



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Farmacologia e Anestesiologia

Dottorato di Ricerca in Farmacologia, Tossicologia e Terapia
Ciclo XXI

Indagine sieroproteomica in pazienti con sepsi grave e shock settico

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Rosa Maria Gaion

Supervisore : Ch.mo Prof. Carlo Ori

Dottorando: Paolo Persona

Riassunto

Obiettivo di questo studio è identificare, attraverso l'analisi sieroproteomica, eventuali nuovi marcatori in pazienti affetti da sepsi, sepsi grave e shock settico; mettere in luce differenze nel pattern proteomico tra pazienti che sopravvivono o meno alla sepsi; cercare nel pattern proteomico eventuali cause di fallimento della terapia standard del paziente settico.

Per fare ciò è stato necessario prima analizzare i pazienti secondo le caratteristiche cliniche e bioumorali, classificarli e identificare i migliori markers prognostici e indici di gravità. Si è proceduto poi ad analizzare i pattern sieroproteomici, cercando una relazione tra i dati clinici e bioumorali. L'indagine ha riguardato 61 pazienti affetti da sepsi, sepsi grave e shock settico. I dati bioumorali hanno rivelato una forte correlazione tra aumento di Procalcitonina e gravità del paziente, con buona correlazione con il SOFA score (Pearson's correlation 0,477; $p=0,0001$); Procalcitonina si è rivelata anche il miglior indice prognostico con $p<0.026$ in 6° giornata. Alterazioni della coagulazione con diminuzione di piastrine, aumento di D-dimero e variazione del PT hanno mostrato correlazioni significative con gravità e outcome non costanti però durante il periodo di osservazione. L'analisi sieroproteomica dei dati ha evidenziato nei pazienti settici una significativa alterazione nei confronti dei soggetti controllo di Platelet Activating Factor 4, Cytokine A18 precursor, di una serie di proteine della famiglia delle Apolipoproteine e di fattori del Complemento; solo Complement factor 3 è risultato essere correlato significativamente anche con la gravità del quadro clinico.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the proteomic pattern of patients affected by sepsis, severe sepsis and septic shock. First of all we analyzed the common circulating factors to identify the best parameters to estimate severity, prognosis or further course of the disease. The best marker to estimate severity was procalcitonine (PCT). Higher values in severe sepsis and septic shock (p -value <0.012 - 0.001 - 0.001 and 0.003 on day 1-3-6 and 9) than in sepsis. D-dimers more increased in more critical patients too. About the relationship between parameters and outcome, there are significant differences in PCT-levels on day 9 ($p<0.026$, $2,05 \mu\text{g/L}$ in dead patients vs $0,4 \mu\text{g/L}$ in recovered patients). An important thrombocytopenia was observed on day 6-9 and 12 in patients with poor-outcome ($p<0.02$ - 0.02 and 0.012 respectively. On the proteomic side, we found significative expression of Platelet activating Factor 4, Cytokine A18 precursor, Apolipoprotein family and complement factors; only Complement factor 3 was related to severity of illness.

Indice

- Introduzione pag 7
- Descrizione dello studio pag 47
- Risultati
 - analisi parametri sieroematici pag 51
 - analisi sieroproteomica pag 85
- Discussione pag 125
- Conclusioni pag 143
- Bibliografia pag 145

INTRODUZIONE

DEFINIZIONE DI SEPSI, SEPSI GRAVE E SHOCK SETTICO

Negli Stati Uniti la sepsi è oggi responsabile di oltre 100.000 morti l'anno [1]. E' una delle sfide più difficili sia per i medici sia per i ricercatori, che da anni studiano nuove e sempre più efficaci terapie per affrontare al meglio questa sindrome ad esito spesso fatale.

La reazione dell'ospite all'invasione di un microorganismo coinvolge una polifonia di segnali e di risposte che rapidamente si amplificano e che possono estendersi al di là del tessuto invaso.

Il termine "sepsi" ancora oggi viene usato con significati differenti.

In Europa, fin dalla definizione data da Schottmuller, "sepsi" e "setticemia" sono sinonimi e vengono usati per indicare un'infezione batterica generalizzata con batteriemia persistente [1]. Nel 1992 i membri dell'American College of Chest Physicians (ACCP) e la Society of Critical Care Medicine (SCCM) svilupparono una definizione più precisa [2]. Essi introdussero il concetto di SIRS, ossia l'attivazione di una reazione infiammatoria sistemica grave, infettiva e non, che si manifesta quando sono presenti due o più tra le seguenti condizioni:

temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$;

frequenza cardiaca >90 battiti al minuto;

frequenza respiratoria >20 atti al minuto oppure $\text{PaCO}_2 <32$
mmHg oppure ventilazione meccanica;

conta leucocitaria $>12000/\text{mm}^3$ o $<4000/\text{mm}^3$ oppure $>10\%$
di forme immature.

Con il termine SEPSI viene indicata la condizione in cui sia presente una risposta infiammatoria sistemica contemporaneamente ad un'infezione presunta o documentata.

Si parla di SEPSI GRAVE quando è associata disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione: l'ipotensione o le anomalie della perfusione possono causare

acidosi lattica, oliguria o alterazione dello stato mentale.

La disfunzione degli organi può interessare uno o più apparati o sistemi (cardiovascolare, respiratorio, renale, epatico, coagulazione, sistema nervoso centrale) o provocare acidosi metabolica altrimenti inspiegabile.

Per SHOCK SETTICO si intende una sepsi con ipotensione nonostante adeguata infusione di liquidi e terapia con farmaci vasopressori e/o inotropi, associata alla presenza di anomalie della perfusione che possono comprendere acidosi lattica, oliguria, o un'alterazione acuta dello stato mentale, ma non sono limitate a queste.

Infine la SINDROME DA INSUFFICIENZA MULTI-ORGANO (MOF) si ha quando c'è una funzione organica alterata in un paziente con malattia acuta tale che l'omeostasi non possa più essere mantenuta senza intervento terapeutico massivo.

Solo nel 2001 però si giunse ad una definizione più soddisfacente e precisa formulata dalla Society of Critical Care Medicine (SCCM), la European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), l'American College of Chest Physicians (ACCP), l'American Thoracic Society (ATS) e la Surgical Infection Society (SIS) che sponsorizzarono l'International Sepsis Definitions Conference.

Utilizzando segni e sintomi, marcatori cellulari, citochine, dati microbiologici e parametri coagulativi, vennero stilati una serie di criteri diagnostici ben precisi, elencati nella tabella seguente[3]:

Tabella I: Criteri diagnostici di sepsi (International Sepsis Definitions Conference 2001):

-Infezione:

Documentata o sospettata e alcuni tra i seguenti parametri:

-Parametri generali

Febbre (temperatura corporea $>38.3^{\circ}\text{C}$)

Ipotermia (temperatura corporea $<36^{\circ}\text{C}$)

Frequenza cardiaca >90 bpm o >2 DS superiori ai valori normali per età

Tachipnea: >30 bpm

Alterato stato mentale

Edema significativo o bilancio di liquidi positivo (>20 ml/kg nelle 24 h)

Iperglicemia (glucosio plasmatico >110 mg/dl o 7.7 mM/l) in assenza di diabete

-Parametri infiammatori

Leucocitosi (GB >12,000/ μ l)

Leucopenia (GB <4,000/ μ l)

GB normali con >10% di forme immature

Proteina C reattiva plasmatica < 2 DS inferiore al valore normale

Procalcitonina plasmatica >2 DS superiori al valore normale

-Parametri emodinamici

Ipotensione arteriosa (pressione sistolica <90 mmHg, pressione arteriosa media <70 o diminuzione della pressione sistolica >40 mmHg negli adulti o <2 DS sotto i valori normali per età)

Saturazione di ossigeno venosa mista <70%

Indice cardiaco <3.5 l/min/m²

-Parametri di disfunzione d'organo

Ipossiemia arteriosa (PaO₂/FIO₂ <300)

Oliguria acuta (urine output <0.5 ml/kg/h o 45 mM/l per almeno 2 h)

Aumento creatinina \geq 0.5 mg/dl

Anormalità coagulazione (INR >1.5 o APTT >60 s)

Ileo paralitico (peristalsi assente)

Trombocitopenia (conta piastrinica $<100.000/\mu\text{l}$)

Iperbilirubinemia (bilirubina totale $>4 \text{ mg/dl}$ o 70 mmol/l)

-Parametri di perfusione tissutale

Iperlattacidemia ($>3 \text{ mmol/l}$)

Diminuito riempimento capillare

E' importante ricordare che nessuno dei parametri sopraelencati è specifico di sepsi e nella pratica clinica si utilizzano ancora i criteri ACCP/SCCM del 1992.

