

**Stellenwert des ACTH-Testes im septischen Schock:  
Ergebnisse einer multizentrischen Studie zur Therapie des  
septischen Schocks mit Hydrocortison**

**Julia Uffermann**

Aus der Klinik für Anästhesiologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. B. Zwissler

**Stellenwert des ACTH-Testes im septischen Schock:  
Ergebnisse einer multizenterischen Studie zur Therapie des  
septischen Schocks mit Hydrocortison**

Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Uffelmann

aus

Lahr/Schwarzwald

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Briegel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Gärtner

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Patrick Möhnle

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung	1
1.2 Folgen eines Cortisolmangels	2
1.3 Das Hormon Cortisol	3
1.4 Adrenocorticale Adaption	4
1.5 Adrenocorticale Dysfunktion	5
1.6 Die Geschichte der Glucocorticoidtherapie	6
1.7 Stress-Dosen von Hydrocortison senken die 28-Tage-Mortalität	7
1.8 Der ACTH-Test	8
1.9 Das Hormonprofil als Vorhersagewert bei kritisch Kranken	9
1.10 Kritik am ACTH-Test	11
1.11 Fragestellung	13
<b>2. Methodik</b>	<b>14</b>
2.1 CORTICUS-Projekt	14
2.2 ACTH-Test im septischen Schock	15
2.3 Harmonisierung der Cortisolmessung	15
2.4 Immunoassays	20
2.4.1 Homogene Immunoassays	21
2.4.2 Heterogene Immunoassays	22
2.4.2.1 Sandwich Immunoassays	22
2.4.2.2 Kompetitive Immunoassays	23
2.4.3 Markierungen	26
2.4.3.1 Enzymmarkierung	26
2.4.3.2 Fluoreszenzmarkierung	27
2.4.3.3 Lumineszenzmarkierung	27
2.4.3.4 Elektrochemilumineszenzmarkierung	28
2.4.3.5 Isotopenmarkierung	28
2.4.4 “Elecsys-Cortisol” Immunoassay (Roche)	29
2.4.5 Immunoassays verschiedener Hersteller	32
2.5 LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) als Referenzmethode	33
2.6 Statistik	38

<b>3. Ergebnisteil</b>	<b>39</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1 Cortisol wird im Serum von septischen Patienten mit Hilfe von Immunoassays nicht richtig gemessen	58
4.2 Die Wertigkeit des ACTH-Tests im septischen Schock	61
4.3 Mögliche Ursachen für Messstörungen	63
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>85</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>89</b>

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Einleitung**

Die Sepsis und der septische Schock stellen in der Intensivmedizin eine häufige Todesursache dar. Obwohl heutzutage hoch potente Antibiotika zur Verfügung stehen und die intensivmedizinische Therapie eine hohe Qualität erreicht hat, liegt die Letalität der Sepsis weiterhin zwischen 20%-70% (21, 22, 40, 87, 90, 111). Zahlreiche Therapieansätze wurden untersucht, um eine Senkung der Sterblichkeit bei Sepsis zu erreichen. Trotzdem blieb bisher ein durchbrechender Erfolg aus. Ein Grund hierfür liegt im noch mangelhaften Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen des Krankheitsgeschehens (35, 61, 70).

Einer der Therapieansätze, der vor allem in den letzten Jahren wieder an Bedeutung gewann, ist der Einsatz von Hydrocortison beim septischen Schock (5, 16, 21, 26, 51). Diesem Therapieansatz liegt die Hypothese zu Grunde, dass bei einem großen Teil der Patienten mit Sepsis eine Nebennierenrindeninsuffizienz vorliegt (3, 7, 13, 17, 78, 112). Diese resultiert in einem relativen Cortisolmangel, weshalb eine adäquate Stressantwort nicht mehr möglich ist.

Dem Hormon Cortisol kommt eine tragende Rolle in der Immunantwort unseres Körpers zu. Muss unser Körper auf extreme Stressbedingungen reagieren, wie es bei schweren Erkrankungen, Traumata, Schock und Sepsis der Fall ist, ist es Aufgabe des Cortisols diese Immunreaktionen zu regulieren. Es gilt ein Gleichgewicht zu halten, zwischen der lebensnotwendigen Abwehr einerseits und einem Überschüssen der Immunantwort andererseits, die sich in diesem Fall auch gegen körpereigene Strukturen richten kann. Somit ist eine Erhöhung des Cortisolspiegels im Rahmen schwerer Erkrankungen eine wichtige Schutzmaßnahme (66). Des Weiteren trägt Cortisol zur Aufrechterhaltung des normalen

Gefäßtonus bei, beeinflusst die Gefäßpermeabilität und potenziert die vasokonstriktorische Wirkung von Katecholaminen. Die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) spielt somit eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase (10).

## **1.2 Folgen eines Cortisol-Mangels**

Schon lange Zeit ist bekannt, dass ein Mangel an Cortisol fatale Folgen haben kann. Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben Waterhouse und Friderichsen ein Syndrom, in dessen Verlauf es in Folge einer fulminant verlaufenden Meningokokkensepsis neben multiplen Blutungen im Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie, unter anderem auch zu hämorrhagischen Infarzierungen der Nebennierenrinde kommt. Diese führen schließlich zu einer akuten Nebennierenrindeninsuffizienz. Unbehandelt verläuft dieses Krankheitsbild rasch letal (39, 107).

Durch den Einsatz des kurzwirksamen Hypnotikums Etomidat in der Intensivmedizin wurden die schwerwiegenden Folgen eines Cortisol-Mangels bei kritisch kranken Patienten deutlich. Ledingham berichtete 1983, dass unter der Langzeit-Sedierung von Polytraumapatienten mit Etomidat eine signifikante Zunahme der Mortalität zu beobachten sei. Diese lag bei einer Sedierung mit Opiaten und Benzodiazepinen bei 25%. Unter Verwendung von Opiaten und Etomidat stieg die Mortalität auf 69% an, wobei die Patienten vermehrt an nosokomialen Infektionen verstarben (55). Kurze Zeit später erkannte man, dass Etomidat dosisabhängig und reversibel die Produktion von Cortisol sowie Aldosteron in der Nebennierenrinde durch Inhibition der 11- $\beta$  Hydroxylase und anderer mitochondrialer Enzyme hemmt (106).

### 1.3 Das Hormon Cortisol

Cortisol wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde aus seinem Vorläufer Cholesterin gebildet. Seine Ausschüttung wird vom Hypothalamus und der Hypophyse über die Hormone CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon) und ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) reguliert. Über einen negativen Feedbackmechanismus greift Cortisol selber in diesen Regelkreis ein.

Nach seiner Sekretion wird es zu über 90% an ein spezifisches Transportprotein, dem CBG (Corticosteroid-Bindendes-Globulin) und zu einem geringen Anteil an Albumin gebunden (1, 10, 104). Weniger als 10% liegen ungebunden als freies Cortisol vor, welches den eigentlich biologisch aktiven Anteil darstellt (18, 36).

Im Gewebe kann Cortisol durch dort vorhandene Enzyme (11- $\beta$  Hydroxysteroid-Dehydrogenase) in die inaktive Form Cortison überführt werden (1). Bei entzündlichen Reaktionen wird Cortison wieder in Cortisol überführt (Cortison-Cortisol-Shuttle). Aufgrund seines lipophilen Charakters diffundiert es dann in die Zielzelle, in der es im Zytoplasma an spezifische Glucocorticoidrezeptoren bindet. Diese sind in inaktiver Form an einen Komplex aus Hitzeschockproteinen (HSP) gebunden (95). Die Bindung von Cortisol bewirkt eine Konformationsänderung der Rezeptoren und damit deren Aktivierung. Die aktivierten Rezeptoren dissoziieren daraufhin vom HSP-Komplex und wandern vom Zytoplasma in den Zellkern. Dort führt eine Änderung der Transkriptionsrate glucocorticoidsensitiver Gene zu einer Änderung der Produktionsrate der von ihnen codierten Proteine (2, 50).

Beinahe alle Funktionen der zellulären und humoralen Immunantwort, wie Phagozytose, Antigen-Präsentation, Chemotaxis, Antikörperbildung und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren werden durch Cortisol inhibiert (41). In physiologischen Dosen besitzt es neben den immunsuppressiven Effekten auch immunpermissive bzw. immunaugmentierende Wirkung, die jedoch im pharmakologischen Dosis-Bereich verloren gehen (15).



#### **1.4 Adrenocorticale Adaption**

Unter Normalbedingungen folgt die Cortisolsekretion einem stabilen circadianen Rhythmus mit sekretorischen Episoden, die in den frühen Morgenstunden eine höhere Frequenz und Amplitude haben, während sie über den Tag hinweg abnehmen (53). Die Produktionsrate beim gesunden Menschen unter normalen Lebensbedingungen liegt bei ca. 13-16 mg pro Tag (97, 98).

Schwere Erkrankungen können diesen natürlichen Sekretionsrhythmus durcheinander bringen. Der Körper versucht sich den neuen Anforderungen anzupassen, indem komplexe neurohumorale Reaktionen ausgelöst werden. Vermittelt werden diese durch das sympathische Nervensystem, das Immunsystem und das endokrine System (15). Die HHNA muss sich im Rahmen der Stressantwort auf die neuen Bedingungen einstellen. Es gilt genügend Cortisol bereitzustellen, um die Reaktion des Organismus zu optimieren. Ein typisches Muster bei kritisch kranken Patienten ist die Zunahme der Cortisol-Produktion, bei gleichzeitiger Abnahme der Aldosteron- und Androgensynthese (10, 11, 72). Speziell bei Patienten mit Sepsis oder im septischen Schock finden sich meist hohe Cortisolkonzentrationen, die jedoch individuell über einen weiten Bereich variieren können (24, 65, 80). Die Aktivierung der HHNA erfolgt durch Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) (27, 99). Es kommt zu einer Zunahme der Produktion von CRH und ACTH und einer Abnahme des negativen Feedback-Mechanismus durch Cortisol (73).

Nicht nur der direkte Einfluss auf die HHNA trägt zu einer Erhöhung des Cortisol-Spiegels bei, neben einer gesteigerten Produktion kommt es auch zu einer Abnahme der hepatischen Eliminierung des Cortisols, wodurch dessen Halbwertszeit verlängert wird (67). Eine schnelle Abnahme der Menge an CBG und eine reduzierte Bindung an dieses sorgen dafür, dass genügend freies und somit biologisch aktives Cortisol zu Verfügung steht (12, 99). Dieser

Effekt wird am Ort der Entzündung noch verstärkt, zum einen durch den Cortison-Cortisol-Shuttle, zum anderen durch die neutrophilen Elastasen, die Cortisol aus seiner Bindung mit CBG spalten und damit die Menge an freiem Cortisol erhöhen (1, 44, 99). Ein weiterer Mechanismus der adrenocorticalen Adaptation ist die Fähigkeit inflammatorischer Zytokine, die Affinität der Glucocorticoidrezeptoren für Cortisol zu steigern (38, 64). All diese Veränderungen zielen darauf ab, eine ausreichende Menge an Cortisol zur Verfügung zu stellen, um die Reaktionen des Körpers auf Stressbedingungen zu optimieren (30).

### **1.5 Adrenocorticale Dysfunktion**

Eine funktionierende HHNA ist für die adäquate Immunantwort von großer Bedeutung. Aus viele klinische und experimentelle Untersuchungen der letzten Jahre ergaben sich Hinweise, dass die Regulation und Physiologie des Stress-Hormons Cortisol während einer Sepsis auf vielfältige Weise gestört werden können (64, 89).

Inflammatorische Peptide wie TNF, TGF- $\beta$  (Transforming Growth Faktor  $\beta$ ) und Corticostatine setzen die Wirkung von ACTH auf die Cortisol-Produktion herab (37, 46, 48, 84). Die pulsatile Sezernierung von ACTH und Cortisol, sowie der circadiane Rhythmus gehen bei Patienten mit schwerer Sepsis verloren und werden durch eine tonische Sekretion mit einer verminderten Anzahl sekretorischer Impulse ersetzt (101). Des Weiteren konnte eine Dissoziation von ACTH und Cortisol-Produktion beobachtet werden. Während in der Initialphase schwerer Erkrankungen, sowohl hohe ACTH- wie auch Cortisol-Werte gemessen wurden, kam es in der zweiten Phase zu einem starken ACTH-Abfall, während die Cortisol-Werte weiterhin erhöht blieben (10, 67, 100). Die Anzahl wie auch die Affinität der Glucocorticoidrezeptoren nimmt ab und damit die Sensitivität des Gewebes gegenüber Glucocorticoiden (63, 113). Ursache hierfür ist die hohe lokale Konzentration proinflammatorischer Zytokine, die über eine Bildung von Transkriptionsfaktoren, wie

„Activator Protein 1“ und „Nuclear Faktor kappa  $\beta$ “ zu einer Komplexbildung mit aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor-Elementen führt. Hierdurch kann die antiinflammatorische Wirkung endogener Glucocorticoide, wie die des Cortisols, nicht mehr oder nur unzureichend wirken (8).

## **1.6 Die Geschichte der Glucocorticoidtherapie**

In der Regel sind die Cortisol-Werte bei kritisch kranken Patienten über die Norm erhöht. Vergleicht man jedoch die Nebennierenrindenfunktion dieser Patienten nach maximaler Stimulation mit ACTH, so fällt auf, dass vor allem Patienten mit septischen Schock eine stark verminderte Stimulierbarkeit der Nebennierenrinde aufweisen (15). Dies ist am ehesten im Sinne einer reduzierten sekretorischen Reserve für Cortisol im Rahmen einer relativen Nebennierenrindeninsuffizienz zu deuten (17). Daher lag die Vermutung nahe, dass diese Patientengruppe von einer Substitutionstherapie mit Hydrocortison profitieren könnte.

Schon Anfang der 50er Jahre wurden Glucocorticoide zur adjuvanten Therapie der Sepsis eingesetzt (42, 108). Obwohl kaum fundierte wissenschaftliche Daten zur Verfügung standen, die diese Therapiemaßnahme unterstützten, nahm man an, dass Patienten mit schweren Infektionen von der antiinflammatorischen Wirkung der Glucocorticoide profitieren würden (52).

Mitte der 70er Jahre veröffentlichte Schumer, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis, die hochdosiert mit Methylprednisolon behandelt wurden, im Vergleich zur Placebo-Gruppe, eine erheblichen Senkung der 28-Tage Mortalität erreicht werden konnte (82). Trotz Kritik an der Durchführung der Studie wurde der Einsatz von Glucocorticoiden im Rahmen einer Sepsis Ende der 70er Jahre zu einer gängigen und anerkannten Therapiemethode (52).

Nach dem anfänglichen Enthusiasmus wurden Ende der 80er Jahre Zweifel am Nutzen der hochdosierten Steroidtherapie laut, als mehrere Studien veröffentlicht wurden, die keine

Vorteile dieser Behandlung nachweisen konnten (22, 60, 87, 90). Zwei Meta-Analysen, die in den 90er Jahren erschienen, fassten alle bis dahin zur Verfügung stehenden Daten aus Studien zu diesem Thema zusammen (31, 56). Man kam zu dem Schluss, dass das Therapiekonzept der hochdosierten Glucocorticoidtherapie bei schwerer Sepsis verlassen werden sollte, da es anscheinend für die Patienten mehr Gefahr barg, als Nutzen mit sich brachte. Im Speziellen wurde auf eine mögliche Verschlechterung der Leber- und Nierenfunktion, sowie auf das erhöhte Risiko nosokomialer Infektionen hingewiesen (31, 85).

### **1.7 Stress-Dosen von Hydrocortison senken die 28-Tage-Mortalität**

In den letzten Jahren ist infolge der wachsenden Erkenntnis der zentralen Rolle von Cortisol in der Immunantwort und dem Konzept der relativen NNR-Insuffizienz im septischen Schock das Interesse an einer Glucocorticoidtherapie wieder erweckt worden. Aufmerksamkeit erregte in diesem Zusammenhang eine Studie aus Frankreich, die im Jahr 2002 veröffentlicht wurde.

In dieser placebokontrollierten Doppelblindstudie, die 300 Patienten im septischen Schock einschloss, konnte gezeigt werden, dass speziell Patienten mit einer relativen Nebennierenrindeninsuffizienz, so genannte Non-Responder im ACTH-Test, von der Substitutionstherapie mit Glucocorticoiden profitieren (5). Durch eine 7-tägige Substitution mit niedrigen Dosen von Hydrocortison (50mg Bolus i.v. alle 6 h) und Fludrocortison (50µg /d) konnte die 28-Tage, wie auch die 1-Jahres-Mortalität deutlich gesenkt werden. Zur Definition der relativen NNR-Insuffizienz und zur Einteilung in die Kategorie „Non-Responder“ wurde hier der Grenzwert von  $\Delta_{\max} \leq 9\mu\text{g/dl}$  im ACTH-Test herangezogen. In diesem Patientenkollektiv konnte am Tag 28 ein zusätzliches Leben gerettet werden, pro sieben Patienten die mit Hydrocortison behandelt wurden.

Auch in vielen weiteren klinischen Studien konnten vorteilhafte Effekte einer Therapie mit Stress-Dosen von Hydrocortison nachgewiesen werden (16, 21, 26, 51). Dazu zählten beispielsweise eine Reduktion der überschießenden inflammatorischen Reaktion im septischen Schock, eine signifikante Verkürzung der Therapie mit Vasopressoren und eine schnellere Rückbildung von Organfunktionsstörungen (16, 21, 26).

## **1.8 Der ACTH-Test**

Trotz der nachgewiesenen Vorteile einer Substitution mit Hydrocortison wurde dieser Therapieansatz in den letzten Jahren immer wieder kontrovers diskutiert (1, 20, 52, 56, 79). Eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen, die Hydrocortison zugeschrieben werden, macht den Einsatz auch weiterhin nicht unbedenklich und fordert eine genaue Auswahl der Patienten. Deshalb wird immer wieder darauf verwiesen, die Nebennierenrindeninsuffizienz im septischen Schock diagnostisch zu erfassen (30).

Man weiß, dass bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis oder septischen Schock die Cortisolwerte über einen großen Bereich variieren und normalerweise erhöht sind (3, 17, 24, 80, 86). Ein absoluter Mangel an Cortisol ist selten und eine gesicherte Indikation zur Substitutionstherapie (20, 24, 47, 49, 78, 80, 86). Relative Cortisolmangelzustände im septischen Schock sind hingegen seit Jahrzehnten Gegenstand teils heftig geführter Diskussionen (24, 49, 52, 56). Das Problem ist hierbei, wie man diesen relativen Cortisolmangel diagnostisch erfassen kann.

Der ACTH-Test wurde als Methode vorgeschlagen, um die Funktion der Nebennierenrinde abzuschätzen (1, 5, 54, 78, 86). Hierzu wird der Serumcortisolwert vor ( $t_0$ ) und 30 Minuten ( $t_{30}$ ) bzw. 60 Minuten ( $t_{60}$ ) nach i.v. Gabe eines synthetischen ACTH-Analogons bestimmt. Eine normale Funktion der Nebennierenrinden ist anzunehmen, wenn der Plasmacortisolspiegel vor oder 30 bzw. 60 Minuten nach Injektion bei  $\geq 20\mu\text{g/dl}$  liegt (69).

Werden niedrige basale Cortisolwerte gemessen, die auch mit ACTH nicht ausreichend stimulierbar sind, liegt eine Nebennierenrindeninsuffizienz vor. Basale wie auch stimulierte Werte betragen  $\leq 20\mu\text{g/dl}$ . Diese Konstellation ist bei Patienten im septischen Schock nicht häufig zu beobachten (78, 80).

Da der basale Plasmacortisolspiegel im Rahmen einer Sepsis meist auf Werte  $\geq 25\mu\text{g/dl}$  erhöht ist, scheint der Cortisolanstieg ( $\Delta_{\text{max}}$ ) hier mehr Aussagekraft zu besitzen. Er ist definiert als die Differenz zwischen  $t_0$  und der höchsten Konzentration von  $t_{30}$  oder  $t_{60}$ . Ist  $\Delta_{\text{max}} > 9\mu\text{g/dl}$  ist von einer adäquaten Nebennierenrindenfunktion auszugehen. Ist  $\Delta_{\text{max}} \leq 9\mu\text{g/dl}$  spricht man von einer relative Nebennierenrindeninsuffizienz (6).

### **1.9 Das Hormonprofil als Vorhersagewert bei kritisch Kranken**

Schon seit längerer Zeit wird vermutet, dass das Hormonprofil von prognostischer Bedeutung bei kritisch kranken Patienten sein könnte. Im Jahr 2000 wurde eine französische Studie veröffentlicht, deren Ziel es gewesen war, ein endokrines Muster zu finden, welches helfen könnte eine Gruppe von Patienten zu identifizieren, die von einer Substitutionstherapie mit Hydrocortison profitieren würde (6).

Die prospektive klinische Studie schloss 189 Patienten ein. Beurteilt wurde der prognostische Wert vom Cortisolspiegel und ACTH-Test bei Patienten im septischen Schock anhand der 28-Tage-Mortalität. Mit Beginn des septischen Schocks wurde ein ACTH-Kurztest, mit 0,25mg Tetracosactrin, durchgeführt. Blutproben wurden vor dem Test ( $t_0$ ), 30 ( $t_{30}$ ) und 60 ( $t_{60}$ ) Minuten nach Tetracosactrin-Gabe entnommen. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass unabhängige Vorhersagewerte, die mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert waren, unter anderem ein hoher basaler Cortisolspiegel und ein schwacher Cortisolanstieg ( $\Delta_{\text{max}}$ ) nach Corticotropin Gabe waren. Für den basalen Cortisolspiegel wurde als beste Grenze ein Wert von  $34\mu\text{g/dl}$  festgelegt. Patienten, die über diesem Wert lagen ( $> 34\mu\text{g/dl}$ ), hatten ein deutlich

erhöhtes Risiko, den septischen Schock nicht zu überleben. Zudem ermittelte man einen Schwellenwert für die Differenz zwischen basalem Cortisolspiegel und dem höchsten Wert nach 30 oder 60 Minuten ( $\Delta_{\max}$ ). Hier stellte ein  $\Delta_{\max}$  von  $< 9\mu\text{g/dl}$  ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko dar.

