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5-Reagenz reduzieren lässt, ohne eine signifikante Abweichung der gemessenen HLA-DR-Beladung im Vergleich zur vorgegebenen Probengröße zu riskieren.

Das verwendete QuantiBRITE-Kit empfahl die Verwendung von 50 µl Vollblut und 20 µl des Quantisierungsreagenz.

Durch 10 Messungen mit derselben Blutprobe (n=2) wurde eine einfache Standardabweichung von 6,2 % für die gemessene Beladung der Monozyten

mit HLA-DR ermittelt. Ziel war nun, das Probenvolumen zu minimieren, ohne aus der Vollsättigung zu fallen, d.h. ohne eine Abweichung von 2 Standardabweichungen (-12,4 %) zu überschreiten.

Mehrere Messreihen (n=4) mit 4 verschiedenen Proben zeigten, dass sich das Probevolumen auf 20 µl Vollblut sowie 4 µl Reagenz minimieren ließ (Standardabweichung der HLA-DR-Beladung -11,7%) – zumindest für die Messung bei nicht infizierten Probanden. Im Extremfall genügten sogar 10 µl VB sowie 2 µl Reagenz; (SD -10,4%).

#### **3.4.2 Einfluss der Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Verarbeitung**

Wird die Blutprobe nicht sofort verarbeitet, ändert sich durch verschiedene Faktoren die gemessene Beladung der Monozyten mit HLA-DR. Mutmaßlich im Blut vorhandene Zytokine sowie die Umgebungstemperatur beeinflussen diesen Prozess [93].

Innerhalb einer Stunde stieg die Beladung (n=7) um 23,4 %, nach 3 Stunden waren es 148 %, 6 Stunden später 423 %. Deshalb erfolgte bei der vorliegenden Arbeit die Verarbeitung der Blutprobe innerhalb der ersten Stunde nach Blutentnahme; Proben, die älter als 2 Stunden waren oder makroskopisch hämolytisch, wurden verworfen.

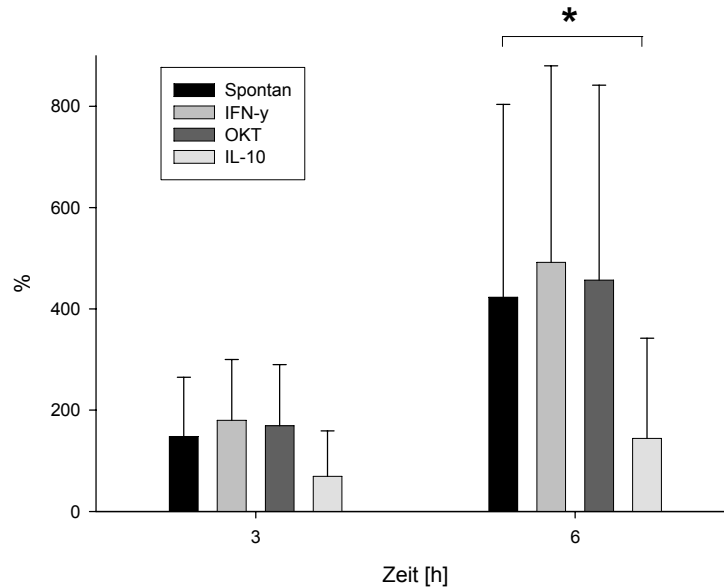
#### **3.4.3 Ex vivo-Stimulation**

Die Zugabe von IFN- $\gamma$ , OKT3 und IL-10 bedingte nur für die Messung nach 6 Stunden für IL-10 eine signifikante ( $p=0,04890$ ) Veränderung der HLA-DR-Beladung im Vergleich zur Nativmessung: Die nach sechsstündiger Inkubation erkennbare Herauf-Regulation durch IFN- $\gamma$  (n=8) und OKT3 (n=8) war in der Auswertung nicht signifikant verschieden zu der in der Nativmessung ebenfalls erkennbaren vermehrten Expression von HLA-DR.

### 3. Ergebnisse

---

Durch IL-10 kam es zu einer signifikanten Hemmung der in der Spontankinetik (s. 3.1.3) erkennbaren Hoch-Regulation nach 6h (n=12). Eine Herabregulation war in den durchgeführten Kinetiken nach 6 Stunden nicht zu sehen.



**Abb. 3.16:** Prozentuale Zunahme der HLA-DR-Beladung peripherer Blutmonozyten nach ex vivo-Stimulation mit IFN- $\gamma$ , OKT3 und IL-10. \*  $p < 0,05$ .

#### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Messung der HLA-DR-Beladung auf Monozyten aus Vollblut mit Hilfe des QuantiBRITE™-Kits waren 20  $\mu$ l Vollblut für die Bestimmung nötig.

Die HLA-DR-Beladung der Monozyten von Neugeborenen war verschieden zu der von Erwachsenen und folgte einer Kinetik in Abhängigkeit vom Lebensalter. Bei initial niedrigen Werten mit einem Minimum im Alter von 18 Lebensstunden folgte am 2. und 3. Lebenstag ein Anstieg der Werte auf ein höheres als das Ausgangsniveau.

Für die Diagnostik einer early-onset bacterial infection eignete sich die Messung der HLA-DR-Beladung nicht, da die bei an EOBI erkrankten Reifgeborenen

### 3. Ergebnisse

---

gefundenen Werte größtenteils innerhalb des Referenzbereiches (95%-Intervall) für nicht infizierte Reifgeborene lagen.

Erstaunlicherweise fand sich bei Frühgeborenen der 33.-37. SSW keine signifikant niedrigere Beladung der Monozyten mit HLA-DR als bei nicht an EOBI erkrankten Reifgeborenen.

### 4. Diskussion

Angesichts der noch immer hohen Morbidität und Mortalität einer bakteriellen Infektion bei Neugeborenen und der bei unspezifischer Klinik fortbestehenden Schwierigkeit einer frühen Diagnosestellung ist die Suche nach einem verlässlichen, ausreichend sensitiven und spezifischen Infektionsparameter weiterhin aktuell.

Ziel unserer Untersuchung war es, die im Erwachsenenalter nachgewiesenen Zusammenhänge zwischen Beladung der Monozyten mit HLA-DR, einem MHC Klasse II-Molekül, welches der Präsentation von prozessierten Antigenen an der Zelloberfläche dient, und dem Verlauf nach schwerem Stress im Rahmen großer chirurgischer Eingriffe oder Sepsis aufs Neugeborenenalter zu übertragen: Bei Erwachsenen hatte sich gezeigt, dass eine niedrige Expression des Oberflächenmarkers mit einer Immunparalyse und schlechtem Outcome vergesellschaftet war [19].

#### 4.1 Methodik

Um die Messung der HLA-DR-Beladung von Monozyten für diagnostische Zwecke nutzbar machen zu können sollte das verwendete Verfahren standardisierbar sein und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Der im Rahmen der Untersuchungen eingesetzte QuantiBRITE™-Kit zur Quantifizierung der HLA-DR-Beladung von Monozyten aus lysiertem Vollblut erfüllt diese Kriterien durchaus: durch die Kalibrierung des verwendeten Durchflusszytometers mit Partikeln (sog. Beads) definierter Beladung ist die Methode unabhängig vom jeweils verwendeten Gerät, den Geräteeinstellungen sowie vom Untersucher [17] (s. Abb. 2.3 und 2.5).

Gratama et al. zeigten jedoch auf, dass die durchflusszytometrische Quantifizierung mit Fluochromen dennoch Tücken birgt: Es bleibt offen, ob tatsächlich die angenommene lineare Abhängigkeit von emittiertem Fluoreszenzsignal und gemessener Intensität über den kompletten Messbereich besteht. Nimmt bei mehreren Fluochromen die unspezifische

Überstrahlung der einzelnen Fluoreszenzkanäle bei stärkerer Expression des quantifizierten Oberflächenmoleküls zu, so könnten auch hierdurch leicht die Messungen verfälscht werden und die bereits oben erwähnte Linearität zunichte gemacht werden [37].

