

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der

TU München

Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. J. Ruland

Evaluierung eines spektrofotometrischen Bestimmungs- verfahrens für die Serumkonzentration des Neugeborenen-Bilirubins

Caroline Dagmar Irene Mielsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. P. B. Lupp
2. Univ.- Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 24.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2012 angenommen.

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht unter:

1. Mielsch C, Zimmermann A, Wagner D, Matthes B, Schlebusch H, Luppä PB. Point-of-care determination of neonatal bilirubin with the bloodgas analyser RapidLab 1265. Clin Chem Lab Med 2010 Oct.; 48 (10): 1455-1461; Epub 2010 Jul.

Widmung

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	ii
Widmung.....	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung.....	7
1.1 Neonatale Hyperbilirubinämie.....	7
1.1.1 Ein Fallbeispiel:	7
1.1.2 Physiologischer und pathologischer Ikterus.....	8
1.1.3 Ätiologie	9
1.2 Bilirubin und Bilirubinstoffwechsel.....	12
1.3 Ursachen und Wirkung der Neurotoxizität des Bilirubins.....	14
1.4 Klinik der akuten und chronischen Bilrubinenzephalopathie	15
1.5 Therapieindikation, Therapiemöglichkeiten und Therapienebenwirkungen	17
1.6 Inzidenz der Hyperbilirubinämie.....	21
2 Zielsetzung.....	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Kollektiv und Durchführung.....	25
3.2 Methodik.....	26
3.2.1 Colorimetrische trockenchemische Testung im Humanserum mittels Mehrschichtfilmtechnologie im klinisch-chemischen Zentrallabor: Vitros 350 von Ortho-Clinical Diagnostics	27
3.2.1.1 Bestimmung des Gesamtbilirubins nach dem Diazoverfahren (TBIL- Slide)	27
3.2.1.2 Bestimmung von unkonjugiertem und konjugiertem Bilirubin mit Hilfe der direkten Spektrofotometrie (BuBc-Slide)	28
3.2.2 Direkte Spektrofotometrie im Vollblut mittels Blutgasanalysegerät Rapidlab 1265 der Firma Siemens	30
3.2.3 Transkutane Bilirubinometrie: Konica Minolta/Airshields JM-103 Jaundice Meter.....	31
3.3 Statistische Methoden	33
3.3.1 Passing-Bablok-Regression	33

3.3.2	Bland-Altman-Übereinstimmungsplot	34
3.3.3	Bivariate Korrelationsanalysen	34
3.3.4	2-paired-t-test und Bonferroni-Korrektur	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Häufigkeitsverteilung der Messwerte	36
4.2	Deskriptive Statistik	38
4.2.1	Quantitative Darstellung der Verteilung der Messwerte	38
4.2.2	Graphische Darstellung der Verteilung der Messwerte	40
4.3	Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Y/Rapidlab 1265	41
4.4	Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Y/Rapidlab 1265	42
4.5	Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Z/JM-103	43
4.6	Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Z/JM-103	45
4.7	Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden Y/Rapidlab 1265 und Z/JM-103	46
4.8	Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden Y/Rapidlab 1265 und Z/JM-103	47
5	Allgemeine Aspekte: Durchführbarkeit, Turn-around-Time	50
6	Diskussion	52
7	Zusammenfassung	61
8	Danksagung	64
	Abbildungsverzeichnis	65
	Literaturverzeichnis	66

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Bc	konjugiertes Bilirubin
Bd	Deltabilirubin
Bf	freies Bilirubin
Bu	unkonjugiertes Bilirubin
c	Konzentration
cHb	totale Hämoglobinkonzentration
COHb	Carboxyhämoglobinfraktion
e	molarer Absorptionskoeffizient
HHb	Deoxyhämoglobinfraktion
l	Weglänge
KI	Konfidenzintervall
MetHb	Methhämoglobinfraktion
MW	Mittelwert
O ₂ Hb	Oxyhämoglobinfraktion
POCT	Point-of-Care Testing
SSW	Schwangerschaftswochen
TAT	Turn-around-Time
TcB	Transkutaner Bilirubinindex
TSB	Totales Serum Bilirubin

1 Einleitung

1.1 Neonatale Hyperbilirubinämie

1.1.1 Ein Fallbeispiel:

„Die siebenjährige Lara könnte ein gesundes und normal entwickeltes Mädchen sein, wenn nicht kurz nach ihrer Geburt die Hebamme einen folgenschweren Fehler begangen hätte: Sie unterschätzte die Intensität der Gelbsucht, die sich bei dem Kind wenige Tage nach der Geburt entwickelt hatte. Solch eine Gelbsucht in den ersten Lebensstagen ist eigentlich nichts Besonderes und wäre leicht zu behandeln gewesen. Doch durch die Nachlässigkeit der Geburtshelferin kam es bei dem Säugling zu massiven Hirnschäden: Lara wird ihr Leben lang auf schwerste Art behindert sein. (...). „Ihrer Mutter fiel knapp drei Tage nach der Geburt auf, dass der Säugling schlechter trank als an den vorherigen Tagen und müder wurde - dann verfärbte sich Laras Haut leicht.“ Die Hebamme kommentierte dies mit den Worten: „ Jetzt wird sie langsam etwas gelb.“ Als die Verfärbung am darauffolgenden Tag intensiver wurde, schickte die Hebamme Blut des Kindes in ein Labor und rief noch abends gegen 22 Uhr dort an, um den Bilirubinwert abzufragen. Mit 40 Milligramm pro Deziliter lag der Leberwert um ein Vielfaches über der Norm. Dies hätte zu einer sofortigen Klinikeinweisung führen müssen, (...). Sogar die Gelbfärbung am Vortag hätte diese Maßnahme bereits nötig gemacht. Die Hebamme lies jedoch noch einen weiteren Tag verstreichen und veranlasste erst dann die Einweisung. (...). Umgehend wurde im Klinikum bei dem Baby ein Blutaus-tausch vorgenommen und eine Phototherapie durchgeführt. Prompt fiel bei Lara der Bilirubinwert auf akzeptable 16,2 Milligramm ab. Doch zu spät: Die bereits eingetretene Hirnschädigung war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr rückgängig zu machen. Die heute siebjährige Lara leidet seither unter einer schweren Koordinationsstörung, kann weder stehen noch gehen- auch nicht krabbeln oder robben. (...) Lara wird weder gehen noch stehen noch sprechen können- und sich „in ihrem künftigen Leben motorisch auf dem Stand eines sechsmonatigen Säuglings befinden“ (...). „Sie wird für immer an den Rollstuhl gefesselt sein und bei allen, auch den einfachsten Verrichtungen, auf fremde Hilfe angewiesen sein.“ (...) [28(S. 47)].

Dieser Fall, beschrieben in dem Beitrag der Süddeutschen Zeitung vom 28.01.2010, zeigt deutlich die Aktualität und Brisanz des Themas auf. Der Ikterus neonatorum ist die häufigste Anpassungsstörung bei Neugeborenen. Obwohl es sich in den allermeisten Fällen um ein vorübergehendes physiologisches Phänomen ohne Krankheitswert handelt, kann es durch verzögerte oder falsche Therapie verheerende Folgen sowohl für die motorische als auch für die kognitive Entwicklung des Kindes mit sich bringen.

Lara aus dem obigen Fall entwickelte zunächst eine akute Hyperbilirubinämie, der unter nicht adäquater Therapie eine chronische Bilirubinenzephalopathie folgte. Als Folge resultierte ein sogenannter Kernikterus. In den letzten Jahren hat dieser erneute Aktualität errungen und ein vermehrtes Auftreten konnte beobachtet werden. Grund hierfür scheint eine zunehmend liberale Einstellung gegenüber erhöhten Bilirubinwerten in Verbindung mit frühzeitiger Entlassung aus Geburtskliniken, dem noch nicht sicher etablierten Stillverhalten der Mütter und die Zunahme ambulanter Geburten zu sein. Die entscheidenden Probleme hierbei sind ungenaue Bilirubinbestimmungsmethoden ebenso wie die diagnostische Lücke mit zu später Bestimmung der Bilirubinsenkonzentration in der poststationären ambulanten Überwachung der Neugeborenen [30(S. 483)].

1.1.2 Physiologischer und pathologischer Ikterus

Unter der neonatalen Hyperbilirubinämie versteht man eine vorübergehende, physiologische Bilirubinerhöhung bis maximal 17 mg/dl. Unter normalen Bedingungen beträgt der Bilirubinspiegel im Nabelschnurblut 1-3 mg/dl [33(S. 250); 35(S. 182)]. 2-3 Tage postnatal entwickeln ca. 60% der Neugeborenen und etwa 80% der Frühgeborenen einen physiologischen Ikterus, der am 4.-5. Tag ein Maximum von ca. 17 mg/dl erreicht und nach ca. 8 Tagen wieder abklingt [33(S. 250); 35(S. 181)]. Hierbei handelt es sich um einen Ikterus mit cephalopedaler Ausbreitung. Ab ca. 2 mg/dl beginnen sich die Skleren sichtbar gelb zu färben. Ab ca. 5 mg/dl unter Berücksichtigung der entsprechenden Schwankungsbreite (3-12 mg/dl) ist eine Gelbfärbung der Haut erkennbar. Mit ansteigenden Serumbilirubinkonzentrationen breitet sich die Färbung über den Kopf, Hals und obere Extremität über den Stamm bis zur unteren Extremität aus [33(S. 250)].

Von dem physiologischen Ikterus abzugrenzen ist der pathologische Ikterus. Man unterscheidet hierbei drei verschiedene pathologische Formen im Bezug auf Zeitpunkt des Auftretens, Dauer sowie Schweregrad des Ikterus.

Zu differenzieren sind hierbei der Ikterus praecox, der Ikterus prolongatus sowie der Ikterus gravis.

Als Ikterus praecox wird eine signifikante Hyperbilirubinämie bezeichnet, die sich bereits in den ersten 36 Lebensstunden postnatal entwickelt und mit einer Serumbilirubinkonzentration von mehr als 12 mg/dl einhergeht [33(S. 250)]. Der Ikterus prolongatus dauert per definitionem länger als 14 Tage. Bei dem pathologischen Ikterus gravis bestehen über den physiologischen Ikterus hinaus erhöhte Bilirubinwerte. Bei Neugeborenen sind Serumbilirubinkonzentrationen höher 20 mg/dl, bei Frühgeborenen höher 10 mg/dl als pathologisch zu werten [21(S. 34); 33(S. 250)].

1.1.3 Ätiologie

Die neonatale Ikterusneigung unterliegt verschiedenen Ursachen. Das Neugeborene weist im Vergleich zum adulten Bilirubinstoffwechsel sowohl qualitative als auch quantitative Besonderheiten auf, die zu einer erhöhten Bilirubinkonzentration im zirkulierenden Blutkreislauf des Neugeborenen führen.

Nach der Abnabelung ist der kindliche Organismus nicht ausreichend in der Lage, das aus dem Hämoglobinabbau anfallende Bilirubin zu eliminieren. Der physiologische Ikterus resultiert somit zum einen aus einer 2- bis 3-fach erhöhten Bilirubinproduktion entsprechend einem erhöhten Hämoglobinanfall, sowie aus der eingeschränkten Fähigkeit, das vermehrt anfallende Bilirubin adäquat abzubauen und auszuscheiden [21(S. 33)].

Dabei resultiert ein prozentualer Anteil von 75% des neonatalen Serumbilirubins aus Hämolyseprozessen des Hämoglobinabbaus, ein Anteil von ca. 25% entstammt der noch relativ insuffizienten Erythropoese [21(S. 33)].

Dieses erhöhte Hämoglobinangebot wird einerseits durch die verkürzte Lebensdauer der HbF-haltigen Erythrozyten von nur 70-90 Tagen, andererseits durch ein erhöhtes Erythrozytenvolumen verursacht. Im Gegensatz dazu leben adulte Erythrozyten etwa 120 Tage. Des Weiteren entstammt zusätzlich Bilirubin aus dem Hämoglobinabbau der teilweise noch insuffizienten Erythropoese des Neugeborenen. Vermehrte Hämolyseprozesse, bedingt durch Geburtstraumata, postnatale Hämatome und Blutungen tragen zusätzlich zum vermehrten Hämoglobinanfall bei [10(S. 581); 35(S. 182)].

Dem erhöhten Bilirubinangebot steht die Problematik gegenüber, dass der neonatale Organismus direkt postnatal noch nicht in der Lage ist, die anfallenden unkonjugierten Bilirubinmetabolite suffizient zu eliminieren. Dies ist einerseits bedingt durch die postnatal, während der ersten Lebenstage, herabgesetzte hepatische Aufnahmekapazität

für zirkulierendes unkonjugiertes Bilirubin, andererseits durch eine verminderte Glukuronyltransferaseaktivität der neonatalen Hepatozyten [10(S. 581); 35(S. 182)].

Erschwerend kommt hinzu, dass zum einen bedingt durch die verzögerte Darmpassage des mekoniumhaltigen Stuhls, sowie zum anderen durch die mangelnde Kolonisierung des Darm mit Bakterien, bereits glukuronidiertes Bilirubin unter Abspaltung der Glucuronsäure, vermehrt rückresorbiert wird. Dieser erhöhte enterohepatische Kreislauf des Neugeborenen trägt somit zusätzlich zu einer verminderten Elimination des Bilirubins bei und erhöht damit zugleich die anfallende Bilirubinkonzentration [10(S. 581); 21(S. 33); 25(S. 444); 35(S. 182)].

Verschiedene weitere Ursachen können zu einem pathologisch erhöhten, drastischen Anstieg des Bilirubins führen. Hierzu zählen Störungen, die mit einer gesteigerter Hämolyse einhergehen, wie Rhesusfaktor- oder Blutgruppeninkompatibilitäten, neonatale Infektionen, genetisch bedingte hämolytische Anämien, bedingt durch Enzymdefekte, Membrandefekte oder weitere Hämoglobinopathien. Darüber hinaus Störungen ohne Hämolyse, die die Bilirubinkonjugation über die physiologischen Limitierungen hinaus vermindern, und somit zu einem zusätzlichen Bilirubinanstieg beitragen, oder mit einer vermehrten enteralen Rückresorption einhergehen [21(S. 34)].

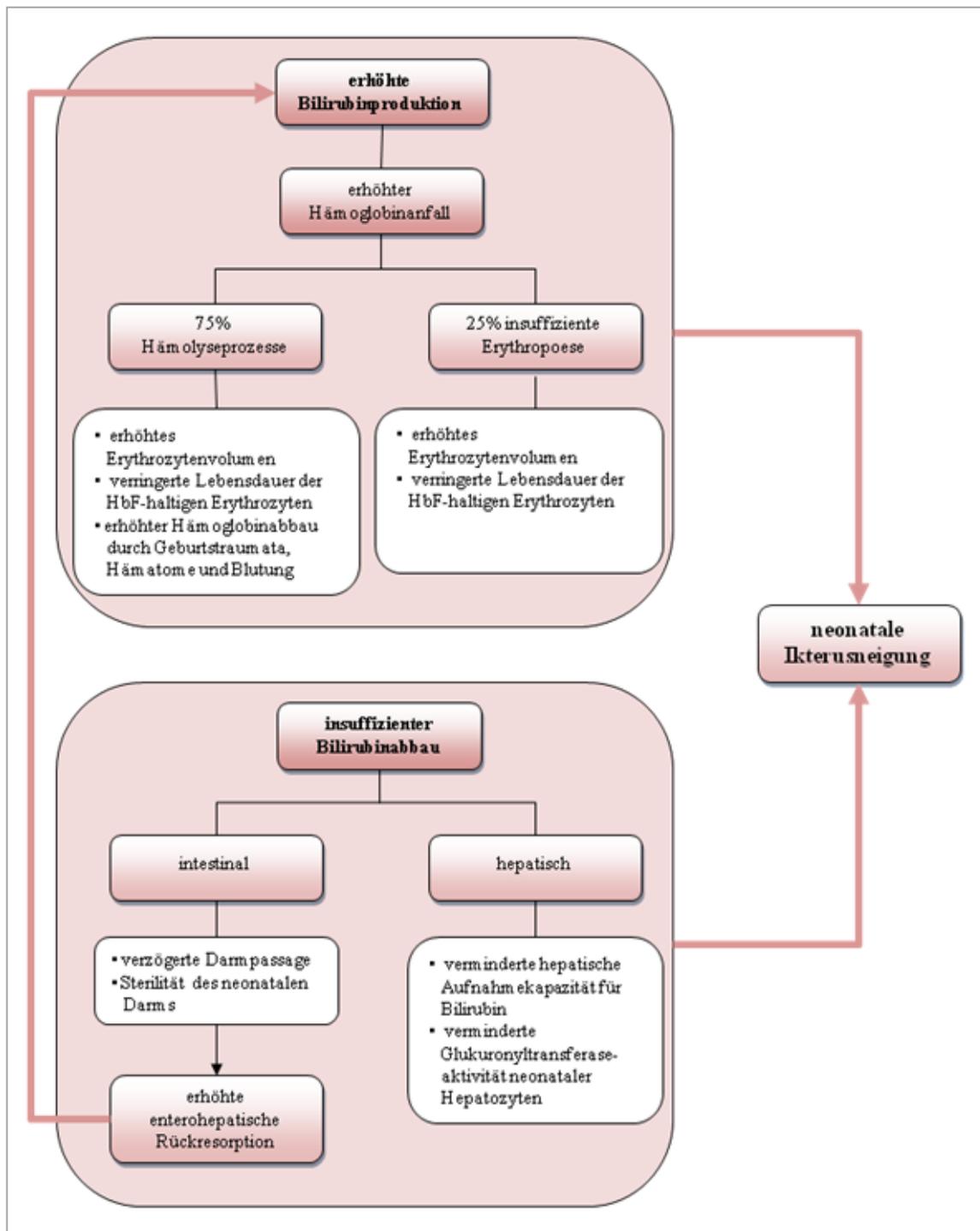


Abb. 1: Schematische Übersicht der Ätiologie der neonatalen Ikterusneigung

1.2 Bilirubin und Bilirubinstoffwechsel

Bilirubin im Blutplasma stellt keine einheitliche Substanz dar, sondern ist ein Gemisch aus verschiedenen Isomeren und Fraktionen wechselnder Zusammensetzung. Man unterscheidet zwischen unkonjugiertem Bilirubin (Bu), konjugiertem Bilirubin (Bc), Deltabilirubin (Bd) sowie freiem Bilirubin (Bf) [36(S. 1)]

Bu entstammt größtenteils dem Hämoglobinabbau gealterter oder geschädigter Erythrozyten. In den Zellen des retikuloendothelialen Systems, vorwiegend der Milz und des Knochenmarks wird der Porphyrinring der aus den Erythrozyten freigesetzten Hämgruppe durch Oxidation aufgespalten. Es entsteht eine Kette von 4 Pyrrolringen, die als Biliverdin bezeichnet wird. Die anschließende Reduktion der Methingruppe, die sich in der Mitte des Moleküls befindet, katalysiert durch die NADPH-abhängige Biliverdinreduktase, bewirkt eine Unterbrechung der konjugierten Doppelbindungen. Das Reaktionsprodukt ist Bu [20(S. 452)].

Bu ist bei physiologischem pH-Wert nahezu wasserunlöslich und wird für den Transport im Blut nicht-kovalent an Albumin gebunden [36(S. 1)].

Das an Albumin gebundene Bu dissoziiert von Albumin nach dem Transport durch den hepatischen Disse-Raum und wird durch aktiven Transport durch Transportproteine, die Gluthation-S-Transferase in den Hepatozyt aufgenommen. Im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten wird Bu in zwei Schritten zu konjugiertem Bilirubin umgewandelt. Durch zweifache Glucuronidierung mit 2 Molekülen UDP-Glucuronsäure, katalysiert durch das Enzym UDP-Glucuronyltransferase, entsteht Bilirubindiglucuronid, das konjugierte Bilirubin. Im Anschluss daran wird Bc durch aktiven Transport in die Galle sezerniert [10(S. 582); 20(S. 453-454); 25(S. 444); 35(S. 182)].

Das mit der Galle in den Darm gelangte konjugierte Bilirubin unterliegt teilweise der enterohepatischen Rezirkulation und wird durch intestinale β -Glucuronidasen unter Ablösung der Glucuronsäure wieder zu unkonjugiertem Bilirubin hydrolysiert, rückresorbiert und gelangt im Anschluss erneut in die Zirkulation. Unter physiologischen Bedingungen entstehen im Darmlumen durch Reduktionsvorgänge, vermittelt durch die Darmflora an mehreren Positionen des Bc, unter Verlust der konjugierten Doppelbindungen, die hydrophilen Verbindungen Stercobilinogen und Urobilinogen, die dann nach Umwandlung zu Stercobilin und Urobilin mit dem Urin oder der Faeces ausgeschieden werden können. Der Darm des Neugeborenen weist allerdings postnatal eine mangelnde Kolonisation mit physiologischen Darmbakterien auf. Durch diese relative Sterilität des neonatalen Darms liegt im Kolon eine erhöhte Menge an konjugiertem Bilirubin vor, welches nicht weiter zu den hydrophilen Endprodukten abgebaut werden

kann. Bc wird dann durch die intestinalen β -Glucuronidasen unter Ablösung der Glucuronsäure wieder in Bu überführt, welches dann über die Darmschleimhaut rückresorbiert und in den enterohepatischen Kreislauf miteinbezogen wird [10(S. 582); 20(S. 453- 454); 25(S. 444)].

Der Vollständigkeit halber sei das Delta-Bilirubin erwähnt, das durch eine nichtenzymatisch vermittelte kovalente Kopplungsreaktion zwischen Bc und Albumin entsteht. Diese Fraktion tritt bei Patienten mit hepatischem und posthepatischem Ikterus auf. Bei einer unkonjugierten Hyperbilirubinämie, wie der neonatalen Hyperbilirubinämie und dem prähepatischen Ikterus, ist die Delta Fraktion nicht nachweisbar.