Mit Hilfe dieser beiden Grenzwerte wurden schließlich drei verschiedene Muster der Aktivierung der HHNA im septischen Schock festgelegt, die mit drei verschiedenen Prognosen der Patienten assoziiert sind. Die beste Prognose haben demnach Patienten mit einer adäquat funktionierenden HHNA ( $t_0 \leq 34\mu\text{g/dl}$ ;  $\Delta_{\max} > 9\mu\text{g/dl}$ ; mittlere Überlebenszeit  $> 28$  Tage). Bei Patienten, die eine der folgenden Konstellationen aufweisen ist von einer mittleren Prognose auszugehen:  $t_0 < 34\mu\text{g/dl}$  und  $\Delta_{\max} \leq 9\mu\text{g/dl}$ , oder  $t_0 > 34\mu\text{g/dl}$  und  $\Delta_{\max} > 9\mu\text{g/dl}$ , 28-Tage Mortalitätsrate 67%. Die schlechteste Prognose haben Patienten mit folgendem Muster:  $t_0 > 34\mu\text{g/dl}$  und  $\Delta_{\max} \leq 9\mu\text{g/dl}$ . Hier lag die 28 Tage Mortalität bei 82%. Man kam zu dem Schluss, dass der ACTH-Kurztest und das  $\Delta$ -Cortisol einen guten prognostischen Wert im Hinblick auf ein erhöhtes Mortalitätsrisiko bei Patienten im septischen Schock besitzen.

In der Literatur finden sich sehr kontroverse Daten zu dieser Thematik. Die Hinweise reichen von Studien, die ebenfalls eine erhöhte Mortalitätsrate bei Patienten mit einem hohen basalen Cortisolwert und einem geringen Anstieg nach ACTH-Gabe feststellten (47, 49, 65, 81, 86), bis hin zu Studien, die keinerlei Zusammenhang zwischen Cortisolwert und Mortalität nachweisen konnten (24, 80).

Die Unklarheiten begründen sich zum Teil in der Tatsache, dass bislang immer noch nicht ausreichend geklärt ist, wie hoch die adäquate Cortisolkonzentration bei Sepsis und im septischen Schock ist und ab welchen Werten eine behandlungsbedürftige NNR-Insuffizienz vorliegt (61).

## 1.10 Kritik am ACTH-Test

Der ACTH-Test wird heute empfohlen, um über eine Therapieindikation mit Hydrocortison bei Patienten im septischen Schock zu entscheiden. Es werden jedoch auch immer wieder Zweifel laut, ob er im Fall des septischen Schocks eine geeignete Methode darstellt, um die NNR-Funktion beurteilen zu können. Schon einige Studien haben Schwierigkeiten aufgezeigt, die sich in diesem Zusammenhang ergeben können. In der Literatur finden sich zahlreiche Schwellenwerte in Bezug auf den ACTH-Test (6, 9, 65, 69) und bis heute gibt es keinen einheitlichen Konsens darüber, wie die Ergebnisse zu interpretieren sind (10, 25, 59, 65).

Eine Arbeit aus dem Jahre 1995 untersuchte die Nebennierenrindenfunktion von Patienten im schweren septischen Schock (24). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn des septischen Schocks wurde unter anderem ein ACTH-Test durchgeführt. Hierbei stellten die Untersucher fest, dass, je nachdem welchen Schwellenwert sie zur Interpretation des ACTH-Tests heranzogen, die Inzidenz der relativen Nebennierenrindeninsuffizienz bei den Patienten stark variierte. Zog man einen Cortisol-Spitzenwert von  $< 18\mu\text{g/dl}$  als Definitionskriterium heran, so wiesen nur 6,25% der 40 untersuchten Patienten eine relative Nebennierenrindeninsuffizienz auf, während bei 96,75% der Patienten die Nebennierenrinde adäquat zu funktionieren schien. Legten sie jedoch fest, dass der Schwellenwert für eine relative NNR-Insuffizienz ein Cortisolanstieg ( $\Delta\text{max}$ )  $< 9\mu\text{g/dl}$  war, erfüllten 75% der Patienten im septischen Schock dieses Kriterium, und nur noch 25% wiesen eine adäquate NNR-Funktion auf. Man kam zu dem Schluss, dass der ACTH-Test, der innerhalb der ersten 24h nach Beginn des septischen Schocks durchgeführt wird, weder zu Vorhersagen bezüglich der Überlebenschancen der Patienten herangezogen werden könne, noch dazu geeignet sei, bei Patienten mit hohen basalen Plasma Cortisolwerten die Beeinträchtigung der NNR-Funktion abzuschätzen und über eine Therapie mit Hydrocortison zu entscheiden.

Einen weiteren Kritikpunkt stellt die Reproduzierbarkeit der ACTH-Testergebnisse dar. In



einer Studie aus dem Jahr 1995 wurden bei 22 Patienten mit septischen Schock zwei aufeinander folgende ACTH-Tests durchgeführt (23). Der erste innerhalb der ersten 24h nach Beginn des septischen Schocks (Tag 1) und der zweite 48h später (Tag 2). Auch hier wurde der Cortisolspiegel vor und 60 Minuten nach i.v. Gabe von 0,25mg Tetracosactrin bestimmt. Man stellte fest, dass keine Korrelation zwischen dem Cortisolanstieg an Tag 1 und Tag 2 bestand. Vielmehr wiesen die Ergebnisse daraufhin, dass der Cortisolanstieg im Rahmen des ACTH-Tests bei Patienten im septischen Schock nicht reproduzierbar sei.

Auch aktuellere Studien befassen sich mit dieser Thematik. Eine Studie aus dem Jahr 2005 untersuchte die Reproduzierbarkeit von ACTH-Testergebnissen bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis, septischen Schock und ohne Sepsis (59). Innerhalb der ersten 24 h nach Aufnahme auf die Intensivstation, oder nach Beginn des septischen Schocks, wurden zwei aufeinander folgende ACTH-Tests durchgeführt. Man beobachtete, dass die Korrelation der ACTH-Tests bei den Patienten ohne Sepsis sehr hoch war, bei den Patienten im septischen Schock jedoch sehr niedrig. Man kam zu dem Schluss, dass der ACTH-Test im septischen Schock sehr schlecht reproduzierbar sei, und dass ein einmalig durchgeführter ACTH-Test nicht die beste Methode darstelle, um bei diesen Patienten eine NNR-Insuffizienz zu diagnostizieren.

Weiterhin finden sich Hinweise darauf, dass die dem ACTH-Test zugrunde liegende Messmethode zur Cortisolbestimmung im Serum Einfluss auf die Ergebnisse haben kann (28, 32). Darauf machte erstmals eine Studie im Jahr 1995 aufmerksam (32). Verglichen wurden die Ergebnisse dreier Immunoassays zur Bestimmung des Cortisols im Serum mit der zu diesem Zeitpunkt als Goldstandard geltenden „Isotop dilution gas chromatography-mass spectrometry“-Methode. Hierbei ergaben sich erhebliche Abweichungen der Messungen mit den verschiedenen Methoden.

## **1.11 Fragestellung**

Wie kommt es zu so unterschiedlichen Studienergebnissen bezüglich der Korrelation zwischen Cortisolwert und Mortalität? Ist vielleicht die Messmethodik, die zur Cortisolbestimmung eingesetzt wird, mit verantwortlich für den großen Variationsbereich der Werte?

Bisher gibt es keine Studien, die sich mit der Harmonisierung und Validierung diagnostischer Tests zur Untersuchung der Nebennierenrindenfunktion im septischen Schock befasst haben.

Um mit Hilfe des ACTH-Tests sichere Kriterien aufstellen zu können, nach denen sich die Therapieindikation für Patienten im septischen Schock richtet, ist es wichtig, dass der Test genaue, vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Behält man die Ergebnisse der zuvor genannten Studien im Gedächtnis, und betrachtet man die Vielzahl der auf dem Markt erhältlichen Testverfahren zur Cortisolbestimmung im Serum, stellt sich die Frage, ob der ACTH-Test im Fall des septischen Schocks eine geeignete Methode darstellt, um die NNR-Funktion zu überprüfen und über den Einsatz von Hydrocortison zu entscheiden.

Im Rahmen des CORTICUS-Projektes wurde deshalb die Wertigkeit des ACTH-Tests, basierend auf den Meßmethoden verschiedener Immunoassays zur Bestimmung von Cortisol im Serum von Patienten im septischen Schock näher untersucht. Insbesondere sollte die Übereinstimmung von Testergebnissen, wie sie in verschiedenen Laboren ermittelt wurden, untersucht werden.

## **2. Methodik**

### **2.1. CORTICUS-Projekt**

Das CORTICUS-Projekt, eine groß angelegte Multizenter-Studie an der sich mehrere europäische Länder beteiligen, soll Antworten auf noch nicht ausreichend geklärten Fragen liefern. Es handelt sich um eine prospektive, randomisierte, placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie, die den therapeutischen Einsatz von Glucocorticoiden im septischen Schock untersuchen wird. Neben der Beurteilung der NNR-Funktion von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Sepsis, soll aufgeklärt werden, welchen möglichen Beitrag die NNR im septischen Schock leistet und welche Bedeutung dabei dem NNR-Hormon Cortisol zukommt. Die zentrale Frage, welche Patienten im Rahmen eines septischen Schocks von einer Therapie mit Corticosteroiden profitieren, soll anhand der 28-Tage-Mortalität der Non-Responder ( $\Delta_{\max} \leq 9\mu\text{g/dl}$ ) im ACTH-Test beurteilt werden (6, 78).

Als Teil des CORTICUS-Projektes wird sich diese Arbeit mit der Messung von Cortisolwerten mittels ACTH-Test bei Patienten im septischen Schock befassen. Fragestellung soll die Wertigkeit dieser Meßmethode im speziellen Fall des septischen Schocks sein, sowie deren Eignung als Testverfahren für die NNR-Funktion im septischen Schock und als Hilfestellung bei der Entscheidung über den Einsatz von Hydrocortison. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, ein europaweit einheitliches, zuverlässiges diagnostisches Testsystem für die Nebennierenrindenfunktion im septischen Schock zu entwickeln.

## **2.2 ACTH-Test im septischen Schock**

Neben der Kenntnis von adäquaten Cortisolkonzentrationen im septischen Schock und genauen Therapierichtlinien ist es wichtig, dass ein einfaches und schnell durchzuführendes Testsystem zur Beurteilung der NNR-Funktion zur Verfügung steht. So kann entschieden werden, welche Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Corticosteroidtherapie profitieren werden und welche man nicht unnötigerweise den Risiken von möglichen Nebenwirkungen aussetzen sollte. Der ACTH-Test erfüllt diese Voraussetzungen und schien bisher die Methode der Wahl zu sein.

Die Bestimmung des Cortisolwertes im Blut vor und nach ACTH-Gabe erfolgt in der Regel mit Hilfe von Immunoassays. Diese immunologischen Nachweisverfahren bedienen sich markierter Antikörper bzw. Antigene, um so die Konzentration eines gesuchten Analytmoleküls zu bestimmen. Je nachdem, welche Markierungen verwendet werden, können der Radioimmunoassay (RIA), der Lumineszenz-Immunoassay (LIA), der Fluoreszenz-Immunoassay (FIA) und der Enzym-Immunoassay (EIA) unterschieden werden. Europaweit finden in den Laboren eine große Anzahl dieser Immunoassays verschiedener Hersteller Verwendung. Trotz dieser Tatsache wurde bisher noch nicht überprüft, inwieweit die Messergebnisse verschiedener Labore, die mit unterschiedlichen Immunoassays arbeiten, übereinstimmen. Die Kenntnis dieser Übereinstimmung ist jedoch von großer Wichtigkeit, wenn man sicher gehen will, dass keine Fehlentscheidungen bezüglich des Vorliegens einer relativen NNR-Insuffizienz getroffen werden.

## **2.3 Harmonisierung der Cortisolmessungen**

Aufgrund dieser Fragestellung wurden im Rahmen des CORTICUS-Projektes bei Patienten im septischen Schock ACTH-Tests zur Beurteilung der NNR-Funktion durchgeführt. Eine anschließende Harmonisierung der Messungen konnte erreicht werden, indem die Blutproben

der Patienten einmal in den Laboren vor Ort gemessen wurden und ein Teil derselben Probe dann ein weiteres Mal im Zentrallabor in München analysiert wurde. Hierzu wurden 125 Patienten aus mehreren europäischen Ländern anhand der folgenden Einschlusskriterien, die der Definition eines septischen Schocks entsprechen, in die Studie aufgenommen. Diese 125 Patienten entsprechen einer Interimsanalyse, die planmäßig im Rahmen des CORTICUS-Projektes vorgenommen wurde.

**Einschlusskriterien:** (alle 4 Unterpunkte müssen erfüllt sein)

1. Klinischer Nachweis einer Infektion innerhalb der vorangegangenen 72 Stunden (kann auch schon länger als 72h bestehen). Mindestens einer der folgenden Unterpunkte a-d muss erfüllt sein:
  - a. Nachweis polymorphkerniger Zellen in einer normalerweise sterilen Körperflüssigkeit (ausgenommen Blut).
  - b. Kultur oder Gramfärbung einer Blut-, Sputum- oder Urin-Probe oder einer anderen, normalerweise sterilen Körperflüssigkeit ist positiv auf pathogene Mikroorganismen.
  - c. Durch Inspektion erkannter Infektionsherd (z.B. intraoperativ erkannte Darmruptur mit freier Luft oder Darminhalt im Abdomen, eiternde Wunden).
  - d. Anderer klinischer Nachweis einer Infektion – behandelte, ambulant erworbene Pneumonie, Purpura fulminans, nekrotisierende Faszitis, etc.
  
2. Nachweis einer systemischen Reaktion auf eine Infektion, definiert als Vorhandensein von zwei oder mehr der folgenden Zeichen innerhalb der vorangegangenen 24h (die Zeichen können auch bereits länger als 24h bestehen).

- a. Fieber (Temperatur  $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie (rektal gemessene Temperatur  $< 35,6^{\circ}\text{C}$ ).
  - b. Tachykardie (Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ).
  - c. Tachypnoe (Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$ ,  $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$ ) oder der Patient benötigt eine invasive, mechanische Beatmung.
  - d. Veränderung der Anzahl weißer Blutkörperchen auf  $> 12.000$  Zellen/ $\text{mm}^3$ ,  $< 4.000$  Zellen/ $\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Neutrophile.
3. Nachweis eines Schocks definiert durch (die Unterpunkte a und b müssen beide innerhalb der letzten 72h aufgetreten sein und dürfen **nicht** schon länger als 72h vorhanden sein):
- a. Systolischer Blutdruck  $< 90\text{mmHg}$  oder ein Abfall des systolischen Blutdrucks um mehr als  $50\text{mmHg}$  vom Ausgangswert bei zuvor hypertensiven Patienten (über mindestens eine Stunde), trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, **oder** Notwendigkeit des Einsatzes von Vasopressoren für mindestens eine Stunde (Dopamininfusion  $\geq 5\text{mg/kg/min}$  **oder** der Einsatz jeglicher Dosen von Adrenalin, Noradrenalin, Phenylepinephrin, Vasopressin) um einen systolischen Blutdruck von  $\geq 90\text{mmHg}$  aufrecht zu erhalten.
  - b. Minderperfusion oder Organdysfunktion, die nicht auf eine zugrunde liegende Erkrankung oder Medikation zurückzuführen sind, aber Folge einer Sepsis sein können, einschließlich eines der folgenden Kriterien:
    1. Anhaltende Oligurie (Urinausscheidung  $< 0,5\text{ml/kg/h}$  über mindestens eine Stunde).
    2. Metabolische Azidose ( $\text{pH} < 7,3$  oder ein Basendefizit von  $\geq 5,0$  mmol/l, oder eine erhöhte Laktatkonzentration  $> 2\text{mmol/l}$ ).

3. Arterielle Hypoxämie ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 280$  ohne Hinweis auf eine Pneumonie) ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$  bei Pneumonie).
  4. Thrombozytopenie, Thrombozytenzahl  $\leq 100.000$  Zellen/ $\text{mm}^3$ .
  5. Akut veränderter Mentalstatus (Glasgow Coma Scale  $< 14$  oder eine akute Veränderung vom Ausgangswert).
4. Einwilligung des Patienten nach Aufklärung.

Patienten, auf die einer der folgenden Punkte zutraf, wurden aus der CORTICUS Studie ausgeschlossen:

**Ausschlusskriterien:**

1. Schwangerschaft.
2. Alter unter 18 Jahre.
3. Zugrunde liegende Erkrankung mit einer voraussichtlichen Lebenserwartung von weniger als drei Monaten.
4. Kardiopulmonale Reanimation innerhalb der letzten 72h vor Studienbeginn.
5. Durch Medikamente induzierte Immunsuppression, einschließlich Chemotherapie oder Bestrahlungstherapie innerhalb der letzten 4 Wochen vor Studienbeginn.
6. Verordnung einer Corticosteroiddauertherapie während der letzten 6 Monate, oder eine akute Steroidtherapie (dosisunabhängig) innerhalb der letzten vier Wochen (einschließlich inhalative Steroide). Topisch angewendete Steroide sind kein Ausschlusskriterium.
7. HIV-positiv.
8. Vorhandensein einer Patientenverfügung zum Verzicht auf lebensverlängernde Maßnahmen.

9. Fortgeschrittene Krebserkrankung mit einer Lebenserwartung von weniger als 3 Monaten.
10. Akuter Myokardinfarkt oder Lungenembolie.
11. Teilnahme an einer anderen experimentellen Medikamentenstudie innerhalb der letzten 30 Tage.
12. Moribunde Patienten, die höchstwahrscheinlich innerhalb der nächsten 24h versterben werden.
13. Patienten, die zum Zeitpunkt des Auftretens des septischen Schocks schon länger als zwei Monate auf der Intensivstation lagen.

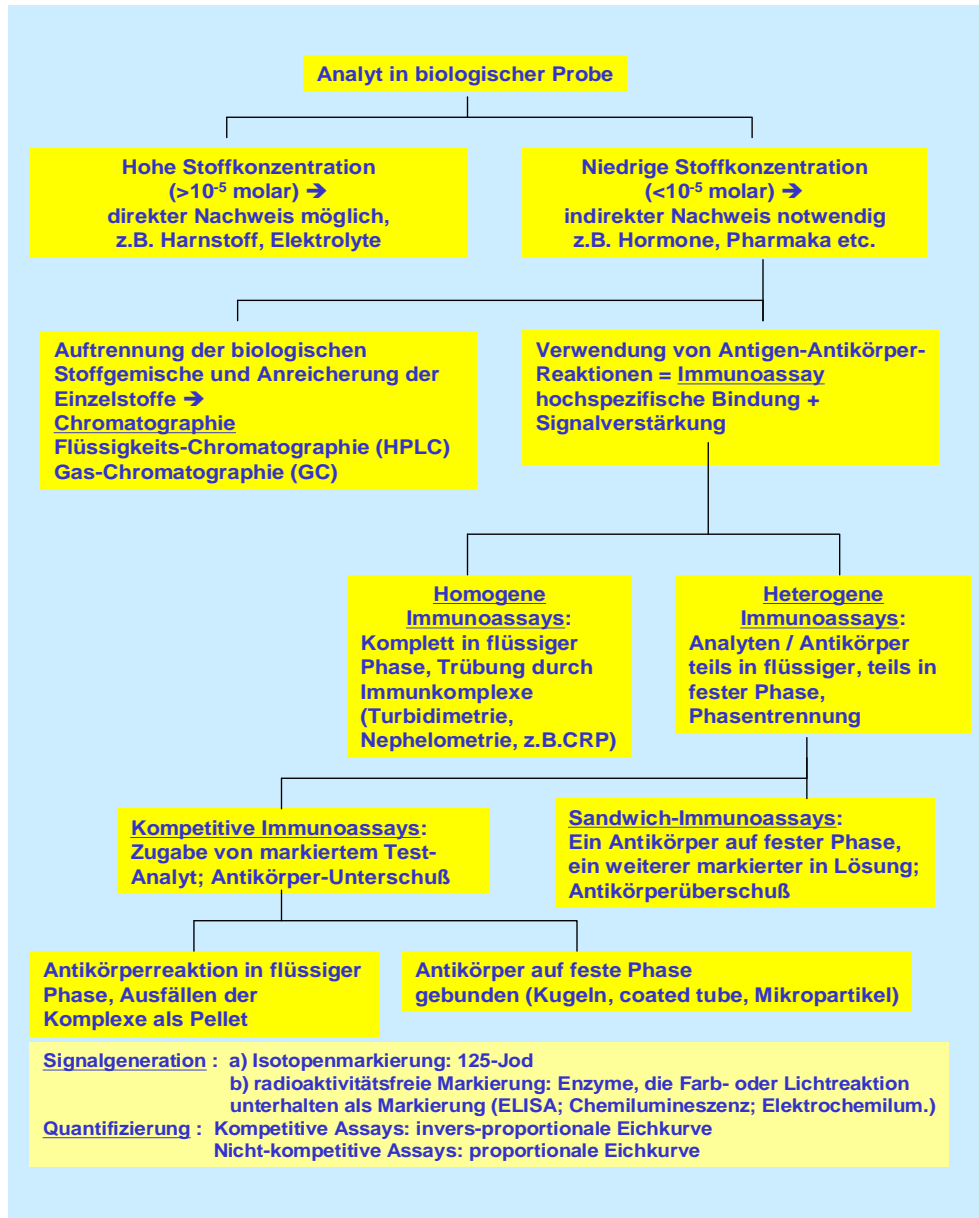
Nach Aufnahme in die Studie wurde ein ACTH-Test durchgeführt. Die Bestimmung des Cortisolwertes vor und 60 min nach Stimulation mit 0,25mg ACTH-Analogon (Synacthen<sup>R</sup>) erfolgte in den Laboren vor Ort mit der dort verwendeten Messmethode. Ein Aliquot der Serumprobe von je 1ml wurde bei -20°C eingefroren und in dafür bereitgestellten Kryobehältern aufbewahrt. Auf Trockeneis gelagert wurden die Proben dann an das Zentrallabor nach München geschickt. Zusätzlich wurde von den Laboren mitgeteilt, mit welcher Messmethode die Cortisolwerte vor Ort bestimmt wurden und mit welchem Gerät die Messungen durchgeführt wurden.