Das Probenvolumen ließ sich in unseren Untersuchungen von den empfohlenen 50 µl auf 20 µl Vollblut reduzieren (s. 3.4.1), so dass auch im Falle mehrfacher Untersuchungen im Rahmen eines stationären Aufenthaltes kein hämodynamisch relevanter Blutverlust für neugeborene Patienten entstünde, was das Verfahren nochmals attraktiver für die pädiatrisch-klinische Praxis macht.

Hinsichtlich der Präanalytik fanden wir eine Zunahme der HLA-DR-Beladung der untersuchten Monozyten ex vivo über die Zeit (s. 3.4.2). Wir sahen bereits nach 1 Stunde unter Raumtemperatur eine Zunahme der Expression um 23,4 %, Döcke et al. fanden bei EDTA-Proben einen Anstieg um 21% nach 2 Stunden. Die Arbeitsgruppe empfahl daher die Lagerung der Proben auf Eis vor Verarbeitung, in diesem Fall lag die Zunahme der Beladung nur bei 4 % in 2 h [17]. Hierbei wird deutlich, dass die Methode empfindlich auf unterschiedliche Handhabung der Proben reagiert und eine in vivo-Herabregulation der HLA-DR-Expression ex vivo leicht verkannt werden kann.

Wie auch wir bereits mutmaßten, schrieben Döcke et al. diese in vitro messbare Zunahme von HLA-DR endogenen Transmittern (IFN- $\gamma$ ) zu, welche in der nicht gewaschenen Blutprobe vorhanden sind. Auch dem verwendeten Antikoagulans fällt sicherlich eine gewisse Bedeutung zu, so war der spontan messbare Anstieg bei Citratblut bspw. deutlich ausgeprägter als bei Verwendung von EDTA [17]. Es wurde in Berlin weiterhin die Standardisierbarkeit der verwendeten Methode untersucht und Richtlinien für die präanalytische Handhabung der Proben erstellt mit dem Ziel der Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Labors im Rahmen zukünftiger Multicenter-Studien. Hierbei fand die Arbeitsgruppe laborintern CV-Werte <4 %

[17]. Wir kamen in wiederholten Messungen zu einer Standardabweichung von ca. 6 % (s. 3.4.1).

### **4.2 Verhalten der HLA-DR-Beladung von Monozyten unter ex vivo-Stimulation mit Zytokinen**

Unter Stimulation der Blutproben mit pro-inflammatorischen Transmittern wie IFN- $\gamma$  und OKT3 zeigte sich eine deutliche Zunahme der Monozyten-Beladung mit HLA-DR, was einer Aktivierung der Monozyten entspricht (s. Abb. 3.16). Unter Einfluss des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 sahen wir eine signifikant niedrigere Expression von HLA-DR auf der Monozytenoberfläche im Vergleich zur Spontankinetik ohne Zytokinzusatz (s. ebenfalls Abb. 3.16). Die auch unter IL-10 beobachtete Zunahme der gemessenen Beladung über die Zeit lässt sich hier am ehesten durch Umgebungsfaktoren erklären, wie z. B. endogene Zytokine, welche in der nicht gewaschenen Blutprobe noch vorhanden sind [93] [17].

Da keine gereinigten Zellpopulationen, sondern lediglich lysierte Vollblutproben verschiedener Patienten verwendet wurden, ließen sich im Rahmen der ex vivo-Stimulationen nur bedingt vergleichbare Untersuchungsbedingungen schaffen, da abhängig vom jeweiligen „Stress“ des Organismus zum Zeitpunkt der Blutabnahme die Zytokinkonzentrationen in den verwendeten Blutproben sicherlich verschieden waren.

Somit gehen wir davon aus, dass durch die exogene Zugabe der Zytokine letztlich nur das Verhältnis der gelösten Zytokine modifiziert wurde, nicht jedoch eine reine Stimulations- oder Hemmungskinetik durch das eingesetzte Reagenz beobachtet werden konnte.

### 4.3 Patientenkollektive

In die Erstellung der Referenzwerte flossen einzig die Messungen der Reifgeborenen ein. Diese wurden auch für den Vergleich mit den Messungen bei Vorliegen einer EOBI herangezogen. Von dem erfassten Patientenkollektiv (260 Neugeborenen) konnten somit nur 241 Messungen der 205 untersuchten Reifgeborenen einbezogen werden. 47 (23 %) hiervon zeigten klinische sowie laborchemische Zeichen einer Infektion. Die Infektionsrate liegt damit deutlich über der unter 1.4.1 angegebenen Inzidenz einer EOBI von 3,5 ‰, was sich am ehesten durch das selektierte Patientenkollektiv eines universitären Perinatalzentrums erklärt.

Die Zusammensetzung der EOBI-Gruppe und der Kontrollgruppe nicht infizierter Neugeborener war ohne signifikanten Unterschied (EOBI vs. nicht infiziert: 64,6 % vs. 57,6 % männlich, Gestationsalter 278 (262 - 293) vs. 280 (259 - 298) Tage, Geburtsgewicht 3.420 (2.790 - 4.520) vs. 3400 (2.050 - 5.350) Gramm), auffallend war letztlich in beiden Gruppen die Prädominanz des männlichen Geschlechts. Auch dieser Sachverhalt erklärt sich sicherlich durch ein Selektionsphänomen: Auch in die Kontrollgruppe wurden Patienten aufgenommen, welche im Rahmen eines Infektionsverdachts einer Routineblutentnahme bedurften. Da nun das männliche Geschlecht als Risikofaktor für eine neonatale Infektion angesehen wird (s. u.) [97], lässt sich mutmaßen, dass auch im Falle eines bloßen Verdachts bei männlichen Neugeborenen häufiger eine Blutentnahme erfolgte.

### 4.4 Lebensaltersabhängige Kinetik der HLA-DR-Beladung auf Monozyten bei Neonaten

Die Beladung von peripheren Blutmonozyten mit HLA-DR unterschied sich in den ersten 24 Lebensstunden reifer Neugeborener (15.380 mAb/c (SD 5.785)) signifikant von der bei Erwachsenen Probanden gemessenen Beladung (25.955 mAb/c (SD 9.250)), (s. Abb. 3.1,  $p < 0,005$ ).



Die von uns bei erwachsenen Kontrollprobanden gemessene Beladung entsprach hierbei in etwa den von Döcke et al. erstellten Referenzwerten für Erwachsene (25.777 mAb/c (SD 6.649)) [17].

Wir fanden eine Abhängigkeit der HLA-DR-Beladung vom Lebensalter innerhalb der ersten 4 Lebenstage (s. Abb. 3.2). Die hierbei in den ersten 18 Lebensstunden beobachtete Abnahme der Beladung lässt sich eventuell dadurch erklären, dass unter der Geburt vorhandenen Zytokine (von der Mutter diaplazentar übertragen sowie vom Kind selbst gebildet) mit steigendem Lebensalter abnehmenden Einfluss ausüben. Um diese Hypothese zu untermauern, wäre jedoch die Bestimmung eines Zytokinprofils aus Nabelschnurblut mit Konzentrationsverlauf postnatal im Rahmen weiterer Studien notwendig.

Im Anschluss an diese vorübergehende Abnahme beobachteten wir nach 18 Lebensstunden einen Wiederanstieg der HLA-DR-Beladung über den Ausgangswert. Hier spielt sicherlich die Reifung der Monozyten und des übrigen Immunsystems eine Rolle, das sich postpartal mit nun vorhandenen Kommensalen auseinandersetzen muss. Diese „zerstören“ die bis zur Geburt herrschenden sterilen Verhältnisse [56] und besiedeln Außenhaut und Darm [59], [57].

