

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
Direktor: Prof. Dr. med. L. Gortner
Prof. Dr. Dres. h. c. F. C. Sitzmann

Procalcitonin (PCT) als Infektionsmarker bei Frühgeborenen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

vorgelegt von:
Jochen Jörn Cäsar
geb. am 04.03.1972 in Leonberg

| | |
|---|-----------|
| 1.ZUSAMMENFASSUNGEN | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung (deutsch) | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung (englisch)..... | 3 |
| PATIENT AND METHODS..... | 3 |
| 2. EINLEITUNG..... | 5 |
| 2.1 Calcitonin und Procalcitonin (PCT)..... | 5 |
| 2.2 PCT Peptidstruktur und Biosynthese..... | 6 |
| 2.2.1 Peptidstruktur..... | 6 |
| 2.2.1 Biosynthese von PCT | 7 |
| 2.3.1 Die Familie der Calcitonin-Gene..... | 8 |
| 2.3.2 Induktion, Regulation und Synthese von PCT im Vergleich zu Zytokinen..... | 10 |
| 2.3.3 Elimination und Proteolyse von PCT im Plasma..... | 15 |
| 2.4 Wirkung von Calcitonin (CT) und Procalcitonin (PCT)..... | 15 |
| 2.4.1 Wirkung des Endhormons Calcitonin (CT) | 15 |
| 2.4.2 Wirkung von PCT auf den Calcium- und Phosphathaushalt..... | 16 |
| 2.4.3 PCT und NO | 17 |
| 2.4.5 PCT als möglicher Letalfaktor im tierexperimentellen Modell..... | 17 |
| 2.4.6 PCT mit anti-inflammatorischer Funktion..... | 18 |
| 2.4.7 Normalwerte und Referenzbereiche..... | 18 |
| 2.5 Fragestellung der Arbeit und Studiendesign..... | 20 |
| 2.5.1 Fragestellung | 20 |
| 2.5.2 Studienaufbau..... | 20 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN..... | 22 |
| 3.1 Material..... | 22 |
| 3.1.1 PCT- Meßkit LUMItest und Basiskit , Fa. Brahms Diagnostica, Berlin | 22 |
| 3.1.2 Geräte..... | 23 |
| 3.1.3 Auswertung..... | 23 |
| 3.2 Methoden..... | 24 |
| 3.2.1 Die laborchemische Bestimmung von PCT mittels ILMA..... | 24 |
| 3.2.1.1 Übersicht..... | 24 |
| 3.2.1.2 Probenbehandlung..... | 25 |
| 3.2.1.3 allgemeine Vorbereitungen | 26 |
| 3.2.1.4 Testvorbereitung der coated tubes..... | 26 |
| 3.2.1.5 Entfernen des überschüssigen Tracers | 27 |
| 3.2.1.5 Messung..... | 27 |
| 3.2.2 CRP-Bestimmung, Routine-Labor | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3 Plazentahistologie..... | 28 |
| 3.3 Auswertung..... | 29 |
| 3.3.1 Statistik..... | 29 |
| 4. ERGEBNISSE | 30 |
| 4.1 Verteilung der gemessenen Werte und explorative Datenanalyse | 30 |
| 4.2.1 ROC-Kurven für histopathologisch gesichertes AIS..... | 37 |
| 4.2.2 ROC-Kurven für gesicherte AIS und / oder mütterliche Infektionszeichen..... | 38 |
| 4.3 Drop-outs und Kasuistiken..... | 42 |
| 5. DISKUSSION | 45 |
| 5.1.1 Verteilung der PCT Werte..... | 45 |
| 5.1.2 PCT und Hypoxie | 46 |
| 5.2 Vergleich PCT und CRP | 47 |
| 5.3 Klinische Bedeutung | 48 |
| 5.3 Ausblick | 48 |
| 5.4 Anhang | 49 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 51 |
| 7. PUBLIKATION | 55 |
| 8. DANKSAGUNG..... | 55 |
| 8. LEBENS LAUF | 56 |

| | |
|-------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AIS | Amnioninfektionssyndrom |
| AK | Antikörper |
| APGAR | (-Index): Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen und Reflexe eines NG |
| AS | Aminosäuren |
| ca. | circa |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CALC | Calcitonin Gen |
| CD | cluster of differentiation, cluster determinants |
| CT | Calcitonin |
| CTpr | Calcitonin precursor |
| CGRP | Calcitonin-Gene-Related Peptide |
| CMV | Cytomegalivirus |
| CRP | C-reaktives Protein |
| dl | Deziliter |
| FG | Frühgeborene |
| Hb | Hämoglobin |
| IL | Interleukin |
| ILMA | immunoluminometrischer Assay |
| IUGR | Intrauterine growth retardation |
| l | Liter |
| LBP | Liposaccharide-binding-protein |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LT | Lebenstag |
| mg | Milligramm |

| | |
|-------|------------------------------------|
| ml | Milliliter |
| mRNA | messenger-Ribonukleinsäure |
| ng | Nanogramm |
| NG | Neugeborenes |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PCT | Procalcitonin |
| RLU | Relative light units |
| ROC | Receiver operating characteristics |
| rpm | Rotations per minute |
| SGA | Small for gestational age |
| SSW | Schwangerschaftswochen |
| Std. | Stunden |
| Tab. | Tabelle |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| µl | Mikroliter |
| V. a. | Verdacht auf |
| PC | Prohormon Convertase |

1. Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung (deutsch)

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage nach der Validität von Procalcitonin (PCT) als Inflammationsparameter bei Frühgeborenen (FG) zur Sicherung eines Amnioninfektionssyndroms (AIS) bzw. einer Early-onset-Sepsis in Abhängigkeit von maternalen Faktoren untersucht werden.

Fragestellung

Bestimmung der Spezifität und Sensitivität von PCT und CRP gegenüber dem histologisch gesicherten AIS der Plazenta, bzw. mütterlichen Infektionszeichen mittels ROC- Kurven.

Material und Methoden

Es wurden 52 FG \leq 36 SSW in einer offenen prospektiven Studie einbezogen.

15 FG (Gruppe A) ohne Anzeichen eines histopathologischen oder klinischen AIS dienten als Kontrollgruppe.

15 FG (Gruppe B) wiesen histopathologisch eine gesicherte Chorioamnionitis oder Plazentitis auf.

17 FG (Gruppe C) hatten deutliche mütterliche klinische und laborchemische Hinweise auf ein AIS (Fieber, CRP-Erhöhung, vorzeitiger Blasensprung, grünes Fruchtwasser, Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie der Mutter, etc.), aber noch nicht ausgeprägte oder unauffällige histopathologische Befunde einer Inflammation im Bereich der Plazenta bzw. der Eihäute.

Ergebnisse

5 FG wurden von der Auswertung ausgeschlossen (2 FG wegen unvollständigen Befunden, 1 FG mit gesicherter konnataler CMV Infektion, 1 FG mit V. a. nosokomiale Late-onset-Sepsis, 1 FG mit Blut- und Fruchtwasseraspiration). Bestimmung von PCT und CRP zeitnah nach der Geburt innerhalb des Routine Labors während der ersten Lebenstage.

Untersuchungsgegenstand war der maximale CRP-, bzw. PCT-Anstieg innerhalb der ersten vier Lebenstage im Bezug zu den mütterlichen Risikofaktoren eines AIS. Initial ergab die Betrachtung der gesamten PCT-Werte der ersten Lebenswoche eine allgemeine Erhöhung der PCT-Werte während des 2. bis 3. Lebenstages. Erstellt wurden PCT-Perzentilenkurven für erste Lebenswoche der Kontrollgruppe.

Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe A (n=15) und der Gruppe B (n=15) mit der histologisch gesicherten AIS ergab eine ähnliche Sensitivität und Spezifität für PCT (87 % u. 47 % bei einem Cut-off-Wert von 0,55 ng/ml) und CRP (80 % u. 47 % bei einem Cut-off-Wert von 1,05 mg/l).

Nimmt man nun die Gruppe mit den entzündlichen Veränderungen innerhalb der Plazenta und die Gruppe mit den klinischen mütterlichen Entzündungszeichen, sowie den vorzeitigen Blasensprung als mögliche Vorstufe des AIS in die Auswertung hinzu (Gruppe B+C, n=32), schneidet PCT im Gegensatz zu CRP bezüglich Sensitivität und Spezifität in dieser Untersuchung etwas besser ab PCT (91 % u. 47 % bei 0,5 ng/ml) und CRP (72 % u. 47 % bei 1,0 mg/l). In dieser Gruppe zeichnete sich ebenfalls ein gewisser zeitlicher Vorteil von PCT gegenüber CRP ab. PCT erkannte in Gruppe C in 7 von 10 Fällen die Risikofaktoren für ein AIS ca. 1 Tag vor einem signifikantem CRP Anstieg.

Schlussfolgerung

Bei ausreichender Sensitivität und Spezifität könnte der zeitliche Gewinn durch PCT bei FG mit Ihrem doch relativ geringen Geburtsgewicht und der damit verbundenen extrem kurzen Latenzzeit von einer bakteriellen Infektion bis zur Sepsis als ein Vorteil gegenüber CRP bei einer möglichst frühzeitigen Therapieentscheidung gewertet werden.

1.1 Zusammenfassung (englisch)

The present paper focuses on the validity of Procalcitonin (PCT) as an inflammatory marker in premature newborns. We evaluate the validity of PCT in chorioamnionitis and early-onset sepsis due to maternal factors.

We evaluated the specificity and sensitivity of PCT and CRP in relation to histologically secured chorioamnionitis, respectively the apparent maternal infection by ROC-analysis.

patient and methods

We started an open prospective study with 52 premature newborns.

We used 15 patients with no signs of chorioamnionitis and clinical signs of maternal infection as control group (group A).

Histologically secured chorioamnionitis was present in 15 patients (group B).

17 patients had obvious signs of maternal infection (e.g. fever, CRP-elevation, preterm rupture of membranes, need of antibiotic therapy) but no or only slight signs of a histological chorioamnionitis.

results

5 patients were excluded (2 because of incomplete data, 1 had a secure congenital CMV-infection, 1 had a nosocomial infection of *Klebsiella*, 1 had a blood- and amniotic fluid aspiration).

We measured PCT and CRP postnatally and during the first days of life together with the routine blood tests. Then we evaluated the maximum peaks of CRP and PCT values of the first 4 days in relation to chorioamnionitis or maternal signs of infection. Initially we saw a general elevation of the PCT values at day 2 and 3. So we calculated percentiles for PCT values for the first week of life.

Discussion

The comparison between control group A and group B with histologically secured chorioamnionitis revealed a similar sensitivity and specificity for PCT.

(87 % and 47 % at a cut-off value of 0.55 ng/ml) and CRP (80 % and 47 % at a cut-off-value of 1.05 mg/l). Taking the group with the clinical signs of maternal infection

(n=17) together with the group with the histological chorioamnionitis (n=15, group B) we had a new group C (n=32). Our evaluation showed an advantage in comparison to CRP in respect to sensitivity (PCT (91 % and 47 % at 0.5 ng/ml) and CRP (72 % and 47 % at 1.0 mg/l).

This group also showed a time advantage for PCT in comparison to CRP in 7 of 10 cases within group C. PCT recognized risk factors for Infection or histological chorioamnionitis approximately 24h before a relevant CRP increase was measured.

Conclusion

Premature newborns have a higher risk of suffering a severe infection or sepsis in a very short time.

In comparison to CRP the gain of time in using PCT as an additional inflammatory marker, may be an advantage to premature newborns.

2. Einleitung

2.1 Calcitonin und Procalcitonin (PCT)

Auf der Suche nach zuverlässigen Infektionsparametern ist Procalcitonin (PCT) als ein Vorläufermolekül (CTpr) des Calcitonins in den letzten Jahren in den Vordergrund des Interesses getreten (Müller B 2001).

In der Erwachsenenmedizin wird PCT zunehmend zur Beurteilung von schweren Infektionen (Castelli *et al.* 2004), Multiorganversagen (Meisner & Tschaikowsky 1996), Polytraumen (Meisner *et al.* 2006), sowie als Verlaufspareter des infektiologischen (Meisner & Tschaikowsky 1996) und postoperativen Monitorings eingesetzt (Rau & Schilling 2004).

Calcitonin wirkt inhibitorisch auf die Knochenresorption durch Reduktion der Osteoklastenaktivität, vermehrte Kalziumexkretion der Nieren, daher der pharmakologische Einsatz von Calcitonin bei M. Paget und hyperkalzämischen Krisen etc.

Eine vermehrte Calcitonin Produktion, (z. B. im Pentagastrin-Test) ist als Marker für ein medulläres Schilddrüsenkarzinom bekannt (Brook 2000; Stolecke 1997).

Die Biosynthese von Calcitonin findet regulär in den C-Zellen der Schilddrüse durch Proteolyse von Procalcitonin statt. Bei systemischen bakteriellen Infektionen findet man aber auch intaktes Procalcitonin im Blutplasma (Assicot M. 1993).

Nach intravenöser Gabe von Endotoxinen (LPS) aus gram-negativen Bakterien zeigten initial gesunde Probanden klinisch sepsisartige Zeichen wie Fieber, Schüttelfrost, Myalgien, und Muskelkrämpfe. In den Blutproben fanden sich erhöhte Konzentrationen von PCT, nicht aber von Calcitonin im Plasma (Dandona *et al.* 1994).

Die extrathyroidale Herkunft ist derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung. Es gibt Hinweise, dass das Hepato-Splanchnikusstromgebiet unter systemischen bakteriellem Kontakt vermehrt Procalcitonin in den Blutkreislauf ausschüttet (Silomon *et al.* 1999). Die Expression von Calcitonin mRNA in der Leber ist hingegen schon seit längerem bekannt (Bracq 1993).

2.2 PCT Peptidstruktur und Biosynthese

2.2.1 Peptidstruktur

Procalcitonin, ein Protein aus 116 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 16 000 Dalton, besteht aus einer Signalsequenz, dem N-PCT als N-terminale Region, der mittleren Calcitoninsequenz und dem Katalcalcin als C-terminale Region (Abb 1).

Es stellt so die Form des Prohormons von Calcitonin dar, welches nach Abspaltung von Katalcalcin und Aminoprocalcitonin (N-ProCT) durch Endopeptidasen und Amidierung schließlich noch aus 32 Aminosäuren besteht (Meisner M 2000).

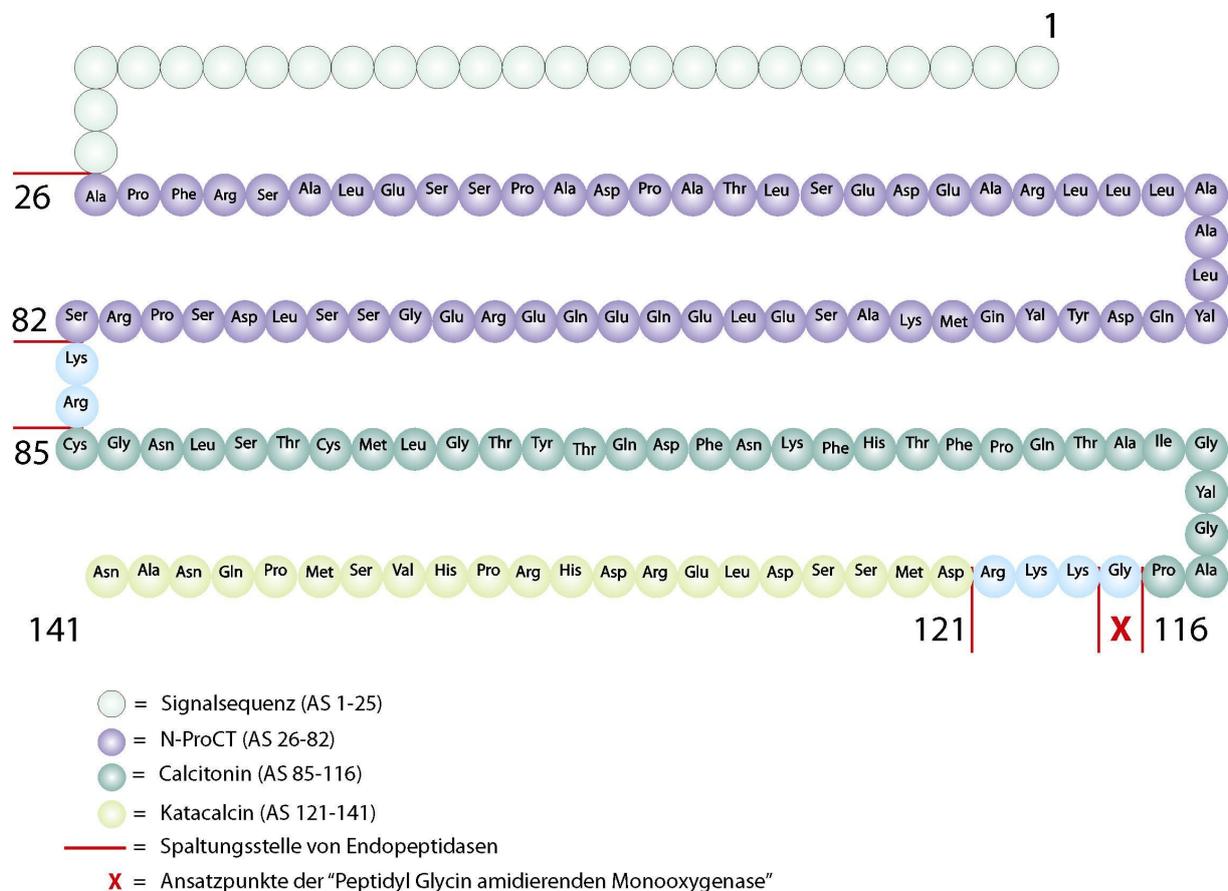


Abb 1: Schematische Peptidstruktur von Preprocalcitonin (AS 1-141) und Aminosäuresequenz von PCT (AS 26-141)

(nach (Le Moullec & Jullienne A 1984).