In München erfolgte dann die zweite quantitative Bestimmung aus den Serumproben mit einem auf dem Markt erhältlichen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay „Elecsys Cortisol“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Um das freie Cortisol berechnen zu können, wurden zusätzlich das CBG und Albumin bestimmt. Eine weitere Messung der Proben erfolgte mit der LC-MS/MS (Hochleistungsflüssigkeits-Tandem-Massenspektrometrie), welche derzeit als Goldstandard/Referenzmethode für die Cortisolbestimmung gilt (88, 103).



## 2.4 Immunoassays

Bei der Wahl der Methode zum Nachweis von Analyten in biologischen Proben spielt die Stoffkonzentration eine Rolle.



**Abbildung 1.** Möglichkeiten bei der Wahl der Methode zum Nachweis von Analyten in biologischen Proben.

Bei hohen Stoffkonzentrationen von  $> 10^{-5}$  molar ist oft ein direkter Nachweis möglich, beispielsweise bei Harnstoff und Elektrolyten, während niedrige Stoffkonzentrationen von etwa  $< 10^{-5}$  molar (Hormone, Pharmaka) einen indirekten Nachweis des Analyten erfordern.

Dieser indirekte Nachweis kann durch unterschiedliche Verfahren erfolgen. Zum einen mit Hilfe von chromatographische Nachweistechiken, wie der Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) oder der Gas-Chromatographie (GC), die es ermöglichen, biologische Stoffgemische aufzutrennen und die so gewonnenen Einzelstoffe anschließend zu detektieren.

Die zweite Möglichkeit des indirekten Nachweises für Analyte niedriger Stoffkonzentration ist die Verwendung von Immunoassays, die auf der Bindung eines Analytmoleküls über seine spezifische antigene Determinante an dem korrespondierenden analytischen Antikörper basieren. Um diese Wechselwirkung der Antigen-Antikörperreaktion analytisch zu nutzen muss sie so verstärkt werden, dass sie mit geeigneten Messgeräten erfasst und quantitativ ausgewertet werden kann (19).

Immunoassays lassen sich prinzipiell in zwei große Gruppen aufgliedern:

Unterschieden werden die homogenen Immunoassays von den heterogenen Immunoassays.

#### **2.4.1 Homogene Immunoassays**

Homogene Immunoassays (Turbidimetrie, Nephelometrie) eignen sich zur immunologischen Bestimmung von Plasmaproteinen wie z. B. Immunglobulinen, CRP, Transferrin, Ferritin, Rheumafaktoren usw. (19). Sie laufen komplett in flüssiger Phase ab und werden in Reaktionsküvetten durchgeführt. Grundlage ist die Trübung der flüssigen Phase durch die Entstehung von Antigen-Antikörperkomplexen.

Bei der Turbidimetrie wird die Abschwächung der Intensität eines Lichtstrahls durch Streuung an Antigen-Antikörper-Aggregaten in einer Lösung gemessen. Nur durchtretendes und ein Teil des vorwärts gestreuten Lichts erreichen das Photometer (19). Bei der Nephelometrie wird die Intensität des in der Küvette entstehenden Streulichts direkt gemessen (19). Für beide Methoden werden dabei Wellenlängen gewählt, bei denen weder das Lösungsmittel noch die Teilchen selbst absorbieren (19).

## **2.4.2 Heterogene Immunoassays**

Bei den heterogenen Immunoassays erfolgt eine Phasentrennung. Analyten bzw. Antikörper liegen teils in flüssiger, teils in fester Phase vor. Anhand des Bindungsprinzips kann bei den heterogenen Immunoassays eine weitere Unterteilung in kompetitive Immunoassay und nicht-kompetitive Sandwich-Assays erfolgen (91).

### **2.4.2.1 Sandwich Immunoassays**

Die Gruppe der nicht-kompetitiven Assays bilden die Sandwich-Immunoassays:

Ein spezifischer Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen der Patientenprobe liegt im Überschuss vor und ist an eine feste Phase gebunden, wie beispielsweise eine Röhrchenwand („coated tube“), Polystyrolkugeln oder Mikropartikel. Wird nun die Patientenprobe hinzugegeben, erfolgt im ersten Schritt die Inkubation zur Bindung des zu bestimmenden Antigens an die spezifischen Antikörper. Anschließend folgt ein Waschen des Ansatzes zur Entfernung störender Serumbestandteile. Nun wird ein markierter Zweitantikörper, der mit einer zweiten Bindungsstelle des Antigens reagiert, hinzugegeben (19). Es folgt die Inkubation zur Bildung von Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen (Sandwich). Anschließend werden die freien markierten Antikörper entfernt. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto mehr wird an die Festphase gebunden und so auch entsprechend mehr markierte Zweitantikörper an den entstandenen Antigen-Antikörperkomplex fixiert. Die Signalgeneration erfolgt abhängig von der verwendeten Markierung entweder als Radioaktivität bei Isotopenmarkierung ( $^{125}\text{J}$ ) oder bei radioaktivitätsfreien Markierungen durch Enzyme die Farb- oder Lichtreaktionen unterhalten (ELISA, Chemilumineszenz, Elektrochemilumineszenz). Je höher der Antigengehalt der Probe, desto größer ist die Signalgeneration. Die Quantifizierung erfolgt somit bei den nicht-kompetitiven Sandwich-Immunoassays über eine proportionale Eichkurve.

Steroidhormone wie Cortisol können nicht mit Sandwich-Assays bestimmt werden.

Die Durchführung eines Sandwich-Assays setzt voraus, dass auf dem Liganden mindestens zwei gut charakterisierte Epitope für die verschiedenen Antikörper vorhanden sind. Da Cortisol nur in geringem Maß immunogen ist, stellt die Herstellung geeigneter Antikörper ein Problem dar. Zudem ist aufgrund der geringen Molekülgröße durch sterische Behinderung die Bindung von zwei Antikörpern nicht möglich (92). Das Cortisol muss deshalb mit Hilfe kompetitiver, heterogener Immunoassays bestimmt werden.

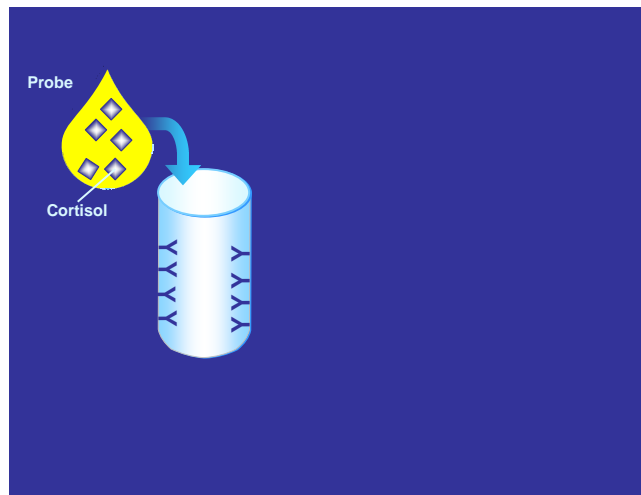
#### **2.4.2.2 Kompetitive Immunoassays**

Beim klassischen kompetitiven Immunoassay konkurriert eine konstante Menge markiertes Standard-Antigen (Tracer) als Bestandteil des Testkits und eine variable Menge nicht markiertes Antigen aus der zu untersuchenden Probe, um eine definierte, im Unterschuss vorliegende Menge spezifischer Antikörper-Bindungsstellen. Die Antikörper sind entweder auf einer festen Phase gebunden (Styrolkugeln, coated tube, Mikropartikel) oder die Antikörperreaktion erfolgt in flüssiger Phase mit anschließender Ausfällung der Komplexe als Pellet.

Die Inkubation der drei angeführten Reaktionspartner erfolgt simultan zur Einstellung eines Gleichgewichts (19). Bei hohem Antigengehalt der Probe wird wenig markiertes Antigen an Antikörper gebunden und umgekehrt. Anschließend erfolgt eine Abtrennung des ungebundenen Tracers aus dem Gemisch und der gebundene Anteil kann bestimmt werden (92). Die Verdrängung des Tracers vom Antikörper ist proportional der Konzentration des Antigens in der Probe. Handelt es sich beispielsweise um eine radioaktive Markierung, ist die Aktivität der gemessenen Strahlung umgekehrt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens (68). Die Auswertung erfolgt somit bei den kompetitiven Assays über eine invers-proportionale Eichkurve.

Die Zugabe der Reaktionspartner kann bei einem kompetitiven Immunoassay auch sequenziell erfolgen, indem es zunächst dem Antigen der Probe ermöglicht wird, sich mit einem Überschuss an spezifischen Antikörpern ins Gleichgewicht zu setzen. Erst in einem zweiten Schritt wird das markierte Antigen hinzugegeben und besetzt die noch freien Antikörperbindungsstellen (92). Die weiteren Schritte gleichen denen des simultanen, kompetitiven Immunoassays.

Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen das Prinzip eines sequenziellen, kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassays zur Cortisolbestimmung:



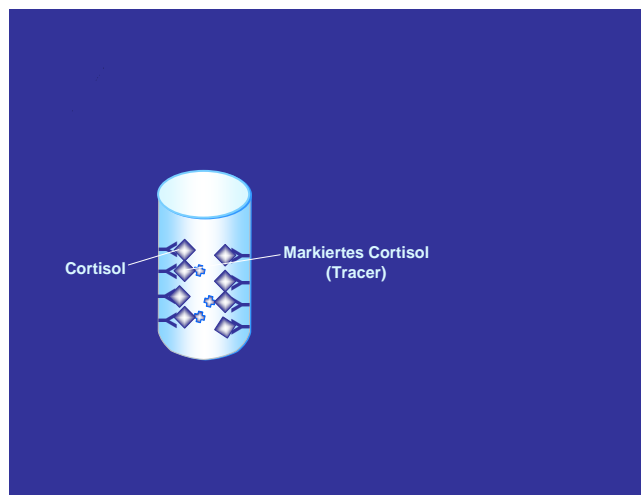
**Abbildung 2a.** Die Patientenprobe wird in ein Röhrenchen gegeben, dessen Wand mit einem Überschuss an Anti-Cortisol-Antikörpern überzogen ist.



**Abbildung 2b.** Die Cortisol Moleküle der Patientenprobe binden an die Antikörper.

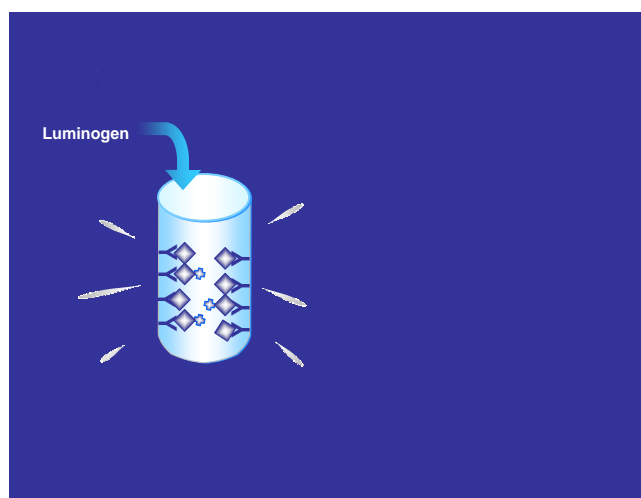


**Abbildung 2c.** Markiertes Cortisol (Tracer) wird hinzugegeben.

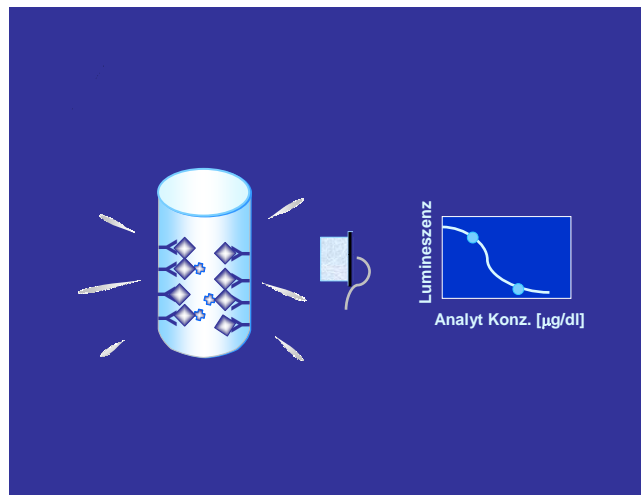


**Abbildung 2d.** Die freien Antikörperbindungsstellen werden von markierten Cortisolmolekülen (Tracer) besetzt.

Der Tracer-Überschuss wird ausgewaschen.



**Abbildung 2e.** Eine luminogene Substanz wird hinzugegeben. In Verbindung mit dem Tracer kommt es zu einer Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht erzeugt wird.



**Abbildung 2f.** Das Lichtsignal kann gemessen werden. Ist wenig Cortisol in der Patientenprobe enthalten, können mehr Antikörperbindungsstellen vom Tracer besetzt werden, und es wird ein stärkeres Lichtsignal gemessen. Je schwächer das Lichtsignal, desto mehr Cortisol ist in der Patientenprobe vorhanden.

### 2.4.3 Markierungen

Die Signalgeneration kann bei Immunoassays mit Hilfe von verschiedenen Markierungen erfolgen:

#### 2.4.3.1 Enzymmarkierung

Zur Enzymmarkierung von Antigen oder Antikörper werden häufig die alkalische Phosphatase, die Meerrettichperoxidase oder die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verwendet (92). Die Messung erfolgt beispielsweise nach Zugabe eines spezifischen, farblosen Substrates, das von dem jeweiligen Enzym in ein Produkt umgewandelt wird, dessen Bildung durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Dieser Farbumschlag kann bei einer definierten Wellenlänge als optische Dichte gemessen werden (68).

### **2.4.3.2 Fluoreszenzmarkierung**

Zur Fluoreszenzmarkierung werden Fluorophore eingesetzt. Es handelt sich hierbei um Moleküle, die Energie absorbieren und in einem Zeitraum von etwa  $10^{-8}$  Sekunden als Photon wieder abgeben. Erfolgt die Energiezufuhr als Strahlung, wird diese mit einer Wellenlängenverschiebung von 30-50nm wieder abgegeben. Nach Anregung mit polarisiertem Licht wird emittiertes Licht mit hoch empfindlichen Photodetektoren im entsprechenden Lichtspektrum gemessen. Ein häufig verwendeter Fluoreszenzfarbstoff ist 4-Methylumbelliferonphosphat, das durch die alkalische Phosphatase zu dem Fluorophor 4-Methylumbelliferon dephosphoryliert wird (92).

### **2.4.3.3 Lumineszenzmarkierung**

Zur Lumineszenzmarkierung werden Luminogene verwendet. Diese Moleküle können nach Energiezufuhr Strahlung aussenden. Je nach Art der Anregung wird die Biolumineszenz von der Chemilumineszenz unterschieden.

Die Biolumineszenz wird erzeugt durch ein lumineszentes System, dem eine energieliefernde enzymatische Reaktion vorgeschaltet ist. Eingesetzt wird das Luziferin-Luziferase-System. Luziferin wird durch Katalyse der Luziferase zu einem angeregten Komplex oxidiert, der unter Lichtemission zerfällt (92).

Die bei den Immunoassays häufig angewandte Chemilumineszenz wird von Substanzen erzeugt, die durch chemische Oxidation Licht abgeben, wie z.B. Luminol, Acridiniumester oder Oxalate. Für den Start der Chemilumineszenzreaktion sind Katalysatoren notwendig (92). Nach Induktion der Lumineszenzreaktion wird emittiertes Licht mit hoch empfindlichen Photodetektoren im entsprechenden Lichtspektrum gemessen (68).



#### **2.4.3.4 Elektrochemilumineszenz**

Bei der Elektrochemilumineszenz wird zur Markierung eines Antikörpers bzw. Antigens ein Rutheniumkomplex verwendet. Das Reaktionsgemisch wird zusammen mit einer Tripropylamin (TPA) enthaltenden Pufferlösung in die Elektrochemilumineszenz-Messzelle überführt, in der die auf den Mikropartikel gebundenen Immunkomplexe durch magnetische Wirkung als dünner, gleichmäßiger Film auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert werden. Durch das Anlegen einer Spannung an die Elektrode kommt es sowohl zur Oxidation des Ruthenium-Komplexes als auch des in der Lösung befindlichen Tripropylamins. Aus der Reaktion dieser beiden Komponenten resultiert die Überführung des Rutheniums in einen angeregten Zustand, aus dem es durch Abgabe von Lichtenergie wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Photonenstrahlung kann im Photomultiplier gemessen und anschließend mit einer Kalibrationskurve verglichen werden (77).

#### **2.4.3.5 Isotopenmarkierung**

Als radioaktives Label wird zum markieren der Liganden hauptsächlich  $^{125}\text{J}$  verwendet, ein Gamma-Strahler mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen (92).

#### **2.4.4 „Elecsys-Cortisol“ Immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim)**

Der im Zentrallabor in München zur Cortisolbestimmung verwendete Immunoassay von Roche Diagnostics soll im Nachfolgenden näher beschrieben werden:

Der „Elecsys-Cortisol“ Immunoassay ist ein *in vitro* Test zur quantitativen Bestimmung von Cortisol in Humanserum. Es handelt sich um einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) der zur Durchführung an den Roche Immunoassay Analyseautomaten „Elecsys 1010/2010“ und am Modular Analytics E170 (Elecsys Modul) vorgesehen ist.

Verwendet wird ein kompetitives Testprinzip mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen Cortisol gerichtet ist. Hierbei konkurriert endogenes Cortisol der Probe, welches mittels Danazol von den Bindeproteinen freigesetzt wird, mit dem im Test exogen zugesetzten Cortisolderivat, welches mit einem Rutheniumkomplex markiert ist, um Bindungsstellen am Antikörper.

Die Gesamtdauer des Tests beträgt 18 Minuten. Im ersten Schritt wird eine 20µL Probe mit einem Cortisol-spezifischen, biotinylierten Antikörper und einem mit Rutheniumkomplex markierten Cortisolderivat inkubiert. Dabei werden die Bindungsstellen des biotinylierten Antikörpers entsprechend der Konzentration des Analyten in der Probe unter Bildung eines Immunkomplexes teilweise mit Probenanalyt und teilweise mit ruthenylierten Hapten besetzt. In einem zweiten Schritt werden Streptavidin beschichtete Mikropartikel hinzugegeben und der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkungen an die Festphase gebunden (76). Die Streptavidin-Biotin-Technologie ist eine Methode, die eine indirekte Fixierung von Antigen oder Antikörper auf der Festphase ermöglicht (92). Streptavidin, ein Protein aus *Streptomyces avidinii*, lässt sich sehr fest an Oberflächen wie Glaswände oder Mikropartikel koppeln und besitzt eine extrem hohe Bindungskraft für das Vitamin Biotin. Biotin seinerseits kann leicht an alle Antikörper chemisch gebunden werden (Biotinylierung), ohne dass deren Struktur und Wirkung verändert wird (34).

Anschließend wird das Reaktionsgemisch in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert (76).

Die analytische Nachweisgrenze (Sensitivität) entspricht der niedrigsten messbaren Analytkonzentration, die von Null unterschieden werden kann und berechnet sich als Konzentration, die zwei Standardabweichungen oberhalb des niedrigsten Standards liegt. Beim „Elecsys-Cortisol“ Immunoassays liegt sie bei  $< 0,500$  nmol/L bzw.  $< 0,018$  µg/dL. Der Messbereich, der definiert ist durch die Nachweisgrenze und das Maximum der Masterkurve (lineare Eichkurve), liegt zwischen  $0,5 - 1750$  nmol/L bzw.  $0,018 - 63$  µg/dL (76).

Bezüglich der analytischen Spezifität wurden vom Hersteller für das verwendete Antikörperderivat folgende Kreuzreaktivitäten ermittelt: a) zugesetzte Substanz je 10 µg/ml: Corticosteron 5,8%, Cortisol-21-Sulfat 0,04%, Cortison 0,30%, 11-Deoxycorticosteron 0,69%, 11-Desoxycortisol 4,1%, Dexamethason 0,08%, 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron 1,50%, Prednison 0,28%, Progesteron 0,35% ; b) zugesetzte Substanz je 1 µg/ml: 21-Desoxycortisol 45,4%, 6- $\beta$ -Hydroxycortisol 158%; c) zugesetzte Substanz je 0,1 µg/ml: Allotetrahydrocortisol 165%, Prednisolon 171%, 6- $\alpha$ -Methylprednisolon 389% (76).

Die Präzision (Reproduzierbarkeit) einer Methode kennzeichnet die Streuung der Messwerte, die eine Methode bei Mehrfachmessung der gleichen Probe aufweist. Ein Maß für die Präzision ist die Standardabweichung, die die mittlere Abweichung der Messwerte vom Mittelwert einer Messreihe innerhalb einer Serie oder zwischen verschiedenen Messreihen

beschreibt. Der Variationskoeffizient (VK) ist der prozentuale Anteil der Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert (68).

Beim Elecsys Cortisol Immunoassay wurde die Reproduzierbarkeit mit Elecsys Reagenzien, gepoolten Humanseren (HS) und Kontrollen (PC U) bestimmt: 6-fach pro Tag über 10 Tage (n = 60). Hierbei ergaben sich für die Präzision in der Serie und die Gesamt-Präzision folgende Variationskoeffizienten in Abhängigkeit von den verschiedenen Mittelwerten (MW) (76):

Elecsys 2010			Präzision in der Serie			Gesamt-Präzision		
Probe	MW		SD		VK	SD		VK
	nmol/L	µg/dl	nmol/L	µg/dl	%	nmol/L	µg/dl	%
<b>HS1</b>	208	7,53	2,76	0,10	1,3	3,29	0,12	1,6
<b>HS2</b>	561	20,3	7,40	0,23	1,3	8,36	0,30	1,5
<b>HS3</b>	1268	46,0	14,0	0,52	1,1	19,9	0,72	1,6
<b>PC U1</b>	363	13,2	5,08	0,18	1,4	5,67	0,21	1,6
<b>PC U2</b>	865	31,4	8,54	0,31	1,0	12,5	0,45	1,4

**Abbildung 3.** Präzision in der Serie und Gesamt-Präzision für den „Elecsys-Cortisol“ Immunoassay von Roche Diagnostics mit dem Analysegerät Elecsys 2010.