Das Polynom 4. Grades, mit welchem wir diese Beobachtung der Kinetik über das Lebensalter näherungsweise zu beschreiben versuchten (s. 3.1.2, Abb. 3.3 und 3.4), ist letztlich empirischer Natur. Zur Bestätigung seiner Gültigkeit wäre eine Kontrolle anhand größerer Fallzahlen, ggf. auch multizentrisch, sicherlich empfehlenswert. Auch die Log-Normalverteilung der Residuen (Differenz zwischen Vorhersagewert der Näherungsformel und tatsächlich gemessener HLA-DR-Expression, s. Abb. 3.4), welche wir unserer Näherung zugrunde legten, sollte anhand größerer Fallzahlen bestätigt werden.

Frühere Analysen benannten unter anderem ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Gestationsalter <37 Schwangerschaftswochen und männlichem Geschlecht [97]. Auch geschlechtliche Unterschiede in Zytokinkonzentrationen, einhergehend mit Unterschieden bzgl. neonataler Morbidität wurden beschrieben [26]. Bspw. fand sich im Liquor asphyktischer Mädchen ein höherer IL-8-Spiegel als bei Jungen, wodurch die Autoren den besseren Schutz der Mädchen vor Hirnschädigungen erklärten [47].

Daneben wurde ein Einfluss des Geburtsmodus in Form fetalen Stresses auf die Immunkompetenz beschrieben: Mit zunehmendem fetalem Stress (Sectio < vaginale Entbindung < vaginal-operative Entbindung) konnte eine erhöhte chemotaktische Potenz neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden [105]. Zudem war die Apoptose der neutrophilen Granulozyten bei vaginaler Entbindung vermindert im Vergleich zu Messungen Neugeborener nach Kaiserschnitt, was auf stressbedingt erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel und anti-inflammatorisch wirksame Eikosanoide zurückgeführt wurde [103].

Hallwirth et al. beschrieben eine signifikant verminderte Fähigkeit der Antigen-Präsentation bei very low birth weight infants bzw. im Rahmen der Gestationsreife, was nach Meinung der Autoren die hohe Infektionsrate in dieser Population erklären könnte [41].

Daher untersuchten wir, ob ein Zusammenhang zwischen der HLA-DR-Beladung und Geburtsmodus, Geschlecht oder Trophie der Neugeborenen bestand. Dieser fand sich jedoch nicht (s. 3.1.3).

Daneben betrachteten wir die verschiedenen etablierten Laborparameter im Rahmen der EOBI-Diagnostik und suchten nach einem etwaigen Zusammenhang zu den von uns gemessenen Beladungen der Monozyten mit HLA-DR.

Sensitivität und Spezifität der Leukozytenzahl werden in der Literatur für die Frühdiagnostik einer EOBI (41 %, respektive 73 %) als niedrig angegeben [79] [96]; auch ein I/T-Quotient >0,2 wird als eher unspezifisch gewertet (Sensitivität 34 %, [87]).

Dem CrP wird in der Literatur in der Frühdiagnostik eine geringe Aussagekraft zugeschrieben [66]: bei Verdacht einer EOBI beträgt gemäß verschiedener Studien die Sensitivität des CrP zwischen 22 und 35 % bei hoher Spezifität von 90-97 % [7], [66]. Aufgrund der hohen Spezifität zeigten Mathers et al., dass ein CrP von >1 mg/dl initial eine neonatale bakterielle Infektion mit hoher Sicherheit voraussagen vermag [66]. Bei deutlich besserer Sensitivität und Spezifität 24 Stunden nach Infektionsbeginn eignet sich dieser Parameter wohl aber eher als Verlaufparameter und zur Therapiekontrolle.

Was die Wertigkeit von IL-8 im Rahmen der Frühdiagnostik einer EOBI betrifft, so existieren verschiedene Angaben: Edgar et al. fanden im Rahmen ihrer Messungen für IL-8 nur eine Sensitivität von 70 % bei einer Spezifität von 77 % [23], andererseits sprachen Mehr et al. von einer Sensitivität/Spezifität von 82/81 % für IL-8 im Plasma bei allerdings sehr großen Konfidenzintervallen [67]. Nupponen et al. beschrieben wiederum für die IL-8-Messung eine Sensitivität von 91% bei einer Spezifität von 100%. Eine tschechische Arbeitsgruppe, die 2008 erneut verschiedene Zytokine auf ihre Wertigkeit bei der Diagnostik einer EOBI untersuchten, bezifferte die Sensitivität von IL-8 auf 87,5 %, während die Spezifität bei 96,5 % lag [100].

Der Versuch einer Korrelation mit den oben genannten, etablierten Laborparametern scheiterte: die zu erwartenden Veränderungen der HLA-DR-Expression auf Monozyten (Anstieg bei Zunahme der Leukozytenzahl, steigendem I/T-Quotienten, CrP und IL-8 jeweils i. S. einer Aktivierung des Immunsystems) fanden sich in unseren Messungen nicht.

### **4.5 HLA-DR auf Monozyten im Rahmen einer Infektion**

Die Frage, vor welcher wir – wie andere Arbeitsgruppen vor uns – standen, war diejenige nach den Definitionskriterien einer neonatalen bakteriellen Infektion i. S. einer EOBI. In der von uns untersuchten Population fand sich keine positive Blutkultur, welche in der Sepsisdiagnostik nach wie vor als Goldstandard gilt.

Andererseits wird im Rahmen einer neonatalen Sepsis die Sensitivität der Blutkultur als niedrig eingestuft, Ottolini et al. fanden unter 1.665 untersuchten Neugeborenen mit Risiko für eine Infektion, von welchen 17 (1 %) eine EOBI entwickelten, keine einzige positive Blutkultur [79]. Ng et al., die ebenfalls die Wertigkeit der HLA-DR-Beladung auf Monozyten im Rahmen einer EOBI untersuchten, fanden lediglich bei einem von 93 Patienten eine positive Blutkultur [71].

Daher erfolgte die Zuordnung der Patienten in die EOBI-Gruppe anhand klinischer Kriterien in Kombination mit einer Erhöhung von CrP, IL-8 und/oder I/T-Quotient (s. Tab. 1.4 und 2.3) [28].

Ziel dieser Arbeit war es, den Stellenwert einer Quantifizierung der HLA-DR-Beladung von Monozyten aus dem Peripherblut im Rahmen der Diagnostik und Verlaufskontrolle einer early-onset Infektion zu beurteilen.

Für diesen Zweck sollte ein eindeutiger Unterschied in der messbaren Expression ohne und mit Infektion gegeben sein und der Parameter sollte durch andere exogene Faktoren möglichst wenig beeinflusst werden.

Analog der Ergebnisse von Ng 2006 ließ sich anhand der Quantifizierung der HLA-DR-Beladung von Monozyten nicht zwischen gesunden Reifgeborenen und Neugeborenen, die an einer early-onset Infektion erkrankt sind, differenzieren [71]. Zwar sind die Mediane der gemessenen HLA-DR-Beladung nicht direkt mit unseren Werten vergleichbar, da die Arbeitsgruppe alle Messungen zum Zeitpunkt des Infektionsverdachtes, unabhängig vom Lebensalter, zusammengefasst hat und diese mit den Reevaluationsmessungen nach 24 Stunden verglichen hat. In unserem Fall haben wir die Messungen zum Lebensalter korreliert, nicht mit dem Zeitpunkt des Infektionsverdachtes. Dennoch fand auch die Arbeitsgruppe um Ng keinen geeigneten cut-off, um zwischen nicht infizierten Neugeborenen und solchen mit bakterieller Infektion zu unterscheiden.

Ng erklärt die unterschiedliche Aussagekraft der HLA-DR-Beladung im Vergleich zu Erwachsenen damit, dass es sich im Rahmen dieser Studien um

systemische Infektionen mit einhergehender Bakteriämie gehandelt hatte, wohingegen in den untersuchten Fällen von EOBI primär lediglich lokalisierte Infektionen, wie z. B. Pneumonien, vorlagen. Die unifokale Organmanifestation, so spekuliert Ng, sei nicht ausreichend potent, um eine vergleichbar ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion zu vermitteln [71].

Auch unserer Ansicht nach lässt sich die Quantifizierung von HLA-DR auf Monozyten daher nicht für die Frühdiagnostik einer early-onset bacterial infection bei Reifgeborenen verwenden.

