

2 Studiendesign und Setting

Die Studie wurde als Kohortenstudie mit prospektiver Datenerhebung des klinischen Verlaufs und der Patientenklassifizierung sowie serieller Bestimmung eines Clusters von Parametern und Markern der inflammatorischen Aktivität durchgeführt.

Die ICU-Patienten wurden auf der interdisziplinären operativen Intensivstation des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin rekrutiert. Das Universitätsklinikum mit 1329 Betten ist eines der 4 Krankenhäuser der Maximalversorgung der Stadt Berlin.

2.1 Patienten

2.1.1 ICU-Patientenkohorte mit *severe sepsis* oder septischem Schock

Sepsisdefinition und Einschlusskriterien

Unter Sepsis wird eine infektiös ausgelöste generalisierte Inflammationsreaktion verstanden (69). Gemäß dieser Definition wurden zur Diagnose der Nachweis eines Infektionsherdes, eine schwere inflammatorische Wirtsantwort und der Nachweis akuter infektionsortferner Organfunktionsstörungen gefordert, die plausibel nicht anders als durch eine generalisierte Inflammation erklärbar sein durften. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um eine epidemiologisch gut definierte Krankheitsentität mit inflammationsbedingtem Letalitätsbeitrag zu erfassen. Definition und Diagnosekriterien entsprechen der Definition *severe sepsis* der ACCP/SCCM-Konsensuskonferenz (108). Der zugrundegelegte Kriterienkatalog ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Patienten mußten die Kriterien innerhalb eines Fensters von 8 Stunden erfüllen. Die Diagnose galt als gesichert, wenn das letzte fehlende Kriterium erfüllt war. Dieser Zeitpunkt wurde auch als Sepsisbeginn angenommen; als Sepsisende der Krankheitstag, an dem das Sepsiskriterium nicht mehr erfüllt war.

Tabelle 1. ACCP/SCCM-Kriterien der Sepsis.

I. Infektiöse Ätiologie der Inflammation

Diese kann mikrobiologisch gesichert oder nach klinischer Kriterien diagnostiziert sein.

II. Schwere inflammatorische Wirtsreaktion

(zumindest 2 Kriterien)

- Fieber: Körperkerntemperatur $> 38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie: Körperkerntemperatur $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie: Kammerfrequenz $> 90/\text{min}$
- Tachypnoe: > 20 Atemzüge/min oder Hyperventilation: $\text{Pa}_{\text{CO}_2} < 4,3\text{ kPa}$ (= 33 mmHg)
- Leukozytose $> 12\text{ G/l}$ oder Leukopenie $< 4\text{ G/l}$ oder
Linksverschiebung im Differentialblutbild (unreife/Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten $> 0,1$)

III. Zeichen der unkontrollierten Inflammation: akute infektionsortferne Organdysfunktionen *entweder*

- Schock: zumindest 2 Stunden lang bestehender systolischer arterieller Blutdruck $< 90\text{ mmHg}$ bei Abwesenheit anderer Schockursachen, ohne Ansprechen auf adäquate intravasale Volumenexpansion (nach dem Urteil des behandelnden Arztes) oder Einsatz von α -adrenerg wirksamen Katecholaminen erforderlich, um den mittleren arteriellen Blutdruck auf $> 60\text{ mmHg}$ anzuheben und zu stabilisieren

oder zumindest 1 der folgenden Kriterien

- Bewußtseinsveränderungen: reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientierung, Delir, ohne Beeinflussung durch psychotrope Pharmaka
- Arterielle Hypotension: systolischer Blutdruck zumindest 1 Stunde lang $< 90\text{ mmHg}$ bei einem zuvor normotensiven Patienten oder ein anhaltender Blutdruckabfall $> 40\text{ mmHg}$ gegenüber dem Ausgangsblutdruck bei Abwesenheit anderer Schockursachen
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Thrombozytenabfall $> 30\text{ } \%/24\text{h}$ oder Thrombozytenzahl $< 100\text{ G/l}$ ohne Blutverluste als Ursache
- Arterielle Hypoxämie: $\text{Pa}_{\text{O}_2} < 10\text{ kPa}$ (= 75 mmHg) unter Atmung von Raumluft oder $\text{Pa}_{\text{O}_2}(\text{kPa})/\text{F}_{\text{I}_{\text{O}_2}} < 33\text{ kPa}$ (= $\text{Pa}_{\text{O}_2}(\text{mmHg})/\text{F}_{\text{I}_{\text{O}_2}} < 250\text{ mmHg}$) unter Sauerstoffsupplementierung ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache
- Renale Dysfunktion/Oligurie: Urinausscheidung $< 0,5\text{ ml/kg KG}$ zumindest für 2 Stunden oder ein Abfall der Kreatininclearance
- Metabolische Azidose: negativer base excess $> 5\text{ mmol/l}$, der nicht andersweitig erklärbar ist oder eine Laktatkonzentration im Plasma außerhalb des Referenzbereiches des jeweiligen Labors

2.1.2 ICU-Patientenkohorte mit infektionsfreiem postoperativen Verlauf

Als Vergleichsgruppe mit einer inflammatorischen Wirtsantwort in der Folge eines Gewebetraumas dienten unausgewählte Aufnahmen auf die ICU, bei denen ein identisches Spektrum von Meßgrößen der inflammatorischen Aktivität 5 Tagen lang nach einem elektiven operativen Eingriff oder einem akzidentellen Trauma untersucht wurden. Ausschlußkriterien für diese Kohorte waren ambulant oder nosokomial erworbene Infektionen. Bei den Patienten durfte in den letzten 3 Monaten keine Operation durchgeführt worden sein.

2.2 Schweregrad-Scoring der Sepsis und des ICU-Krankheitsverlaufs

2.2.1 APACHE-III[®]-Klassifizierung

Da kategoriale Diagnosen als nicht ausreichend betrachtet werden müssen, um die Krankheitsverläufe und das weite Letalitätsspektrum von Patienten mit klinischen Kriterien der Sepsis zu differenzieren, wurde zur Quantifizierung des Schweregrades der Erkrankung die APACHE-III[®]-Klassifizierung eingesetzt (90). Die Klassifizierung wurde ebenfalls zur Beschreibung der ICU-Vergleichsgruppe mit infektionsfreiem postoperativem Verlauf angewendet.

Die APACHE[®]-Klassifizierung (Acute Physiology, Age and Chronic Health Evaluation) besteht in ihrer dritten Version aus folgenden Elementen: APACHE-III-Score, ICU-Aufnahmediagnose, Bewertung der Behandlungseinrichtung und -dauer vor ICU-Aufnahme sowie der Einteilung in operativ und nicht operativ behandelte Patienten. Die Gewichtung der einzelnen Elemente der Klassifizierung wurde in einer prospektiven Studie an 17.440 erwachsenen Intensivpatienten aus 40 nach epidemiologischen und biostatistischen Gesichtspunkten ausgewählten US-amerikanischen Krankenhäusern entwickelt und validiert.