Mit einem VK < 10% erfüllt der Elecsys Cortisol Immunoassay (Roche) die allgemeinen Akzeptanzkriterien für Präzision und Richtigkeit und wird im Zentrallabor in München für die Cortisolbestimmung eingesetzt.

## 2.4.5 Immunoassays verschiedener Hersteller

In der nachfolgenden Tabelle finden sich Angaben zu weiteren Immunoassays verschiedener Hersteller, die in den Laboren vor Ort verwendet wurden:

Verwendeter Immunoassay/ Hersteller	Analysegerät	Testprinzip/ Signalgeneration	Markierung Cortisolderivat	Antikörper-Typ	Messbereich/ Analytische Sensitivität
„Elecsys-Cortisol“ <b>Roche</b>	Elecsys 1010/2010	Kompetitiver Elektrochemi- lumineszenzassay	Ruthenium-Komplex	Polyklonaler Ak (Schaf)	0,5-1750 nmol/l (0,018-63 µg/dl)
„Immulite 2000 Cortisol“ <b>DPC</b>	Immulite 2000	Kompetitiver Chemilumineszenz- immunoassay	Alkalische Phosphatase	Polyklonaler Ak (Hase)	28-1380 nmol/l (1-50 µg/dl)
„VIDAS Cortisol S“ <b>Biomérieux</b>	VIDAS- System	Kompetitiver Fluoreszenz- enzymimmunoassay	Alkalische Phosphatase 4-Methyl-umbelliferyl- phosphat (Substrat)	Polyklonaler Ak (Kaninchen)	5,53–1796nmol/l (0,20-65,1µg/dl)
„Cortisol RIA“ <b>Demeditec</b>	Gamma- Counter	Kompetitiver Radioimmunoassay	<sup>125</sup> J	Monoklonaler Ak	10-2000 nmol/l (0,36- 72,5 µg/dl)
„Spectria Cortisol RIA“ <b>Orion Diagnostica</b>	Gamma- Counter	Kompetitiver Radioimmunoassay	<sup>125</sup> J	Polyklonaler Ak (Hase)	20-2000 nmol/l (0,72-72,5 µg/dl)
„ADVIA Centaur Cortisol“ <b>Bayer</b>	ADVIA Centaur	Kompetitiver Chemilumineszenz- immunoassay	Acridiniumester	Polyklonaler Ak (Kaninchen)	5,5-2069 nmol/l (0,20-75 µg/dl)
„Nichols Advantage Cortisol“ <b>Nichols Institute Diagnostics</b>	Advantage	Kompetitiver Chemilumineszenz- immunoassay	Acridiniumester	Monoklonaler Ak (Maus)	8,28-1655 nmol/l (0,3-60 µg/dl)

Abbildung 4. Tabelle zur Übersicht der Immunoassays verschiedener Hersteller.

## **2.5 LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) als Referenzmethode**

Bei der LC-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie) ist die Trenntechnik der HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography / Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) mit einem massenspektrometrischen Detektionsverfahren gekoppelt (93).

Chromatographische Analysemethoden dienen der Trennung von Substanzgemischen. Dies geschieht unter Verwendung einer stationären und einer mobilen Phase, mit denen die zu trennenden Komponenten eines Stoffgemisches in Wechselwirkung treten (68). Durch differentielle Adsorption an definierte Oberflächen können so Einzelsubstanzen eines Untersuchungsmaterials getrennt werden (93). Die stationäre Phase befindet sich hierzu fixiert in einer Trennsäule. Die zu untersuchende Probe muss zunächst einer spezifischen Probenvorbereitung unterzogen werden, um makromolekulare Matrixbestandteile (Proteine) aus der Probe zu entfernen (93). Sie wird dann in eine flüssige oder gasförmige, mobile Phase aufgenommen und darin über die feste Phase geleitet (93). Je nach Intensität der Wechselwirkung zwischen Analyt, stationärer und mobiler Phase, eluieren die Einzelstoffe der Probe von der Trennsäule in einer charakteristischen zeitlichen Sequenz (93). Dies kann in einem „Chromatogramm“ dargestellt werden, indem das Detektionssignal auf der y-Achse gegen die Zeit auf der x-Achse aufgetragen wird. Durch diese Darstellungsweise ergibt jeder getrennte Einzelstoff im Chromatogramm einen „Peak“. Dieser Peak sollte idealerweise eine symmetrische Form und eine konstante Retentionszeit aufweisen, über die die Identifikation des Stoffes erfolgen kann (93). Quantifiziert werden kann der Stoff, indem die Fläche unter dem Peak oder die Höhe bestimmt wird und anschließend mit Kalibrationsproben in Beziehung gesetzt wird (93).

Bei der LC-MS/MS ist der Massenspektrometrie als chromatographisches Verfahren die

HPLC vorgeschaltet. Bei der HPLC ist die mobile Phase flüssig, bestehend aus wässriger Pufferlösung und organischem Lösungsmittel. Die stationäre Phase besteht aus dicht gepackten Partikeln von ca. 5µm Durchmesser mit definierter Oberfläche, wie beispielsweise Kohlenwasserstoffketten an Silica-Partikeln, welche sich in einer Stahlkartusche befinden (93). Durch diese Trennsäulenkartusche wird die mobile Phase hohem Druck unterzogen, wobei der Druck des Flüssigkeitsstroms abgebaut wird und das Eluat am Ende mit Atmosphärendruck aus der Säule strömt (93). Anschließend wird es in den Detektor weitergeleitet. Die so getrennten Einzelsubstanzen können nun einer massenspektrometrischen Detektion unterzogen werden.

Massenspektrometrische Techniken ermöglichen eine Analyse der Zielanalyte auf dem Niveau ihrer molekularen Struktur. Dadurch weisen sie, verglichen mit immunologischen Messtechniken, ein besonders hohes Maß an Stoffspezifität auf (105) und eignen sich zur höchst akkuraten Quantifizierung endogener und exogener niedermolekularer Analyte (93).

Grundlage für die Massenspektrometrie ist die Tatsache, dass Ionen aufgrund ihrer elektrischen Ladung in elektromagnetischen Feldern gezielt bewegt werden können. Da Ionen unter Atmosphärenbedingungen schon nach minimalen Distanzen mit Luftmolekülen kollidieren, ist hierzu jedoch ein Hochvakuum erforderlich. Dieses Hochvakuum, mit Drucken von ca.  $10^{-5}$  Torr, wird in einem Massenspektrometer durch Turbinen-Vakuumpumpen aufrechterhalten (105). Werden nun geeignete Feldstrukturen angelegt ist es möglich, Ionen anhand ihres jeweiligen Molekülgewichts aus einem Gesamtionenstrom zu separieren (105). Dazu kann ein „Quadrupol“-Massenfilter verwendet werden. Hierbei handelt es sich um ein System, das aus vier parallel angeordneten Metallstäben besteht, die in Flugrichtung der Ionen angeordnet sind. An diese werden eine Gleichspannung und eine Radiofrequenzspannung angelegt (68). Bei einem bestimmten Muster des Radiofrequenzspannungsfeldes können nur ionisierte Moleküle mit einer bestimmten Masse-

Ladungs-Ratio (Mass-to-charge-Ratio,  $m/z$  Ratio) den Quadrupol passieren, während andere Ionen seitlich emittiert werden (102).

Die Erzeugung der Ionen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Bei der GC-MS (Gaschromatographische-Massenspektrometrie), welche die klassische massenspektrometrische Technik darstellt, werden Ionen mit Hilfe der „Elektron Impact (EI)-Ionisation“ erzeugt. Die durch die Gaschromatographie aufgetrennten Einzelstoffe werden direkt in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet. Dort angekommen werden sie einem Elektronenstrahl ausgesetzt, der die Analytmoleküle in ca. 5-10 stofftypische Fragmentationen zerschlägt. Das Massenspektrum einer Substanz kann elektronisch mit Fragmentationen-Bibliotheken verglichen werden. So können auch primär unbekannte Stoffe identifiziert werden (105).

Die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie ist erst seit der Entwicklung der Elektrospray-Ionisation (ESI) möglich. Das HPLC-Eluat kann nicht wie bei der GC-MS direkt in den Hochvakuumbereich geleitet werden, da die Evaporation der mobilen Phase enorme Gasmengen erzeugen würde. Unter diesen Umständen wäre die Aufrechterhaltung des notwendigen Hochvakuums nicht möglich (93). Bei der ESI kann die Ionisation der Zielanalyte bei Atmosphärendruck außerhalb des Massenspektrometers erfolgen (93).

Hierbei wird ein Teil des HPLC-Eluats durch eine feine Kapillare gesprüht, unterstützt durch einen Stickstoffstrom, und auf diese Weise ein Aerosol erzeugt (102). Auf der Spraykapillare liegt eine Spannung von ca. 3 kV, wodurch eine elektrische Ladung auf die Tröpfchen des Aerosols übertragen wird (93). Um die Lösungsmittel des Eluats rasch zu verdampfen, wird ein sehr hoher Strom heißen Stickstoffs zugeleitet, wobei die hierbei entstehende Verdunstungskälte eine thermische Belastung des Analyten verhindert (93). Durch die Evaporation des Lösungsmittels nimmt der Durchmesser der Tröpfchen ab (102). Ab einer gewissen Größe übersteigt die elektrostatische Abstoßung in den Tröpfchen die



Oberflächenspannung, was zum Zerplatzen in immer kleinere Tröpfchengenerationen führt und als „Coulomb-Explosion“ bezeichnet wird (93). Schließlich wird elektrische Ladung auf einzelne Moleküle in den Tröpfchen übertragen, und es kommt zur „Ionen-Emission“ von Einzelionen aus den Tröpfchen auf Grund der gleichsinnigen Ladung. Die Ionisation erfolgt in einem Bereich von ca. 2 cm am Ende der Spraykapillare (93). Anschließend wird der Ionenstrom durch die Gegenspannung in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet.

Die Technik der Elektrospray-Ionisation wird als „weich“ bezeichnet, da die Analyte keiner thermischen Belastung ausgesetzt werden und nicht bereits bei der Ionisation zu Fragmentationen desintegriert werden, wie bei der EI-Ionisation der GC-MS. Somit stehen die intakten Molekülionen im Hochvakuum einer kontrollierten Fragmentation zur Verfügung (105).

Bei der LC-MS/MS wird ein Tandem-Massenspektrometer verwendet, was bedeutet, dass zwei Quadrupol-Massenfilter mit einer interponierten Kollisionszelle gekoppelt sind (93). Der Gesamtionenstrom, der durch die ESI erzeugt wurde, gelangt in das erste Quadrupol. Das hier angelegte Radiofrequenzmuster ist so geschaltet, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Ionen einer bestimmten Masse-Ladungs-Ratio passieren können, während andere Ionen abgelenkt werden (93). Auf diese Weise könne intakte Molekülionen eines Zielanalyten herausgefiltert werden, die auch als „Mutterion“ bezeichnet werden (93). Diese „Mutterionen“ werden in die nachgeschaltete Kollisionszelle geleitet, in die mit minimalem Fluss Argon einströmt, welches als Kollisionsgas fungiert. Durch die Kollision mit Argon-Molekülen zerfallen die „Mutterionen“ in mehrere, für die jeweilige Verbindung typische „Tochterionen“. Dieser Vorgang wird auch als „kollisionsinduzierte Desintegration“ bezeichnet (102). Der Fragmentationenstrom wird nun in den zweiten Quadrupol geleitet. Hier wird, wiederum anhand des Ratios, ein einzelnes, definiertes Fragmentation des Zielanalyten

herausgefiltert und erreicht schließlich den Ionendetektor (93). Auf dem Fragmentationsverhalten eines Stoffes beruhend ist auf diese Weise eine sehr spezifische Detektion möglich (105).

Bei der quantitativen Messung von Cortisol im Serum mittels LC-MS/MS wird die Stabilisotopen-Verdünnungstechnik verwendet. Den Patientenproben und der Kalibratorserie wird hierbei zur internen Standardisierung eine genau identische Menge des markierten Zielanalyten zugegeben. In diesen Molekülen sind mehrere Atome durch stabile, nicht radioaktive Atome ausgetauscht, weshalb sie eine jeweils um 1 höhere Atommasse aufweisen (93). Im Fall der Cortisolmessung wird der zu untersuchenden Probe beispielsweise eine definierte Menge von synthetisiertem Cortisol zugegeben, in dessen Molekülen mehrere Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt sind (105). Es kann somit von nativem Cortisol aus der Probe massenspektrometrisch, anhand des höheren Molekulargewichts, eindeutig unterschieden werden. Das physikochemische Verhalten des stabilisotopen-markierten Standards ist jedoch praktisch identisch mit dem natürlich vorkommenden Cortisol (93). Varianzen, beispielsweise in der Probenextraktion und Ionisation von Probe zu Probe, können so voll kompensiert werden und es kann ein Höchstmaß an analytischer Richtigkeit erreicht werden (93). Die Fragmentationen, die aus natürlichem Cortisol hervorgehen, bzw. die Fragmentationen, die aus synthetisiertem Cortisol hervorgehen, werden bei der Analyse in Sekundenbruchteilen alternierend detektiert (105). Aus den einzelnen Datenpunkten werden zwei zeitlich überlagerte chromatographische Peaks gebildet, deren Flächen bestimmt werden. Von der bekannten Konzentration des zugegebenen markierten Cortisols kann nun aus dem Peakflächen-Verhältnis auf die Konzentration des Cortisols in der Probe rück geschlossen werden (105).

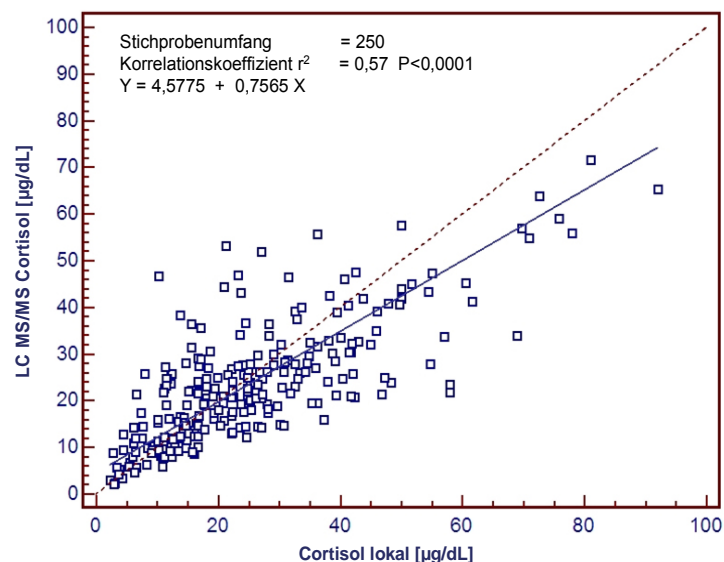
## 2.6 Statistik

Die Daten werden soweit nicht anders vermerkt als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Für Korrelationsbestimmungen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Die Regressionsgleichung wurde als Passing-Bablok Regression (Korrelation zweier Variablen) gerechnet. Als konkordant wurden Responder bzw. Non-Responder bezeichnet, die sowohl im lokalen als auch im zentralen Labor im ACTH-Test einen Cortisol-Anstieg von  $\leq 9\mu\text{g/dl}$  (Nonresponder) oder  $> 9\mu\text{g/dl}$  aufwiesen. Die Übereinstimmung der Methoden wurde darüber hinaus mit der Methode nach Bland und Altman dargestellt (14).

### 3. Ergebnisteil

Die nachfolgend aufgeführten Daten stammen aus einer Interim-Analyse, die als Teil der groß angelegten CORTICUS Studie durchgeführt wurde. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Doppelblindstudie noch nicht abgeschlossen, weshalb uns die biometrischen Daten der Patienten nicht vorliegen. Alle gewonnenen Messdaten stammen ausschließlich aus Seren von Patienten, die die Einschlusskriterien für die CORTICUS Studie erfüllt haben und sich somit zum Zeitpunkt der Probengewinnung in einem septischen Schock befanden.

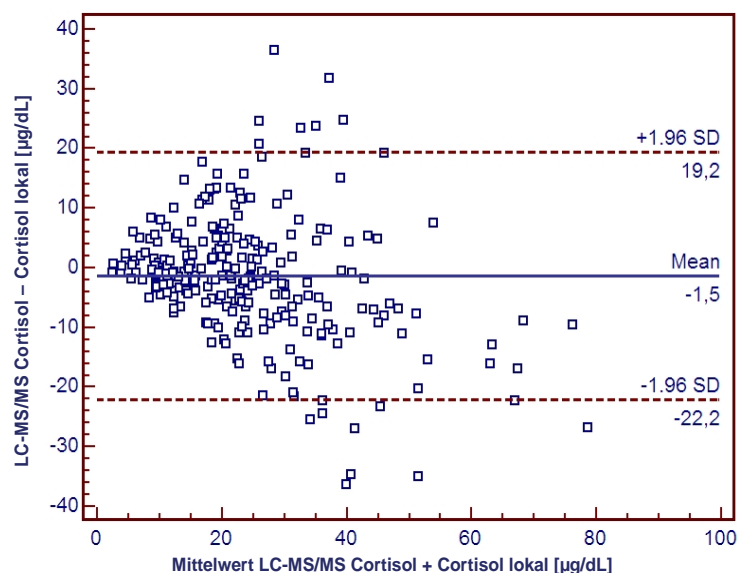
Zur Cortisolbestimmung in den Laboren vor Ort wurden Immunoassays unterschiedlicher Hersteller verwendet. Unabhängig von den verschiedenen Immunoassays wurde zunächst die Übereinstimmung der Messergebnisse für den Cortisolwert der Labore vor Ort mit denen unserer Referenzmethode (LC-MS/MS) verglichen. Hierzu wurden insgesamt 250 Proben analysiert.



**Abbildung 5.** Darstellung der Korrelation zwischen den in den Laboren vor Ort ermittelten Cortisolwerten (Cortisol lokal) und den mit der Referenzmethode ermittelten Werten (LC MS/MS Cortisol) mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=250;  $r^2=0,57$ ).

Abbildung 5 zeigt die Darstellung der Regressionsgeraden die sich ergibt, trägt man die in den Laboren vor Ort gemessenen Cortisolwerte über der x-Achse auf und die dazugehörigen, mit der Referenzmethode aus einem Aliquot der jeweiligen Probe ermittelten Werte, über der y-Achse. Mit unterbrochener Linie eingezeichnet verläuft die „Line of Equality“. Würden im Idealfall beide Messmethoden übereinstimmende Ergebnisse liefern, so lägen alle Punkte entlang dieser Linie. Betrachtet man die Regressionsgerade, die sich für die Wertepaare ergibt, so fällt auf, dass sie im Bereich niedriger Cortisolwerte noch nahe an der „Line of Equality“ verläuft. Im Bereich höhere Cortisolwerte weicht sie jedoch immer mehr von dieser ab. Der ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt  $r^2 = 0,57$ ,  $p < 0,0001$ . Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der beiden Messmethoden in einem erheblichen Maße differieren.

Zur weiteren Überprüfung der Übereinstimmung der beiden Messmethoden wurde eine Analyse nach Bland und Altman durchgeführt. In der nachfolgenden Abbildung wird die Streuung der Differenzen der einzelnen Messwertepaare deutlich.

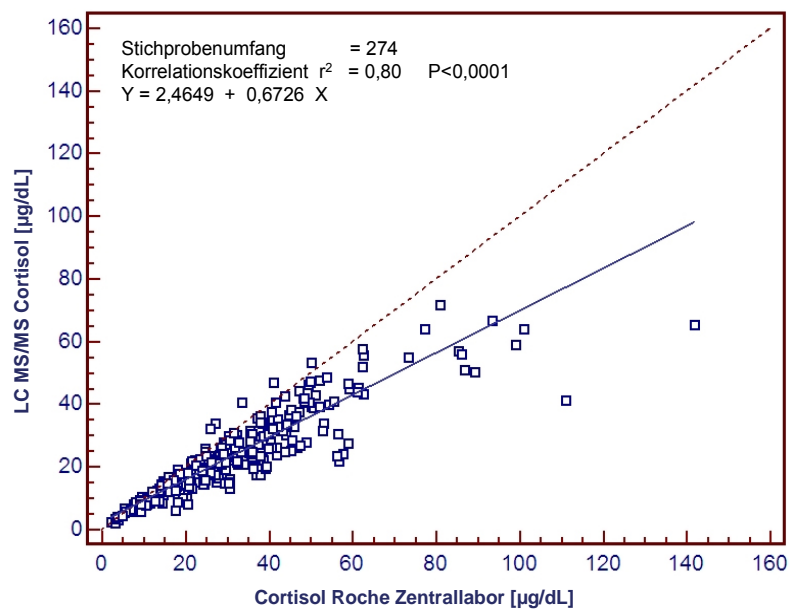


**Abbildung 6.** Darstellung nach Bland und Altman. Aufgetragen sind die Differenzen der Messergebnisse für Cortisol zwischen der Referenzmethode und den Laboren vor Ort gegen den jeweiligen Mittelwert beider Methoden.

In der Darstellung nach Bland und Altman (Abbildung 6) wird über der y-Achse die Differenz der Messergebnisse für den jeweiligen Cortisolwert zwischen den beide Messmethoden (LC-MS/MS – Cortisol lokal) gegen den Mittelwert beider Methoden (LC-MS/MS + Cortisol lokal /2) über der x-Achse aufgetragen. Des Weiteren wird der Mittelwert der Differenzen (Mean) bestimmt. Die ebenfalls eingezeichneten Übereinstimmungsgrenzen (Limits of Agreement) errechnen sich aus dem Mittelwert der Differenzen  $\pm 1,96$  Standardabweichungen. Geht man davon aus, dass die in der Abbildung dargestellten Differenzen zwischen den beiden Messmethoden annähernd einer Normalverteilung folgen, wäre zu erwarten, dass ca. 95% der Werte in diesem Bereich liegen.