Was die Verlaufsbeurteilung betrifft, so sind weitere Untersuchungen notwendig, denn der Referenzbereich der HLA-DR-Beladung ist sehr weit und die von uns aufgestellte Näherungsformel auf die ersten 4 Lebensstage beschränkt. Somit kann keine Aussage über Referenzwerte für ältere Kinder getroffen werden. Auch lässt sich keine Tendenz zwischen zwei Messungen innerhalb dieser Zeitspanne beurteilen: Bei weitem Referenzbereich kann es sich leicht um eine lediglich „gesunde“ Schwankungsbreite handeln.

### **4.6 Schlussfolgerung**

Der bei Erwachsenen gefundene Zusammenhang zwischen HLA-DR-Beladung und Outcome im Rahmen einer Sepsis lässt sich unseren Untersuchungen zufolge nicht ohne weiteres auf das Neugeborene übertragen. Möglicherweise liegt das darin begründet, dass einerseits durch die Unreife des Immunsystems, eventuell durch ein lokalisierteres Infektgeschehen andererseits, das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion bei Reifgeborenen weniger stark ausgeprägt ist als bei Erwachsenen [71].

Hallwirth et al. fanden bei very low birth weight infants eine signifikant erniedrigte HLA-DR-Expression im Vergleich zu Neugeborenen mit einem Gestationsalter von >32 SSW [41]; die Arbeitsgruppe beschrieb zuvor außerdem, dass Monozyten von VLBWI mit einer EOBI eine massiv reduzierte phagozytäre Kompetenz und HLA-DR-Expression zeigen [42] und schloss

daraus, dass auch – zumindest auf VLBWI – die bei Erwachsenen gezeigten Zusammenhänge übertragen werden können. Hierzu ist anzumerken, dass auch bei Erwachsenen differente Angaben über die Bedeutung einer erniedrigten HLA-DR-Expression zu finden sind: Oczenski et al. untersuchten Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen und fanden eine erniedrigte Beladung ohne signifikante Differenz zwischen Patienten mit unkompliziertem postoperativem Verlauf und solchen, die septische Komplikationen erlitten [74].

Verschiedenste Zytokine und Oberflächenmoleküle wurden bereits als Marker für die verlässliche Frühdiagnostik einer EOBI untersucht: Neben den oben bereits erwähnten sahen Hodge et al. bspw. die CD69-Expression auf NK-Zellen als sensitiven Marker [44], Hallwirth et al. fanden für die Fähigkeit von Nabelschnurmonozyten, nicht opsonierte *E. coli* zu phagozytieren sowie die LPS-induzierte Bildung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % [42]. Anderenorts wurde der Expression von CD64 auf Neutrophilen eine hohe Spezifität (96,8 %) für eine EOBI eingeräumt [53], eine finnische Arbeitsgruppe zeigte für CD11b auf Neutrophilen ebenfalls eine hohe Sensitivität und Spezifität (je 100%) auf. Auch die Messung des intracellular adhesion molecule-1 wurde als hoch sensitiv für eine EOBI gewertet [23].

Letztlich konnte sich aber keiner dieser Parameter bislang in der Routinediagnostik als für die klinische Praxis geeignet beweisen, denn neben einer ausreichend hohen Sensitivität und Spezifität ist hierfür auch eine schnelle Verfügbarkeit erforderlich und die entstehenden Kosten müssen in Relation zu dem erreichbaren Benefit durch die Methode stehen.

Die Quantifizierung von HLA-DR würde neben des kleinen Probenvolumens (s. o.) auch diese Kriterien (rasche Verfügbarkeit, Laborunabhängigkeit, vertretbare Kosten) erfüllen, leider eignet sie sich jedoch aufgrund des in unseren Untersuchungen fehlenden cut-off nicht für die Frühdiagnostik einer EOBI.

Einige Anmerkungen sind hierzu allerdings sicherlich noch zu machen:

Bei vielen an einer EOBI erkrankten Kindern liegen zuvor mütterliche Risikofaktoren vor, eine antibiotische Therapie der Mutter ist daher meist schon unter der Geburt in die Wege geleitet. Dies mag möglicherweise ein Grund für die niedrige Sensitivität der Blutkultur im Rahmen einer EOBI sein [33], zum anderen könnte dies aber auch den Umstand zur Folge haben, dass deutlich weniger schwere Sepsisverläufe bei Neugeborenen zu beobachten sind, als dies ohne antibiotische Therapie der Mutter der Fall wäre. Schwere Verläufe könnten möglicherweise auch mit einer signifikant erniedrigten HLA-DR-Expression einhergehen, ohne dass wir dies im Rahmen unserer Messungen nachgewiesen hätten. Denn, wie auch schon in anderen zitierten Studien [28, 29, 67, 73] und unter 4.5 erwähnt, handelte es sich in unserem Fall größtenteils um klinisch septisch wirkende Patienten bei fehlendem Goldstandard in der Diagnosestellung einer EOBI.

Somit besteht durchaus die Möglichkeit, dass die HLA-DR-Beladung von Monozyten in der Lage wäre, eine schwer verlaufende EOBI vorherzusehen bzw. als Frühindikator hierfür zu dienen. Dafür wären jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Hinterfragen müssen wir auch, dass in die Erstellung der Referenzwerte einzig die Werte von Neugeborenen einfließen, welche im Rahmen eines Infektionsverdachts einer Blutentnahme bedurften. Ob diese klinischen Verdachtsmomente auch mit – wenngleich unspezifischen – immunologischen Phänomenen einhergehen, kann nur gemutmaßt werden; in diesem Falle bleibt aber offen, ob diese Phänomene auch Einfluss auf die Beladung der Monozyten mit HLA-DR genommen haben, was die Gültigkeit unserer Referenzwerte in Frage stellen würde.

### 5. Zusammenfassung

Noch immer ist eine neonatale bakterielle Infektion mit hohem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko für das Neugeborene behaftet. Aufgrund der unspezifischen Klinik gestaltet sich die Diagnostik schwierig, einen nicht unbedeutenden Risikofaktor stellt jedoch auch die Unreife des Immunsystems dar, im Rahmen derer die initial überschießende Entzündungsreaktion mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  von einer IL-10-vermittelten anti-inflammatorischen Reaktion i. S. einer Immunparalyse gefolgt sein kann.

Bei an einer Sepsis erkrankten Erwachsenen hatte sich die HLA-DR-Beladung auf Monozyten als verwertbarer Parameter für den Aktivierungsgrad des Immunsystems bewährt. HLA-DR ist ein MHC Klasse II-Molekül, welches der Antigenpräsentation für T-Lymphozyten dient und damit Monozyten zu einer zentralen Schaltstelle zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem macht. Eine niedrige Beladung war in mehreren Studien mit höherer sepsisbedingter Morbidität und Mortalität vergesellschaftet gewesen.

Ziel dieser Arbeit war es, die diagnostische Wertigkeit der Quantifizierung von HLA-DR auf Monozyten im Rahmen einer early-onset bacterial infection zu beurteilen. Hierzu wurde mit Hilfe des QuantiBRITE™-Reagenz der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, die Beladung der Monozyten aus Vollblut bestimmt. Wir erstellten Referenzwerte für reife Neugeborene, mit welchen die bei an einer EOBI erkrankten Neugeborenen gefundene Beladung verglichen wurde.