2.2.1 Biosynthese von PCT

Der Syntheseweg von Procalcitonin und Calcitonin beginnt mit der Transkription des CALC-1 Genes. Nach Prozessierung der RNA entsteht eine mRNA, die ein 141 Aminosäuren (AS) umfassendes Vorläuferpeptid (Preprocalcitonin) codiert (Le Moullec & Jullienne A 1984).

Durch spezifische Proteolyse wird aus diesem Peptid zunächst Procalcitonin (116 AS) gebildet. Im normalen hormonellen Syntheseweg findet dies in den C-Zellen der Schilddrüse statt.

Innerhalb des Polypeptids von PCT aus 116 AS befindet sich an Position 60 bis 91 die Aminosäuresequenz von Calcitonin. Die Calcitoninsequenz wird durch basische Aminosäuren flankiert (Lys-Arg und Gly-Lys-Lys-Arg), die das Signal für eine spezifische Proteolyse durch das Enzym Prohormon Convertase (PC) darstellen. Durch die Tätigkeit der PC entstehen die Hauptbruchstücke von Procalcitonin: N-PCT (57 AS), Calcitonin (32 AS) und Katalcalcin (21 AS), sowie entsprechende Kombinationen.

Das eigentliche Hormon Calcitonin (32 AS) bekommt seine endgültige Form erst unmittelbar nach weiterer Proteolyse und durch Bildung einer Ringstruktur über Disulfidbrücken (Cys-Cys) sowie der Abspaltung des C-terminalen Glycins (AD 3, Carboxypeptidase) und nachfolgender Amidierung (Peptidyl Glycin amidierende Monooxygenase, PAM).

Beim gesunden Menschen wird das Hormon Calcitonin an das zirkulierende Blut abgegeben. Calcitonin hat im Blut eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten (Meisner & Tschaikowsky 1996).

2.3.1 Die Familie der Calcitonin-Gene

Aus der Familie der Calcitonin-Gene sind bisher 4 Gene bekannt (CALC-I bis CALC-IV), die zu unterschiedlichen Genprodukten führen auf die im Folgenden eingegangen werden wird. Ihre Gemeinsamkeit sind Sequenzhomologien zum Hormon Calcitonin. Für die Calcitoninbiosynthese und auch für die Biosynthese von Procalcitonin bei verschiedenen Infektionen ist wahrscheinlich das sogenannte CALC-I Gen verantwortlich (Meisner M 2000).

Die übrigen 3 Gene (CALC-II bis CALC -IV) sind für die Calcitoninsynthese ohne Bedeutung.

Das CALC-II-Gen ist ähnlich dem CALC-I-Gen strukturiert. Eine Sequenzanalyse zeigt, dass die Synthese einer Calcitonin-mRNA unwahrscheinlich ist. CALC-II ist ein strukturelles Gen für CGRP-II. CGRP-II unterscheidet sich von CGRP-I in 3 Aminosäuren.

Das CALC-III Gen ist möglicherweise ein Pseudogen und transkribiert kein Protein.

Das CALC-IV Gen enthält nur 3 Exons und codiert das Amylin-Gen. Das Peptid Amylin hat 46% Sequenzhomologien mit CGRP. Amylin ist ein funktioneller Gegenspieler von Insulin.

Das Calcitonin-I Gen (CALC-I) war eines der ersten Beispiele für alternatives Splicing der transkribierten RNA eines einzelnen Gens zu unterschiedlicher mRNA in verschiedenen Geweben (Kelley MJ 1994).

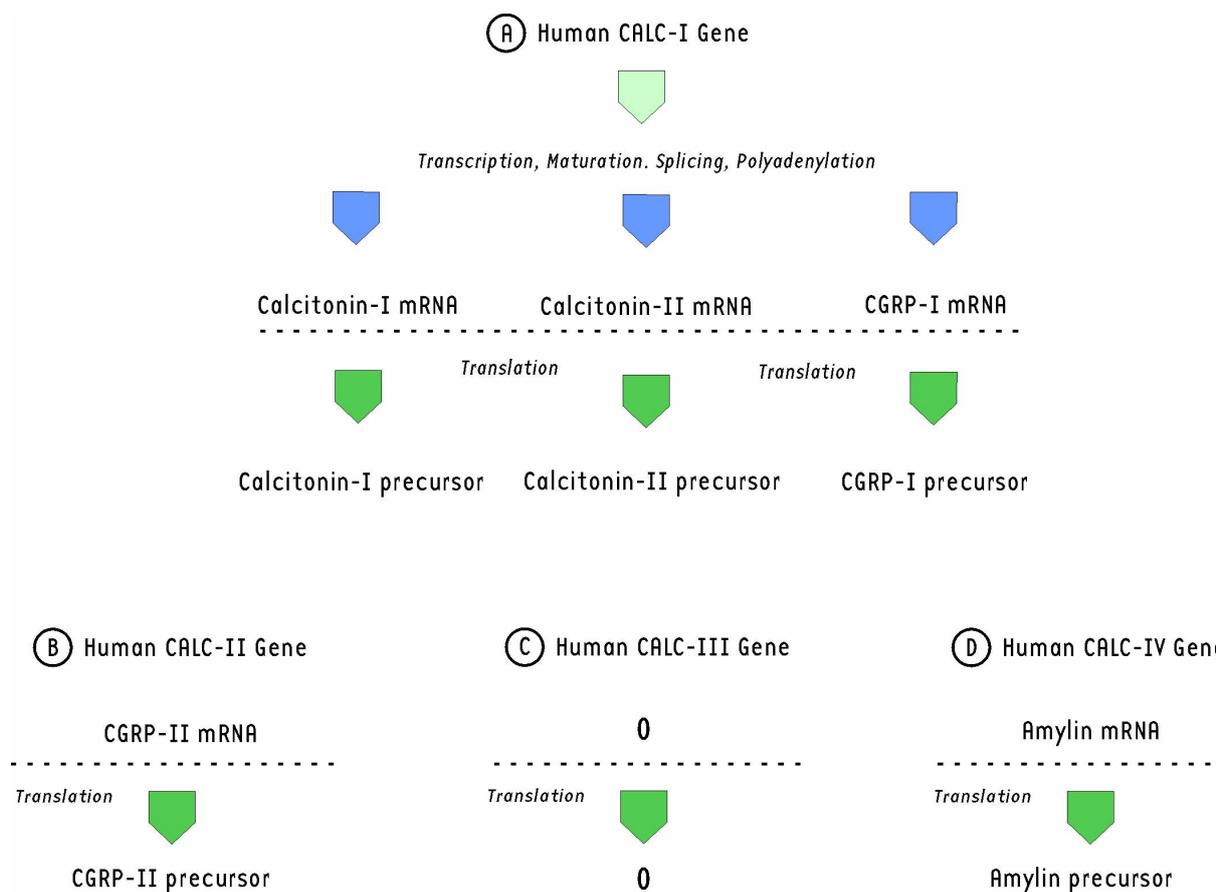


Abb 2: Übersicht über die Calcitonin-Gen Familie (CALC-I bis CALC-IV Gen) und deren Genprodukte

(nach (Stuart E Leff 1982; Yoshimitsu Kiriayama 2002))

Calcitonin-mRNA ist das Hauptprodukt der CALC-I-Transkription in den C-Zellen der Schilddrüse, während die Calcitonin-Gen-Related Peptide-1-messenger RNA (CGRP-I mRNA) hauptsächlich in Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems gebildet wird (Kelley MJ 1994; Meisner M 2000).

Das CALC-I-Gen codiert 6 Exons, die nach Transkription, Reifung, Splicing und Polyadenylierung zu drei unterschiedlichen mRNAs kombiniert werden können. Möglichkeiten I und II des Splicingvorgangs führen nach der Translation zu Preprocalcitonin, wobei die entstehenden Proteine sich ausschließlich in der Sequenz des carboxyterminalen Peptids I und II unterscheiden. Bei der dritten Option verliert die RNA während des Splicingprozesses die Calcitoninsequenz und codiert stattdessen die CGRP-Sequenz. CGRP ist ein stark vasodilatatives Peptid,

ohne Einfluss auf den Calcium- und Phosphathaushalt. CGRP wurde besonders in Nervenfasern, die mit der glatten Muskulatur von Blutgefäßen in Verbindung stehen, nachgewiesen. ProCGRP und PCT enthalten teilweise identische n-terminale Aminosäuresequenzen.

Weitere Splicing-Varianten mit zusätzlichen mRNA-Produkten und ihren entsprechenden Translationsprodukten werden momentan als sehr wahrscheinlich angesehen (Stuart E Leff 1982; Yeakley 1993).

2.3.2 Induktion, Regulation und Synthese von PCT im Vergleich zu Zytokinen

Die Induktion proinflammatorischer Zytokine durch Endotoxin beginnt mit der spezifischen Bindung und Komplexbildung von Endotoxin mit Liposaccharide-binding protein (LBP) im Plasma. LBP vermag das Endotoxin an membranständige mCD14- oder gelöste sCD14-Moleküle abzugeben. mCD14 ist ein Glykoprotein, das sich auf der Zelloberfläche aller reifen myeloischen Zellen befindet und zunächst als Differenzierungsantigen diente. CD14 hat keine transmembranöse Domäne, so sind zur Aktivierung der Signaltransduktion noch Toll-like Rezeptoren (TLR) erforderlich. Diese TLR sind wesentliche Erkennungsmoleküle der natürlichen Immunabwehr. Von den bisher 10 verschiedenen TLR sind für die Pathogenese der Sepsis insbesondere TLR2, TLR4 und TLR9 interessant. So binden die Antigene von gram-positiven Erregern hauptsächlich an den TLR2 (Feezor RJ & Oberholzer C 2003).

Die intrazelluläre Signalverarbeitung nach TLR4 Aktivierung wird vorwiegend durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt und führt zur Anschaltung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und Chemokinen wie IL-8, aber auch von Adhäsionsmolekülen, reaktiven Sauerstoff und Stickoxiden (NO).

Die lösliche Form sCD14 bindet ebenfalls spezifisch an Endotoxin und so kann auch die Aktivierung von CD14-negativen Zellen, wie Endothelzellen und glatte Muskelzellen durch Endotoxin vermittelt werden (Werdan K & Schuster H-P 2005).

Durch bakterielle Infektionen und durch Endotoxin induziertes, im Blut zirkulierendes Procalcitonin wird nach heutigem Kenntnisstand vermutlich nicht aus den C-Zellen der Schilddrüse abgegeben.

Als Hauptsyntheseort von PCT wurden im Infektionsfall gewebsständige Zellen wie Makrophagen und monozytäre Zellen verschiedener innerer Organe vermutet. Die mRNA von Calcitonin-Precursor-Molekülen wurden bereits 1993 in der Leber nachgewiesen. Selbst die Hypophyse ist nach Stimulation mit LPS als Syntheseort erkannt, dies zeigen zumindest Untersuchungen der CT-mRNA Expression der Hypophyse im Tiermodell (Yoshimitsu Kiriyama 2002).

In vitro-Modelle zur Induktion von PCT zeigten eine Zunahme von PCT-mRNA in peripheren mononukleären Zellen des Blutes. Die Stärke der Induktion erfolgte in absteigender Reihenfolge von Endotoxin, TNF- α , IL-6, IL-1 β über IL-2 zu Phytohemagglutinin (Oberhoffer *et al.* 1999).

Aber auch andere Zellen kommen als mögliche Quellen für eine PCT-Synthese in Frage. Nicht nur Leukozyten oder neurokrine Zellen innerer Organe wie der Lunge (Nylen ES *et al.* 1996) und des Intestinums können Calcitonin und seine Vorläuferpeptide synthetisieren, auch in anderen Zellarten konnte z.B. kürzlich eine induzierbare mRNA-Produktion am Modell des Hamsters nachgewiesen werden (in-situ-Hybridisierung). In verschiedenen Arten humaner Leukozyten wurde ein intrazelluläres Vorkommen von Katalcalcin und Calcitonin mittels Flow-zytometrischer Analyse (FACS) festgestellt. Ob die von Zellen freigesetzten PCT-Mengen jedoch ausreichen, die Induktion von PCT bei septischen Patienten zu erklären, ist nicht gesichert (Meisner M 2000).

In einer computergestützten Analyse der bisher bekannten Sequenz der Promotorregion des CALC-I-Gens zeigte sich, dass zumindest theoretisch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die durch Inflammation aktiviert werden, hier binden und möglicherweise so die Transkription beeinflussen. Dies könnte zur Erklärung der inflammatorisch-aktivierten Induktion von PCT beitragen (Meisner M 2000).

Eine Endotoxinausschüttung im Rahmen einer bakteriellen Infektion induziert eine allgemeine Steigerung der CALC-I Genexpression in vielen Bereichen des Körpers und bewirkt innerhalb von 2 – 6 Std. eine PCT-Erhöhung. Während einer Sepsis ist die Transkription von Calcitonin precursor mRNA (CTpr-mRNA) einheitlich steiler hoch reguliert, ähnlich wie die mRNA der klassischen Zytokine (z. B. TNF- α , IL-6) (Müller B *et al.* 2001). Interessanterweise ist die Expression in den Leukozyten weniger ausgeprägt als bisher erwartet (Monneret G *et al.* 1999; Müller B *et al.* 2001). Die größere CTpr mRNA Induktion und Freisetzung von CTpr von parenchymatösen Zellen im Vergleich zu Leukozyten weist so eher auf eine gewebsständige Reaktion hin.

Daher wurde für die CALC-I Genprodukte wie PCT der Begriff der „Hormokine“ geprägt, die einerseits dem klassischen Expressionspfad der Hormonsynthese folgen, andererseits alternativ wie Zytokine exprimiert werden. Die Produktion dieser Hormokine wird von bisher nicht bekannten Faktoren vermittelt. Entweder direkt durch den Endotoxinkontakt oder indirekt über eine humoral- oder zellvermittelte Immunantwort. Der Überschuss der CT Vorläufermoleküle im Falle einer Sepsis gegenüber dem reifen CT weist auf eine Zelldegranulation unter Umgehung der intrazellulären enzymatischen Reifung hin.

Die geringe Zellspeicherung von Calcitoninvorstufen wie z. B. PCT während einer Sepsis ist charakteristisch für Zytokine (Müller B *et al.* 2001).

Zu beachten ist in diesem Zusammenhang auch, dass es eine Möglichkeit der Modulation der CT-Precursors-Ausschüttung durch Antiphlogistika wie z. B. Ibuprofen gibt. Durch die fehlende Zytokinsuppression durch Prostaglandine konnten z. B. erhöhte TNF- α und CT-Precursor Ausschüttungen nach Gabe von Endotoxin und Ibuprofen beim Menschen beobachtet werden. In 27 % konnte eine Suppression von TNF- α durch CT-Precursors beobachtet werden. In wie weit CT-Precursors einen gegenregulatorischen Effekt gegenüber TNF- α haben ist noch nicht vollständig geklärt. Dies sollte bei der Beurteilung von PCT-Werten in der Praxis berücksichtigt werden (Preas *et al.* 2001).