Der Mittelwert der Differenzen betrug bei den Messungen  $-1,5\mu\text{g/dl}$ , die Standardabweichungen  $+1,96\text{ SD} = 19,2\mu\text{g/dl}$ ;  $-1,96\text{ SD} = -22,2\mu\text{g/dl}$ . Während sich die Differenzen der Messergebnisse in den unteren Bereichen noch nahe dem Mittelwert gruppieren, wird die Streuung immer größer, je höher die gemessenen Werte sind. 15 (6%) der ermittelten Werte liegen außerhalb des Bereichs von 2 Standardabweichungen. Fasst man das Ergebnis der beiden Abbildungen zusammen, so ergeben sich vor allem im Bereich höherer Cortisolwerte erhebliche Differenzen zwischen den Messergebnissen der Immunoassays und denen der Referenzmethode.

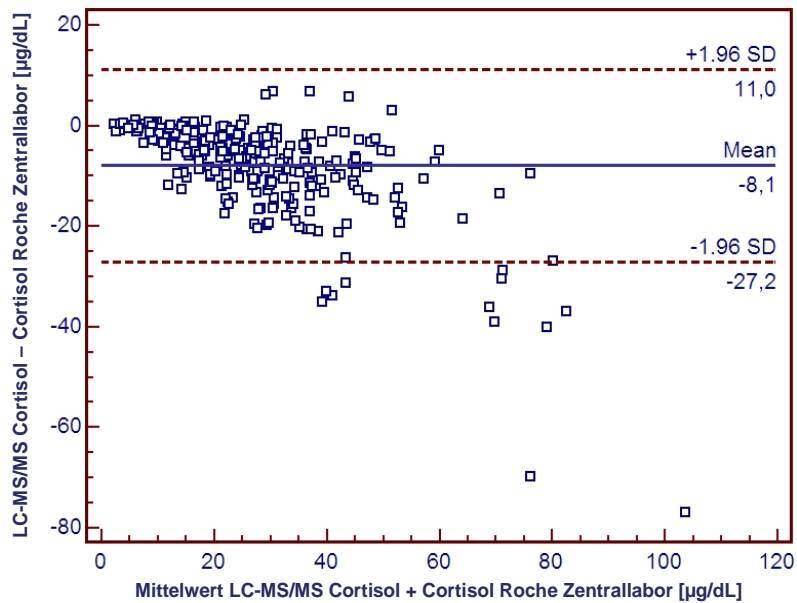
Die nächste Frage war, inwieweit die Ergebnisse der Referenzmethode mit denen des Immunoassays, der im Zentrallabor verwendet wird, übereinstimmen. Es handelt sich hierbei um den „Elecsys-Cortisol“ Immunoassay des Herstellers Roche Diagnostics. 274 Proben wurden untersucht:



**Abbildung 7.** Darstellung der Korrelation zwischen den Cortisolwerten, die im Zentrallabor mit dem Immunoassay von Roche ermittelt wurden und den mit der Referenzmethode ermittelten Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=274;  $r^2=0,80$ ).

Abbildung 7 zeigt auf der y-Achse dargestellt die Messergebnisse der Referenzmethode (LC-MS/MS) und auf der x-Achse dargestellt die zugehörigen Ergebnisse, die mit dem Immunoassay von Roche Diagnostics aus derselben Probe gemessen wurden.

Auch hier kann das gleiche Phänomen beobachten werden. Während die beiden Geraden im Bereich niedriger Cortisolwerte noch fast deckungsgleich verlaufen, kommt es bei höheren Cortisolwerten zu einer deutlichen Abweichung der Regressionsgeraden. Vergleicht man allerdings die Messergebnisse aller Immunoassays, die vor Ort verwendet wurden (Abbildung 5) mit denen des im Zentrallabor verwendeten Immunoassays von Roche, so stimmen diese durchschnittlich besser mit der Referenzmethode überein. Der Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall  $r^2 = 0,80$ ;  $p < 0,0001$ .

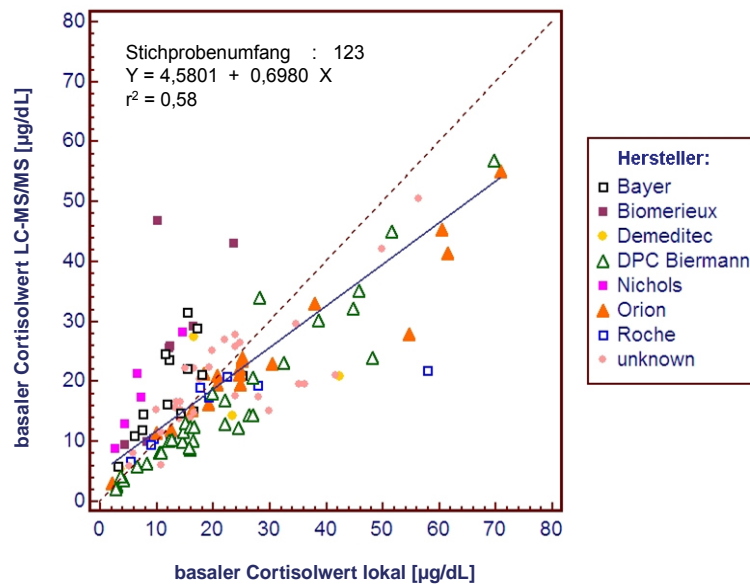


**Abbildung 8.** Darstellung nach Bland und Altman. Aufgetragen sind die Differenzen der Messergebnisse für Cortisol zwischen der Referenzmethode (LC-MS/MS Cortisol) und dem Immunoassay von Roche, der im Zentrallabor verwendet wurde (Cortisol Roche Zentrallabor), gegen den jeweiligen Mittelwert beider Methoden.

Abbildung 8 zeigt die Werte in der Darstellung nach Bland und Altman. Der Mittelwert der Differenzen (Mean) betrug  $-8,1 \mu\text{g/dl}$ . Während in Abbildung 6 die Werte in einem weiten positiven wie auch negativen Bereich um den Mittelwert der Differenzen streuen, ist deutlich zu erkennen, dass die Differenzen in Abbildung 8 zum größten Teil in den negativen Bereich abweichen. Sind die gemessenen Cortisolwerte niedrig, liegen die Differenzen sehr eng um den 0-Wert verteilt, d.h. dass der Immunoassay von Roche in diesem Bereich mit der Referenzmethode sehr gut übereinstimmt. Je höher der gemessene Cortisolwert, desto mehr beobachtet man Abweichungen der Differenzen in den negativen Bereich, was dafür spricht, dass der Immunoassay von Roche vor allem im Bereich höherer Cortisolwerte falsch hohe Messwerte liefert.

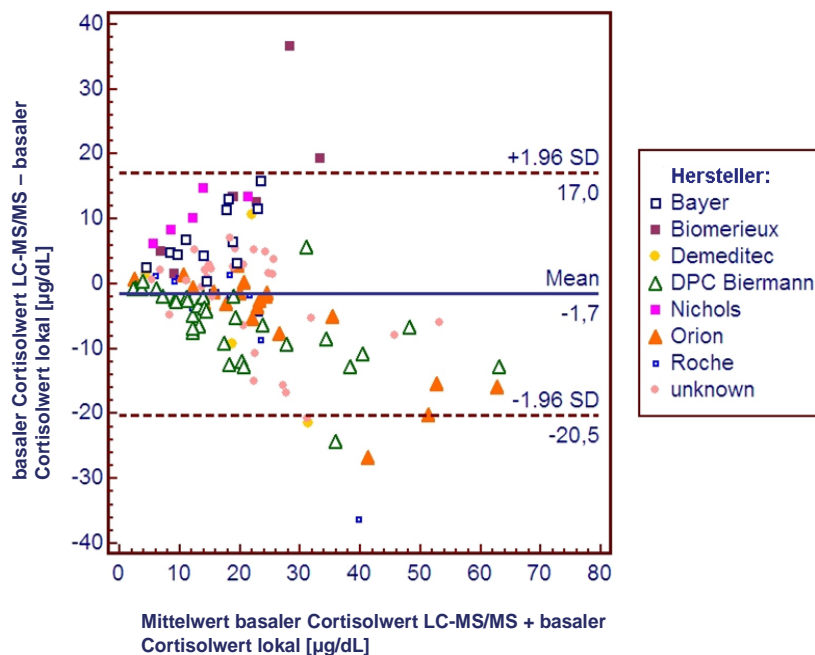


Da für die Therapieentscheidung mit Hydrocortison im septischen Schock das  $\Delta$  Cortisol (Cortisol-Spitzenwert – Cortisol basal) und die nachfolgende Klassifizierung der Patienten in Responder und Nonresponder eine entscheidende Rolle spielt, wurden in den nachfolgenden Abbildungen, zum Vergleich mit der Referenzmethode, einmal der basale Cortisolwert und einmal der Cortisol-Spitzenwert nach Stimulation mit ACTH herangezogen.



**Abbildung 9.** Darstellung der Korrelation zwischen den basalen Cortisolwerten, die mit Immunoassays verschiedener Hersteller gemessen wurden und den mit der Referenzmethode ermittelten Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=123;  $r^2=0,58$ ).

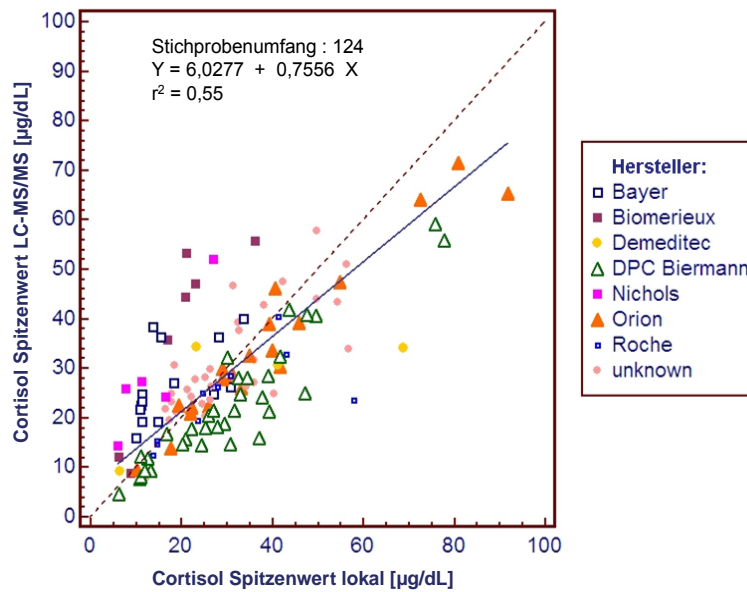
In Abbildung 9 sind zunächst die Wertepaare für das basale Cortisol, bestehend aus den Messergebnissen der verschiedenen Immunoassays in den Laboren vor Ort (x-Achse), sowie denen der Referenzmethode (y-Achse), dargestellt. 123 Proben wurden untersucht. Es erfolgte eine Auftrennung der unterschiedlichen Immunoassays anhand farbiger Symbole. Betrachtet man die Regressionsgerade ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 5. Der Korrelationskoeffizienten beträgt  $r^2 = 0,58$ .



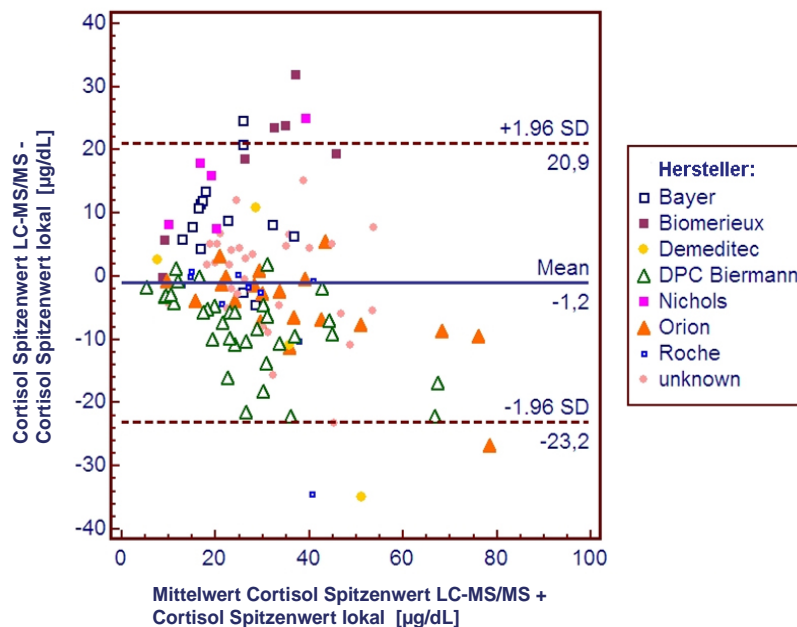
**Abbildung 10.** Darstellung nach Bland und Altman. Aufgetragen sind die Differenzen der Messergebnisse für den basalen Cortisolwert zwischen der Referenzmethode und den Immunoassays verschiedener Hersteller gegen den Mittelwert beider Methoden.

Abbildung 10 stellt wiederum die Streuung der Differenzen dar, deren Mittelwert  $-1,7\mu\text{g/dl}$  beträgt. Erwartungsgemäß ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 6. Diesmal ist anhand der Aufgliederung der Immunoassays, dargestellt durch farbige Symbole, jedoch sehr schön zu erkennen, in welche Richtung die Messergebnisse verschiedener Immunoassays von der Referenzmethode abweichen. Während beispielsweise die Immunoassays von DPC Biermann und Orion in bestimmten Bereichen falsch hohe Werte liefern, tendieren die Immunoassays von Nichols, Bayer und Biomerieux zu falsch niedrigen Werten. Die Gemeinsamkeit scheint trotz Auftrennung weiterhin darin zu bestehen, dass diese Messfehler größer werden, je höher die gemessenen Cortisolwerte sind.

In Abbildung 11 und 12 sind die Ergebnisse für den Cortisol Spitzenwert aus 124 Proben dargestellt.



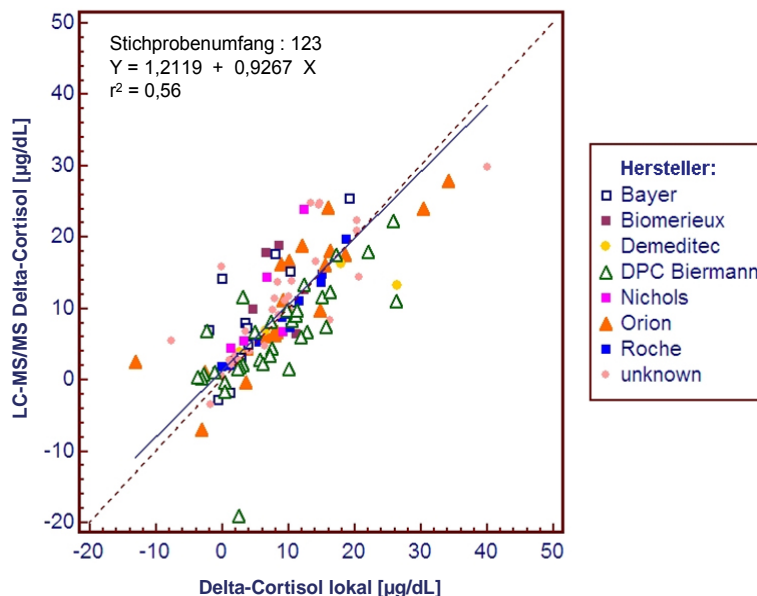
**Abbildung 11.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit Immunoassays verschiedener Hersteller ermittelten Cortisol Spitzenwerten LC und den mit der Referenzmethode ermittelten Cortisol Spitzenwerten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=124;  $r^2=0,55$ ).



**Abbildung 12.** Darstellung nach Bland und Altman. Aufgetragen sind die Differenzen der Messergebnisse für den Cortisol Spitzenwert zwischen der Referenzmethode und den Immunoassays verschiedener Hersteller gegen den jeweiligen Mittelwert beider Methoden.

Vergleicht man die Abbildungen 11 und 12 mit den Abbildungen 9 und 10 so lassen sich keine auffälligen Veränderungen erkennen. Die Immunoassays behalten die Tendenz ihrer Abweichung bei, und somit ergibt sich für den Cortisol-Spitzenwert ein sehr ähnliches Bild.

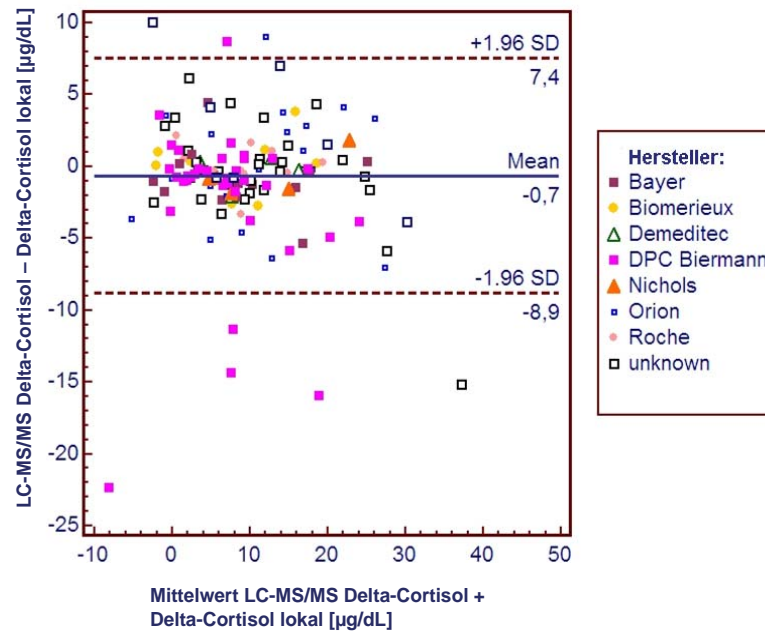
Interessant ist nun die Frage, wie es sich mit dem  $\Delta$  Cortisol verhält, der Wert, der letztendlich für die Therapieentscheidung ausschlaggebend ist. Für 123 Proben wurde das  $\Delta$  Cortisol der Labore vor Ort (x-Achse) mit dem  $\Delta$  Cortisol der Referenzmethode (y-Achse) verglichen.



**Abbildung 13.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit Immunoassays verschiedener Hersteller ermittelten  $\Delta$  Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode ermittelten  $\Delta$  Cortisolwerten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=123; r<sup>2</sup>=0,56).

Abbildung 13 zeigt eine Regressionsgerade, die sehr nah an der „Line of Equality“ zu verlaufen scheint. Trotzdem ergibt sich nur ein Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0,56$  und somit ist auch hier durchschnittlich von einer relativ großen Differenz zwischen  $\Delta$  Cortisol lokal und  $\Delta$  Cortisol zentral auszugehen.

Trägt man die Differenzen zwischen Delta Cortisol zentral (LC-MS/MS) und  $\Delta$  Cortisol lokal in Bezug auf den Mittelwert der Differenzen auf, ergibt sich folgendes Bild:



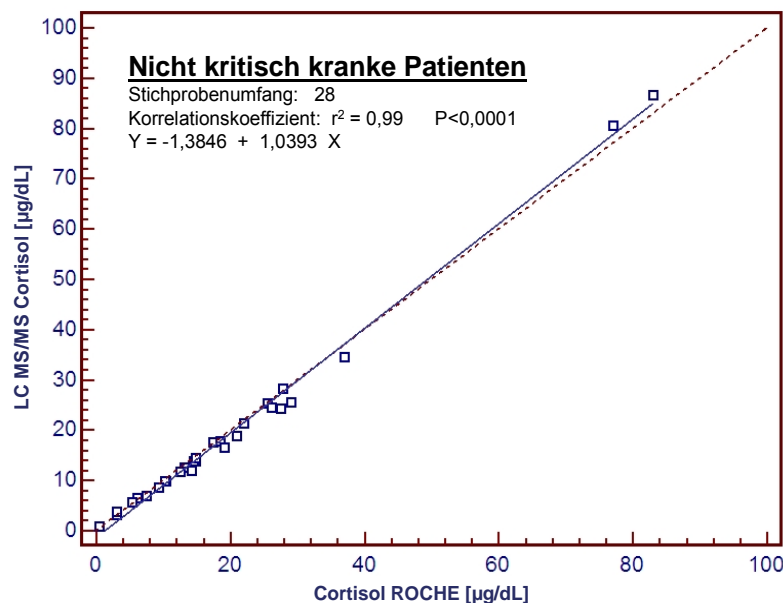
**Abbildung 14.** Darstellung nach Bland und Altman. Aufgetragen sind die Differenzen der Ergebnisse für  $\Delta$  Cortisol zwischen der Referenzmethode und den Immunoassays verschiedener Hersteller gegen den jeweiligen Mittelwert beider Methoden.

Auf den ersten Blick lässt sich anhand der farbigen Symbole erkennen, dass es Immunoassays gibt, deren Differenzen teilweise erheblich vom Mittelwert der Differenzen bzw. dem Nullwert abweichen, beispielsweise der Immunoassay von DPC Biermann. Andere, die nahe um den Mittelwert bzw. Nullwert verteilt liegen, scheine relativ gut mit dem  $\Delta$  Cortisol der Referenzmethode zu korrelieren (z. B. Demeditec, Biomerieux, Bayer). Trotzdem muss Folgendes beachtet werden.

Der Mittelwert der Differenzen beträgt  $-0,7\mu\text{g/dl}$ , die Standardabweichungen  $7,4\mu\text{g/dl}$  und  $-8,9\mu\text{g/dl}$ . Zwar liegen die meisten Werte innerhalb dieser Standardabweichungen, bedenkt man jedoch, dass der Grenzwert zwischen Respondern und Nonrespondern bei einem  $\Delta$

Cortisol von  $\leq 9\mu\text{g/dl}$  liegt, so können Abweichungen von bis zu  $+7,4\mu\text{g/dl}$  und  $-8,9\mu\text{g/dl}$  nicht akzeptiert werden.