Dal punto di vista eziologico la sepsi può essere la risposta a infezioni causate da qualsiasi classe di microrganismi.

L'invasione microbica della circolazione ematica non è essenziale per lo sviluppo di sepsi: anche la diffusione locale o sistemica di molecole di segnale o di tossine microbiche può sollecitare la risposta.

Circa il 20-40% dei pazienti con sepsi severa e il 40-70% di quelli con shock settico presentano emocolture positive per batteri o funghi. Singoli batteri Gram-negativi o Gram-positivi rendono conto approssimativamente del 70% di quelli isolati; i restanti sono miceti o associazioni di microrganismi [4]. In pazienti le cui emocolture risultano negative, l'agente eziologico viene spesso stabilito sulla base della coltura o dell'esame microscopico di materiale infetto prelevato localmente.

La sepsi è solitamente reversibile, mentre molti pazienti con shock settico muoiono nonostante l'istituzione di terapie aggressive.

A tale scopo si sono dimostrate efficaci alcune misure di ordine generale, quali la ventilazione meccanica a bassi volumi correnti, il reintegro dei fluidi e l'uso di farmaci vasoattivi titolati sulla saturazione dell'O₂ dell'emoglobina nel sangue venoso misto (SVO₂), la glicemia entro i limiti fisiologici; non ultime il controllo dei foci infettivi e l'antibiotico-terapia mirata. Dal 2001 si parla di Early Goal-Directed Therapy, riferendosi all'ottimizzazione del precarico, postcarico e contrattilità cardiaca per accoppiare al meglio domanda e consumo di ossigeno [5].

EPIDEMIOLOGIA E COSTI

L'incidenza di sepsi severa e shock settico è aumentata negli ultimi 15 anni, raggiungendo attualmente i 300.000-500.000 casi per anno; circa i 2/3 dei casi si verificano in pazienti ospedalizzati per altre patologie [4].

E' la seconda causa di morte nelle Unità di Terapia Intensiva; la tabella II riporta incidenza e mortalità nelle T.I. italiane:

Tab II: Andamento della sepsi nelle T.I. in Italia [4]

	INCIDENZA	MORTALITA'
SEPSI	27,9%	36%
SEPSI SEVERA	11,6%	52%
SHOCK SETTICO	6,1%	81%

Il numero di pazienti affetti da sepsi per anno è aumentato da 164.072 nel 1979 a 659.935 nel 2000, un incremento del 13,7% annuo [6].

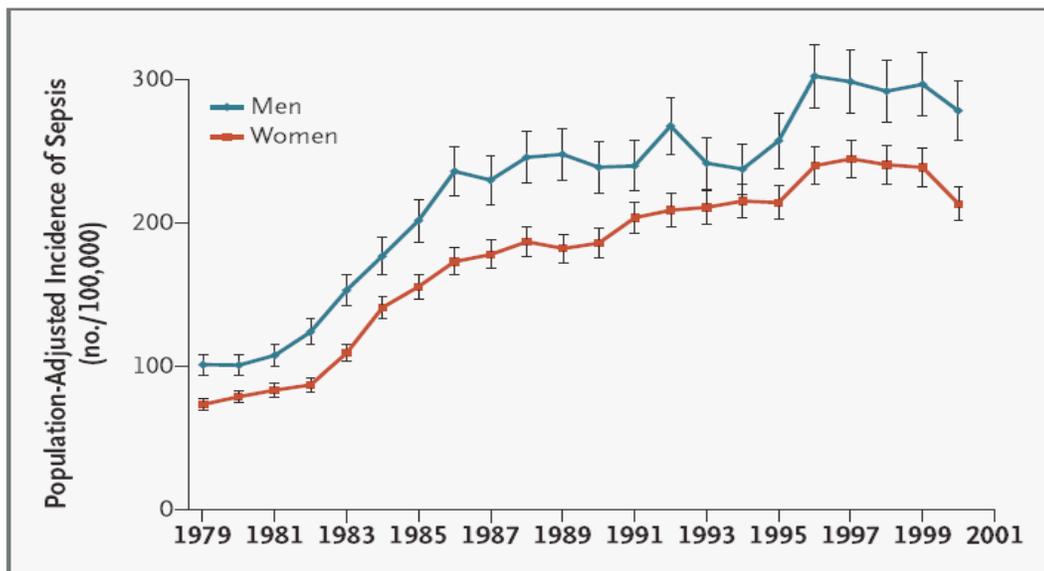


Fig.1: Incidenza di sepsi aggiustata sulla popolazione. 1979-2000

Le possibili cause dell'aumento d'incidenza della sepsi negli ultimi anni comprendono in primo luogo un aumento delle segnalazioni da parte dei medici,

che hanno acquisito una consapevolezza maggiore delle modalità con cui la sepsi si presenta e dell'importanza della sua progressione verso la sepsi grave.

In secondo luogo, è aumentata la popolazione di pazienti a rischio e ciò potrebbe essere dovuto :

- ad un maggior uso di procedure invasive;
- all'aumento della sopravvivenza dei pazienti a rischio di sepsi;
- alla maggior sopravvivenza dei neonati prematuri;
- all'invecchiamento della popolazione e all'aumentata sopravvivenza dei pazienti con malattie croniche;
- all'aumentato ricorso a terapie immunosoppressive, chemioterapie e trapianti;
- all'aumento di infezioni da HIV;
- all'incremento delle resistenze batteriche agli antimicrobici e all'aumento delle infezioni ospedaliere [4,6];
- al miglioramento della tecnologia medica, che ha ridotto la mortalità, ma ha aumentato la morbilità dei pazienti.

Negli studi di Rossi et al. e del gruppo EPISEPSIS l'età media dei pazienti colpiti è risultata di 61 anni, i siti di infezione più frequenti sono risultati a livello polmonare e intraddominale, mentre le colture microbiologiche sono risultate positive nel 58% dei casi [7].

La frequenza relativa dei microrganismi patogeni che causano sepsi è variata nel tempo: dal 1979 al 1987 la sepsi è stata causata per la maggior parte da batteri gram-negativi; nel 2000 invece i gram-positivi sono risultati responsabili nel 52,1% dei casi; oltre all'aumento dei batteri gram-positivi, si è anche registrato un aumento di infezioni fungine come causa di sepsi [8,9].

La proporzione di pazienti con sepsi che ha presentato un'insufficienza d'organo, marker di severità della patologia, è aumentata nel tempo dal 19,1% nei primi 11 anni dello studio al 30,2% degli ultimi anni. L'insufficienza d'organo ha un effetto cumulativo sulla mortalità: approssimativamente il 15% dei pazienti senza

insufficienza d'organo muore, mentre fino al 70% dei pazienti con insufficienza multi-organo non sopravvive. Gli organi che più spesso vanno incontro ad insufficienza sono i polmoni (18% dei pazienti) ed i reni (15% dei pazienti); meno frequentemente si osservano un'insufficienza cardiovascolare (7%), ematologica (6%), metabolica (4%) e neurologica (2%).