Das Kernstück der Klassifizierung ist der APACHE-III-Score. APACHE III ist ein numerischer Score, bei dem 0-299 Punkte vergeben werden können. Der Score errechnet sich aus der Summe der Punkte, die für den APS (APACHE III physiologic score) mit 17 Parametern, das Alter und für 7 chronische Vorerkrankungen vergeben werden (APS: 0-252, Alter: 0-24 und chronische Vorerkrankungen: 0-23 Punkte). Nur die Patienten, bei denen vor der ICU-Aufnahme eine Operation zur Behandlung einer lebensbedrohlichen Erkrankung

durchgeführt wurde, erhalten Punkte für chronische Vorerkrankungen. Für die Berechnung des APS wird die weitestgehende Abweichung der einzelnen Parameter von Referenzpunkten bewertet. Der Erhebungszeitraum erstreckt sich über die ersten 24 Stunden nach ICU-Aufnahme sowie täglich über den folgenden ICU-Verlauf. Für fehlende Meßwerte werden definitionsgemäß keine Punkte vergeben. Für zwei Parameter gelten besondere Bedingungen. Der arterielle pH wird in Abhängigkeit vom arteriellen P_{CO_2} gewichtet. Die Glasgow-Coma-Skala (GCS) wurde modifiziert. Der für den APACHE-III-Score modifizierte GCS vergibt die höchste Punktzahl für die schlechteste Bewußtseinslage (0-48 Punkte). Die eigenständige Punktvergabe für das Augenöffnen fällt weg, die beste motorische Reaktion wird in Kombination mit der besten verbalen Reaktion bewertet. Die Punktvergabe für Reaktionslosigkeit wird bei komatösen oder nichtkomatösen Patienten unterschiedlich bewertet.

Eine Risikostratifizierung ergibt sich bei der Anwendung des APACHE-III-Scores nur innerhalb von 78 definierten operativen oder nichtoperativen Diagnosekategorien. Diese ICU-Aufnahmediagnosen müssen nicht mit der Grunderkrankung oder Sepsisursache identisch sein.

2.2.2 Sepsis-spezifische APACHE-III[®]-Klassifizierung

Die Sepsis-spezifische Klassifizierung bewertet neben den Elementen der APACHE-III[®]-Klassifizierung zusätzlich die Ätiologie der Sepsis, die ICU-Behandlungsdauer bis zum Sepsisbeginn, das Vorhandensein einer Leberzirrhose, die numerische Leukozytenzahl und den numerischen pH-Wert mit einem eigenen Faktor. Die Zahl der ICU-Aufnahmekategorien wurde auf 10 reduziert. Die Gewichtung der neuen Parameter wurde anhand von 1.195 Patienten kalibriert, die die klinischen Kriterien einer Sepsis erfüllten und prospektiv bei 295 Patienten, die die Kriterien einer Sepsis bei Gram-negativer Infektion erfüllten, validiert (90). Das Mortalitätsrisiko am 28. Krankenhaustag nach Sepsisbeginn berechnet sich folgendermaßen: $\text{Prob}\{T \geq t\} = 1 - \Phi[(\log t - X\beta)/1,882]$. Das Mortalitätsrisiko läßt sich bei Anwendung dieser Fassung auch bei ICU-erworbener Sepsis kalkulieren.

$$X\beta = \text{INTERCEPT} + \text{APS} \times \text{aps} + \text{PRELOS} \times (1/1,2 + \text{PRELOS}) + \text{ICUDAY} \times \text{icuday} - \text{AGE} \times \text{age} + \text{GIFAIL} \{ \text{gifail} \} - \text{RESPFAIL} \{ \text{respfail} \} + \text{NONOP} \{ \text{nonop} \} + \text{SEPUTI} \{ \text{seputi} \} + \text{SGIMISC} \{ \text{sgimisc} \} + \text{SGIPERF} \{ \text{sgiperf} \} + \text{OTHSURG} \{ \text{othersurg} \} + \text{TRAUMA} \{ \text{trauma} \} + \text{WBLC} \times (\text{wblc}, 10) + \text{SEPH} \times \text{seph} + \text{CIRRH} \times \text{cirrhosis}$$

INTERCEPT = Regressionskoeffizient

APS = Punkte des APACHE III acute physiology score

PRELOS	= Dauer der Krankenhausbehandlung vor ICU-Aufnahme (bis Tag 7)
ICUDAY	= Dauer der ICU-Behandlung vor Sepsisbeginn
AGE	= Alter in Jahren
GIFAIL	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose gastrointestinales Versagen ist, sonst 0
RESPFAIL	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose respiratorisches Versagen ist, sonst 0
NONOP	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose nichtoperative Ursache ist, sonst 0
SEPUTI	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose Sepsis durch Urogenitaltraktinfektion ist, sonst 0
SGIMISC	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose sonstige gastrointestinale Operation ist, sonst 0
SGIPERF	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose gastrointestinale Perforation ist, sonst 0
OTHSURG	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose andere operative Ursache ist, sonst 0
TRAUMA	= 1, wenn die ICU-Aufnahmediagnose Trauma ist, sonst 0
WBLC	= Leukozytenzahl (bis 10 G/l)
SEPH	= Serum-pH-Wert
CIRRH	= 1, wenn eine durch Leberbiopsie nachgewiesene Zirrhose vorliegt, sonst 0

Die kleingeschriebenen oder in Klammern gesetzten Faktoren stellen kommerziell erhältliche Regressionskoeffizienten dar, die der Studienleitung durch APACHE Medical Systems, Inc., Washington, DC, USA, für die Studie zur Verfügung gestellt wurden. Die Sepsis-spezifische Klassifikation wurde zur Darstellung des Studienkollektivs und zum Vergleich der erwarteten mit der tatsächlich beobachteten Letalität eingesetzt.

2.2.3 Studienspezifische definitorische Festlegungen bei der APACHE-III-Score-Datenerhebung

Erhebungszeiträume

Der Beginn des Erhebungszeitraumes für die Kalkulation des APACHE-III-Scores wurde bei den Patienten mit klinischen Kriterien der Sepsis auf das Erreichen des letzten erforderlichen Kriteriums des oben beschriebenen Kriterienkataloges festgelegt. Der Score wurde danach in 24-Stunden-Zeitintervallen bis zum Ende der Sepsis kalkuliert. Davon abweichend wurde bei der ICU-Vergleichsgruppe der Score in den ersten 24 Stunden der Intensivbehandlung erhoben, danach aber pro Kalendertag. Alle Werte wurden nur unter einer aktiven Intensivtherapie erhoben. Agonale Befunde oder Befunde nach Therapieabbruch wurden nicht verwendet.

Sepsis-spezifische intraoperative Befunde

Parameter aus einer Reanimationsepisode wurden definitionsgemäß nicht berücksichtigt. Dagegen wurden während eines operativen Eingriffes gemessene Urinausscheidungen sowie akute hämodynamische Veränderungen, die als sepsisbedingt angesehen werden mußten, verwendet.

Kurzzeitige akute physiologische Veränderungen

Einmalige vorübergehende physiologische Veränderungen, z.B. eine kurzzeitige Hypotension, die auf einen nicht überlappenden Perfusorspritzenwechsel zurückzuführen war, eine durch die Mobilisation des Patienten entstandene Tachykardie oder eine offensichtlich durch Maßnahmen zur Kühlung hervorgerufene Hypothermie, wurden nicht berücksichtigt.