Bei der Fraktion des freien Bilirubins handelt es sich um unkonjugiertes, nicht an Albumin gebundenes Bilirubin, welches als Hauptursache für die Bilirubinenzephalopathie verantwortlich gemacht wird. Es ist anzumerken, dass bislang keine zuverlässige Methode zur analytischen Bestimmung dieser klinisch relevanten Bilirubinfraktion existiert. Ebenso wenig wie eine ersatzweise Bestimmung der freien Bindungskapazität von Albumin für freies Bilirubin [36(S. 2)]. Daher wird in der klinischen Praxis der Serumspiegel des Gesamtbilirubins bestimmt. Der Totale Serum Bilirubin (TSB-) Wert setzt sich aus der Summe des konjugierten und unkonjugierten Bilirubins zusammen. Bei Neugeborenen entspricht der TSB-Wert weitestgehend der Konzentration des unkonjugierten, an Albumin gebundenen Bilirubins [20(S. 454); 34(S. 411)].

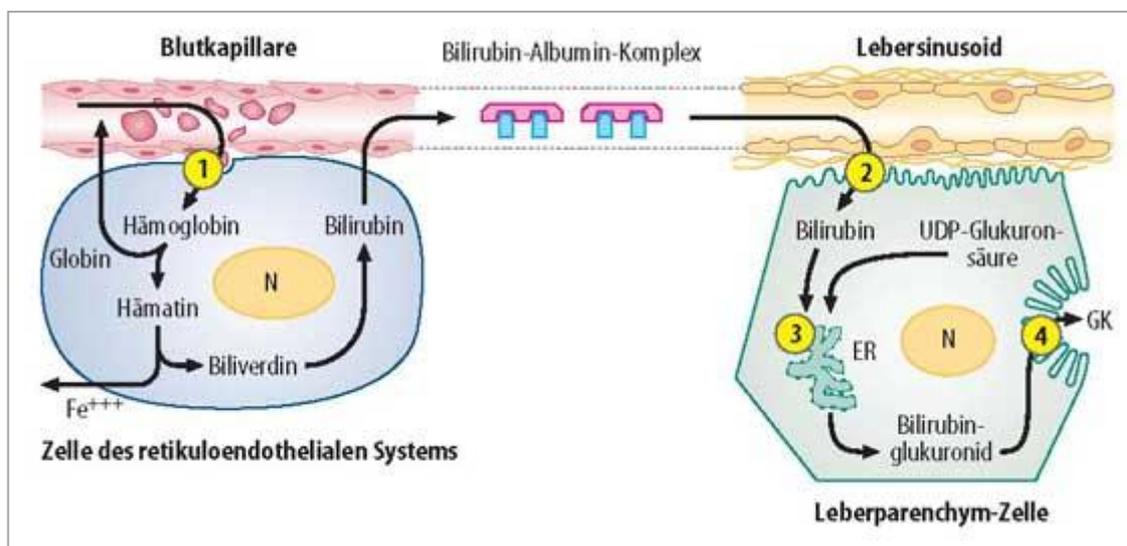


Abb. 2: Schematische Darstellung des Bilirubinstoffwechsels [35(S. 224; Abb.: 842; Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags)]

1.3 Ursachen und Wirkung der Neurotoxizität des Bilirubins

Das freie unkonjugierte, nicht an Albumin gebundene Bilirubin ist aufgrund seiner lipophilen, wasserunlöslichen Form in der Lage an Lipidmembranen von Zellen zu binden und in diese durch Diffusion einzudringen. Aufgrund der Fixation intramolekularer Carboxy- und Aminogruppen durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen entsteht die dreidimensionale wannenförmige Struktur des unkonjugierten Bilirubins. Bei physiologischem pH-Wert und einer Temperatur von 37°C ist das Molekül unpolar und nahezu wasserunlöslich. Zum extrazellulären Transport im Blut ist es an Albumin gebunden. Es wird davon ausgegangen, dass Humanalbumin über mindestens zwei Bindungsstellen mit unterschiedlich hoher Affinität für Bilirubin verfügt [30(S. 486); 35(S. 182); 37(S. 99)]. Bei reifen Neugeborenen mit einer Serumalbuminkonzentration von 3,0-3,5 g/dl können Bilirubinkonzentrationen von 25-28 mg/dl gebunden werden [30(S. 486)]. Wird die Albuminbindungskapazität überschritten, insbesondere bei Sättigung der primären Bindungsstelle, steigt die Konzentration des freien Bilirubins im Serum an und ermöglicht damit den Übertritt von freiem Bilirubin in das Gewebe. In Abhängigkeit des Lipidgehalts weisen die Gewebe eine unterschiedliche Affinität für den Übertritt des freien Bilirubins auf. Somit kann das freie Bilirubin, entsprechend der Lipophilie des neuronalen Gewebes mühelos die Blut-Hirn-Schranke überwinden und an die Zellmembranen der Neurone binden und in diese eindringen. Dabei ist die Blut-Hirn-Schranke reifer Neugeborener nicht generell durchlässiger als bei Erwachsenen, dennoch wird ihr eine höhere passive Permeabilität für nicht fettlösliche Proteine zugesprochen. Somit können hohe Bilirubinkonzentrationen, bei Überschreiten der Albuminbindungskapazität zu einem Eintritt von freiem Bilirubin in die Neurone führen. Zum anderen können Faktoren, die zu einer Verminderung der Albuminbindungskapazität führen, denselben Effekt bewirken. Frühgeburtlichkeit, Sepsis und Hypalbuminämie durch vermindertes Serumeiweiß gehen mit einer Verminderung der Albuminbindungskapazität einher. Ebenso kann die Albuminbindungskapazität für Bilirubin durch Verdrängungsmechanismen durch freie Fettsäuren oder Medikamente, die eine hohe Proteinbindung aufweisen, herabgesetzt werden. Der Übertritt von freiem Bilirubin in das neuronale Gewebe wird somit begünstigt [30(S. 486)]. Nachgewiesen wurde ebenfalls, dass die Blut-Hirn-Schranke unter bestimmten pathologischen Bedingungen durchlässig für Albumin-gebundenes unkonjugiertes Bilirubin ist. Hierzu zählen Asphyxie, Hypertension, Hyperosmolarität und Hyperkapnie. Vermutlich trifft dies ebenfalls bei Infektionen, Fieber und Sepsis zu [10(S. 584); 30(S. 486); 37(S. 100-101)].

Die einzelnen neuronalen Zelltypen, das Ausmaß der Gehirnreife sowie die verschiedenen Stoffwechselforgänge der unterschiedlichen Gehirnzellen weisen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber den neurotoxischen Effekten des Bilirubins auf. Somit können zusammenfassend vier Aspekte identifiziert werden, die das Risiko für eine Bilirubin-bedingte neuronale Schädigung festlegen: Hierzu zählen die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins, die Albuminbindungskapazität, die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke sowie die Suszeptibilität der einzelnen neuronalen Zellen [37(S. 98)].

Die Neurotoxizität des Bilirubins beruht auf zellulärer Ebene unter anderem auf der Inhibition der oxidativen Phosphorylierung, unter Hemmung mitochondrialer Enzyme. Bilirubin interferiert des Weiteren mit der DNA-Synthese und kann DNA-Einzelstrangbrüche induzieren. Darüber hinaus soll es den Ionenaustausch über die Zellmembranen stören, was zu einem zytotoxischen Anschwellen der Nervenzelle führt. Im Rahmen der elektrophysiologischen Nervenleitung behindert Bilirubin des Weiteren die Funktion des NMDA-Rezeptors und hemmt damit die exzitatorische Reizweiterleitung. Zusätzlich wirkt Bilirubin hemmend auf die synaptische Übertragung zwischen den einzelnen Neuronen. Das neurotoxische Potential des Bilirubins korreliert dabei mit der Bilirubinspitzenkonzentration und der Dauer des Ikterus [10(S. 538)].

1.4 Klinik der akuten und chronischen Bilirubinenzephalopathie

Das Vollbild der Bilirubinenzephalopathie, der sogenannte Kernikterus, beinhaltet die neuronale Schädigung durch die Bilirubinansammlung und die damit einhergehenden irreversiblen Läsionen in den Bereichen der Basalganglien, insbesondere des Globus pallidus sowie des Nucleus subthalamicus. Des Weiteren sind auch die Gehirnareale des Hypothalamus, des Ammonshorns, der Formatio reticularis sowie die Hirnnervenkerne des Nervus Abducens, des Nervus Facialis, des Nervus Vestibularis, sowie des Nervus Cochlearis von der Schädigung betroffen. Darüber hinaus zeigten sich auch die Purkinjezellen des Cerebellums und der Hippocampus für die Neurotoxizität des Bilirubins suszeptibel [30(S. 487); 34(S. 412); 37(S. 98)].

Der Begriff Kernikterus entstammt dem optischen Eindruck entsprechend des Sektionsbefundes der an Gelbsucht verstorbenen Kinder. Aufgrund der gelbgefärbten zellulären, zytoplasmatischen Einschlüsse der geschädigten Zellen wurde um 1900 der Begriff Kernikterus für diese Pathologie eingeführt [10(S. 581)].

Die klinischen Symptome der Bilirubin-induzierten neuronalen Schädigung sind unspezifisch und unterliegen einer Vielzahl von Variationen. Zu unterscheiden ist hierbei die akute von der chronischen Bilirubinenzephalopathie. Die akute Bilirubinenzephalopathie vollzieht sich typischerweise in drei Phasen. Mit der ersten Phase beginnend, fallen die Neugeborenen in den ersten beiden Tagen durch abnehmendes Trinkverhalten, Lethargie, Schläfrigkeit, schrilles Schreien, muskuläre Hypotonie, sowie durch zerebrale Krampfanfälle auf. Im Laufe der ersten Woche schließt sich die zweite Phase an. Sie ist von einem gesteigerten Extensorentonus, Ophistotonus und Retrocollis geprägt. Zusätzlich leiden die Neugeborenen häufig unter Fieber. Nach der ersten Woche, in die dritte Phase übergehend, weist das Neugeborene einen generellen muskulären Hypertonus auf. Die Kinder befinden sich meist in einem stuporösen bis komatösen Zustand, der von Apnoephasen gekennzeichnet sein und schließlich zum Tod führen kann [4(S. 1); 10(S. 584); 25(S. 446); 34(S. 412)].

Die chronische Form hingegen ist im ersten Lebensjahr durch muskuläre Hypotonie, tonische persistierende Nackenreflexe sowie durch eine generell verzögerte motorische Entwicklung gekennzeichnet. Nach dem ersten Lebensjahr manifestiert sich eine extrapyramidale Bewegungsstörung in Form einer choreoathetoiden Zerebralparese, einhergehend mit Ballismus, Choreoathetose und Tremor. Zusätzlich entwickeln die erkrankten Kinder eine vertikale Blickparese, eine sensorineurale Taubheit sowie evtl. Zahnschmelzhypoplasie und mentale Retardierung [4(S. 1); 10(S. 584); 34(S. 413)].

akute Bilirubinenzephalopathie

- | | | |
|-----------|--------------------|--|
| 1. Phase: | 1. - 2. Lebenstag: | <ul style="list-style-type: none"> • abnehmendes Trinkverhalten • Lethargie • Schläfrigkeit • schrilles Schreien • muskuläre Hypotonie • zerebrale Krämpfe |
| 2. Phase: | 1. Lebenswoche: | <ul style="list-style-type: none"> • gesteigerter Extensorentonus • Ophistotonus • Retrocollis • Fieber |
| 3. Phase: | 2. Lebenswoche: | <ul style="list-style-type: none"> • genereller muskulärer Hypertonus • Stupor bis Koma • Apnoephasen • Tod |

chronische Bilirubinenzephalopathie

- | | |
|---------------------|---|
| 1. Lebensjahr: | <ul style="list-style-type: none"> • muskuläre Hypotonie • tonisch persistierende Nackenreflexe • verzögerte motorische und evtl. auch mentale Entwicklung |
| nach 1. Lebensjahr: | <ul style="list-style-type: none"> • extrapyramidale Bewegungsstörung: choreoathetoide Zerebralparese • vertikale Blickparese • sensorineurale Taubheit • evtl. Zahnschmelzhypoplasie • evtl. Intelligenzminderung |

Abb. 3: Übersicht der klinischen Symptomatik der akuten und chronischen Bilirubinenzephalopathie modifiziert nach [10(S. 584)]

1.5 Therapieindikation, Therapiemöglichkeiten und Therapienebenwirkungen

Die Therapieindikation des Neugeborenenikterus wird in Abhängigkeit von postpartalem Alter des Neugeborenen und von der Höhe der Serumbilirubinkonzentration gestellt. In Anlehnung an das von Bhutani et al. [8] entwickelte Nomogramm, dient ein postpartal fortlaufend geführtes Nomogramm mit altersbezogenen Bilirubinkon-

zentrationen im klinischen Alltag der Risikoabschätzung einer behandlungsbedürftigen Hyperbilirubinämie. Entsprechend dem postpartalem Alter und der Höhe der Bilirubinkonzentration kann ein individuelles Risiko für die Entwicklung einer signifikanten Hyperbilirubinämie abgeschätzt werden und mithilfe von klinischen Leitlinien, im Konsens zu den strengen Empfehlungen der American Academy of Pediatrics die Therapieindikation gestellt werden [1; 4(S. 1)]. Dabei handelt es sich um ein ergebnisgesteuertes Stufenscreening. Hierfür werden transkutane oder blutige Bilirubinmessungen durchgeführt und die Messwerte entsprechend dem Nomogramm anhand der Lebensalter-bezogenen Perzentilen bewertet und entsprechend konkrete Folgemessungen determiniert [4(S. 2)].

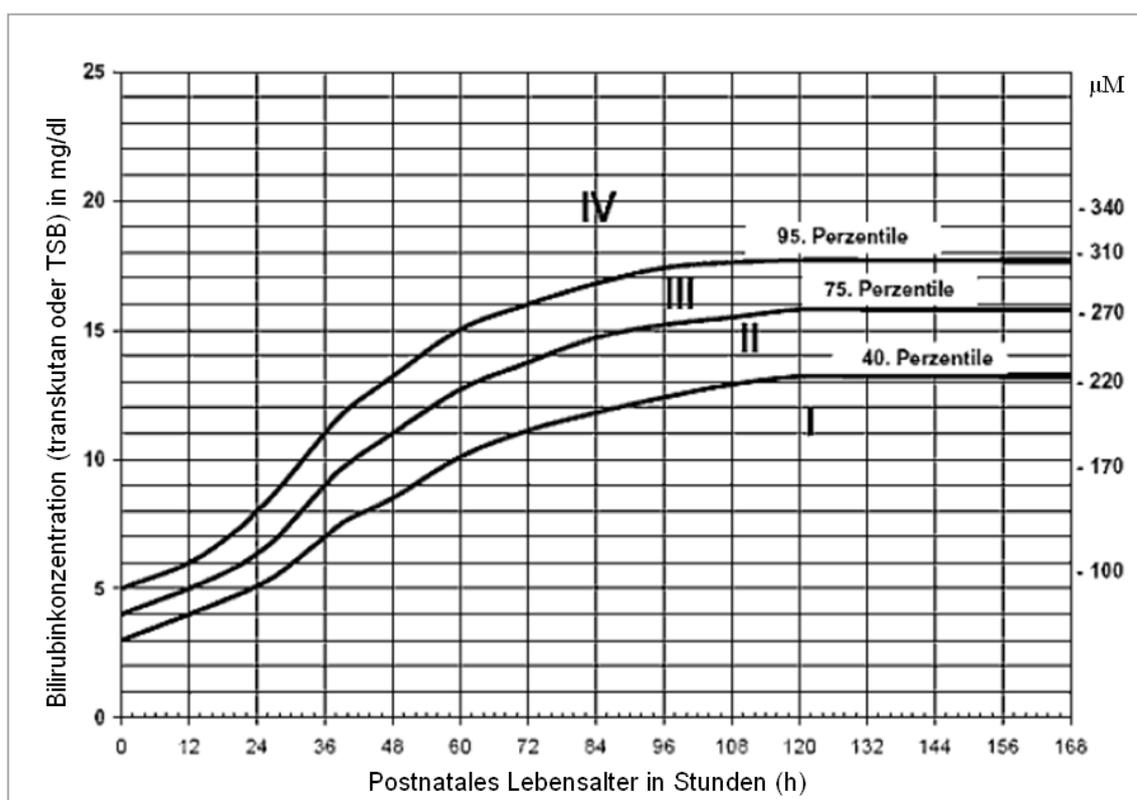


Abb. 4: Nomogramm zur Risikostratifizierung einer behandlungsbedürftigen Hyperbilirubinämie bei reifen Neugeborenen, modifiziert nach Bhutani et al. [8]

- Zone I: Klinische Kontrolle nach 72 Stunden; Neugeborenen (NG) <38 Schwangerschaftswochen (SSW) nach 48 Stunden
- Zone II: Klinische Kontrolle nach 48 Stunden; NG <38 SSW nach 24 Stunden
- Zone III: Klinische Kontrolle nach 24 Stunden; NG <38 SSW nach 12 Stunden
- Zone IV: blutige TSB-Bestimmung obligat + direkter Coombs-Test, Wiederholung nach 12 Stunden; NG <38 SSW nach 6 Stunden

Die Therapie der neonatalen Hyperbilirubinämie beabsichtigt zum einen, einen weiteren Bilirubinanstieg zu vermeiden, zum anderen, pathologisch erhöhte Bilirubinkonzentrationen zu senken. Je nach Höhe der Bilirubinkonzentration und postpartalem Lebensalter, entsprechend der Risikobestimmung, stehen verschiedene Möglichkeiten der medizinischen Intervention zur Verfügung.

Ein wichtiger Bestandteil ist dabei die Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs durch häufige Mahlzeiten und optimales Stillmanagement. Steigenden Bilirubinkonzentrationen infolge Dehydratation kann durch die Optimierung des Stillverhaltens und in seltenen Fällen, wie z.B. bei maternaler Hypogalaktie, durch Zufüttern von Formulanahrung positiv entgegen gewirkt werden. Die Optimierung des Stillverhaltens mit dem Ziel die enterohepatische Rückresorption zu unterbrechen bzw. zu reduzieren, hat im Rahmen der Hyperbilirubinämie-therapie allerdings eher präventiven Charakter [4(S. 4)].

Bei Überschreiten einer Bilirubinschwellenkonzentration entsprechend der Leitlinien, besteht die primäre Therapie des nicht-hämolytischen Ikterus zunächst in der Anwendung der Fototherapie. Mit dieser Therapieform gelingt es in den meisten Fällen die Bilirubinkonzentration drastisch zu senken [10(S. 585)]. Hierfür werden folgende Schwellenwerte angegeben: Für Neugeborene >38+0 SSW und bei nicht bestehendem Hämolysehinweis gilt ab 72 Stunden postnatal eine Bilirubinkonzentration >20 mg/dl als Fototherapieindikation. Bei Neugeborenen <38 SSW gilt zur Bestimmung der Fototherapiegrenze die Faustregel: aktuelles Gestationsalter in Wochen minus 20= Fototherapiegrenze in mg/dl [4(S. 4)].

Der Wirkungsmechanismus der Fototherapie beruht auf einer cis-/trans-Isomerisierung und der Bildung quantitativ unbedeutender Dipyrrrole als Fotooxidationsprodukte. Durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht im Wellenlängenbereich von 420-470 nm entsteht neben den Fotooxidationsprodukten durch strukturelle Isomerisation das Stereoisomer Lumirubin und durch konfigurationsale Fotoisomerisation in geringem Umfang Cyclobilirubin. Durch das Wandern einer Doppelbindung wird einer der äußeren Ringe des Moleküls so gedreht, dass keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr ausgebildet werden können. Die dadurch entstandenen Moleküle weisen nun polare, wasserlösliche Eigenschaften auf und können somit, unter Umgehung der hepatischen Konjugation, über die Galle ausgeschieden werden [30(S. 506); 36(S. 2)]. Die Behandlung wird mit einer zunächst kontinuierlichen Bestrahlung begonnen, bis ein Abfall der Serumkonzentration unter 16 mg/dl zu verzeichnen ist. Im Anschluss daran kann die Behandlung in Form einer intermittierenden Bestrahlung mit jeweils 4 bis 6 stündigen Intervallen fortgeführt werden [30(S. 507)].

Bei erfolglos intensivierter Fototherapie, d.h. wenn in den ersten 4-6 Stunden kein Absinken der Bilirubinkonzentration um 1-2 mg/dl zu erzielen ist, oder bei Serumbilirubinkonzentrationen über 25-30 mg/dl und je nach postnatalem Alter muss die Indikation zur Austauschtransfusion gestellt werden [4(S. 5); 33(S. 254)].

Als ergänzende Therapieform, bei Rhesusinkompatibilität mit positivem Coombs-Test, sei die intravenöse Gabe von Immunglobulinen erwähnt, die bei neonataler Hämolyse durch mütterliche Antikörper versucht werden kann. Diese Therapie kann die Rate an Austauschtransfusionen für dieses spezielle Krankheitsbild im Rahmen des neonatalen Ikterus senken, dennoch war diese Therapieform in mehreren Fällen mit der schwerwiegenden Nebenwirkung einer nekrotisierenden Enterokolitis verbunden und sollte gemäß der Leitlinien nur in Einzelfällen zur Anwendung kommen [4(S. 5)].

Die regulär eingesetzten Therapieformen, insbesondere die Fototherapie, sind im Vergleich zu den gravierenden Folgen des Vollbildes der Erkrankung, einfach durchzuführen, unter klinisch suffizienter Kontrolle vergleichsweise risikoarm und nachweislich effizient. Dennoch weisen sowohl die Fototherapie als auch die Austauschtransfusion in unterschiedlichem Ausmaß Nebenwirkungen auf und bedürfen einer engmaschigen klinischen Überwachung.

Eine der wichtigsten Nebenwirkungen der konventionellen Fototherapie ist die Mutter-Kind-Trennung bei der Durchführung im Inkubator oder durch die Verlegung des Neugeborenen in eine Kinderklinik. Durch die großflächige Bestrahlung des Neugeborenen können unter anderem Verschiebungen im Wasser- und Elektrolythaushalt, Dehydratation sowie Temperaturinstabilitäten auftreten. Durch eine verkürzte Darmpassage leiden die therapierten Neugeborenen häufig vermehrt unter Diarrhöen. Des Weiteren kann die Bestrahlung unter Umständen eine dermatologische Reizung im Sinne einer Dermatitis solaris oder auch eine Schädigung der Augen im Sinne einer Netzhautschädigung oder einer Konjunktivitis verursachen. Eine therapieinduzierte Erhöhung des konjugierten Bilirubins kann zur Ausbildung des sogenannten Bronze-Baby-Syndroms führen [30(S. 508)].