La mortalità dei pazienti ospedalizzati è diminuita del 27,8% durante i primi 6 anni dello studio e del 17,9% durante gli ultimi 6 anni [8]. (Fig.2)

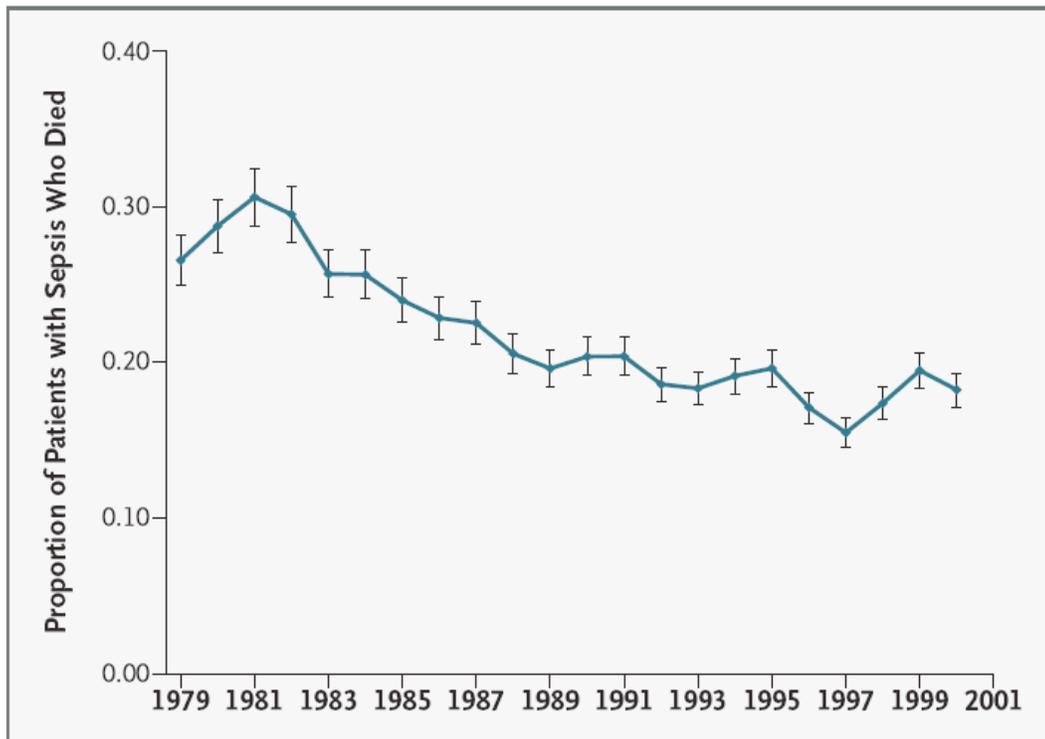


Fig.2: Mortalità nei pazienti ospedalizzati 1979-2000

Nelle Unità di Terapia Intensiva i pazienti settici rimangono ricoverati per lunghi periodi e i costi di cura sono molto elevati: per 23,3 giorni di ricovero si arrivano a spendere \$29.900. La spesa annua per la cura della sepsi è di 16,7 miliardi di dollari negli USA.[1]

Secondo lo studio di Martin et al. la cura dei pazienti settici costa \$50.000 per paziente e circa 17 miliardi di dollari all'anno negli USA. [7]

FISIOPATOLOGIA DELLA SEPSI

Le nostre conoscenze sulla fisiopatologia molecolare della sepsi sono cresciute significativamente negli ultimi 25 anni.

Il *primum movens* della risposta infiammatoria è rappresentato da uno stimolo infettivo che, a contatto con il sangue, viene riconosciuto come estraneo dal sistema immunitario [10,11].

Per discutere della fisiopatologia della sepsi bisogna tenere presente alcuni punti chiave. In primo luogo che è la risposta dell'ospite, piuttosto che la natura del microrganismo patogeno, a determinare l'esito del paziente. In secondo luogo che i monociti e le cellule endoteliali giocano un ruolo centrale nell'iniziare la risposta dell'ospite e nel perpetuarla. Terzo, la sepsi è associata ad una attivazione contemporanea delle cascate dell'infiammazione e coagulativa. Infine, la risposta dell'ospite contro i patogeni provoca danni collaterali ai tessuti normali [12].

Il modello correntemente accettato individua come causa prima un'attivazione non controllata della **risposta immune innata**, con un minor contributo della risposta immune adattativa.

I **macrofagi** sono le prime cellule fagocitarie ad arrivare a contatto con i patogeni: essi giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta infiammatoria seguente ad un insulto [11]. Recenti ricerche sui batteri gram negativi hanno evidenziato che i recettori Toll-like situati sulla superficie dei macrofagi permettono di identificare gli agenti infettivi grazie al riconoscimento del lipopolisaccaride (LPS). Il LPS dei microrganismi gram negativi stimola i macrofagi a produrre citochine, che, a loro volta, attivano le cellule T e B e implementano le risposte immunitarie adattative.

Il TLR4 (Toll-like receptor 4) è il recettore per il lipopolisaccaride e la sua stimolazione induce l'attivazione a livello intracellulare del fattore nucleare kB (NF-kB). L'attivazione del NF-kB coinvolge la fosforilazione e la degradazione dell'IkB, un inibitore del NF-kB, che permette la traslocazione degli eterodimeri di NF-kB al nucleo. Il sistema NF-kB/IkB esercita una regolazione trascrizionale sui geni proinfiammatori, che codificano varie citochine e molecole di adesione. L'attivazione del NF-kB permette l'induzione di geni effettori NF-kB dipendenti,

come quelli del TNF- α , dell'IL-1, chemochine e molecole di adesione [13]. L'eccessiva e prolungata stimolazione dei macrofagi conduce ad un circolo vizioso di rilascio dei mediatori dell'infiammazione: questi agiscono sinergicamente e aumentano ulteriormente la risposta infiammatoria.

Le **citochine** sono un elemento chiave nella risposta infiammatoria che caratterizza la sepsi e lo shock settico: sono peptidi immunoregolatori con una potente azione infiammatoria e le loro interazioni possono provocare o attenuare il danno tissutale.

Tra le citochine proinfiammatorie troviamo:

-TNF α : una delle più importanti citochine coinvolte nella fisiopatologia della sepsi; è un mediatore dell'infiammazione locale: attiva l'endotelio vascolare, induce la produzione di ossido nitrico che determina vasodilatazione, aumenta la permeabilità vascolare e l'espressione delle molecole di adesione sull'endotelio. I risultati finali sono l'attivazione del complemento, il reclutamento di cellule infiammatorie e l'attivazione di linfociti T e B con produzione di immunoglobuline. L'azione del TNF- α è mediata dal suo legame con due differenti recettori (chiamati p55 e p75) localizzati su neutrofili, cellule endoteliali e fibroblasti;

-IL-1: stimola la sintesi e il rilascio di prostaglandine, elastasi, collagenasi, promuove la migrazione transendoteliale dei neutrofili e attiva le cellule endoteliali microvascolari che rispondono rilasciando PAF e IL-8;

-IL-8: è una citochina chemotattica, guida lo spostamento dei neutrofili e l'espressione di molecole di adesione sulla loro superficie.

TNF α e IL-1 inibiscono la contrattilità miocardica, inducono il rilascio della muscolatura liscia vascolare e aumentano la permeabilità vascolare.

Tra le citochine, l'IL-10 ha invece una potente azione antinfiammatoria e inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie e chemochine. Il bilancio tra citochine proinfiammatorie e antinfiammatorie è cruciale nella risposta dell'ospite alle infezioni [14].

I **neutrofili**, una volta attivati dai prodotti batterici, si trasferiscono rapidamente nel sito dell'infiammazione locale e lì rilasciano il contenuto dei loro granuli primari e secondari per la distruzione dei batteri. Questo può tuttavia anche danneggiare l'organismo stesso e determinare una distruzione microvascolare .