Da intrazellulär die gezielten proteolytischen Spaltungen von PCT im Golgi-Apparat unter dem Einfluss von Zytokinen und Endotoxinen unterbleiben, werden die

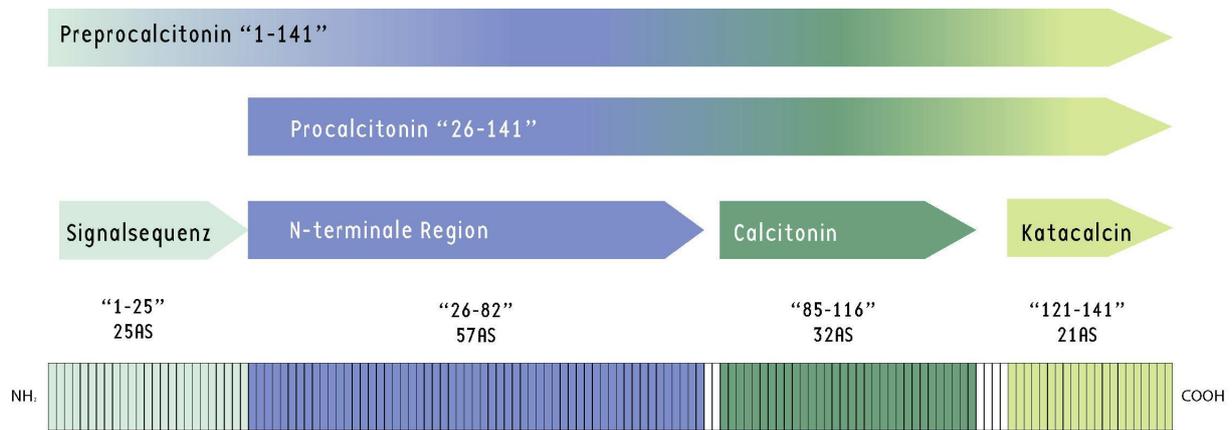
unprozessierten Vorläuferproteine, darunter Procalcitonin und seine Fragmente, an das zirkulierende Plasma abgegeben. Parallel wird die Transkription der mRNA von PCT durch inflammatorische Stimuli deutlich erhöht (Whang KT *et al.* 1998).

Diese Spaltung findet bei inflammatorisch induziertem PCT nicht statt, so dass intaktes PCT im Plasma erscheint. Interessant ist, dass gerade in den Regionen zwischen diesen Bruchstücken Aminosäuresequenzen vorkommen, die für eine spezifische Phosphorylierung geeignet sind. Die Möglichkeit einer inflammatorisch aktivierten Phosphorylierung von PCT könnte ursächlich für das Vorkommen von intaktem PCT im Plasma bei Sepsis und Infektionen sein. Vorläufig bisher nicht bestätigte Untersuchungen zeigen, dass die Aminosäurekette von PCT N-terminal auch um einige Aminosäuren verkürzt sein kann, was die Messwerte der verwendeten Methode allerdings nicht beeinflusst (Meisner M 2000).

Bei systemischer Inflammation infolge schwerer bakterieller Infektionen sowie bei Schock und Multiorganversagen finden sich dann hohe Konzentrationen der stabilen Calcitonin-Precursor-Peptide im Blut ohne Hinweis auf eine entsprechende Sekretion von Calcitonin. PCT ist ein Hauptvertreter dieser Vorläuferpeptide und hat im Plasma eine relativ lange Halbwertszeit von mindestens 20 bis 24 Stunden (Dandona *et al.* 1994).

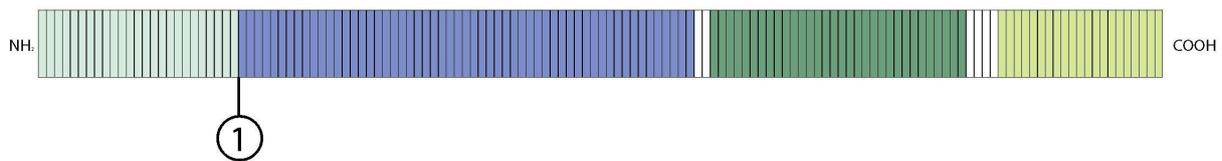
Neben PCT treten bei Infektionen immer auch andere Spaltprodukte des Prohormons im Plasma auf, das intakte PCT stellt jedoch einen wesentlichen Anteil der Calcitonin-Vorläuferpeptide dar.

Die schematische Peptidsequenz und proteolytische Spaltung der beteiligten Peptide sind im Folgenden schematisch dargestellt (Abb. 3).



Preprocalcitonin

- 1 Abspaltung des Signalpeptids



Procalcitonin (PCT)

- 2 Abspaltung von Katacalcin und N-PCT

- 3 Bildung einer Ringstruktur durch Disulfidbrücken

- 4 Abspaltung Glycin und Amidierung

Calcitonin

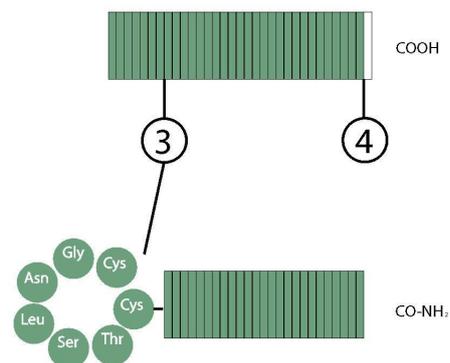


Abb. 3: Schematische Peptidsequenz von PCT und Darstellung der proteolytischen Spaltung von PCT

(nach (Müller B 2001))

2.3.3 Elimination und Proteolyse von PCT im Plasma

Ein spezifischer Eliminationsweg von PCT ist bisher nicht bekannt. Wahrscheinlich wird PCT, wie andere Plasmaproteine, durch Proteolyse abgebaut.

PCT ist relativ stabil und hat im Plasma eine Halbwertszeit von ca. 20 bis 24 Stunden. Ob eine mögliche Glykosylierung des Proteins einen Schutz vor Proteolyse darstellt, ist für inflammatorisch induziertes PCT bisher nicht nachgewiesen (Meisner M 2000).

Die renale Ausscheidung von intaktem PCT spielt nur eine geringe Rolle. So ist anhand klinischer Daten erkennbar, dass auch bei schweren Nierenfunktionsstörungen keine Akkumulation von PCT auftritt. Die Abklingquote der PCT-Plasmakonzentrationen, die bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen gemessen wurden, unterscheiden sich nicht signifikant von den bei Nierengesunden gemessenen Werten (Meisner M & Schmidt J 2001).

2.4 Wirkung von Calcitonin (CT) und Procalcitonin (PCT)

2.4.1 Wirkung des Endhormons Calcitonin (CT)

Calcitonin (32 Aminosäuren) wird hauptsächlich in den parafollikulären Zellen (C-Zellen) der Schilddrüse gebildet und die Ausschüttung erfolgt normalerweise proportional zur Calciumkonzentration des Blutplasmas.

Es bindet an spezifische Rezeptoren und bewirkt über die Aktivierung der Adenylatzyklase eine Signaltransduktion über cAMP (second messenger). Folge ist eine schnelle und kurz dauernde Senkung der Calcium- und Phosphatkonzentration im Plasma (antagonistische Wirkung zu Parathormon). Weiterhin hat es einen geringen analgetischen Effekt. Während des Wachstums hemmt CT vor allem die Osteoklastenaktivität, im Erwachsenenalter fördert es den Ca^{2+} -Einbau ins Osteoid und wirkt auch auf die Nieren und den Darm (erhöhte Ausscheidung von Calcium-, Phosphat- u. Natriumionen). Eine pathologische Überproduktion findet sich beim medullären C-Zellkarzinom der Schilddrüse.

Als Therapeutikum findet Calcitonin bei folgenden Erkrankungen Verwendung: Osteodystrophia deformans, sympathischer Reflexdystrophie, Hyperkalzämiesyndrom und Osteoporose. Unerwünschte Nebenwirkungen sind unter anderem Hitzegefühl und gastrointestinale Störungen (Silbernagel S & Despopulus A 1991).

2.4.2 Wirkung von PCT auf den Calcium- und Phosphathaushalt

Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen PCT-Erhöhung und Veränderungen im Calcium und Phosphathaushalt konnte bisher nicht eindeutig belegt werden.

Unter Bedingungen, bei denen erhöhte PCT-Werte beobachtet wurden, konnten in vereinzelt Studien nur unterschiedliche und zum Teil auch widersprüchliche Aussagen über die mögliche Wirkung von PCT auf den Calcium- und Phosphathaushalt gemacht werden. Weiterhin handelt es sich meist um eher geringe Veränderungen im Calcium- und Phosphathaushalt. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass nach inflammatorischer Induktion von PCT kein deutlich erhöhter Spiegel von reifen, auf den Calcium und Phosphathaushalt wirkenden Calcitonin im Plasma gefunden wird (Dandona *et al.* 1994).

So beschreibt Nylén *et al.* bei Patienten mit Pneumonien leicht erniedrigte Calcium- und Phosphatspiegel.

Allerdings wurde in dieser Studie mit einem Radioimmunassay die Mittelregion von Calcitonin und damit auch reifes Calcitonin neben seinen verschiedenen Vorläuferformen (einschließlich PCT) erfasst (Nylén ES *et al.* 1996).

Bei fehlender Differenzierung zwischen reifen CT und Vorläuferpeptiden kann hier keine Aussage über die Wirkung von PCT auf den Calcium- und Phosphathaushalt gemacht werden.

Tierexperimentell konnte am Hamster ein signifikanter Rückgang von Serum-Calcium und Anstieg von Serum-Phosphat in einem *E. coli*-Peritonitis-Modell gemessen werden. Gleichzeitig wurden auch erhöhte Plasmaspiegel der Calcitonin-Vorläuferproteine (einschließlich PCT) gemessen, allerdings liegen hier keine

weiteren Daten zur Bestimmung der Calcitoninvorläufer vor (Steinwald PM *et al.* 1996).

Ob tatsächlich PCT oder andere Vorläufermoleküle für diese Beobachtung verantwortlich sind, oder ob nicht doch reifes CT für die Veränderungen verantwortlich ist, ist bisher nicht geklärt. Ebenso ist unklar, ob die gemachten Beobachtungen überhaupt physiologisch relevant sind

2.4.3 PCT und NO

Die Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) ist während einer Sepsis erhöht, *in vitro* fanden sich Hinweise auf eine Induktion der NO-Synthetase durch PCT (Becker *et al.* 2004; Hoffmann 2002).

2.4.5 PCT als möglicher Letalfaktor im tierexperimentellen Modell

Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung im Rahmen der Immunantwort findet man in den Arbeiten von Nylén *et al.* Im tierexperimentellen Hamstermodell wurde mit intraperitonealer Applikation von *E. coli* ein septischer Schock induziert. Durch Gabe von PCT wurde die Mortalität auf 93 % gegenüber der Kontrollgruppe mit 43 % gesteigert. Durch Neutralisation von PCT mittels spezifischer Antikörper konnte die Letalität der Tiere zum Teil verhindert werden (6 % Mortalität bei prophylaktischer Antikörpergabe gegenüber 62 % in der Kontrollgruppe. Bei Postexpositionsgabe 54 % gegenüber 82 % Mortalität nach 102 Stunden in der Kontrollgruppe) (Nylén ES *et al.* 1998).

Die experimentelle Applikation von PCT bei gesunden Tieren zeigte keinerlei toxischen Effekt.

Bei gleichzeitiger Induktion eines bakteriellen Schocks und PCT-Gabe ergab sich eine Zunahme der Letalität.

Auch im Schweinmodell konnte durch Gabe spezifischer PCT-Antikörper durch Immunoneutralisation die Schwere der Sepsis (Kristin E 2002) gemildert und die

Mortalität gesenkt werden (20 % in der Interventionsgruppe gegenüber 100 % Mortalität in der Kontrollgruppe) (Martinez 2001).

2.4.6 PCT mit anti-inflammatorischer Funktion

Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine anti-inflammatorische Rolle von PCT und CGRP. So unterdrücken z. B. PCT und CGRP signifikant die TNF Synthese im Rattenmodell und im menschlichen Blut während einer LPS induzierten Sepsis. Ein Effekt auf andere Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) konnte dabei nicht beobachtet werden (Monneret G 2000).

2.4.7 Normalwerte und Referenzbereiche

Bei gesunden erwachsenen Probanden liegen die Plasmaspiegel von PCT deutlich unter 0,1 ng/ml und damit an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten PCT-Assays. Aufgrund des Schwankungsbereiches der PCT-Konzentrationen in einem entsprechend großen Kollektiv wird der Referenzbereich im verwendeten PCT Assay zur Zeit jedoch mit < 0,5 ng/ml angegeben.

Dagegen lassen sich bei schweren bakteriellen Infektionen hohe Konzentrationen an PCT im Plasma nachweisen, ohne dass die Calcitoninwerte selbst erhöht wären. Plasma-PCT ist sehr stabil und wird nicht zu hormonell aktivem Calcitonin abgebaut. Bei schwerer Sepsis werden Konzentrationen von PCT im Bereich von unter 10 ng/ml bis über 1000 ng/ml im Plasma nachgewiesen.

Für reife Neugeborene liegen zur Zeit nur spärliche PCT-Normwerte für die ersten beiden Lebenstage vor (Chiesa C 1998).

Für Frühgeborene ist seit Anfang 2006 ein Nomogram für PCT-Werte in den ersten 4 Lebenstagen veröffentlicht worden. Für FG ohne Infektionszeichen wurde nur der Median angegeben. Die dort angegebenen 95 % Perzentilen beziehen sich auf das Gesamtkollektiv, nach Gestationsalter sortiert, nicht aber nach Infektionszeichen unterschieden (Turner D 2006).

In geringen Mengen (Picogramm pro Milliliter-Bereich) sind mit speziellen Anreicherungs- und Nachweisverfahren auch bei gesunden Personen Procalcitonin und seine Fragmente sowie weitere Vorläuferpeptide von Calcitonin im Plasma nachweisbar. Durch ultrasensitive Messverfahren wird es in Zukunft auch möglich sein, PCT-Konzentrationen weit unter 0,5 ng/ml genau zu bestimmen. Es ist denkbar, dass mit diesen Messverfahren auch bei lokal begrenzten oder systemisch nicht wirksamen Infektionen eine Induktion von PCT nachgewiesen werden könnte (Meisner & Tschakowsky 1996).

2.5 Fragestellung der Arbeit und Studiendesign

2.5.1 Fragestellung

Wertigkeit von PCT als diagnostischer und prognostischer Infektionsparameter bei Frühgeborenen im Rahmen der stationären Behandlung im Vergleich zu CRP.

2.5.2 Studienaufbau

Titel: Procalcitonin als Infektionsmarker bei Frühgeborenen

Studienart: Prospektive Verlaufsstudie

Patienten: Frühgeborene (FG) \leq 36 Schwangerschaftswochen

Patientenzahl: 52 Frühgeborene

Methoden: PCT-Bestimmung mittels immunoluminometrischen Assay und Vergleich mit CRP (mittels Turbidimetrie) im Verlauf der stationären Behandlung auf der neonatologischen Intensivstation.

PCT/CRP-Abnahmezeitpunkte: im Rahmen des Routinelabors direkt postnatal, in den ersten 3 Lebenstagen, 5., 7. und 10. Lebenstag, sowie bei erneuten klinischen oder laborchemischen Anzeichen einer Infektion

Patientenkollektiv: Einteilung der Patienten nach klinischen, laborchemischen und histologischen Kriterien.

1. „gesunde“ Frühgeborene, ohne klinische, anamnestische, laborchemische oder histologische (Plazentahistologie) Hinweise auf eine Infektion (Gruppe A).
2. Frühgeborene mit sicheren Hinweisen auf ein entzündliches Geschehen in der Plazentahistologie (Gruppe B).
3. Frühgeborene mit klinischen Symptomen einer Amnioninfektion, mütterliche oder kindliche Anzeichen einer Infektion (Fieber, CRP-Erhöhung, vorzeitiger Blasensprung, grünes Fruchtwasser, Erregernachweis etc.).
4. Frühgeborene mit sekundären Infektionen während der stationären Behandlung.

Diagnostische Parameter zur Einteilung der Patienten:

Plazentahistologie, mütterliche Infektionszeichen (CRP-Erhöhung, vorzeitiger Blasensprung, Fieber, grünes Fruchtwasser, Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie), Abstriche, Magenaspirat, Stuhl, Blutkulturen etc.