Die Durchführung von Austauschtransfusionen birgt die Gefahr etlicher Komplikationen. Diese reichen von vaskulären Nebenwirkungen, wie der Auslösung von Embolien, Thrombosen und hämorrhagischer Infarzierung, zu kardialen Komplikationen, wie Arrhythmien, Anämien oder hypervolämischer Kreislaufüberlastung. Zusätzlich können biochemische Elektrolyt- und Stoffwechsellentgleisungen, sowie gerinnungsphysiologische Komplikationen auftreten. Weiter kann es zu Infektionen oder einer mechanischen Schädigung der Erythrozyten sowie zu Problemen bei der Durchführung der

Nabelvenenkatheterisierung wie z.B. der Perforation der Umbilikalvene kommen. Bei der Durchführung von Austauschtransfusionen handelt sich um eine deutlich invasivere und potentiell komplikationsreichere Maßnahme, die mit einer erhöhten Mortalität (1-2 %) und Morbidität einhergeht [4(S. 5); 10(S. 586); 30(S. 505)]. Sie wird nur in Einzelfällen (<5%) angewandt und sollte den Neugeborenen vorbehalten bleiben, die an einer hämolytischen und/oder schwerwiegenden Hyperbilirubinämie leiden oder die auf eine initiale Fototherapie unzureichend ansprechen. Darüber hinaus sollte sie nur bei den Neugeborenen zur Anwendung kommen, deren Risiko, eine Bilirubinenzephalopathie zu entwickeln, das Risiko der Komplikationen übersteigt [4(S. 5); 10(S. 586)].

In Anbetracht der Komplikationsmöglichkeiten der genannten Therapieformen wird deutlich, welche bedeutsame Rolle die exakte Diagnostik in der Anwendung dieser Therapiemaßnahmen und in Stellung der Therapieindikation spielt.

1.6 Inzidenz der Hyperbilirubinämie

Der zu Beginn der Dissertationsarbeit zitierte Zeitungsartikel verdeutlicht das Ausmaß dieser Erkrankung und deren Folgen. Es stellt sich die Frage, warum diese Krankheit, zu deren Prävention einfache und vergleichsweise ungefährliche Therapiemaßnahmen zu Verfügung stehen, in der heutigen Zeit wieder auf dem Vormarsch sein kann [10(S. 581); 15(S. 104)].

Verantwortlich für diesen Anstieg werden eine zunehmende Tendenz zu ambulanten Geburten sowie die verkürzte, postpartale, stationäre Aufenthaltsdauer gemacht. Das Hauptproblem dieser beiden Aspekte ist hierbei die häufig nicht adäquate lückenlose pädiatrische Weiterbetreuung der Neonaten. Dies kann dazu führen, dass eine schwerwiegende Hyperbilirubinämie nicht rechtzeitig erkannt wird und eine Therapieeinleitung versäumt wird. Des Weiteren konnte, begünstigt durch unzuverlässige Diagnostik, sowie durch seit 1992 sukzessiv erhöhte Interventionsgrenzen in neonatologischen Leitlinien, seit 1990 eine erneute Zunahme der Inzidenz dieser Erkrankung verzeichnet werden [10(S. 581); 15(S. 106); 29(S. 242); 30(S. 487)].

Die genaue Inzidenz des Kernikterus bei reifen Neugeborenen ist jedoch unklar [29(S. 242)]. Die aktuellen Leitlinien mit dem Stand von 2010 geben für das Auftreten einer extremen Hyperbilirubinämie mit Maximalkonzentrationen von mehr als 25 mg/dl bzw. mehr als 30 mg/dl eine Häufigkeit von 1: 1.000 bzw. 1: 10.000 an. Das Vorkommen einer chronischen Bilirubinenzephalopathie bzw. eines Bilirubin-bedingten Todesfalls wird mit 1: 100.000 bzw. 1: 1.000.000 beziffert [4(S. 1)].

Kernikterus ist ein schweres Krankheitsbild und birgt für jedes Neugeborene mit Hyperbilirubinämie ein potentielles Risiko einer folgeschweren, irreversiblen Hirnschädigung. Es bedarf bei jedem Kind einer Risikostratifizierung und einer damit verbundenen individuellen Evaluierung und Interpretation der Bilirubinkonzentration im Kontext der individuellen Risikofaktoren sowie der entsprechenden Symptome einer drohenden neurotoxischen Schädigung der neonatalen Gehirnstrukturen. Jedes Neugeborene mit einer erhöhten Bilirubinkonzentration und den klinischen Symptomen einer beginnenden akuten Bilirubinenzephalopathie muss als pädiatrischer Notfall angesehen werden.

2 Zielsetzung

Das Ziel der Dissertationsarbeit war es, in Anbetracht der Bedeutung und Schwere der Erkrankung, dazu beizutragen, die Diagnostik im Bereich der Neugeborenen-Hyperbilirubinämie zu verbessern. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Tendenz der ambulanten Geburtshilfe sowie den verkürzten postpartalen stationären Aufenthaltsdauern, gewinnt das zuverlässige postnatale Bilirubin-Screening der Neugeborenen an Bedeutung. Durch die Zunahme der ambulanten poststationären Überwachung, durch Kinderärzte, Hebammen und Kinderschwestern treten transkutane Messgeräte in den Fokus, die bei entsprechend vorsichtiger Interpretation der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der therapeutischen Leitlinien zur unblutigen Überwachung und Verlaufskontrolle genutzt werden können. Seit kurzer Zeit stehen dem klinisch-stationären Bereich auch Blutgasanalytoren zur Verfügung, die mittels einer auf direkter Spektrofotometrie basierenden Bestimmungsmethode eine Bilirubinanalyse im Vollblut durchführen. Diese patientennahe Diagnostik durch sogenannte Point-of-Care Testing (POCT-) Blutgasanalysegeräte ist unter Umständen mit dem bisherigen Goldstandard in der neonatalen Bilirubinbestimmung, dem laborchemisch bestimmten TSB vergleichbar.

Der TSB-Wert, bestimmt im klinisch-chemischen Zentrallabor mittels der Diazo-Methode gilt bisher als wichtigste, valide diagnostische Kenngröße im Rahmen der neonatalen Hyperbilirubinämie-Diagnostik. Um eine Vergleichbarkeit der neueren POCT-Geräte mit der Labormethode zu konstatieren, müssen die analytischen Eigenschaften der beiden Methoden auch im Vergleich zu der transkutanen Bilirubinbestimmung mittels Bilirubinometer unter klinischen Routinebedingungen evaluiert und beurteilt werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es, systematische Unterschiede zwischen den POCT-Geräten, der Zentrallaborbestimmung und der transkutanen Bilirubinbestimmung zu erfassen, sowie die analytischen Charakteristiken der Methoden miteinander zu vergleichen. Dabei sollte die transkutane Messung des Bilirubins, als nicht-invasives, diagnostisches Verfahren, welches im klinisch-stationären Alltag, sowie in der ambulanten poststationären Überwachung bereits häufig angewendet wird, reevaluiert werden.

Des Weiteren wurde in dieser Studie ein Vergleich des Zeitbedarfs durchgeführt, welcher zwischen der Probenentnahme bzw. der Messung am Patienten und dem Vorliegen eines qualitätskontrollierten Resultats verstreicht. Diese Zeitspanne wird als so-

nannte Turn-around-Time (TAT) bezeichnet. Durch den Vergleich der TATs der einzelnen Methoden im klinischen Alltag kann beurteilt werden, ob der Einsatz neuer POCT-Blutgasanalysegeräte eine rasche, bettseitige Diagnostik ermöglicht und somit anschließend eine schnellere Therapie eingeleitet werden kann. Eine kürzere TAT durch den Einsatz dieser POCT-Geräte könnte Neugeborenen-Intensivstationen, die nicht direkt an ein klinisch-chemisches Zentrallabor angebunden sind organisatorische Vorteile bieten.

Eine Verbesserung der Neugeborenen-Hyperbilirubinämie-Diagnostik kann nur dann gewährleistet sein, wenn alternative Bestimmungsmethoden im Bezug auf die Messgenauigkeit und entsprechend verkürzter TAT mit dem bisherigen Goldstandard vergleichbar sind. Indem Bilirubinbestimmungen mittels POCT-Analyse unter Umständen verlässlich durchgeführt werden könnten, würden durch eine sehr kurze TAT Therapieindikationen frühzeitiger gestellt werden und das Neugeborene könnte schneller der adäquaten Therapie zugeführt werden. Bei Unterschreiten der Therapieindikationsgrenze könnte eine Therapie schneller beendet und unangenehme, unerwünschte Therapie Nebenwirkungen schneller abgewendet werden.

Im Rahmen dieser Vergleichsstudie wurden die Messmethoden für das Neugeborenen-Bilirubin im Folgenden als Methode X, Y und Z bezeichnet, miteinander verglichen und evaluiert:

- Methode X: Colorimetrische trockenchemische Testung im Humanserum mittels Mehrschichtenfilmtechnologie im Zentrallabor: Vitros 350 der Firma Ortho-Clinical Diagnostics
- Methode Y: Direkte Spektrofotometrie im Vollblut mittels Blutgasanalysegerät: Rapidlab 1265 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics
- Methode Z: Transkutane Messung und Erhebung eines Bilirubinindex mittels des Konica Minolta/Airshields JM-103 Jaundice Meter der Firma Dräger Medical

3 Material und Methoden

3.1 Kollektiv und Durchführung

In der vorliegenden Studie wurden 222 Neugeborene untersucht, die im Zeitraum von 1. März 2009 bis 7. August 2009 in der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, der Technischen Universität München (TUM), geboren wurden. Dabei handelte es sich um 213 reif geborene Neugeborene mit einem Gestationsalter von mehr als 37 SSW und 9 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von mehr als 32 und weniger als 37 SSW.

Keines der in die Studie miteinbezogenen Neugeborenen war intensivpflichtig, wog unter 2500 g oder hatte eine noch unreife Lunge.

Die Studie wurde vor der Durchführung der Ethikkommission der TUM vorgelegt und genehmigt. Bei allen Neugeborenen, die an der Studie teilnahmen, wurde von beiden Elternteilen eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Dabei wurden sie zum einen, persönlich durch einen Kinderarzt, zum anderen, in Form einer schriftlichen Patienteninformation, auf den Zweck, die Risikofreiheit der Studie sowie auf die Einhaltung der Datenschutzbestimmungen hingewiesen.

Mit einem postnatalen Alter von 36-40 Stunden wurde den Neugeborenen, im Rahmen des Stoffwechselscreenings, welches bei jedem Neu- und Frühgeborenen routinemäßig durchgeführt wird, Blut zur Bilirubinbestimmung abgenommen. Für das Stoffwechselscreening wird in der Regel ein Blutvolumen von ca. 200 µl benötigt. Für die Vergleichsmessungen im Rahmen der Studie war die zusätzliche Entnahme von 60 µl Vollblut notwendig.

Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen eines Säuglings von 270 ml mit einem Gewicht von 3000 g, entspricht die zusätzliche Blutentnahme von 60 µl, bei einem Erwachsenen, mit einem Blutvolumen von 5 l, einer zusätzlichen Blutentnahme von 1,1 ml. Daher stellte die zum Zweck der Studie zusätzlich abgenommene Blutmenge keine Gefahr für die Entwicklung einer Anämie dar.

Bei der Blutabnahme wurden für den Versand in das klinisch-chemische Zentrallabor zur Analyse Lithiumheparinröhrchen (300 µl) der Firma Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland Cat # 20.1309) verwendet. Im Zentrallabor wurde die Blutprobe für 20 Minuten mit einer Zentrifugalkraft von 1500 g zentrifugiert und im Anschluss daran mit dem Gerät Vitros 350 analysiert.

Für die Bilirubinbestimmung mit dem POCT-Gerät Rapidlab 1265 wurden im Rahmen der Blutabnahme die Glaskapillaren Multi Cap S der Firma Siemens Healthcare Diagnostics (Cat # 2043295) mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von 175 µl verwendet. Nach der Blutentnahme wurde außerdem bei jedem Patienten der transkutane Bilirubinindex mittels des Bilirubinometer (Bil_z) auf der Stirn bestimmt und in der Patientenakte vermerkt. Die transkutane Bilirubinbestimmung wurde innerhalb von 60 Minuten nach der Blutabnahme durchgeführt.

Die Blutproben wurden nach Methode X im Labor (Bil_x) bzw. nach Methode Y auf der Intensivstation unter Verwendung des POCT-Gerätes (Bil_y) analysiert und die Resultate notiert. Die verwendeten Blutproben waren weder hämolytisch noch lipämisch.

Aus dem Kollektiv ergaben sich folgende Werte für die Auswertung:

Bei ikterischen Neugeborenen wurden, bedingt durch sich im Krankheitsverlauf entwickelnde erhöhte Bilirubinwerte, zusätzliche Kontrollen des Bilirubinwerts durchgeführt, wodurch sich ein Datensatz von 240 Messwerten ergab. Dabei lieferten die einzelnen Methoden eine unterschiedliche Anzahl an auswertbaren Werten. Die Methode X/Vitros 350 erbrachte 235, Methode Y/Rapidlab 1265 210 und Methode Z/JM-103 237 Messwerte. Die Differenzen ergaben sich aus verschiedenen Gründen im Bereich der einzelnen Methoden.

Bei Methode X handelte es sich vorwiegend um zu wenig eingesandtes Probenmaterial. Fehlende Werte der Methode Y resultierten zum einen aus bereits geronnenen Blutproben in den Glaskapillaren, bedingt durch den relativ hohen Hämatokrit der Neugeborenen, was zu einem Verstopfen des Probeneingangs des Blutgasanalysators führte. Zum anderen machten auch automatische Spülvorgänge und regelmäßige Kalibrationen des Blutgasanalysegeräts teilweise eine Messung unmöglich. Fehlende Bilirubinindices der Methode Z sind auf mangelnde Dokumentation zurückzuführen.

3.2 Methodik

Bei der durchgeführten Studie wurden die Daten mittels dreier verschiedener Messverfahren erhoben. Zur Anwendung kamen zum einen die Labormethode unter Verwendung der colorimetrischen, trockenchemischen Testung im Vollblut mittels Mehrschichtfilmentechnologie im klinisch-chemischen Zentrallabor, zum anderen die direkte Spektrofotometrie im Vollblut mithilfe des Blutgasanalysegerätes Rapidlab 1265 der Firma Siemens sowie die transkutane Bilirubinometrie mit dem Gerät Konica Minolta/Airshields JM-103 Jaundice Meter der Firma Dräger Medical.

3.2.1 Colorimetrische trockenchemische Testung im Humanserum mittels Mehrschichtfilmtechnologie im klinisch-chemischen Zentrallabor: Vitros 350 von Ortho-Clinical Diagnostics

Als Untersuchungsmaterial dient ein mit mindestens 1 ml Vollblut gefülltes Standard-Probenentnahmeröhrchen, welches zunächst zentrifugiert werden muss. Das durch 20-minütige Zentrifugation gewonnene Serum oder Heparinplasma kann dann als zu analysierendes Material für die Bilirubinbestimmung verwendet werden.

Bei dem verwendeten Vitros Gerät handelt es sich um ein vollautomatisches Analysegerät zur quantitativen Bestimmung klinisch-chemischer Parameter mit Hilfe der Mehrschichtfilm-Technologie [36 (S. 5)].

Das in der Studie verwendete Gerät Vitros 350 kann auf zwei unterschiedliche Methoden die Bilirubinbestimmung durchführen. Zum einen wird das Gesamtbilirubin durch eine Modifikation des Diazoverfahrens mittels des TBIL-Slides bestimmt. [12; 17; 36(S. 5)]. Zum anderen kann durch getrennte Messung des konjugierten und des unkonjugierten Bilirubins das Gesamtbilirubin durch direkte Spektrofotometrie unter Verwendung des BuBc-Slides gemessen werden [36 (S.5)].

Von zentraler Bedeutung für die Funktionsweise des Geräts ist das in einer Mehrschichtfilmtechnologie hergestellte gebrauchsfertige Plättchen. Dieses Plättchen besteht aus 4 Schichten. Die erforderlichen Reagenzien sind auf einem dünnen Film appliziert, der zusammen mit der Trägerschicht ein Plättchen mit einer ca. 1 cm² großen Reaktionszone bildet [36 (S.5); 38 (S.2366)].

3.2.1.1 Bestimmung des Gesamtbilirubins nach dem Diazoverfahren (TBIL-Slide)

Die Routinemethode nach Kupplung mit Diazoniumsalzen beruht auf der Azokupplung von Bilirubin und Diazoniumionen an der zentralen Methylengruppe des Bilirubins. Dabei reagiert das Bilirubin mit diazotierter Sulfanilsäure unter Bildung eines Azopigments und Hydroxypyromethen-Carbinol. Hydroxypyromethen-Carbinol reagiert dann mit einem weiteren Molekül diazotierter Sulfanilsäure. Unter Abspaltung von Formaldehyd entsteht ein zweites Molekül des Azopigments. Aus Bu ergeben sich somit zwei diazotierte Isomere und aus Bc zwei verschiedene, glukuronisierte Azopigmente, sowie zwei nicht-veresterte Monomere. Die entstandenen Azopigmente verfügen über Indikatoreigenschaften, die durch fotometrische Quantifizierung den Bilirubingehalt bestimmen lassen [36(S. 3)]. Aufgrund der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen reagiert Bu nur langsam mit den Diazoniumsalzen, Bc und Bd hingegen schnell. Aus

diesem Grund ist zur Bestimmung des Gesamtbilirubins die Zugabe von gewissen Akzeleratoren notwendig. Dabei handelt es sich beispielsweise um Coffein, Methanol, Ethanol, Natriumacetat, Natriumbenzoat oder Diphyllin. Der Zusatz dieser Stoffe bewirkt zum einen die Schwächung der intramolekularen Wasserstoffbrücken des Bu, sowie zum anderen die Freisetzung des Bu von Albumin. Dies führt zu einer ähnlich schnellen Reaktionszeit für Bu [36(S. 3)].

Das bei Vitros 350 zur Bestimmung des Gesamtbilirubins eingesetzte, in Mehrschichtfilmtechnologie hergestellte TBIL-Analyseplättchen, besteht aus gebrauchsfertigen Reagenzien, die auf einem transparenten Polyesterfilm aufgebracht sind. Der Plättchenaufbau besteht von oben nach unten aus einem oberen Plättchenrahmen, einer Verteilerschicht (BaSO_4) mit den gebrauchsfertigen Reagenzien, einer Pufferschicht (Puffer pH 3,0), einer Trägerschicht und dem unteren Plättchenrahmen [2(S. 3)].

Bei den in der Verteilerschicht befindlichen Reagenzien handelt es sich um ein stabilisiertes Diazoniumsalz [4-(N-Carboxy-Methylaminosulfonyl)-Benzoldiazoniumhexafluorosphat] sowie Diphyllin und Triton X-100 als Akzeleratoren [2(S. 3); 36(S. 5)].

Das Probenmaterial wird durch die Verteilerschicht gleichmäßig in die darunterliegenden Schichten verteilt. Durch das Diphyllin und Triton X-100 wird Bu von Albumin getrennt und die, für Bu bekannte Reaktionsträgheit beschleunigt. Die einzelnen Bilirubinfractionen Bu, Bc sowie die Deltafraktion reagieren im Anschluss mit dem Diazoniumsalz [4-(N-Carboxy-Methylaminosulfonyl)-Benzoldiazoniumhexafluorosphat] zu einem Farbstoff den Azobilirubin-Chromophoren [2(S. 2); 36(S. 5)]. Der quantitativ gebildete Farbstoff wird anschließend an eine kationische Beize gebunden und bei 540/460 nm fotometrisch gemessen [36(S. 5)].

3.2.1.2 Bestimmung von unkonjugiertem und konjugiertem Bilirubin mit Hilfe der direkten Spektrofotometrie (BuBc-Slide)

Das für diese Analysemethode verwendete BuBc-Analyseplättchen besteht wie auch der TBIL-Slide aus 4 Schichten. Auf einem transparenten Polyesterfilm sind die für die Bilirubinanalyse benötigten gebrauchsfertigen Reagenzien appliziert [3(S. 3)]. Der Plättchenaufbau besteht von oben nach unten aus einem oberen Plättchenrahmen, einer Verteilerschicht (Titaniumdioxid, Koffein, Natriumbenzoat), einer Maskierungsschicht, einer Reagenzschicht, die eine Pufferlösung (Puffer pH 8,0) sowie die kationische Beize enthält, einer Trägerschicht und dem unteren Plättchenrahmen [3(S. 3)]. Die oberste Schicht, die Verteilerschicht, verteilt das 10 μl Serum-bzw. Plasmaprobenmaterial gleichmäßig auf dem Plättchen. Des Weiteren enthält die oberste Schicht

Titaniumdioxid, Koffein und Natriumbenzoat sowie Surfactants, welche als Akzeleratoren eingesetzt werden und somit eine schnellere Dissoziation des Bilirubins von Albumin ermöglichen [3(S. 2); 36(S. 5); 38(S. 2366)].

Die Verteilerschicht zeichnet sich zudem durch ihre lichtundurchlässige Eigenschaft aus, wodurch Nicht-Bilirubin-Pigmente wie Hämoglobin, Lipide oder Lipochrome vor einer optischen Erfassung abgeschirmt werden. Die Verteilerschicht erfüllt des Weiteren die Aufgabe, mehr als 90% der Serumproteine größer als 60.000 Da zurückzuhalten. Das von Albumin durch die Akzeleratoren dissoziierte Bu gelangt mit den Bilirubinglucuroniden durch die nächste Schicht, die Maskierungsschicht, wodurch Proteine sowie Delta-Bilirubin zurückgehalten werden [36(S. 5)]. Diese enthält Titaniumdioxid und Gelatine [38(S. 2366)]. Diese Maskierungsschicht blockiert somit zusätzlich auf optischem Wege Störsubstanzen, die in der Verteilerschicht liegen [3(S. 2); 38(S. 2366)]. In der darauffolgenden Reagenzschicht befinden sich die kationische Beize sowie ein pH-Puffer von 8,0. Nach Bindung an die Beize ergeben sich für die Bilirubinglucuronide ein Absorptionsmaximum bei 420 nm, für das Bu allerdings ein Absorptionsmaximum bei 460 nm [36(S. 5); 38(S. 2366)]. Durch die Bindung an die kationische Beize verschieben sich die jeweiligen Absorptionsmaxima der Bilirubinfraktionen, wodurch sich die molaren Extinktionskoeffizienten signifikant erhöhen [3(S. 2)]. Nach Ablauf dieser Indikatorreaktion führt das Gerät eine Zweiwellenlängenmessung durch und bestimmt durch die, im Anschluss daran durchgeführte aufwendige Berechnung, die Konzentrationen für Bu und Bc [36(S. 5)].