Anche le **cellule dell'endotelio microvascolare** giocano un ruolo fondamentale nei processi di patogenesi della sepsi poiché l'endotelio non è un organo passivo: il danno all'endotelio è il risultato del contatto con numerose sostanze nocive, tra cui anche le citochine prodotte durante la risposta infiammatoria. Questo danno determina la trasformazione delle cellule endoteliali da superfici anti- a pro-coagulanti, la sintesi di molecole che promuovono l'adesione, il rolling e la tras migrazione dei leucociti, la produzione di sostanze vasoattive, un'aumentata permeabilità e conseguente perdita delle funzioni di barriera e, infine, l'induzione dell'apoptosi. Il risultato finale è l'aumento della permeabilità microvascolare, la formazione di edema e conseguente ipotensione dati dalla massiva perdita di liquidi nell'interstizio. Questo collasso circolatorio in combinazione con le microtrombosi (si veda sotto) conducono all'insufficienza multiorgano spesso fatale nella sepsi. (Fig. 3) [9-18].

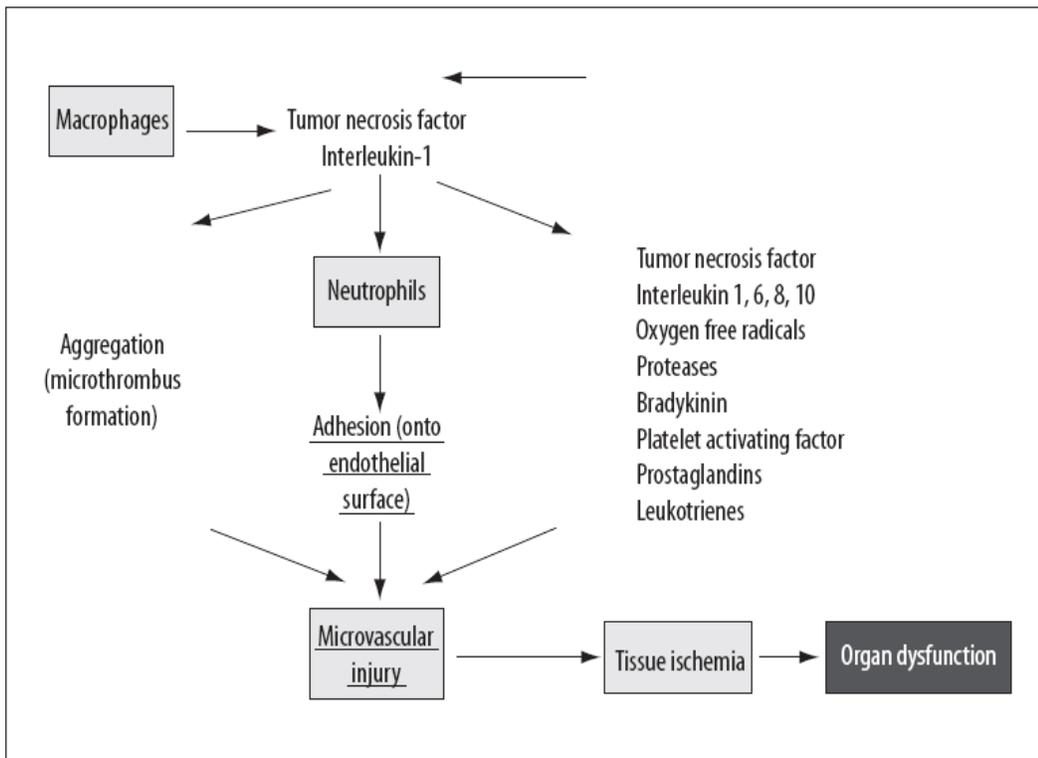


Fig.3: Lo stimolo tossico attiva i macrofagi, che producono citochine (TNF α e IL-1). Questo determina l'attivazione dei neutrofilii e successiva adesione alle cellule endoteliali, aggregazione, formazione di microtrombi e produzione di citochine che alterano la parete microvascolare. Il risultato finale è danno con ischemia tissutale e disfunzione d'organo.

Altri mediatori dell'infiammazione che giocano un ruolo importante sono:

- le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che fanno parte della difesa contro i microorganismi, ma possono disorganizzare le membrane e portare a necrosi delle cellule;
- il nitrossido (NO), che si pensa sia una tra le molecole segnale più importanti che conducono alla vasodilatazione resistente alle amine e alla depressione del miocardio caratteristiche dello shock settico;
- l'acido arachidonico (AA), che viene metabolizzato dalla ciclossigenasi o dalla 5' lipossigenasi a prostagladine o leucotrieni, che hanno potenti effetti proinfiammatori;
- il fattore attivante le piastrine (PAF), che ha effetti diretti sull'endotelio (stimola l'adesione dei neutrofilo) e porta a cambiamenti nella forma delle cellule in seguito al riarrangiamento della struttura del citoscheletro. Questo risulta in una perdita dei legami intercellulari e può contribuire all'aumento del danno microvascolare e all'aumento della permeabilità caratteristica della sepsi;
- eicosanoidi, che hanno potenti effetti locali, come una profonda vasocostrizione, aggregazione piastrinica, infiltrazione dei neutrofilo e aumento della permeabilità vascolare [11,13].

Nel corso della sepsi, l'alterazione del **sistema della coagulazione** rappresenta un indice di criticità importante: i pirogeni endogeni TNF- α , IL-1 e IL-6 hanno un'azione endocrina sul fegato e danno inizio alla risposta di fase acuta, in tal modo si sposta il programma di biosintesi in senso procoagulante e viene repressa la sintesi degli anticoagulanti endogeni. E' aumentato il rilascio di fibrinogeno e ridotto quello di antitrombina e questo può essere causa di formazione di trombi microvascolari, che alterano la perfusione d'organo e ne promuovono la disfunzione; il numero delle piastrine può subire improvvise e drastiche variazioni ed esitare in coagulazione intravascolare disseminata (CID), con conseguente aumento della mortalità.

Più in particolare, dati recenti hanno dimostrato che il modello dell'attivazione del sistema della coagulazione non è più quello classico «a cascata» ma quello cellulare [18], dove il fattore tissutale (TF), complessato con il fattore VIIa sulla superficie di membrana, è ritenuto il maggiore attivatore della coagulazione *in vivo*,

seguito dalla massiva amplificazione della produzione di trombina da parte del complesso protrombinasico, composto dal fattore Xa e fattore Va. Tale evento si sviluppa sulla superficie delle piastrine attivate.

A sua volta, l'infiammazione sistemica si manifesta, in parte, quando citochine come il TNF- α e l'IL-1 sono rilasciate nella circolazione sistemica, dove inducono l'espressione del TF sui monociti e sulle cellule endoteliali.

La trombina con questa serie di eventi sinergizza l'azione infiammatoria delle endotossine sull'endotelio, che amplifica il processo coagulativo inibendo gli inibitori della coagulazione (fibrinolisi). L'endotelio vascolare svolge un ruolo attivo nel processo di coagulazione indotta dalla sepsi, ma è anche centrale nei meccanismi di fibrinolisi. Il principale stimolo all'avvio del processo fibrinolitico è fornito dalla trombina che stimola il rilascio di attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) consentendo efficacemente, in presenza di fibrina, la conversione da plasminogeno a plasmina. Quando la produzione di plasmina eccede la capacità di neutralizzazione da parte del suo inibitore specifico, l' α 2-antiplasmina, l'azione proteolitica non è più limitata alla fibrina, ma investe anche altri fattori della coagulazione. Il meccanismo deputato all'inibizione della fibrinolisi è essenzialmente rappresentato dalla sintesi e rilascio di un inibitore specifico di t-PA, il PAI-1, anch'esso di sintesi endoteliale, in grado di complessarsi irreversibilmente con esso neutralizzandone rapidamente l'attività. Oltre al PAI-1 recentemente è stato identificato un nuovo zimogeno, l'inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina (TAFI), che rimuove la lisina e l'arginina carbossiterminali dalla fibrina e riduce l'attivazione del plasminogeno provocando così una diminuzione della fibrinolisi [15-22].