Statistische Auswertung:

Excel zum Erstellen der Datensätze, Punktwolken, Mittelwerte und Standardabweichungen

SPSS zur deskriptiven und explorativen Datenanalyse (Tests, ROC-Kurven)

Kolmogorov-Smirnov-Test zur Prüfung auf Normalverteilung

U-Test / Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Patientenkollektive

Receiver Operating Characteristics (ROC) zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität bei bestimmten Cut-off-Werten

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 PCT- Meßkit LUMItest und Basiskit , Fa. Brahms Diagnostica, Berlin

Coated tubes (Teströhrchen), beschichtet mit anti-PCT-Antikörper (monoklonale Antikörper der Maus)

Tracer, lumineszenzmarkierter (Akridium-Derivat) anti-PCT-Antikörper (monoklonale Antikörper der Maus)

Puffer (zur Rekonstitution des Tracers, gebrauchsfertig)

Waschlösung, Konzentrat

Nullserum (Humanserum), zur Rekonstitution der Standards, Kalibratoren und Kontrollen

6 PCT-Standards (2 davon als Kalibratoren S2/K1 u. S4/K2), lyophilisiert (S1-S6)

2 PCT-Kontrollen, lyophilisiert (Ko1, Ko2)

0,5% H₂O₂ in 0,1 M HNO₃

0,25 M Natronlauge

destilliertes Wasser

Zellstoffunterlage

3.1.2 Geräte

Mikroliter Pipetten (20 μ , 250 μ l), Eppendorf, mit austauschbaren Kunststoffspitzen

Vibrationsmischer, Vortex

Horizontalschüttler

Dispenser (5ml) für Waschlösung

Luminometer mit 2 Injektoren

Probenzentrifuge

3.1.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte über eine Luminometer-Rechner-Kombination mit internem computergestützten Auswertungsprogramm. Aus der resultierenden Standardkurve, bzw. der rekalkulierten Masterkurve werden über die gemittelten Lumineszenzsignale die Messwerte in RLU, bzw. direkt in ng/ml ausgegeben.

3.2 Methoden

3.2.1 Die laborchemische Bestimmung von PCT mittels ILMA

3.2.1.1 Übersicht

Die Bestimmung von PCT erfolgte mit dem LUMItest PCT, ein Immunoluminometrischer Assay (ILMA) der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH für 100 Proben (16 Standards und 84 Bestimmungen).

Bei diesem Verfahren werden zwei antigenspezifische monoklonale Antikörper, die das Procalcitonin (Antigen) an zwei verschiedenen Stellen – dem Calcitonin- und dem Katalcalcin-Anteil – binden, im Überschuss eingesetzt. Einer der beiden Antikörper ist lumineszenzmarkiert (Tracer), der andere ist auf der Innenseite der Röhren fixiert (Coated tube System).

Im Verlauf der Inkubation reagieren beide Antikörper mit den Procalcitonin-Molekülen der Probe zu so genannten „Sandwich-Komplexen“ (Abb 5), wodurch der lumineszenzmarkierte Antikörper an die Röhrenoberfläche gebunden wird. Nach dem Reaktionsende wird der verbleibende Tracerüberschuss durch sorgfältiges Waschen vollständig aus dem Röhren entfernt und verworfen.

Der nach dem Waschen an der Röhrenwand verbliebene Traceranteil wird durch die Messung des Lumineszenzsignals in einem dafür geeigneten Luminometer unter Verwendung der Basiskit-Reagenzien ermittelt. Die Größe des Lumineszenzsignals (RLU) ist der PCT-Konzentration der jeweiligen Probe direkt proportional. Über die Lumineszenzsignal-Werte der mitgeführten Standards (bekannte Antigenkonzentrationen, kalibriert an synthetischem, intaktem humanem Procalcitonin) lässt sich eine Standardkurve erstellen, an der die unbekanntes PCT-Konzentrationen der Patientenserum abgelesen werden können.

Alternativ besteht die Möglichkeit, die unbekanntes PCT-Konzentrationen der Patientenseren oder –plasmen an einer vom Hersteller mitgelieferten Masterkurve über die Lumineszenzsignal-Werte der mitgeführten Kalibratoren abzulesen.

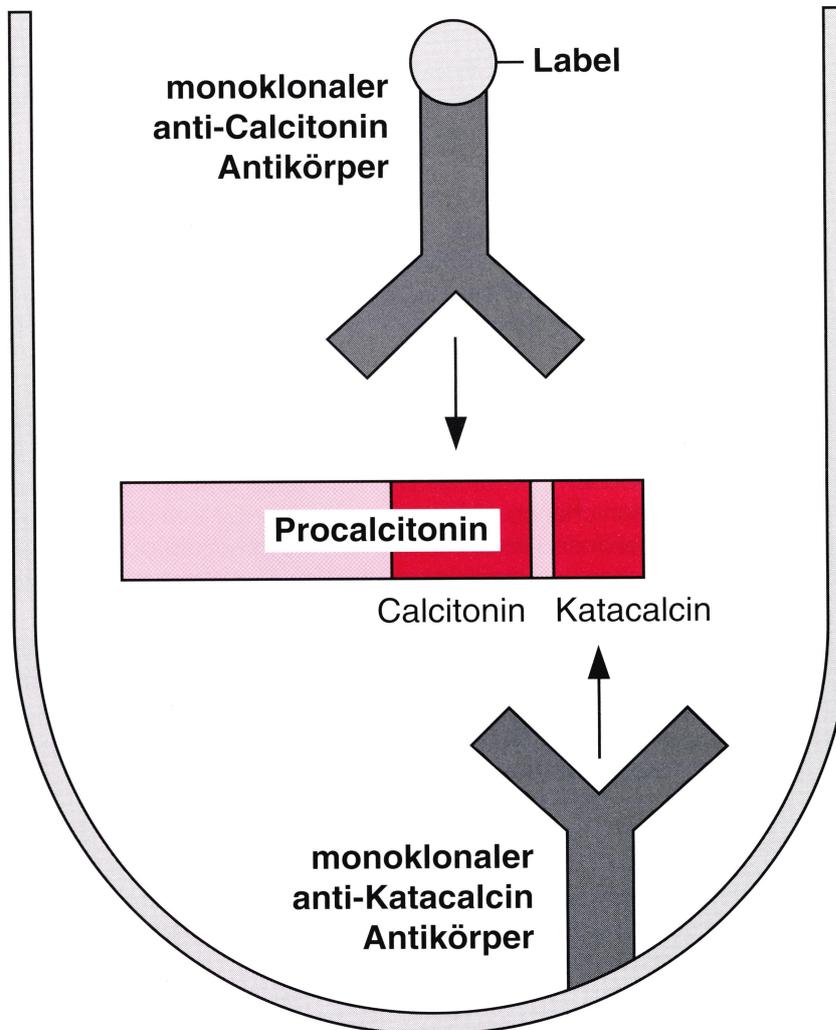


Abb. 4: Schematische Darstellung des so genannten „Sandwich-Komplexes“

(Quelle: PCT Meisner, M. 2000, mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York)

3.2.1.2 Probenbehandlung

Von den 52 Frühgeborenen wurden nach der Geburt und in den ersten Lebenstagen während routinemäßiger Blutentnahmen (Differentialblutbild, CRP etc.) 0,5 ml Vollblut zur PCT-Bestimmung entnommen. Nach Entnahme wurde der Anteil der Blutprobe für die PCT-Bestimmung noch innerhalb der nächsten Stunden mittels

einer Zentrifuge bei ca. 1000rpm über ca. 10 min abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Serum sofort bei -20°C tiefgefroren und gesammelt.

3.2.1.3 allgemeine Vorbereitungen

Vorsichtiges Auftauen der Serumproben bis auf Raumtemperatur

Rekonstitution der Kalibratoren, Standards, Kontrollen und Tracer

Durchmischen der Proben und rekonstituierten Reagenzien mittels Vibrationsmischer

Herstellung der Waschlösung (40 ml Konzentrat auf 2 l destilliertes Wasser)

Einspülen der Basisreagenzien in das Luminometer

3.2.1.4 Testvorbereitung der coated tubes

In einem Messkit befinden sich 100 Teströhrchen (coated tubes), die entsprechend dem Messprotokoll mit einem wasserfesten Stift zu beschriften sind.

In die ersten 12 Teströhrchen werden je 20 μl der PCT-Standards (S1a, S1b bis S6a, S6b) in aufsteigender Konzentration pipettiert.

In die nächsten 4 Teströhrchen werden je 20 μl der beiden Kontrollen (Ko1, Ko2) pipettiert.

In die folgenden 84 Teströhrchen werden je 20 μl Serum der zu testenden Patientenproben pipettiert.

In alle 100 Teströhrchen werden 250 μl Tracer pipettiert, die Teströhrchen anschließend mit Klebefolie verschlossen und 2 Std. bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.

3.2.1.5 Entfernen des überschüssigen Tracers

Nach Ablauf der Inkubationszeit Einbringen von 1 ml Waschlösung in jedes Teströhrchen, anschließend Dekantieren. Dies wird fünfmal wiederholt, die Innenwände werden ebenfalls gut gespült. Trocknung der Teströhrchen über Kopf auf einer Zellstoffunterlage, Ausklopfen eventueller Flüssigkeitsreste.

3.2.1.5 Messung

Die so vorbereiteten Teströhrchen werden in der vom Protokoll vorgegebenen Messreihenfolge in das Luminometer einsortiert.

Nach der automatischen Zugabe von je 300 µl 0,5% H₂O₂ in 0,1 M HNO₃ und 0,25 M Natronlauge wird das jeweilige Lumineszenzsignal für 1sec pro Teströhrchen gemessen.

Die Größe des Lumineszenzsignals (RLU) ist der PCT-Konzentration der jeweiligen Probe direkt proportional. Über die Lumineszenzsignal-Werte der mitgeführten Standards (bekannte Antigenkonzentrationen, kalibriert an synthetischem, intakten humanem Procalcitonin) wird eine Standardkurve erstellt, an der die unbekanntes PCT-Konzentrationen der Patientenserum ermittelt werden (automatisierter interner Luminometeralgorithmus).

Die Messwerte werden sowohl als Lumineszenzsignal in RLU als auch in ng/ml unter Angabe der Probennummer vom Messgerät über einen Thermopapierdrucker als fortlaufendes Protokoll ausgegeben.

3.2.2 CRP-Bestimmung, Routine-Labor

Die Bestimmung von C-reaktiven Protein erfolgte mittels immunologischer Turbidimetrie und wie die anderen Parameter des durchgeführten Routine-Labors im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes unter den entsprechenden klinischen Standards statt. Mittels immunologischer Turbidimetrie misst man photometrisch die Trübung der ausgefällten Immunkomplexe aus spezifischen AK und des zu messenden Parameters.

3.2.3 Plazentahistologie

Die Befunde der Plazentahistologie wurden im Rahmen der Routineuntersuchung vom hiesigen Institut für allgemeine und spezielle Pathologie erhoben und. Bei der Einteilung der Befunde wurden die üblichen Richtlinien zur Beurteilung einer Entzündungsreaktion herangezogen. Als Anhalt für eine floride Entzündung wurden z. B. granulozytäre Infiltrate der Eihäute und Dezidua (Chorioamnionitis), Nabelschnur (Funisitis), Plazenta (parenchymatöse Plazentitis), Zotten (Villitis), und der Gefäße (Vaskulitis) angesehen und nach deren Schwere beurteilt.

3.3 Auswertung

3.3.1 Statistik

Erstellung von Datenblättern mittels Microsoft Excel Tabellen

Explorative Datenanalyse mittels SPSS

Mittelwerte und Standardabweichung für CRP und PCT Werte

Punktwolken für CRP und PCT Werte

Erstellung von Perzentilenkurven für PCT

Kolmogorov-Smirnov-Test zur Prüfung auf Normalverteilung

U-Test / Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Patientenkollektive

ROC-Kurven Für CRP und PCT Werte zur Bestimmung der jeweiligen Sensitivität und Spezifität

Die angegebenen Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wird mittels U-Test für unverbundene Stichproben ermittelt. Statistische Signifikanz wird für $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Verteilung der gemessenen Werte und explorative Datenanalyse

1. In allen Gruppen konnte eine allgemeine Erhöhung der PCT-Konzentrationen im Serum vom zweiten bis zum vierten Lebenstag beobachtet werden (Perzentilen).

a) Verteilung aller PCT-Werte innerhalb der ersten Lebenstage in logarithmischer Auftragung. Hier fallen vor allem die generellen PCT Erhöhungen am 2. bis 4. LT auf.

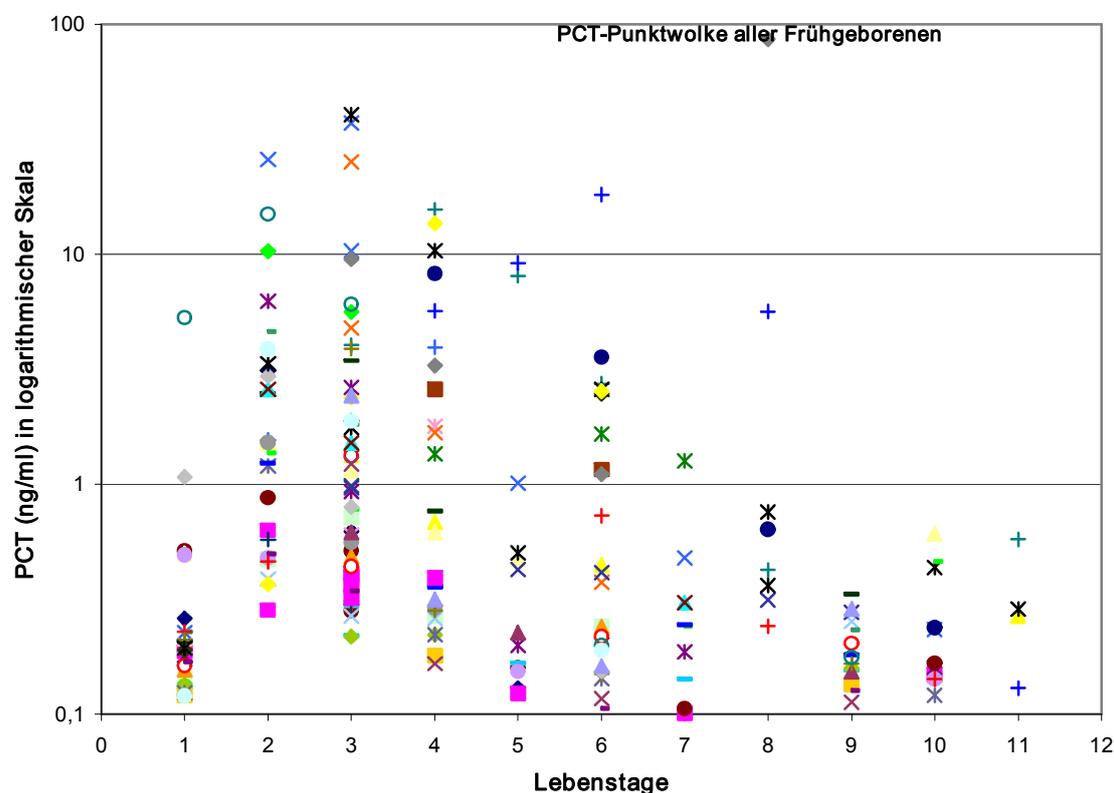


Abb 5: Darstellung aller gemessenen PCT-Werte aller Gruppen (je nach Patient und dessen Verlauf in unterschiedlicher Farbe und Markierung). In logarithmischer Skalierung ist die allgemeine Erhöhung der PCT-Werte in den ersten Lebenstagen besonders gut zu erkennen. Am 2. und 3. LT sind kaum PCT-Werte unter 0,5 ng/ml zu erkennen.

b) Darstellung der PCT-Werte der Kontrollgruppe A (n=15) durch Perzentilenkurven.