Nach elterlichem Einverständnis erfolgte die quantitative Bestimmung durchflusszytometrisch (FACScan, Becton-Dickinson) mit Hilfe des QuantiBRITE™-Assays (Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5, Becton-Dickinson) aus 20  $\mu$ l Vollblut. Die longitudinale Vergleichbarkeit wurde durch die Mitführung eines internen Standards gewährleistet. In die Erstellung der Referenzwerte gingen 186 Messungen von 158 Neugeborenen (57,6 % männlich, Gestationsalter 280 (259 - 298) Tage, Geburtsgewicht 3.400 (2.050 -



5.350) Gramm) ein, bei welchen klinisch und serologisch eine EOBI ausgeschlossen werden konnte. Eine erwachsene Kontrollpopulation von 57 Spendern wurde untersucht und zuletzt 55 Messungen von 47 an einer EOBI erkrankten Reifgeborenen (63,8 % männlich, Gestationsalter 278 (262 – 293) Tage, Geburtsgewicht 3.430 (2.790 - 4.520) Gramm) mit den Referenzwerten verglichen. Zur Prüfung der Zytokinabhängigkeit der HLA-DR-Beladung erfolgten ex vivo sechsstündige Stimulationskinetiken mit IFN- $\gamma$  (n=8; 500 I.E./ml; R&D, Minneapolis), OKT3 (n=8; 5  $\mu$ g/ml; CRAG, Orthoclone) und IL-10 (n=12; 50 ng/ml; R&D, Minneapolis).

Die HLA-DR-Beladung nicht infizierter Reifgeborener (n=77; Median 15.380 mAb/c (SD 5.785)) war in den ersten 24 Lebensstunden signifikant verschieden von der gesunder Erwachsener (n=57; 25.955 mAb/c (SD 9.250)).

Die HLA-DR-Expression von durchschnittlich 18.936 mAb/c (SD 6.122) im Alter bis 6 Stunden nahm bis zum Alter von 18 Lebensstunden zunächst um 33 % ab auf 12.726 mAb/c (SD 3.908). In den folgenden 78 Stunden sahen wir einen kontinuierlichen Anstieg um 272 % auf 47.382 mAb/c (SD 15.350) ( $p < 0,05$ ).

Geschlecht, Geburtsgewicht und –modus beeinflussten die Beladung der Monozyten mit HLA-DR nicht. Eine rechnerische Korrelation mit etablierten Parametern wie CrP, Leukozytenzahl, I/T-Quotient und IL-8 ließ sich nicht nachweisen.

Die Messwerte der an einer EOBI erkrankten Reifgeborenen lagen größtenteils (89,1 %) innerhalb des 97,5%-Konfidenzintervalls um den Median der bei nicht infizierten Neugeborenen zu erwartenden Beladung, so dass sich kein geeigneter cut-off festlegen ließ, um zwischen EOBI und nicht infiziert zu unterscheiden.

Die Zytokinstimulationen ergaben eine in der Tendenz erkennbare Herauf-Regulation der HLA-DR-Expression nach 6 Stunden unter IFN- $\gamma$  (n=8; +492 %, (SD 388)) und OKT3 (n=8; +457 %, (SD 385)), die jedoch nicht signifikant verschieden war von der in der Spontankinetik erkennbaren Zunahme der

Expression (n=7; +423 % (SD 380)). IL-10 (n=12; +144 %, (SD 198)) führte zu einer signifikant verminderten Zunahme der Expression über die Zeit ( $p < 0,05$ ).

Die neonatale HLA-DR-Expression auf Monozyten zeigte sich als vom Lebensalter abhängig, was bei der Interpretation von Messwerten berücksichtigt werden muss. Allerdings stellte sich dieser Parameter für die Diagnostik einer EOBI in unseren Messungen als ungeeignet heraus.

Bei mit dem Lebensalter größer werdender Schwankungsbreite ist auch die Relevanz der HLA-DR-Beladung von Monozyten als Verlaufsparemeter fraglich, hierfür sind jedoch weitere Studien notwendig.

### III. Literaturverzeichnis

1. Allen, M.L., Peters, M.J., Goldman, A., Elliott, M., James, I., Callard, R. and Klein, N.J.  
**Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care**  
Crit Care Med, 2002. 30(5): p. 1140-5.
2. Ang, A.T., Ho, N.K. and Chia, S.E.  
**The usefulness of CRP and I/T ratio in early diagnosis of infections in Asian newborns**  
J Singapore Paediatr Soc, 1990. 32(3-4): p. 159-63.
3. Astiz, M., Saha, D., Lustbader, D., Lin, R. and Rackow, E.  
**Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis**  
J Lab Clin Med, 1996. 128(6): p. 594-600.
4. Baggiolini, M., Walz, A. and Kunkel, S.L.  
**Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils**  
J Clin Invest, 1989. 84(4): p. 1045-9.
5. Barker, R.N., Erwig, L., Pearce, W.P., Devine, A. and Rees, A.J.  
**Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages**  
Pathobiology, 1999. 67(5-6): p. 302-5.
6. Behrman, R.E., Kliegman, R., Jenson, H. B. et al.  
**Nelson Textbook of Pediatrics.**  
17th ed, ed. Behrman, R.E., Kliegman, R., Jenson, H. B. 2004: Saunders (Elsevier Science).
7. Benitz, W.E., Han, M.Y., Madan, A. and Ramachandra, P.  
**Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection**  
Pediatrics, 1998. 102(4): p. E41.
8. Besemer, J., Hujber, A. and Kuhn, B.  
**Specific binding, internalization, and degradation of human neutrophil activating factor by human polymorphonuclear leukocytes**  
J Biol Chem, 1989. 264(29): p. 17409-15.

9. Cairo, M.S.  
**Neonatal neutrophil host defense. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis**  
Am J Dis Child, 1989. 143(1): p. 40-6.
10. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J.  
**Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking**  
J Exp Med, 1994. 180(4): p. 1263-72.
11. Chirico, G., Gasparoni, A., Ciardelli, L., Martinotti, L. and Rondini, G.  
**Leukocyte counts in relation to the method of delivery during the first five days of life**  
Biol Neonate, 1999. 75(5): p. 294-9.
12. Christensen, R.D., Bradley, P.P. and Rothstein, G.  
**The leukocyte left shift in clinical and experimental neonatal sepsis**  
J Pediatr, 1981. 98(1): p. 101-5.
13. Christensen, R.D. and Rothstein, G.  
**Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis**  
J Pediatr, 1980. 96(2): p. 316-8.
14. Christensen, R.D. and Rothstein, G.  
**Efficiency of neutrophil migration in the neonate**  
Pediatr Res, 1980. 14(10): p. 1147-9.
15. Darbonne, W.C., Rice, G.C., Mohler, M.A., Apple, T., Hebert, C.A., Valente, A.J. and Baker, J.B.  
**Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin**  
J Clin Invest, 1991. 88(4): p. 1362-9.
16. Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L. and Gregory, C.D.  
**Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells**  
Nature, 1998. 392(6675): p. 505-9.
17. Docke, W.D., Hoflich, C., Davis, K.A., Rottgers, K., Meisel, C., Kiefer, P., Weber, S.U., Hedwig-Geissing, M., Kreuzfelder, E., Tschentscher, P., Nebe, T., Engel, A., Monneret, G., Spittler, A., Schmolke, K., Reinke, P., Volk, H.D. and Kunz, D.  
**Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study**  
Clin Chem, 2005. 51(12): p. 2341-7.

18. Docke, W.D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H.D. and Kox, W.  
**Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment**  
Nat Med, 1997. 3(6): p. 678-81.
19. Döcke, W.D., Reinke, P., Syrbe, U., Platzer, C., Asadullah, K., Krausch, D., Zuckermann, H. and Volk, H.D.  
**Immunoparalysis in Sepsis - from Phenomenon to Treatment Strategies**  
Transplantationsmedizin, 1997. 9: p. 55-65.
20. Dollner, H., Vatten, L. and Austgulen, R.  
**Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules**  
J Clin Epidemiol, 2001. 54(12): p. 1251-7.
21. Dretschmer, R.R., Stewardson, R.B., Papierniak, C.K. and Gotoff, S.P.  
**Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes**  
J Immunol, 1976. 117(4): p. 1303-7.
22. Drews, U.  
**Taschenatlas der Embryologie.** 1993, Stuttgart, New York: Thieme.
23. Edgar, J.D., Wilson, D.C., McMillan, S.A., Crockard, A.D., Halliday, M.I., Gardiner, K.R., Rowlands, B.J., Halliday, H.L. and McNeill, T.A.  
**Predictive value of soluble immunological mediators in neonatal infection**  
Clin Sci (Lond), 1994. 87(2): p. 165-71.
24. Eichenwald, E.C.  
**Perinatally transmitted neonatal bacterial infections**  
Infect Dis Clin North Am, 1997. 11(1): p. 223-39.
25. El-Mohandes, A.A., Rivas, R.A., Kiang, E., Wahl, L.M. and Katona, I.M.  
**Membrane antigen and ligand receptor expression on neonatal monocytes**  
Biol Neonate, 1995. 68(5): p. 308-17.
26. Elsmen, E., Ley, D., Cilio, C.M., Hansen-Pupp, I. and Hellstrom-Westas, L.  
**Umbilical cord levels of interleukin-1 receptor antagonist and neonatal outcome**  
Biol Neonate, 2006. 89(4): p. 220-6.