Pulsfrequenz

Die Pulsfrequenz wurde stündlich vom EKG-Monitor übernommen oder palpatorisch an der A. radialis über eine Minute ausgezählt. Beim Vorliegen einer absoluten Arrhythmie wurde die Ventrikelfrequenz immer ausgezählt.

Arterieller Mitteldruck (MAP)

Bei einer direkten oder oszillometrischen Messung des Blutdruckes wurde der mittlere arterielle Druck stündlich vom Monitor abgelesen. Bei indirekter Messung des Blutdruckes nach Riva-Rocci und Korotkoff wurde der mittlere arterielle Blutdruck nach der Formel (systolischer Blutdruck + diastolischer Blutdruck x 2)/3 berechnet.

Körpertemperatur

Es wurde in der Regel die rektale Körpertemperatur gemessen. Bei liegendem Pulmonalarterienkatheter wurde auch die zentrale Bluttemperatur verwendet.

Atemfrequenz und arterielle Blutgasanalyse

Bei der Atemfrequenz wurde nicht unterschieden, ob der Patient beatmet war oder nicht. Patienten, die nicht beatmet waren, erhielten keine Punkte für eine Atemfrequenz von 14-24 Atemzügen/min, beatmete Patienten erhielten dagegen keine Punkte für eine Atemfrequenz von 6-11/min. Erlaubte das Beatmungsmuster eine Spontanatmung, setzte sich die Gesamtatemfrequenz aus der Summe von Respiator- und Eigenatmungsfrequenz zusammen. Der schlechteste PaO₂ wurde folgendermaßen ermittelt: Bei beatmeten Patienten mit einem FI_{O₂} < 0,5 sowie bei nichtbeatmeten Patienten wurde der niedrigste

P_{aO_2} ermittelt; bei beatmeten Patienten mit einem $F_{IO_2} \geq 0,5$ wurde die alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz berechnet: $P(A-a)_{O_2}$ [kPa] = $(F_{IO_2} \times 94,8) - P_{aO_2}$ [kPa] - P_{aCO_2} [kPa].

Säure-Basen-Status

Diejenige arterielle Blutgasanalyse, die anhand der oben genannten Kriterien die schlechteste Oxygenierung zeigte, wurde der Bestimmung des arteriellen pH und des arteriellen P_{CO_2} zugrundegelegt.

Urinausscheidung und Kreatinin im Serum

Die Urinausscheidung wurde stündlich gemessen. Fehlte ein Teil der Messungen, wurden die gemessenen Urinmengen auf 24 Stunden hochgerechnet.

Wenn die Patienten mit einem Hämodialyse-gleichwertigen extrakorporalen Eliminationsverfahren behandelt wurden, wurde die Kreatininserumkonzentration wie bei einem akuten Nierenversagen bewertet.

Fehlende laborchemische Bestimmungen

Fehlten im Verlauf laborchemische Bestimmungen von Parametern mit relativ langer Halbwertszeit, z.B. Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff oder Albumin, die aber am Vortag oder am nachfolgenden Tag pathologisch verändert waren, wurde der Wert des Parameters interpoliert, um Scoresprünge durch fehlende Werte zu vermeiden.

Bewußtseinslage

Waren die Patienten analgosediert, so daß der neurologische Status nicht erhoben werden konnte und lagen keine Befunde über den neurologischen Aufnahmezustand vor, wurden keine Punkte vergeben. Bei den Patienten, die vor der Sedierung GCS-Punkte wegen eines Schädel-Hirn-Traumas oder einer intrakraniellen Blutung erhalten hatten, wurden diese Punkte bis zum Eintritt einer neurologischen Verbesserung auch während der Analgosedierung vergeben. Generell wurde für die Beurteilung des GCS eine konservative Herangehensweise gewählt.

2.2.4 SOFA-Score

Als Goldstandard zur Beschreibung des intensivmedizinischen Krankheitsverlaufs wurde darüber hinaus der SOFA-Score (SOFA, sequential organ failure assessment), eine

differenzierte Weiterentwicklung des MOF-Scores (MOF, multiple-organ failure) angewandt und in beiden Kohorten berechnet (66, 170).

2.2.5 Durchführung

Die Kalkulation der APACHE-III- und SOFA-Scores wurde für jeden Patienten unabhängig voneinander von zwei Doktoranten durchgeführt. Jeder Score und insbesondere Differenzen bei der Ersterhebung unterlagen einem zusätzlichen Monitoring durch den verantwortlichen Studienleiter.

2.3 Meßpunkte und präanalytische Probenbehandlung

2.3.1 Meßpunkte

ICU-Kohorte mit severe sepsis oder septischem Schock

Nach Studieneinschluß sollte die erste Probennahme innerhalb der ersten 24 Stunden der Sepsisepisode erfolgen, danach während der intensivmedizinischen Behandlung bis zum Entlassungs- bzw. Todestag täglich. Der Zeitpunkt der Probennahme lag nach den ersten 48 Stunden jeweils zwischen 8 und 10 Uhr. Nach der Verlegung auf die Bettenstation wurden Blutproben nur noch in mehrtägigen Abständen genommen. Die abschließende Blutentnahme erfolgte als Genesungswert einen Tag vor Entlassung des Patienten.

ICU-Kontrollkohorte

Für die sukzessiven ICU-Aufnahmen nach elektiven operativen Eingriffen erfolgte die erste Blutentnahme um 17 Uhr am präoperativen Abend. Die zweite Probenentnahme sollte 10 Stunden nach dem operativen Trauma vorgenommen werden. Danach erfolgten tägliche Blutentnahmen bis einschließlich des 5. postoperativen Tages. Die abschließende Probe ist ein Genesungswert am Tag vor der Krankenhausentlassung. Die Probennahme wurde einheitlich in der Zeit zwischen 8 und 10 Uhr durchgeführt.

Bei den nichtelektiven Aufnahmen auf die Intensivstation sollte die erste Blutentnahme analog zu den elektiven operativen Eingriffen 10 Stunden nach dem Trauma erfolgen. Die Probennahmen erfolgten danach bis zum 5. Tag täglich, mit einer zusätzlichen Abnahme unmittelbar vor Entlassung.

2.3.2 Probennahme und präanalytische Probenbehandlung

2.3.2.1 Material und Geräte

5-ml-Vacutainer[®] plus SST[®] Gel and Clot Activator (Art.-Nr. 367986, Fa. Becton Dickinson, Meylan, Frankreich)

4-ml-Vacutainer[®] mit 7,2 mg EDTA(K₂) (Art.-Nr. 367861, Fa. Becton Dickinson, Meylan, Frankreich)

10-ml-Monovette[®] Z ohne Zusatz (Art.-Nr. 324658, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

5-ml-Plastikröhrchen (Art.-Nr. 115261, Fa. Greiner, Nürtingen, Deutschland)

2-ml- und 10-ml-Einmalspritzen (Art.-Nr. 17094D2501 und 95C1301, Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)

Pipetten (Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)

Pipettenspitzen 1000 µl (Art.-Nr. 0030015.002, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge: Minifuge RF (Fa. Heraeus Holding, Berlin, Deutschland)

Tiefkühltruhe (Typ 6385, Fa. GFL, Großburgwedel, Deutschland)

2.3.2.2 Technik der Blutentnahme und Probenbehandlung

Die Probennahmen erfolgten bei den Patienten der Intensivstation entweder über den arteriellen Katheter der direkten Blutdruckmessung oder einen Kavakatheter. Bei der Studienkohorte mit Sepsis wurden überwiegend arterielle Blutproben gewonnen. Die Blutentnahmen nach der Verlegung auf die Bettenstationen wurden über zentralvenöse Katheter oder über periphervenöse Punktionen mit einer Butterfly[®]-Kanüle durchgeführt. Dabei wurde strikt auf einen 30minütigen Abstand zu schmerzhaften pflegerischen oder ärztlichen Maßnahmen sowie auf eine Rückenlage des Patienten geachtet.