Tab.1:
PCT-Standardabweichungen und Perzentilen der Kontrollgruppe in der 1. Lebenswoche

| Lebenstag | | 1. | 2. | 3. | 4. und 5. | 6. und 7. |
|-----------------------------------|---------|------|------|------|-----------|-----------|
| N | gültig | 10 | 8 | 11 | 13 | 9 |
| | fehlend | 5 | 7 | 4 | 2 | 6 |
| Standardabweichung | | 0,11 | 0,99 | 0,76 | 1,06 | 1,00 |
| PCT- Perzentile (PCT in ng/ml) | 10 % | 0,12 | 0,28 | 0,23 | 0,18 | 0,14 |
| | 25 % | 0,12 | 0,40 | 0,32 | 0,22 | 0,16 |
| | 50 % | 0,15 | 1,36 | 0,56 | 0,36 | 0,23 |
| | 75 % | 0,19 | 1,55 | 1,49 | 0,65 | 1,50 |
| | 90 % | 0,46 | 3,34 | 2,28 | 3,08 | 2,53 |

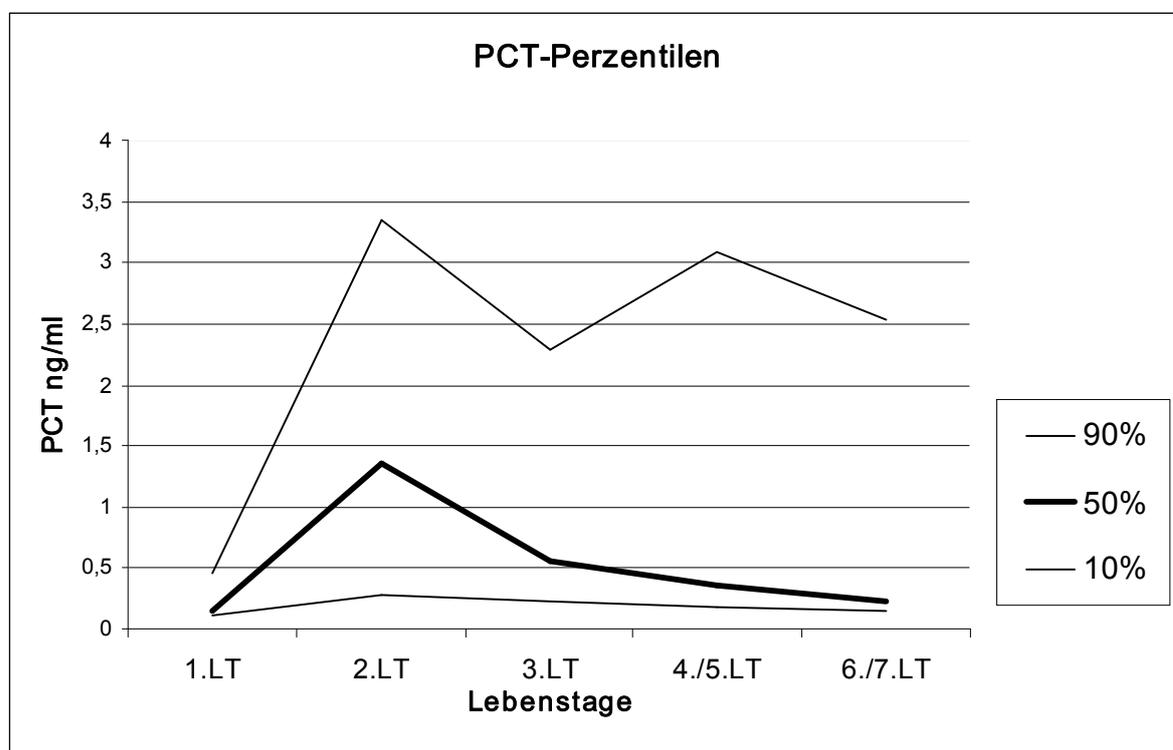


Abb 6: 10 %-, 50 %- und 90 %-Perzentilenkurven der PCT-Werte aus der Kontrollgruppe (Gruppe A).

2. Untersucht wurden jeweils die maximalen Werte für PCT- und CRP-Konzentrationen im Serum während der ersten vier Lebenstage. Dies ergab folgende Ergebnisse:

3. a) **Kontrollgruppe A (n=15)**

Die maximalen Konzentrationen der PCT/CRP-Serumspiegel im Plasma innerhalb der ersten 4 LT bei FG ohne Infektionsverdacht bei der Mutter oder histologischen Entzündungshinweis der Plazenta.

| Tab.2: Gruppe A | Minimum | Maximum | Median, Mittelwert | | Standard- abweichung |
|---------------------------|---------|---------|--------------------|------|-------------------------|
| PCT ng/ml | 0,19 | 3,34 | 0,99 | 1,09 | 0,93 |
| CRP mg/dl | 0,0 | 5,3 | 1,3 | 1,61 | 1,90 |

b) **Gruppe B (n=15)**

Die maximalen Konzentrationen der PCT/CRP-Serumspiegel im Plasma innerhalb der ersten 4 LT bei Kindern deren Plazenta eindeutige Entzündungszeichen zeigten (n=15), 10 davon hatten zusätzlich einen mütterlichen Infektionsverdacht.

| Tab.3: Gruppe B | Minimum | Maximum | Median, Mittelwert | | Standard- abweichung |
|---------------------------|---------|---------|--------------------|------|-------------------------|
| PCT ng/ml | 0,30 | 40,40 | 3,46 | 9,09 | 13,56 |
| CRP mg/dl | 0,0 | 21,7 | 5,8 | 7,32 | 7,35 |

Bei nicht vorliegender Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) wurden die Mittelwerte mittels eines nicht parametrischer Tests für unverbundene Stichproben verglichen (Mann-Whitney-U-Test / Wilcoxon).

Bei Fallzahlen von weniger als n=30 unter Angabe der exakten Signifikanz.

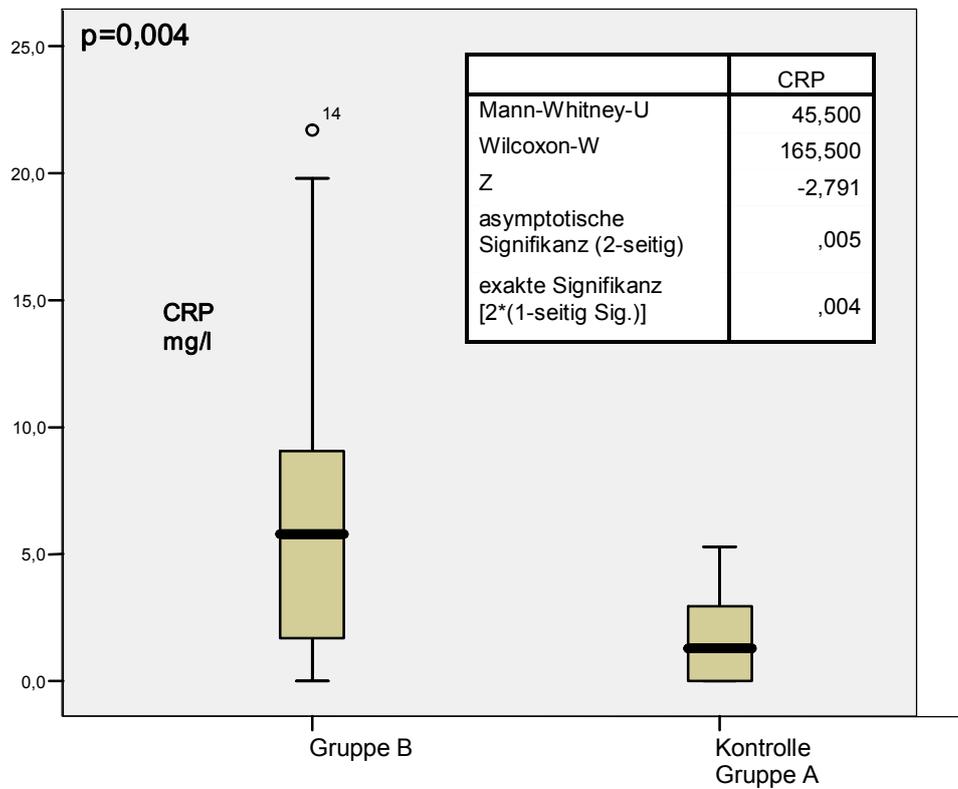
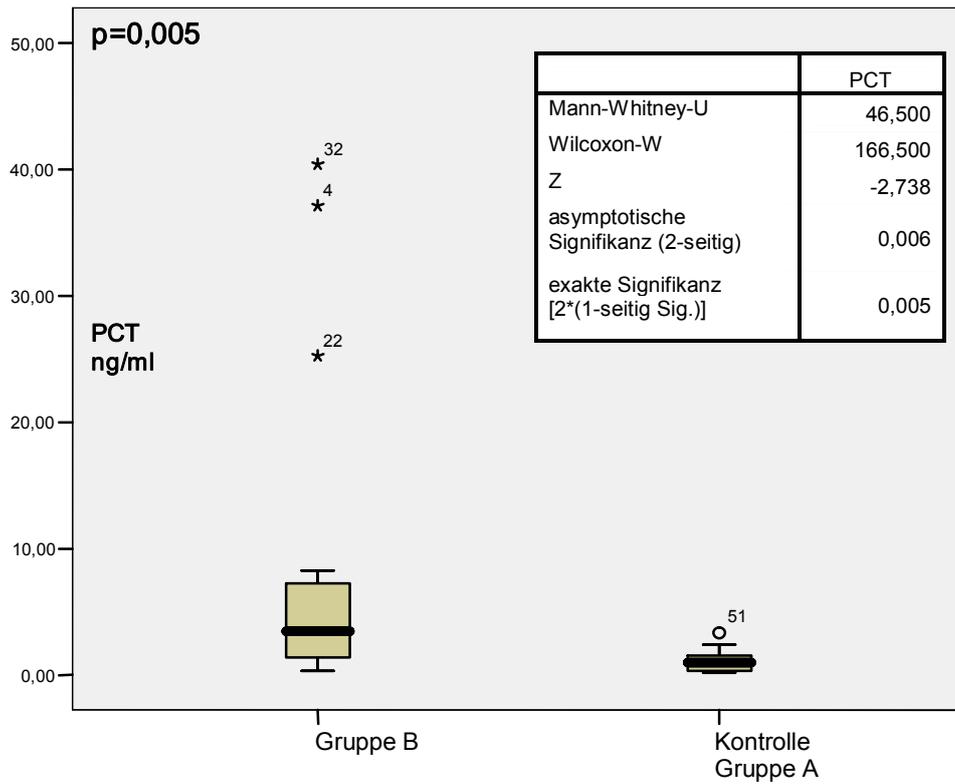


Abb 7 und 8: Der Unterschied der maximalen CRP- und PCT-Werte in der Gruppe B und der Kontrollgruppe A ist jeweils hochsignifikant.

c) Gruppe B+C (n=32)

Die maximalen Konzentrationen der PCT/CRP-Serumspiegel im Plasma innerhalb der ersten 4 LT bei Kindern deren Plazenta Entzündungszeichen (Gruppe A) und aller FG mit mütterlichem Infektionsverdacht.

| Tab.4: Gruppe B+C | Minimum | Maximum | Median, Mittelwert | Standard- abweichung |
|----------------------|---------|---------|--------------------|-------------------------|
| PCT ng/ml | 0,30 | 62,61 | 2,55 8,30 | 14,13 |
| CRP mg/dl | 0,0 | 32,4 | 3,2 6,71 | 8,31 |

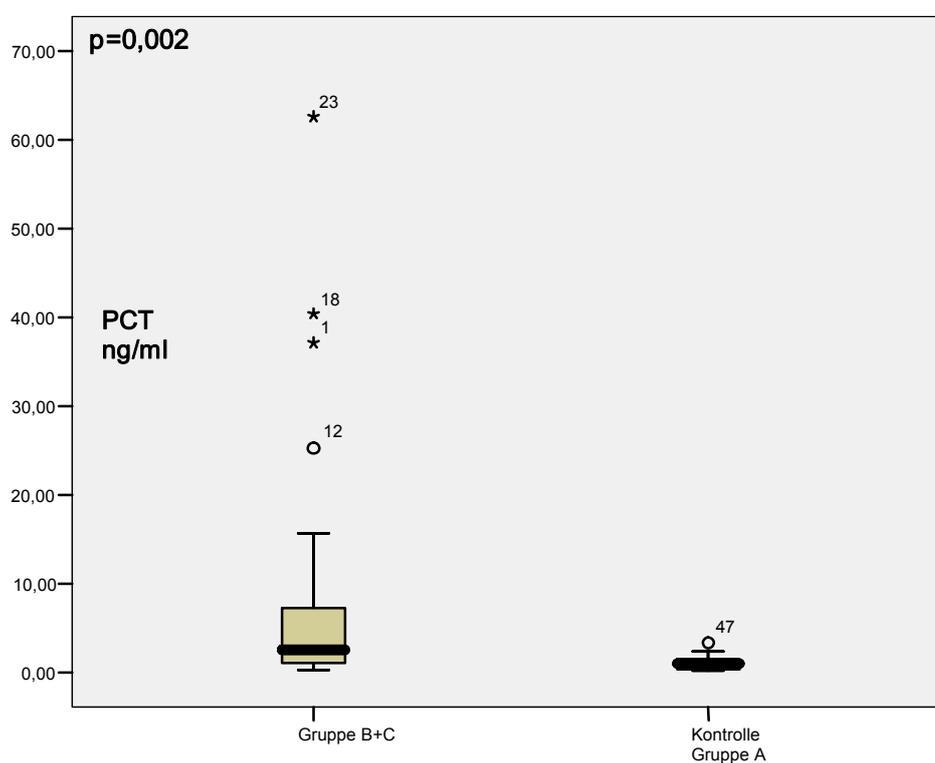


Abb. 9: Der Unterschied der maximalen PCT-Werte in der Gruppe B+C und der Kontrollgruppe A ist für PCT hochsignifikant ($p=0,002$).

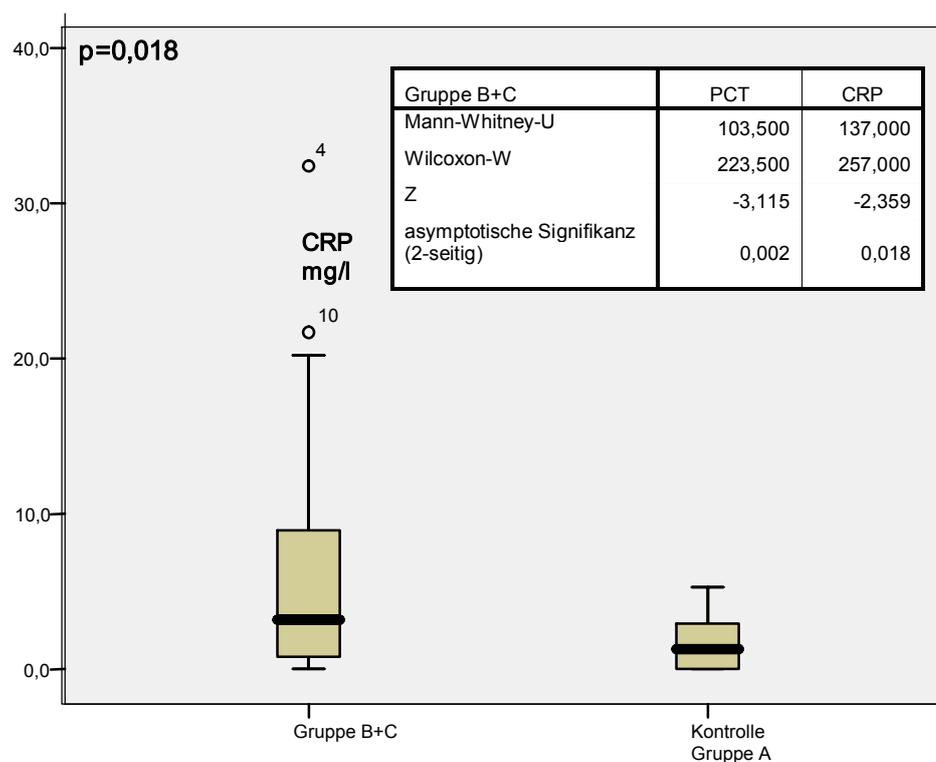


Abb. 10: Der Unterschied der maximalen CRP-Werte in der Gruppe B+C und der Kontrollgruppe A ist für CRP signifikant ($p=0,018$).

d) Die zeitliche Verteilung der PCT-/CRP-Anstiege in der Patientengruppe B+C ergab 25 auswertbare Fälle, da in 7 Fällen die Proben in den ersten LT nicht parallel für CRP und PCT bestimmt worden waren. In 7 Fällen waren PCT und CRP parallel angestiegen, in 2 Fällen war CRP schneller und in 16 Fällen PCT (um ca. einen Tag) schneller angestiegen.

In dieser Untersuchung bedeutet das einen gewissen zeitlichen Vorteil von PCT gegenüber CRP in ca. 70 % der Fälle.