Aufgrund der Tatsache, dass das Hämoglobin durch die einzelnen Schichten des Slides zurückgehalten wird, kann gewährleistet werden, dass der Test durch Hämolyse kaum beeinflusst wird. Entsprechend der Herstellerangaben wird die Bilirubinbestimmung für Proben von Neugeborenen, die weniger als 14 Tage alt sind, mithilfe des BuBc-Slides durchgeführt. Als Begründung wird hierbei vom Hersteller die unterschiedliche Kalibration der beiden verschiedenen Methoden genannt [36(S. 5)]. Somit gilt die Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Hilfe der direkten Spektrofotometrie mit BuBc-Slide in der hier vorliegenden Studie als wichtigste Vergleichsmethode gegenüber der Bestimmung des Gesamtbilirubins mittels Rapidlab 1265, sowie der Bestimmung des transkutanen Bilirubinindex anhand des Bilirubinometers JM-103.

Zur Bestimmung des Bilirubins benötigt das Gerät ein Blutvolumen von mindestens 60 µl. Der Messbereich des Geräts liegt bei 0-27 mg/dl. Die Kalibration erfolgt mit herstellereigenen Standards, die auf die HPLC-Methode von Lauff [23(S. 629- 631)] zurückzuführen sind [36(S.6)].

3.2.2 Direkte Spektrofotometrie im Vollblut mittels Blutgasanalysegerät Rapidlab 1265 der Firma Siemens

Das in der Studie verwendete Gerät Rapidlab 1265 der Firma Siemens führt im CO-Oxymetriemodul eine Mehrwellenlängenmessung im nicht-hämolytierten Vollblut durch, welche neben der Gesamt-Hämoglobinkonzentration, den Hämoglobinfractionen ebenfalls Bilirubin bestimmt. Für die Messung benötigt das Gerät 50 µl Vollblut in einer Glaskapillare, welche als Küvette dient. Rapidlab 1265 verwendet für die Mehrwellenlängenmessung 256 Wellenlängen im Bereich von 500- 680 nm [36(S. 5)].

Dabei berechnet sich die totale Hämoglobinkonzentration (cHb) aus der Summe aller gemessenen Hämoglobinfractionen, der Oxyhämoglobinfraction (O₂Hb), der Deoxyhämoglobinfraction (HHb), der Methhämoglobinfraction (MetHb) sowie der Carboxyhämoglobinfraction (COHb):

$$cHb = cO_2Hb + cHHb + cMetHb + cCOHb$$

Die einzelnen Hb-Fractionen absorbieren Licht bei unterschiedlichen, jeweils charakteristischen Wellenlängen. Mit Hilfe von Matrixgleichungen errechnet die spektrale Absorptionmethode die Konzentration der Fractionen. Dabei entspricht die Absorption (A) bei einer entsprechenden Wellenlänge dem Produkt aus Weglänge (l), der Konzentration (c) und dem entsprechenden molaren Absorptionskoeffizienten (ε):

$$A = l \times \epsilon \times c$$

Bei mehreren Substanzen entspricht die gemessene Absorption der Summe der Einzelabsorptionen. Somit wird, um die Konzentrationen bestimmen zu können, jede Hb-Fraktion einzeln über Absorptionsmessungen mit dem CO-Oxymeter bei charakteristischen Wellenlängen bestimmt [27(S. 59)].

Die Absorptionsspektren von Hämoglobin und Bilirubin unterscheiden sich hierbei wesentlich [36(S. 5)]. Die Bilirubinkonzentration errechnet sich aus den Ergebnissen der Absorptionsmessungen mit Hilfe der Multi-Komponenten-Analyse. Bei dem Algorithmus handelt es sich um das mathematische Verfahren der Methode der kleinsten Quadrate [36(S. 5)].

Das in der Studie verwendete Blutgasanalysegerät ist in der Lage innerhalb von 60 Sekunden eine vollständige Blutgasanalyse, sowie die oben erwähnte CO-Oxymetrie durchzuführen, um damit Blutgase, Elektrolyte und andere Stoffwechselfparameter zu bestimmen. Für die alleinige Bilirubinbestimmung ist ebenfalls ein Blutvolumen von 60 µl erforderlich. Der Messbereich für Bilirubin erstreckt sich von 2-60 mg/dl. Eine Qualitätskontrolle ist mittels herstellereigenen Kontrollproben möglich [36(S. 5)].

3.2.3 Transkutane Bilirubinometrie: Konica Minolta/Airshields JM-103 Jaundice Meter

Als Grundprinzip der transkutanen Bilirubinometrie wird eine reflexionsdensitometrische Messung der Haut im Bereich der Stirn oder des Sternums eingesetzt, wobei die Eigenfarbe der Haut korrigiert wird [24(S. 327)]. Das JM-103 Jaundice Meter misst die Gelbfärbung der Haut und des subkutanen Gewebes durch Bestimmung der Differenz der optischen Dichte des an der Haut reflektierten Lichts im Bereich zweier Wellenlängen bei 450 nm und 550 nm. Als Lichtquelle dient eine Xenon-Blitzlichtlampe. Beim Aufsetzen der Messsonde auf die Haut des Neugeborenen dringt das Licht durch zwei verschiedene Strahlengänge unterschiedlich tief in die Haut ein. Dabei wird das Licht vom Gewebe gestreut, absorbiert und teilweise reflektiert. Das an den oberflächlichen Schichten der Haut reflektierte Licht gelangt über einen kurzen Strahlengang im Inneren des Leiters zurück zu der korrespondierenden Fotodiode und wird dort gemessen. Der Anteil, der in die tieferen Hautschichten eindringt, wird von Blau im subkutanen Gewebe absorbiert und nach der Aufspaltung in einen blauen und grünen Strahl über einen langen Strahlengang im äußeren Teil des Leiters zur zweiten Fotodiode zurückgeleitet. Dort wird der reflektierte Lichtanteil von Silikonfotозellen mit blauem und grünem Filter gesammelt und in elektrische Signale transformiert [13(S. 1285); 39(S. 81-82)]. Die Verwendung von Licht zweier Wellenlängen und die Messung des reflektierten Anteils mittels zweier Fotodioden ermöglicht die Bestimmung eines transkutanen Bilirubin-Dichtewerts, der durch Störfaktoren wie die Pigmentierung der Haut, durch Melanin und Hämoglobin und durch den Reifegrad der Haut des Neugeborenen nur minimal beeinflusst wird. Dadurch wird versucht, ein weitestgehend Bilirubinspezifisches Signal zu erhalten [13(S. 1285); 24(S. 85)]. Die Grundlage hierfür bietet die unterschiedliche Verteilung von Melanin und Bilirubin in den Hautschichten. So ist Melanin vorwiegend in den epidermalen Hautschichten zu finden, wohingegen das Bilirubin, das stark an Membranproteine und an Albumin gebunden ist, in der Subkutis vorkommt [39(S. 87)]. Nach Aufnahme des reflektierten Lichts in die jeweiligen Fotodioden berechnet das Gerät den optischen Dichteunterschied für beide Wellenlängenbereiche, abzüglich des reflektierten Lichtanteils aus Epidermis und Dermis. Daraus ergibt sich ein optischer Dichteunterschied allein für das subkutane Gewebe. Die Dichtedifferenz der Extinktion korreliert linear mit dem TSB-Wert und ergibt damit einen Schätzwert für die Bilirubinkonzentration im Serum (Bilirubin-Index). Dieser Wert wird dann digital auf dem Gerät angezeigt [13(S. 1285); 39(S. 82-83)].

Das Modell, welches in der hier vorliegenden Studie zur Anwendung kam, verfügt über einen Messbereich von 0-20 mg/dl. Die Kalibration ist im Gerät fest eingestellt und kann durch ein Prüfgerät in der Ladestation überprüft werden [24(S. 86)].

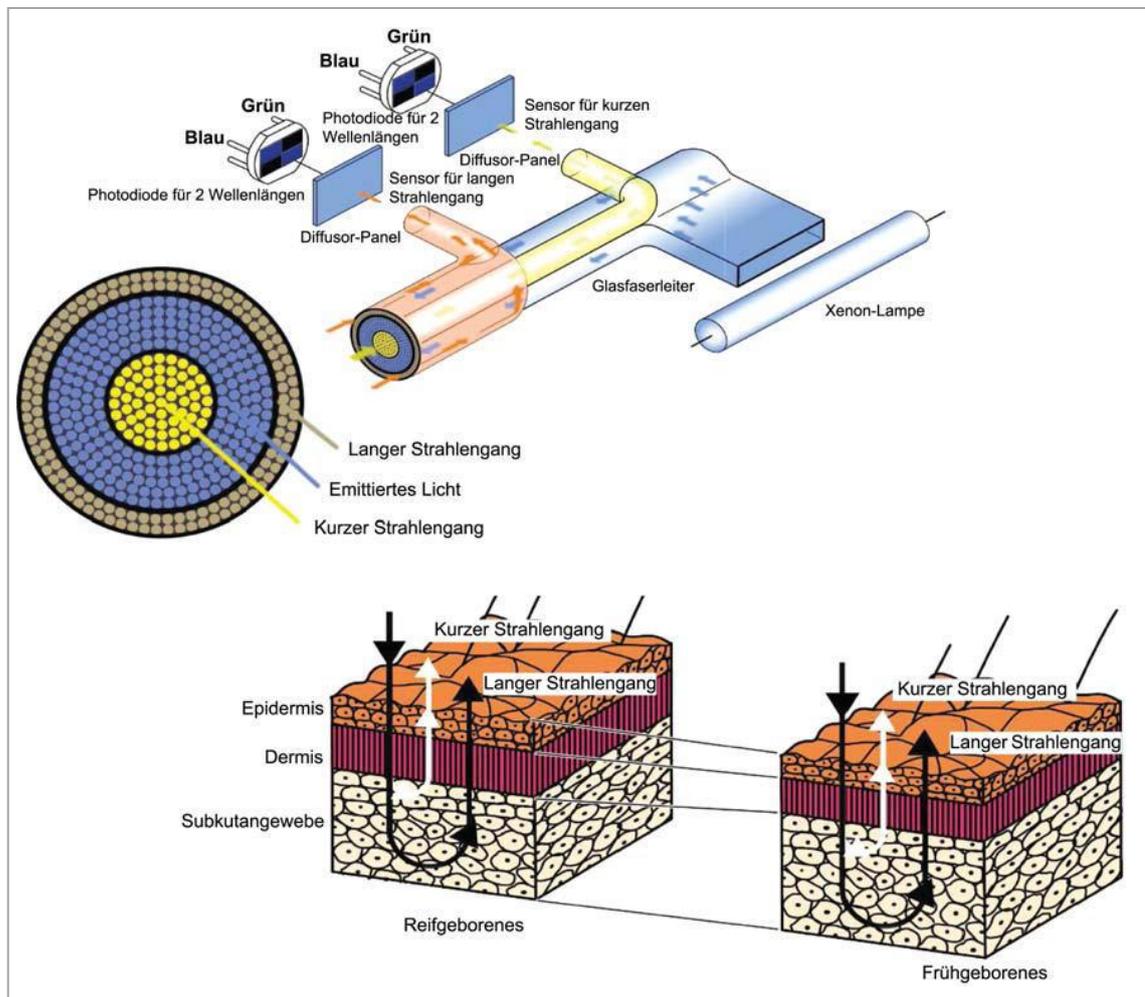


Abb. 5: Schematische Darstellung des Messprinzips des JM-103, modifiziert nach el-Beshbishi S. N., Shattuck K. E., Mohammad A. A., Petersen J. R.: Hyperbilirubinemia and transcutaneous bilirubinometry [13(S. 1285)]

3.3 Statistische Methoden

3.3.1 Passing-Bablok-Regression

Zur Beurteilung der Übereinstimmung der Messmethoden wurde als statistisches Verfahren die Passing-Bablok-Regression verwendet. Die Koeffizienten (*Intercept* und *Slope*) der Regressionsgeraden nach Passing-Bablok beschreiben die Übereinstimmung der jeweils zu vergleichenden zwei Messmethoden.

Der *Intercept* (Y-Achsenabschnitt) beschreibt die mittlere Abweichung der Messungen, den sogenannten Bias bzw. systematischen Fehler, wenn die Steigung der Regressionsgeraden (*Slope*) gleich eins ist. Die Steigung der Regressionsgeraden (*Slope*) entspricht einer zu- oder abnehmenden Abweichung der Messwerte mit steigendem Wertniveau.

Bei einer Geradensteigung ungleich 1 liegt ein proportionaler Fehler vor. Dabei entspricht der Y-Achsenabschnitt (*Intercept*) bei einem Messwert von 0 unter der Referenzmethode auf der X-Achse der mittleren Abweichung zwischen beiden Messverfahren.

Die Steigung der Regressionsgeraden (*Slope*) beschreibt den mittleren, d.h. den zu erwartenden absoluten Zuwachs in der Messdifferenz beider Verfahren in Abhängigkeit des ansteigenden Werteneiveaus auf der Referenzskala. Die *Slope* gibt den proportionalen Fehler an.

Für beide Koeffizientenschätzungen werden 95%-ige Konfidenzintervalle (KI) angegeben, welche die Unsicherheit der Stichprobeninformation zum Ausdruck bringen. Dabei setzt sich die Stichprobenunsicherheit aus der Fallzahl und der Datenvariabilität zusammen. Auf diese Weise besitzt jeder Parameterwert, der in einem solchen Konfidenzintervall enthalten ist, die 95%-ige Wahrscheinlichkeit, dem wahren zugrundeliegenden Koeffizienten (*Intercept* und *Slope*) zu entsprechen. Für die adäquate Beurteilung der tatsächlich zugrundeliegenden Übereinstimmung der Messverfahren werden daher die Konfidenzintervalle beider Koeffizienten zur Interpretation herangezogen. Um statistische Gleichwertigkeit der Methoden zu folgern, müssen der Nullwert für den *Intercept* sowie der Wert 1 für die *Slope* im jeweiligen Konfidenzintervall enthalten sein. Die Intervallgrenzen sollten ferner keine klinischen Toleranzschranken hinsichtlich eines systematischen und/oder proportionalen Fehlers überschreiten.

3.3.2 Bland-Altman-Übereinstimmungsplot

Um eventuelle Abweichungen der Messverfahren in Abhängigkeit vom Wertenniveau zu erfassen, wurde als weitere statistische Methode der Bland-Altman-Übereinstimmungsplot angewendet. Hierbei werden die Differenzen zweier zu vergleichender Messmethoden gegen den Mittelwert (MW) beider Messungen in einem Streudiagramm gegenübergestellt. Es soll geklärt werden, ob sich bei zunehmendem Wertenniveau die Messdifferenz vergrößert. Zusätzlich werden, um das Ausmaß der individuellen Abweichungen zu quantifizieren, sogenannte Grenzen der individuellen Übereinstimmung (*limits of agreement*) berechnet. Diese entsprechen dem 2,5. bzw. dem 97,5. Verteilungspersentil der gemessenen Differenzen. Das bedeutet, dass demnach 95% der individuellen Abweichungen der Messwerte zwischen beiden Messmethoden in diesem Intervall erwartet werden können. Im Allgemeinen entsprechen die *limits of agreement* einem 95%-igen Erwartungsbereich von Einzelbeobachtungen.

Die *limits of agreement* sollten des Weiteren keine klinisch relevanten Grenzen überschreiten. Neben diesen Übereinstimmungsgrenzen wird zusätzlich der systematische Fehler (*Bias*) ermittelt. Dieser gibt die mittlere Abweichung über alle Messwerte an, ungeachtet eines proportionalen Fehlers (Passing-Bablok-Regression).

Für den Bias wird ebenfalls ein 95%-iges Konfidenzintervall angegeben, in dem der Äquivalenzwert 0 enthalten sein sollte. Kritische klinische Akzeptanzschranken für den systematischen Fehler sollten die Intervallgrenzen nicht überschreiten.

3.3.3 Bivariate Korrelationsanalysen

Im Zuge der Datenanalyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, um die Stärke des monotonen Zusammenhangs zwischen jeweils zwei Messverfahren zu quantifizieren. Der Korrelationskoeffizient nimmt Werte im Bereich -1 bis 1 an. Je näher der Koeffizient am Absolutwert 1 liegt, umso größer ist der monotone Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen. Ein Korrelationskoeffizient nahe oder gleich 0 bedeutet, dass kein Zusammenhang besteht. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt an, ob ein gleichsinniger (positiver) Zusammenhang oder ein gegensinniger (negativer) Zusammenhang besteht, das heißt, ob mit steigenden Werten der einen Vergleichsgröße ebenfalls die Werte der anderen Größe ansteigen, oder ob diese fallen.

3.3.4 2-paired-t-test und Bonferroni-Korrektur

Als statistisches Verfahren der Hypothesentestung wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit der 2-paired-test verwendet. Mit dem durchgeführten Test wurde geprüft, ob sich die Mittelwerte je zweier Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Damit soll sichergestellt werden, dass der beobachtete Gruppenunterschied im Wertenniveau, ausgedrückt durch den Mittelwert eines quantitativen Merkmals, nicht durch Zufall entstanden ist.

Da es sich bei dem durchgeführten 2-paired-test um ein Instrument für den Zweigruppenvergleich handelt, wurden die paarweisen Einzelvergleiche nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen adjustiert.

4 Ergebnisse

4.1 Häufigkeitsverteilung der Messwerte

Es wurde ein Datensatz von 240 Bilirubinmesswerten erhoben und mit Hilfe der in Teil 3.3 detailliert erläuterten statistischen Methoden analysiert.

Für die Methode X/Vitros 350 ergaben sich Messwerte von 0,1 mg/dl bis 19,5 mg/dl. Bei Methode Y/Rapidlab 1265 und Z/JM-103 konnten Werte von jeweils 2 mg/dl bis 19,5 mg/dl bzw. 0 bis 16,5 mg/dl ermittelt werden. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Bilirubinwertverteilungen unter den einzelnen Messmethoden mit Hilfe von Histogrammen graphisch dargestellt. Es zeigten sich unter allen drei Messmethoden weitestgehend symmetrische Werteverteilungen der gemessenen Bilirubinkonzentrationen.

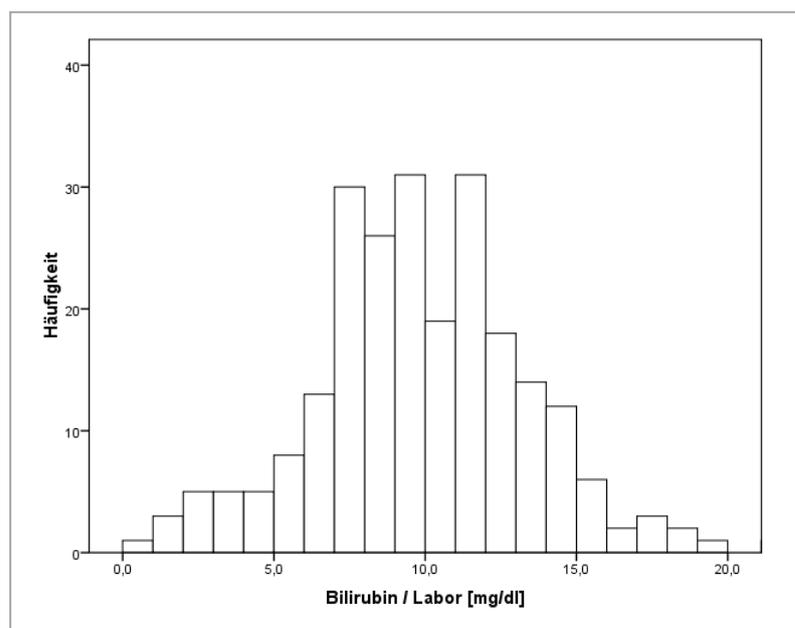


Abb. 6: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Bilirubinmesswerte Methode X/Vitros 350

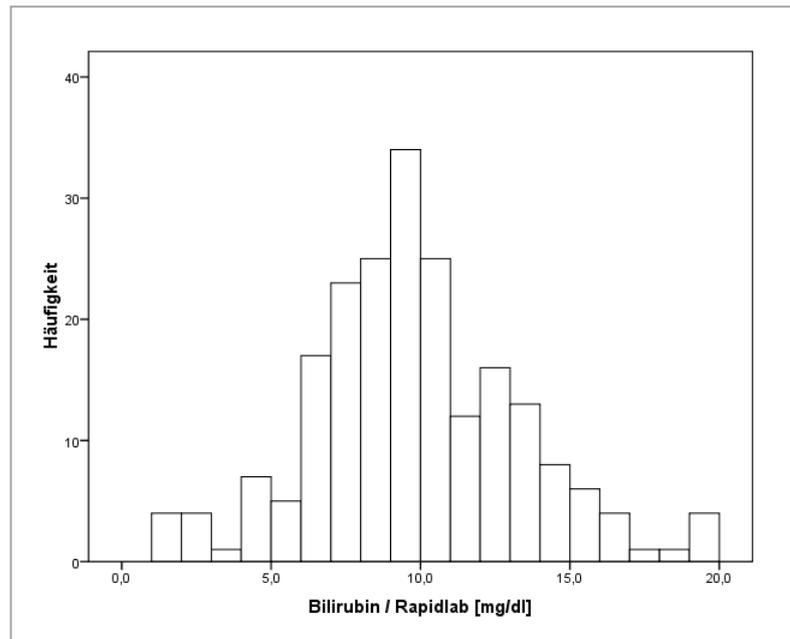


Abb. 7: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Bilirubinmesswerte Methode Y/Rapidlab 1265

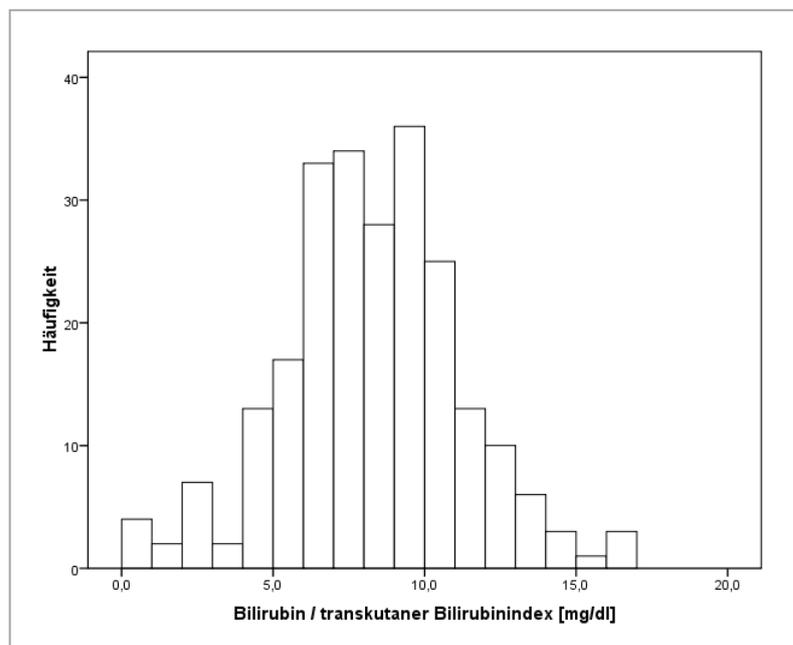


Abb. 8: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Methode Z/JM-103

4.2 Deskriptive Statistik

4.2.1 Quantitative Darstellung der Verteilung der Messwerte

Methode	#	Anzahl n	Median in [mg/dl] (96,3% KI)	Mittelwert in [mg/dl] (95% KI)	[2,5.; 97,5.] Perzentile in [mg/dl]
Vitros 350	X	210	9,600 (9,100-9,900)	9,765 (9,291-10,238)	[2,165; 17,780]
Rapidlab 1265	Y	235	9,700 (9,200-10,300)	9,782 (9,338-10,225)	[2,570; 17,050]
JM-103	Z	237	8,200 (7,600-8,800)	8,208 (7,830-8,586)	[1,870; 14,025]

Abb. 9: Statistische Maßzahlen aller gemessenen Bilirubinwerte

Für den 2-paired-t-test ergaben sich folgende Werte:

#X vs. #Y: nicht signifikant $p= 0,303$;

#X vs. #Z: signifikant $p< 0,001$;

#Y vs. #Z: signifikant $p< 0,001$;

Die Messungen ergaben eine hohe Korrelation zwischen den einzelnen Methoden.