27. Fleer, A., Gerards, L.J. and Verhoef, J.  
**Host defence to bacterial infection in the neonate**  
*J Hosp Infect*, 1988. *11 Suppl A*: p. 320-7.
28. Franz, A.R., Kron, M., Pohlandt, F. and Steinbach, G.  
**Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants**  
*Pediatr Infect Dis J*, 1999. *18*(8): p. 666-71.
29. Franz, A.R., Steinbach, G., Kron, M. and Pohlandt, F.  
**Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections**  
*Pediatrics*, 1999. *104*(3 Pt 1): p. 447-53.
30. Friedland, J.S., Suputtamongkol, Y., Remick, D.G., Chaowagul, W., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., White, N.J. and Griffin, G.E.  
**Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection**  
*Infect Immun*, 1992. *60*(6): p. 2402-8.
31. Fujishima, S., Nakamura, H., Waki, Y., Soejima, K., Takeuchi, Y., Ogawa, M., Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Kawashiro, T., Aiso, S. and Kanazawa, M.  
**Cell-associated IL-8 in human blood monocytes: analysis by flow cytometry**  
*Cytometry*, 1996. *24*(4): p. 382-9.
32. Gauldie, J., Northemann, W. and Fey, G.H.  
**IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6**  
*J Immunol*, 1990. *144*(10): p. 3804-8.
33. Gerdes, J.S.  
**Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis**  
*Clin Perinatol*, 1991. *18*(2): p. 361-81.
34. Gerdes, J.S. and Polin, R.  
**Early diagnosis and treatment of neonatal sepsis**  
*Indian J Pediatr*, 1998. *65*(1): p. 63-78.

35. Gille, C., Spring, B., Tewes, L.J., Loffler, J., Dannecker, G.E., Hoffmann, M.K., Eichner, M., Poets, C.F. and Orlikowsky, T.W.  
**Diminished response to interleukin-10 and reduced antibody-dependent cellular cytotoxicity of cord blood monocyte-derived macrophages**  
*Pediatr Res*, 2006. 60(2): p. 152-7.
36. Girndt, M., Sester, U., Kaul, H., Hunger, F. and Kohler, H.  
**Glucocorticoids inhibit activation-dependent expression of costimulatory molecule B7-1 in human monocytes**  
*Transplantation*, 1998. 66(3): p. 370-5.
37. Gratama, J.W., D'Hautcourt J, L., Mandy, F., Rothe, G., Barnett, D., Janossy, G., Papa, S., Schmitz, G. and Lenkei, R.  
**Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis**  
*Cytometry*, 1998. 33(2): p. 166-78.
38. Gregory, C.D.  
**CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system**  
*Current Opinion in Immunology*, 2000. 12: p. 27-34.
39. Hack, C.E., Aarden, L.A. and Thijs, L.G.  
**Role of cytokines in sepsis**  
*Adv Immunol*, 1997. 66: p. 101-95.
40. Hack, C.E., Hart, M., van Schijndel, R.J., Eerenberg, A.J., Nuijens, J.H., Thijs, L.G. and Aarden, L.A.  
**Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators**  
*Infect Immun*, 1992. 60(7): p. 2835-42.
41. Hallwirth, U., Pomberger, G., Pollak, A., Roth, E. and Spittler, A.  
**Monocyte switch in neonates: high phagocytic capacity and low HLA-DR expression in VLBWI are inverted during gestational aging**  
*Pediatr Allergy Immunol*, 2004. 15(6): p. 513-6.
42. Hallwirth, U., Pomberger, G., Zaknun, D., Szepfalusi, Z., Horcher, E., Pollak, A., Roth, E. and Spittler, A.  
**Monocyte phagocytosis as a reliable parameter for predicting early-onset sepsis in very low birthweight infants**  
*Early Hum Dev*, 2002. 67(1-2): p. 1-9.

43. Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. and Hodes, R.J.  
**Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function**  
J Exp Med, 1994. 180(2): p. 631-40.
44. Hodge, G., Hodge, S., Han, P. and Haslam, R.  
**Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection**  
Clin Exp Immunol, 2004. 135(1): p. 125-9.
45. Höflich, C. and Volk, H.-D.  
**Immunmodulation in der Sepsis**  
Der Chirurg, 2002. 73(11): p. 1100-1104.
46. Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. and Miller, L.H.  
**A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor**  
Science, 1993. 261(5125): p. 1182-4.
47. Hussein, M.H., Daoud, G.A., Kakita, H., Hattori, A., Murai, H., Yasuda, M., Mizuno, K., Goto, K., Ozaki, Y., Ito, T., Tanaka, T., Fukuda, S., Kato, I., Fujimoto, S., Suzuki, S., Sobajima, H. and Togari, H.  
**The sex differences of cerebrospinal fluid levels of interleukin 8 and antioxidants in asphyxiated newborns**  
Shock, 2007. 28(2): p. 154-9.
48. Hynninen, M., Pettila, V., Takkunen, O., Orko, R., Jansson, S.E., Kuusela, P., Renkonen, R. and Valtonen, M.  
**Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis**  
Shock, 2003. 20(1): p. 1-4.
49. Joyner, J.L., Augustine, N.H., Taylor, K.A., La Pine, T.R. and Hill, H.R.  
**Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion**  
J Infect Dis, 2000. 182(3): p. 974-7.
50. Kampalath, B., Cleveland, R.P. and Kass, L.  
**Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes**  
Clin Immunol Immunopathol, 1998. 87(1): p. 93-100.
51. Kox, W.J., Volk, T., Kox, S.N. and Volk, H.D.  
**Immunomodulatory therapies in sepsis**  
Intensive Care Med, 2000. 26 Suppl 1: p. S124-8.



52. Landmann, R., Muller, B. and Zimmerli, W.  
**CD14, new aspects of ligand and signal diversity**  
*Microbes Infect*, 2000. 2(3): p. 295-304.
53. Layseca-Espinosa, E., Perez-Gonzalez, L.F., Torres-Montes, A., Baranda, L., de la Fuente, H., Rosenstein, Y. and Gonzalez-Amaro, R.  
**Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis**  
*Pediatr Allergy Immunol*, 2002. 13(5): p. 319-27.
54. Lepenies, J.  
**Knochenmark**  
in *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Bühling, K.J., Lepenies, J. and Witt, K., Editors. 2000, Urban&Fischer: München, Jena. p. 377-390.
55. Lewis, L.L. and Jackson, A.L.  
**Monoclonal Antibodies: Differentiation Antigens Expressed on Leucocytes**  
in *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Rose, N.R., de Macario, E.C., Fahy, J.L., Frieman, H. and Penn, G.M., Editors. 1992, American Society of Microbiology: Washington DC. p. 157-163.
56. Long, S.S. and Swenson, R.M.  
**Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants**  
*J Pediatr*, 1977. 91(2): p. 298-301.
57. Lundell, A.C., Andersson, K., Josefsson, E., Steinkasserer, A. and Rudin, A.  
**Soluble CD14 and CD83 from human neonatal antigen-presenting cells are inducible by commensal bacteria and suppress allergen-induced human neonatal Th2 differentiation**  
*Infect Immun*, 2007. 75(8): p. 4097-104.
58. Mach, B.  
**MHC class II regulation--lessons from a disease**  
*N Engl J Med*, 1995. 332(2): p. 120-2.
59. Mackie, R.I., Sghir, A. and Gaskins, H.R.  
**Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract**  
*Am J Clin Nutr*, 1999. 69(5): p. 1035S-1045S.
60. Manroe, B.L., Weinberg, A.G., Rosenfeld, C.R. and Browne, R.  
**The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells**  
*J Pediatr*, 1979. 95(1): p. 89-98.