Riassumendo, l'attivazione dell'endotelio da parte di citochine proinfiammatorie provoca da un lato un'amplificazione dell'infiammazione, dall'altro una coagulazione intravascolare il cui principale fattore, la trombina, da una parte inibisce la dissoluzione del coagulo, dall'altro induce una ulteriore amplificazione del fenomeno infiammatorio (Fig.4) [23].

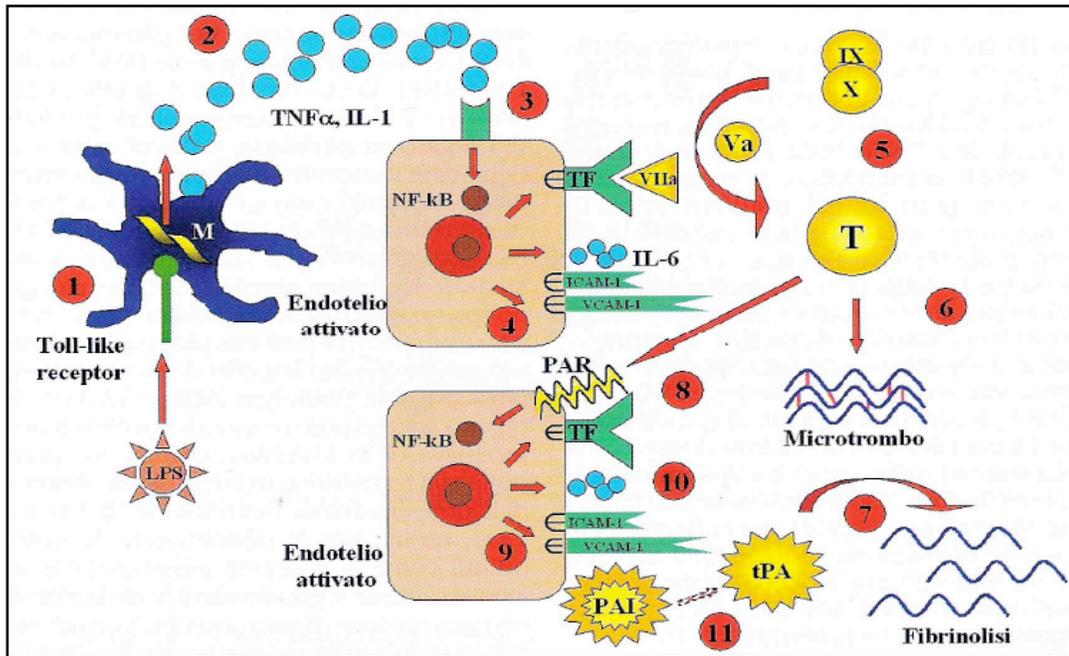


Fig. 4: 1) l'endotossina si lega ad un recettore superficiale del macrofago; 2) stimolazione produzione di TNF- α e IL-1; 3) trascrizione geni proinfiammatori mediante NF-kB; 4) attivazione endotelio e liberazione endotossine e TF; 5) TF lega e attiva il fattore VII innescando la vie estrinseca della coagulazione; 6) Attivazione trombina e formazione di fibrina→formazione del coagulo; 7) la plasmina attivata dal tPA, limita le dimensioni del trombo; 8/9) la trombina è pure in grado di attivare il sistema NF-kB nell'endotelio 10) ciò amplifica la risposta infiammatoria e 11) stimola il PAI ad inattivare il tPA

L'organismo dispone di tre vie principali che ostacolano l'attivazione e la propagazione dei processi infiammatori e coagulativi: gli inibitori fisiologici della coagulazione (inibitore della via del fattore tissutale, antitrombina, proteina C attivata), controllando la formazione della trombina, hanno proprietà antinfiammatoria indiretta.

L'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI) inibisce la generazione di fattore Xa e IXa della cascata coagulativa. La rilevanza clinica di questa via inibitoria nella sepsi non è chiara, in quanto i livelli di TFPI sono normali nei pazienti settici [24].

L'antitrombina (AT) è il più importante inibitore fisiologico delle serin-proteasi generate durante le reazioni a cascata della coagulazione e della fibrinolisi. L'AT

ha una potente attività anticoagulante, sia perché blocca direttamente la trombina, sia perché inibisce e diminuisce la formazione di enzimi che portano alla produzione di trombina stessa [23]. L'azione dell'AT è aumentata di circa 1000 volte dall'eparina e dai glicosaminoglicani (GAGs) presenti nell'endotelio. Il legame dell'AT ai GAGs induce la formazione di PGI-2 che inibisce la formazione di citochine e l'attivazione leucocitaria (Fig 5).

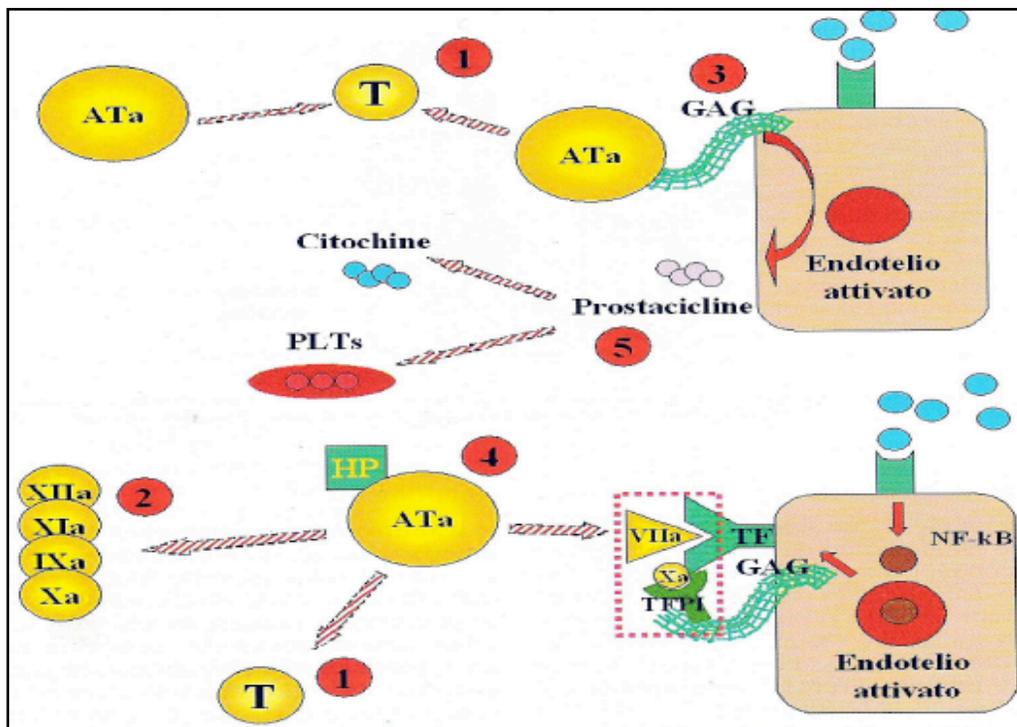


Fig.5: 1) l'antitrombina: blocca la trombina con meccanismo diretto, 2) i fattori XIIa, IXa e Xa, 3) mediante meccanismo subordinato alla presenza di GAG sull'endotelio o 4) GAG esterni come l'eparina (HP). 5) Infine induce l'endotelio a produrre prostacicline che limitano l'aggregazione piastrinica e la sintesi di citochine proinfiammatorie.