Die durchgeführten Messungen ergaben für die Methode X/Vitros 350 einen Mittelwert von 9,77 mg/dl (mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall von 9,29-10,24). Die Messungen der Methode Y/Rapidlab1265 erbrachten einen minimal geringeren Mittelwert. Der Mittelwert betrug hierbei 9,78 mg/dl (mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall von 9,34-10,23). Hingegen hierzu zeigte Methode Z/JM-103 einen deutlich geringeren Mittelwert der Messergebnisse von 8,21 mg/dl (mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall von 7,83-8,59).

Mit dem durchgeführten 2-paired-t-test wurde geprüft, ob sich die Mittelwerte je zweier Stichproben signifikant voneinander unterscheiden.

Hierbei ergab sich, dass bei Methode Z/JM-103 statistisch signifikant geringere Werte zu verzeichnen waren, als bei Methode X/Vitros 350, bzw. im Vergleich zu Methode Y/Rapidlab 1265:

#X (MW 9,77 mg/dl) vs. #Z (MW 8,21mg/dl): $p < 0,001$.

#Y (MW 9,78 mg/dl) vs. #Z (MW 8,21mg/dl): $p < 0,001$.

Die geringe Mittelwertdifferenz von 0,02 mg/dl zwischen Methode X/Vitros 350 und Methode Y/Rapidlab 1265 hingegen war statistisch nicht signifikant:

#X (MW 9,77 mg/dl) vs. #Y (MW 9,78 mg/dl): $p = 0,303 > p = 0,001$.

Nachdem es sich bei dem durchgeführten t-Test um ein Instrument für den Zwei-Gruppenvergleich handelt, wurden die paarweisen Einzelvergleiche nach der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen adjustiert. Hierzu wird der berechnete p-Wert mit dem Faktor 3 multipliziert:

#X vs. #Y: $p = 0,303 \times 3 = 0,909$

#X vs. #Z: signifikant $p < 0,001 \times 3 < 0,003$

#Y vs. #Z: signifikant $p < 0,001 \times 3 < 0,003$.

Nach der Adjustierung bleiben die Gruppenunterschiede #X vs. #Z und #Y vs. #Z statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Mittelwertdifferenz zeigt nach der Bonferroni Adjustierung für die Methoden #X vs. #Y weiterhin keine statistische Signifikanz auf.

4.2.2 Graphische Darstellung der Verteilung der Messwerte

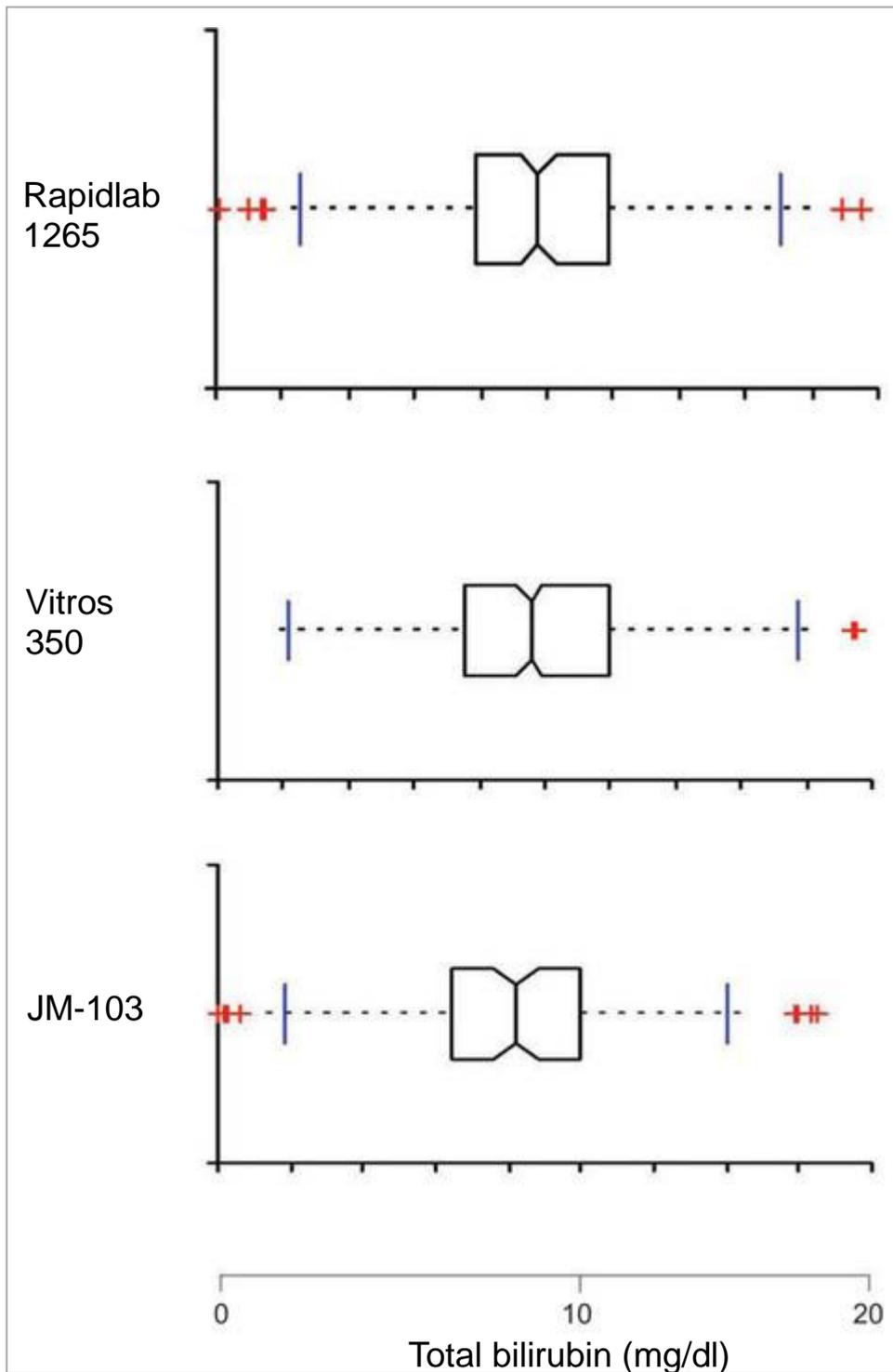


Abb. 10: Box- und Whiskerplots der Bilirubinmesswerte der drei verschiedenen Geräte

4.3 Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Y/Rapidlab 1265

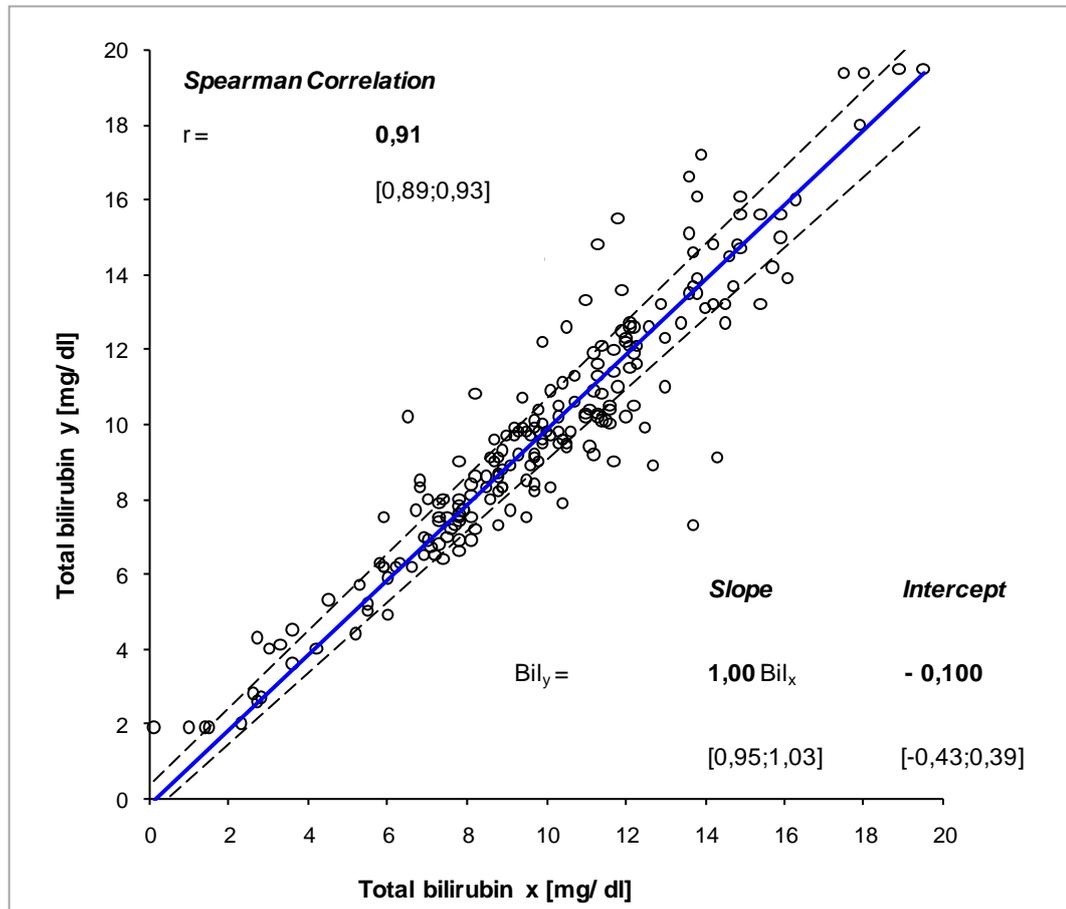


Abb. 11: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Y/Rapidlab 1265

Angegeben: Anpassungsgerade der Passing-Bablok-Regression (----) mit 95%-igem Konfidenzbereich (- - -); Regressionsgeradengleichung: *Slope* + *Intercept* mit jeweils zugehörigen 95%-igen Konfidenzintervallen []. Des Weiteren angegeben r: Spearman-Korrelationskoeffizient und zugehöriges 95%-iges Konfidenzintervall [].

In der Passing-Bablok-Regression konnten keine statistisch signifikanten Abweichungen der Bilirubinmesswerte zwischen den beiden Verfahren festgestellt werden. So betrug der geschätzte relative Fehlerzuwachs je Bilirubineinheit 0%, entsprechend einem Anstieg der Regressionsgeraden (proportionaler Fehler) von 1,00. Für den Geradenanstieg ergab sich ein 95%-iges Konfidenzintervall von [0,95; 1,03], welches den kritischen Wert 1 beinhaltet. Demzufolge liegt kein proportionaler Fehler vor. Die

geschätzte systematische Abweichung im Koordinatenursprung betrug $-0,10$, wobei das zugehörige Konfidenzintervall $[-0,43; 0,39]$ den kritischen Wert 0 (kein systematischer Fehler) nicht ausschließt. Somit ist die systematische Abweichung (*Intercept*) als statistisch nicht signifikant zu bewerten. Es konnten somit weder klinisch relevante, noch statistisch signifikante Abweichungen der Bilirubinmessungen beider Verfahren festgestellt werden.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt $0,91$ (also nahe 1) und verweist somit auf einen starken, gleichsinnigen, monotonen Zusammenhang.

4.4 Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Y/Rapidlab 1265

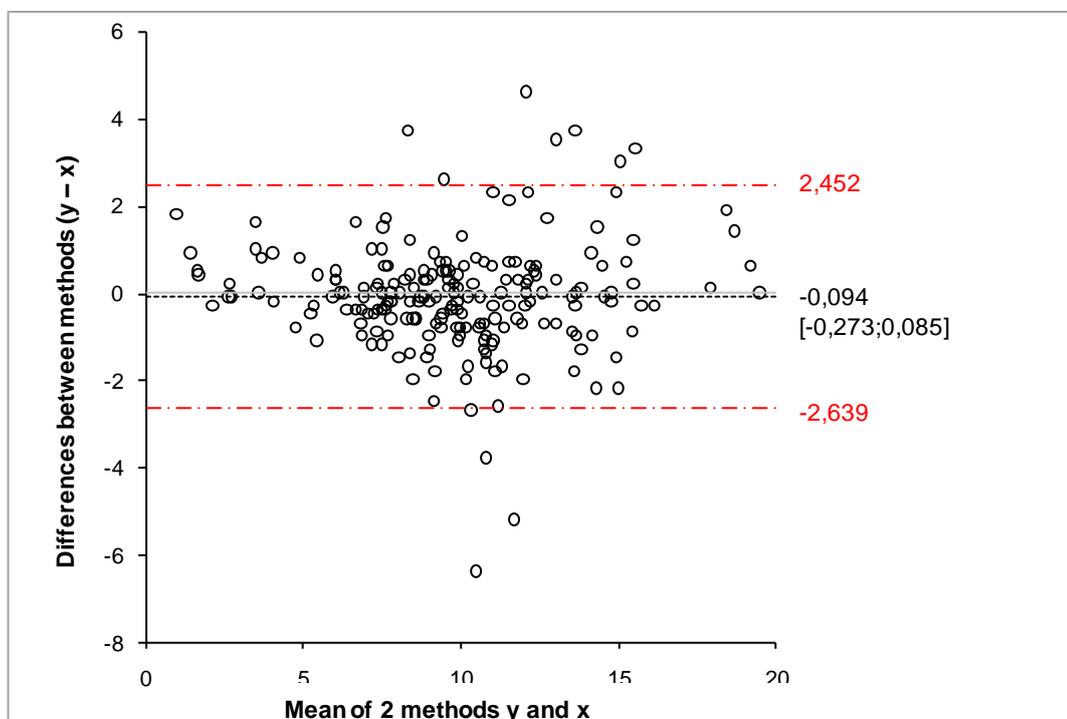


Abb. 12: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Y/Rapidlab 1265

Aufgetragen sind die Differenzen der Bilirubinmesswerte der Methode X/Vitros 350 minus Methode Y/Rapidlab 1265 vs. Mittelwerte der Messwerte beider Verfahren in mg/dl. Zusätzlich angegeben sind die 95%-igen Grenzen der Übereinstimmung (*limits of agreement*) (---) und der systematische Fehler (Bias) (---) mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall [].

In der Bland-Altman-Analyse konnten lediglich geringe Tendenzen hinsichtlich eines Fehlerzuwachses in Abhängigkeit des Bilirubinwertenniveaus festgestellt werden. So waren insbesondere bei geringen mittleren Bilirubinmesswerten vergleichsweise kleine Abweichungen zwischen den Messungen beider Methoden festzustellen. Die berechneten 95%-igen Grenzen der Übereinstimmung (*limits of agreement*) ergaben sich zu -2,6 und 2,5, d.h., dass mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit Abweichungen von bis zu 2,6 mg/dl erwartet werden müssen. Die geschätzte mittlere systematische Abweichung ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus belief sich auf -0,09 mit dem zugehörigen 95%-igen Konfidenzintervall [-0,27; 0,09] und war somit weder klinisch noch statistisch signifikant, da der kritische Wert 0 im Konfidenzintervall enthalten ist.

4.5 Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Z/JM-103

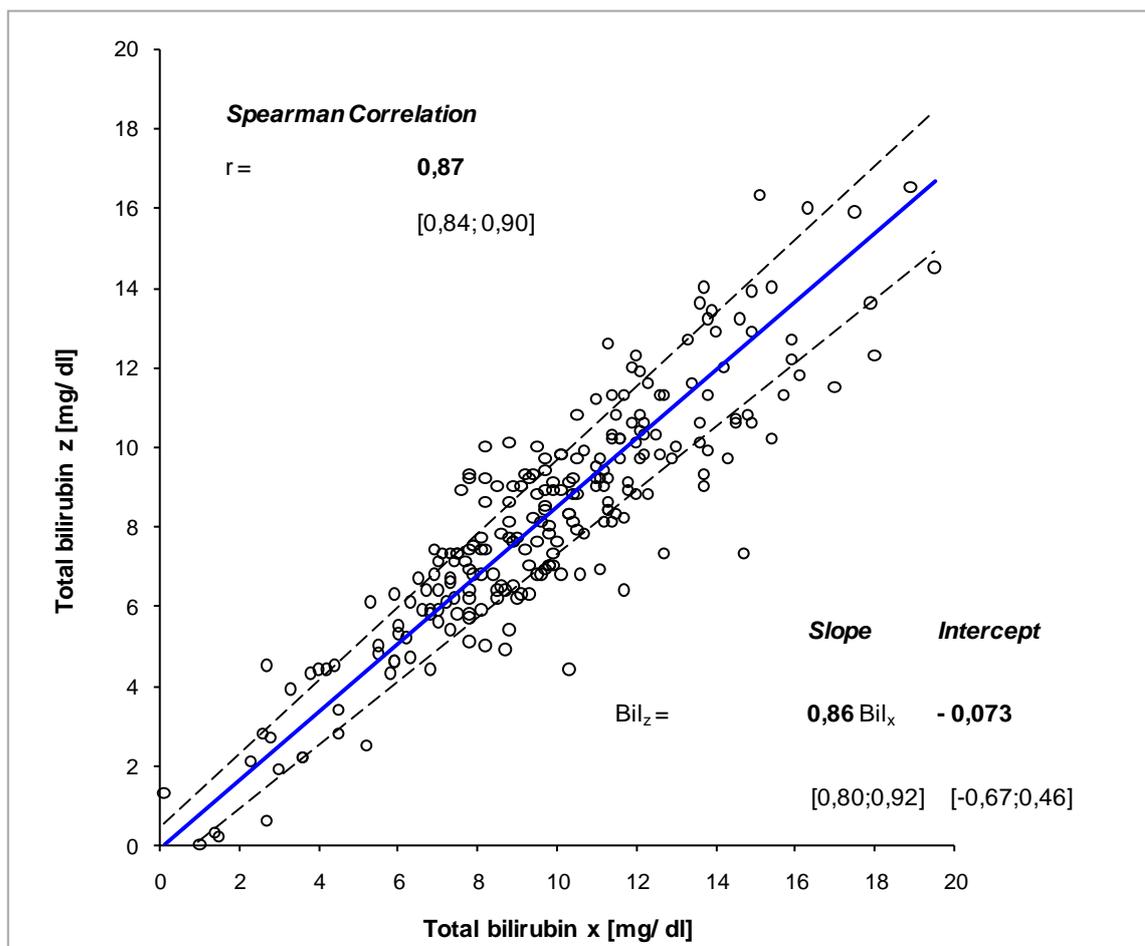


Abb. 13: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Z/JM-103

Angegeben: Anpassungsgerade der Passing-Bablok-Regression (----) mit 95%-igem Konfidenzbereich (- - -); Regressionsgeradengleichung: *Slope* + *Intercept* mit jeweils zugehörigen 95%-igen Konfidenzintervallen []. Des Weiteren angegeben r: Spearman-Korrelationskoeffizient und zugehöriges 95%-iges Konfidenzintervall [].

Die Passing-Bablok-Regressionsanalyse ergab für den Vergleich der Methoden X/Vitros 350 und Z/JM-103 eine statistisch signifikante Abweichung. Der relative Fehlerzuwachs betrug, bezogen auf die Labormessungen, 14% pro mg/dl (Anstieg der Regressionsgeraden: 0,86) mit einem 95%-igen Konfidenzintervall von [0,80; 0,92], welches den kritischen Wert 1 ausschloss. Demzufolge wurde ein statistisch signifikanter proportionaler Fehler von 0,86 in der Bilirubinmessung zwischen Methode X/Vitros 350 und Z/JM-103 festgestellt. Die geschätzte absolute systematische Abweichung im Koordinatenursprung betrug -0,07. Da das zugehörige Konfidenzintervall [-0,67; 0,46] den kritischen Wert 0 enthält, ist die systematische Abweichung jedoch nicht als statistisch signifikant zu erachten.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,87 und verweist somit auf einen substantiellen, gleichsinnigen monotonen Zusammenhang.