61. Marie, C., Fitting, C., Cheval, C., Losser, M.R., Carlet, J., Payen, D., Foster, K. and Cavaillon, J.M.  
**Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome**  
*Infect Immun*, 1997. 65(3): p. 865-71.
62. Marodi, L.  
**IL-12 and IFN-gamma deficiencies in human neonates**  
*Pediatr Res*, 2001. 49(3): p. 316.
63. Martin, H., Olander, B. and Norman, M.  
**Reactive hyperemia and interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis**  
*Pediatrics*, 2001. 108(4): p. E61.
64. Marwitz, P.A., Van Arkel-Vigna, E., Rijkers, G.T. and Zegers, B.J.  
**Expression and modulation of cell surface determinants on human adult and neonatal monocytes**  
*Clin Exp Immunol*, 1988. 72(2): p. 260-6.
65. Mason, D., Andre, P., Bensussan, A., Buckley, C., Civin, C., Clark, E., de Haas, M., Goyert, S., Hadam, M., Hart, D., Horejsi, V., Meuer, S., Morrissey, J., Schwartz-Albiez, R., Shaw, S., Simmons, D., Ugucioni, M., van der Schoot, E., Vivier, E. and Zola, H.  
**CD antigens 2001**  
*Immunology*, 2001. 103(4): p. 401-6.
66. Mathers, N.J. and Pohlandt, F.  
**Diagnostic audit of C-reactive protein in neonatal infection**  
*Eur J Pediatr*, 1987. 146(2): p. 147-51.
67. Mehr, S.S., Doyle, L.W., Rice, G.E., Vervaart, P. and Henschke, P.  
**Interleukin-6 and interleukin-8 in newborn bacterial infection**  
*Am J Perinatol*, 2001. 18(6): p. 313-24.
68. Moriguchi, N., Yamamoto, S., Isokawa, S., Andou, A. and Miyata, H.  
**Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 2: activation of granulocyte functions by cytokines**  
*Pediatr Int*, 2006. 48(1): p. 22-8.
69. Moriguchi, N., Yamamoto, S., Isokawa, S., Andou, A. and Miyata, H.  
**Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 1: flow cytometric analysis of granulocyte functions in whole blood**  
*Pediatr Int*, 2006. 48(1): p. 17-21.

70. Mortensen, R.F.  
**C-reactive protein, inflammation, and innate immunity**  
Immunol Res, 2001. 24(2): p. 163-76.
71. Ng, P.C., Li, G., Chui, K.M., Chu, W.C., Li, K., Wong, R.P. and Fok, T.F.  
**Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection**  
Biol Neonate, 2006. 89(2): p. 75-81.
72. Notarangelo, L.D., Panina, P., Imberti, L., Malfa, P., Ugazio, A.G. and Albertini, A.  
**Neonatal T4+ lymphocytes: analysis of the expression of 4B4 and 2H4 antigens**  
Clin Immunol Immunopathol, 1988. 46(1): p. 61-7.
73. Nupponen, I., Andersson, S., Jarvenpaa, A.L., Kautiainen, H. and Repo, H.  
**Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis**  
Pediatrics, 2001. 108(1): p. E12.
74. Oczenski, W., Krenn, H., Jilch, R., Watzka, H., Waldenberger, F., Koller, U., Schwarz, S. and Fitzgerald, R.D.  
**HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery**  
Intensive Care Med, 2003. 29(8): p. 1253-7.
75. Oliveira, E.B., Gotschlich, C. and Liu, T.Y.  
**Primary structure of human C-reactive protein**  
J Biol Chem, 1979. 254(2): p. 489-502.
76. Orlikowsky, T., Dannecker, G.E., Wang, Z., Horowitz, H., Niethammer, D. and Hoffmann, M.K.  
**Activation or destruction of T cells via macrophages**  
Pathobiology, 1999. 67(5-6): p. 298-301.
77. Orlikowsky, T.W., Dannecker, G.E., Spring, B., Eichner, M., Hoffmann, M.K. and Poets, C.F.  
**Effect of dexamethasone on B7 regulation and T cell activation in neonates and adults**  
Pediatr Res, 2005. 57(5 Pt 1): p. 656-61.
78. Orlowski, J.P., Sieger, L. and Anthony, B.F.  
**Bactericidal capacity of monocytes of newborn infants**  
J Pediatr, 1976. 89(5): p. 797-801.

79. Ottolini, M.C., Lundgren, K., Mirkinson, L.J., Cason, S. and Ottolini, M.G.  
**Utility of complete blood count and blood culture screening to diagnose neonatal sepsis in the asymptomatic at risk newborn**  
*Pediatr Infect Dis J*, 2003. 22(5): p. 430-4.
80. Payen, D., Faivre, V., Lukaszewicz, A.C. and Losser, M.R.  
**Assessment of immunological status in the critically ill**  
*Minerva Anesthesiol*, 2000. 66(10): p. 757-63.
81. Perry, S.E., Mostafa, S.M., Wenstone, R., Shenkin, A. and McLaughlin, P.J.  
**Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis?**  
*Intensive Care Med*, 2003. 29(8): p. 1245-52.
82. Petrides, P.E.  
**Immunsystem**  
in *Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler, G. and Petrides, P.E., Editors.  
1998, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. p. 1057-1086.
83. Quie, P.G.  
**Antimicrobial defenses in the neonate**  
*Semin Perinatol*, 1990. 14(4 Suppl 1): p. 2-9.
84. Reinsberg, J., Dembinski, J., Dorn, C., Behrendt, D., Bartmann, P. and van Der Ven, H.  
**Determination of total interleukin-8 in whole blood after cell lysis**  
*Clin Chem*, 2000. 46(9): p. 1387-94.
85. Reith, W., Steimle, V., Durand, B., Kobr, M. and Mach, B.  
**Regulation of MHC class II gene expression**  
*Immunobiology*, 1995. 193(2-4): p. 248-53.
86. Rodwell, R.L., Leslie, A.L. and Tudehope, D.I.  
**Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system**  
*J Pediatr*, 1988. 112(5): p. 761-7.
87. Russell, G.A., Smyth, A. and Cooke, R.W.  
**Receiver operating characteristic curves for comparison of serial neutrophil band forms and C reactive protein in neonates at risk of infection**  
*Arch Dis Child*, 1992. 67(7 Spec No): p. 808-12.
88. Salomon, B. and Bluestone, J.A.  
**Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation**  
*Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 225-52.