La trombomodulina (TM) nelle cellule endoteliali, legandosi alla trombina, ne modula l'azione: il complesso trombina/TM favorisce l'attivazione della proteina C ed il suo legame al recettore endoteliale. La proteina C attivata (APC) ha molteplici funzioni. La sua azione anticoagulante viene esplicata bloccando selettivamente i fattori Va e VIIIa e conseguentemente riduce la produzione di trombina, ha un'azione fibrinolitica poiché forma complessi stabili con i PAI-1 e ne blocca l'azione [23], infine ha un'azione antinfiammatoria perché, bloccando l' NF-kB nei

monociti e nelle cellule endoteliali, blocca la produzione di TNF- α , inibendo così una via fondamentale per la produzione delle citochine infiammatorie e per l'espressione di molecole di adesione (Fig.6)

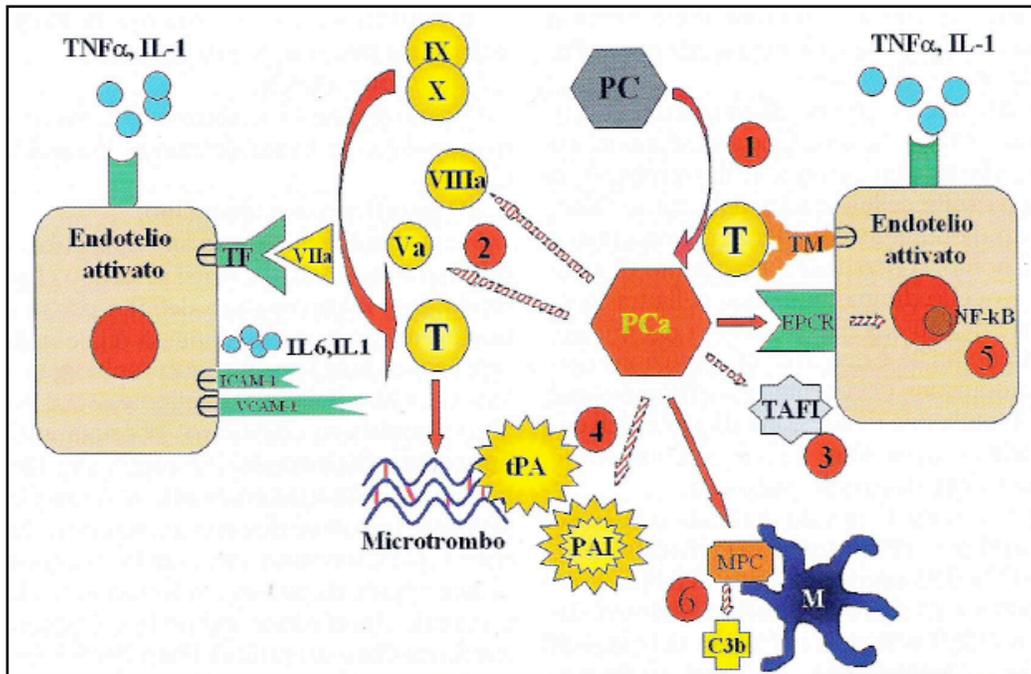


Fig. 6: l'APC. 1) la proteina C viene attivata da T/TM ed EPCR, 2) blocca i fattori Va e VIIIa, 3) diminuisce la sintesi di trombina e riduce la produzione di TAFI, 4) con legame diretto con il PAI favorisce la fibrinolisi, 5) inibisce la sintesi di citochine inibendo il NF-kB dopo legame con EPCR

L'espressione di GAG e TM sulla superficie cellulare è inibita dalle citochine infiammatorie e dal lipopolisaccaride, che bloccano così l'aumento di attività antitrombinica determinato dai GAG e la formazione di proteina C attivata da parte della TM [25].

E' quindi sempre presente una coagulopatia correlata alla sepsi [16] e, se l'attivazione dei sistemi della coagulazione è massiva, c'è la possibilità di andare incontro a coagulazione intravascolare disseminata (CID), caratterizzata da un'importante deposizione di fibrina nel circolo, che può compromettere l'apporto di sangue ai vari organi per occlusione trombotica microvascolare [25], e da consumo di piastrine e proteine del sistema della coagulazione, che può indurre un severo sanguinamento (Fig.7). La CID contribuisce all'insufficienza multiorgano e peggiora

la prognosi della malattia [26,27].

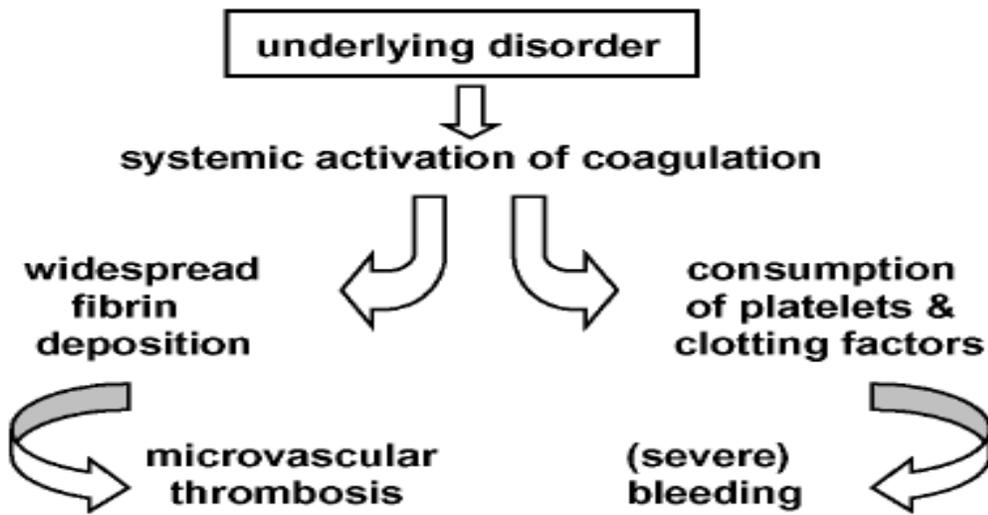


Fig 7: patogenesi CID [27]

Riassumendo, le attuali conoscenze sulla fisiopatologia della sepsi permettono di affermare che infiammazione e coagulazione sono anelli della stessa catena. All'attivazione dei fenomeni infiammatori e coagulativi è sempre associata una reazione di feedback negativo, con espressione di molecole ad azione antinfiammatoria, anticoagulatoria e fibrinolitica e la compartimentalizzazione dell'infezione, cioè la sua delimitazione nello spazio e nel tempo, dipende da un corretto bilancio dei vari componenti della rete. La sepsi si verifica in caso di prevalenza di fenomeni infiammatori e coagulativi (Fig. 8) [23].



Fig 8: alterazione dell'omeostasi durante la sepsi [28,29,30]

CLINICA E PRINCIPI DI TERAPIA

Per identificare un paziente con una sepsi in atto non abbiamo a disposizione sintomi, segni, dati di laboratorio specifici. Essa viene diagnosticata generalmente in base ad un insieme di alterazioni che ci consentono di ipotizzarne la presenza. L'obiettività clinica e i segni di laboratorio sono spesso collegabili alla SIRS e alla disfunzione d'organo [28].

Sono spesso presenti:

- alterazioni della temperatura corporea, più frequentemente c'è febbre, a causa del rilascio in circolo di citochine (IL-1 e TNF α), talvolta può essere presente ipotermia, che in genere indica una prognosi peggiore;
- alterazioni polmonari con tachipnea, ipossiemia, riduzione della saturazione arteriosa di O₂ e del rapporto PaO₂/FiO₂, riduzione della saturazione venosa di O₂, alcalosi respiratoria fino all'insufficienza respiratoria;
- alterazioni cardiache, di solito tachicardia, talvolta diminuzione della frazione di eiezione per depressione delle performance miocardiche e conseguente aumento della pressione venosa centrale e della PAOP;
- manifestazioni a carico dei vasi periferici con diminuzione delle resistenze vascolari e conseguente ipotensione per effetti vasodilatatori di PGI₂, bradichinine,

nitrossido e riduzione della contrazione della muscolatura liscia dei vasi data dalle citochine;

-manifestazioni renali con oligoanuria, aumento di urea e creatinina fino alla necessità di terapia depurativa con CVVH, soprattutto ad alti flussi;

-alterazioni del sistema della coagulazione con diminuzione di PT, aumento di APTT, D-dimero e diminuzione delle piastrine e della proteina C;

-alterazioni della funzionalità epatica con ittero, ipo/iperglicemia, aumento degli enzimi;

-alterazioni a carico del sistema nervoso centrale, con confusione, delirio, letargia fino al coma per alterazioni del flusso cerebrale [29-32].