4.6 Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden X/Vitros 350 und Z/JM-103

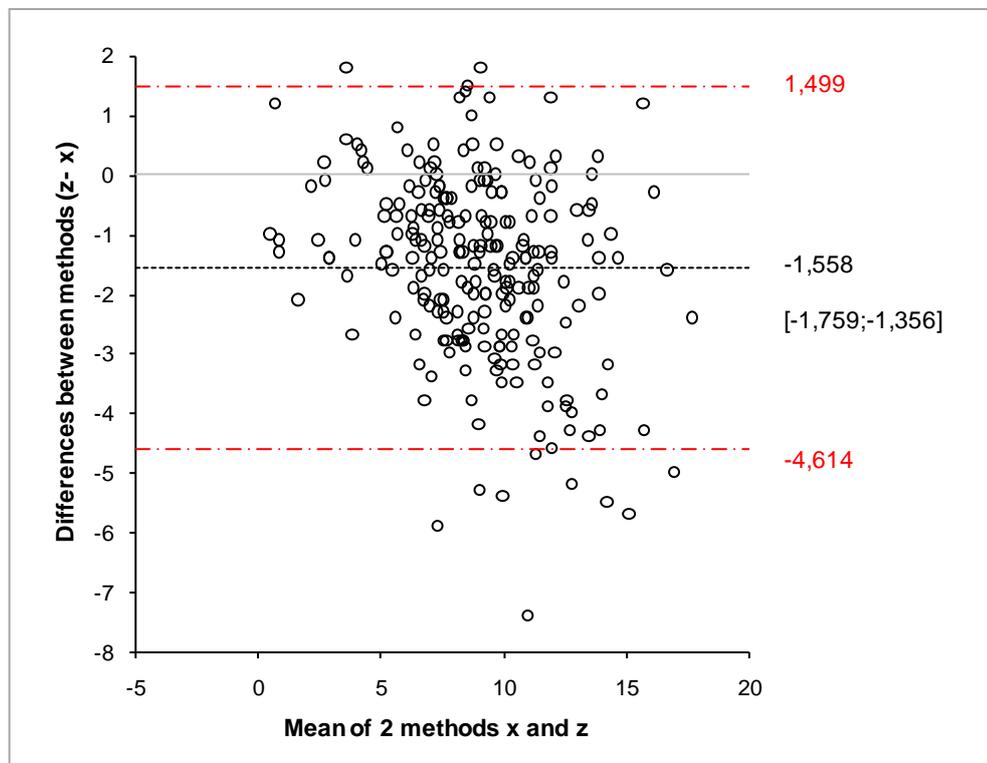


Abb. 14: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Z/JM-103

Aufgetragen sind die Differenzen der Bilirubinmesswerte der Methode X/Vitros 350 minus Methode Z/JM-103 vs. Mittelwerte der Messwerte beider Verfahren in mg/dl. Zusätzlich angegeben sind die 95%-igen Grenzen der Übereinstimmung (*limits of agreement*) (---) und der systematische Fehler (Bias) (---) mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall [].

In der Bland-Altman-Analyse konnte ein tendenzieller Fehlerzuwachs in Abhängigkeit des Bilirubinniveaus verzeichnet werden. So waren insbesondere bei höheren mittleren Bilirubinmesswerten stärkere Abweichungen zwischen den Messungen beider Methoden festzustellen als bei niedrigen Werten. Die berechneten 95%-igen Grenzen der individuellen Übereinstimmung (*limits of agreement*) ergaben sich zu -4,61 und 1,50. Daraus ergibt sich, dass mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit mit einer Abweichung von bis zu 4,61 mg/dl gerechnet werden muss. Die geschätzte mittlere systematische Abweichung ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus belief sich auf -1,56. Da das zugehörige 95%-ige Konfidenzintervall [-1,76; -1,36] den kritischen Wert 0 nicht enthält, ist der Bias ebenfalls als statistisch signifikant anzusehen.

4.7 Passing-Bablok-Regressionsanalyse der Bilirubinmesswerte der Methoden Y/Rapidlab 1265 und Z/JM-103

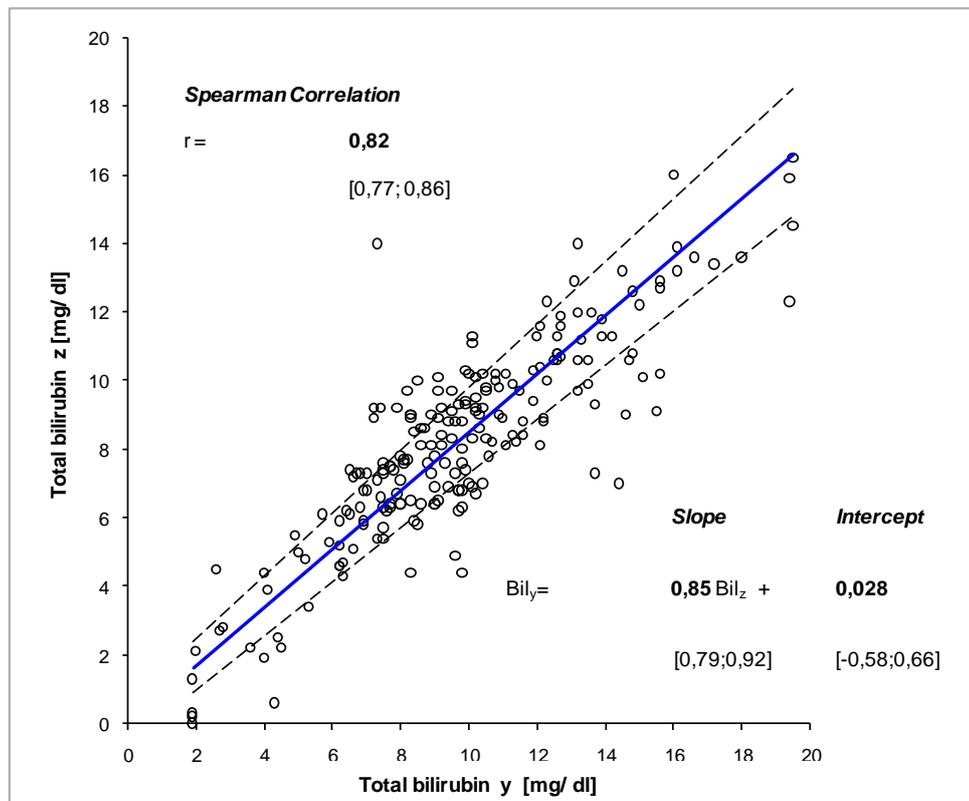


Abb. 15: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103

Angegeben: Anpassungsgerade der Passing-Bablok-Regression (----) mit 95%-igem Konfidenzbereich (- - -); Regressionsgeradengleichung: *Slope* + *Intercept* mit jeweils zugehörigen 95%-igen Konfidenzintervallen []. Des Weiteren angegeben r : Spearman-Korrelationskoeffizient und zugehöriges 95%-iges Konfidenzintervall [].

Die Passing-Bablok-Regression zeigte für die Methoden Y und Z statistisch signifikante Abweichungen in den Bilirubinmessungen. So belief sich der relative Fehlerzuwachs je mg/dl auf 15% entsprechend einem Anstieg der Regressionsgeraden von 0,85. Das entsprechende 95%-ige Konfidenzintervall von [0,79; 0,92] schließt den kritischen Wert 1 nicht mit ein, infolgedessen muss der beobachtete proportionale Fehler als statistisch signifikant erachtet werden. Die geschätzte systematische Abweichung (*Intercept*) zusätzlich zum proportionalen Fehler wurde mit 0,03 mg/dl bestimmt. Da der kritische Wert 0 im zugehörigen 95%-igen Konfidenzintervall [-0,58; 0,66] enthalten ist, konnte

keine statistisch signifikante systematische Abweichung eruiert werden. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wird mit 0,82 angegeben und verweist somit auf einen moderaten, gleichsinnig monotonen Zusammenhang.

4.8 Bland-Altman-Analyse der Bilirubinmesswerte der Methoden Y/Rapidlab 1265 und Z/JM-103

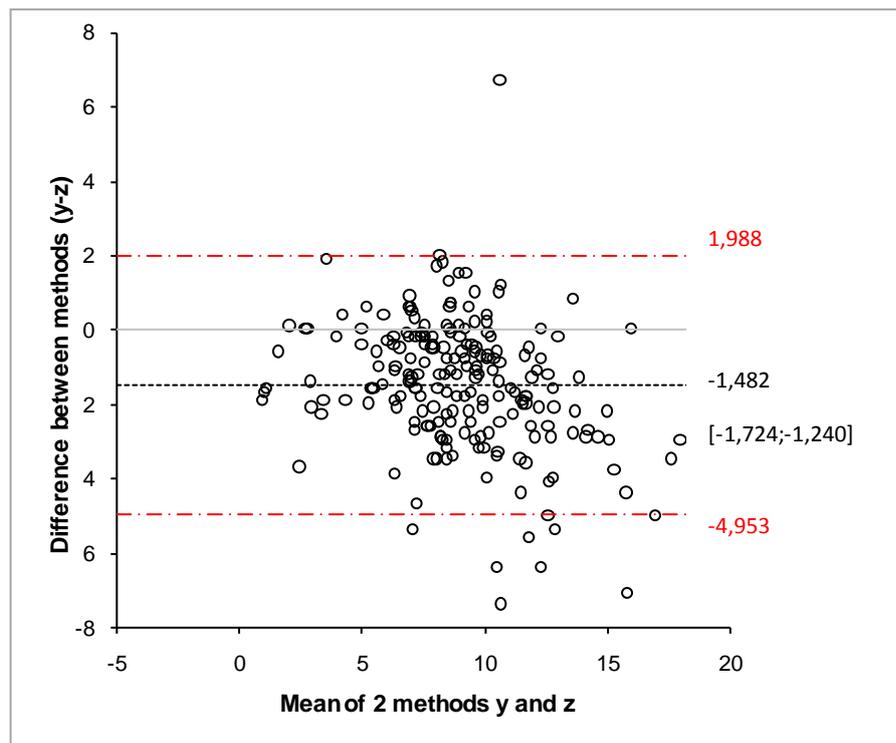


Abb. 16: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103

Aufgetragen sind die Differenzen der Bilirubinmesswerte der Methode Y/Rapidlab 1265 minus Methode Z/JM-103 vs. Mittelwerte der Messwerte beider Verfahren in mg/dl. Zusätzlich angegeben sind die 95%-igen Grenzen der Übereinstimmung (*limits of agreement*) (---) und der systematische Fehler (Bias) (---) mit zugehörigem 95%-igen Konfidenzintervall [].

In der Bland-Altman-Analyse konnten ebenfalls unterschiedlich starke Abweichungen der Messwerte in Abhängigkeit des Bilirubinniveaus festgestellt werden. So waren insbesondere bei hohen mittleren Bilirubinmesswerten vergleichsweise starke Abweichungen zwischen den Messungen beider Methoden festzustellen. Die berechneten 95%-igen Grenzen der individuellen Übereinstimmung (*limits of agreement*) ergaben sich zu -4,95 und 1,99 mg/dl. Somit können mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit Differen-

zen von bis zu 4,95 mg/dl auftreten. Die geschätzte mittlere systematische Abweichung ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus ergab einen Wert von -1,48. Das korrespondierende 95%-ige Konfidenzintervall [-1,72; -1,24] beinhaltet nicht den kritischen Wert 0. Demnach ist dieser Bias auf dem 5%-Signifikanzniveau statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das transkutane Messgerät wesentlich ungenauer misst als die anderen Messmethoden. Das Bilirubinometer JM-103 unterschätzt die tatsächliche Bilirubinkonzentration im Mittel um 1,56 mg/dl, verglichen mit den im Labor ermittelten Bilirubinwerten, und um 1,48 mg/dl, verglichen mit den Bilirubinwerten, die die Messungen mit dem POCT-Gerät erbrachten. Obwohl sich für das transkutane Bilirubinmessgerät in den Regressionsanalysen keine statistisch signifikante absolute systematische Abweichung zeigen lässt, wird dennoch im Bereich des relativen Fehlerzuwachses der Regressionsanalyse sowie in der Bland-Altman-Übereinstimmungsanalyse deutlich, dass vor allem bei höheren Bilirubinwerten mit relevanten Abweichungen zu rechnen ist. So zeigen die Bablok-Passing-Regressionanalyse sowie der Bland-Altman-Übereinstimmungsplot deutliche Abweichungen der Bilirubinwerte des Bilirubinometers gegenüber den anderen beiden Methoden.

Im Vergleich zu Methode X/Vitros 350 zeigt sich ein relativer Fehlerzuwachs von 14%. In der Bland-Altman-Analyse zeichnen sich bei höheren mittleren Bilirubinmesswerten stärkere Abweichungen des transkutanen Bilirubinwertes von den Laborwerten ab als bei niedrigen Werten. Die geschätzte mittlere systematische Abweichung ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus beläuft sich auf -1,56 mg/dl und ist statistisch signifikant. Des Weiteren muss mit einer maximalen Abweichung von bis zu 4,61 mg/dl gerechnet werden.

Gegenüber der Methode Y/Rapidlab 1265 ergibt sich bei der transkutanen Messung sogar ein relativer Fehlerzuwachs von 15%. Die Abweichungen der Bilirubinbestimmung des JM-103 von den Werten des Rapidlab 1265 sind ebenso wie im Vergleich zu den Laborwerten höher im mittleren und hohen Messwertbereich. Die geschätzte mittlere systematische Abweichung ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus ergibt einen Bias von -1,48 mg/dl, welcher auf dem 5%-Signifikanzniveau statistisch signifikant ist. Mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit können Differenzen von bis zu 4,95 mg/dl im Vergleich zu den mit Methode Y/Rapidlab 1265 gemessenen Bilirubinkonzentrationen auftreten.

Der Vergleich zwischen Methode X/Vitros 350 und Methode Y/Rapidlab1265 hingegen ist sehr zufriedenstellend. Alle angewandten statistischen Methoden zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der Messwerte des POCT-Gerätes Rapidlab 1265 mit den Laborwerten/Vitros 350. Die Regressionsanalyse ergibt einen statistisch signifikanten relativen Fehlerzuwachs von 0%. Die Bland-Altman-Analyse zeigt lediglich geringe Abweichungen der Messwerte beider Methoden im Messwertebereich von 0-20 mg/dl. Es handelt sich hierbei um vergleichsweise kleine Abweichungen zwischen den Messungen beider Methoden. Mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit kann es zu Abweichungen der Messwerte von maximal 2,64 mg/dl kommen. Der Bias ohne Berücksichtigung des Wertenniveaus beläuft sich auf -0,09 und ist nicht als statistisch signifikant anzusehen. Ein nahe 1 gelegener Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,91 verweist ebenfalls auf einen starken gleichsinnig monotonen Zusammenhang. Es konnten somit weder klinisch relevante, noch statistisch signifikante Abweichungen der Bilirubinmessungen dieser beiden Verfahren festgestellt werden.

5 Allgemeine Aspekte: Durchführbarkeit, Turn-around-Time

Zur Bedienbarkeit der einzelnen Geräte unter Routinebedingungen muss gesagt werden, dass es sich bei dem Gerät Rapidlab 1265 sowie bei dem transkutanen Messgerät JM-103 um vollautomatische Geräte handelt, die im klinischen Alltag vom Pflegepersonal und den Pädiatern auf Station benutzt werden. Die Bedienung der Geräte ist einfach und selbsterklärend. Hingegen wird das Gerät Vitros 350, das sich im Zentrallabor des Instituts für Klinische Chemie im Klinikum rechts der Isar befindet, von ausgebildeten Medizinisch-Technischen-Assistenten bedient.

Die Verwendung des transkutanen Bilirubinometers stellt die geringsten Anforderungen an den Benutzer. In einer kurzen Vorbereitungsphase wird die Messsonde des Gerätes lediglich durch eine Desinfektionslösung mit Hilfe eines Wattetupfers gereinigt. Nach Einschalten des Gerätes zeigt die Anzeige die Anzahl der eingestellten, durchzuführenden Messungen an, im Anschluss ist das Gerät messbereit. Das Gerät wird auf die Stirn des Neugeborenen bzw. auf das Sternum aufgesetzt und die Messung durch Knopfdruck durchgeführt. Nach ca. 5 Sekunden kann das Ergebnis von der Digitalanzeige abgelesen werden.

Vor der tatsächlichen Integration des Blutgasanalysators Rapidlab 1265 in den klinischen Stationsalltag wurde für das Stationspersonal und die Ärzte eine praktische Schulung am Gerät Rapidlab 1265 durchgeführt, die den Benutzern ermöglichen sollte, besser mit dem Gerät umzugehen, da es trotz des selbsterklärenden Touch-Screens dennoch komplex ist. Nach einer gewissen Familiarisierung im Umgang mit dem Gerät, traten im Verlauf der Studie dennoch immer wieder Probleme auf. Zum einen stellten die verwendeten Glaskapillaren ein Problem dar, in denen das Blut der Neugeborenen aufgrund des relativ erhöhten Hämatokrits häufig bereits vor der Messung koagulierte. Wurde die Kapillare dennoch auf den Probeneingang gesteckt und das Blut vom Gerät trotz beginnender in-vitro-Gerinnung eingezogen, kam es regelmäßig zur Verstopfung des Probeneingangs. Der verstopfte Probeneingang kann im Anschluss daran manuell durch einen neuen, vom Hersteller bereits mitgelieferten Probeneingang ersetzt werden. Allerdings führt das Gerät nach dem Austausch automatisch einen Spülvorgang aus, in dem das Gerät für ca. 2 Minuten nicht für erneute Messungen zu Verfügung steht. Weiterhin wird in diesem Fall auch die zur Untersuchung gewonnene Blutprobe vom Gerät eingezogen, ohne ein diagnostisches Ergebnis zu liefern.

Der Wartungsaufwand des Geräts ist als gering anzusehen. Rapidlab 1265 verfügt über ein vollautomatisches Qualitätskontrollsystem. Zusätzlich wird entweder alle 30 oder alle 60 Minuten eine 1-Punkt-Kalibration durchgeführt. Eine vollständige Gesamtkalibration erfolgt automatisch alle 8 Stunden. Diese auf den ersten Blick unkomplizierte Wartungsmöglichkeit stellt allerdings ebenfalls Herausforderungen an das Personal. In der Zeit, in der das Gerät kalibriert wird, in der Regel bis zu 10 Minuten, können ebenfalls keine Messungen erfolgen. Da das Gerät sich während der Studie auf einer Intensivstation für Früh- und Neugeborene befand, ist dieser Kritikpunkt als problematisch anzusehen, da mit diesem Gerät vor allem lebenswichtige Blutgase bestimmt werden müssen.

Positiv hingegen ist die TAT des POCT-Gerätes Rapidlab 1265. Vom Aufsetzen der Kapillare bis zum Ausdruck der Analysewerte vergehen weniger als 2 Minuten. Im Gegensatz dazu benötigt die Bestimmung des neonatalen Bilirubins im Zentrallabor ungleich mehr Zeit. Mit der Ankunft der Probe im Zentrallabor, der Zentrifugation bis zur Bestimmung der Bilirubinkonzentration mit Hilfe des Vitros 350 verstreichen allein mindestens 50 Minuten. Hinzugerechnet werden muss der Versand der Blutprobe über die Rohrpost mit ca. 1 Minute sowie 1 zusätzliche Minute zur elektronischen Datenvermittlung bis zum Erhalt des Resultats. Daraus ergibt sich eine TAT für die Laborbestimmung von mindestens 52 Minuten. Entsprechend der Qualitätsberichte des klinisch-chemischen Zentrallabors wurden im Zeitraum von 1.3. bis 30.11.2009 2284 Neugeborenen-Bilirubinmessungen im Notfalllabor durchgeführt. Die mittlere Zeit von Ankunft der Probe bis Ausgabe der Ergebnisse (TAT) betrug demnach 52 Minuten. Bei Lebensgefahr-Markierung auf dem Antrag war das Ergebnis innerhalb von 25 Minuten verfügbar.

6 Diskussion

In dieser Studie wurde ein systematischer Vergleich der Bilirubinbestimmungsmethode mittels des POCT-Gerätes Rapidlab 1265 und der neonatalen Bilirubinbestimmung mittels einer modifizierten Jendrassik-Grof-Methode auf dem Gerät Vitros 350 durchgeführt. Zusätzlich wurden die gemessenen Werte mit der transkutanen Hautmessung mittels JM-103 verglichen. Zu diesem Zweck wurden 240 Blutproben von Neugeborenen untersucht die den gesamten klinisch relevanten Messbereich von 0 bis 20 mg/dl umfassten.

Der Vergleich zwischen den Methoden Rapidlab 1265 und Vitros 350 ergab über den gesamten Messbereich eine sehr gute Übereinstimmung. Die Regressionsanalyse ergab eine Geradengleichung von $y = 1,00 \times x - 0,100$. Der Spearman Korrelationskoeffizient r war 0,91. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Hotaling et al [16(S. A214-A215)], in deren Kurz-Studie Rapidlab 1200 mit Vitros 950 verglichen wurde. In ihrer Untersuchung konnte ebenfalls eine hervorragende Übereinstimmung der Labor-Messwerte und der Rapidlab-Werte festgestellt werden [16(S. A214-A215)].

Diese Messgenauigkeit, mit der Rapidlab 1265 und Vitros 350 übereinstimmen, konnte auch von Rolinski et al. [32] bestätigt werden. Die Autoren verglichen Blutgasanalysegeräte (Roche Omni S Point-of-Care Analyzer, ABL 735 Radiometer) unter anderem mit der trockenchemischen Methode auf dem Vitros 250. Der Korrelationskoeffizient zwischen Omni S Point-of-Care Analyzer und Vitros 250 belief sich auf $r = 0,98$. Die zugehörige Regressionsgeradengleichung $y = 0,984 \times x - 0,1$. Aus ihren Ergebnissen schließen Rolinski et al., dass die Blutgasanalysatoren, im Konsens zu unseren Ergebnissen, den Erwartungen, die an die Routinelabormethode gestellt werden, gerecht werden.