4.2 ROC-Kurven

Die Receiver Operating Characteristics (ROC) Analyse dient zur Beurteilung der diagnostischen Qualität der gewählten Parameter. Der Begriff stammt ursprünglich aus der Nachrichtentechnik und dient hier zur Beurteilung der Signalerkennung. Die Analyse gibt den Zusammenhang zwischen richtig und falsch erkannten Signalen (Testentscheidung) wieder.

Die ROC-Kurve ist grafisch gesehen eine Darstellung, in der man die Sensitivität gegen 100 % Spezifität (1 – Spezifität) in Abhängigkeit von gewählten Schwellenwerten (cut-off-Werten) aufträgt. Eine Erhöhung der Sensitivität geht zu Lasten der Spezifität und eine Erhöhung der Spezifität zu Lasten der Sensitivität. Diesen Zusammenhang kann man mit Hilfe von ROC-Kurven analysieren.

Ein guter diagnostischer Parameter weist wenig Verlust an Spezifität auf, während die Sensitivität stetig zunimmt. Erst bei höheren Werten der Sensitivität resultiert eine Verminderung der Spezifität

Eine ROC-Kurve wird umso besser gewertet, je stärker sie sich in die linke obere Ecke des Koordinatensystems krümmt. Ein Maß für die Gesamtgenauigkeit eines Parameters ist die Fläche unter seiner ROC-Kurve. Je größer die Fläche, desto besser ist der Parameter für die Fragestellung geeignet (Krentz H 2002).

Im Vergleich zu CRP hat PCT in den ROC-Kurven (im Bezug auf die Merkmale mütterliche Entzündungszeichen und/oder histologische Entzündungszeichen der Plazenta) eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 40 % (bei einem Grenzwert für PCT von 0,375 ng/ml, der gut mit den Grenzwerten der Literatur korreliert). Bei CRP liegt die Sensitivität bei 50 %, die Spezifität bei 73 % (bei einem Grenzwert von 3,2 mg/l).

4.2.1 ROC-Kurven für histopathologisch gesichertes AIS

| Tab.5: Gruppe B | gültige N (listenweise) |
|--------------------|----------------------------|
| positiv(a) | 15 |
| negativ | 15 |

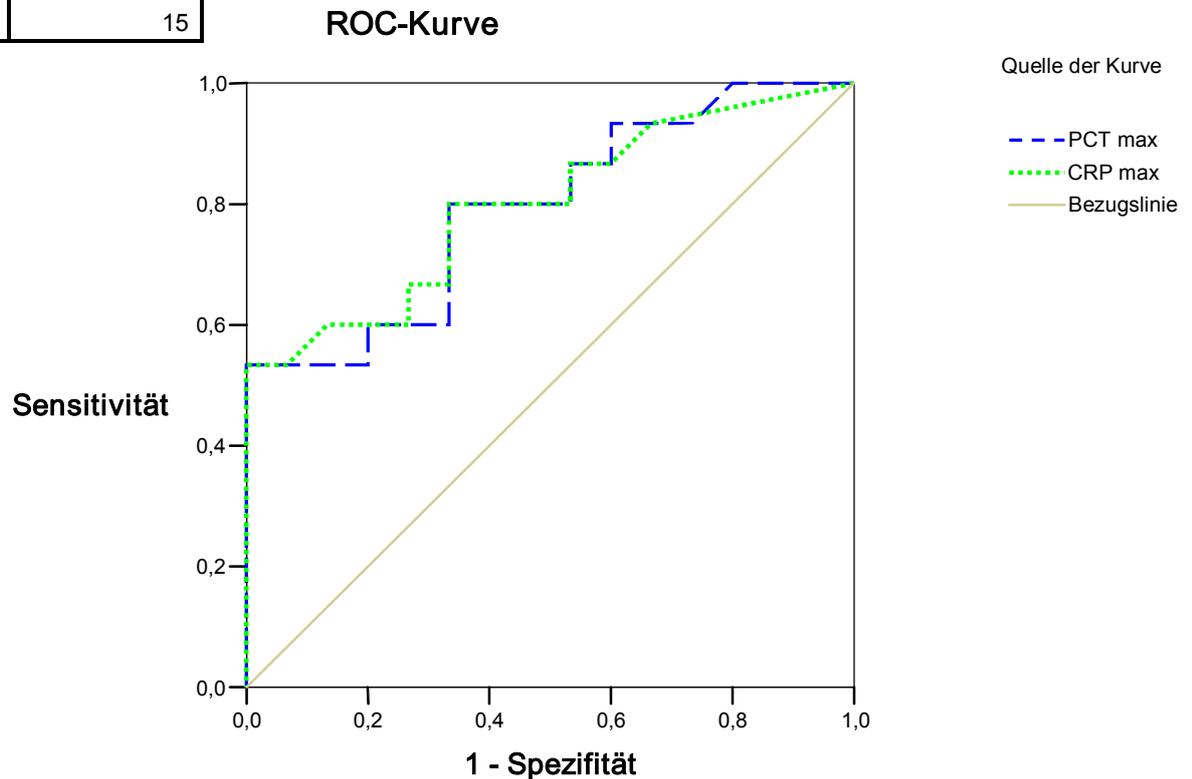


Abb.11: ROC-Kurven von CRP und PCT in der Gruppe B zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität in Bezug auf eine histologisch gesicherte Chorioamnionitis

Verarbeitete Fälle
Fläche unter der Kurve

| Tab.6: Gruppe B | Fläche | Standard- fehler(a) | asymptotische Signifikanz(b) | asymptotisches 95% Konfidenzintervall | |
|--------------------|--------|------------------------|---------------------------------|--|------------|
| | | | | Untergrenze | Obergrenze |
| PCT | ,793 | ,082 | ,006 | ,633 | ,954 |
| CRP | ,798 | ,082 | ,005 | ,637 | ,959 |

a Unter der nichtparametrischen Annahme, b Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

| Gruppe B | positiv, wenn größer oder gleich(a) | Sensitivität | 1 - Spezifität |
|---|---|--------------|----------------|
| Cut-off-Werte für PCT in ng/ml | -,8100 | 1,000 | 1,000 |
| | ,2050 | 1,000 | ,933 |
| | ,2600 | 1,000 | ,800 |
| | ,3250 | ,933 | ,733 |
| | ,3550 | ,933 | ,667 |

| | | | | Tab.7: Koordinaten der Kurve zur Ermittlung der Cut-Off-Werte |
|---|--------------|-------------|-------------|---|
| | ,3750 | ,933 | ,600 | |
| | ,4400 | ,867 | ,600 | |
| | ,5450 | ,867 | ,533 | |
| | ,7950 | ,800 | ,533 | |
| | 1,0950 | ,800 | ,467 | |
| | 1,2650 | ,800 | ,400 | |
| | 1,3430 | ,800 | ,333 | |
| | 1,3680 | ,733 | ,333 | |
| | 1,4350 | ,667 | ,333 | |
| | 1,5050 | ,600 | ,333 | |
| | 1,5250 | ,600 | ,200 | |
| | 1,7150 | ,533 | ,200 | |
| | 2,1350 | ,533 | ,133 | |
| | 2,8550 | ,533 | ,067 | |
| | 3,4000 | ,533 | ,000 | |
| | 3,6800 | ,467 | ,000 | |
| | 4,2650 | ,400 | ,000 | |
| | 5,4450 | ,333 | ,000 | |
| | 7,2605 | ,267 | ,000 | |
| | 16,7555 | ,200 | ,000 | |
| | 31,1950 | ,133 | ,000 | |
| | 38,7700 | ,067 | ,000 | |
| | 41,4000 | ,000 | ,000 | |
| Cut-off-Werte für CRP in mg/dl | -1,000 | 1,000 | 1,000 | |
| | ,050 | ,933 | ,667 | |
| | ,150 | ,867 | ,600 | |
| | ,500 | ,867 | ,533 | |
| | 1,050 | ,800 | ,533 | |
| | 1,350 | ,800 | ,467 | |
| | 1,450 | ,800 | ,333 | |
| | 1,700 | ,733 | ,333 | |
| | 2,100 | ,667 | ,333 | |
| | 2,900 | ,667 | ,267 | |
| | 3,550 | ,600 | ,267 | |
| | 3,650 | ,600 | ,200 | |
| | 4,300 | ,600 | ,133 | |
| | 5,100 | ,533 | ,067 | |
| | 5,550 | ,533 | ,000 | |
| | 5,950 | ,467 | ,000 | |
| | 6,200 | ,400 | ,000 | |
| | 6,650 | ,333 | ,000 | |
| | 9,050 | ,267 | ,000 | |
| | 15,200 | ,200 | ,000 | |
| | 19,550 | ,133 | ,000 | |
| | 20,750 | ,067 | ,000 | |
| | 22,700 | ,000 | ,000 | |

4.2.2 ROC-Kurven für gesicherte AIS und / oder mütterliche Infektionszeichen

Tab.8: Verarbeitete Fälle

| Gruppe B+C | gültige N (listenweise) |
|------------|-------------------------|
| positiv | 32 |
| negativ | 15 |

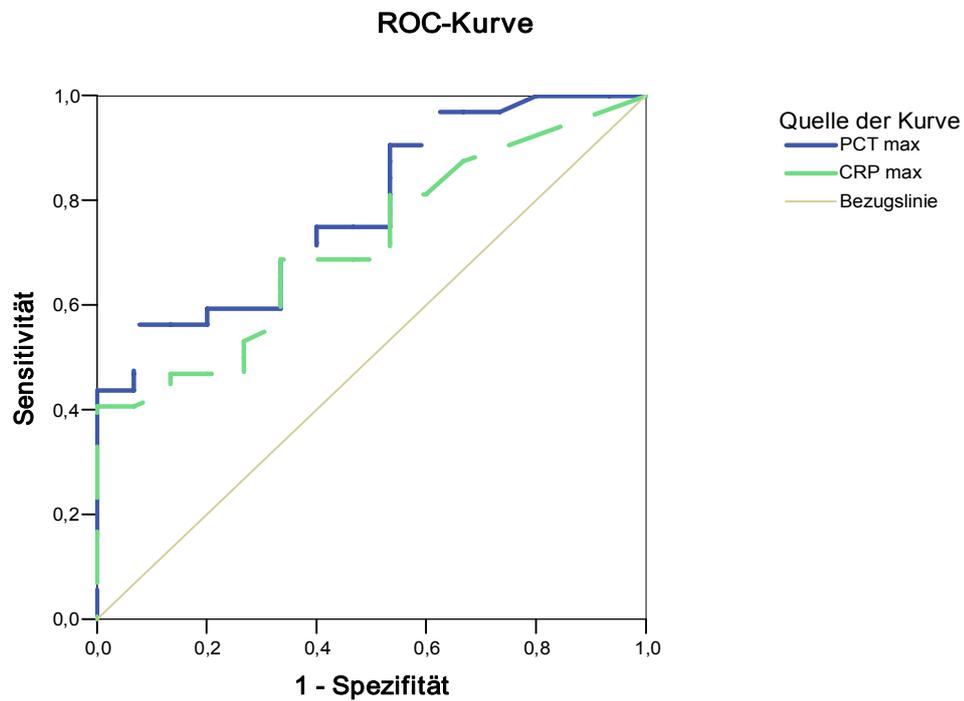


Abb. 12: ROC-Kurven von CRP und PCT in der Gruppe B+C zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität in Bezug auf eine bestehende oder beginnende Chorioamnionitis, bzw. mütterlichen Infektionszeichen

Tab.9: Fläche unter der Kurve

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | asymptotische Signifikanz(b) | asymptotisches 95 % Konfidenzintervall | |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|--|------------|
| | | | | Untergrenze | Obergrenze |
| PCT | ,784 | ,068 | ,002 | ,652 | ,917 |
| CRP | ,715 | ,075 | ,019 | ,567 | ,862 |

a Unter der nichtparametrischen Annahme b Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Tab.10: Koordinaten der Kurve zur Ermittlung der Cut-Off-Werte

| Variable(n) für Testergebnis | Positiv, wenn größer oder gleich(a) | Sensitivität | 1 - Spezifität |
|--------------------------------|-------------------------------------|--------------|----------------|
| Cut-off-Werte für PCT in ng/ml | ,2050 | 1,000 | ,933 |
| | ,2600 | 1,000 | ,800 |
| | ,3250 | ,969 | ,733 |
| | ,3550 | ,969 | ,667 |
| | ,3750 | ,969 | ,600 |
| | ,4250 | ,938 | ,600 |
| | ,4750 | ,906 | ,600 |
| | ,4950 | ,906 | ,533 |
| | ,5350 | ,875 | ,533 |
| | ,5850 | ,844 | ,533 |
| | ,6550 | ,813 | ,533 |
| | ,7950 | ,781 | ,533 |
| | ,9350 | ,750 | ,533 |
| | 1,0950 | ,750 | ,467 |
| | 1,2150 | ,750 | ,400 |
| | 1,2350 | ,719 | ,400 |
| | 1,2850 | ,688 | ,400 |
| | 1,3430 | ,688 | ,333 |
| | 1,3680 | ,656 | ,333 |
| | 1,4350 | ,625 | ,333 |
| | 1,5050 | ,594 | ,333 |
| | 1,5250 | ,594 | ,200 |
| | 1,7150 | ,563 | ,200 |
| | 2,1350 | ,563 | ,133 |
| | 2,4000 | ,563 | ,067 |
| | 2,4700 | ,531 | ,067 |
| | 2,5500 | ,500 | ,067 |
| | 2,7700 | ,469 | ,067 |
| | 3,1450 | ,438 | ,067 |
| | 3,4000 | ,438 | ,000 |
| | 3,6650 | ,406 | ,000 |
| | 3,8850 | ,375 | ,000 |
| | 4,2650 | ,344 | ,000 |
| 5,1550 | ,313 | ,000 | |
| 5,9700 | ,281 | ,000 | |
| 7,2605 | ,250 | ,000 | |
| 9,2805 | ,219 | ,000 | |
| 12,6350 | ,188 | ,000 | |
| Cut-off-Werte für CRP in mg/dl | ,050 | ,875 | ,667 |
| | ,150 | ,813 | ,600 |
| | ,400 | ,813 | ,533 |
| | ,700 | ,781 | ,533 |
| | 1,000 | ,719 | ,533 |
| | 1,250 | ,688 | ,533 |
| 1,350 | ,688 | ,467 | |

| | | | |
|--|--------|------|------|
| | 1,450 | ,688 | ,333 |
| | 1,600 | ,656 | ,333 |
| | 1,750 | ,625 | ,333 |
| | 1,850 | ,594 | ,333 |
| | 2,100 | ,563 | ,333 |
| | 2,600 | ,531 | ,267 |
| | 3,200 | ,500 | ,267 |
| | 3,550 | ,469 | ,267 |
| | 3,650 | ,469 | ,200 |
| | 3,800 | ,469 | ,133 |
| | 4,400 | ,438 | ,133 |
| | 5,100 | ,406 | ,067 |
| | 5,550 | ,406 | ,000 |
| | 5,950 | ,375 | ,000 |
| | 6,200 | ,344 | ,000 |
| | 6,650 | ,313 | ,000 |
| | 7,800 | ,281 | ,000 |
| | 8,950 | ,250 | ,000 |
| | 10,200 | ,219 | ,000 |
| | 15,050 | ,188 | ,000 |
| | 19,150 | ,156 | ,000 |
| | 19,550 | ,125 | ,000 |
| | 20,000 | ,094 | ,000 |
| | 20,950 | ,063 | ,000 |
| | 27,050 | ,031 | ,000 |
| | 33,400 | ,000 | ,000 |

4.3 Drop-outs und Kasuistiken

Folgende 5 Patienten gingen nicht in die Auswertungen mit ein.

1. Bei Patient 1 und 2 lag bei unauffälligen mütterlichen Infektionszeichen keine Plazentahistologie vor, so dass eine sichere Zuordnung in die Kontrollgruppe nicht möglich war.

2. Bei Patient Nummer 21 liegt eine nachgewiesene CMV-Infektion der Mutter vor, sowie eine histologisches Korrelat für eine virale Infektion der Plazenta. Im Gegensatz zum erhöhten CRP bleibt in diesem Fall die PCT-Konzentration niedrig (unter 0,5 ng/ml). Dies ist bei viralen Infektionen ein häufiger Befund (Gendrel G 1997).