Alle Blutentnahmen erfolgten atraumatisch, d.h. arterielle Abnahmen wurden durch Abtropfen direkt in Vacutainer[®] und Monovetten[®], venöse Entnahmen durch langsames Füllen von 10-ml-Einmalspritzen gewonnen. Für die Patienten der Sepsisgruppe wurden an jedem Meßpunkt 8 ml Blut zur Bestimmung von ProCT, CRP und IL-6 abgenommen. Zusätzlich erfolgte an jedem Meßpunkt die Bestimmung eines Blutbildes mit Differentialblutbild.

Die Blutproben wurden zunächst in einer Kühlzentrifuge bei -10 °C mit 3000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde dann abpipettiert und Aliquots für jede geplante Bestimmung bei -80 °C eingefroren. Die Plasmaproben wurden innerhalb von 15 Minuten verarbeitet. Die Serumprobe wurde 30 Minuten dem Gerinnungsprozeß überlassen und danach ebenfalls 10 Minuten lang mit 3000 U/min bei einer Temperatur von -10 °C zentrifugiert. Das Serum wurde dann abpipettiert und in Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Besonderheiten der Probennahme und -bearbeitung wurden auf einem Probenprotokoll dokumentiert.

2.4 Bestimmung von ProCT

2.4.1 Meßprinzip des immunoluminometrischen Assays

Die Bestimmung von ProCT im Serum erfolgte immunoluminometrisch (175). Verwendet wurde der LUMItest® PCT (Fa. Brahms Diagnostica, Berlin, Deutschland). Das Verfahren beruht auf der Detektion und quantitativen Bestimmung von ProCT mit zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern, die an die Kalzitonin(AS 85-116)- und die Katakalin(AS 121-141)sequenz des Prohormons binden. Der Capture-Antikörper ist auf der Innenseite der

Teströhrchen fixiert, der Tracer-Antikörper ist Lumineszenz-markiert. Die Markierung des Antikörpers erfolgte mit Akridinium. Im Verlauf der Inkubation reagieren beide Antikörper mit den ProCT-Molekülen der Probe, wobei „Sandwich-Komplexe“ entstehen, die an der Röhrchenwand gebunden bleiben. Nach dem Reaktionsende wird der verbliebene Tracerüberschuß durch sorgfältiges Waschen vollständig aus den Röhrchen entfernt. Dann werden dem Teströhrchen die Reagenzien des LUMItest®-Basiskits zugefügt. Die dabei entstehende Energie wird von dem Luminogen absorbiert und die emittierten Photonen werden mit einer Wellenlänge von 445 nm als relative light units (RLU) in einem geeigneten Luminometer gemessen. Die Größe

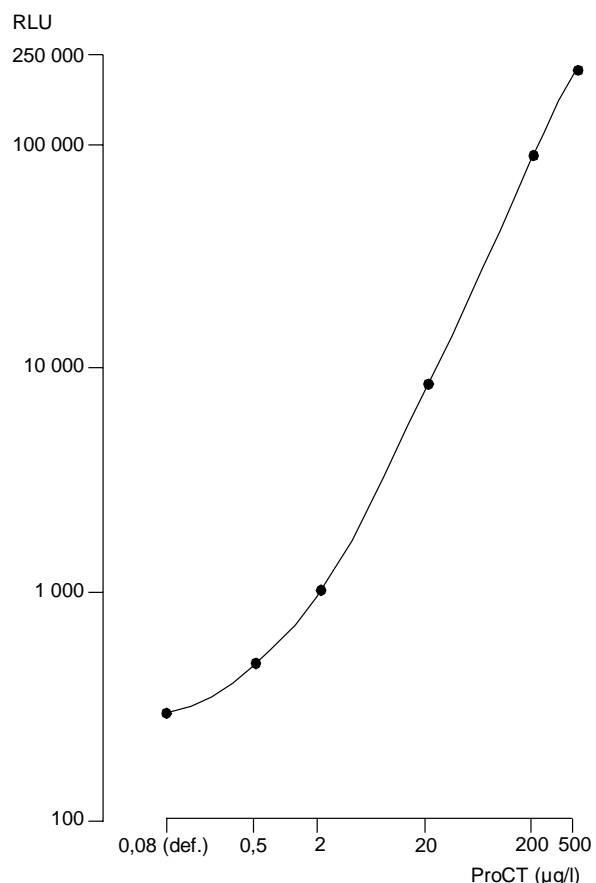


Abb. 2. Repräsentative Eichkurve zur ProCT-Bestimmung (RLU, relative light unit)

des Lumineszenzsignals ist der jeweiligen ProCT-Konzentration proportional. Über eine Eichkurve, die eine Beziehung zwischen dem gemessenen Lumineszenzsignal und

bekanntem Konzentrationen im interessierenden Bereich herstellt, werden dann die unbekanntem ProCT-Konzentrationen in den Serumproben kalkuliert (Abb. 2).

2.4.2 Bestimmung von ProCT im Serum

2.4.2.1 Reagenzien und Geräte

Der Lumitest[®] PCT enthält die Reagenzien für 100 ProCT-Bestimmungen. Unter Verwendung von 6 Standardansätzen und 2 Kontrollproben in Doppelbestimmung lassen sich 42 Serumproben messen.

Als Zubehör ist der Lumitest[®]-Basiskit erforderlich, der die Reagenzien zum Betrieb des Luminometers enthält sowie die Lumitest[®]-Waschlösung für die Waschvorgänge.

Inhalt des Reagenzienansatzes LUMItest[®] PCT

Teströhrchen (Coated tubes): beschichtet mit monoklonalen murinen anti-ProCT-Antikörpern; 2 x 50 Stück

Tracer: monoklonale mit Akridinium markierte anti-ProCT-Antikörper; 1 Fläschchen, lyophilisiert; 29 ml nach Rekonstitution mit Puffer

Phosphat-Puffer zur Rekonstitution des Tracers; 1 Fläschchen à 29 ml

Humanes Nullserum zur Rekonstitution der Standards (6) und Kontrollen (2); 1 Fläschchen à 4 ml

ProCT-Standards: 6 Fläschchen à 0,25 ml; lyophilisiert; werden vor Gebrauch mit je 0,25 ml Nullserum zu ProCT-Konzentrationen von 0,08 (definiert); 0,5; 2,0; 20; 200 und 500 µg/l rekonstituiert

ProCT-Kontrollseren: 2 Fläschchen à 0,25 ml; lyophilisiert; werden vor Gebrauch mit je 0,25 ml Nullserum rekonstituiert

Zur Präzisionskontrolle für den Anwender werden für jede Kit-Charge 2 Kontrollserumkonzentrationen als Mittelwert $\pm 2\sigma$ aus 20 Messungen angegeben. Alle Reagenzien und die Teströhrchen wurden bis zur Verwendung bei 4-8 °C gelagert. Bei weniger als 100 Bestimmungen wurden alle rekonstituierten Reagenzien sofort nach dem Pipettieren bei -20 °C eingefroren.

Weitere Reagenzien und Zubehör

LUMItest[®]-*Basiskit*: Der Inhalt des Reagenzienansatzes Lumitest[®] Basiskit enthält folgende Komponenten und Mengen ausreichend für 1000 Probenmessungen:

- 0,5% H₂O₂ in 0,1 M HNO₃, 3 Flaschen à 105 ml
- 0,25 M NaOH, 3 Flaschen à 105 ml
- Basiskit-Kontrolle 1: 2 Fläschchen; lyophilisiert; je 2 ml nach Rekonstitution mit destilliertem Wasser
- Basiskit-Kontrolle 2: 2 Fläschchen; lyophilisiert; je 2 ml nach Rekonstitution mit destilliertem Wasser

LUMItest[®]-*Waschkit*

deionisiertes Wasser (Fa. Brahms Diagnostica, Berlin, Deutschland)

Reagenzröhrchen 12 x 75 mm zur Vorbereitung des Luminometers und zur Messung des Reagenzienleerwertes (Art.-Nr. 755476, Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

Mikroliterpipetten, 20 µl und 250 µl (Comforpette[®] 4800, Art.-Nr. 4700 und Multipette[®], Art.-Nr. 4780, Fa. Eppendorf-Nethler-Hintz, Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen 10-100 µl und 250 µl (Eurotips[®], Art.-Nr. 0030063.619 und Combitips[®], Art.-Nr. 0030048.016, Fa. Eppendorf-Nethler-Hintz, Hamburg, Deutschland)

Dekantier-/Klemmgestell für 50 Teströhrchen (Fa. Bect-Werk, Hermann Buchholz, Berlin, Deutschland)

Klebefolie

Geräte

Vibrationsmischer Typ DSG (Fa. Heydolph, Kelheim, Deutschland)

Horizontalschüttler (KS 250, Fa. Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland)

Luminometer mit zwei Injektoren (AutoCliniLumat LB 952, Fa. Laboratorium Prof. Dr. Berthold, Wildbad, Deutschland)

Software Multicalc[®] (Fa. Laboratorium Prof. Dr. Berthold, Wildbad, Deutschland)

Dispenser 50 ml für Waschlösung (Dispensette[®], Fa. Brand, Wertheim, Deutschland)

manuelle Waschorruchtung

2.4.2.2 Durchführung

Vorbereitungen

Die Teströhrchen, Reagenzien und Patientenproben wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Die ProCT-Standards und Kontrollseren wurden mit dem Nullserum rekonstituiert und alle zu messenden Serumproben wurden gut durchmischt. Der Tracer wurde mit dem Puffer rekonstituiert. Die Waschlösung wurde wie folgt hergestellt: 40 ml Konzentrat wurde mit destilliertem Wasser auf 2 Liter verdünnt. Durch Einspülen der Basiskit-Reagenzien wurde der Luminometer in einen betriebsbereiten Zustand gebracht. Bei großen Testserien wurden die Einzelreagenzien einer Charge vor der Testdurchführung gepoolt.

Inkubationsschema

1. In die Teströhrchen wurden dann jeweils 20 µl ProCT-Standard, Kontroll- oder Patientenserum und anschließend 250 µl Tracer pipettiert. Für jede Probe wurde eine neue Pipettenspitze eingesetzt.
 2. Die Teströhrchen wurden anschließend auf einem Vibrationsschüttler kurz geschüttelt, mit Klebefolien abgedeckt und für 120 ± 15 min bei Raumtemperatur (maximal 25 °C) unter Schütteln bei 300 U/min lichtgeschützt inkubiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Teströhrchen keiner direkten Lichtstrahlung ausgesetzt waren.
 3. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde zu allen Teströhrchen je 1 ml Waschlösung gegeben und anschließend dekantiert. Es wurde darauf geachtet, daß bei der Zugabe der Waschlösung auch der obere Teil der Teströhrcheninnenwand vollständig mit Waschlösung benetzt wurde. Nur auf diese Weise kann gesichert werden, daß freie Tracer-Reste, die am oberen Rand der Teströhrcheninnenwand haften können, vollständig entfernt werden.
 4. Danach wurden alle Teströhrchen noch jeweils viermal mit 1 ml Waschlösung befüllt und jeweils dekantiert. Nach dem letzten Dekantierschritt wurden die Teströhrchen 5-10 Minuten auf frischem Zellstoff „über Kopf“ stehen gelassen, um so anhaftende Flüssigkeitsreste ablaufen zu lassen. Abschließend wurden die Teströhrchen nochmals kräftig auf dem Zellstoff aufgestoßen, um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen.
 5. Die Teströhrchen wurden anschließend in das Luminometer einsortiert und nach der automatischen Zugabe von jeweils 300 µl der LUMItest[®] Basiskit-Reagenzien die Lumineszenzsignale gemessen. Die Meßzeit beträgt 1 Sekunde pro Teströhrchen.
- Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung im Forschungslabor der Fa. Brahms Diagnostica (Leiter Klinische Forschung: Dr. rer. nat. W. Beier) durchgeführt.

2.4.3 Assayevaluierung: Herstellerangaben und eigene Untersuchungen

2.4.3.1 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als das kleinste Meßergebnis, das bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % von einem Leerwert unterschieden werden kann (83), wurde folgendermaßen ermittelt: Eine Nullserum-Probe wurde 10fach im gleichen Assay vermessen und ergab einen Mittelwert \pm Standardabweichung von $66,6\pm 3,74$ RLU. Die Berechnung der Nachweisgrenze (NWG) des Lumineszenzsignals erfolgte nach der Formel $NWG [RLU] = \text{Mittelwert [RLU]} + 2\sigma [RLU]$. Dies entspricht einer unteren Nachweisgrenze der ProCT-Serumkonzentration von $0,12 \mu\text{g/l}$.

2.4.3.2 Spezifität

Nach Angaben des Herstellers besteht keine Kreuzreaktivität mit folgenden Prokalzitonin-strukturähnlichen Peptiden: Keine Interferenzen mit humanem Kalzitonin bis $10 \mu\text{g/l}$, mit humanem Katakalin bis $10 \mu\text{g/l}$ und mit α - und β -Kalzitonin-assoziiertem Peptid (CGRP) bis 10pg/ml .

2.4.3.3 Präzision

Intra-Assay Präzision

Für die mittleren ProCT-Serumkonzentrationen $2,6$; $14,4$; $30,1$; $54,4$; 101 und $338 \mu\text{g/l}$ betrug der Variationskoeffizient bei 20 Messungen $3,5$; $1,8$; $1,7$; $2,0$; $3,6$ bzw. $2,6 \%$.

Inter-Assay Präzision

Patientenplasmen wurden 5fach mit verschiedenen Kits der gleichen Charge vermessen und die Mittelwerte und Variationskoeffizienten berechnet. Für eine mittlere ProCT-Serumkonzentration von $0,44$; $1,51$; $8,53$; $32,4$ und $184 \mu\text{g/l}$ ergaben sich Variationskoeffizienten von $13,2$; $6,6$; $13,1$; $5,2$ und $1,7 \%$.

2.4.3.4 High-Dose-Hook-Effekt

Bei ProCT-Serumkonzentration über 1500 µg/l werden abnehmende Lumineszenzsignale gemessen (Abb. 3). Proben mit Konzentrationen über 500 µg/l wurden daher mit Nullserum verdünnt und erneut gemessen. Die Serumkonzentration vor der Verdünnung wird aus der zuletzt gemessenen Probenkonzentration und dem Verdünnungsfaktor berechnet.

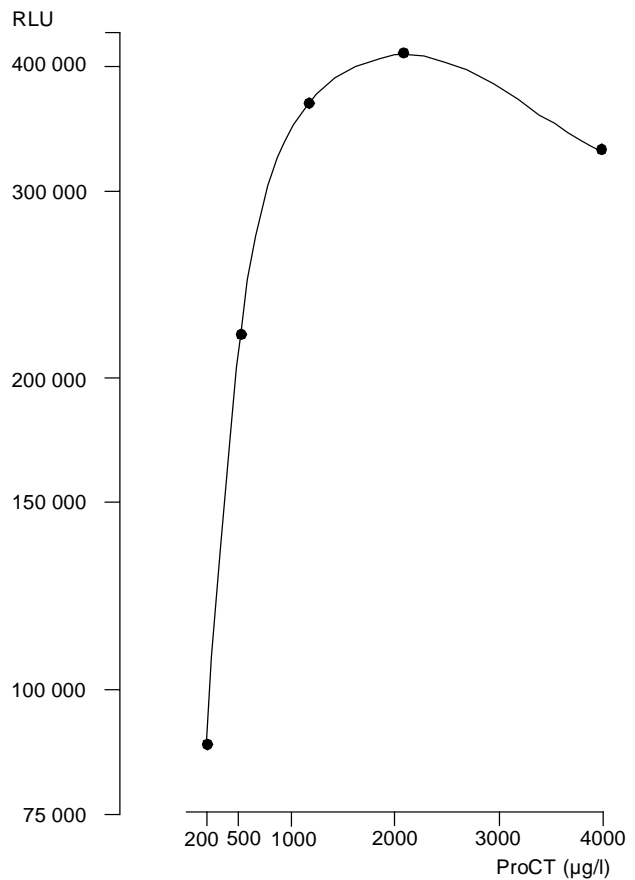


Abb. 3. High-Dose-Hook-Effekt (RLU, relative light unit)

2.4.3.5 Präanalytische Einflüsse auf die ProCT-Messung

Entnahmebesteck

Um den Einfluß unterschiedlicher Probengewinnungstechniken auf die ProCT-Messung zu untersuchen, wurden bei 10 Patienten mit einem weiten Spektrum von ProCT-Serumkonzentrationen Probenaliquots mit 7 verschiedenen Entnahmebestecken (Tabelle 2) gewonnen. Die Proben mit Zusätzen von Antikoagulantien wurden sofort zentrifugiert, die anderen Proben zur Serumgewinnung 30 bzw. 45 Minuten der Blutgerinnung überlassen.

Tabelle 2. Geprüfte Entnahmebestecke für die ProCT-Bestimmung

Plasmagewinnung

1. Vacutainer® mit 7,2 mg EDTA(K ₂)	4 ml	(Fa. Becton Dickinson, Meylan, F)
2. Vacutainer® mit 0,5 ml Citrat (0,11-M-Lösung)	4,5 ml	(Fa. Becton Dickinson, Meylan, F)
3. Monovette® mit NH ₄ -Heparin (15. I.E./ml Blut)	9 ml	(Fa. Sarstedt, Nürnberg, D)

4. Monovette [®] mit Li-Heparin (15. I.E./ml Blut)	9 ml	(Fa. Sarstedt, Nürnberg, D)
<i>Serumgewinnung</i>		
1. Monovette [®] Serum	10 ml	(Fa. Sarstedt, Nürnberg, D)
2. Vacutainer [®] mit SST [®] und Clotactivator	5 ml	(Fa. Becton Dickinson, Meylan, F)
3. Polypropylenröhrchen ohne Zusätze	5 ml	(Fa. Greiner, Frickenhausen, D)

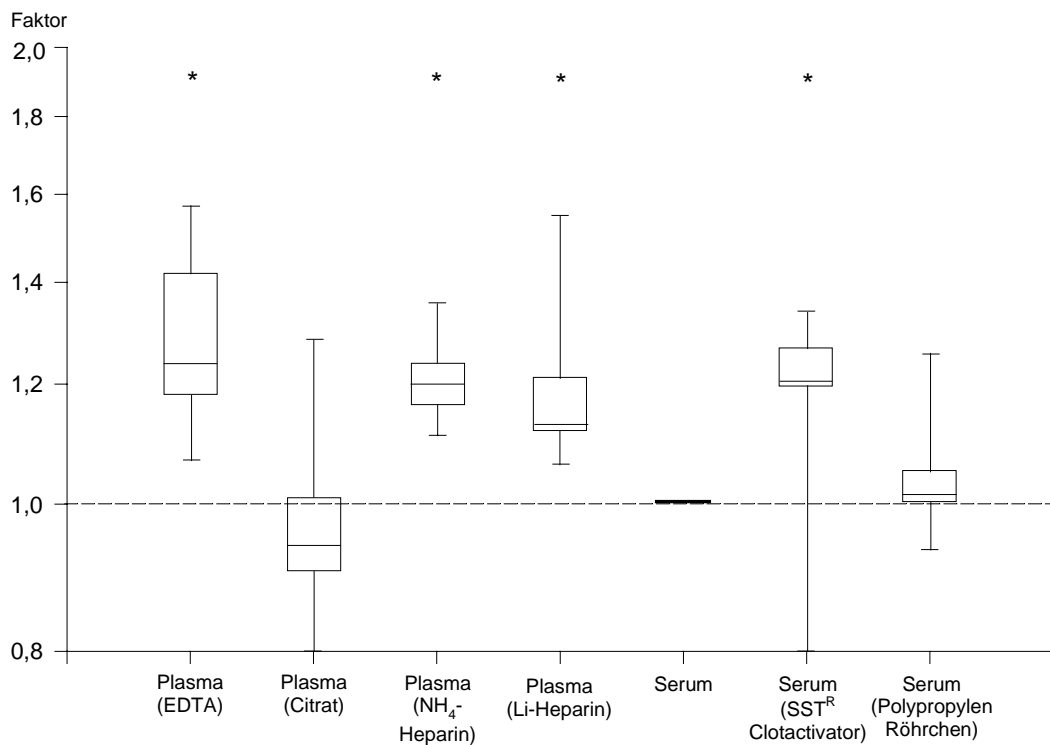


Abb. 4. Methodischer Einfluß der Plasma/Serum-Entnahmetechnik auf die ProCT-Bestimmung. Alle Messungen sind auf die Referenzkonzentration des mit einer Serum-Monovette[®] entnommenen Blutes bezogen (n=10; Median und Bereich; Wilcoxon-Test: *, p < 0,05).

Abbildung 4 zeigt den Einfluß der Verwendung verschiedener Antikoagulantien und Trennungskemikalien auf die ProCT-Bestimmung. Es ergaben sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,77 bis 221 µg/l ProCT-Konzentrationen, die im Median das 0,95 bis 1,23fache der Referenzkonzentration betragen. Die maximale positive Abweichung war bei EDTA-Plasma mit einem Faktor von 1,59, die maximale negative Abweichung bei Citrat-Plasma mit einem Faktor von 0,79 zu beobachten. Die Unterschiede sind für Li-Heparin-, NH₄-Heparin, EDTA-Plasma und das mit dem Vacutainer[®] mit SST[®] und Clotactivator gewonnene Serum statistisch signifikant.

2.4.3.6 Interferenzen mit der intensivmedizinischen Pharmakotherapie

Interferenzen des Assays bestehen nach Herstellerangaben mit unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen und Temperaturen. Diese Interferenzen wurden keiner eigenen Evaluierung unterworfen.

Wegen der bei dem untersuchten Studienkollektiv häufig erforderlichen Pharmakotherapie mit hochdosierten Arzneimitteln, wurden 13 häufig eingesetzte Pharmaka (Tabelle 3) in ihrem Einfluß auf die Assaycharakteristik untersucht. Die entsprechenden Arzneimittel wurden definierten Standards in Konzentrationen zugesetzt, wie sie maximal im Plasma von Intensivpatienten zu finden sind. Keines der getesteten Medikamente übte einen meßbaren Kreuzreaktivitätseffekt aus.

Tabelle 3. Dosis und Serumkonzentrationen hochdosierter Arzneimittel in der Intensivtherapie von Patienten mit *severe sepsis* oder septischem Schock und deren maximale prozentuale Kreuzreaktivität mit den Anti-ProCT-Antikörpern

MEDIKAMENT/ STANDARDTAGESDOSIS	SERUMKONZENTRATION	KREUZ- REAKTIVITÄT
<u>Antiinfektiva:</u>		
Imipenem (Zienam®) 3•500 mg	20-60 mg/l (1 h nach Infusionsende)	< 1•10 ⁻⁴ %
Cefotaxim (Claforan®) 3•2 g	12 mg/l (1 h nach Infusionsende)	< 4•10 ⁻⁴ %
Gentamicin (Refobacin®) 4•6 mg/kg KG	15-25 mg/l (1 h nach Infusionsende)	< 1•10 ⁻⁴ %
Vancomycin (Vanco Lederle®) 2•1 g	10-40 mg/l (1 h nach Infusionsende)	< 1•10 ⁻⁴ %
<u>Vasoaktive Pharmaka:</u>		
Dobutamin (Dobutamin Hexal®) 5-15 µg/kg•min	167 ng/ml (bei 10 µg/kg•min)	< 5•10 ⁻³ %
Noradrenalin (Arterenol®) 0,1-1,0 µg/kg•min	1.000-30.000 ng/ml	< 2•10 ⁻⁴ %

Dopamin (Dopamin Fresenius®) 1,5-3,3 µg/kg•min	bis 60.000 ng/ml	< 1•10 ⁻⁴ %
Adrenalin (Suprarenin®) 0,1-0,45 µg/kg•min	4.000-15.000 ng/ml	< 1•10 ⁻⁴ %
<u>Analgosedierung:</u>		
Fentanyl®-Janssen 0,04-0,24 mg/h	15-30 ng/ml	< 1•10 ⁻² %
Flunitrazepam (Rohypnol®) 1-6 mg/h	50-800 ng/ml	
Disoprivan (Propofol®) 2-4 mg/kg•h	1-3 µg/ml	
<u>Thromboembolieprophylaxe:</u>		
Heparin 250-500 IE/h	0,25-0,5 IE/ml	ohne Effekt
<u>Sonstige:</u>		
Furosemid (Lasix®) 3-6•10 mg		< 1•10 ⁻⁴ %

2.4.4 Bestimmung von ProCT im Urin

2.4.4.1 Gewinnung und präanalytische Behandlung der Urinproben

Bei Patienten, von denen in den ersten 5 Tagen der Sepsisepisode 24-Stunden-Sammelurin gewonnen werden konnte, wurde in einer Nebenfragestellung die renale ProCT-Ausscheidung untersucht. Die Urinsammelzeit erstreckte sich jeweils von 5 Uhr bis zum folgenden Tag um 5 Uhr. Am ersten Tag der Sepsis wurde der Urin vom Zeitpunkt des Sepsisbeginns bis um 5 Uhr gesammelt. Die renale ProCT-Ausscheidung wurde für diesen Tag dann auf 24 Stunden hochgerechnet.

Der Urin wurde zunächst über Blasendauerkatheter gesammelt. Die Messung der Urinmenge erfolgte nach Umfüllung in einen Meßzylinder. Anschließend wurden 10 ml des gut durchmischten Urins in 5-ml-Greiner-Röhrchen aliquotiert und bis zur Bestimmung bei -80 °C eingefroren. Patienten mit akutem Nierenversagen und Patienten, bei denen

innerhalb der ersten 5 Tage extrakorporale Eliminationsverfahren zur Anwendung kamen, wurden als drop-outs gewertet.

2.4.4.2 Durchführung

Meßprinzip der ProCT-Bestimmung im Urin

Zur ProCT-Bestimmung im Urin wurde eine zusätzliche Normalurin-Eichkurve angewendet, die unter Rekonstitution der ProCT-Standards mit Normalurin erstellt wurde.

Bei der Bestimmung der ProCT-Konzentrationen in den unterschiedlichen individuellen Urinmatrizes wurde das Prinzip der Wiederfindungsrate zu Hilfe genommen. Zunächst wurde die ProCT-Konzentration in der Urinprobe bestimmt. Die Kalkulation der wahren ProCT-Konzentration erfordert nun die Kenntnis der urinspezifischen Wiederfindungsrate. Diese wurde in der Weise bestimmt, daß ProCT in einer Konzentration von 20 µg/l mit der Originalurinprobe rekonstituiert wurde und die Gesamtprokalzitoninkonzentration in dieser Urinprobe gemessen wurde. Unter der Annahme konstanter Wiederfindungsraten bei gleicher Matrix läßt sich dann die tatsächliche ProCT-Konzentration in der Originalurinprobe kalkulieren. Bei 41 unter der Verwendung von Normalurin rekonstituierten lyophilisierten 20 µg/l-ProCT-Standards betrug die Wiederfindungsrate 90 ± 27 % und lag damit deutlich höher als die Wiederfindungsrate unter der Verwendung von mit Nullserum rekonstituierten 20 µg/l-ProCT-Standards, die nur 58 ± 10 % betrug.

2.5 Analytische Verfahren zur Bestimmung der etablierten Meßgrößen der inflammatorischen Aktivität

2.5.1 Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP)

Zur Bestimmung der CRP-Serumkonzentrationen wurde ein immunologischer Agglutinationstest (N Latex CRP mono, Fa. Behring Diagnostica, Marburg, Deutschland) angewendet. Die Bestimmung erfolgte im Forschungslabor der Firma Brahms Diagnostica, Berlin.

Meßprinzip:

Die mit monoklonalen CRP-Antikörpern beladenen Polystyrol-Partikel reagieren mit dem Antigen aus der Serumprobe und bilden einen Antigen-Antikörper-Komplex, der nach Agglutination turbidimetrisch im Nephelometer gemessen wird. Die Intensität des Streulichts ist vom CRP-Gehalt der Probe abhängig, so daß durch Vergleich mit der Verdünnungsreihe eines Standards bekannter CRP-Konzentrationen der CRP-Gehalt der Probe anhand einer Konzentrations-Extinktions-Kurve ermittelt werden kann.

Charakteristik des Assays

Sensitivität:

Die untere Nachweisgrenze beträgt 0,8 mg/l.

Spezifität:

Der Assay mißt natürlich vorhandenes CRP. Eine Kreuzreaktion ist nicht bekannt.

Präzision:

Intra-Assay: Drei Proben mit bekannten Konzentrationen wurden in je 20 Aliquots in einem Assay gemessen. Dabei ergaben sich Variationskoeffizienten von 4; 2,3 und 4,4 % für die Mittelwerte der Konzentrationen 15, 25 und 60 mg/l.

Inter-Assay: Proben mit fünf bekannten Konzentrationen wurden in 10 Kits gemessen. Dabei ergaben sich für die Mittelwerte der Konzentrationen 10, 15, 25, 45 und 60 mg/l Variationskoeffizienten zwischen 2,6 und 5,7 %.

Referenzbereich:

Der vom Hersteller des Kits angegebene Referenzbereich liegt bei 5 mg/l.

2.5.2 Bestimmung von Interleukin-6 (IL-6)

Zur Bestimmung der IL-6-Konzentrationen im Serum wurde ein Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (Fa. Research and Diagnostics Systems, Minneapolis, USA) benutzt. Die Bestimmung erfolgte im Forschungslabor der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin.

*Charakteristik des Assays***Sensitivität:**

Die untere Nachweisgrenze des Assays beträgt 0,35 pg/ml.

Spezifität:

Der Assay mißt humanes IL-6. Es besteht keine Kreuzreaktion mit anderen Zytokinen, insbesondere nicht mit IL-1 bis IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF α und β .

Präzision:

Intra-Assay: 20 Aliquots von drei Proben wurden in einem Kit gemessen. Dabei ergaben sich für die Mittelwerte der Konzentrationen 5,61; 39 und 116 pg/ml Variationskoeffizienten von 4,1; 3,1; und 2,7 %.

Inter-Assay: 3 Proben wurden in 20 Kits gemessen. Dabei ergaben sich für die Konzentrationen 5,2; 41 und 117 pg/ml Variationskoeffizienten von 7,8; 4,3 und 4,1 %.

Referenzbereich:

Der vom Hersteller des Kits angegebene Referenzbereich beträgt 5-30 pg/ml.

2.5.3 Bestimmung der Leukozytenzahl

Die Bestimmung der Leukozytenzahl sowie die Anfertigung der Differentialblutbilder wurde im Labor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof.

Dr. med. E. Thiel) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Zur Erstellung des Blutbildes wurde das Zählgerät Coulter-Counter STKS (Fa. Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland) benutzt. Für die Differentialblutbilder wurden die luftgetrockneten Blutausstriche nach Pappenheim mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung gefärbt und dann mikroskopisch ausgezählt.

2.6 Statistische Methoden

Die Datenerfassung und -eingabe wurde studienbegleitend durchgeführt. Die Datei wurde zunächst als Microsoft-Word[®] 6.0-Datei (Fa. Microsoft, Seattle, USA) geführt, später dann in eine Excel[®] 5.0-Datei (Fa. Microsoft, Seattle, USA) übertragen, in der die qualitativen Daten kodiert übernommen wurden. Der gesamte Datensatz wurde anschließend einer Diskrepanzkontrolle unterworfen und fehlerhafte Eingaben über eine Doppelkontrolle korrigiert.

Die Beschreibung der Patientenkollektive erfolgte durch die Angabe absoluter und relativer Häufigkeiten für qualitative Merkmale, Mittelwerte und Standardabweichungen, Mediane und Perzentilen für die quantitativen Meßparameter. Als Mitte der Sepsisphase wurde das geometrische Mittel der Verlaufswerte genommen.

Die statistische Beurteilung von Unterschieden zwischen den Patientengruppen erfolgte für qualitative Merkmale mit dem χ^2 -Test und für ordinale und stetige Parameter mit dem Mann-Whitney-U-Test. Meßwerte unterhalb der analytischen Nachweisgrenze der verwendeten Assays wurden für statistische Berechnungen bei der Hälfte der jeweiligen Sensitivitätsgrenze angenommen. Verläufe innerhalb von Patientengruppen wurden mit dem Friedman-Test geprüft. Bei statistischer Signifikanz wurden anschließend die Ausgangswerte mit den Werten der folgenden Meßpunkte mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Test verglichen.

Die diagnostische Güte der Parameter und Marker der Inflammationsaktivität zwischen SIRS und *severe sepsis*/septischer Schock zu diskriminieren, und die prognostische Güte, d.h. die Vorhersage des Versterbens während der Sepsis in Abhängigkeit von der Zeit nach Sepsisbeginn, wurde vergleichend mit Hilfe von ROC(Receiver Operating Characteristics)-Analysen bewertet. Als Maßstab für die Prognosegüte dient dabei die sog. ROC-AUC (area under the curve, Fläche unter der ROC-Kurve). Sie nimmt bei hoher Diagnose- oder

Prognosegüte Werte nahe 1 oder 0 an, je nach Orientierung der Variable. Bei prognostisch indifferenten Variablen nimmt sie Werte bei 0,5 an bzw. ist von 0,5 nicht signifikant verschieden. Unterschiede der ROC-AUC-Werte zwischen den untersuchten Parametern wurden mit dem Test nach Hanley und McNeil geprüft (24a, 72a).

Darüberhinaus wurde in dieser explorativen Analyse der jeweils bestmögliche (d.h. der die χ^2 -Statistik optimierende) Grenzwert des Parameters zur Einteilung in Patienten mit positiver und negativer Prognose berechnet. Für die resultierende binäre Prognosevariable wurden Sensitivität und Spezifität kalkuliert, wobei zu berücksichtigen ist, daß es bei diesem datenexplorierenden Verfahren durch die Optimierung des Grenzwertes zu einer optimistischen Verfälschung kommen kann.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einem zweiseitigen Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Softwareprogrammen SPSS[®]PC+, Version 5.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und durchgeführt.

2.7 Ethische und rechtliche Voraussetzungen

Die Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin begutachtet und gebilligt. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Standards durchgeführt, wie sie in der Deklaration von Helsinki zum Experimentieren am Menschen festgelegt worden sind (176). Nach Aufklärung über den wissenschaftlichen Zweck der Blutentnahmen wurde die Zustimmung der Patienten bzw. bei nichteinwilligungsfähigen Schwerstkranken deren mutmaßliche Zustimmung durch den nächsten Angehörigen eingeholt.