Infine possono essere presenti sintomi correlati con la sede dell'infezione primitiva, come dolore addominale nel caso di infezione addominale, escreato purulento con insufficienza respiratoria per una partenza polmonare, disuria o stranguria per un'infezione delle vie urinarie, gonfiore articolare e immobilità per le localizzazioni articolare od ossea, cefalea per un'infezione del SNC o una meningite.

Diversi interventi di supporto sono necessari per migliorare gli standard di cure nel paziente affetto da sepsi. Nel 2004 un gruppo di esperti [32] ha promosso una campagna di sensibilizzazione generale e messo a punto le nuove linee guida per il trattamento della sepsi.

La rianimazione iniziale di un malato in sepsi severa o in ipoperfusione tissutale indotta dalla sepsi (ipotensione o acidosi lattica) dovrebbe iniziare immediatamente dopo l'identificazione della sindrome e non dovrebbe essere ritardata dall'attesa del ricovero del paziente in Terapia Intensiva. Durante le prime 6 ore gli obiettivi della rianimazione dovrebbero includere i seguenti punti come facenti parte di un protocollo di terapia:

a) Una pressione venosa centrale (PVC) di 8- 12 mm Hg

a) Una pressione arteriosa media (PAM) > di 65 mm Hg

b) Una diuresi oraria > 0.5 ml/Kg/h-1

c) Una ScVO₂ (saturazione del sangue nella vena cava superiore) o SvO₂ (saturazione venosa mista d'ossigeno) > 70%.

Le colture necessarie dovrebbero essere raccolte sempre prima dell'inizio della terapia antibiotica. La terapia antibiotica endovenosa dovrebbe essere iniziata

entro la prima ora dal riconoscimento della sepsi grave, e dopo il prelievo delle appropriate colture.

Ogni malato affetto da sepsi severa deve essere studiato per escludere la presenza di una fonte d'infezione eradicabile tramite misure di controllo quali il drenaggio nel caso di un ascesso, l'asportazione di tessuto necrotico infetto, la rimozione di un presidio potenzialmente infetto.

Dopo campionamento e coltura delle sedi sospette si ritiene opportuno iniziare immediatamente una terapia con antibiotici ad ampio spettro che successivamente verrà sostituita o corretta con antibiotici più mirati in relazione ai dati colturali ottenuti.

La terapia di reintegro volêmico consiste nell'infusione di cristalloidi o di colloidali naturali o artificiali.

Nel caso in cui un appropriato reintegro volêmico non riuscisse a migliorare la pressione arteriosa e la perfusione degli organi, si dovrebbe iniziare la terapia con vasopressori. Sia la noradrenalina che la dopamina rappresentano dei farmaci vasopressori di prima scelta per correggere l'ipotensione nel caso di uno shock settico. La dopamina aumenta la pressione arteriosa media, aumenta la gittata cardiaca e la frequenza cardiaca. La norepinefrina aumenta la pressione arteriosa media grazie ai suoi effetti vasocostrittori associati a minime variazioni della frequenza e ad un minor aumento della gittata cardiaca rispetto alla dopamina. Nei pazienti con shock refrattario sono raccomandate basse dosi (0,01-0,04 U/min) di vasopressina per aumentare la pressione arteriosa media, le resistenze vascolari e la diuresi; essa può diminuire la gittata cardiaca.

Diversi studi raccomandano l'uso di basse dosi di corticosteroidi per migliorare lo stato di shock e ridurre la mortalità.

La proteina C attivata umana ricombinante (rhAPC) è raccomandata nei pazienti ad alto rischio di morte privi di controindicazioni assolute al trattamento, quali il pericolo di sanguinamento. La risposta infiammatoria nella sepsi severa è legata all'attività procoagulante ed all'attivazione endoteliale. La rhAPC è una proteina endogena con proprietà antiinfiammatorie ed anticoagulanti ed è in grado di migliorare la sopravvivenza dei pazienti con disfunzione d'organo indotta dalla sepsi.

Dopo la correzione dello stato d'ipoperfusione, in assenza di condizioni debilitanti quali una malattia coronarica acuta importante, un'emorragia acuta o l'acidosi lattica, si dovrebbero trasfondere globuli rossi concentrati solo se l'Hb diminuisce <7,0 g/dl fino ad un valore ideale pari a 7,0-9,0 g/dl. La terapia trasfusionale è mirata sui dati dell'ossimetria. Può essere utile la somministrazione di plasma fresco congelato in presenza di anomalie negli esami di laboratorio riguardanti la coagulazione, mentre i concentrati di piastrine sono indicati se la conta è <5000/mm³. E' consigliabile mantenere un livello di piastrine >50000/mm³ se sono previsti interventi chirurgici.

Per quanto riguarda la ventilazione, in presenza di Acute Lung Injury o ARDS, sono raccomandati bassi volumi correnti e ipercapnia permissiva: questa situazione può indurre un aumento della portata cardiaca e un riduzione della differenza artero-venosa di O₂ e dei lattati ematici. Inoltre l'applicazione della PEEP favorisce il reclutamento delle vie aeree e migliora gli scambi gassosi e l'emodinamica.

E' fondamentale un buon controllo glicemico.

Nei pazienti critici, in particolare in quelli settici con insufficienza d'organo multipla, l'uso di insulina per mantenere la glicemia in un range di 80 – 110 mg/dl ridurrebbe del 40% il rischio di morte nei pazienti trattati rispetto ai controlli.

E' noto che l'iperglicemia è un forte stimolo per l'attivazione di PAI-1, con conseguente blocco della fibrinolisi [33].

Se necessario il supporto renale, l'emofiltrazione continua veno-venosa o la dialisi intermittente sono considerate equivalenti. L'emofiltrazione continua consente un più facile controllo del bilancio idrico nei pazienti settici emodinamicamente instabili.

Si è cercato anche di bloccare l'endotossina LPS-A, core comune di tutte le tossine sintetizzate da Gram-negativi, mediante l'utilizzo di Anticorpi specifici, ricavati dal siero di pazienti vaccinati con ceppi particolari di E.Coli o Anticorpi monoclonali specifici.

Questo approccio ovviamente è valido solo per infezioni da Gram-negativi e per di più i risultati di questi studi preliminari di fase II sono stati alquanto deludenti, quindi questo approccio terapeutico è stato abbandonato.

Altri anticorpi monoclonali specifici contro TNF-alfa, il suo recettore e il recettore di IL-1 sono stati sperimentati negli ultimi anni ma senza un reale vantaggio in termini di sopravvivenza [34].

Inoltre sono stati effettuati innumerevoli tentativi mirati a bloccare il Fattore Tissutale o basati sull'utilizzo terapeutico dell'ATIII, ma un ampio studio di fase III [35] non ha dimostrato miglior sopravvivenza nei soggetti trattati.

Sono, infine, importanti la profilassi per la trombosi venosa profonda (TVP) e per l'ulcera da stress [36-39].

DEFINIZIONE, DIAGNOSI ED EZIOLOGIA DI ARDS

Nel nostro studio sono stati seguiti anche 7 pazienti con diagnosi di ARDS ossia di 'sindrome da distress respiratorio acuto' [40,41].