Weitere vergleichbare Ergebnisse zeigten die Daten für das ABL 735 Radiometer sowie für den Roche Omni S Point-of-Care Analyzer in Studien von Borgard et al. [9(S.1109)], die eine Bestimmung der Bilirubinkonzentration im Vollblut mit Hilfe des Gerätes ABL 735 Radiometer mit der Bilirubinbestimmung im Plasma mittels verschiedener Laborgeräte verglichen, deren Messmethode auf der Jendrassik-Grof-Methode beruht. Sie erhielten eine über die je 3 Untersuchungen (#1 ABL 735 vs. LX20a, #2 ABL 735 vs. LX20b, #3 ABL 735 vs. Hitachi 917b) gemittelte Regressionsgeradengleichung $y = 1,006 \times x - 0,10$, die mit der, in dieser Studie ermittelten Regressionsgeradengleichung nahezu übereinstimmt [9(S. 1106-1107)]. Borgard et al. weisen in ihrer

Studie darauf hin, dass die Bilirubinbestimmung im Vollblut mit dem Gerät ABL 735 Radiometer, im Bezug auf die Präzision nahezu identisch zu den verwendeten Vergleichsmethoden ist [9(S. 1108)]. Weiterhin betont die Studie die Vergleichbarkeit der Bilirubinmessung im Vollblut mit Hilfe der direkten Spektrofotometrie im CO-Oxymetriemodul des ABL 735 Radiometer unter Einhaltung definierter Bedingung mit den konventionell etablierten Methoden der Klinischen Chemie. Zu diesen Bedingungen zählt unter anderem, dass für die Untersuchung ausschließlich Blut von Neu- bzw.-Frühgeborene mit einem Anteil fetalen Hämoglobins HbF von $>70\%$ verwendet wird [9(S. 1109)]. Diese Bedingung ist spezifisch für die von ABL 735 Radiometer angewendete Oxymetrie [9(S. 1109)].

Grohmann et al. [14] untersuchten in ihrer Studie 9 häufig verwendete Methoden zur neonatalen Bilirubinbestimmung. Darunter JM-103, Roche Omni S und ABL 735 Radiometer sowie Vitros 250 und einige weitere. Grohmann et al. geben eine Maximaldifferenz zwischen den Blutgasanalysegeräten Roche Omni S und ABL 735 Radiometer und den verglichenen Laborgeräten von $-3,5$ mg/dl bzw. von $-2,0$ mg/dl an. Die in unserer Studie bestimmte maximale Abweichung zwischen Vitros 350 und Rapidlab 1265 beträgt $-2,6$ mg/dl und ist damit vergleichbar [14(S. 1177)]. Auch die von Grohmann et al. durchgeführte Regressionsanalyse zeigte eine enge Korrelation zu den hier in der Studie erhobenen Werten. Für Roche Omni S und ABL 735 geben Grohmann et al. eine jeweilige Steigung der Regressionsgeraden von $1,028$ bzw. $1,007$ an. Die Steigung von $1,000$ der Regressionsgeraden nach Passing-Bablok in unserer Studie entspricht damit den Werten von Grohmann et al. Des Weiteren stimmen auch die Korrelationskoeffizienten für Roche Omni S und ABL 735 Radiometer verglichen mit Vitros 250 nach Grohmann et al. sehr gut mit unseren Werten überein. Dabei ergeben sich jeweils Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ für Roche Omni S bzw. $r = 0,99$ für ABL 735 Radiometer. Für Rapidlab 1265 konnte in dieser Studie im Vergleich zu Vitros 350 einen Korrelationskoeffizient von $r = 0,91$ angegeben werden.

Grohmann et al. [14] geben in ihrer Untersuchung für zwei der untersuchten Blutgasanalysegeräte in diesem Fall für das Gerät ABL 735 Radiometer sowie für das Gerät Twin Beam, eine Unterschätzung des Bilirubinwertes gegenüber dem Laborwert an, im Durchschnitt um 1 mg/dl. Für das von ihnen untersuchte Blutgasanalysegerät Roche Omni S zeigte sich in deren Studie eine generelle Überschätzung um $0,5$ mg/dl gegenüber den Laborwerten [14(S. 1181)]. Im Gegensatz dazu konnten wir keine statistisch signifikante Unterschätzung bzw. Überschätzung der Bilirubinkonzentration durch Rapidlab 1265 im Vergleich zu den an Vitros 350 gemessenen Werten ermitteln.

Auch Laterza et al. zeigten in ihrer Studie eine statistisch signifikante Übereinstimmung zwischen Vitros 250 und ABL 735 Radiometer, die zu den Ergebnissen unserer Studie konform sind. Die Korrelation dieser beider Messverfahren beträgt $r = 0.95$ [22(S. 117)]. Ebenso bestätigt deren Regressionsanalyse mit der Regressionsgeradengleichung $y(\text{ABL 735}) = 0,95 \times x(\text{Vitros 250}) + 0,5$ die hier erhobenen Werte sowie die Ergebnisse der aktuellen Literatur [9; 14; 16; 32] und verweist auf die enge Korrelation zwischen, auf direkter Spektrofotometrie basierender Bilirubinbestimmung und Laboranalyse.

Die in der hier durchgeführten Dissertationsarbeit erhobenen übereinstimmenden Messgenauigkeiten zwischen Rapidlab1265 und Vitros 350 sind im Prinzip vergleichbar mit den erstellten Daten von ABL 735 Radiometer sowie von Roche Omni S, die von Borgard et al. [9], Rolinski et al. [32], Laterza et al. [22] und Grohmann et al. [14] erhoben wurden. Ein direkter Vergleich zwischen zwei POCT-Blutgasanalysegeräten, zwischen Rapidlab 1245 der Firma Siemens und dem ABL 735 Radiometer, wurde von Dietzen et al. [11] durchgeführt. Bei der direkten Gegenüberstellung wird die bisher angenommene Gleichwertigkeit der einzelnen Blutgasanalysegeräte deutlich. Die Korrelation zwischen Rapidlab 1245 und ABL 735 Radiometer wird von Dietzen et al. mit $r = 0,96$ angegeben, der Bias mit 0,4 mg/dl. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 1,0. Somit beträgt der geschätzte relative Fehlerzuwachs zwischen beiden Geräten je Bilirubineinheit 0%. Die geschätzte systematische Abweichung im Koordinatenursprung wird von Dietzen et al. mit -0,48 beziffert. Die Bilirubinbestimmung mit den beiden von Dietzen et al. untersuchten Geräten kann im Wesentlichen als gleichwertig betrachtet werden [11(S. A235)].

Trotz der gezeigten hervorragenden Korrelation zwischen Rapidlab 1265 und Vitros 350 lagen in der hier durchgeführten Studie dennoch 3 Fälle vor, bei denen Unterschiede zwischen den Messwerten von mehr als 4,0 mg/dl auftraten. Solche Abweichungen konnten auch in anderen Studien verzeichnet werden. In der hier durchgeführten Studie wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Ausreißern mehr um ein Problem im praktischen Umgang mit den Blutproben handelt, als um einen tatsächlichen technischen Messfehler der Geräte.

Im Gegensatz zu der deutlichen Übereinstimmung der Messwerte von Rapidlab 1265 und Vitros 350, zeigte der Vergleich der beiden Methoden mit dem Bilirubinometer JM-103 in der hier vorliegenden Studie eine weniger gute Korrelation. JM-103 unterschätzte die tatsächlich Bilirubinkonzentration im Mittel um 1,56 mg/dl, verglichen mit den im Labor ermittelten Bilirubinwerten und um 1,57 mg/dl, verglichen mit den Bilirubinwerten, die die Messungen mit dem POCT-Gerät erbrachten. Die Bland-Altman-Analyse zeigte sowohl im Vergleich zu Vitros 350 als auch zu Rapidlab 1265

jeweils einen Bias von -1,59 mg/dl bzw. von -1,48 mg/dl, der auf dem 5%-Signifikanzniveau als statistisch signifikant anzusehen ist. Des Weiteren wird aus den Bland-Altman-Übereinstimmungsplots ersichtlich, dass die transkutanen Bilirubinwerte umso stärker von den beiden anderen Methoden abweichen, je höher die gemessenen Bilirubinwerte waren. Die Passing-Bablok-Regressionsanalyse zeigte ebenso statistisch signifikante Abweichungen:

$$X/\text{Vitros 350 (x) vs. Z/JM-103 (z): } z = 0,86 \times x - 0,073$$

$$Y/\text{Rapidlab 1265 (y) vs. Z/JM-103 (z): } z = 0,85 \times y - 0,0275$$

Der relative Fehlerzuwachs bei Vitros 350 vs. JM-103 bzw. Rapidlab1265 vs. JM-103 von 14% bzw. 15% unterstreicht die, bereits im Bland-Altman-Übereinstimmungsplot konstatierte größere Abweichung bei entsprechend höheren Bilirubinkonzentrationen. Auch hier kann eine generelle Unterschätzung des Bilirubinniveaus durch das transkutane Messgerät statistisch aufgezeigt werden.

Entsprechend zu den hier erhobenen Werten zeigte auch die Studie von Grohmann et al. eine Unterschätzung der Bilirubinwerte bei höheren Bilirubinkonzentrationen [14(S. 1177)]. Die Autoren trugen hierzu die Differenzen zwischen JM-103 und den Vergleichsmesswerten aus den Geräten Hitachi 912, Dimension RxL (Siemens Healthcare) und Vitros 250 gegen die Mittelwerte der Vergleichsmethoden im Streudiagramm nach Bland-Altman auf. In ihrer Studie ergaben sich für JM-103 maximale Abweichungen zu den Vergleichswerten von bis zu -3,2 mg/dl. Im Vergleich dazu wurde in dieser Studie eine ähnliche Maximalabweichung der Messwerte des JM-103 gegenüber Vitros 350 von -4,61 mg/dl konstatiert. Auch Grohmann et al. zeigten, dass diese Abweichungen vor allem bei höheren Bilirubinkonzentrationen jenseits von 11,8 mg/dl auftreten [14(S. 1177)]. Während Grohmann et al. eine bessere Korrelation von $r = 0,96$ zwischen JM-103 und dem Mittelwert, der in deren Studie verwendeten Laborgeräte feststellen konnte, ergab die Spearmankorrelationsanalyse in unserer Studie lediglich einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,87$ für den Vergleich JM-103 vs. Vitros 350 bzw. $r = 0,82$ im Vergleich JM-103 vs. Rapidlab 1265.

Eine allgemeine Tendenz der transkutanen Messgeräte, die tatsächliche Bilirubinkonzentration zu unterschätzen, zeigt sich auch bei Beck et al. [5]. Die Autoren konnten in ihrem Vergleich des transkutanen Messgeräts Bilicheck mit einem bereits etablierten transkutanen Messgerät, dem Jaundice Meter und der Bestimmung der Bilirubinkonzentration im Serum mittels direkter Spektrofotometrie (BuBc-Slide) zwar relativ hohe Korrelationskoeffizienten angeben, für Bilicheck eine Korrelation von $r = 0,92$ und für das Gerät Jaundice Meter eine Korrelation von $r = 0,85$. Trotz der durch-

aus überzeugenden Korrelation geben sie in ihrer Arbeit an, ebenfalls deutliche Abweichungen der transkutanen Werte gegenüber dem Laborwert ermittelt zu haben. Die Grenzen der individuellen Übereinstimmung (*limits of agreement*) des von Beck et al. durchgeführten Bland-Altman-Übereinstimmungsplots weisen eine weite Spanne auf. Die berechneten 95%-igen Grenzen der *limits of agreement* ergaben sich zu -3,95 und 3,23 mg/dl für das Bilicheck, für das Jaundice Meter sogar zu -5,45 und 4,68 mg/dl [5(S. F350)]. Im Vergleich dazu zeigen die berechneten *limits of agreement* der Bland-Altman-Analyse der hier durchgeführten Studie für JM-103 und Vitros 350 eine ganz ähnliche Verteilung mit -4,61 und 1,50 mg/dl. Beck et al. weisen ausdrücklich darauf hin, dass besonders im Bereich von Bilirubinkonzentrationen jenseits 11 mg/dl eine zunehmende Abweichung, entsprechend einer Unterschätzung der Bilirubinwerte zu verzeichnen ist [5(S. F350)]. Dies korreliert mit der bereits in unserer Studie konstatierten Abweichung und Unterschätzung der Bilirubinwerte durch das transkutane Messgerät JM-103 im Vergleich zu den mit Rapidlab 1265 bzw. Vitros 350 gemessenen Werten in mittleren und höheren Messwertbereichen.

In Anlehnung zu den in dieser Studie ermittelten Ergebnissen und den Resultaten von Grohmann et al. [14] konstatieren Beck et al., dass diese Abweichungen insbesondere bei höheren Bilirubinmesswerten auftreten. Die Autoren bestätigen eine zunehmende Unterschätzung des Serumwerts ab einer TSB-Konzentration von 11 mg/dl durch beide untersuchten, transkutanen Messgeräte [5(S. F350)].

Eine entsprechende Unterschätzung der transkutanen Bilirubinmessung gegenüber der Serumbestimmung wird auch durch eine Studie von Reyes et al. [31] bestätigt. Sie errechneten eine statistisch signifikante mittlere systematische Abweichung des Bilicheck gegenüber dem Serumwert von -1,71 mg/dl. Des Weiteren eruierten die Autoren ebenfalls, dass sich diese systematische Unterschätzung der Serumbilirubinkonzentration bei zunehmenden Bilirubinkonzentrationen aggraviert [13(S. 1283); 31(S. 688)].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Karen et al. [18]. In ihrer Studie verglichen sie das transkutane Bilirubinmessgerät Bilicheck mit im Serum bestimmten Bilirubinwerten. Zudem untersuchten sie drei verschiedene Gruppen Neugeborener: Reife Neugeborene und Frühgeborene. Letztere wurden nochmals mittels eines Cut-off-Wertes bei 34 SSW in zwei Untersuchungskollektive aufgeteilt. Sie konnten dabei zeigen, dass in allen drei Gruppen, die Grenzen der individuellen Übereinstimmung eine zu große Verteilung aufweisen und somit zu große Maximalabweichungen vom Serumwert möglich sind. Des Weiteren stellten Karen et al. fest, dass die Übereinstimmung der transkutanen Werte mit dem Laborwert mit ansteigenden Bilirubinwerten

deutlich abnimmt [18(S. 3)]. Darüber hinaus zeigt die Studie von Karen et al. eine signifikante Diskrepanz zwischen der Gruppe der reifen Neugeborenen ($r = 0,72$) und der Gruppe der untersuchten Frühgeborenen ($r = 0,39$) im Bezug auf die Korrelation zwischen transkutanem Messgerät und entsprechendem Serumwert. Diese Tatsache legt nahe, dass der transkutanen Bilirubinmessung gewisse Grenzen gesetzt sind, vor allem im Einsatz in der Frühgeborenenendiagnostik.

Im Gegensatz dazu konnten Karon et al. [19] eine konstante Überschätzung der Bilirubinwerte durch das transkutane Messgeräts Bilicheck im Vergleich zu den im Labor erhobenen Werten feststellen. Die mittlere systematische Abweichung des Bilicheck zu der laborchemischen Diazomethode beträgt 2,0 mg/dl. Der Bias zur BuBc-Slide-Methode entspricht 1,3 mg/dl [19(S. 978)]. Beide Bias sind statistisch signifikant. Die von Karon et al. berechneten Korrelationskoeffizienten betragen für TcB und Diazo-TSB $r = 0,81$ ($r^2 = 0,65$) und für TcB und Vitros-TSB $r = 0,81$ ($r^2 = 0,66$) [19(S. 978)].

Entsprechend der Ergebnisse von Karon et al. [19] stellte auch Maisels et al. [26] eine gute Übereinstimmung zwischen dem transkutanen Bilirubinometer JM-103 und der Bestimmung der Bilirubinkonzentration im Serum fest. Eine Gesamtkorrelation zwischen Serumwert und transkutanem Bilirubinindex wird mit $r_{\text{Stirn}} = 0,914$ bzw. $r_{\text{Sternum}} = 0,953$, je nach Lokalisation der Messung, angegeben. In der Studie von Maisels et al. wurde das untersuchte Kollektiv auch in ethnische Gruppen unterteilt. Dabei zeigte sich ein höherer Korrelationskoeffizient für die weiße Population mit $r = 0,95$. Für die Gruppe der Neugeborenen mit schwarzer Hautfarbe war ein Korrelationskoeffizient von nur $r = 0,82$ zu verzeichnen [26(S. 1629)]. In 2% der weißen und in 17,4% der schwarzen Neugeborenen zeigten sich Maximalabweichungen des transkutan bestimmten Bilirubinwerts vom Serumwert, die größer als 3 mg/dl waren. Des Weiteren konnten Maisels et al. in ihrer Studie für die gesamte Gruppe der schwarzen Neugeborenen eine konstante Überschätzung des Bilirubinwerts mit dem JM-103 im Vergleich zum Serumwert zeigen. Im Vergleich der beiden transkutanen Messgeräte mit den im Serum bestimmten Bilirubinkonzentrationen konnten die Autoren zudem keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Korrelation von JM-103 ($r = 0,973$) und Bilicheck ($r = 0,971$) nachweisen.

Dem entgegen steht die Studie von Karen et al. [18], die in ihrer Studie eine Beeinträchtigung der transkutanen Messwerte durch eine stärkere Pigmentierung der Haut gegenüber Neugeborenen mit weißer Hautfarbe nicht bestätigen [18(S. 6)]. Sie geben ähnliche Korrelationskoeffizienten für schwarze und weiße Neugeborene an. In der Bland-Altman-Analyse zeigten sich in ihrer Studie lediglich deutlich weiter auseinander-

liegende Grenzen der individuellen Übereinstimmung für die Gruppe der schwarzen Neugeborenen. Im Kollektiv der weißen Neugeborenen befand sich hingegen eine höhere Anzahl der Serumwerte außerhalb dieser Grenzen der individuellen Übereinstimmung [18(S.6)].

Nachdem in der hier vorliegenden Studie nicht nach ethnischen Gruppen unterteilt wurde und überwiegend Kinder mit weißer Hautfarbe in die Studie miteinbezogen wurden, zeigt die Beobachtung von Maisels et al. ebenfalls lediglich gewisse Limitierungen bezüglich der Anwendbarkeit des JM-103 bei Neugeborenen auf. Aus der konstatierten Überschätzung der Werte ergibt sich zwar nicht die Gefahr, die Einleitung einer notwendigen Therapie zu verpassen, allerdings werden durch das transkutane Screening dunkelhäutiger Kindern unter Einsatz des JM-103 unter Umständen unnötige Kontrolluntersuchungen sowie erneute Klinikaufnahmen notwendig. Des Weiteren könnte dies zu zusätzlichen Blutabnahmen führen, um bei entsprechend hohen TcB-Werten den exakten Serumwert zu kontrollieren [26(S. 1632)].

Im Unterschied zu der von Beck et al., Grohmann et al., Reyes et al. [5; 14; 31] sowie in unserer Studie bereits festgestellten größeren Abweichung des transkutanen Bilirubinwerts bei höheren Bilirubinkonzentrationen, gibt Maisels et al. [26] keine größeren Unterschiede zwischen den Messwerten bei steigendem Bilirubinwertniveau in der weißhäutigen Population an. In der Gruppe der weißen Neugeborenen konnten Maisels et al. Unterschiede zwischen den transkutan gemessenen Werten und den im Labor bestimmten Werten von bis zu 3,9 mg/dl angegeben [26(S. 1632)]. Anders jedoch bei der Gruppe der schwarzhäutigen Neugeborenen. Dort kann eine klare Tendenz verzeichnet werden, dass die Abweichungen zwischen den Messwerten bei höheren Bilirubinkonzentrationen signifikant zunehmen [26(S. 1632)].

Im Gegensatz zu Maisels et al. [26] zeigen die Studien von Bental et al. [6] sowie auch die von Karon et al. [19] keine signifikante Abnahme der Korrelation zwischen TcB und TSB in unterschiedlichen ethnischen Gruppen.

Bental et al. stellten in 85% der Fälle eine Unterschätzung des TSB-Wertes fest, in 14% eine Überschätzung [6(S. 1904)]. Bental et al. konnten in ihrer Studie einen zusätzlichen Aspekt einbringen, der in hier durchgeführten Studie nicht untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die transkutane Messung, wenn sie auf dem Sternum ($r_{\text{Sternum}}^2 = 0,8170$; $r_{\text{Sternum}} = 0,90$) durchgeführt wird, eine signifikant höhere Korrelation erbringt, als wenn die Messung auf der Stirn ($r_{\text{Stirn}}^2 = 0,8076$; $r_{\text{Stirn}} = 0,90$) erfolgt. Die höchste Übereinstimmung ($r_{\text{Stirn+ Sternum}/2}^2 = 0,8463$; $r_{\text{Stirn+ Sternum}/2} = 0,92$) mit dem Serumwert wird erreicht, wenn ein Mittelwert aus beiden Messungen berechnet wird [6(S.

1904)]. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Maisels et al. gestützt, die ebenfalls eine bessere Korrelation zwischen TcB-Wert und Serumwert feststellen konnten, wenn die transkutane Bilirubinbestimmung auf dem Sternum durchgeführt wird [26(S. 1632)].

Im Konsens zu Bental et al. und Karon et al. [6; 19] kann auch von Bhutani et al. [7] keine Abweichung der Qualität der Messungen bestätigt werden, wenn das untersuchte Kollektiv in ethnische Gruppen unterteilt wird. Darüber hinaus stellten Bhutani et al. auch keine signifikanten Unterschiede zwischen reifen Neugeborenen und Frühgeborenen fest. Die Korrelation zwischen TcB Wert, erhoben mit Bilicheck und TSB, bestimmt mittels HPLC Methode, betrug $r = 0.91$. Ähnliche Korrelationswerte geben Bhutani et al. auch für den Vergleich des Bilicheck mit anderen Labormethoden an [7(S. 4)].