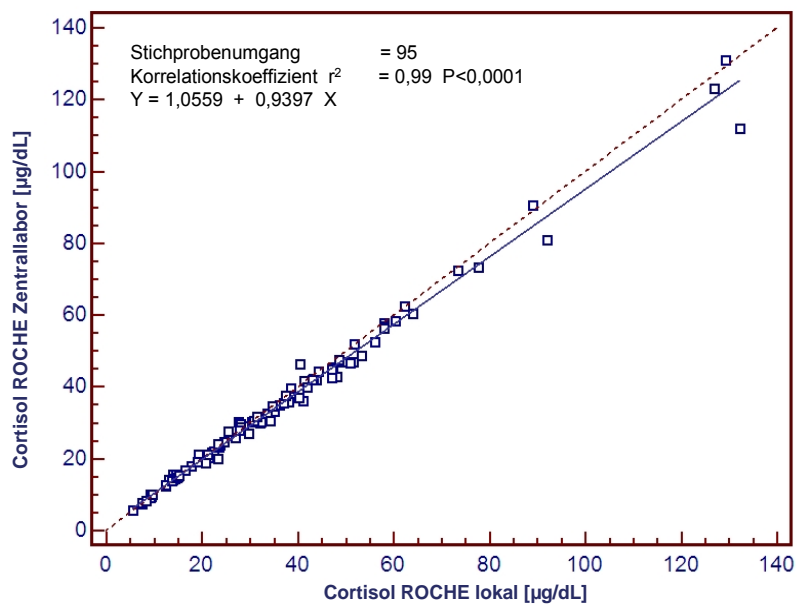
In einer Kontrolluntersuchung wurden die Cortisolwerte aus Serumproben eines Kollektivs von 28 nicht kritisch kranken Patienten aus der endokrinologischen Ambulanz des Klinikums Großhadern bestimmt. Es wurde eine Messung mit dem im Zentrallabor verwendeten „Elecsys Cortisol“ Immunoassay von Roche Diagnostics durchgeführt (x-Achse) und eine weitere Messung mit der Referenzmethode (LC-MS/MS) (y-Achse).



**Abbildung 15.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Roche ermittelten Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode ermittelten Werten bei einer Kontrollgruppe von nicht kritisch kranken Patienten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade ( $n=28$ ;  $r^2=0,99$ ).

Hier zeigt sich eine sehr hohe Korrelation der beiden Messmethoden mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,99$ ;  $p < 0,0001$ . Auch im Bereich hoher Cortisolwerte ist die Regressionsgerade fast deckungsgleich mit der „Line of Equality“. Im Serum von nicht

septischen Patienten liefert der Immunoassay von Roche somit sehr genaue Messergebnisse. Interessant ist auch der folgende Vergleich. Auf der y-Achse aufgetragen finden sich die Cortisolwerte, die im Zentrallabor mit dem Immunoassay von Roche Diagnostics gemessen wurden. Auf der x-Achse aufgetragen die Cortisolwerte aus den Laboren vor Ort, die ebenfalls den Immunoassay von Roche Diagnostics verwendeten.

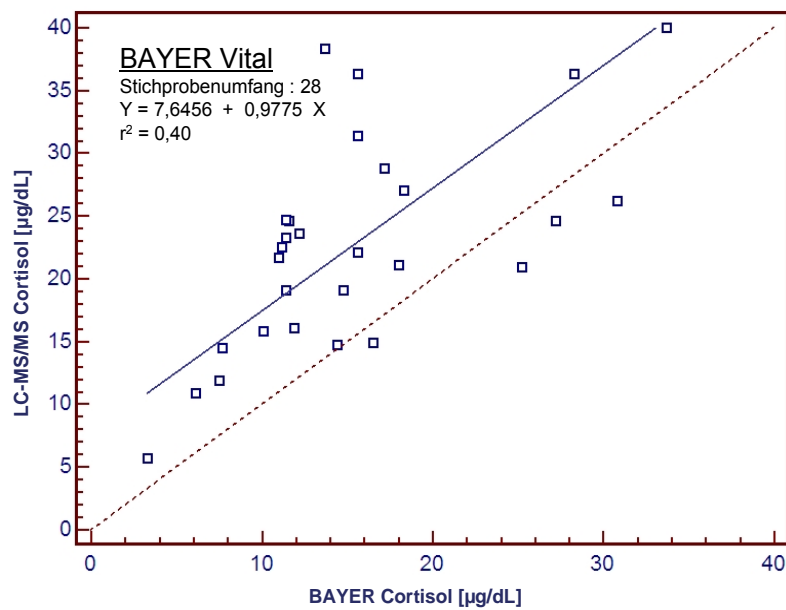


**Abbildung 16.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Roche in den Laboren vor Ort gemessenen Cortisolwerten und den mit dem Immunoassay von Roche im Zentrallabor gemessenen Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=95; r<sup>2</sup>=0,99).

Auch hier findet man eine sehr hohe Korrelation zwischen den Messwerten. Der Korrelationskoeffizient beträgt r<sup>2</sup> = 0,99; p < 0,0001. Somit ergibt sich für den Roche-Assay eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zwischen verschiedenen Laboren auch im Serum von Patienten mit septischem Schock.

Im Folgenden sind die Messergebnisse der gängigsten Immunoassays, die in europäischen Laboren Verwendung finden, noch einmal einzeln im Vergleich zur Referenzmethode dargestellt.

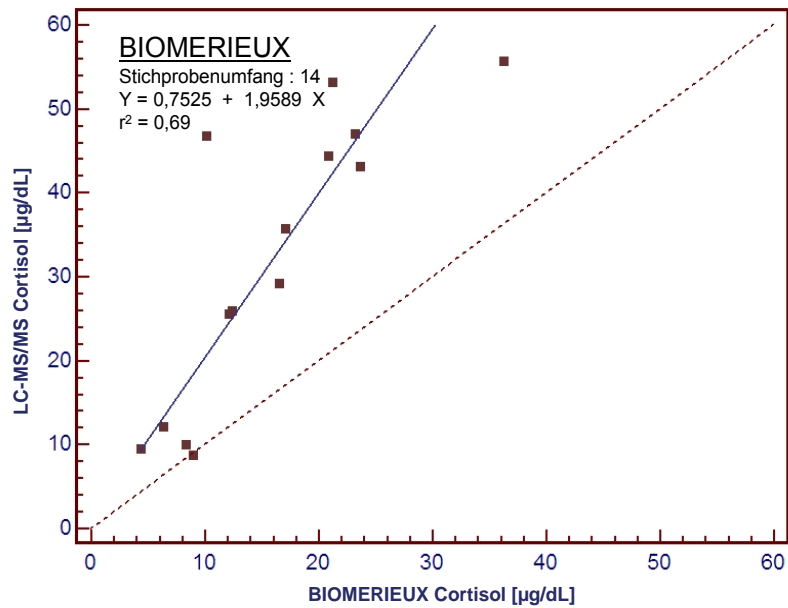
Abbildung 17 zeigt die Messergebnisse von 28 Proben, die mit dem Immunoassay von Bayer Vital ermittelt wurden.



**Abbildung 17.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Bayer Vital gemessenen Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode ermittelten Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=28;  $r^2=0,40$ ).

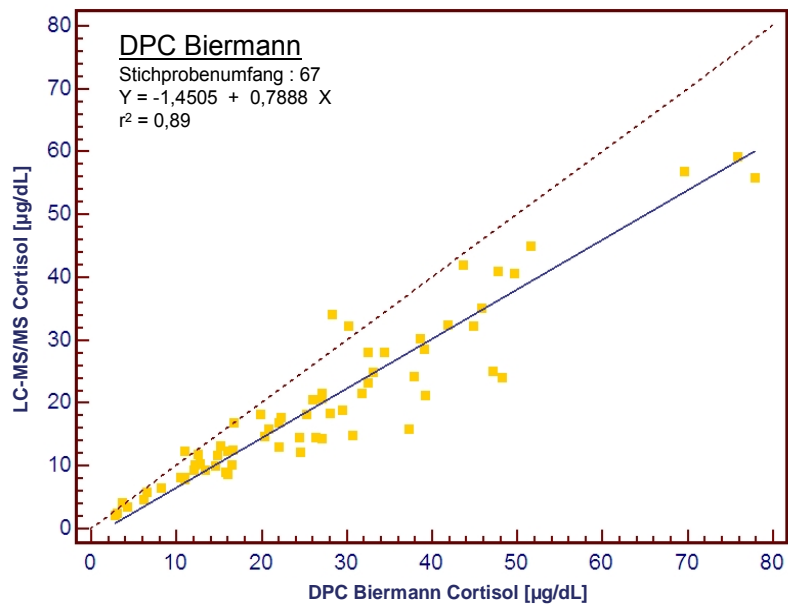
Die Regressionsgerade ist nach links verschoben. Der Immunoassay liefert fast über den gesamten Messbereich falsch niedrige Ergebnisse. Der Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,4$  zeigt, dass die gemessenen Werte stark von denen der Referenzmethode differieren.





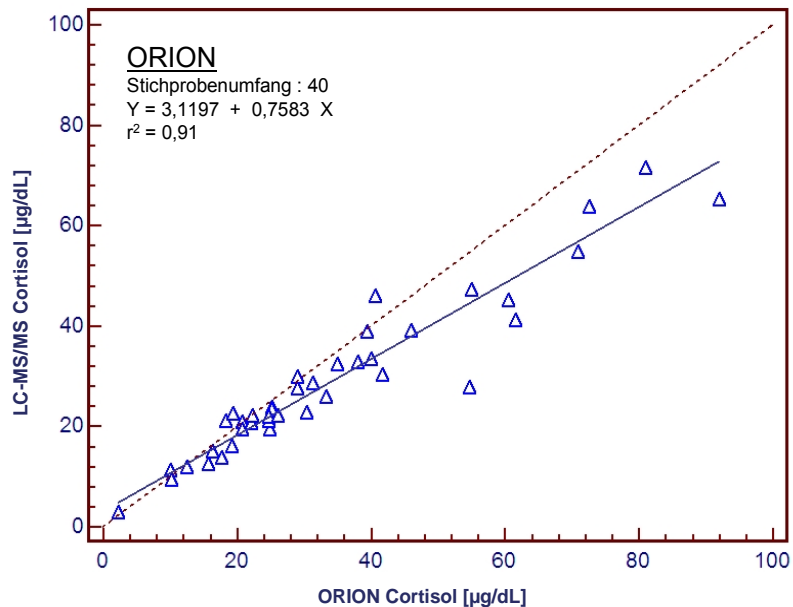
**Abbildung 18.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Biomerieux gemessenen Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode gemessenen Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=14;  $r^2=0,69$ ).

Auch beim Immunoassay von Biomerieux ist die Regressionsgerade nach links verschoben, weist aber eine größere Steigung auf. Dieser Test liefert ebenfalls falsch niedrige Ergebnisse, wobei der Messfehler im Bereich höhere Cortisolwerte zunimmt. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r^2 = 0,69$ .



**Abbildung 19.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von DPC Biermann gemessenen Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode gemessenen Werten.

( $n=67$ ;  $r^2=0,89$ )



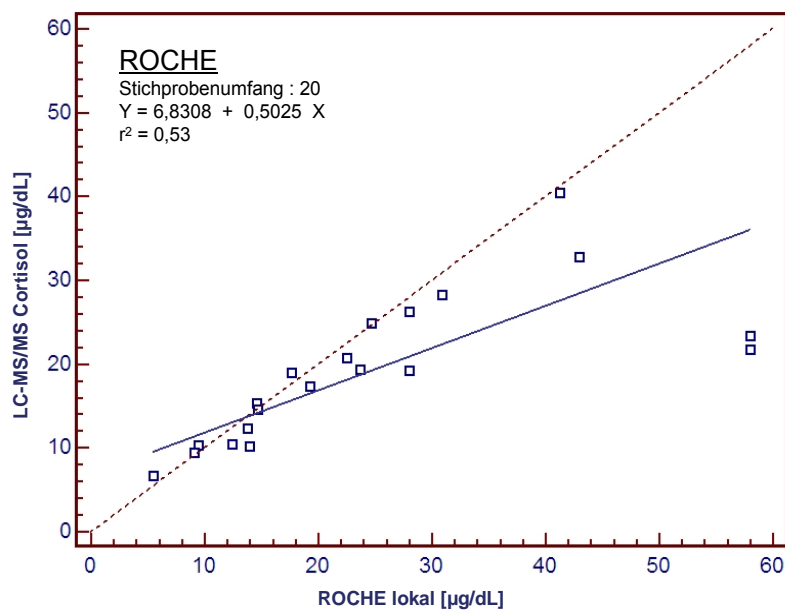
**Abbildung 20.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Orion gemessenen Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode gemessenen Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade

( $n=40$ ;  $r^2=0,91$ )

Abbildung 19 und 20 zeigen zwei Immunoassays, deren Messergebnisse relativ gut mit denen der Referenzmethode übereinstimmen. Für den Immunoassay von DPC Biermann errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0,89$ , für den Immunoassay von Orion  $r^2 = 0,91$ .

Bei beiden Immunoassays lässt sich wiederum beobachten, wie die Regressionsgeraden im Bereich niedriger Cortisolwerte noch sehr nahe an der „Line of Equality“ verlaufen und im Bereich höhere Cortisolwerte nach rechts abweichen. Es kommt zu falsch hohen Messergebnissen.

In Abbildung 21 ist der Vergleich mit dem Immunoassay von Roche Diagnostics dargestellt, der zuvor schon ausführlicher besprochen wurde.



**Abbildung 21.** Darstellung der Korrelation zwischen den mit dem Immunoassay von Roche lokal gemessenen Cortisolwerten und den mit der Referenzmethode gemessenen Werten mittels Streudiagramm und Regressionsgerade (n=20;  $r^2=0,53$ ).

Der größte Teil der Messwerte liegt sehr nahe um die „Line of Equality“ verteilt, was bedeutet, dass die meisten gemessenen Werte gut mit der Referenzmethode übereinstimmen.

Der berechnete Korrelationskoeffizient beträgt jedoch nur  $r^2 = 0,53$  und ist dadurch zu erklären, dass es im Bereich höhere Cortisolwerte zu erheblichen Ausreißern kommt und die Regressionsgerade dadurch stark abweicht.

Wie sah letztendlich die Einteilung der in dieser Studie untersuchten Patienten anhand des  $\Delta$  Cortisols in Cortisol Responder und Cortisol Non-Responder aus, und inwieweit lag hier eine Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Immunoassays und der Referenzmethode vor?

Abbildung 22 veranschaulicht die Ergebnisse in einer Vierfeldertafel.

Referenzmethode vs. Assays verschiedener Hersteller in den lokalen Laboren	Responder lokal	Nonresponder lokal	Total
LC-MS/MS Cortisol Responder	35%	10%	45%
LC-MS/MS Cortisol Non-Responder	9%	46%	55%
Total	44%	56%	100%

**Abbildung 22.** Vergleich der prozentualen Aufteilung der Patienten in Responder/Nonresponder zwischen der Referenzmethode und den verschiedenen Immunoassays der Labore vor Ort anhand einer Vierfeldertafel.

Betrachtet man zunächst die absoluten Prozentzahlen, so kommen beide Messmethoden zu einem ähnlichen Ergebnis. Der Referenzmethode (LC-MS/MS) zu folge handelt es sich bei 45% der Patienten um Cortisol Responder, bei 55% um Cortisol Non-Responder. Nach den

Messergebnissen der Immunoassays sind 44% der Patienten Cortisol Responder und 56% Non-Responder, also eine Abweichung von gerade mal 1%.

Die prozentuale Übereinstimmung zeigt jedoch, dass die beiden Messmethoden in 19% der Fälle zu einer unterschiedlichen Zuordnung und Klassifizierung der Patienten kommen. Somit wäre die Therapieentscheidung für oder gegen Hydrocortison bei fast jedem fünften Patienten anders ausgefallen

Referenzmethode vs. Roche Assay im Zentrallabor	Roche-Zentrallabor Responder	Roche-Zentrallabor Nonresponder	Total
LC-MS/MS Cortisol Responder	41%	3%	44%
LC-MS/MS Cortisol Non-Responder	10%	46%	56%
Total	51%	49%	100%

**Abbildung 23.** Vergleich der prozentualen Aufteilung der Patienten in Responder/Nonresponder zwischen der Referenzmethode und dem Immunoassay von Roche des Zentrallabors anhand einer Vierfeldertafel.

Abbildung 23 zeigt eine entsprechende Vierfeldertafel für den Vergleich der Einteilung in Responder und Non-Responder zwischen der Referenzmethode und dem Immunoassay von Roche, der im Zentrallabor verwendet wurde. Nach der Referenzmethode handelt es sich bei 44% der Patienten um Responder, bei 56% um Non-Responder. In 51% Responder und 49% Non-Responder teilen sich die Patienten nach den Messergebnissen des Immunoassays von Roche auf. In diesem Fall wäre man in 13% der Fälle zu einer anderen Klassifizierung gekommen und hätte somit eine andere Behandlung gewählt.

#### 4. Diskussion

Basierend auf der Erkenntnis, dass bei kritisch Kranken im septischen Schock häufig eine relative Nebennierenrindeninsuffizienz vorliegt (10, 65, 78), ist der Einsatz von Hydrocortison ein neuer und viel versprechender Behandlungsansatz des septischen Schocks. Eine Reihe von Studien konnten die Vorteile einer solchen Substitutionstherapie nachweisen (5, 16, 21, 26, 51). Gefürchtete Nebenwirkungen einer Cortisontherapie, wie das Auftreten nosokomialer Infektionen, gastroduodener Blutungen oder einer Hyperglykämie, konnten bei der Behandlung mit Stressdosen von Hydrocortison nicht vermehrt beobachtet werden (4). Der Nutzen und die Sicherheit einer Therapie mit Hydrocortison sind bislang jedoch nur für Patienten nachgewiesen, die im ACTH-Test einen Anstieg von Cortisol um weniger oder gleich  $9\mu\text{g/dl}$  aufwiesen (5). Deshalb kommt dem ACTH-Test eine essentielle Bedeutung bei der Indikation zur Therapie mit Hydrocortison zu.

In vielen Fällen kann über die Bestimmung von Hormonkonzentrationen im Serum der Funktionszustand des endokrinen Organs erfasst werden. So lässt sich beispielsweise über die Konzentrationsbestimmung der Hormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) eine klare Aussage über den Funktionszustand der Schilddrüse machen. Das Vorliegen einer Schilddrüsenüberfunktion bzw. -unterfunktion lässt sich somit schnell und einfach diagnostizieren (43). Anders verhält es sich bei der NNR-Funktion im Rahmen einer Sepsis. Diese zu beurteilen und die Diagnose einer relativen NNR-Insuffizienz zu stellen ist weitaus komplizierter. Das Problem hierbei ist die während einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks individuell erheblich variierende Cortisol Produktionsrate, sowie Plasmacortisolspiegel, die über weite Bereiche schwanken und sich innerhalb kurzer Zeit ändern können (24, 59, 80). Somit besitzen einzeln gemessene Cortisolwerte keine bzw. wenig Aussagekraft.

#### **4.1 Cortisol wird im Serum von septischen Patienten mit Hilfe von Immunoassays nicht richtig gemessen**

Eine Erklärung für die bekanntermaßen stark variierenden Messwerte für Cortisol im septischen Schock ergibt sich aus vorliegender Untersuchung. Es zeigte sich, dass der Cortisolwert in der Sepsis bzw. im septischen Schock mit Immunoassays nicht in jedem Fall richtig bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurden die Messergebnisse von gängigen, auf dem europäischen Markt erhältlichen Immunoassays, die in den verschiedenen Studienzentren verwendet wurden, mit denen der LC MS/MS, die als Referenzmethode diente und derzeit als Goldstandard zur Cortisolbestimmung im Serum gilt, verglichen (88, 103). Die so gewonnenen Wertepaare sind in Abbildung 5 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Messergebnisse der Immunoassays in weiten Bereichen erheblich von denen der Referenzmethode abweichen. Ein Korrelationskoeffizient von  $r^2 = 0,57$  zeigt, dass zwischen den beiden Messmethoden nur eine mäßige Übereinstimmung vorliegt.

Die erheblichen Differenzen zwischen den beiden Messmethoden werden in einer Darstellung nach Bland und Altman noch deutlicher (Abbildung 6). Für jeden gemessenen Cortisolwert ist die jeweilige Differenz, die sich zwischen Referenzmethode und Immunoassay ergibt, auf der y-Achse gegen den jeweiligen Mittelwert der beiden Messmethoden auf der x-Achse aufgetragen. Ebenfalls dargestellt sind der Mittelwert der Differenzen und die Streuung der Werte um diesen. Idealerweise sollten sich die eingetragenen Punkte möglichst nahe um die Nulllinie gruppieren, was bedeuten würde, dass es nur kleine Abweichungen zwischen den beiden Messmethoden gäbe.

In diesem Fall kam es zu einer großen Streuung der Werte um die Nulllinie. Die Spannweite der Übereinstimmungsgrenzen (Limits of Agreement), innerhalb derer erwartungsgemäß 95% der ermittelten Werte liegen, reicht von  $+19,2\mu\text{g/dl}$  bis  $-22,2\mu\text{g/dl}$ . Differenzen zwischen den beiden Messmethoden in dieser Größenordnung können nicht zulässig sein.

Auch unter Verwendung nur eines Immunoassays kam es zu starken Abweichungen der Messergebnisse für Cortisol. Aus 274 Proben wurde der Cortisolwert ausschließlich mit dem Immunoassay des Herstellers Roche ermittelt und mit der Referenzmethode verglichen. Dieser Immunoassay wird im Zentrallabor in München zur Cortisolbestimmung verwendet. Wie Abbildung 7 zeigt, lag die Korrelation der Wertepaare mit  $r^2=0,80$  über dem Durchschnitt der Gesamtheit der Immunoassays (Abbildung 5). Wiederum verdeutlicht die Darstellung nach Bland und Altman (Abbildung 8) jedoch, dass die Messwerte des Immunoassays im Mittel um  $8,1\mu\text{g/dl}$  über denen der Referenzmethode lagen und der Immunoassay von Roche vor allem im Bereich höherer Cortisolwerte falsch hohe Messwerte lieferte. Die Streuung der Differenzen im Bereich von zwei Standardabweichungen lag zwischen  $+11,0\mu\text{g/dl}$  und  $-27,2\mu\text{g/dl}$  und kann ebenfalls nicht akzeptiert werden. Hier zeigt sich, dass selbst ein Immunoassay, der als sehr zuverlässig gilt, im septischen Serum erhebliche Messfehler aufweist, die wohl überwiegend als systematischen Messfehler bezeichnet werden können. Man kann davon ausgehen, dass Cortisol im septischen Serum mit Immunoassays nicht richtig gemessen werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass speziell im septischen Serum Störfaktoren vorliegen, die mit der Methode der Immunoassays interferieren und dadurch Messfehler bedingen.