89. Schelonka, R.L. and Infante, A.J.  
**Neonatal immunology**  
Semin Perinatol, 1998. 22(1): p. 2-14.
90. Schelonka, R.L., Yoder, B.A., desJardins, S.E., Hall, R.B. and Butler, J.  
**Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants**  
J Pediatr, 1994. 125(4): p. 603-6.
91. Schmittel, A., Scheibenbogen, C. and Keilholz, U.  
**Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human monocytes**  
Scand J Immunol, 1995. 42(6): p. 701-4.
92. Schuchat, A., Zywicki, S.S., Dinsmoor, M.J., Mercer, B., Romaguera, J., O'Sullivan, M.J., Patel, D., Peters, M.T., Stoll, B. and Levine, O.S.  
**Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study**  
Pediatrics, 2000. 105(1 Pt 1): p. 21-6.
93. Shalekoff, S., Page-Shipp, L. and Tiemessen, C.T.  
**Effects of anticoagulants and temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human leukocytes**  
Clin Diagn Lab Immunol, 1998. 5(5): p. 695-702.
94. Speer, C.P., Gahr, M. and Johnston, R.B., Jr.  
**Funktion neonataler neutrophiler Granulozyten**  
Monatsschr Kinderheilkd, 1985. 133(9): p. 651-6.
95. Spits, H. and de Waal Malefyt, R.  
**Functional characterization of human IL-10**  
Int Arch Allergy Immunol, 1992. 99(1): p. 8-15.
96. Squire, E., Favara, B. and Todd, J.  
**Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases**  
Pediatrics, 1979. 64(1): p. 60-4.
97. St Geme, J.W., Jr., Murray, D.L., Carter, J., Hobel, C.J., Leake, R.D., Anthony, B.F., Thibeault, D.C., Ross, I.B. and Drage, J.S.  
**Perinatal bacterial infection after prolonged rupture of amniotic membranes: an analysis of risk and management**  
J Pediatr, 1984. 104(4): p. 608-13.
98. Stoll, B.J., Holman, R.C. and Schuchat, A.  
**Decline in sepsis-associated neonatal and infant deaths in the United States, 1979 through 1994**  
Pediatrics, 1998. 102(2): p. e18.

99. Tsegaye, A., Wolday, D., Otto, S., Petros, B., Assefa, T., Alebachew, T., Hailu, E., Adugna, F., Measho, W., Dorigo, W., Fontanet, A.L., van Baarle, D. and Miedema, F.  
**Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians**  
*Clin Immunol*, 2003. 109(3): p. 338-46.
100. Veleminsky, M., Jr., Stransky, P., Veleminsky, M., Sr. and Tosner, J.  
**Relationship of IL-6, IL-8, TNF and sICAM-1 levels to PROM, pPROM, and the risk of early-onset neonatal sepsis**  
*Neuro Endocrinol Lett*, 2008. 29(3): p. 303-11.
101. Volk, H.D., Thieme, M., Heym, S., Docke, W.D., Ruppe, U., Tausch, W., Manger, D., Zuckermann, S., Golosubow, A., Nieter, B. and et al.  
**Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies**  
*Behring Inst Mitt*, 1991(88): p. 208-15.
102. Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Rothhut, B., Huerta, J.M., Russo-Marie, F. and Fiers, W.  
**Defective IFN-gamma production in the human neonate. II. Role of increased sensitivity to the suppressive effects of prostaglandin E**  
*J Immunol*, 1985. 134(1): p. 172-6.
103. Weinberger, B., Vetrano, A.M., Syed, K., Murthy, S., Hanna, N., Laskin, J.D. and Laskin, D.L.  
**Influence of labor on neonatal neutrophil apoptosis, and inflammatory activity**  
*Pediatr Res*, 2007. 61(5 Pt 1): p. 572-7.
104. Weston, W.L., Carson, B.S., Barkin, R.M., Slater, G.D., Dustin, R.D. and Hecht, S.K.  
**Monocyte-macrophage function in the newborn**  
*Am J Dis Child*, 1977. 131(11): p. 1241-2.
105. Yektaei-Karin, E., Moshfegh, A., Lundahl, J., Berggren, V., Hansson, L.O. and Marchini, G.  
**The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn**  
*Pediatr Allergy Immunol*, 2007. 18(8): p. 643-51.
106. Zankovich, R. and Diehl, V.  
**Leukozytopenie und Leukozytose**  
in *Innere Medizin*, Classen, M., Diehl, V. and Kochsiek, K., Editors. 1998, Urban&Fischer: München, Wien, Baltimore. p. 161-165.

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Aufbau des MHC-Komplexes und der MHC-Proteine .....	6
Abb. 1.2:	Interaktion zwischen TCR und MHC-Komplexen .....	7
Abb. 2.1:	Emissionsspektrum der verwendeten Fluochrome .....	22
Abb. 2.2:	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers .....	22
Abb. 2.3:	Beads und Regression:.....	25
Abb. 2.4:	Vollblutprobe im FSC/SSC Dot Plot mit Zellpopulationen .....	26
Abb. 2.5:	Mit QuantiBRITE™-Assay markierte Blutprobe .....	27
Abb. 3.1:	HLA-DR-Beladung von Monozyten .....	35
Abb. 3.2:	HLA-DR nicht infizierter Reifgeborener nach Lebensalter I .....	36
Abb. 3.3:	HLA-DR-Beladung von nach Lebensalter II .....	37
Abb. 3.4:	Log-Normalverteilung der Residuen .....	38
Abb. 3.5:	Logarithmische Darstellung HLA-DR-Beladung .....	39
Abb. 3.6:	HLA-DR-Beladung versus Geschlecht.....	40
Abb. 3.7:	HLA-DR-Beladung versus Geburtsgewicht.....	40
Abb. 3.8:	HLA-DR-Beladung versus Geburtsmodus. ....	41
Abb. 3.9:	HLA-DR-Beladung versus CrP.....	42
Abb. 3.10:	HLA-DR-Beladung versus Leukozytenzahl.....	43
Abb. 3.11:	HLA-DR-Beladung versus I/T-Quotient.....	44
Abb. 3.12:	HLA-DR-Beladung versus IL-8.....	45
Abb. 3.13:	HLA-DR-Beladung des EOBI-Kollektivs I.....	46
Abb. 3.14:	HLA-DR-Beladung EOBI Reifgeborene II .....	47
Abb. 3.15:	HLA-DR Reifgeborene versus Frühgeborenen (33.-37. SSW)....	48
Abb. 3.16:	HLA-DR nach ex vivo-Stimulation mit IFN- $\gamma$ , OKT3 und IL-10 ....	50

## V. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Aktivierung von Makrophagen.....	1
Tab. 1.2:	Zusammenstellung der Funktionen von Makrophagen .....	3
Tab. 1.3:	Early-onset versus late-onset Infektion .....	12
Tab. 1.4:	Referenzwerte etablierter Infektparameter mit Referenzbereich.	13
Tab. 2.1:	Erfasste Parameter .....	18
Tab. 2.2:	Patientenkollektive .....	18
Tab. 2.3:	Zuteilungskriterien.....	20
Tab. 2.4:	Farbstoffe.....	21
Tab. 2.5:	Monoklonale Antikörper .....	31
Tab. 2.6:	Reagenzien/Substanzen .....	32
Tab. 2.7:	verwendete Geräte .....	33
Tab. 2.8:	Sonstige Materialien .....	33
Tab. 3.1:	Zusammensetzung des Kollektivs für Referenzwerte .....	34
Tab. 3.2:	Messungen nach Lebensalter.....	36
Tab. 3.3:	Zusammensetzung des EOBI-Kollektivs.....	46



## **VI. Danksagung**

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Orlikowsky an der Neonatologischen Klinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen erstellt. Für seine Motivation, seine Geduld und seinen Optimismus möchte ich mich ebenso wie auch für den fachlichen Beistand, mit dem er mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite stand, herzlich bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. C. F. Poets, in dessen Abteilung diese Arbeit entstehen durfte, für seine Korrektur und konstruktive Kritik.

Ohne die tatkräftige Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Bärbel Spring wären meine Bemühungen wohl schon in ihren Anfängen erstickt worden. Ihr gilt mein aufrichtiger Dank für die praktische Anleitung im Labor, ihre aufmunternden Worte und ihre freundliche Art, mit der sie im Labor eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen vermochte.

Für diese angenehme Atmosphäre, die Gespräche und gegenseitige Motivation danke ich außerdem meinen Mitdotorandinnen Jutta Bauhammer, Judith Spreemann und Lena Tewes.

Herrn Prof. Dr. M. Eichner (Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen) danke ich für die Beratung und Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank jedoch geht an meine Eltern, die mich in meinem Werden ununterbrochen unterstützt, mir alles ermöglicht haben und die immer an mich glauben; und zu guter Letzt natürlich meiner Frau Judith, die mich motivierte und mir half durchzuhalten und ohne die diese Arbeit sicherlich nie zu einem Ende gefunden hätte.