In unserer Studie zeigt sich im Vergleich des JM-103 mit Rapidlab1265 und mit Vitros 350 eine relativ gute Korrelation mit $r = 0,82$ bzw. $r = 0,87$. Mit der aktuellen Literatur verglichen, zeigt sich, dass in anderen Studien teilweise bessere und teilweise auch schlechtere Korrelationskoeffizienten für die transkutane Bilirubinmessung gegenüber der Serumkonzentrationsbestimmung angegeben werden. Dennoch sind die in unserer Studie ermittelten Werte durchaus mit anderen Studien vergleichbar. Zum einen werden unterschiedliche Geräte verglichen, zum anderen führen beispielsweise Grohmann et al. [14], Bental et al. [6] und Maisels et al. [26] die Messungen mit dem transkutanen Messgerät auf dem Sternum durch. In unserer Studie erfolgten alle transkutanen Messungen auf der Stirn der Neugeborenen.

Weiterhin wurden während der Durchführung dieser Studie keine ethnischen Gruppen unterschieden. Ebenso wurden in dieser Studie 213 reife Neugeborene >37 SSW und nur 9 Frühgeborene >32 SSW und <37 SSW untersucht. Diese Zahl an Probanden ist im Vergleich zu den Studien von Rolinski et al., Hotaling, et al., Borgard et al., Grohmann et al., Laterza et al., Dietzen et al., Karen et al. und Karon et al. [9; 11; 14; 16; 18; 19; 22; 32] sehr hoch und erlaubt daher statistisch belastbare Aussagen bezüglich der definierten Studienziele. Der prozentuale Anteil von 4% der Frühgeborenen am Gesamtkollektiv erscheint nicht repräsentativ genug, um daraus eine eigene Gruppe zu bilden und diese eigens zu untersuchen. Somit kann in dieser Studie keine Aussage getroffen werden, inwieweit Hautfarbe, Geburtsgewicht oder Gestationsalter die Messgenauigkeit beeinflussen.

Es wurde in unserer Studie deutlich, dass die festgestellte Unterschätzung der Serumwerte durch JM-103, der allgemeinen Tendenz der Hautmessgeräte, die Bilirubin-

konzentrationen zu niedrig zu erfassen, gut entspricht. Auch, dass sich der negative Bias bei steigendem Bilirubinwertniveau stärker manifestiert, wird von der Literatur größtenteils bestätigt [5; 14; 18; 31].

Besonders deutlich ist allerdings die Uneinigkeit in der Literatur bezogen auf eventuelle Störgrößen im Rahmen der transkutanen Bilirubinmessung wie z.B. ethnische Herkunft bzw. Hautfarbe oder Reifegrad der zu untersuchenden Neugeborenen [13; 19; 26].

Diese Unschärfe verdeutlicht die offensichtlichen Schwachpunkte und Grenzen der transkutanen Bilirubinbestimmung.

Aufgrund der geschilderten Ungenauigkeiten sollten die transkutanen Geräte nur zu Screeningzwecken eingesetzt werden, keinesfalls allerdings, um eine zuverlässige Bestimmung der Serumbilirubinkonzentration zu erreichen. Die in der hier durchgeführten Studie bestimmte Maximalabweichung von -4,61 mg/dl des transkutanen Bilirubinindex vom Serumwert bzw. von -4,95 mg/dl von der Bilirubinkonzentration gemessen mit Rapidlab 1265, sowie die konstatierte Unterschätzung der Serumbilirubinkonzentration durch das Hautmessgerät, verdeutlichten die unabdingbare Notwendigkeit, TcB-Werte entsprechend vorsichtig und im klinischen Kontext zu interpretieren.

7 Zusammenfassung

Bei der Hyperbilirubinämie des Neugeborenen, die ihre Maximalvariante in Form des Kernikterus findet, handelt es sich um ein folgenschweres Krankheitsbild. Die irreversible Hirnschädigung und die damit einhergehenden kognitiven und motorischen Defizite der chronischen Hyperbilirubinämie sowie der lebensbedrohliche akute Verlauf der Erkrankung zeigen die Notwendigkeit einer optimalen und exakten Diagnostik und Therapieindikationsstellung auf.

Das Ziel der Studie war es, einen systematischen Vergleich zwischen den neonatalen Bilirubinbestimmungsmethoden zu erstellen, Messunterschiede zu erfassen und zu bewerten. Dabei sollte das Blutgasanalysegerät Rapidlab 1265, welches eine Bilirubinanalyse im neonatalen Vollblut mittels direkter Spektrofotometrie durchführt, im klinischen Alltag evaluiert und dessen Messgenauigkeit gegenüber der Labormethode verifiziert werden.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Bilirubinmesswerte von 240 Patientenblutproben, gemessen mit der POCT-Methode, mit den durch die Routine-Labormethode (colorimetrisch-trockenchemische Testung mittels BuBc-Slide mit Vitros 350) bestimmten Messwerten verglichen. Parallel dazu wurde das transkutane Hautmessgerät JM-103 zur Bilirubinbestimmung herangezogen und mit den anderen beiden Messmethoden jeweils in Vergleich gesetzt. Bei den Probanden handelte sich um 213 nicht-intensivpflichtige, reife Neugeborene >37 SSW und 9 Frühgeborene >32 SSW. Das Geburtsgewicht der Kinder betrug durchweg mehr als 2500 g. Des Weiteren wurden im Rahmen der Studie die Turn-around-Time und die praktische Durchführbarkeit der einzelnen Methoden erfasst und miteinander verglichen.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Bilirubinbestimmung mit Rapidlab 1265 für die neonatale Bilirubindiagnostik geeignet ist. Die Messergebnisse der POCT-Methode korrelierten sehr gut mit den durch die Labormethode bestimmten Werten. Die statistische Auswertung des Methodenvergleichs der Methoden X/Vitros 350 und Y/Rapidlab 1265 ergab eine sehr gute Übereinstimmung. Die Regressionsanalyse ergab die Regressionsgeradengleichung:

$$y(\text{Rapidlab 1265}) = 1,00 \times x(\text{Vitros 350}) - 0,100$$

Der Spearman-Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,91$. Der Bias wurde mit $-0,09$ mg/dl und die Grenzen der individuellen Übereinstimmung wurden mit $-2,64$ bzw. $2,45$ mg/dl

angegeben. Weiter ergab sich, dass die gemessenen Messunterschiede auf einem 5%-Signifikanzniveau statistisch nicht als signifikant zu bewerten sind. Ebenso war die gemessene TAT mit weniger als 2 Minuten überzeugend, sie war damit wesentlich kürzer als die für die Labormethode bestimmte TAT mit 52 bzw. 25 Minuten (Markierung: Lebensgefahr).

Der Vergleich der transkutanen Bilirubinbestimmung mittels JM-103 mit der POCT-Methode ergab hingegen eine schlechtere Übereinstimmung. Die jeweiligen Regressionsanalysen ergaben folgende Regressionsgeradengleichungen: für den Vergleich der Methoden X/Vitros 350 mit Methode Z/JM-103:

$$z(\text{JM-103}) = 0,86 \times x(\text{Vitros350}) - 0,073;$$

für den Vergleich der Methoden Y/Rapidlab 1265 und der Methode Z/JM-103:

$$z(\text{JM-103}) = 0,85 \times y(\text{Rapidlab1265}) + 0,028$$

Dem entsprechend ergab sich für beide Methodenvergleiche ein relativer Fehlerzuwachs von 14 bzw. 15%, welcher in beiden Fällen unter entsprechender Berücksichtigung der Konfidenzintervalle statistisch signifikant ist. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab für beide Vergleiche einen moderaten monotonen Zusammenhang. Die Korrelationskoeffizienten wurden zu $r = 0,87$ (X/Vitros 350 vs. Z/JM-103) bzw. $r = 0,82$ (Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103) berechnet. Der Bias betrug für die entsprechenden Methodenvergleiche $-1,65$ (X/Vitros 350 vs. Z/JM-103) bzw. $-1,48$ (Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103) und war ebenfalls statistisch signifikant. Die Grenzen der individuellen Übereinstimmung betragen für den Vergleich Vitros 350 vs. JM-103 $-4,61$ und $1,50$ mg/dl. Für die Gegenüberstellung von Rapidlab 1265 und JM-103 konnten in der Bland-Altman-Analyse die *limits of agreement* mit $-4,95$ und $1,99$ mg/dl berechnet werden. Somit können in beiden Fällen Maximalabweichungen der transkutanen Hautmessung vom entsprechenden Serum- bzw. Vollblutwert von bis zu $4,61$ bzw. $4,95$ mg/dl auftreten. Die TAT des Bilirubinometers im Bereich weniger Sekunden (5s) ist damit die kürzeste unter den verglichenen Bilirubinbestimmungsmethoden.

Es bleibt anzumerken, dass die transkutane, nicht-invasive Bilirubinmessung, aufgrund ihrer Messgenauigkeit und der Anfälligkeit im Bezug auf gewisse Störgrößen, Screeningprozessen vorbehalten bleiben sollte. Die statistisch signifikanten festgestellten Abweichungen und die generelle Tendenz zur Unterschätzung des totalen Bilirubinkonzentrationswertes mit den Hautmessgeräten sind von klinischer Relevanz. Der Einsatz der transkutanen Bilirubinbestimmung als etabliertes Screeningverfahren im stationären sowie im ambulanten Bereich setzt daher immer eine entsprechend vorsichtige Interpretation des Messergebnisses im klinischen Kontext voraus.

Im Gegensatz zu den Methodenvergleichen mit der transkutanen Bilirubinbestimmung, korrelieren die Bilirubinergebnisse der POCT-Methode und der Labormethode sehr gut miteinander. Es lässt sich damit feststellen, dass das untersuchte POCT-Blutgasanalysegerät Rapidlab 1265 in der Lage ist, klinisch verwertbare und diagnostisch brauchbare Bilirubinmessungen durchzuführen. Dennoch ist hinzuzufügen, dass das POCT-Gerät in seiner korrekten Handhabung durchaus komplex ist und einen gewissen, technisch-analytischen Anspruch an den Benutzer stellt. Bei den Bedienern bedarf es eines guten Trainings und einer entsprechenden Familiarisierung mit dem Gerät, um im klinischen Alltag angemessene, zweckdienliche Resultate zu generieren.

Durch die hohe Probandenzahl von 222 Patienten und den erhobenen Datensatz von 240 Messwerten ist es gelungen, entsprechend statistisch belastbare Aussagen bezüglich der definierten Studienziele zu treffen. Durch die hohe Anzahl an erfassten Messdaten grenzt sich die hier vorgelegte Studie bezüglich der Aussagefähigkeit deutlich gegenüber den anderen einschlägigen Studien ab. Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen stimmen aber mit den Resultaten der aktuellen Literatur gut überein.

8 Danksagung

Ohne die vielseitige Unterstützung, die mir von vielen Seiten zuteilwurde, wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Hierfür möchte ich besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter B. Luppä danken. Zunächst für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine stetige Unterstützung und konstante Betreuung meiner Arbeit. Ohne die ständige Diskussionsbereitschaft und Verfügbarkeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. med. Andrea Zimmermann, die mit viel Engagement und Hinweisen die praktische Realisierung der Studie ermöglichte und mich weiterhin in allen organisatorischen Belangen exzellent unterstützte.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der neonatologischen Stationen 4/3 IN und 4/3 NK des Klinikums München rechts der Isar für ihre engagierte Mitarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Studie.

Auch Herrn Dr. Dipl.-Stat. Tibor Schuster des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der technischen Universität München sei an dieser Stelle für seine freundliche und kompetente statistische Beratung gedankt.

Mein herzlichster und tiefer Dank gilt meinen Eltern für die seelische und moralische Unterstützung, die sie mir mein ganzes Leben und insbesondere auch während meines Studiums zuteilwerden ließen. Aus tiefstem Herzen möchte Ihnen dafür danken, dass sie mir in allen Lebenslagen immer mit Rat und Tat zur Seite standen und niemals aufgehört haben an mich zu glauben.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Übersicht der Ätiologie der neonatalen Ikterusneigung	11
Abb. 2: Schematische Darstellung des Bilirubinstoffwechsels [35(S. 224; Abb.: 842; Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags)]	13
Abb. 3: Übersicht der klinischen Symptomatik der akuten und chronischen Bilirubinenzephalopathie modifiziert nach [10(S. 584)]	17
Abb. 4: Nomogramm zur Risikostratifizierung einer behandlungsbedürftigen Hyperbilirubinämie bei reifen Neugeborenen, modifiziert nach Bhutani et al. [8]	18
Abb. 5: Schematische Darstellung des Messprinzips des JM-103, modifiziert nach el-Beshbishi S. N., Shattuck K. E., Mohammad A. A., Petersen J. R.: Hyperbilirubinemia and transcutaneous bilirubinometry [13(S. 1285)]	32
Abb. 6: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Bilirubinmesswerte Methode X/Vitros 350	36
Abb. 7: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Bilirubinmesswerte Methode Y/Rapidlab 1265	37
Abb. 8: Histogramm (Klassenbreite 1 mg/dl) Methode Z/JM-103.....	37
Abb. 9: Statistische Maßzahlen aller gemessenen Bilirubinwerte	38
Abb. 10: Box- und Whiskerplots der Bilirubinmesswerte der drei verschiedenen Geräte.....	40
Abb. 11: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Y/Rapidlab 1265	41
Abb. 12: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Y/Rapidlab 1265	42
Abb. 13: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Z/JM-103	43
Abb. 14: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte X/Vitros 350 vs. Z/JM-103	45
Abb. 15: Regressionsgerade nach Passing-Bablok der Bilirubinmesswerte Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103	46
Abb. 16: Streudiagramm nach Bland-Altman der Bilirubinmesswerte Y/Rapidlab 1265 vs. Z/JM-103	47

Literaturverzeichnis

- 1 American Academy of Pediatrics: Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation *Pediatrics* 2004;114(1): 297-316.
- 2 Arbeitanweisung AM-NF-TBIL/A: Quantitative Bestimmung von Gesamtbilirubin im Humanserum am Vitros 350 Arbeitanweisung zur Methodendurchführung; Bereich Notfalllabor; Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie Klinikum Rechts der Isar Technische Universität München Prof. Dr. D. Neumeier 2007: 1-5.
- 3 Arbeitanweisung AM-NF-BUBC/A: Quantitative Bestimmung von konjugiertem und unkonjugiertem Bilirubin im Humanserum am Vitros 350 Arbeitanweisung zur Methodendurchführung; Bereich Notfalllabor; Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie Klinikum Rechts der Isar Technische Universität München Prof. Dr. D. Neumeier 2007: 1-5.
- 4 AWMF-online-Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. (aktueller Stand: 03/2010). "Hyperbilirubinämie des Neugeborenen - Diagnostik und Therapie." from <http://www.leitlinien.net/>.
- 5 Beck M., Kau N. and Schlebusch H.: Transcutaneous bilirubin measurement in newborn infants: evaluation of a new spectrophotometric method; *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88(4): F350-351.
- 6 Bental Y. A., Shiff Y., Dorsht N., Litig E., Tuval L. and Mimouni F. B.: Bhutani-based nomograms for the prediction of significant hyperbilirubinaemia using transcutaneous measurements of bilirubin; *Acta Paediatr* 2009;98(12): 1902-1908.
- 7 Bhutani V. K., Gourley G. R., Adler S., Kreamer B., Dalin C. and Johnson L. H.: Noninvasive measurement of total serum bilirubin in a multiracial predischarge newborn population to assess the risk of severe hyperbilirubinemia; *Pediatrics* 2000;106(2): E17.
- 8 Bhutani V. K., Johnson L. and Sivieri E. M.: Predictive ability of a predischarge hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns; *Pediatrics* 1999;103(1): 6-14.

-
- 9 Borgard J. P., Szymanowicz A., Pellae I., Szmidt-Adjide V. and Rota M.: Determination of total bilirubin in whole blood from neonates: results from a French multicenter study; *Clin Chem Lab Med* 2006;44(9): 1103-1110.
 - 10 Dennerly P. A., Seidman D. S. and Stevenson D. K.: Neonatal hyperbilirubinemia; *N Engl J Med* 2001;344(8): 581-590.
 - 11 Dietzen D. J. and Wilhite T. R.: Comparison of whole blood total bilirubin determination in neonates on the Siemens RAPIDLAB and Radiometer ABL blood gas analyzers; *Clin Chem* 2008;54: A 235.
 - 12 Doumas B. T., Kwok-Cheung P. P., Perry B. W., Jendrzejczak B., McComb R. B., Schaffer R. and Hause L. L.: Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation; *Clin Chem* 1985;31(11): 1779-1789.
 - 13 el-Beshbishi S. N., Shattuck K. E., Mohammad A. A. and Petersen J. R.: Hyperbilirubinemia and transcutaneous bilirubinometry; *Clin Chem* 2009;55(7): 1280-1287.
 - 14 Grohmann K., Roser M., Rolinski B., Kadow I., Muller C., Goerlach-Graw A., Nauck M. and Kuster H.: Bilirubin measurement for neonates: comparison of 9 frequently used methods; *Pediatrics* 2006;117(4): 1174-1183.
 - 15 Hansen T. W.: Kernicterus: an international perspective; *Semin Neonatol* 2002;7(2): 103-109.
 - 16 Hotaling T., Brunelle J. and Mullert K.: Neonatal bilirubin method evaluation: whole blood on RAPIDLAB 1200 versus plasma on VITROS 950 chemistry system; *Clin Chem* 2008;54: A214-215.
 - 17 Jendrassik L. and Grof P.: Vereinfachte photometrische Methode zur Bestimmung des Bilirubins; *Biochem Z* 1938;297: 81-89.
 - 18 Karen T., Bucher H. U. and Fauchere J. C.: Comparison of a new transcutaneous bilirubinometer (Bilimed) with serum bilirubin measurements in preterm and full-term infants; *BMC Pediatr* 2009;9: 70.
 - 19 Karon B. S., Teske A., Santrach P. J. and Cook W. J.: Evaluation of the BiliChek noninvasive bilirubin analyzer for prediction of serum bilirubin and risk of hyperbilirubinemia; *Am J Clin Pathol* 2008;130(6): 976-982.
 - 20 Kirk J. M.: Neonatal jaundice: a critical review of the role and practice of bilirubin analysis; *Ann Clin Biochem* 2008;45(Pt 5): 452-462.

-
- 21 Kröner C., Koletzko B.: Neonatologie in Basiswissen Pädiatrie; Springer Verlag, Berlin, 2010; 1. Aufl.; 18-50
 - 22 Laterza O. F., Smith C. H., Wilhite T. R. and Landt M.: Accurate direct spectrophotometric bilirubin measurement combined with blood gas analysis; Clin Chim Acta 2002;323(1-2): 115-120.
 - 23 Lauff J. J., Kasper M. E., Wu T. W. and Ambrose R. T.: Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein; Clin Chem 1982;28(4 Pt 1): 629-637.
 - 24 Luppä P. B. und Schlebusch H.: Nichtinvasive (transkutane) Analytik in: POCT-Patientennahe Labordiagnostik; Schlebusch H. and Luppä P. B.; Springer Verlag, Heidelberg, 2008; 1. Aufl.; 117-121
 - 25 Maisels M. J.: Neonatal jaundice; Pediatr Rev 2006;27(12): 443-454.
 - 26 Maisels M. J., Ostrea E. M. Jr., Touch S., Clune S. E., Cepeda E., Kring E., Gracey K., Jackson C., Talbot D. and Huang R.: Evaluation of a new transcutaneous bilirubinometer; Pediatrics 2004;113(6): 1628-1635.
 - 27 Mikulucik P.: Rapidanalyse - Blutgase und mehr: Sauerstoffstatus Siemens Medical Solution Diagnostics GmbH Bayer Health Care 2007; 3. Auflage; 43-70
 - 28 Müller-Jentsch E.: Fataler Fehler einer Hebamme aus: Süddeutsche Zeitung vom 28.01.2010: S. 47.
 - 29 Newman T. B. and Maisels M. J.: Less aggressive treatment of neonatal jaundice and reports of kernicterus: lessons about practice guidelines; Pediatrics 2000;105(1 Pt 3): 242-245.
 - 30 Obladen M., Maier R. F.: Hyperbilirubinämie und Morbus haemolyticus neonatorum in: Neugeborenenintensivmedizin - Evidenz und Erfahrung; Springer Verlag, Berlin, 2006; 7. Aufl.; 483-515
 - 31 Reyes C. A., Stednitz D. R., Hahn C., Mutchie K. D., McCullough S. R. and Kronberg K.: Evaluation of the BiliChek being used on hyperbilirubinemic newborns undergoing home phototherapy; Arch Pathol Lab Med 2008;132(4): 684-689.
 - 32 Rolinski B., Okorodudu A. O., Kost G., Roser M., Wu J., Goerlach-Graw A. and Kuester H.: Evaluation of total bilirubin determination in neonatal whole-blood samples by multiwavelength photometry on the ROCHE OMNI S point-of-care analyzer; Point of Care 2005;4: 3-8.

- 33 Roos R., Proquitté H. und Genzel- Boroviczény O.: Checkliste Neonatologie: Icterus neonatorum in: Hämatologie; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2000; 1. Aufl.; 250-274
- 34 Shapiro S. M.: Bilirubin toxicity in the developing nervous system; *Pediatr Neurol* 2003;29(5): 410-421.
- 35 Speer C. P., Gahr M.: Pädiatrie: Neonatologie; Springer Verlag, Heidelberg, 2009; 3. Aufl.; 137-205.
- 36 Thaler M., Luppá P. B. and Schlebusch H.: Bilirubin measurement - an updated survey; *J Lab Med* 2008;32: 1-10.
- 37 Wennberg R. P.: The blood-brain barrier and bilirubin encephalopathy; *Cell Mol Neurobiol* 2000;20(1): 97-109.
- 38 Wu T. W., Dappen G. M., Powers D. M., Lo D. H., Rand R. N. and Spayd R. W.: The Kodak Ektachem clinical chemistry slide for measurement of bilirubin in newborns: principles and performance; *Clin Chem* 1982;28(12): 2366-2372.
- 39 Yasuda S., Itoh S., Isobe K., Yonetani M., Nakamura H., Nakamura M., Yamauchi Y. and Yamanishi A.: New transcutaneous jaundice device with two optical paths; *J Perinat Med* 2003;31(1): 81-88.