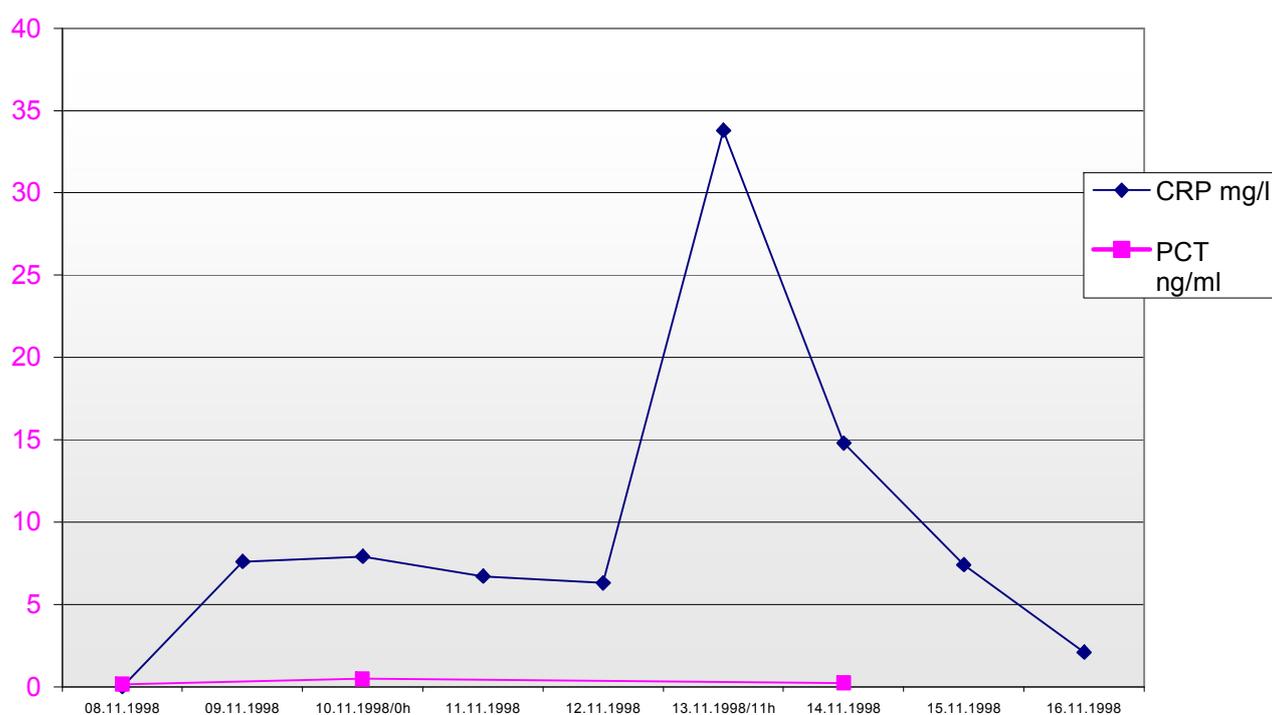


Abb. 13: PCT- und CRP-Verlauf bei einer viralen Infektion

3. Bei Patient 42 lag nach Notsectio eine Blut- und Fruchtwasseraspiration mit stark erhöhten PCT-Werten vor. Dass gerade bei Inhalationstraumen die PCT-Werte stark ansteigen, war schon in den 90er Jahren bekannt und initial zusammen mit der Onkologie einer der Hauptschwerpunkte bei den Untersuchungen von PCT (Bohoun C 2000; Nysten ES *et al.* 1996).

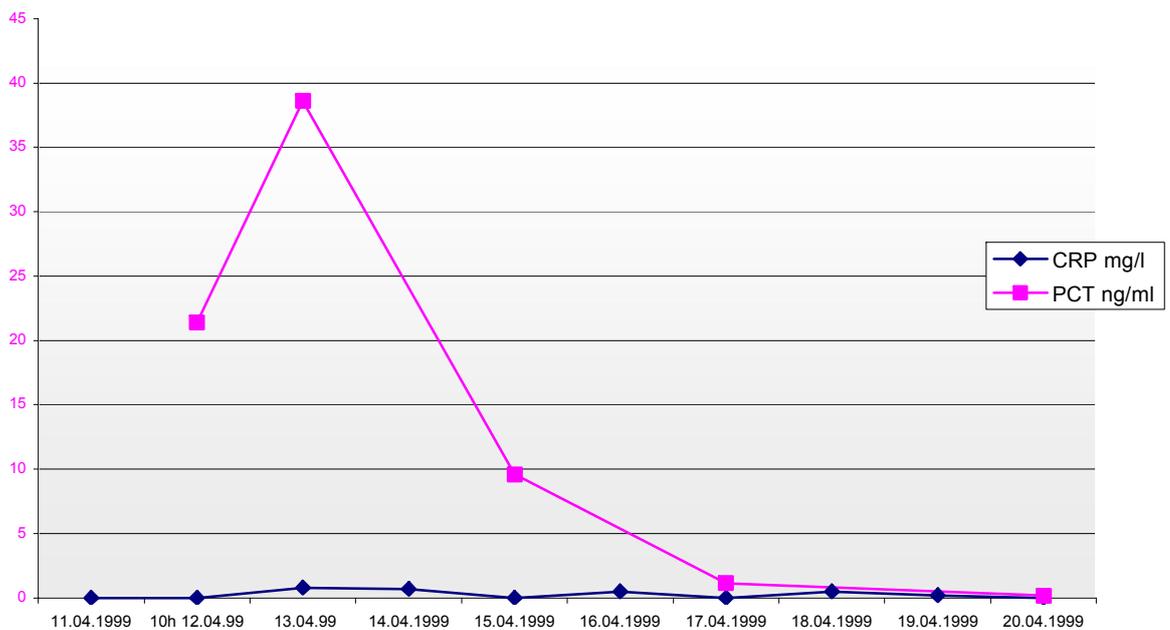


Abb. 14: PCT- und CRP-Verlauf nach Aspiration von blutigem Fruchtwasser

4. Bei Patient Nummer 48 lagen bei unauffälligem Plazentabefund und unauffälliger Anamnese der Mutter, bei wahrscheinlich nosokomialer Infektion des Kindes mit Klebsiellen extrem erhöhte PCT-Konzentrationen (beginnend am 3. LT, max. am 9. LT) im Serum vor.

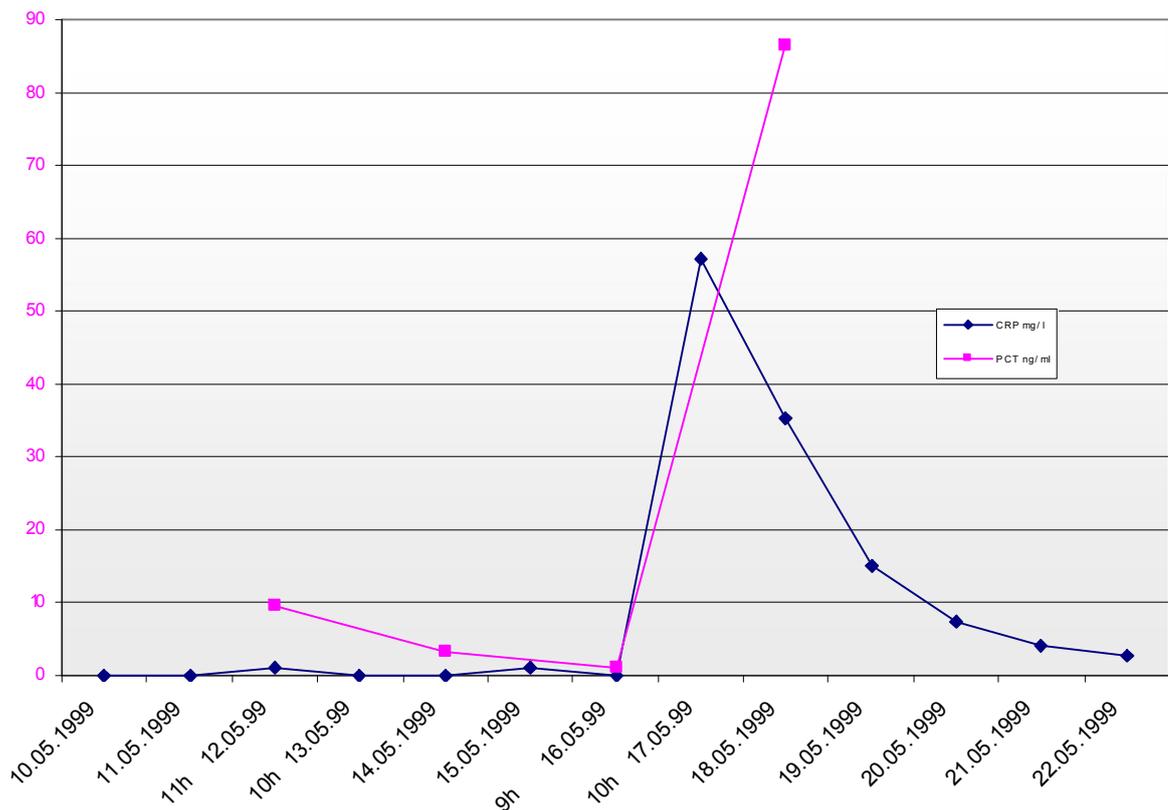


Abb. 15: CRP- und PCT-Verlauf bei nosokomialer (late-onset) Infektion

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Validität von PCT bei FG als möglichen Inflammationsparameter innerhalb der ersten Lebenstage zur frühzeitigen Erkennung eines AIS bzw. von pränatalen mütterlichen Zeichen einer Infektion als mögliche Vorstufe zum AIS.

Als Vergleich wurde CRP als klassischer Infektionsparameter gewählt.

5.1.1 Verteilung der PCT-Werte

Bei der Verteilung der PCT-Werte in den ersten Lebenstagen, decken sich unsere Beobachtungen gut mit denen, die bisher an Reifgeborenen innerhalb der ersten beiden Lebenstagen gemacht worden sind (Chiesa C 1998).

In unserem Kollektiv von FG (n=52) finden sich naturgemäß häufig mütterliche Komplikationen, wie z. B. eine Infektion oder ein vorz. Blasensprung, die auch zu einer Frühgeborenenheit führen können (Ugwumadu A. *et al.* 2003). Dies erklärt auch die kleine Fallzahl der Kontrollgruppe (Gruppe A, n=15) und muss bei der Verwendung der dargestellten PCT-Perzentilen bedacht werden.

Weiterhin ist bisher nicht geklärt, ob nicht noch andere Faktoren wie z. B. Hypoxie den PCT-Verlauf beeinflussen. So dienen diese Perzentilen für FG nur zur Veranschaulichung des PCT-Verlaufes bei einer kleinen Fallzahl einer heterogenen Gruppe in den ersten Lebenstagen. Zur Erstellung von validen PCT-Perzentilen bei Frühgeborenen sind aus oben genannten Gründen sicher größere Kollektive notwendig.

In wieweit die generelle Erhöhung der PCT Werte vom 2. bis 4. LT zu interpretieren ist, bleibt noch unklar. Ob es sich dabei um eine physiologische inflammatorische Reaktion auf den Umgebungswechsel im Sinne einer ersten Auseinandersetzung mit der neuen bakteriologischen Umgebung, z. B. über die Lunge durch eine milde Stimulation der pulmonalen neuroendokrinen Zellen handelt, analog zu den Untersuchungen der chemischen und bakteriellen Pneumonitis (Nylen ES *et al.* 1996), oder andere Stressfaktoren unter der Geburt zur Induktion von PCT führen, ist bisher noch nicht belegt. Im Bezug zum zeitlichen Zusammenhang würde allerdings

der Abstand zum Beginn der PCT-Erhöpfung am 2. LT zur Geburt sprechen, da bekannt ist, dass nach initialer Induktion von PCT mittels Endotoxinapplikation nach ca. 24 Std. PCT ein erstes Konzentrationsplateau im Serum erreicht (Chiesa C 2003; Dandona *et al.* 1994).

5.1.2 PCT und Hypoxie

Bei Untersuchungen bei Verbrennungen zeigte sich eine frühe Induktion von PCT, ohne dass TNF- α oder Endotoxin nachweisbar erhöht gewesen waren. Offenbar kann PCT nach Verbrennungen durch andere Faktoren als Infektion, bakterielles Endotoxin, bakterielle Translokation und TNF- α induziert werden. PCT korrelierte hier mit dem Ausmaß der Gewebsschädigung und mit den Serum-Laktat-Spiegeln, die Ausdruck der Gewebsschädigung sind (Hypoxie) (Carsin H 1997).

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Untersuchungen zu Inhalationstraumata (Nylen ES 1992), hier wurde schon frühzeitig die Herkunft der Calcitoninmoleküle bei den Neuroendokrinen Zellen des Bronchialepithels vermutet, für die eine Hyperplasie und Freisetzung von Calcitonin-Vorläufern durch Zigarettenrauch schon länger bekannt ist (Tabassian AR 1988).

Ob die Hypoxie unter der Geburt ein weiterer möglicher Induktionsfaktor für PCT ist, bleibt ebenfalls noch zu klären. Eine der bisher höchsten gemessenen PCT-Konzentrationen im Serum fand man bei einem Patienten nach Herzstillstand, protrahierter Reanimation und anschließender ausgeprägter hypoxischer Enzephalopathie (Lateef A 2005). Ob in diesem Fall die Translokation von Bakterien, bzw. Endotoxin durch die Barrierestörungen des Darmes nach Kreislaufstillstand als Erklärung ausreicht, bleibt bisher unklar (Meisner M 2000).

Weiterhin gibt es inzwischen auch Daten über eine Korrelation von Protein S100 mit PCT bzgl. dem neurologischen Outcome von Patienten nach Herzstillstand ohne bestehende Infektionszeichen (Fries M 2003).

Das Protein S100B als Verlaufsparemeter z. B. bei hypoxischer Enzephalopathie auch in der Pädiatrie einen Stellenwert einnimmt und zunehmend an Bedeutung

gewinnt, zeigen die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen (Meyer S & Gortner L 2006).

5.2 Vergleich PCT und CRP

Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe A (n=15) und der Gruppe B mit der histologisch gesicherten AIS (n=15) ergab eine ähnliche Sensitivität und Spezifität für PCT (87 % u. 47 % bei 0,55 ng/ml) und CRP (80 % u. 47 % bei 1,05 mg/l).

Nimmt man aber die Gruppe mit den entzündlichen Veränderungen innerhalb der Plazenta, den Eihäuten und die Gruppe mit den klinischen mütterlichen Entzündungszeichen, sowie den vorzeitigen Blasensprung als mögliche Vorstufe des AIS in die Auswertung hinzu (Gruppe C), schneidet PCT im Gegensatz zu CRP bezüglich Sensitivität und Spezifität in dieser Untersuchung etwas besser ab PCT (91 % u. 47 % bei 0,5 ng/ml) und CRP (72 % u. 47 % bei 1,0 mg/l).

Diese Ergebnisse sind stimmig und ergänzen sich gut mit den bisher gemachten Beobachtungen (Janota *et al.* 2001).

Z. B. 120 Neugeborenen (davon aber nur 32 Frühgeborene), Sensitivität von PCT bei der bakteriologischen neonatalen Sepsis, negativ prädiktiver Wert von 93 % (Guibourdenche J 2002).

In Untersuchungen des Nabelschnurblutes reifer Neugeborener fanden sich ebenfalls signifikant erhöhte PCT-Werte mit einer Sensitivität von 87,5 % und Spezifität von 98,7 % in Erkennung einer early-onset Sepsis (Joram M 2006).

Oder 2005 bei hypotrophen FG in Bezug auf die diagnostische Wertigkeit von PCT (cut off 0,5 ng/ml, Sensitivität 97 %) bei der Late-Onset-Sepsis im Vergleich zu CRP (cut off 0,8 mg/dl, Sensitivität 73 %) (Ramesh Vazzalwar 2005).

Hier stellt das Problem der CRP-Bestimmungen oft ein Problem dar, die oft erst ab 5 mg/l beginnen und damit einen Einsatz in der Frühdiagnostik als nicht sinnvoll erscheinen.

In der Praxis finden sich daher Kombinationen eines sensitiver „Frühmarker“ (z. B. IL-6, IL-8) mit einem spezifischen „Spätmarker“ (z. B. CRP) eine Anwendung.

Der neueren Literatur zufolge gibt es Hinweise auf bestimmte Vorteile von PCT gegenüber IL-6 und CRP in der sehr frühen Diagnose einer Infektion innerhalb der ersten 12 Lebensstunden eines Neugeborenen (Resch B 2003).

