



**Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”
Cluj-Napoca**

EXPLORAREA RĂSPUNSULUI INFLAMATOR SISTEMIC ÎN SEPSIS

TEZĂ DE DOCTORAT PENTRU OBTINEREA TITLULUI DE DOCTOR ÎN MEDICINĂ

- rezumat -

**Coordonator științific:
Prof. Dr. Dumitru Cârstina**

**Doctorand:
Simona Mera (căsătorită Oltean)**

2010

CUPRINS

PARTEA I: STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. INTRODUCERE	1
CAPITOLUL 2. MECANISME PATOGENETICE ÎN SEPSIS	2
2.1. AGRESIUNEA MICROBIANĂ.....	2
2.1.1. FACTORI CE ȚIN DE AGENTUL ETIOLOGIC.....	2
2.1.2. FACTORI CE ȚIN DE GAZDĂ.....	10
2.1.3. TRASEUL URMAT DE AGENTUL ETIOLOGIC ÎN ORGANISMUL GAZDĂ.....	15
2.2. RĂSPUNSUL POSTAGRESIUNE MICROBIANĂ.....	18
2.2.1. INFLAMAȚIE VS ANTIINFLAMAȚIE.....	18
2.2.2. RĂSPUNSUL INFLAMATOR SISTEMIC.....	22
2.2.3. TULBURĂRILE DE COAGULARE.....	36
2.2.4. REACȚIA NEUROENDOCRINĂ.....	44
2.2.5. RĂSPUNSUL ANTIINFLAMATOR.....	45
2.2.6. LEZIUNILE CELULARE.....	47
2.3. FIZIOPATOLOGIA MODS ȘI A ȘOCULUI SEPTIC.....	48
CAPITOLUL 3. DEFINIȚIA SEPSISULUI ȘI A SEVERITĂȚII ACESTUIA	51
3.1. EVALUAREA SEVERITĂȚII SEPSISULUI.....	53
3.1.1. Scoruri de severitate pentru evaluarea gravității sepsisului.....	53
3.1.2. Modelul PIRO de stratificare a sepsisului.....	55
CAPITOLUL 4. MARKERI ȘI MEDIATORI ÎN SEPSIS	57
4.1. DEFINIREA TERMENILOR DE PARAMETRU, MARKER ȘI MEDIATOR.....	57
CAPITOLUL 5. PERSPECTIVE TERAPEUTICE	62

PARTEA A II-A: CONTRIBUTII PERSONALE

CAPITOLUL 1. RĂSPUNSUL INFLAMATOR SISTEMIC - ELEMENT AL EVALUĂRII RISCULUI DE DECES AL PACIENȚILOR CU SEPSIS	64
1.1. SCOPUL CERCETĂRII.....	64
1.2. MATERIAL ȘI METODE.....	65
1.2.1. Designul studiului.....	65
1.2.2. Analiza statistică.....	68
1.3. REZULTATE.....	69
1.3.1. Caracteristicile pacienților.....	69
1.3.1.1. Prezența comorbidităților.....	70
1.3.1.2. Parametrii sindromului inflamator.....	71
1.3.1.3. Date despre infecție.....	73
1.3.1.4. Date legate de severitate.....	80
1.3.2. Analiza SIRS ca și predictor al mortalității.....	84
1.3.3. Aplicarea modelului PIRO de stadializare a sepsisului.....	88
1.3.4. Comparatie între scorul PIRO, numărul de criterii de SIRS, scorul SOFA și Charlson's WIC în prezicerea mortalității.....	106
1.4. DISCUȚII.....	120
1.5. CONCLUZII.....	132
CAPITOLUL 2. STUDIUL POTENȚIALILOR BIOMARKERI AI RĂSPUNSULUI INFLAMATOR SISTEMIC ÎN SEPSIS	135
2.1. SCOPUL CERCETĂRII.....	135
2.2. MATERIAL ȘI METODE.....	136

2.2.1. Designul studiului.....	136
2.2.2. Colectarea probelor.....	137
2.2.3. Determinarea concentrațiilor serice de citokine.....	137
2.2.3.1. Determinarea concentrațiilor de citokine prin metoda xMAP Multiplex.....	137
2.2.3.2. Determinarea concentrațiilor de citokine prin metoda ELISA.....	139
2.2.4. Analiza statistică.....	140
2.3. REZULTATE.....	142
2.3.1. Caracteristicile pacienților.....	142
2.3.2. Concentrațiile serice ale citokinelor.....	142
2.3.3. Concentrațiile serice ale citokinelor și numărul de criterii de SIRS.....	147
2.3.4. Concentrațiile serice ale citokinelor și terenul gazdei.....	149
2.3.5. Concentrațiile serice ale citokinelor și alți parametri ai răspunsului inflamator.....	153
2.3.6. Concentrațiile serice ale citokinelor și focarele de infecție.....	154
2.3.7. Concentrațiile serice ale citokinelor și etiologia.....	158
2.3.8. Concentrațiile serice ale citokinelor și severitatea sepsisului.....	160
2.3.9. Concentrațiile serice ale citokinelor și mortalitatea în sepsis.....	162
2.3.10. Concentrațiile serice ale citokinelor și PIRO.....	169
2.3.11. Comparația între metodele de determinare a citokinelor: Luminex vs ELISA.....	172
2.4. DISCUȚII.....	177
2.5. CONCLUZII.....	188
<u>CONCLUZII GENERALE</u>	190
INDEX TABELE	192
INDEX FIGURI	196
LISTA DE ABREVIERI	199
REFERINȚE	204

ANEXA 1. The profile of circulating IL-8 and GM-CSF in patients with severe sepsis. Simona Mera, Doina Țăulescu, Virginia Zanc, Cristina Cismaru, Mirela Flonta, Dumitru Cârștina. Timișoara Medical Journal 2008;58(3–4):177-182.

ANEXA 2. Serum profile of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma in early sepsis Simona Mera, Doina Țăulescu, Cristina Cismaru, Adriana Slavcovici, Virginia Zanc, Mirela Flonta, Dumitru Cârștina. Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology 2009;8(1):81-85.

CUVINTE CHEIE: sepsis, markeri, mediatori, răspuns inflamator sistemic, prognostic, PIRO, citokine, Luminex

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sepsisul definește o stare clinico-biologică foarte gravă care rezultă dintr-un răspuns sistemic al gazdei la o afecțiune de cauză infecțioasă. Sepsisul are o incidență în creștere și constituie a doua cauză de deces în unitățile de terapie intensivă non-coronariene precum și cea de-a zecea cauză de deces globală în țările dezvoltate, în pofida progreselor din domeniul antibioterapiei.

Sepsisul este declanșat de stimuli bacterieni dar este întreținut și modulat de o multitudine de mediatori endogeni activați într-o cascadă de evenimente imunologice complexe. Sinteza și eliberarea excesivă a acestor mediatori circulanți poate însă conduce la activarea necontrolată a diferite subseturi leucocitare, a sistemului complementului, a căilor de activare ale coagulării și sistemului fibrinolitic și care în final pot genera leziuni microvasculare care rezultă în ischemie tisulară și disfuncție de organ.

Răspunsul la agresiunea microbiană se desfășoară în mai multe etape, care se pot succeda rapid și pot antrena deteriorarea, uneori severă și ireversibilă a stării generale și în final decesul pacientului. Din aceste motive, prognosticarea evoluției spre stadii avansate sau deces are o importanță deosebită în adaptarea timpurie a măsurilor terapeutice.

Principali mediiatori ai sindromului inflamator sistemic (SIRS) din sepsis sunt reprezentați de numeroase proteine cu greutate moleculară mică numite citokine și chemokine, sintetizate de numeroase tipuri celulare. Acestea pot modula fenotipul sau activitatea diverselor subseturi leucocitare și al altor tipuri de celule (fibroblaste, celule endoteliale).

Diagnosticul, monitorizarea și tratamentul pacienților cu sepsis precum și stratificarea în funcție de gravitate și prognostic necesită criterii și definiții precise. Actualmente acestea se bazează în principal pe evaluarea disfuncțiilor de organ (APACHE, SOFA, MODS). Unele dintre acestea prezintă avantajul simplității dar toate sunt extrem de nespecifice și nu permit stratificarea precisă și formularea rapidă a prognosticului răspunsului gazdei la infecție. Tendința actuală este de identificare de noi criterii de evaluare rapidă și eficientă, bazate pe mecanismele patogenetice implicate în răspunsul sistemic, inclusiv prin studiul și utilizarea diverselor biomolecule. Acestea ar putea revela noi intervale de oportunitate și intervenție terapeutică, care să preceadă apariția elementelor actuale de diagnostic, care se instalează în faze avansate ale sindromului și sunt nespecifice.

Recent a fost propus un nou model de stratificare a pacienților cu sepsis, cu acronimul PIRO (Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction). Acesta ia în considerare mai multe aspecte considerate utile pentru o mai bună caracterizare a sindromului pe baza factorilor predispozanți și a comorbidităților, a naturii infecției, a caracteristicilor răspunsului gazei și a amplitudinii disfuncțiilor de organ rezultate din acesta. Sistemul PIRO nu se aplică încă de rutină, necesitând validare practică. Rezultatele primei aplicării (retrospective) a unui sistem de stadializare bazat pe conceptul PIRO pe două baze de date extrem de vaste, constând în câteva zeci de mii de pacienți, au fost publicate foarte recent (2009). Concluziile acestui studiu au fost că sistemul propus ar putea deveni un model eficient de stadializare a sepsisului, părând să fie predictiv pentru mortalitate.

Pe lângă aceste scoruri clinice în continuă re-analizare, zeci de molecule bioactive, solubile sau celulare au fost propuse ca markeri ai prezenței, severității sau evoluției sepsisului, datorită rolului lor fiziopatologic în sepsis. Din nefericire, caracteristicile majorității acestora (dinamică, sensibilitate, specificitate) s-au dovedit nesatisfăcătoare iar cercetările destinate identificării unui marker al sepsisului continuă.

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 1. RĂSPUNSUL INFLAMATOR SISTEMIC - ELEMENT AL EVALUĂRII RISCULUI DE DECES AL PACIENȚILOR CU SEPSIS

SCOPUL CERCETĂRII

Studiul nostru a avut ca și obiectiv analizarea retrospectivă a răspunsului inflamator sistemic și a rolului SIRS în evaluarea riscului de deces. De asemenea am urmarit aplicarea în premieră pe un lot de pacienți din România a sistemului de stadializare dezvoltat pe baza conceptului PIRO și investigarea eficienței acestuia în prezicerea mortalității. În cadrul aceluiași studiu ne-am propus compararea scorului PIRO cu SIRS și cu alte scoruri cu rol în aprecierea riscului de deces, cum ar fi scorul SOFA, care evaluează pacientul prin prisma insuficiențelor de organ și indexul ponderat al comorbidităților al lui Charlson care evaluează pacientul prin prisma predispoziției datorate afecțiunilor cronice asociate.

MATERIAL ȘI METODE

Într-un studiu retrospectiv bazat pe cazuistica Clinicii de Boli Infecțioase din Cluj-Napoca pe o perioadă de 42 de luni (în intervalul 2006 – 2009), s-au analizat datele demografice, clinice și paraclinice consemnate în foile de observație ale pacienților cu sepsis.

Pacienții au fost incluși în studiu conform criteriilor ACCP/SCCM Consensus Conference din 1992 de definire a sepsisului.

Variabilele luate în calcul pentru aplicarea modelului PIRO au fost vârsta, tahicardia, tahipneea, infecția dovedită, proveniența infecției, focarul infecțios inițial, tipul infecției, numărul de disfuncții de organ, și cele două tipuri de comorbidități incluse în calcularea scorului - cardiomiopatia congestivă și hepatopatia cronică iar scorul a fost calculat conform modelului propus de Rubulotta et al. în 2009. Pentru cuantificarea severității din perspectiva insuficiențelor de organ în primele 24 ore de la internare s-a utilizat scorul SOFA. Impactul bolilor asociate a fost apreciat cu ajutorul indexului ponderat al comorbidităților propus de Charlson et al. (weighted index of comorbidities -WIC).