Immer wieder wurde probiert, einen Zusammenhang zwischen Cortisolwerten und Mortalität bei Patienten im septischen Schock herzustellen und die Fragestellung zu klären, ob der Cortisolwert eine Aussagekraft im Hinblick auf die Überlebenschancen von septischen Patienten besitzt. Zu dieser Thematik finden sich zahlreiche Studien, die jedoch teilweise zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich einer Korrelation zwischen Cortisolwert und Mortalität, sowie der Wertigkeit eines ACTH-Tests in diesem Zusammenhang kommen (24, 47, 49, 65, 78, 80, 81, 86).



Schon zuvor wurde in der Literatur darauf hingewiesen, dass die Messmethode zur Cortisolbestimmung Fehlerquellen birgt, und dass die Ergebnisse des ACTH-Tests bei septischen Patienten nicht reproduzierbar seien (23, 24, 32, 59). Die Messungen dieser Arbeit bestätigen diese Annahme. Betrachtet man die zum Teil erheblichen Messfehler der Immunoassays im septischen Serum, lassen sich gegensätzlichen Studienergebnissen und unterschiedliche Meinungen erklären.

In den Abbildungen 17-21 sind die Cortisolmesswerte von fünf gängigen Immunoassays, die in europäischen Laboren Verwendung finden, einzeln im Vergleich zur Referenzmethode aufgezeigt. Hierbei kann man bei den verschiedenen Immunoassays verschiedene systematische Fehler identifizieren. Die Immunoassays von Bayer (Abb. 17) und Biomerieux (Abb. 18) beispielsweise lieferten durchschnittlich im Vergleich zur Referenzmethode zu niedrige Werte, während die Immunoassays von DPC Biermann (Abb. 19), Orion (Abb. 20) und Roche (Abb. 21) dazu tendierten, falsch hohe Cortisolwerte zu messen. Die Messfehler nahmen im Bereich höherer Cortisolwerte zu. Die Spannweite der Streuung der Differenzen der Gesamtheit der Immunoassays (Abb. 6) lag zwischen  $+ 19,2\mu\text{g/dl}$  und  $-22,2 \mu\text{g/dl}$ . Verwendet eine Studie einen Immunoassay, der die Tendenz aufweist, zu hohe Werte für Cortisol zu messen, sind diese Ergebnisse nicht mit denen einer Studie vergleichbar, die beispielsweise einen Immunoassay verwendet, der zu niedrig misst. Theoretisch könnte in einem solchen Fall die Spanne zwischen den Ergebnissen bis zu  $40\mu\text{g/dl}$  betragen. Ergebnisse von Studien, die mit unterschiedlichen Immunoassays arbeiten, sind deshalb nicht miteinander vergleichbar.

## 4.2 Die Wertigkeit des ACTH-Tests im septischen Schock

Da einzelne Cortisolwerte in der Sepsis keine Aussagekraft besitzen und individuell über weite Bereiche schwanken können, ist man dazu übergegangen, die Nebennierenrinde mit einem ACTH-Analogon zu stimulieren, um anschließend über den Cortisolanstieg auf die Reservekapazität der Nebennierenrinde und damit ihren Funktionszustand schließen zu können. Dieser so genannte ACTH-Test wird von vielen Autoren als ein geeignetes diagnostisches Mittel gesehen, um bei Patienten im septischen Schock, nach Abschätzung der NNR-Funktion, über eine Therapieindikation mit Hydrocortison zu entscheiden (1, 5, 54, 78). Eine wichtige Studie in diesem Zusammenhang hat Annane im Jahr 2000 veröffentlicht (6). Bewertet wurde die prognostische Aussagekraft der NNR-Funktion und des ACTH-Tests für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten im septischen Schock. Man kam zu dem Ergebnis, dass sich der ACTH-Test gut dazu eigne, eine Gruppe von Patienten im septischen Schock herauszufiltern, die ein erhöhtes Mortalitätsrisiko aufweist. Anhand des Ergebnisses eines ACTH-Tests teilte Annane die Patienten in die Gruppen „Responder“ oder „Nonresponder“ ein. Bei letzteren ist die Reservekapazität der NNR nicht ausreichend, weshalb diese Patienten aller Wahrscheinlichkeit nach von einer Substitutionstherapie mit Hydrocortison profitieren. Als Grenzwert zwischen „Respondern“ und „Nonrespondern“ wurde als bester Wert ein Cortisolanstieg nach Stimulation von mehr als  $9\mu\text{g/dl}$  ermittelt ( $\Delta$  Cortisol). Dieser Schwellenwert wurde in einer ROC-Analyse ermittelt, wobei eine Spezifität von 0,649 und eine Sensitivität von 0,679 berechnet wurden. Der von Annane vorgeschlagene Grenzwert von  $9\mu\text{g/dl}$  hat sich weitestgehend durchgesetzt und wird in den meisten Fällen herangezogen, um über eine Therapie mit Hydrocortison zu entscheiden.

Man muss hierbei bedenken, dass Annane in seiner Studie einen einzigen ACTH-Test verwendet hat und alle Proben im selben Labor gemessen wurden. Um den von ihm ermittelten Grenzwert generell und als sinnvolle Hilfe zur Unterstützung bei der Entscheidung über den Einsatz von Hydrocortison nutzen zu können, müsste gewährleistet sein, dass die

vielen Immunoassays verschiedener Hersteller, die in den Laboren verwendet werden, vergleichbare, reproduzierbare und richtige Ergebnisse liefern.

Die Abbildungen 9-14 zeigen die Messergebnisse von Immunoassays verschiedener Hersteller, jeweils im Vergleich zu den Messergebnissen der Referenzmethode. Die Immunoassays sind anhand farbiger Symbole aufgeschlüsselt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen den Vergleich für die basalen Cortisolwerte, Abbildung 11 und 12 den Vergleich für die Cortisolspitzenwerte.

In den Darstellungen nach Bland und Altman (Abbildung 10 + 12) ist gut zu erkennen, dass die Immunoassays verschiedener Hersteller gewisse Tendenzen in Bezug auf ihre Messfehler aufweisen. Die Assays von Nichols, Biomerieux und Bayer haben in den Messungen tendenziell zu niedrige Cortisolwerte geliefert, während die Assays von DPC Biermann und Orion die Tendenz aufwiesen, zu hohe Cortisolwerte zu messen. Dadurch ergeben sich erhebliche Spannweiten der Messwerte und die Ergebnisse der Immunoassays lassen sich nicht mehr miteinander vergleichen. Da die Messfehler nicht über den gesamten Bereich konstant sind, kann man nicht davon ausgehen, dass sich der Fehler bei der Berechnung des  $\Delta$  Cortisols aufhebt.

Wie die Abbildungen 13 und 14 verdeutlichen, übertragen sich die Abweichungen auch auf das  $\Delta$  Cortisol. Eine Korrelation von  $r^2=0,56$  für  $\Delta$  Cortisol zwischen den Immunoassays und der Referenzmethode zeigt, dass die Ergebnisse der beiden Methoden nicht gut übereinstimmen (Abbildung 13). Der Bereich von  $\pm 1,96$  Standardabweichungen umfasste eine Spannweite von  $+ 7,4\mu\text{g/dl}$  bis  $- 8,9\mu\text{g/dl}$  (Abbildung 14). Bei einem Grenzwert von  $\Delta_{\text{max}} \leq 9 \mu\text{g/dl}$  kann es bei solchen Abweichungen sehr leicht zu einer Fehlentscheidung bei der Zuordnung der Patienten zur Gruppe der „Responder“ bzw. „Nonresponder“ kommen. Die möglichen Folgen sind aus Abbildung 22 ersichtlich, die die Ergebnisse in einer Vierfeldertafel zusammenfasst.

Anhand der Messergebnisse der Referenzmethode für  $\Delta_{\max}$  wäre man in 19% der Fälle zu einer anderen Klassifikation der Patienten in die Kategorien Responder/Nonresponder gekommen, als dies anhand der Messergebnisse der Immunoassays geschehen wäre. Demnach wäre fast jedem fünften Patienten eine falsche Therapie zuteil geworden. Selbst wenn alle Proben mit dem Immunoassay eines Herstellers (Roche) gemessen werden, kommt man immer noch in 13% der Fälle zu einer abweichenden Einteilung im Vergleich zur Referenzmethode (Abbildung 23). Auf diese Weise kann Patienten eine sinnvolle Therapie vorenthalten werden, und andere wiederum können unnötigerweise den Risiken einer Cortisontherapie ausgesetzt werden.

Die Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Untersuchung ist, dass der ACTH-Test im septischen Schock keine genauen und vergleichbaren Ergebnisse liefert. Deshalb ist der ACTH-Test während eines septischen Schocks nicht geeignet, um zwischen Patienten mit und ohne relative NNR-Insuffizienz zu unterscheiden. Er stellt somit auch nicht die geeignete Methode dar, um über eine Therapieindikation mit Hydrocortison zu entscheiden.

#### **4.3 Mögliche Ursachen für Messstörungen**

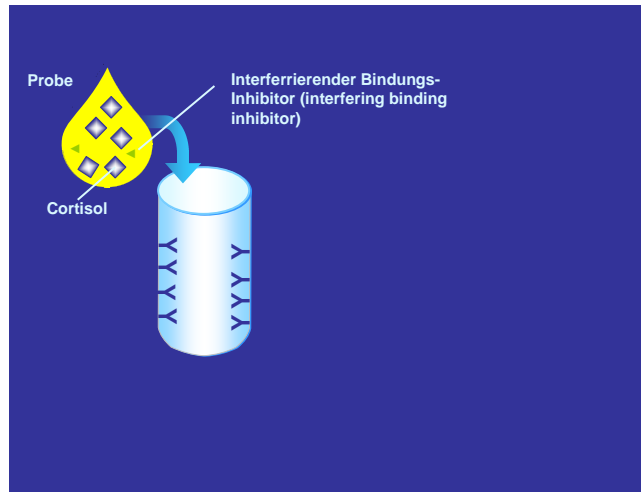
Allen Arten von Immunoassays ist gemeinsam, dass der Nachweis des Analyten durch Störeffekte beeinflusst werden kann. Sehr häufige Effekte sind Kreuzreaktivitäten, unspezifische Bindungen, Matrixeffekte und direkte Interaktionen des Analyten, des Fänger- oder Detektorantikörpers mit Störsubstanzen, die in mehr oder weniger großen Konzentrationen in Proben vorkommen können (75). Beispiele hierfür sind heterophile Antikörper, HAMAs (human antimouse antibodies) oder störende Substanzen wie Rheumafaktoren, Bilirubin und Triglyceride (75). Auch können die zur Markierung eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme zu unerwünschten Interaktionen mit Proteinen

der Probe oder mit Fängerantikörpern führen (75). Letztlich führt die Immobilisierung von Antikörpern auf Oberflächen (Fängerantikörper) zu einer strukturellen Veränderung, die im ungünstigsten Fall die Spezifität des Antikörpers verändert (75). Durch Kenntnis der genannten Störeffekte können die Hersteller von Immunoassays geeignete Gegenmaßnahmen ergreifen. Durch verschiedene Zusätze in den Tests lassen sich so in der Regel die Störeffekte vermeiden, oder können soweit wie möglich minimiert werden, sodass mit Immunoassays im Vergleich zu Referenzmethoden sehr genaue Messergebnisse erzielt werden können.

Die Frage, was die möglichen Ursachen für die Messstörungen in dieser Studie sein könnten, bleibt offen. Die ursprüngliche Entwicklung des ACTH-Tests erfolgte an gesunden Probanden (58, 109). Die Messungen an einer Kontrollgruppe gesunder, nicht septischer Patienten bestätigten, dass ein Immunoassay im nicht-septischen Serum sehr genaue Messergebnisse liefert (Abbildung 15). Auch bei dem Vergleich der Messergebnisse des im Zentrallabor in München verwendeten Immunoassays von Roche mit den Messergebnissen der Labore vor Ort, die ebenfalls den Immunoassay des selben Herstellers verwendeten, ergab sich eine sehr hohe Korrelation der Werte (Abbildung 16). Dies zeigt, dass ein systematischer Fehler vorliegen muss. Zudem konnten Fehler bei der Probengewinnung und Durchführung des ACTH-Tests weitestgehend ausgeschlossen werden.

Am wahrscheinlichsten ist die Ursache für die Messfehler im septischen Serum zu finden. Alle Cortisolmessungen der unterschiedlichen Hersteller basieren auf dem Prinzip des kompetitiven Immunoassays. Das in der Patientenprobe enthaltene Cortisol bindet an eine definierte Menge festphasengebundener Anti-Cortisol-Antikörper. Zugegebenes, mit einem Tracer markiertes Cortisol besetzt die noch freien Bindungsstellen. Je nach Art der Markierung kann anschließend aufgrund der gemessenen Lumineszenz, Radioaktivität usw. auf den Cortisolgehalt der Patientenprobe rück geschlossen werden. Auf jeder Ebene dieses Messvorgangs könnten Fehlerquellen liegen. Denkbar wäre, dass im septischen Serum

interferierende Bindungsinhibitoren vorliegen, die als Störfaktoren Messfehler bedingen. Erläutert werden soll diese Annahme in den folgenden Abbildungen anhand des häufig bei Immunoassays verwendeten Chemilumineszenzverfahrens:



**Abbildung 24a.** Die Patientenprobe wird in ein Röhrchen gegeben, an dessen Wand sich fest gebundene Anti-Cortisol-Antikörper befinden. Im septischen Serum befinden sich neben Cortisol noch andere Substanzen, die die Bindung von Cortisol an die Antikörper stören können (Interfering Binding Inhibitors).



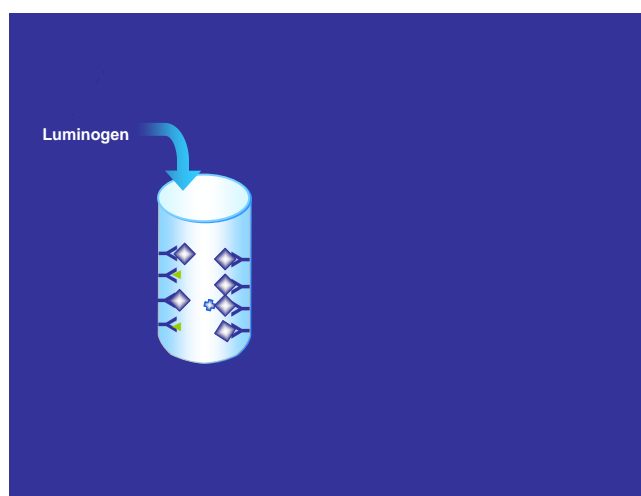
**Abbildung 24b.** Ein gewisser Teil der Antikörperbindungsstellen wird von diesen „Nicht-Cortisol-Molekülen“ besetzt.



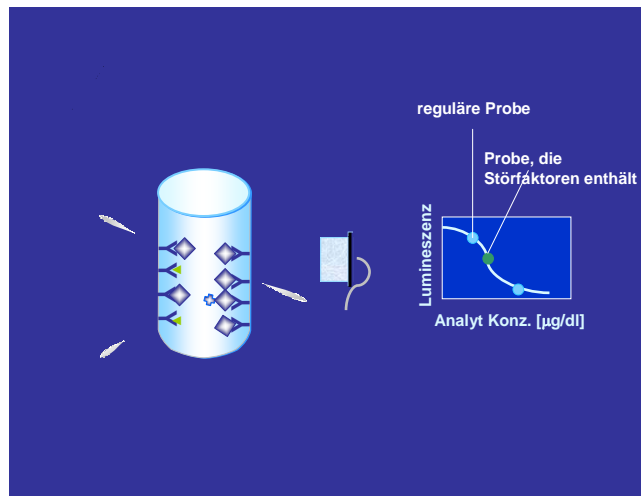
**Abbildung 24c.** Markiertes Cortisol (Tracer) wird hinzugegeben.



**Abbildung 24d.** Es stehen weniger freie Bindungsstellen zur Verfügung, an die das markierte Cortisol binden kann.



**Abbildung 24e.** Luminogen wird hinzugegeben.



**Abbildung 24f.** Nach Zugabe von Luminogen ist die Lumineszenzreaktion vermindert.

Die Kalibrationskurve zeigt, dass für diese Probe, die Störfaktoren enthält, mit einem geringeren Lichtsignal, eine anscheinend höhere Cortisolkonzentration vom analytischen System detektiert wird.

Dies wäre eine mögliche Erklärung für falsch hohe Cortisolmesswerte.

Als mögliche Störfaktoren kommen in erster Linie andere Steroide in Betracht. Synthetische Steroide, wie beispielsweise Prednisolon, können eine Interferenz bedingen und die Messungen stören (92). Da eines der Ausschlusskriterien aus der CORTICUS Studie die Verwendung von synthetischen Steroiden war, ist dies jedoch in diesem Fall als Ursache auszuschließen. Man weiß das Synacthen neben Cortisol auch andere körpereigene Steroide freisetzen kann, wie beispielsweise 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, 17- $\alpha$ -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosterone, Androstenedion, Androstendiol und Aldosteron (28). Diese könnten mit der Antikörperbindung von Cortisol interferieren und Kreuzreaktivitäten bedingen. Hiermit ist das Unvermögen eines Antikörpers gemeint, fehlerfrei zwischen Analyten und einem Molekül mit ähnlichen Epitopen zu unterscheiden. Kreuzreaktivitäten kommen bei allen Immunoassays vor, wobei Sandwich Assays weniger betroffen sind, da die Epitope für beide Antikörper auf einem Liganden sein müssen und somit die Möglichkeit vermindert ist. Bei den Steroidhormonen handelt es sich um kleine Moleküle, bei denen aufgrund sterischer



Behinderung die Bindung von zwei Antikörpern, wie es beim Sandwich Assay erforderlich ist, nicht erfolgen kann. Sie werden deshalb mit kompetitiven Assays bestimmt, bei denen häufiger Kreuzreaktivitäten auftreten können (92).

In einer Studie von Clark et al., die sich mit der Definition der normalen Antwort auf einen ACTH-Test befasste, wurde bei 100 gesunden Probanden ein ACTH-Test durchgeführt und anschließend die Ergebnisse mit vier verschiedenen Immunoassays bestimmt. Es ergaben sich hierbei erhebliche Differenzen der Messergebnisse für Cortisol zwischen den verschiedenen Immunoassays, insbesondere bei den stimulierten Werten. Es wurde spekuliert, dass diese Differenzen durch Kreuzreaktivitäten mit anderen Steroiden, die ebenfalls durch Synacthen freigesetzt werden, bedingt sein könnten. Je nach Spezifität der in den verschiedenen Assays verwendeten Antikörper, könnten diese Kreuzreaktivitäten dann in unterschiedlichem Ausmaß zum Cortisolergebnis beitragen. Außerdem wurden signifikante, geschlechtsspezifische Unterschiede in der Antwort auf das ACTH-Analogon festgestellt und angedacht, dass die NNR bei Frauen eventuell sensibler auf das ACTH-Analogon reagiert und somit mehr andere Steroide freigesetzt werden könnten, die eine Kreuzreaktivität bedingen (28).

In der Studie von Clark et al. wurden gesunde Probanden untersucht. Es wäre jedoch denkbar, dass die Sensibilität der NNR bei Patienten mit Sepsis bzw. im septischen Schock gegenüber dem ACTH-Analogon individuell sehr unterschiedlich ist. Genauso wie die Cortisolwerte über weite Bereiche schwanken, könnte auch die Freisetzung von anderen Steroiden, die die Messung stören können, individuell sehr unterschiedlich ausfallen. Bei den Messungen dieser Studie wurden sowohl bei den basalen, wie auch den stimulierten Cortisolwerten starke Abweichungen der Messwerte beobachtet, was gegen diese Theorie spricht. Ebenfalls dagegen spricht die Tatsache, dass es im Rahmen einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks zu einem Shift in der Steroidsynthese kommt, mit verminderter Androgen- und

Mineralcorticoidsynthese hin zu einer stark gesteigerten Cortisolsynthese (10, 11). Die Möglichkeit, dass andere körpereigene Steroide als Störfaktoren in Betracht kommen und in diesem Ausmaß Differenzen bei den Messergebnissen bedingen, erscheint somit eher unwahrscheinlich.

Das Bindungsverhalten der Anti-Cortisol-Antikörper ist eine weitere Ebene, auf der es zu Störungen der Messungen kommen könnte. Es wäre denkbar, dass das septische Serum eine sterische Veränderung der Antikörperbindungsstellen hervorruft. Eine dadurch bedingte Veränderung der Affinität der Antikörper, die zu einer verminderten Bindung von Cortisol führt, wäre eine Erklärungsmöglichkeit für falsch niedrige Cortisolmesswerte.

Im Falle des Chemilumineszenz-Immunoassays würde eine verminderte Bindung von Cortisol an die Antikörper zu mehr freien Bindungsstellen führen, die durch markiertes Cortisol besetzt werden können und somit zu einem stärkeren Lichtsignal führen. Das wiederum ergäbe auf der Kalibrationskurve einen falsch niedrigen Cortisolwert.

Im Zusammenhang mit dem Bindungsverhalten von Cortisol ist auch ein abweichendes Bindungsverhalten von gebundenem und freiem Cortisol in Erwägung zu ziehen. Während einer Sepsis fällt im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion das CBG ab, und der Anteil an freiem Cortisol erhöht sich (12, 45, 57, 74). Da der Patientenprobe vor der Messung jedoch ein „Releasing Reagent“ zugesetzt wird, dass Cortisol aus der Bindung mit CBG spaltet, kommt diese Möglichkeit hier nicht in Betracht.

Um den Anteil des mit Tracern markierten Cortisols zu messen sind häufig Enzymreaktionen notwendig. Bei Immunoassays mit enzymmarkiertem Label werden Enzyme wie die alkalische Phosphatase, die Meerrettichperoxidase oder die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzt. Sie wandeln ein spezifisches Substrat in ein Endprodukt um, das dann gemessen werden kann (92).

Bei den Chemilumineszenz-Immunoassays werden zur Markierung Substanzen verwendet, die durch chemische Oxidation Licht abgeben. Um die Chemilumineszenzreaktion zu starten sind Katalysatoren notwendig, wie beispielsweise Meerrettichperoxidase oder Wasserstoffperoxid. Diese Enzymreaktionen könnten durch das septische Serum gestört werden und auf dieser Ebene Messfehlern bedingen.

Offen bleiben die Fragen, warum die Messfehler im Bereich höherer Cortisolwerte stärker ausgeprägt sind und warum die Immunoassays verschiedener Hersteller unterschiedliche Tendenzen der Messfehler aufweisen. Es wäre anzunehmen, dass sich Störfaktoren im septischen Serum auf alle Immunoassays in gleicher Weise auswirken.

Hier könnten eventuell die verschiedenen Anti-Cortisol-Antikörper, die von den Herstellern verwendet werden und sich somit auch in ihrem Bindungsverhalten und ihrer Spezifität unterscheiden, in Erwägung gezogen werden.

Die genannten Möglichkeiten für Störungen der Cortisolmessung mit Hilfe von Immunoassays im septischen Serum sind reine Spekulationen. Um die wahren Ursachen zu ermitteln und Antworten auf die offenen Fragen zu finden, wäre ein experimenteller Ansatz notwendig, der mögliche Störeinflüsse auf den verschiedenen Ebenen der Messung simuliert.

## 5. Zusammenfassung

In der Literatur finden sich immer wieder Studien, die die Wertigkeit des ACTH-Tests zur Überprüfung der NNR-Funktion bei Patienten mit Sepsis bzw. einem septischen Schock anzweifeln. Die wichtigsten Kritikpunkte sind das Fehlen von exakten, einheitlich anerkannten diagnostischen Kriterien für das Vorliegen einer relativen NNR-Insuffizienz (59, 71, 94), ein mangelnder Konsens darüber, wie die Ergebnisse des ACTH-Tests zu interpretieren sind (10, 25, 59, 71, 110) und in diesem Zusammenhang zahlreiche, unterschiedliche Angaben zu Schwellenwerten (83, 110), sowie eine unzureichende Reproduzierbarkeit der Testergebnisse bei Patienten im septischen Schock (23, 59).

Einige Studien haben bereits darauf hingewiesen, dass die Messmethode ein Grund für unterschiedliche ACTH-Testergebnisse sein könnte (28, 32, 96). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Annahmen. Zu den oben genannten Kritikpunkten lässt sich hinzufügen, dass Cortisol im Serum von Patienten im septischen Schock mit Immunoassays nicht richtig gemessen werden kann. Die Messergebnisse von Immunoassays verschiedener Hersteller sind nicht miteinander vergleichbar und somit auch nicht die Ergebnisse von Studien, die mit unterschiedlichen Immunoassays arbeiten. Der ACTH-Test eignet sich nicht, um zuverlässige Aussagen über den Funktionszustand der NNR bei Patienten im septischen Schock zu machen, und er ist somit auch nicht die geeignete Methode, um über den Einsatz von Hydrocortison zu entscheiden.

Ursachen für die Messfehler der Immunoassays, die bei den Messungen im Serum von nicht septischen Patienten sehr genaue Messwerte für Cortisol im Vergleich zur Referenzmethode lieferten, sind möglicherweise Störfaktoren, die speziell im septischen Serum vorkommen. Um was es sich bei diesen Störfaktoren handelt ist unklar. Zur genauen Klärung der

Ursachen, die die Messungenauigkeiten bedingen und der Frage, warum sie die Immunoassays verschiedener Hersteller in unterschiedlichem Ausmaß betreffen, sind weitere Studien notwendig.

Vielfach wurde darauf hingewiesen, dass die Bestimmung des freien Cortisols mehr Aussagekraft besitze und ein besserer Marker sei, um Aussagen über den Funktionszustand der NNR zu machen (33, 45, 57). Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die Berechnungen des freien Cortisols mit Hilfe der Formel nach Coolens et al. und die Berechnung des Freien Cortisol Index ( $FCI = \text{totales Cortisol} / \text{CBG}$ ) ebenfalls auf den Messungen mit Hilfe von Immunoassays beruhen (29, 57, 104).

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allary J, Annane D. Glucocorticoids and sepsis. *Minerva Anesthesiol* 2005; 71:759-768.
2. Annane D. Glucocorticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:449-453.
3. Annane D, Bellissant E. The hypothalamo-pituitary axis in septic shock. *Br J Intens Care* 1996; 6:260-268.
4. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BJM* 2004; 329:480.
5. Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low dose of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002; 288:862-871.
6. Annane D, Sebille V, Troche G, et al: A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA* 2000; 283:1038-1045.
7. Aygen B, Inan M, Doganay M, et al: Adrenal functions in patients with sepsis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105:182-186.
8. Barnes PJ. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. *Biochem Soc Trans* 1995; 23:940-945.
9. Barquist E, Kirton O. Adrenal insufficiency in the surgical intensive care unit patient. *J Trauma* 1997; 42:27-31.

10. Beishuizen A, Thijs LG. Relative adrenal failure in intensive care: an identifiable problem requiring treatment? *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 15:513-531.
11. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? *Critical Care* 2002 Oct; 6:434-438.
12. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med* 2001; 27:1584-1591.
13. Beishuizen A, Vermes I, Hylkema BS, et al: Relative eosinophilia and functional adrenal insufficiency in critically ill patients. *Lancet* 1999; 353:1675-1676.
14. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986 Feb 8; 1(8476):307-310.
15. Briegel J. Cortisol bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis: Physiologische Funktionen und therapeutische Implikationen. *Wien Klein Wochenschr* 2002; 114 (Suppl 1):9-19.
16. Briegel J, Forst H, Haller M, Schelling G et al. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single center study. *Crit Care Med* 1999; 27:723-732.
17. Briegel J, Schelling G, Haller M, et al: A comparison of the adrenocortical response during septic shock and after complete recovery. *Intensive Care Med* 1996; 22:894-899.
18. Brien TG. Pathophysiology of free Cortisol in plasma. *Ann New York Acad Sci* 1988; 538:130-136.

19. Bruhn, Fölsch. Lehrbuch der Labormedizin. Schattauer Verlagsgesellschaft 1999: 30-31; 45-53.
20. Bollaert PE. Stress doses of glucocorticoids in catecholamine dependency: a new therapy for a new syndrome? *Intensive Care Med* 2000; 26:3-5.
21. Bollaert PE, Charpentier C, Levy B et al. Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. *Crit Care Med* 1998; 26:645-650.
22. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, et al: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987; 317:653-658.
23. Bouachour G, Roy P-M, Guiraud M-P. The repetitive short corticotropin stimulation test in patients with septic shock. *Ann Int Med* 1995; 123:962-963.
24. Bouachour G, Tirot P, Gouello JP, et al. Adrenocortical function during septic shock. *Intens Care Med* 1995; 21:57-62.
25. Bourne RS, Webber SJ, Hutchinson SP. Adrenal axis testing and corticosteroid replacement therapy in septic shock patients-local and national perspectives. *Anaesthesia* 2003; 58:571-596.
26. Chawala K, Kupfer Y, Goldman I, Tessler S. Hydrocortisone reverses refractory septic shock (abstract). *Crit Care Med* 1999; 27:A33.
27. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332:1351-1362.
28. Clark PM, Neylon I, Raggatt PR, Sheppard MC, Stewart PM. Defining the normal cortisol response to the short Synacthen test: implications for the investigation of hypothalamic-pituitary disorders. *Clinical Endocrinology* 1998; 49:287-292.
29. Coolens JL, Van Baelen J, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987; 26:197-202.



30. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003; 348/8:727-734.
31. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23:1430-1439.
32. De Brabandere V, Thienpont LM, Stöckl D, De Leenheer AP. Three routine methods for serum Cortisol evaluated by comparison with an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method. *Clin Chem* 1995; 41:1781-1783.
33. Dhillo WS, Kong WM, Le Roux CW, Alagband-Zadeh J, Jones J et al. Cortisol-binding globulin is important in the interpretation of dynamic tests of the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis. *European J of Endocrinology* 2002; 146:231-235.
34. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme Verlag, 4. Auflage 2001:45-51.
35. Eidelman LA, Sprung CL. Why have new effective therapies for sepsis not been developed? *Crit Care Med* 1994; 22:1330-1334.
36. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990; 11:5-46.
37. Feige J-J, Cochet C, Rainey WE, Madani C, Chambaz EM. Type  $\beta$  transforming growth factor affects adrenocortical cell-differentiated functions. *J Biol Chem* 1987; 262:13491-13495.
38. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2834-2839.
39. Friderichsen C. Nebennierenapoplexie bei kleinen Kindern. *Jb Kinderheilk* 1918;87:109.

40. Greenman RL, Schein RMHm, Martin MA, et al: A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal antibody to endotoxin in the treatment of Gram-negative sepsis. *JAMA* 1991; 266: 1097-1102.
41. Guyre PM, Munck A. Glucocorticoid actions on monocytes and macrophages. 1989 in: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky A (eds) *Anti-inflammatory steroid action: basic and clinical aspects*. Academic Press, San Diego, pp 199-225.
42. Hahn EO, Houser HB, Rammelkamp CH. Effect of cortisone on acute streptococcal infections and post-streptococcal complications. *J Clin Invest* 1951; 30:274-281.
43. Hahn JM. *Checkliste Innere Medizin*. Thieme Verlag, 4. Auflage 2003:511-514.
44. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of Cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:34-39.
45. Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, Lewis JG, Torpy DJ. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma Cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(1):105-114.
46. Hotta M, Baird A. Differential effects of transforming growth factor type  $\beta$  on growth and function of adrenocortical cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7795-7799.
47. Jarek M, Legare E, McDermott MT, et al. Endocrine profiles for outcome prediction from the intensive care unit. *Crit Care Med* 1993; 21:534-550.
48. Jäättelä M, Ilvesmäki V, Voutilainen P, Stenman U-H, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin induced Cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991; 128:623-629.

49. Journey TH, Cockrell JL, Lindberg JS, et al. Spectrum of Cortisol and response to ACTH in ICU patients: correlation with degree of illness and mortality. *Chest* 1987; 92:292-295.
50. Karow T, Lang R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2002 10. Auflage:492.
51. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens, et al. Immunologic and hemodynamic effects of “low dose” hydrocortisone in septic shock. A double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:512-520.
52. Kenyon NJ, Albertson TE: Steroids and Sepsis: Time for another reevaluation. *J Intensive Care Med* 2002; 17:68-74.
53. Klinke R, Silbernagel S. *Lehrbuch der Physiologie*. 1996; 2. Auflage:467.
54. Lamberts SWJ, Bruining HA, De Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 1997;333:1285-1292.
55. Ledingham IM, Watt I. Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet* 1983; i:1270.
56. Lefering R, Neugebauer EAM: Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med* 1995; 23:1294-1303.
57. Le Roux CW, Chapman A, Kong WM, Dhillon WS, Jones J, Alaghband-Zadeh J. Free Cortisol Index is better than serum total Cortisol in determining hypothalamic-pituitary-adrenal status in patients undergoing surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5):2045-2048.
58. Lindholm J, Kehlet H. Re-evaluation of the clinical value of the 30 min ACTH test in assessing the hypothalamo-pituitary-adrenocortical function. *Clinical Endocrinology* 1987; 26:53-59.

59. Loisa P, Uusaro A, Ruukonen E. A single adrenocorticotrophic hormone stimulation test does not reveal adrenal insufficiency in septic shock. *Anesth Analg* 2005; 101:1792-1798.
60. Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, et al. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:62-68.
61. Matot I, Sprung CL. Corticosteroids in septic shock: Resurrection of the last rites? *Crit Care Med* 1998; 26:627-630.
62. Melby JC, Egdahl RH, Spink WW. Secretion and metabolism of Cortisol after injection of endotoxin. *J Lab Clin Med* 1960; 56:50-62.
63. Molijn GJ, Koper JW, Van Uffelen CJC, De Jong FH, Brinkmann AO, Bruining HA, Lamberts SWJ. Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leucocyte in patients with sepsis or septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:197-203.
64. Molijn GJ, Spek JJ, Van Uffelen JCJ, De Jong FH et al. Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1799-1803.
65. Moran A, Chapman MJ, O'Fathartaigh MS, et al: Hypocortisolaemia and adrenocortical responsiveness at onset of septic shock. *Intens Care Med* 1994; 20:489-495.
66. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; 5:25-44.
67. Naito Y, Tamai S, Shingu K et al. Responses of plasma adrenocorticotrophic hormone, cortisol and cytokines during and after upper abdominal surgery. *Anesthesiology* 1992; 77:426-431.

68. Neumeister B, Besenthal I, Liebich H, Böhm BO. Klinikleitfaden Labordiagnostik. Urban & Fischer, 3. Auflage 2003:28-33.
69. Oelkers W. Adrenal insufficiency. N Engl J Med 1996; 335:1206-1212.
70. Oppert M, Reinicke A, Gräf KJ, Barckow D, Frei U, Eckhardt KU. Plasma cortisol levels before and during „low dose“ hydrocortisone therapy and their relationship to hemodynamic improvement in patients with septic shock. Intensive Care Med 2000; 26:1747-1755.
71. Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Gräf KJ, Boenisch O, Barckow D, Frei U, Eckhardt KU. Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. Crit Care Med 2005; 33,11:2457-2463.
72. Parker LN, Levin ER, Lifrak ET. Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. J Clin Endocrinol Metab 1985; 60:947-952.
73. Perrot D, Bonneton A, Dechaud H, Motin J, Pugeat M. Hypercortisolism in septic shock is not suppressible by dexamethasone infusion. Crit Care Med 1993; 21:396-401.
74. Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, Rocle-Nicolas B, Lejeune H et al. Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. Clin Chem 1989; 35/8:1675-1679.
75. Raem AM, Rauch P. Immunoassays. Elsevier Spektrum, Akademischer Verlag. 2007; 1. Auflage: 243-261.
76. Roche Diagnostics: Produktinformationsbeilage Elecsys 1010/2010, Elecsys-Cortisol Immunoassay. Roche Diagnostics 2005.
77. Roche Diagnostics: Produktinformationsbeilage Elecsys 1010/2010, Elecsys-PTH Immunoassay. Roche Diagnostics 1999.

78. Rothwell PM, Udwala ZF, Lawler PG. Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock. *Lancet* 1991; 337:582-583.
79. Schein RHM, Sprung CL. The use of corticosteroids in the sepsis syndrome. *Critical Care- State of the Art* 1986; The Society of Critical Care Medicine, Fullerton, 1986; 7:131-149.
80. Schein RM, Sprung CL, Marcial E, et al. Plasma cortisol levels in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1990; 18:259-263.
81. Schroeder S, Wichers M, Klingmüller D, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of patients with severe sepsis: altered response to corticotropin-releasing hormone. *Crit Care Med* 2001; 29:310-316.
82. Schumer W. Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Ann Surg* 1976; 184:333-341.
83. Siraux V, De Backer D, Yalavatti G, Melot C, Gervy C, Mockel J, Vincent JL. Relative adrenal insufficiency in patients with septic shock: comparison of low-dose and conventional corticotropin tests. *Crit Care Med* 2005; 33,11:2479-2486.
84. Singh A, Bateman A, Zhu Q, Shimasaki S, Esch F, Solomon S. Structure of a novel human granulocyte peptide with anti-acth activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:524-529.
85. Slotman GJ, Fisher CJ Jr, Bone RC, et al. Detrimental effects of high-dose methylprednisolone sodium succinate on serum concentrations of hepatic and renal function indicators in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 1993; 21:191-195.
86. Span FR, Hermus ARMM, Bartelink AKM, et al. Adrenocortical function: an indicator of severity of disease and survival in chronic critically ill patients. *Intensive Care Med* 1992; 18:93-96.

87. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, et al: The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. *N Engl J Med* 1984; 311:1137-1143.
88. Tai S S-C, Welch M J. Development and evaluation of a candidate reference method for the determination of total Cortisol in human serum using isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2004; 76:1008-1014.
89. Tayek JA, Atienza VJ. Pituitary-adrenal axis function in systemic inflammatory response syndrome. *Endocrine* 1995; 3:315-318.
90. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group: Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis. *N Engl J Med* 1987; 317:659-665.
91. Thomas L. Labor und Diagnose. Die medizinische Verlagsgesellschaft 4. Auflage 1995:1811-1836.
92. Thomas L. Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft, 6. Auflage 2005:1923-1937.
93. Thomas L. Labor und Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft, 6. Auflage 2005: 1957-1964.
94. Thys F, Laterre PF. Hydrocortisone in septic shock: too much, too little, too soon? *Crit Care Med* 2005; 33,11:2683-2684.
95. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:451-486.
96. Tunn S, Pappert G, Willnow P et al. Multicenter evaluation of an enzyme-immunoassay for cortisol determination. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 12:929-935.

97. Van den Berg G, Frölich M, Veldhuis JD, Roelfsema F. Combined amplification of the pulsatile and basal modes of adrenocorticotropin and cortisol secretion in patients with Cushing's disease: evidence for decreased responsiveness of the adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3750-3757.
98. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Lizarralde G, Johnson ML. Amplitude modulation of a burstlike mode of cortisol secretion subserves the circadian glucocorticoid rhythm. *Am J Physiol* 1989; 257:E6-14.
99. Vermes I, Beishuizen A. The hypothalamic-pituitary-adrenal response to critical illness. *Best Practice & Research Clin Endocrinology and Metabolism* 2001; 15/4:495-511.
100. Vermes I, Beishuizen A, Hampsink RM, Haanen C. Dissociation of plasma adrenocorticotropin and Cortisol levels in critically ill patients: possible role of endothelin and atrial natriuretic hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1238-1242.
101. Voerman HJ, Strack van Schijndel RJM, Groeneveld ABJ, De Boer H, Nauta JP, Thijs LG. Pulsatile hormone secretion during severe sepsis: accuracy of different blood sampling regimens. *Metabolism* 1992; 41:934-940.
102. Vogeser M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry – application in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(2):117-126.
103. Vogeser M, Briegel J, Jacob K. Determination of serum cortisol by isotope-dilution liquid-chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(10):944-947.
104. Vogeser M, Briegel J, Zachoval R. Diazalyse free cortisol after stimulation with synacthen. *Clin Biochem* 2002; 35:539-543.
105. Vogeser M, Kobold U, Seidel D. Massenspektrometrie in der Medizin-Stellenwert der molekularen Analytik. 2007:1-25.



106. Wagner RL, White PF, Kan PB, Rosenthal MH, Feldman D. Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic Etomidate. *N Engl J Med* 1984; 310:1415-1421.
107. Waterhouse R. Case of suprarenal apoplexy. *Lancet* 1911; 1:577.
108. Weitzman S, Berger S. Clinical trial design in studies of corticosteroids for bacterial infections. *Ann Intern Med* 1974; 81:36-42.
109. Wood JB, Frankland AW, James VHT, Landon J. A rapid test of adrenocortical function. *Lancet* 1965; i:243-245.
110. Wood PJ. Short Synacthen tests-the need for rationalization. *Clinical Endocrinology* 1998; 49:283.
111. Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL, et al: Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 1991; 324:429-436.
112. Zolga GP, Marik P: Hypothalamic-pituitary adrenal-insufficiency. *Crit Care Clin* 2001; 17:25-42.
113. Zonghai H, Han G, Renbao X. Study on glucocorticoid receptors during intestinal ischemia shock and septic shock. *Circ Res* 1987; 23:27-36.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
CBG	Corticosteroid Bindendes Globulin
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRP	C-reaktives Protein
° C	Grad Celsius
$\Delta$ Cortisol	Delta Cortisol (Cortisolanstieg nach ACTH-Gabe)
$\Delta$ max	Delta max (maximaler Cortisolanstieg nach ACTH-Gabe)
dl	Deziliter
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EII	Elektron Impact Ionisation
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCI	Freier Cortisol Index
FIA	Fluoreszenz-Immunoassay
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay
GC	Gas-Chromatographie
GC-MS	Gas-Chromatographie Massenspektrometrie

h	Stunde
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
Il 1	Interleukin 1
i.v.	intravenös
J	Jod
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LC MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LC TMS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LIA	Lumineszenz-Immunoassay
µg/dl	Mikrogramm pro Deziliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
m/z Ratio	Masse-Ladungs Ratio
MW	Mittelwert
n	Anzahl
nmol/l	Nanomol pro Liter

NNR	Nebennierenrinde
paCO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck
paO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Partialdruck
pH	Potenz und Maß für Wasserstoffionenkonzentration negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
%	Prozent
r <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver Operating Characteristic Curve
SD	Standardabweichung
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tripropylamin
VK	Variationskoeffizient
z.B.	zum Beispiel

## **8. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Josef Briegel, der durch seine stetige Hilfsbereitschaft und fachliche Betreuung das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichte.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Michael Vogeser für sein Mitwirken an dieser Arbeit und seine Hilfsbereitschaft bedanken.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name	Julia Uffelmann
Geburtsdatum	2. Januar 1978
Geburtsort	Lahr/Schwarzwald
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### **Schulbildung:**

1984-1988	Grundschule Lahr/Schwarzwald
1988-1997	Max-Planck-Gymnasium Lahr/Schwarzwald

### **Hochschulbildung:**

1997-2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
03/2001	1. Staatsexamen
03/2003	2. Staatsexamen
11/2004	3. Staatsexamen

### **Berufsausbildung:**

06/2006-10/07	Assistenzärztin in der Abteilung für Chirurgie an den Isarkliniken München
seit 11/07	Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie am Klinikum Freising