Hier scheinen vor allem die altersspezifischen Grenzwerte zur Beurteilung der Laborergebnisse eine tragende Rolle zu spielen (Chiesa C 2003).

5.3 Klinische Bedeutung

Der zeitliche Gewinn durch PCT könnte bei FG mit geringen Geburtsgewicht und der damit verbundenen extrem kurzen Latenzzeit von einer bakteriellen Infektion bis zur generalisierten Sepsis als zusätzliche Hilfe bei einer frühzeitigen Diagnose eines AIS genutzt werden.

Weiterhin bietet die Differenzierungsmöglichkeit von PCT zwischen bakteriellen und viralen Infektionen einen Vorteil bei Therapieentscheidungen.

5.3 Ausblick

Der Einsatz von PCT als Frühmarker bei bakteriellen Infektionen ist sicherlich auch im weiteren Verlauf der Neonatalphase, z. B. zur frühzeitigen Erkennung und Differenzierung von nosokomialen Infektionen sinnvoll.

Die weiteren Zusammenhänge von Hypoxie, intrauteriner Wachstumsretardierung, Inflammation und PCT in der Perinatalzeit sind noch zu klären.

Inwieweit hier gemeinsame inflammatorische Signaltransduktionen möglich sind, ist ebenfalls noch unklar. Diese zu entschlüsseln um noch effektivere, sichere und frühzeitige Diagnosemöglichkeiten zu erhalten, wird eine der zukünftigen Herausforderungen sein.

Die bisher experimentelle Immunoneutralisation mittels spezifischen PCT-Antikörpern stellt in fernerer Zukunft eventuell eine weitere Therapieoption der Sepsis dar.

5.4 Anhang

Tab.11: Ausgangswerte

| Patient Nr. | Geschl. m=1 w=2 | Plaz. Histo pos=1 neg=2 | Mütterl. Infekt. pos=1 neg=2 | PCT max in ng/ml | CRP max in mg/dl |
|----------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 1 | . | 1 | 3,13 | 3,3 |
| 2 | 1 | . | 1 | 0,63 | 2,9 |
| 3 | 2 | 2 | 2 | 1,52 | 5,3 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 37,14 | 11,1 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 6,26 | 1,9 |
| 6 | 1 | 2 | 1 | 0,88 | 2,9 |
| 7 | 2 | . | 1 | 15,65 | 32,4 |
| 8 | 1 | . | 1 | 5,68 | 19,0 |
| 9 | 2 | 2 | 2 | 0,22 | 1,3 |
| 10 | 1 | 2 | 1 | 10,30 | 9,3 |
| 11 | 2 | 2 | 1 | 0,71 | 0,0 |
| 12 | 2 | 1 | 2 | 1,53 | 1,5 |
| 13 | 2 | 1 | 1 | 0,39 | 5,8 |
| 14 | 1 | 1 | 2 | 0,60 | 21,7 |
| 15 | 2 | 2 | 2 | 0,49 | 0,0 |
| 16 | 2 | 1 | 2 | 0,30 | 0,0 |
| 17 | 2 | 2 | 2 | 1,90 | 0,0 |
| 18 | 1 | 2 | 2 | 0,30 | 0,2 |
| 19 | 2 | 2 | 2 | 0,22 | 0,0 |
| 20 | 2 | 2 | 2 | 0,35 | 0,0 |
| 21 | 1 | . | . | 0,48 | 7,9 |
| 22 | 1 | 1 | 1 | 25,25 | 0,8 |
| 23 | 2 | 2 | 2 | 1,20 | 0,0 |
| 24 | 1 | 2 | 2 | 1,52 | 3,6 |
| 25 | 2 | 2 | 1 | 0,57 | 2,3 |
| 26 | 1 | 1 | 2 | 4,63 | 3,5 |
| 27 | 1 | 1 | 2 | 3,46 | 0,1 |

| | | | | | |
|----|---|---|---|-------|------|
| 28 | 1 | 2 | 2 | 0,19 | 3,7 |
| 29 | 1 | 2 | 1 | 2,51 | 8,6 |
| 30 | 1 | 1 | 1 | 1,49 | 6,3 |
| 31 | 2 | 2 | 2 | 0,99 | 1,4 |
| 32 | 2 | 1 | 2 | 40,40 | 6,1 |
| 33 | 1 | 2 | 2 | 1,33 | 1,4 |
| 34 | 1 | 2 | 1 | 0,46 | 0,0 |
| 35 | 2 | 1 | 2 | 1,38 | 7,0 |
| 36 | 2 | 2 | 1 | 1,24 | 0,1 |
| 37 | 1 | 2 | 2 | 2,37 | 2,3 |
| 38 | 1 | 2 | 2 | 0,36 | 0,1 |
| 39 | 2 | 2 | 1 | 2,59 | 1,7 |
| 40 | 2 | 2 | 1 | 62,61 | 20,2 |
| 41 | 2 | 1 | 2 | 1,36 | 19,3 |
| 42 | 1 | . | 2 | 38,60 | 0,8 |
| 43 | 1 | 1 | 2 | 8,26 | 19,8 |
| 44 | 1 | 1 | 1 | 3,90 | 4,9 |
| 45 | 2 | 2 | 1 | 0,50 | 0,0 |
| 46 | 2 | 2 | 1 | 14,97 | 0,6 |
| 47 | 2 | 2 | 1 | 2,95 | 1,8 |
| 48 | 1 | 2 | 2 | 9,53 | 1,1 |
| 49 | 1 | 2 | 1 | 2,43 | 1,2 |
| 50 | 1 | 2 | 1 | 1,23 | 3,9 |
| 51 | 2 | 2 | 2 | 3,34 | 4,9 |
| 52 | 2 | 2 | 1 | 3,87 | 0,8 |

6. Literaturverzeichnis

1. Assicot M. GD 1993 High Serum Procalcitonin concentrations in Patients with sepsis and infection. *Lancet* **341**: 515-518.
2. Becker KL, Nysten ES, White JC, Muller B & Snider RH, Jr. 2004 Procalcitonin and the Calcitonin Gene Family of Peptides in Inflammation, Infection, and Sepsis: A Journey from Calcitonin Back to Its Precursors. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **89**: 1512-1525.
3. Bohoun C 2000 A brief history of Procalcitonin. *Intensive Care Medicine* **26**: 146-147.
4. Bracq Sea 1993 Calcitonin gene expression in normal human liver. *FEBS Letters, Federation of European biochemical Societies* **331**: 15-18.
5. Brook CGD 2000 The Thyroid Gland, Thyroid Neoplasia. In *Clinical Paediatric Endocrinology*, edn 3, pp 423. Blackwell Science.
6. Carsin H 1997 Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF-alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* **23**: 218-224.
7. Castelli G, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D & Sgarbi L 2004 Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical Care* **8**: R234-R242.
8. Chiesa C 1998 Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis.* **27**: 1559-1561.
9. Chiesa C 2003 C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clinical Chemistry* **49**: 60-68.
10. Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M & Bohoun C 1994 Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **79**: 1605-1608.
11. Feezor RJ & Oberholzer C 2003 Molecular characterization of the acute inflammatory response to Infections with gram-negative versus gram positive bacteria. *Infection and Immunity* **71**: 5803-5813.
12. Fries M 2003 Procalcitonin serum levels after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* **59**: 105-109.
13. Gendrel G 1997 Measurement of Procalcitonin Levels in Children with Bacterial or Viral Meningitis. *Clinical Infectious Diseases* **24**: 1240-1242.

14. Guibourdenche J. 2002. Biochemical Markers of neonatal Sepsis: value of Procalcitonin in the emergency setting. *Ann Clin Biochem* **39**: 130-135.
15. Hoffmann GP 2002 Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Critical Care Medicine* **30**: 2091-2095.
16. Janota J, Stranak Z, Belohlavkova S, Mudra K & Simak J 2001 Postnatal increase of procalcitonin in premature newborns is enhanced by chorioamnionitis and neonatal sepsis. *European Journal of Clinical Investigation* **31**: 978-983.
17. Joram M 2006 Umbilical cord blood procalcitonin and C reactive protein concentrations as markers for early diagnosis of very early onset neonatal infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **91**: 65-66.
18. Kelley MJ 1994 Small cell lung carcinoma cell line express mRNA for calcitonin and alpha- and beta-calcitonin related peptide. *Cancer Lett* **81**: 19-25.
19. Krentz H 2002 *Statistische Analysen und Datenverwaltung mit SPSS in der Medizin*. Shaker Verlag.
20. Kristin E 2002 Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Critical Care Medicine* **30**: 2313-2321.
21. Lateef A 2005 Procalcitonin in hypoxic brain damage. *Intensive Care Medicine, Correspondence*:134.
22. Le Moullec J & Jullienne A ea 1984 The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Letters, Federation of European biochemical Societies* **167**: 93-97.
23. Martinez 2001 Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis. *Surg Infect (Larchmt)* **2**: 193.
24. Meisner M 2000 *Procalcitonin (PCT)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
25. Meisner M & Schmidt J 2001 The natural elimination rate of procalcitonin in patient with normal and impaired renal function. *European Journal of Anaesthesiology* **18**: 79-87.
26. Meisner M, Adina H & Schmidt J 2006 Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Critical Care* **10**: R1-10.

27. Meisner M & Tschaikowsky K 1996 Procalcitonin (PCT) - ein neuer Parameter zur Diagnose und Verlaufskontrolle von bakteriellen Entzündungen und Sepsis. *Anästhesiologie und Intensivmedizin* **10**: 529-539.
28. Meyer S & Gortner L 2006 Neuromonitoring mittels S100B-Protein: Stellenwert für die Neonatologie, pädiatrische Intensivmedizin und Pädiatrie. *Klinische Pädiatrie* **218**: 49-56.
29. Monneret G 2000 Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnf production by human circulating blood cells. *Cytokine* **12**: 762-764.
30. Monneret G, Laroche B & Bienvenue J 1999 Procalcitonin is not produced by circulating blood cells. *Infection* **27**: 35.
31. Müller B 2001 Procalcitonin: how a Hormon became a marker and mediator of sepsis. *Swiss med wkl* **131**: 595-602.
32. Müller B, White JC & Becker KL 2001 Ubiquitous expression of the calcitonin-1 gene in multiple tissues in response to sepsis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **86**: 396-404.
33. Nylen ES 1992 Serun procalcitonin as an index of inhalation injury in burns. *Hormone and metabolic research* **24**: 439-443.
34. Nylen ES, Snider RH, Steinwald PM, White JC & Becker KL 1998 Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Critical Care Medicine* **26**: 1001-1006.
35. Nylen ES, Snider RH, Thompson KA, Rohatgi P, and Becker KL 1996. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *American Journal of Medicine* **312**: 12-18.
36. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, Jager L & Reinhart K 1999 Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **134**: 49-55.
37. Preas HL, Nylen ES, Snider RH, Becker KL, White JC, Agosti JM & Suffredini AF 2001 Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *J Infect Dis.* **184**: 373-376.
38. Ramesh Vazzalwar 2005. Procalcitonin as a screening Test for late -onset Sepsis in preterm very low birth weight infants. *Journal of Perinatology* .
39. Rau B & Schilling MK 2004 Procalcitonin: improved biochemical severity stratification and postoperative monitoring in severe abdominal

-
- inflammation and sepsis. *Langenbeck's Archives of Surgery* **389**: 134-144.
40. Resch B 2003 Procalcitonin and interleukin-6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. *Acta Paediatr.* **92**: 245.
 41. Silbernagel S & Despopulus A 1991 Kalzium- und Phosphathaushalt. In *Taschenatlas der Physiologie*, edn 4, pp 254-257. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
 42. Silomon M, Bach F, Ecker D, Graeter T, Grundmann U & Larsen R 1999 Procalcitonin nach extrakorporaler Zirkulation. *Der Anaesthetist* **48**: 395-398.
 43. Steinwald PM, Becker KL, Nylén ES, Snider RH, and White JC. Hyperprocalcitonemia of e.coli sepsis in a hamster model: association with hypocalcemia and hyperphosphatemia. 10th international Congress of Endocrinology 1996, San Francisco, CA 1998 . 1996.
 44. Stolecke 1997 Schilddrüse, Schilddrüsenmalignome. In *Endokrinologie im Kindes-und Jugendalter*, edn 3., pp 183. Springer Verlag.
 45. Stuart E Leff 1982 Splice Commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression. *Cell* **48**: 517-524.
 46. Tabassian AR 1988 evidence for cigarette smoke-induced calcitonin secretion from lungs of man and hamster. *Life Sciences* **42**: 2323-2329.
 47. Turner D 2006 Procalcitonin in preterm infants during the first few days of live. introducing an age related nomogram. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Edition* **91**: 283-286.
 48. Ugwumadu A., Manyonda I., Reid F. & Hay F. 2003 Effect of oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *The Lancet* **361**: 983-988.
 49. Werdan K & Schuster H-P 2005 *Sepsis und MODS*. Springer.
 50. Whang KT, Steinwald PM, White JC & Nylén ES 1998 Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **83**: 3296-3301.
 51. Yeakley JM 1993 Control of calcitonin/calcitonin gene -related peptide pre-mRNA processing by constitutive intron and exon elements. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 5999-6011.
 52. Yoshimitsu Kiriyaama.2002 Calcitonin gene expression induced by lipopolysaccharide in the rat pituitary. *American Journal of Physiol Endocrinology and Metabolism* **282**: 1380-1384.

7. Publikation

Cäsar J., Limbach H-G., Rohrer T., Gortner L.
Validität von Procalcitonin (PCT) als Inflammationsparameter bei V.a.
Amnioninfektionssyndrom (AIS) bei Frühgeborenen (FG) in Abhängigkeit von
maternalen Faktoren. 102. Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und
Jugendmedizin, Mainz. Abstractband Sept.2006 S. 138, DGKJ-PS-84.

8. Danksagung

Herrn Professor F.C. Sitzmann danke ich für die Überlassung des Themas und
Herrn Professor L. Gortner für die Fortführung und die hervorragende
wissenschaftliche Unterstützung, sowie die Möglichkeit diese Dissertation in den
Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin vollenden zu können.

Bei Herrn Dr. H-G. Limbach für die andauernde Unterstützung bei der Entstehung
und Durchführung der Arbeit.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für allgemeine und spezielle Pathologie für die
Unterstützung bei der Beurteilung der Histologien.

Bei den Mitarbeitern des Biometrischen Institutes für die Einführung in die
statistischen Auswertungen.

Bei Herrn Professor Hermann und den Mitarbeitern des Klinisch Chemischen
Zentrallabors für die Mitbenutzung des Luminometers.

Bei Frau Edith Behrens für die Hilfe beim Lektorat

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die stete
Unterstützung.

8. Lebenslauf

Jochen Jörn Cäsar

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Geburtsdatum: 04.03.1972
- Geburtsort: Leonberg
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Religionszugehörigkeit: röm. kath.

SCHULBILDUNG

| | | |
|---|------------------------------|-----------------|
| 1979 - 1983 | Hermann Butzer-Schule | Schwieberdingen |
| 1983 - 1985 | Realschule | Schwieberdingen |
| 1985 - 1992 | Gymnasium Korntal-Münchingen | |
| <i>Allgemeine Hochschulreife Mai 1992</i> | | |

ERSATZDIENST

| | | |
|--|-----------------|-----------|
| 1992 - 1993 | Caritas-Verband | Stuttgart |
| <i>Betreuung und Schulung körperlich und geistig behinderter Erwachsener</i> | | |

HOCHSCHULBILDUNG

| | |
|---|----------------------------|
| Okt. 1993 - 2001 | Universität des Saarlandes |
| <ul style="list-style-type: none"> ■ Sept. 1995: Ärztliche Vorprüfung ■ Sept. 1997: 1. Staatsexamen ■ Sept. 1999: 2. Staatsexamen ■ April 2001: 3. Staatsexamen | |

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|---|----------------------------|
| ■ Okt. 1999: <i>Pädiatrie/ Kinderneurologie</i> | Universitätsklinik Homburg |
| ■ Febr. 2000: <i>Chirurgie/ Kinderchirurgie</i> | Kantonspital Basel |
| ■ Juni 2000: <i>Innere Medizin/ Kardiologie</i> | Universitätsklinik Homburg |

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HOMBURG

- Dez. 2001 bis Juni 2003: *AiP*
Klinik für Kinder und Jugendmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes
- seit Juni 2003: *Stationsarzt und Assistenzarzt pädiatrische Endokrinologie*
Klinik für Kinder und Jugendmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes