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul aplicațiilor SPSS 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism 5.00 și Statistica 7.0. Pentru compararea a două sau mai multe grupuri s-au utilizat diferite testele statistice în funcție de distribuția variabilei (testul Mann Whitney, Student, testul χ^2 și Fisher's exact test). S-a calculat Riscul relativ (RR) și Odds Ratio (OR) și intervalul de încredere al acestora pentru a estima riscul expunerii la factorii studiați. Analiza de corelație între variabile continue s-a efectuat prin determinarea coeficienților de corelație Pearson respectiv Spearman. Pentru estimarea relației dintre două sau mai multe variabile, cea dependentă calitativă, iar variabilele independente cantitative sau calitative a fost folosită regresia logistică. Valorile p sub 0,05 au fost considerate semnificative statistic.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dintre cei 250 de pacienți incluși în studiu, pe perioada internării, 55 (22%) au decedat, 126 au fost externați la domiciliu iar 69 au fost transferați în alte servicii (incluși în lotul de supraviețuitori). Originea infecției: a fost urinară în 87 de cazuri (34,8%), respiratorie în 73 de cazuri (29,2%), abdominală în 46 de cazuri (18,4%), cutanată în 23 de cazuri (9,2%) și din alte situsuri în 21 de cazuri (7,2%).

Vârsta medie a pacienților care au decedat a fost $65,3 \pm 15,6$ ani iar a pacienților care au supraviețuit a fost $59 \pm 16,3$ ($p=0,024$). Riscul de deces al pacienților peste 65 de ani a fost de $RR=1,68$ (interval de încredere 1,05-2,68) și $OR=1,96$ (interval de încredere 1,07-3,59). Cei mai mulți dintre pacienții decedați au prezentat sepsis respirator (60%), în timp ce sepsisul de origine urinară și abdominală au reprezentat fiecare câte 12,72% din totalul deceselor.

Din 250 pacienți, s-au recoltat hemoculturi la 197, iar etiologia a fost identificată în 139 (55,6%) de cazuri. În 91 de cazuri infecția s-a datorat germenilor Gram negativi, în 44 de cazuri

germenilor Gram pozitivi, într-un caz a fost datorată fungilor iar în 3 cazuri a fost mixtă. Etiologia a rămas neidentificată în 111 cazuri. Printre cei 55 de pacienți care au decedat, 34 (61,81%) au avut etiologia neidentificată, în timp ce din totalul de 195 de supraviețuitori doar în 77 de cazuri (34,48%) nu s-a identificat etiologia. Studiul nostru a evidențiat faptul că lipsa identificării etiologiei este un factor de risc pentru deces, diferența între numărul de decese în rândul pacienților cu etiologie necunoscută și a celor la care etiologia a fost identificată fiind semnificativă statistic ($p=0,003$). Neidentificarea etiologiei a determinat un risc de deces tradus prin RR de 2,06 (interval de încredere 95% între 1,30-3,24) și OR de 2,62 (interval de încredere 95% între 1,41-4,90). Rezultatele nu fac decât să evidențieze odată în plus importanța identificării etiologiei și a antibioterapiei țintite pentru evoluția și prognosticul pacienților cu sepsis.

Procalcitonina (PCT) a fost determinată la 146 de pacienți și a înregistrat valori crescute la 135 (92,4%) dintre aceștia. PCT a fost semnificativ mai mică la pacienții cu sepsis comparativ cu cei cu șoc septic, în timp ce diferența între valorile PCT la pacienții cu sepsis și sepsis sever a fost la limita semnificației statistice. Valorile PCT nu au fost însă predictive pentru deces.

Valoarea CRP determinată la momentul diagnosticului nu a fost semnificativ diferită între supraviețuitori și decedați ($p=0,996$).

Frecvența șocului a fost semnificativ mai mare la pacienții cu sepsis respirator comparativ cu cei cu sepsis urinar (48,8 % vs. 27,5%, $p=0,045$). Riscul de a dezvolta șoc septic la pacienții cu sepsis respirator a fost mai mare comparativ cu cei cu sepsis urinar (RR=1,59 - interval de încredere 1,03-2,44; OR=2,05 - interval de încredere 1,06-3,96).

Dintre cei 250 de pacienți studiați 96 (38,4%) au prezentat sepsis fără criterii de severitate, 76 (30,4%) au prezentat sepsis sever și 78 (31,2%) au prezentat șoc septic. Numărului de criterii SIRS la pacienții cu sepsis fără criterii de severitate a fost mai mic comparativ cu pacienții cu șoc septic ($p=0,006$). Diferența între media numărului de criterii SIRS la pacienții cu sepsis fără criterii de severitate și cei cu sepsis sever precum și între media numărului de criterii de definire a SIRS la pacienții cu sepsis sever și cei cu șoc septic nu a fost semnificativă statistic. Diferența între numărul de decese în rândul pacienților cu sepsis sever și a celor cu șoc septic nu a fost semnificativă statistic ($p=0,307$), în schimb diferența între numărul de decese în rândul pacienților cu sepsis și a celor cu sepsis sever respectiv șoc septic a fost semnificativă statistic ($p<0,0001$ în ambele cazuri). Studiul nostru a evidențiat și că riscul de deces depinde semnificativ de numărul de criterii de SIRS (cu toate că cel mai puțin semnificativ dintre variabilele studiate) dar, deși acuratețea predicției decedului pentru numărul de criterii SIRS a fost 78% iar sensibilitatea de 100%, specificitatea a fost 0. Aceste rezultate concordă cu studii anterioare care indică o asociere între numărul de criterii de SIRS și mortalitate, însă se încrie totodata și în opinia actuală privind lipsa de specificitate a acestor criterii și a necesității identificării altor abordări mai specifice de apreciere a riscului în cazul pacienților cu sepsis.

Dintre variabilele incluse în definirea SIRS, alura ventriculară a fost semnificativ diferită între supraviețuitori și decedați când au fost considerate intervalele din definiția SIRS (≤ 90 bătăi/minut respectiv > 90 bătăi/minut). Analiza în raport cu temperatura (între 36°C - 38°C respectiv $< 36^{\circ}\text{C}$ sau $> 38^{\circ}\text{C}$) sau frecvența respiratorie (peste 20/minut respectiv sub 20/minut) nu s-a asociat cu un număr semnificativ diferit de decese. Am constatat existența unui număr semnificativ mai mare de decese în intervalul de temperatură $\leq 35,8^{\circ}$ și între $37,5^{\circ}$ - 39°C comparativ cu intervalul de temperatură între $35,8^{\circ}$ - $37,4^{\circ}\text{C}$ și $\geq 39^{\circ}\text{C}$ precum și între intervalele de frecvență respiratorie < 25 respirații/minut comparativ cu ≥ 25 respirații/minut ($p<0,0001$). Acelasi rezultat l-am obținut analizand diferența dintre numărul de decese în intervalele de alură ventriculară ≤ 100 bătăi/minut respectiv > 100 bătăi/minut, unde am constatat existența unui număr mai mare de decese în intervalul cu AV > 100 bătăi/minut.

Conform unor studii anterioare, mortalitatea se dublează odată cu creșterea numărului de disfuncții de organ. Studiul de față confirmă că mortalitatea a crescut odată cu creșterea numărului de disfuncții de organ, de la 3,92% în absența acestora, la 8,21% pentru o disfuncție prezentă,

23,07% pentru două disfuncții, 52,08% pentru trei disfuncții, 50% pentru 4 disfuncții și 66,66% pentru 5 disfuncții de organ. O creștere semnificativă statistic odată cu adăugarea a încă unei disfuncții de organ s-a înregistrat între mortalitatea pacienților cu 2 respectiv 3 disfuncții de organ ($p=0,002$) și între mortalitatea în cazul pacienților cu 1 respectiv 2 disfuncții de organ ($p=0,018$). Prevalența disfuncțiilor de organ a fost semnificativ mai mare la pacienții care au decedat ($p<0,0001$ pentru disfuncția respiratorie și neurologică, $p=0,009$ pentru disfuncția renală).

Scorul SOFA a avut o mediana de 4 (0-13) și o medie de $4,2 \pm 3,2$. Pacienții cu sepsis au avut o medie a scorului SOFA de $1,6 \pm 1,4$, cei cu sepsis sever au avut o medie a scorului SOFA de $5,1 \pm 2,6$ iar pacienții cu șoc septic au avut o medie a scorului SOFA de $6,6 \pm 3,1$. Scorul SOFA a fost semnificativ mai mare la pacienții cu șoc septic comparativ cu pacienții cu sepsis sau sepsis sever ($p<0,0001$ respectiv $p=0,0014$).

Pentru valorile Charlson's WIC s-au înregistrat de asemenea diferențe semnificative statistic între supraviețuitori și decedați ($p < 0,0001$). Prin regresia logistică univariată metoda ENTER ce a inclus ca variabilă independentă scorul WIC și ca variabilă dependentă decesul, a reieșit că riscul de deces depinde semnificativ de scorul WIC ($p<0,001$) cu un OR de 1,59 și interval de încredere 95% pentru OR între 1,31-1,93.

Studiul de față a aplicat pentru prima dată, din cunoștințele noastre, scorul PIRO (propus de Rubulotta et al) pe un grup de pacienți din România. Analiza uni- și multivariată a relevat numeroase corelații pozitive între mortalitate și scorul PIRO atât luat în ansamblu cât și în funcție de fiecare din elementele sale (Predispoziție, Infecție, Răspuns și disfuncții de Organ).

Din modelul de regresie logistică univariată pentru fiecare dintre componentele scorului PIRO a reieșit că acestea au fost variabile de predicție independente pentru deces ($p<0,001$ pentru P, O și R, $p=0,003$ pentru I). Cel mai bun OR a fost identificat pentru componenta R, însă atât pentru componenta R cât și pentru componenta I, specificitatea a fost 0.

Studiind relația dintre componentele scorului PIRO am decelat o corelație pozitivă între componenta I și componenta R precum și între componenta R și componenta O.

În regresie logistică multivariată metoda FORWARD, ce a inclus ca variabile independente fiecare dintre componentele scorului PIRO și ca variabilă dependentă decesul, scorul O a fost cel mai semnificativ pentru mortalitate, urmat de P și de R. Scorul I nu a intrat în modelul de regresie, ceea ce denotă faptul că acesta nu explică variația reziduală a probabilității de deces în mod semnificativ în comparație cu combinarea scorului O, P și R. Scorul O a intrat primul în modelul de regresie, urmat de scorul P și apoi, în pasul trei de scorul R. Acest fapt arată că P se corelează cel mai semnificativ cu variația reziduală a probabilității de deces după îndepărtarea variației datorate scorului O, scorul R se corelează cel mai semnificativ cu variația reziduală a probabilității de deces după îndepărtarea variației datorate scorului O și a scorului P. Acuratețea predicției pentru componentele scorului PIRO în modelul de regresie logistică multivariată indica o sensibilitate de 90,7%, și o specificitate de 45,5%.

Am observat corelații pozitive între scorul PIRO și numărul de criterii de SIRS, scorul SOFA și Charlson's WIC. Cea mai bună corelație observată a fost pentru scorul PIRO și scorul SOFA ($r = 0,61$; $p < 0,0001$).

Valoarea prognostică deosebită a PIRO a fost confirmată în regresia logistică multivariată având ca variabile independente PIRO, SOFA, WIC și numărul de criterii de SIRS și variabilă dependentă decesul. Numărul de criterii SIRS nu a intrat în regresie, ceea ce denotă faptul că nu explică variația reziduală a probabilității de deces în mod semnificativ în comparație cu combinarea scorului PIRO, scorul SOFA și Charlson's WIC.

Studiul de față combină avantajele și dezavantajele analizelor *single center*. Avantajele sunt reprezentate de metodologia și standardele diagnostice identice precum și de protocoalele terapeutice similare pe când dezavantajele studiului *single center* sunt datorate în principal de dimensiunea relativ limitată al coortei de pacienți. Lotul mic și inomogen de pacienți nu ne-a permis aplicarea unui model de regresie logistică multivariată în vederea creării unui scor propriu,

motiv pentru care am ales aplicarea scorului creat de Rubulotta et al. Există însă și alte câteva studii care au încercat crearea de modele ale unui scor bazat pe conceptul PIRO, aplicate fie pe baza de date a cohortei multinationale SAPS 3 sau pe grupuri mai bine delimitate cum ar fi pacienții cu pneumonie comunitară (CAP), pneumonie de ventilator (VAP) sau copiii. Toate aceste eforturi recente subliniază interesul pentru noul concept de clasificare și prognostic al sepsisului reprezentat de PIRO și certifică potențialul acestuia. Anticipăm că viitorul apropiat și noi studii prospective vor confirma sau combate optimismul care înconjoară acest nou concept.

CONCLUZII

În concluzie, numărul de criterii de SIRS la internare este variabilă de predicție independentă pentru deces, însă prezența și numărul de criterii de SIRS sunt elemente prea sensibile și nespecifice în prezicerea mortalității. Alura ventriculară peste 90 de bătăi/minut este singurul parametru din componența SIRS asociat semnificativ statistic cu mortalitatea iar o alura ventriculară peste 100 de bătăi/minut se asociază cu decesul la un nivel statistic mai semnificativ decât valoarea din definiția SIRS (90 de bătăi/minut) și pare a avea valoare de cut-off. Valorile procalcitoninei serice sau CRP determinate la momentul diagnosticului nu sunt predictive pentru deces. Vârsta înaintată a pacienților, lipsa identificării etiologiei dar și originea respiratorie a infecției sunt variabile predictive pentru deces.

În ce privește scorurile și indexurile de evaluare a bolnavilor cu sepsis, riscul de deces depinde de scorul SOFA, acesta fiind o variabilă independentă de predicție a decesului în modelul de regresie logistică univariată. Scorul SOFA nu se corelează cu numărul de criterii de SIRS dar un scor SOFA mare se asociază cu un număr mai mare de decese în prezența comorbidităților, existând o corelație pozitivă între scorul SOFA și Charlson's WIC, ce ar putea fi interpretată printr-o severitate crescută a disfuncțiilor de organ la pacienții cu comorbidități. Fiecare dintre componentele PIRO (Predispoziția, Infecția, Răspunsul, disfuncțiile de Organ) - sunt variabile independente de predicție a decesului în modelul de regresie logistică univariată. În regresie logistică multivariată, criteriul O este cel mai semnificativ pentru mortalitate ceea ce sugerează că identificarea și a corectarea rapidă a disfuncțiilor de organ este cea mai importantă intervenție terapeutică pentru îmbunătățirea prognosticului. Scorul compozit PIRO este predictiv pentru deces și se corelează cu rata mortalității, un scor PIRO egal cu 4 putând reprezenta un cut-off în prezicerea decesului. Având în vedere că în studiul nostru lipsa etiologiei a fost identificată drept factor de risc pentru deces, sugerăm că această variabilă (lipsa etiologiei) ar putea deveni unul din elementele scorului I.

CAPITOLUL 2. STUDIUL POTENȚIALILOR BIOMARKERI AI RĂSPUNSULUI INFLAMATOR SISTEMIC ÎN SEPSIS

SCOPUL CERCETĂRII

Scopul studiului nostru a fost de a încerca o nouă abordare, aceea a măsurării simultane a mai multor biomolecule cu ajutorul tehnologiei Luminex și de a determina eficiența și relevanța acestora în diagnosticul și monitorizarea pacienților cu sepsis precum și compararea rezultatelor obținute prin această nouă metodologie cu rezultate obținute prin metoda clasică – ELISA. Identificarea și combinarea moleculelor relevante într-un test comun care să permită măsurarea rapidă a tuturor acestor molecule ar putea deveni un instrument important atât pentru cercetare cât și pentru practica medicală în cazul pacienților cu sepsis.

MATERIAL ȘI METODE

În cadrul unui studiu observațional s-au măsurat niveluri serice seriate ale principalelor citokine proinflamatorii, chemokine și citokine antiinflamatorii implicate în răspunsul imun (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 α și MCP-1) la 30 de pacienți adulți cu sepsis. Pentru cuantificarea severității din perspectiva insuficiențelor de organ s-a utilizat scorul SOFA iar impactul bolilor asociate a fost apreciat cu

ajutorul indexului ponderat al comorbidităților propus de Charlson et al. Au fost înregistrate și alte date clinice, paraclinice și demografice relevante. Pe acest lot de pacienți am aplicat și modelul PIRO, scorul fiind calculat conform modelului propus de Rubulotta et al.

Determinarea diverselor molecule inflamatorii s-a realizat prin tehnica xMAP multiplex (Luminex) iar rezultatele obținute cu tehnologia xMAP au fost comparate cu rezultate obținute cu metodele convenționale (ELISA). Principiul multiplex care stă la baza tehnologiei Luminex permite determinarea cantitativă simultană a mai multor substanțe (până la 100) în diferite fluide biologice. Volumul de probă biologică necesar unei astfel de determinări este de 50 μ l.

Eșantioanele testate au fost independente, dar au existat variabile măsurate în mod repetat. Pentru compararea a două sau mai multe grupuri s-au utilizat diferite testele statistice în funcție de distribuția variabilei (testul Mann Whitney, Student, Kruskal-Wallis, Anova, testul Wilcoxon) iar analiza de corelație între variabile continue s-a efectuat prin determinarea coeficienților de corelație Pearson sau Spearman. Pentru constatarea influenței unui factor asupra evoluției în timp a unei variabile continue măsurate în mod repetat a fost utilizată analiza de profil cu modulul GLM. Pentru estimarea relației dintre două sau mai multe variabile, cea dependentă calitativă, iar variabilele independente cantitative sau calitative a fost folosită regresia logistică. Cele două metode de măsurare a citokinelor au fost comparate utilizând curbele ROC. Pragul de semnificație pentru testele folosite a fost luat $p = 0,05$. Calculele statistice au fost efectuate cu ajutorul aplicațiilor SPSS 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism 5.00 și Statistica 7.0.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pacienții (24 bărbați/6 femei) au avut o mediană a vârstei de 59 de ani. 25 de pacienți (83,3%) au prezentat sepsis sever conform definițiilor ACCP/SCCM iar nouă (30%) au prezentat șoc septic la internare. Cinci pacienți (16,6%) au decedat în prima săptămână. Infecția inițială a avut origine urinară (12), respiratorie (12), abdominală (4), dentară (1) și cutanată (1).

Studiind relația dintre concentrațiile serice ale citokinelor în ziua 1 și numărul de criterii de definire a SIRS la internare am constatat că pacienții cu 4 criterii prezente au avut concentrații semnificativ crescute de IL-8 comparativ cu cei cu 2 criterii prezente. Pacienții cu 4 criterii la internare au avut concentrații semnificativ mai mari de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α și IL-8 ($p < 0,01$) decât la pacienții cu doar 3 dintre criteriile de definire a SIRS prezente. În ziua 1, IL-10 a fost prezentă la niveluri mai crescute la pacienții cu 4 criterii decât la cei cu 3 criterii, însă fără semnificație statistică. Citokinele ale căror concentrații în ziua 1 s-au corelat pozitiv cu numărul de criterii de SIRS la internare au fost: IL-8 ($r=0,477$; $p=0,010$), IL-10 ($r=0,389$; $p=0,041$) și IL-17 ($r=0,412$; $p=0,030$).

Dintre cei 30 de pacienți incluși în studiu, 21 au prezentat comorbidități. Medianele concentrațiilor de IL-6, IL-8, IL-10 și IL-13 la pacienții "imunocompetenți" au fost mai mici decât la pacienții cu comorbidități, diferențe semnificative statistic înregistrându-se în ziua 5 pentru IL-6, pentru IL-8 în zilele 1-3 și 5-7, pentru IL-10 în zilele 1-6 iar pentru IL-13 pentru zilele 1-5. Dinamica acestora nu a diferit semnificativ în funcție de prezența sau absența comorbidităților.

Procalcitonina serica la internare a fost crescută la 93% din pacienți. În primele 3 zile pacienții cu PCT sub 0,5 ng/ml, au avut o mediana IL-10 semnificativ mai mare decât la cei cu PCT între 0,5 și 2 ng/ml ($p < 0,05$). În plus, am înregistrat mediane semnificativ mai mari ale concentrațiilor de IL-10 la pacienții cu PCT sub 0,5 ng/ml comparativ cu pacienții având PCT peste 2 ng/ml în zilele 4-5. MIP-1 β a prezentat de asemenea valori mediane semnificativ mai mari la pacienții cu PCT peste 10 ng/ml decât la pacienții cu PCT între 2 și 10 ng/ml în ziua 3.

Studiul a evidențiat asocieri interesante între originea infecției și profilul răspunsului la nivel molecular precum și între etiologie și intensitatea răspunsului inflamator. Sepsisul respirator a condus la niveluri mai mari ale medianelor citokinelor proinflamatorii IL-6, IL-8, TNF- α și MIP-1 β la toate momentele, și concentrații mai mari ale MCP-1 începând cu ziua 3, comparativ cu urosepsisul. Am detectat diferențe semnificative între medianele concentrațiilor de IL-6 în ziua 3, IL-8 în ziua 4, MCP-1 în ziua 3 și 5, MIP-1 β în ziua 1 și TNF- α în ziua 3. Comparând dinamica

citokinelor la pacienții cu sepsis respirator și sepsis urinar am decelat diferențe semnificative statistic pentru curbele descrise de moleculele proinflamatorii IL-1 β , IL-6, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α și de principala citokină antiinflamatorie IL-10. Plecând de la ipoteza stimulului extravascular în patogeniza sepsisului, sugerăm că bogăția de celule ale sistemului imunității în născute în arborele traheobronșic și în plămân stă la baza unui răspuns inflamator mai intens comparativ cu cel declanșat de infecțiile tractului urinar.

Sepsisul datorat bacteriilor Gram pozitive a determinat niveluri circulante inițiale mai mari decât sepsisul cu Gram negativi ale multora dintre citokinele proinflamatorii (IL-2, IL-6, IL-12, IL-17), chemokine (IL-8, MIP-1 β) și factori de stimulare (IL-7, G-CSF, GM-CSF). Diferențe semnificative statistic s-au înregistrat în ziua 1 pentru IL-8, IL-12, IL-17, MIP-1 β și GM-CSF, în ziua 2 pentru IL-2, în ziua 3 pentru IL-6 și GM-CSF și în ziua 4 pentru G-CSF, IL-7 și IL-12. Rezultatele concordă deplin cu mecanismele moleculare de inițiere a semnalizării intracelulare, conform cărora recunoașterea LPS este mediată de TLR4 pe cand infecția cu Gram pozitivi stimulează în principal TLR2.

Am observat astfel o corelație pozitivă între nivelurile MCP-1, MIP-1 β și IL-8 în primele trei zile și scorul SOFA în ziua 1. Cele mai bune corelații au fost observate pentru IL-8 în ziua 2 ($r = 0,47$; $p = 0,013$) și MIP-1 β în ziua 3 ($r = 0,42$; $p = 0,047$).

Comparând concentrațiile citokinelor la pacienții cu și fără șoc septic la internare am observat că în ziua 1 mediana MIP-1 β și GM-CSF au fost semnificativ mai mici la pacienții cu șoc ($p < 0,0001$ respectiv $p = 0,042$).

Citokinele proinflamatorii IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , G-CSF și TNF- α și citokina anti-inflamatorie IL-4 au prezentat o cinetică diferită la supraviețuitori față de decedați, cu valori medii persistent ridicate sau chiar dinamică crescătoare la nesupraviețuitori. Medianele concentrațiilor IL-8 în primele 3 zile și ale concentrațiilor MCP-1 în prima zi au fost semnificativ mai mari la pacienții care nu au supraviețuit ($p = 0,003$; $p = 0,002$; $p = 0,021$ pentru IL-8 în ziua 1, 2 și 3, respectiv $p = 0,024$ pentru MCP-1 în ziua 1).

În regresia logistică multivariată FORWARD cu variabile independente concentrațiile citokinelor în ziua 1 și variabilă dependentă decesul, concentrația IL-8a intrat în regresie la primul pas, indicand faptul IL-8 în ziua 1 a fost cea mai predictivă pentru deces. În același model avand ca și variabile independente diferențele între concentrațiile citokinelor în ziua 2 și ziua 1 (Δ CK = concentrația CK în ziua 2 - concentrația CK în ziua 1) și ca și variabilă dependentă decesul, la primul pas au intrat în regresie Δ IL-1 β urmată de Δ IL-8, indicand că Δ IL-1 a fost cea mai predictivă pentru deces, cel mai bine completată mai apoi de Δ IL-8. Media Δ IL-1 β a fost negativă la supraviețuitori, pe când la decedați a fost pozitivă.

În cadrul acestui studiu am încercat să continuăm cercetările anterioare, retrospective, în privința stratificării pacienților cu sepsis în funcție de riscul de deces dar din cauza numărului mic de cazuri scorul PIRO nu a fost asociat semnificativ statistic cu decesul. Aplicând scorul PIRO pe acest lot de pacienți ($n = 30$) am obținut un scor compozit a cărei medie a fost de 4,36 în rândul supraviețuitorilor respectiv 6,2 în rândul pacienților care au decedat ($p = 0,102$). În regresie logistică modelul ENTER scorul compozit PIRO nu s-a asociat semnificativ cu riscul de deces (OR = 1,45 cu interval de confidență 95% pentru OR între 0,90-2,32; $p = 0,123$).

De asemeni am încercat să propunem o eventuală alternativă a scorului PIRO anterior utilizat, care să includă ca și variabile ale aprecierii răspunsului gazdei și eventuali markeri circulanți ai acestuia. Δ IL-1 β alături de Δ IL-8 au fost singurele variabile care au intrat în regresia care a inclus Δ CK și scorul compozit PIRO. Acesta indică faptul că, pentru acest lot de pacienți, Δ IL-1 β alături de Δ IL-8 au fost mai predictive pentru deces decât scorul PIRO. Această observație ne-a determinat să cautăm valorile de cut-off ale celor două variabile, însă numărul redus de cazuri ne-a împiedicat să atingem semnificația statistică a predicției de deces pentru aceste valori prag.

Introducerea valorilor de cut-off ale Δ IL-1 β și Δ IL-8 în scorul PIRO (ca și variabile în componenta ce cuantifică răspunsul - R) nu a îmbunătățit predicția de deces. Această observație nu exclude însă posibilitatea ca Δ IL-1 β și Δ IL-8 să devină parametri incluși în scorul R din componența PIRO, rămânând ca studii viitoare pe un lot mai mare de pacienți să confirme sau să infirme utilitatea lor.

Concentrațiile medii de citokinelor testate au fost mai mari la determinarea prin Luminex comparativ cu ELISA, cu excepția IL-8. Coeficienții de corelație între valorile obținute prin tehnica multiplex și prin ELISA au variat între 0,711 și 0,993 pentru IL-8 și IL-6. Corelații pozitive am observat și între valorile TNF- α respectiv IFN- γ determinate cu Luminex respectiv ELISA cu excepția TNF- α în ziua 7 și IFN- γ în ziua 2 și 3. Alorile IL-12 și ale GM-CSF determinate prin ELISA au fost înregistrate ca fiind 0 pg/ml (constante) și nu am putut realiza corelații între ELISA și tehnica multiplex.

Studiul nostru a evidențiat faptul că mediile concentrațiilor de citokine testate au fost mai mari la determinarea prin Luminex comparativ cu ELISA, cu excepția IL-8. Am identificat însă corelații foarte bune între determinările citokinelor efectuate prin tehnica multiplex respectiv ELISA în cazul IL-6 și IL-8 și corelații acceptabile între determinările TNF- α și IFN- γ efectuate prin cele două tehnici. Prin compararea mediilor diferențelor cu range-ul valorilor absolute determinate prin cele două metode, am constatat că diferențele inter-individuale depășesc cu mult diferențele inter-metode atât pentru IL-8 cât și pentru IL-6. Prin compararea curbelor ROC de discriminare între pacienții cu sepsis și subiecții sănătoși am constatat că din punct de vedere al valorilor relative ale IL-6, IL-8, TNF- α și IFN- γ cele două metode de determinare sunt asemănătoare. Având în vedere că în cazul GM-CSF și IL-12 majoritatea probelor analizate prin ELISA s-au aflat sub limitele inferioare ale curbelor de standard, compararea celor două metode de determinare a acestor molecule în cadrul studiului nostru a fost practic imposibilă.

Date din literatură indică faptul că determinarea citokinelor cu ajutorul tehnologiei Luminex xMAP este comparabilă cu rezultatele obținute prin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), coeficientul de corelație r variind între 0,75 și 0,99. De asemenea există mai multe studii care raportează diferențe între valorile absolute determinate prin diferite metode multiplex și ELISA, cu păstrarea însă a tendințelor (a valorilor relative) concentrațiilor de citokine în loturile analizate. În aceeași linie de observații se înscrie și studiul nostru prin care, deși am observat diferențe cantitative, diferențele relative sunt comparabile, astfel că ambele metode sunt potrivite pentru analizarea tendințelor în care se înscriu moleculele analizate în anumite circumstanțe. Totodată, faptul că kiturile multiplex au avut un interval mai extins al valorilor detectabile decât kiturile de ELISA, a reprezentat un avantaj în studierea concentrațiilor de citokine la lotul nostru de pacienți care s-a dovedit a fi inhomogen din punct de vedere al răspunsului sistemic, cu concentrații ale unora dintre citokine variând larg. Acest aspect nu este neobișnuit în sepsis, distribuția concentrațiilor de citokine fiind una exponențială, cu atât mai mult cu cât pacienții incluși în studiu au prezentat grade diferite de severitate. În plus, avantajul net al tehnicii multiplex a fost acela de determinare simultană a 17 biomolecule din aceeași probă de ser.

CONCLUZII

În concluzie, studiul simultan al 17 biomolecule utilizând noua tehnologie Multiplex a indicat faptul că numărul criteriilor de definire a SIRS prezente la internare reflectă intensitatea răspunsului pro-inflamator dar și al celui anti-inflamator prezente concomitent în fazele inițiale ale sepsisului. Eliberarea de citokine nu pare să difere semnificativ între pacienții cu sepsis sub respectiv peste 65 de ani dar nivelurile unora dintre citokinele pro-inflamatorii diferă în sepsisul cu Gram negativi comparativ cu cel cu Gram pozitivi. Intensitatea răspunsului inflamator pare de asemenea dependentă de originea infecției, sepsisul respirator fiind asociat cu cele mai mari creșteri ale citokinelor pro-inflamatorii.

Principalele citokine și chemokine pro-inflamatorii (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 și TNF- α) au o cinetică diferită la pacienții cu sepsis care supraviețuiesc față de cei care decedază, la aceștia din urmă înregistrând un trend ascendent. Pacienții care nu supraviețuiesc au concentrații

inițiale crescute ale chemokinelor IL-8 și MCP-1 comparativ cu supraviețuitorii, concentrația IL-8 la internare fiind cea mai predictivă pentru deces dintre toate concentrațiile citokinelor studiate.

Atât tehnica Multiplex cât și tehnica ELISA sunt adecvate pentru analizarea tendințelor în care se înscriu moleculele analizate în anumite circumstanțe. Avantajul net al tehnicii Multiplex este acela că permite analiza rapidă, simultană a unei multitudini de molecule oferind o imagine de ansamblu foarte amănunțită în explorarea mecanismelor biologice din sepsis.

CONCLUZII GENERALE

1. Vârsta înaintată a pacienților reprezintă un factor de risc pentru deces, însă la nivel molecular răspunsul inflamator nu diferă între pacienții cu sepsis sub respectiv peste 65 de ani.
2. Este posibil ca prezența comorbidităților, mai frecvente la vârstnici, să fie cea care modifică tipul de răspuns inflamator și severitatea sindromului, ipoteză susținută de observația că indexul ponderat al comorbidităților propus de Charlson este predictiv pentru mortalitate.
3. PCT ar putea reprezenta un indicator indirect al activării monocitelor și a stresului inflamator, însă valorile procalcitoninei serice determinate la momentul diagnosticului nu sunt predictive pentru deces.
4. Răspunsul inflamator diferă în sepsisul cu Gram negativi și cel cu Gram pozitivi, însă se pare că această diferență nu influențează mortalitatea.
5. Originea infecției este una dintre cele mai importante variabile predictive pentru deces, cel mai mare risc fiind asociat cu sepsisul de origine respiratorie. Acesta se explică și prin faptul că intensitatea răspunsului inflamator este dependentă de originea infecției, sepsisul respirator fiind asociat cu cele mai mari creșteri ale citokinelor pro-inflamatorii.
6. Bacteriemia este o consecință a infecției scăpate de sub control la nivel tisular dar nu a fost un factor de risc pentru sepsis sever sau pentru deces la lotul de pacienți studiat.
7. Prezența sindromului de răspuns inflamator sistemic și numărul de criterii de SIRS sunt elemente prea sensibile și nespecifice în prezicerea mortalității, parametrii SIRS având valori de cut-off semnificative pentru predicția decesului superioare celor din definiția de consens a ACCP/SCCM. În schimb, numărul criteriilor de definire a SIRS prezente la internare reflectă intensitatea la nivel molecular a răspunsului pro-inflamator dar și al celui anti-inflamator prezente concomitent în fazele inițiale ale sepsisului.
8. Scorul SOFA este predictiv pentru deces, iar concentrațiile chemokinelor IL-8, MCP-1 și MIP-1 β în primele zile se corelează cu severitatea disfuncțiilor de organ cuantificată prin scorul SOFA la internare.
9. Este posibil ca diferența între concentrațiile IFN- γ în ziua a doua și cele din prima zi să completeze predicția de deces a scorului SOFA combinat cu indexul ponderat al comorbidităților propus de Charlson.
10. Scorul compozit PIRO este predictiv pentru deces și se corelează cu rata mortalității.
11. Scorul PIRO are o valoare prognostică deosebită, fiind mai eficient în prezicerea decesului decât scorul SOFA, Charlson's WIC și numărul de criterii de SIRS.
12. Pacienții care nu supraviețuiesc au concentrații inițiale crescute ale chemokinelor IL-8 și MCP-1 comparativ cu supraviețuitorii, concentrația IL-8 la internare fiind cea mai predictivă pentru deces dintre toate concentrațiile citokinelor studiate.
13. Principalele citokine și chemokine pro-inflamatorii (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 și TNF- α) au o cinetică diferită la pacienții cu sepsis care supraviețuiesc față de cei care decedază, la aceștia din urmă înregistrând un trend ascendent.
14. Diferențele între concentrațiile în ziua a doua și cele din prima zi ale IL-1 β respectiv IL-8 sunt predictive pentru deces și propunem studierea lor în viitor ca și potențiale componente ale scorului PIRO.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 2009; 101 (1): 36.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, et al. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171 (5): 461.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20 (6): 864.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29 (7): 1303.
- Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007; 11 (2): R49.
- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama* 1995; 274 (12): 968.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40 (5): 373.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36 (1): 296.
- Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2003; 71 (10): 5803.
- Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37 (7): 2290.
- Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003; 31 (5): 1560.
- Moreno RP, Metnitz B, Adler L, Hoechtel A, Bauer P, Metnitz PG. Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response. *Intensive Care Med* 2008; 34 (3): 496.
- Munford R. Sepsis, severe sepsis and septic shock. In: Mandell L, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennet's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier, 2005: 906.
- Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 2005; 23 (6): 488.
- Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27 (8): 1608.
- Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6 (3 Suppl): S55.
- Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993; 103 (2): 565.
- Popescu C, Popescu C. *Sepsis- actualitati si controversive*. Bucuresti: Editura Agerpress, 2002.
- Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M. Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37 (4): 1329.
- van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8 (1): 32.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22 (7): 707.
- Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med* 2008; 26 (6): 711.

CURRICULUM VITAE

Nume: MERA (căsătorită OLTEAN)

Prenume: SIMONA MARIELA

Data și locul nașterii: 24.04.1978, Cluj-Napoca

Adresa: Calea Floresti 3/38, 400509 Cluj-Napoca, ROMÂNIA

Studii:

1992 –1996: Liceului Teoretic “Emil Racoviță”, Cluj-Napoca, România

1997 – 2003: Facultatea de Medicină la Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

2002 : stagiul clinic/bursă Erasmus în cadrul Departamentului de Endocrinologie și Boli Metabolice din Hopital Sud, CHU Amiens, Franța, (3 luni)

Ian. 2004 – Dec. 2008: Medic rezident în specialitatea Boli Infecțioase, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca

Mai 2004 – Mai 2005: bursă de cercetare în cadrul Departamentului de Reumatologie și Studiul Inflamației, Academia Sahlgrenska la Universitatea din Göteborg, Spitalul Universitar Sahlgrenska, Göteborg, Suedia (12 luni)

2005 – studii doctorale la Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Încadrarea actuală:

Asistent universitar la Catedra de Boli Infecțioase a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Medic specialist în specialitatea Boli Infecțioase, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ:

Articole publicate în reviste internaționale cotate ISI: 4 (1 ca prim autor, 3 coautor)

1) FK506 donor pretreatment improves intestinal graft microcirculation and morphology by concurrent inhibition of early NF-kappaB activation and augmented HSP72 synthesis. Oltean M, Olofsson R, Zhu C, **Mera S**, Blomgren K, Olausson M. *Transplant Proc* 2005;37:1931-3.

2) Transplantation of preconditioned intestinal grafts is associated with lower systemic inflammatory activation and remote organ injury in rats. Oltean M, **Mera S**, Olofsson R, Zhu C, Blomgren K, Olausson M. *Transplant Proc* 2006;38(6):1775-8.

3) Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. **Mera S**, Magnusson M, Tarkowski A, Bokarewa M. *J Leukoc Biol.* 2007;15:

- 4) Reduced liver dysfunction and cytokine release following transplantation of preconditioned intestinal grafts. Oltean M, **Mera S**, Pullerits R, Zhu C, Matsby-Balzer I, Molne J, Blomgren K, Olausson M. *J Surg Res* 2009;145(1):36-44.
- 5) Vascular Endothelial Growth Factor A expression in uveal melanoma. Georgiu C, Mera M, **Mera S**, Gheban D, Călugaru D, Georgiu A. Medimond - Monduzzi Editore *International Proceedings of the 3rd Intercontinental Congress of pathology*, Barcelona, Spain, May 17-22, 2008, ISBN 978-88-7587-447-6.
- 6) Survivin expression in posterior uveal melanoma: an immunohistochemical study. Mera M, Georgiu C, **Mera S**, Gheban D, Călugaru D, Georgiu A. Medimond - Monduzzi Editore *International Proceedings of the 3rd Intercontinental Congress of pathology*, Barcelona, Spain, May 17-22, 2008, ISBN 978-88-7587-447-6.

Rezumate publicate în reviste internaționale cotate ISI: 6 (3 ca prim autor, 3 coautor)

- 1) Herpes Zoster and patient age. Bica A, **Mera S**, Lupșe M, Bondor C. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 4):114.
- 2) Time course of granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and IL-8 in severe sepsis: are the initial low levels of IL-8 a consequence of immunodepression? **Mera S**, Tățulescu D, Cismaru C, Flonta M, Cârștina D. *Critical Care* 2007; 11(Suppl 4):S18.
- 3) Reduced liver dysfunction and cytokine release following transplantation of preconditioned intestinal grafts. Oltean M, **Mera S**, Matsby-Balzer I, Molne J, Olausson M. *Transpl Int* 2007;20 (suppl 2):61.
- 4) Proinflammatory cytokine profile and its correlation with immunosuppressive therapy in septic patients. Cismaru C, **Mera S**, Tățulescu D, Zanc V, Flonta M. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(1):s84.
- 5) Early pattern of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma levels in septic patients. **Mera S**, Cismaru C, Zanc V, Tățulescu D, Flonta M, Cârștina D. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (suppl 7).
- 6) Survivin: any potential implication in early sepsis? **Mera S**, Tățulescu D, Cismaru C, Slavcovici A, Zanc V, Flonta M, Cârștina D. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(suppl 4): R2276.

Articole publicate în reviste naționale: 5 (2 ca prim autor, 3 coautor)

- 1) Serum profile of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma in early sepsis. **Mera S**, Tățulescu D, Cismaru C, Slavcovici A, Zanc V, Flonta M, Cârștina D. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009; 13(1): 81-85.
- 2) The profile of circulating IL-8 and GM-CSF in patients with severe sepsis. **Mera S**, Tățulescu D, Zanc V, Cismaru C, Flonta M, Cârștina D. *Timișoara Medical Journal* 2008; 58: 177-182.

3) The role of risk factors “CARMELI score” and infective endocarditis classification in the assessment of appropriate empirical therapy. Slavcovici A, Streinu-Cercel A, Tăţulescu D, Rădulescu A, **Mera S**, Marcu C, Vesbianu D, Topan A. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009; 13(1): 52-56.

4) Implicațiile stresului oxidativ în patologia infecțioasă. Tăţulescu D, Muntean M, **Mera S**, Briciu V, Aştilean A *Revista Română de Boli Infecțioase* 2008; 11:101-120.

5) For the general practitioner: Antioxidant therapy in acute viral hepatitis. Tăţulescu D, Turdean M, Mureşan A, **Mera S**. *Fiziologia-Physiology* 2006;(15).

Lucrări prezentate la manifestări științifice: 12 (9 internaționale, 3 naționale)

Participări la manifestări științifice: 13 (6 internaționale, 7 naționale)

Citări ale articolelor proprii în reviste internaționale cotate ISI: 11

Granturi de cercetare :

1) **Grant CNCSIS tip TD** (Director de grant) , Titlu: Noi biomarkeri in sepsis. (2007-2008).

2) **Grant CNCSIS tip A cod 548** (colaborator) Titlu: Evaluarea unor indicatori morfologici (neoangiogeneza), imagistici și moleculari (VEGF și survivina) ai potențialului metastazant al melanomului malign uveal. (2007-2008). Director de grant: Conf. Dr. Mera Mihaela.

3) **Reintegration Grant. NATO Programme SECURITY THROUGH SCIENCE** (Director de grant)- Titlu: Novel approaches in the rapid diagnosis and prognosis of severe infections and sepsis (2006-2009).

AFILIERI PROFESIONALE:

2008 – : Societatea Română de Boli Infecțioase

2009 – : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

LIMBI STRAINE CUNOSCUTE:

Engleză – foarte bine (vorbit/scrise)

Franceză – bine (vorbit/scrise)



**University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu”
Cluj-Napoca**

**THE EXPLORATION OF THE SYSTEMIC
INFLAMMATORY RESPONSE IN SEPSIS**

DOCTORAL THESIS FOR ATTAINING THE SCIENTIFIC TITLE OF PhD IN MEDICAL SCIENCE

- summary -

**Supervisor:
Prof. Dr. Dumitru Cârstina**

**PhD student:
Simona Mera (married Oltean)**

2010

CONTENTS OF THE THESIS

PART I: OVERVIEW

CHAPTER 1. INTRODUCTION	1
CHAPTER 2. PATHOGENETIC MECHANISMS IN SEPSIS	2
2.1. THE INFECTIOUS INSULT.....	2
2.1.1. MICROBIAL FACTORS.....	2
2.1.2. HOST FACTORS.....	10
2.1.3. THE MICROBIAL PATHWAYS OF INVASION.....	15
2.2. POST MICROBIAL AGRESSION RESPONSE.....	18
2.2.1. INFLAMMATION VS ANTI-INFLAMMATION.....	18
2.2.2. THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE.....	22
2.2.3. THE COAGULATION INBALLANCE.....	36
2.2.4. THE NEUROENDOCRINE REACTION	44
2.2.5. THE ANTIINFLAMMATORY RESPONSE.....	45
2.2.6. CELLULAR LESIONS.....	47
2.3. THE PATHOPHYSIOLOGY OF MODS AND SEPTIC SHOCK.....	48
CHAPTER 3. DEFINING SEPSIS AND SEPSIS SEVERITY	51
3.1. THE ASSESSMENT OF SEPSIS SEVERITY	53
3.1.1. Severity scores.....	53
3.1.2. The PIRO model for staging sepsis.....	55
CHAPTER 4. MARKERS AND MEDIATORS IN SEPSIS	57
4.1. MEASURES, MARKERS, AND MEDIATORS: A TAXONOMY.....	57
CHAPTER 5. FUTURE PERSPECTIVES IN SEPSIS THERAPY	62

PART II. ORIGINAL RESEARCH

CHAPTER 1. THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE – A COMPONENT OF RISK EVALUATION IN SEPTIC PATIENTS	64
1.1. AIM OF THE STUDY	64
1.2. MATERIALS AND METHODS.....	65
1.2.1. Study design.....	65
1.2.2. Statistical analysis.....	68
1.3. RESULTS.....	69
1.3.1. Patient characteristics.....	69
1.3.1.1. Underlying disorders.....	70
1.3.1.2. Inflammatory syndrome parameters.....	71
1.3.1.3. Microbiological data.....	73
1.3.1.4. Sepsis severity.....	80
1.3.2. Analysis of SIRS as a predictor of mortality.....	84
1.3.3. Application of PIRO model for staging sepsis.....	88
1.3.4. Comparison between the value of PIRO score, the number of SIRS criteria, SOFA score and Charlson’s WIC in mortality prediction.....	106
1.4. DISCUSSIONS.....	120
1.5. CONCLUSIONS.....	132
CHAPTER 2. POTENTIAL BIOMARKERS OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN SEPSIS	135
2.1. AIM OF THE STUDY	135

2.2. MATERIALS AND METHODS.....	136
2.2.1. Study design.....	136
2.2.2. Sample collection.....	137
2.2.3. The measurement of cytokines concentrations.....	137
2.2.3.1. The measurement by xMAP Multiplex technology.....	137
2.2.3.2. The measurement by ELISA.....	139
2.2.4. Statistical analysis.....	140
2.3. RESULTS.....	142
2.3.1. Patient characteristics.....	142
2.3.2. Cytokine concentrations.....	142
2.3.3. Cytokine concentrations and the number of SIRS criteria.....	147
2.3.4. Cytokine concentrations and the host characteristics.....	149
2.3.5. Cytokine concentrations and other inflammatory syndrome parameters.....	153
2.3.6. Cytokine concentrations and the infectious sites.....	154
2.3.7. Cytokine concentrations and etiology.....	158
2.3.8. Cytokine concentrations and sepsis severity.....	160
2.3.9. Cytokine concentrations and the mortality in sepsis.....	162
2.3.10. Cytokine concentrations and PIRO.....	169
2.3.11. Comparison between the methods of cytokine measurement: Luminex vs ELISA.....	172
2.4. DISCUSSIONS.....	177
2.5. CONCLUSIONS.....	188
<u>GENERAL CONCLUSIONS</u>	190
TABLE INDEX	192
FIGURE INDEX	196
ABBREVIATIONS LIST	199
REFERENCES	204

APPENDIX 1. The profile of circulating IL-8 and GM-CSF in patients with severe sepsis. Simona Mera, Doina Țățulescu, Virginia Zanc, Cristina Cismaru, Mirela Flonta, Dumitru Cârstina. *Timișoara Medical Journal* 2008;58(3–4):177-182.

APPENDIX 2. Serum profile of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma in early sepsis Simona Mera, Doina Țățulescu, Cristina Cismaru, Adriana Slavcovici, Virginia Zanc, Mirela Flonta, Dumitru Cârstina. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009;8(1):81-85.

KEY WORDS: sepsis, markers, mediators, systemic inflammatory response, prognostic, PIRO, cytokines, Luminex

PART I. OVERVIEW

Sepsis is a life-threatening clinico-biological syndrome secondary to an exaggerated inflammatory reaction in response to bacterial stimulation. Sepsis reveals a growing incidence and represents the second cause of death in the non-coronary intensive care units as well as the tenth global cause of death in developed countries, despite all recent progress in antibiotherapy.

Sepsis is initiated by bacterial stimuli but it is promoted and modulated by a multitude of endogenous mediators activated in a complex cascade of immunological events. However, the uncontrolled activation of various leukocyte subsets, the complement system, coagulation and fibrinolysis may generate microvascular injuries which ultimately may result in tissue ischemia and organ dysfunction.

The response to the microbial aggression has a stepwise development, steps that may follow each other very fast and may lead to severe and sometimes irreversible alteration in the clinical status and ultimately patient death. Hence, the early detection of therapy resistance as well as foreseeing progression towards advanced stages has a crucial importance for allowing timely adjustments in the therapy.

The main mediators of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) during sepsis are represented by several low-weight proteins released by numerous cell types and called cytokines and chemokines. These proteins are able to modulate the phenotype or the activity of various leukocyte subsets as well as other cell types (fibroblasts, endothelial cells).

The diagnosis, the monitoring and the treatment of septic patients as well as their stratification according to gravity and prognosis requires accurate definitions and criteria. To date, these are mainly based on the assessment of organ dysfunction (APACHE, SOFA, MODS). Some of these have the advantage of simplicity, however all are extremely unspecific and do not allow an accurate stratification and a rapid prognosis of the host response to infection. The most recent trends aim towards identifying novel, rapid and effective criteria based on the pathophysiological mechanisms behind the systemic response, including the analysis and use of various biomolecules. This could reveal new windows of opportunity for intervention that may predate the occurrence of the currently used diagnostic elements which appear relatively late and are rather unspecific.

A new model for stratification of septic patients based on Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction. has been recently suggested and presented under the acronym PIRO. This model considers several issues deemed as relevant for a better patient and syndrome description such as predisposing factors, concurrent morbidity, infection characteristics, host response features as well as the magnitude of organ dysfunction consequent to the development of the host response. The PIRO score is not routinely used yet and still requires clinical validation. The results of the first clinical evaluation in a large retrospective study, based on several tens of thousands of patients, have recently been released (2009). The study concludes that PIRO score may become an effective model for staging sepsis and appears to be highly predictive for mortality.

Besides these clinical scores undergoing a perpetual reassessment, tens of other bioactive molecules, either circulating or membrane-bound, have been suggested as markers for the presence, severity or development of sepsis due to their role in the pathophysiology of sepsis. Unfortunately, the characteristics of most of these suggested markers proved unsatisfactory with regard to specificity and sensitivity and the quest for identification of reliable markers for sepsis is still ongoing.

PART II. ORIGINAL RESEARCH

CHAPTER 1. THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE – AN ELEMENT IN THE ASSESSMENT OF RISK OF DEATH IN SEPTIC PATIENTS

AIM OF THE STUDY

The present study aimed the retrospective review of the inflammatory response and the role of SIRS in assessing the risk of death. We also aimed to apply for the first time on a group of Romanian patients a staging system based on the PIRO concept, as well as the analysis of its efficiency in predicting mortality. We also compared the PIRO score with SIRS and other several scores designed for predicting the risk of death such as SOFA, which assesses the critical patient considering the number of failing organs and the weighted index of comorbidities of Charlson, that takes into account patients' chronic comorbidities.

MATERIALS AND METHODS

We retrospectively reviewed the charts of all septic patient admitted over a period of 42 months (2006-2009) at the Clinic of Infectious Diseases in Cluj-Napoca. Patient demographics, clinical and laboratory data were recorded. Patients were included according to the 1992 ACCP/SCCM Consensus conference.

The parameters considered for calculation of PIRO score were age, tachycardia, tachipnoea, documented infection, origin of infection, initial infection site, type of infection, number of failing organs as well as the presence or absence of the two comorbidities in the score, namely congestive heart disease and chronic liver failure. Severity assessment from the perspective of organ failure at admission was done using the SOFA score and the impact of comorbidities on survival was assessed by the means of the weighted index of comorbidities (WIC).

The statistical analysis was performed using SPSS 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism 5.00. Depending on the distribution of values, comparison between two or more groups was performed using several statistical tests (Mann-Whitney, Student, t test, χ^2 test and Fisher's exact test). We calculated the relative risk (RR), Odds ration (OR) and the confidence interval to calculate the exposure risk for the studied factors. Correlations between continuous variables were performed using Spearman and Pearson correlations, respectively. Assessment of the relationship between two or more variables was done using logistic regression. A p value below 0,05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Fifty five out of the 250 patients studied of the patients (22%) died, 126 patients were discharged at home while 69 were transferred to other units and were counted as survivors. The origin of infection was urinary in 87 (34,8%) of cases, respiratory in 73 (29,2%), abdominal in 46 (18,4%), cutaneous in 23 (9,2%) and had other source in 21 (7,2%) of cases.

The mean age in deceased patients was $65,3 \pm 15,6$ while survivors had and mean age of $59 \pm 16,3$ ($p=0,024$). The relative risk of death (RR) in patients over 65 was $RR=1,68$ (confidence interval 1,05-2,68) and $OR=1,96$ (confidence interval 1,07-3,59). Majority of deceased patients had respiratory sepsis (60%), while urinary and abdominal sepsis represented 12,72% each out of the total deaths.

Blood culture was obtained in 197 out of 250 patients and ethiology was identified in 139 (55,6%) of cases. In 91 cases infection was secondary to Gram positive bacteria, in 44 cases was due to Gram negative, in three cases the origin was mixed while in one case infection was fungal. Ethiology remained unidentified in 111 cases. Among the 55 nonsurvivors, 34 (61,81%) had unidentified ethiology while out of the 195% it was only in 77 (34,48%) the ethiology remained

unidentified. Our study indicates that unidentified etiology is a risk factor for death, the death rate between the groups with and without etiology being statistically significant ($p=0,003$).

Unidentified etiology was associated with a relative risk of death (RR) of 2,06 (95% confidence interval 1,30-3,24) and OR of 2,62 (95% confidence interval 1,41-4,90). These results once again underline the weight of identifying etiology and targeted antibiotherapy for the clinical course and the prognostic of septic patients.

Procalcitonin (PCT) was analysed in 146 patients and was found increased in 135 (92,4%). PCT was significantly lower in patients with sepsis compared with patients presenting with septic shock, while the difference between PCT in patients with sepsis and severe sepsis was right under the level of statistical significance. PCT values were not predictive for death.

C reactive protein at the time of diagnosis did not significantly differ between survivors and non-survivors ($p=0,996$).

Shock was encountered more often in respiratory sepsis compared with urinary sepsis (48,8 % vs. 27,5%, $p=0,045$). The risk of developing septic shock in patients with respiratory sepsis was greater than in patients with urinary sepsis (RR=1,59 – confidence interval 1,03-2,44; OR=2,05 – confidence interval 1,06-3,96).

Ninety six out of the 250 patients (38,4%) had sepsis with severity criteria, 76 (30,4%) had severe sepsis and 78 (31,2%) had septic shock. The number of SIRS criteria in patients without severity criteria was lesser than in patients with septic shock ($p=0,006$). The difference between the average number of SIRS criteria in patients without severity criteria and those with septic shock was fell out of statistical significance. The difference in the number of deaths among patients with severe sepsis and septic shock was not significant. ($p=0,307$), yet the difference in death rate between septic patients and patients with severe sepsis or septic shock was highly significant ($p<0,0001$ in both cases). The present study indicated that the risk of death significantly depends on the number of SIRS criteria (although least significant out of the parameters studied), however the accuracy of death prediction for SIRS criteria was 78% and sensibility was 100%, however the specificity was 0. These results concord with previous studies indicating an association between the number of SIRS criteria and mortality but also is in agreement with the current opinion regarding the lack of specificity and the subsequent need for identification of more specific approaches of evaluating the risk in patients with sepsis.

Among the variables included in the definition of SIRS, heart rate differed significantly between survivors and nonsurvivors when the interval in SIRS definition was considered (above or under 90 beats/minute).

The analysis of body temperature (between 36°-38°C and < 36°C > 38°C respectively) or the respiratory rate (over and below 20/minute) did not reveal significant association with increased death rate. We found a significantly higher death rate for patients having body temperature $\leq 35,8^\circ$ and between 37,5°-39°C compared with 35,8°-37,4°C and $\geq 39^\circ$ C as well as between the respiratory frequency < 25 breaths/minute compared with ≥ 25 breaths/minute ($p<0,0001$). The same result was obtained while analysing the difference in the death rate in several heart rate intervals (≤ 100 beats per minute and >100 beats per minute respectively), where we found a higher death rate in patients with heart rate >100 .

Previous studies revealed that mortality doubles with the number of organ dysfunctions. The previous study confirms that mortality increases together with the number of failing organs. Thus, mortality was 3,92% in the absence of organ dysfunction, 8,21% for one dysfunctional organ, 23,07% for two, 52,08% for three, 50% for four and 66,66% for five dysfunctional organs respectively.

A significant increase in mortality was recorded when one more dysfunctional organ was added to patients with 2 or 3 organ dysfunctions ($p=0,002$) and between the mortality in patients with 1 or 2 dysfunctional organs respectively ($p=0,018$). The prevalence of organ dysfunction was

significantly higher in nonsurvivors ($p < 0,0001$ for respiratory and neurologic dysfunction, $p = 0,009$ for renal dysfunction).

SOFA score had a median of 4 (0-13) and an average of $4,2 \pm 3,2$. Patients with sepsis had an average SOFA score of $1,6 \pm 1,4$, patients with severe sepsis had an average SOFA of $5,1 \pm 2,6$ and patients with septic shock had an average SOFA score of $6,6 \pm 3,1$. SOFA score was found significantly higher in patients with septic shock compared with patients with sepsis and severe sepsis ($p < 0,0001$ and $p = 0,0014$ respectively).

Charlson's weighted index of comorbidities recorded significant differences between survivors and non-survivors ($p < 0,0001$). Using the univariate logistic regression –the ENTER method- and considering WIC as the independent variable and patient death as the dependent variable we found that the risk of death significantly depends on the WIC score ($p < 0,001$) with an OR = 1,59 and a 95% confidence interval between 1,31-1,93.

To the best of our knowledge, the present study applied for the first time the PIRO score in a Romanian series of patients. The uni- and multivariate analysis revealed numerous positive correlations between mortality and the PIRO, both as a whole and when its elements were taken individually (Predisposition, Infection, Response and Organ dysfunction).

The univariate logistic regression revealed that each of the components of PIRO score were independent prediction variables for death ($p < 0,001$ for P, O and R, $p = 0,003$ for I). The best OR was identified for the R component. However, for both R and I the specificity was 0.

Analysing the relationship between the components of the PIRO score we found a positive correlation between the I and R components as well as between the R and O components.

The multivariate logistic regression – the FORWARD method- having each of the PIRO score components as independent variables and as the dependent variable patient death showed that the O score was the most significant for mortality followed by P and R. The I score did not enter the regression model, indicating that it cannot explain the residual variation of the probability for patient death in comparison with the combination of the O, P and R score. The O score entered into the regression first, followed by the P score and then by the R score. This fact indicates that P correlates best with the residual variation of the probability for death after removing the variation owing to the O and P scores. The accuracy of prediction for the components of the PIRO score in the multivariate regression analysis shows a 90,7% sensitivity and 45,5% specificity.

We found positive correlations between the PIRO score and the number of SIRS criteria, SOFA score and Charlson's WIC. The best correlations recorded was that for the PIRO score and the SOFA score ($r = 0,61$; $p < 0,0001$).

The remarkable prognostic value of PIRO was confirmed by the multivariate logistic regression having PIRO, SOFA and WIC as independent variables and patient death as the dependent variable. The number of SIRS criteria did not enter regression, indicating that it cannot significantly explain the residual variation of the probability of death in comparison with the combined PIRO, SOFA and Charlson's WIC.

The current study combines the advantages and the disadvantages of a single center analysis. The advantages are represented by the identical methodology and diagnostic standards as well as the similar therapeutic protocols, while the disadvantages are due to the relatively limited size of the patient cohort. The small size and the unhomogenous group of patients did not allow the application of a multivariate logistic regression in order to create an own scoring system and therefore we chose to use the score of Rubulotta et al. Several other studies attempted the creation of models of a score based on the PIRO concept, and applied on the database of the multinational cohort SAPS 3 or on several better defined groups such as patients with community acquired pneumonia, ventilator-associated pneumonia och children. All these recent efforts underline the growing interest for the novel concept of classification and prognosis in sepsis represented by PIRO and confirms its potential. We anticipate that the near future and new prospective studies will confirm or refute the optimism surrounding this novel concept.

CONCLUSIONS

The number of SIRS criteria at admission is an independent predictive variable for death, yet the presence and number of SIRS criteria are too sensitive and unspecific elements in predicting mortality. Heart rate above 90 beats/minute is the only SIRS parameter significantly associated with mortality and a heart rate above 100 beats/minute is associated with death, has a higher significance and appears as a cut-off value. Serum procalcitonin or CRP at the time of diagnosis are not predictive for death. High age, the unidentified ethiology as well as the respiratory origin of infection are predictive for patient death.

Regarding the scores and the evaluation indexes, the risk of death depends on the SOFA score. This is an independent predictive variable for death in the model of multivariate logistic regression. SOFA score does not correlate with the number of SIRS criteria but a higher SOFA is associated with a greater number of deaths when commorbidities are present, revealing a positive correlation between the SOFA and Charlson's WIC that may be interpreted as an increased severity of organ dysfunction in patients with commorbidities. Each of the PIRO components (Predisposition, Infection, Response and Organ dysfunction) are independent predictive variables that predict death in the univariate logistic regression.

Multivariate logistic regression revealed that the O criteria is the most significant for mortality, suggesting that identification and rapid correction of organ dysfunction is the most important therapeutic intervention to improve the prognosis. The PIRO composite score is predictive for patient death and correlates with the mortality rate, a PIRO score of 4 being able to represent a cut-off in predicting patient death. Considering that our study identified the unidentified ethiology as risk factor for patient death we suggest that this variable (the lack of ethiology) to become an element of the I score.

CHAPTER 2. POTENTIAL BIOMARKERS OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN SEPSIS

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to assess a new approach, namely the simultaneous measurement of several biomolecules using the Luminex technology, and determine its efficiency and relevance in the diagnosis and monitoring of the septic patients, as well as to compare the results obtained using this technology and the classical method – ELISA. The identification and combination of the relevant molecules in a common test could become an important instrument both for research and for the medical management of the septic patients.

MATERIALS AND METHODS

We measured the serial serum levels of the main pro- and antiinflammatory cytokines and chemokines involved in the immune response (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 α și MCP-1) in 30 septic patients. To quantify the severity with regard to the organ failure we used the SOFA score while the impact of the associated diseases was estimated by the means of the Charlson's weighted index of commorbidities. Patient demographics, clinical and laboratory data were recorded. We also applied the PIRO model on this group of patients, using the model suggested by Rubulotta et al.

The analysis of the various inflammatory molecules has been performed by the xMAP multiplex (Luminex) technique and the results obtained were compared with the results obtained with conventional methods (ELISA). The multiplex principle at the base of the Luminex technology allows the quantitative simultaneous analysis of several substances (up to 100) in various biological fluids. The sample volume needed is 50 μ l.

The samples were independent but several variables were repeatedly assessed. Depending on the data distribution, various tests were used Mann Whitney, Student, Kruskal-Wallis, Anova,

Wilcoxon signed rank test) for the comparison between two or more groups. Correlations were performed by determining the Pearson and Spearman correlation coefficients. To assess the influence of one factor on the time course of a common variable we repeatedly used the profile analysis of the GLM module. To estimate the relationship between two or more variables, with the dependent variable qualitative and the independent values as both quantitative and qualitative we used logistic regression. The two measurement methods were compared using the ROC curve. The significance threshold in the tests used was set at $p=0,05$. The statistical analyses were performed by the means of SPSS 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism 5.00 and Statistica 7.0.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Patients (24 men/women) had a median age of 59. Twenty-five patients (83,3%) has severe sepsis upon admission according to the definitions of ACCP/SCCM while nine (30%) has septic shock at admission. Five patients (16,6%) died during the first week. The primary infection had urinary origin (12), respiratory (12), abdominal (4), dental (1) and cutaneous (1).

Analyzing the relationship between the cytokine serum concentrations at day 1 and the number of SIRS criteria at admission we found that patients with 4 present criteria had significantly higher IL-8 compared with patients with only 2 SIRS criteria present. Patients with 4 criteria at admission has significantly higher IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α and IL-8 ($p < 0,01$) compared with patients with only 3 SIRS criteria at admission. At day 1, IL-10 was found significantly increased in patients with 4 SIRS criteria compared with those having only 3 SIRS criteria. Cytokines whose concentrations at day 1 positively correlated with the number of SIRS criteria at admission were: IL-8 ($r=0,477$; $p=0,010$), IL-10 ($r=0,389$; $p=0,041$) and IL-17 ($r=0,412$; $p=0,030$).

Twenty-one out of the 30 patients studied had commorbidities. Median IL-6, IL-8, IL-10 and IL-13 concentrations in immunocompetent patients were lower than in patients with commorbidities and revealed significant differences at day 5 for IL-6, days 1-3 and 5-7 for IL-8, days 1-6 for IL-10 and days 1-5 for IL-13. The time-course, however, did not vary significantly with regard to the presence or absence of commorbidities.

Procalcitonin (PCT) at admission was increased in 93% of the patients. The patients with PCT below 0,5 ng/ml had significantly higher IL-10 median value over the first 3 days compared with patients having PCT between 0,5 and 2 ng/ml ($p < 0,05$). Moreover, we recorded significantly higher IL-10 median values in patients with low PCT ($< 0,5$ ng/ml) compared with patients having high PCT (> 2 ng/ml) at day 4-5. MIP-1 β showed higher median values in patients with PCT > 10 ng/ml compared with patients having PCT between 2 and 10 ng/ml at day 3.

Our study revealed some interesting relations between the site of infection and the molecular profile of the inflammatory response as well as between etiology and the intensity of the inflammatory response. Thus, the respiratory sepsis induced higher levels of the proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF- α and MIP-1 β at all time-points and higher MCP-1 levels starting with day 3 in comparison with the urosepsis. We found significant differences between the median values of IL-6 at day 3, IL-8 at day 4, MCP-1 at day 3 and 5, MIP-1 β at day 1 and TNF- α at day 3. The cytokine time-course in patients with respiratory and urinary sepsis revealed significant differences for the IL-1 β , IL-6, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α curves as well as for the main antiinflammatory cytokine IL-10. Considering the abundance in immune cells in both the upper and lower respiratory airways we believe that the innate immune response was more vigorous compared with that triggered by the urinary tract infections.

The Gram-positive sepsis lead to initial higher levels of several proinflammatory cytokines (IL-2, IL-6, IL-12, IL-17), chemokines (IL-8, MIP-1 β) growth factors (IL-7, G-CSF, GM-CSF) compared with the Gram-negative sepsis. Significant differences were recorded at day 1 for IL-8, IL-12, IL-17, MIP-1 β and GM-CSF, at day 2 for IL-2, at day 3 for IL-6 and GM-CSF and at day 4 for G-CSF, IL-7 and IL-12. The results fully agree with the known molecular mechanisms of

signalling, stating that LPS recognition is based on TLR4 while Gram positive infection mainly stimulates TLR2..

We also recorded a positive correlation between the MCP-1, MIP-1 β and IL-8 during the first three days and the SOFA score at day 1. The best correlations were observed for IL-8 at day 2 ($r = 0,47$; $p = 0,013$) and MIP-1 β at day 3 ($r = 0,42$; $p = 0,047$).

A comparison between patients with or without septic shock at admission revealed significantly lower median values of MIP-1 β and GM-CSF at day 1 in shocked patients ($p < 0,0001$ respectively $p = 0,042$).

The proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , G-CSF and TNF- α as well as the antiinflammatory cytokine IL-4 showed a different time-course in survivors and nonsurvivors, namely persistent increases or increasing trends in the deceased patients. Median IL-8 concentrations over the first three days as well as the MCP-1 concentration in the first day were significantly higher in nonsurvivors ($p = 0,003$; $p = 0,002$; $p = 0,021$ for IL-8 at day 1, 2 and 3 and $p = 0,024$ for MCP-1 at day 1).

The multivariate logistic regression (FORWARD) with cytokine concentrations at day 1 as the independent variable and patient death as the dependent variable entered into regression at the first step, indicating that IL-8 at day 1 was predictive for patient death. Using cytokine concentrations at day 2 as well as the difference in concentrations between day 2 and 1 (Δ CK = CK concentration at day 2 - CK concentration at day 1) as independent variable and patient death as the dependent variable, Δ IL-1 β and Δ IL-8 entered into regression at the first step indicating Δ IL-1 as the most predictive for patient death, complemented by Δ IL-8. Δ IL-1 β average has been found negative in survivors and positive in deceased patients.

In the current study we tried to continue our previous retrospective research on the stratification of septic patients depending on the risk of death, but due to the low number of patients, PIRO score could not be significantly associated with the risk of death. The application of the PIRO score in this series revealed an average score of 4,36 in survivors and 6,2 in nonsurvivors ($p = 0,102$). In logistic regression (ENTER) the composite score PIRO did not significantly associate with the risk of death (OR= 1,45 95% confidence interval 0,90-2,32; $p = 0,123$).

We also tried to suggest an alternative to the previously used PIRO score to include additional information on the host response and potential circulating markers. Δ IL-1 β and Δ IL-8 were the only variables that entered into the logistic regression including Δ CK and the PIRO composite score. This indicates that both Δ IL-1 β and Δ IL-8 were more predictive for patient death than PIRO score in our series of patients. Based on this finding we tried to identify eventual cut-off values, however the low number of patients hindered us to reach any statistical significance

The introduction of both Δ IL-1 β and Δ IL-8 cut-offs in the PIRO score (as variables of the R criteria, summarizing the host response) did not improve the prediction of death. This observation does not overrule the possibility that Δ IL-1 β and Δ IL-8 could become routine parameters of the R criteria in the composite PIRO score; future studies on larger patient series could either confirm or reject its usefulness.

The average concentrations of the tested cytokines were higher when analysed using the Luminex technique compared with ELISA, except IL-8. The correlation coefficients between the result of the multiplex and ELISA varied between 0,711 and 0,993 (for IL-8 and IL-6). We recorded positive correlations between TNF- α and IFN- γ (analysed with Luminex and ELISA respectively), except TNF- α at day 7 and IFN- γ at days 2 and 3. IL-12 and GM-CSF as determined by ELISA were inputted as 0 pg/ml (constant) and therefore in these cases we were unable to perform correlations between ELISA and the multiplex technique.

Our analysis also revealed that the average cytokine concentrations were higher while measured by the Luminex technique compared with ELISA, except for IL-8. However, we identified very good correlations between the concentrations determined by the multiplex

technique and ELISA (for IL-6 and IL-8) and acceptable correlations after the measurement of TNF- α and IFN- γ . Comparing the average differences with the range of the absolute values we found that the differences between individuals largely exceed the differences between methods both for IL-8 and for IL-6. The comparative analysis of the ROC curves between septic patients and healthy individuals allowed us to conclude that from the standpoint of the IL-6, IL-8, TNF- α and IFN- γ relative values the two methods are similar. Considering that most of the GM-CSF and IL-12 samples were below the lowest value on the standard curve the comparison of the methods using these two molecules was basically impossible.

Existing data in the literature indicate that cytokine determination using the analysis of Luminex xMAP technique is comparable with the results obtained using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and several papers reported correlation coefficients between 0,75 and 0,99. Moreover, several studies report differences between the absolute values determined by the means of different Multiplex methods and ELISA, however the trends were preserved between the analysed series. In line with these reports, our study confirms that both methods are suitable for monitoring the trends of various molecules. At the same time, the fact that the Multiplex kits had a broader measurement interval than the ELISA kits seems to have been represented an advantage in studying the cytokine concentrations in our patient series, which appeared as rather inhomogeneous from the standpoint of the systemic response. This issue is not unusual in sepsis, since cytokine distribution is exponential and the patients included herein had different grades of severity. In addition, another advantage of the multiplex technique was the simultaneous determination of 17 biomolecules out of the same serum sample.

CONCLUSIONS

The simultaneous analysis of 17 biomolecules by the use of the novel Multiplex technology indicated that the SIRS definition criteria adequately reflect the intensity of the inflammatory response as well as that of the antiinflammatory response in the early stages of sepsis. The cytokine release does not seem to significantly differ between patients above or below the age of 65 but the levels of several proinflammatory cytokines significantly differ between the Gram positive and the Gram-negative sepsis. The intensity of the response also seem to be influenced by the site of infection, the respiratory sepsis appears to be followed by the strongest proinflammatory cytokine response.

The time-course of the main cytokines and chemokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 and TNF- α) seem to differ between survivors and non-survivors, the later revealing an increasing trend over time. Non-survivors have had early increases in IL-8 and MCP-1 compared to survivors and IL-8 at admission is the most predictive for patient death among all the studied cytokines.

Both the Multiplex technique and ELISA are adequate for studying the trend of the analyzed molecules. The clear cut advantage of the Multiplex technique may be that it allows for the faster and simultaneous analysis of a panel of molecules, thus offering a comprehensive overview in the exploration of the biological mechanisms in sepsis.

GENERAL CONCLUSIONS

1. High age represents a risk factor for patient death, however the inflammatory response does not differ in septic patients below or above 65.
2. It is possible that comorbidities, more frequently in the elderly, change the type of inflammatory response and the severity of the syndrome. This concurs with the observation that Charlson's WIC is predictive for mortality.
3. PCT may represent an indirect marker of monocyte activation and may mirror the inflammatory stress, however serum PCT levels are not predictive for death.
4. the inflammatory response differs between the Gram negative sepsis and the Gram positive sepsis, however this difference does not influence the outcome.

5. The site of infection is one of the most important predictive values for patient death, the greatest risk being associated with the respiratory sepsis. This may also be explained by the most intense inflammatory response and the largest increases in the proinflammatory cytokines ensuing after respiratory infections.
6. Bacteremia is the result of the inability to control infection at the tissue level, but it was not found as a risk factor for severe sepsis or patient death in the studied cohort.
7. The presence of the systemic inflammatory response syndrome and the number of SIRS criteria are too sensitive and unspecific elements to accurately predict mortality. The presence of SIRS and the number of SIRS criteria are too sensitive and unspecific elements to accurately predict death; SIRS parameters have cut-off values superior to those in the ACCP/SCCM consensus definition, yet number of the definition criteria seem to accurately mirror the intensity at a molecular level of the proinflammatory response as well as of the anti-inflammatory response, both concomitantly present in the early stages of sepsis.
8. SOFA score is predictive for patient death and IL-8, MCP-1 and MIP-1 β levels during the first days correlates with the severity of organ failure quantified by the SOFA score at admission.
9. It is possible that the variation in IFN- γ levels between the first and the second day after admission complements the prediction of patient death given by SOFA and Charlson's WIC.
10. The composite PIRO score is predictive for patient death and correlates with the mortality rate.
11. The PIRO score has a particular prognostic value and is more efficient in predicting patient death than SOFA, Charlson's WIC and the number of SIRS criteria.
12. Nonsurvivors have higher early IL-8 și MCP-1 levels. IL-8 level at admission predicts most accurately patient death among all the studied cytokines.
13. The main proinflammatory cytokines and chemokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 and TNF- α) have a different time-course in patients surviving sepsis compared with patients which die in the disease, the latter revealing an increasing trend over time.
14. The difference in IL-1 β and IL-8 concentrations between the first and the second day after admission are predictive for patient death and we suggest its inclusion in future revised PIRO scores

REFERENCES

- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 2009; 101 (1): 36.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, et al. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171 (5): 461.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20 (6): 864.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29 (7): 1303.
- Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007; 11 (2): R49.

- Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama* 1995; 274 (12): 968.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40 (5): 373.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36 (1): 296.
- Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2003; 71 (10): 5803.
- Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37 (7): 2290.
- Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003; 31 (5): 1560.
- Moreno RP, Metnitz B, Adler L, Hoechtl A, Bauer P, Metnitz PG. Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response. *Intensive Care Med* 2008; 34 (3): 496.
- Munford R. Sepsis, severe sepsis and septic shock. In: Mandell L, Bennett J, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennet's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier, 2005: 906.
- Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 2005; 23 (6): 488.
- Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27 (8): 1608.
- Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6 (3 Suppl): S55.
- Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993; 103 (2): 565.
- Popescu C, Popescu C. *Sepsis- actualitati si controverse*. Bucuresti: Editura Agerpress, 2002.
- Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M. Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37 (4): 1329.
- van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8 (1): 32.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22 (7): 707.
- Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med* 2008; 26 (6): 711.

CURRICULUM VITAE

Family name:: MERA (married OLTEAN)

Given names: SIMONA MARIELA

Birth date and place: 24.04.1978, Cluj-Napoca

Education:

1992 – 1996 National College “Emil Racoviță”, Cluj-Napoca, Romania

1997 – 2003: Faculty of Medicine, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania (M.D.)

2002 : clinical elective (Erasmus programme) Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, CHU Amiens, France (3 months)

2004 – 2008: Resident in Infectious Diseases, Clinic of Infectious Diseases, Cluj-Napoca

2004 – 2005: research fellowship at the Department of Rheumatology and Inflammation Research, Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Sahlgrenska University Hospital Göteborg, Sweden (12 months).

2005 – PhD student , “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca

Current appointments:

Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

Specialist in Infectious Diseases, Clinic of Infectious Diseases, Cluj-Napoca, Romania

SCIENTIFIC ACTIVITY:

Papers in international journals (indexed by ISI): 6 (1 as first author, 5 as co-author)

1) FK506 donor pretreatment improves intestinal graft microcirculation and morphology by concurrent inhibition of early NF-kappaB activation and augmented HSP72 synthesis. Oltean M, Olofsson R, Zhu C, **Mera S**, Blomgren K, Olausson M. *Transplant Proc* 2005;37:1931-3.

2) Transplantation of preconditioned intestinal grafts is associated with lower systemic inflammatory activation and remote organ injury in rats. Oltean M, **Mera S**, Olofsson R, Zhu C, Blomgren K, Olausson M. *Transplant Proc* 2006;38(6):1775-8.

3) Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. **Mera S**, Magnusson M, Tarkowski A, Bokarewa M. *J Leukoc Biol.* 2007;15:

- 4) Reduced liver dysfunction and cytokine release following transplantation of preconditioned intestinal grafts. Oltean M, **Mera S**, Pullerits R, Zhu C, Matsby-Balzer I, Molne J, Blomgren K, Olausson M. *J Surg Res* 2009;145(1):36-44.
- 5) Vascular Endothelial Growth Factor A expression in uveal melanoma. Georgiu C, Mera M, **Mera S**, Gheban D, Calugaru D, Georgiu A. Medimond - Monduzzi Editore *International Proceedings of the 3rd Intercontinental Congress of pathology*, Barcelona, Spain, May 17-22, 2008, ISBN 978-88-7587-447-6.
- 6) Survivin expression in posterior uveal melanoma: an immunohistochemical study. Mera M, Georgiu C, **Mera S**, Gheban D, Calugaru D, Georgiu A. Medimond - Monduzzi Editore *International Proceedings of the 3rd Intercontinental Congress of pathology*, Barcelona, Spain, May 17-22, 2008, ISBN 978-88-7587-447-6.

Abstracts in international journals (ISI): 6 (3 as first author, 3 as co-author)

- 1) Herpes Zoster and patient age. Bica A, **Mera S**, Lupse M, Bondor C. *Clin Microbiol Infect* 2006;12 (Suppl 4):114.
- 2) Time course of granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and IL-8 in severe sepsis: are the initial low levels of IL-8 a consequence of immunodepression? **Mera S**, Tăţulescu D, Cismaru C, Flonta M, Carstina D. *Critical Care* 2007;11(Suppl 4):S18.
- 3) Reduced liver dysfunction and cytokine release following transplantation of preconditioned intestinal grafts. Oltean M, **Mera S**, Matsby-Balzer I, Molne J, Olausson M. *Transpl Int* 2007;20 (suppl 2):61.
- 4) Proinflammatory cytokine profile and its correlation with immunosuppressive therapy in septic patients. Cismaru C, **Mera S**, Tăţulescu D, Zanc V, Flonta M. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(1):s84.
- 5) Early pattern of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma levels in septic patients. **Mera S**, Cismaru C, Zanc V, Tăţulescu D, Flonta M, Carstina D. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 (suppl 7).
- 6) Survivin: any potential implication in early sepsis? **Mera S**, Tăţulescu D, Cismaru C, Slavcovici A, Zanc V, Flonta M, Carstina D. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(suppl 4): R2276.

Papers in national journals: 5 (2 as first author, 3 as co-author)

- 1) Serum profile of IL-6, TNF-alpha, IL-12 and IFN-gamma in early sepsis. **Mera S**, Tăţulescu D, Cismaru C, Slavcovici A, Zanc V, Flonta M, Cârstina D. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009; 13(1): 81-85.
- 2) The profile of circulating IL -8 and GM-CSF in patients with severe sepsis. **Mera S**, Tăţulescu D, Zanc V, Cismaru C, Flonta M, Cârstina D. *Timisoara Medical Journal* 2008; 58: 177-182.

3) The role of risk factors “CARMELI score” and infective endocarditis classification in the assessment of appropriate empirical therapy. Slavcovici A, Streinu-Cercel A, Tăţulescu D, Radulescu A, **Mera S**, C. Marcu, Vesbianu D, Topan A. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009; 13(1): 52-56.

4) Implicațiile stresului oxidativ în patologia infecțioasă. Tăţulescu D, Muntean M, **Mera S**, Briciu V, Aştilean A *Revista Română de Boli Infecțioase* 2008; 11:101-120.

5) For the general practitioner: Antioxidant therapy in acute viral hepatitis. Tăţulescu D, Turdean M, Mureşan A, **Mera S**. *Fiziologia-Physiology* 2006;(15).

Presented papers: 12 (9 international, 3 national)

Attended scientific meetings: 13 (6 international, 7 national)

Citations in international journals (ISD): 11

Research Grants :

1) **Grant CNCSIS tip TD** (Grant Director) , Title: Noi biomarkeri în sepsis. (2007-2008).

2) **Grant CNCSIS tip A cod 548** (External collaborator) Title: Evaluarea unor indicatori morfologici (neoangiogeneza), imagistici și moleculari (VEGF și survivină) ai potențialului metastazant al melanomului malign uveal. (2007-2008). Grant Director: Assoc. Prof. Mera Mihaela.

3) **Reintegration Grant. NATO Programme SECURITY THROUGH SCIENCE** - Title: Novel approaches in the rapid diagnosis and prognosis of severe infections and sepsis (2006-2009).

MEMBERSHIPS :

2008 – : Romanian Society of Infectious Diseases

2009 – : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

FOREIGN LANGUAGES:

English- very well (spoken/written)

French – well (spoken/written)