L'incidenza è difficile da quantificare a causa delle definizioni variabili riportate nella maggior parte degli studi epidemiologici condotti. Negli Stati Uniti è stimata intorno ai 190.600 affetti, 74.500 decessi per anno, ed è superiore al 30% in presenza di sepsi. [42]

I criteri clinici per la diagnosi di ARDS, proposti dall'"American-European Consensus Conference" del 1994 sono i seguenti:

- Esordio acuto;
- Infiltrati bilaterali all'Rx-torace;
- Pressione di incuneamento polmonare (PAWP) < 18 mmHg o assenza di evidenza clinica di ipertensione atriale sinistra;
- Rapporto PaO₂/FiO₂ < 200 [43,44].

Dal punto di vista eziologico tale sindrome può essere causata da due meccanismi:

- Il primo da stimolo tossico diretto, come nel caso di aspirazione di contenuto gastrico, inalazione di sostanze tossiche o trauma toracico chiuso.

- Il secondo meccanismo è basato su insulti sistemici (sepsi, trauma, politrasfusioni, pancreatiti..), che determinano il rilascio di numerosi mediatori [TNF-alfa, NO, PMN] responsabili dei danni polmonari, come nei pazienti da noi seguiti [45-50].

La fisiopatologia e il quadro anatomopatologico dell'ARDS sono generalmente distinti in tre stadi:

- *STADIO ESSUDATIVO*, con accumulo di eccessivo fluido, proteine e cellule infiammatorie, provenienti dai capillari, negli spazi alveolari;
- *STADIO FIBROPROLIFERATIVO*, con deposizione di tessuto connettivo in risposta allo stimolo nocivo;
- *STADIO DELLA RISOLUZIONE e GUARIGIONE*.

Durante la *FASE ACUTA* si instaura rapidamente un quadro d'insufficienza respiratoria con dispnea, ipossia anche marcata, refrattarietà all'ossigeno-terapia, infiltrati polmonari irregolari, asimmetrici e bilaterali all'RX.

La *FASE DI GUARIGIONE* è caratterizzata da una graduale risoluzione dell'ipossiemia, miglioramento della compliance e normalizzazione del quadro radiologico [51-53].

Il cardine della terapia è la ventilazione meccanica con intubazione endotracheale, basata sull'impiego di una pressione inspiratoria di picco al di sotto di 35 cmH₂O, volumi tidal di 6 ml/Kg e una 'pressione positiva tele-espironaria esterna' (PEEP) tra 10 e 15 cmH₂O, così da prevenire l'atelettasia da compressione e limitare il collasso fascico delle vie aeree [54].

Tale modalità ventilatoria può esitare in una ritenzione di CO₂, ma in assenza di effetti avversi si permette che l'ipercapnia persista (ipercapnia permissiva).

Nei casi non trattati o non responsivi, la sindrome evolve verso la MOF con una mortalità complessiva del 60%.

Fra i sopravvissuti alcuni evolvono in fibrosi e quindi in patologia polmonare restrittiva, negli altri si ha recupero della normale funzione respiratoria in genere entro 6-12 mesi dall'episodio acuto [48,49].

BIOMARKERS

Nonostante le conoscenze biomolecolari sulla fisiopatologia della sepsi migliorino giorno per giorno, per questa patologia non sono ancora stati identificati degli indici che ci consentano di effettuare una diagnosi precoce, o dei fattori prognostici di elevata sensibilità e specificità.

Una diagnosi tempestiva è auspicabile perché migliorerebbe outcome in molti pazienti e consentirebbe di riconoscere 'precocemente' i soggetti più a rischio. Attraverso il dosaggio di parametri sensibili e specifici si potrebbero attuare trattamenti più precoci, mirati ed efficaci.

Negli ultimi anni sono stati proposti innumerevoli markers biochimici di sepsi, sepsi grave e shock settico. Nel nostro studio abbiamo analizzato in particolare i seguenti :

- la PROTEINA C-reattiva è una proteina di fase acuta, sintetizzata a livello epatico. E' stata usata come indice di infezione per molti anni [55,56] anche se in realtà è poco specifica e ha scarsa capacità di discriminazione tra infezione ed infiammazione. E' inadatta a predire l'esito della malattia e la sua severità. Non consente una diagnosi immediata di sepsi perché i suoi valori plasmatici raggiungono livelli massimi solo dopo 2-3 giorni e permangono elevati per parecchio tempo (v.n. PCR < 6 mg/L) [57,58].

- l'ATIII, è tra i più importanti anticoagulanti presenti nel sangue ed è in grado di rimuovere la trombina dal circolo. E' un'alfa-globulina (v.n. 80–130%).

Mentre il coagulo si forma, circa l'85-90% della trombina, derivata dalla protrombina, viene adsorbita dai filamenti di fibrina, a man mano che essi si organizzano. Ciò ovviamente concorre ad impedire la diffusione della trombina nel resto del sangue e non permette quindi un'eccessiva estensione del coagulo.

La trombina che non viene adsorbita dai filamenti di fibrina si combina con ATIII, che in tal modo blocca l'azione della trombina sul fibrinogeno e poi inattiva, nei successivi 12-20 minuti, la trombina legata.

Alcuni studi hanno evidenziato che deficit iniziali di ATIII depongono per una prognosi più infausta e significative diminuzioni plasmatiche si verificano già nelle

fasi cliniche iniziali [59].

- il dosaggio dei GLOBULI BIANCHI si è dimostrato poco specifico (SP) nella discriminazione di quadri infiammatori da settici (v.n. $4,2 - 12,4 \times 10^9 /L$) [60]

- il FIBRINOGENO, è una proteina ad alto pm (340.000) e si trova nel plasma in quantità variabili tra 100 e 700 mg/ml.

A seguito dell'attivazione della cascata coagulativa la trombina agisce sul fibrinogeno staccando 4 peptidi di basso pm, formando così una molecola di monomero di fibrina, che polimerizza in lunghi filamenti, andando a costituire il reticolo del coagulo.

Secondo uno studio realizzato negli U.K. nel 2005 [59] alti livelli di fibrinogeno, in combinazione con bassi dosaggi di prot.C, prot.S e ATIII, sono risultati associati ad un "poor-outcome", e la diminuzione più significativa è stata della proteina C-coagulativa.

- il D-DIMERO, è prodotto dalla degradazione del fibrinogeno a seguito dell'attivazione dei meccanismi di lisi del coagulo.

Uno tra gli ultimi studi realizzato da Karamarkovic A. et al. (Settembre 2001-Giugno 2003) ha confermato che nei pazienti a prognosi infausta le concentrazioni plasmatiche sono maggiori rispetto a quelle nei sopravvissuti (v.n. fino a 200 ug/L) [58].

- la CONTA PIASTRINICA, è un altro elemento molto importante da monitorare perchè nei pazienti settici si attivano precocemente dei meccanismi che portano ad un loro maggiore consumo, degradazione e/o CID (v.n. $150 - 450 \times 10^9/L$).

- il PT, fornisce l'indicazione della quantità totale di protrombina presente nel sangue e quindi è un metodo di studio della via di attivazione estrinseca della coagulazione (v.n. 75 – 112%).

Numerosi sono i dati in letteratura che confermano [61,62] frequenti alterazioni del PT già nelle fasi iniziali dei quadri settici, indici di una coagulopatia tipica che spesso compare anche prima della diagnosi (v.n. 75 – 112%).

- la PROCALCITONICA (PCT) è precursore, pro-ormone, della calcitonina ed è sintetizzata da tessuto neuroendocrino extratiroidale presente nell'organismo, a seguito dell'attivazione della trascrizione e traduzione del gene CALC-I in corso di infezioni batteriche [63, 64].

L'induzione della PCT può essere provocata da numerosi stimoli, sia in vivo che in vitro. Le endotossine batteriche e le citochine pro-infiammatorie rappresentano potenti stimoli per la sua produzione. Il suo ruolo preciso rimane in gran parte sconosciuto. E' una proteina stabile nei campioni di sangue e plasma e normalmente ha un'emivita di 25/30h [65].

Negli ultimi anni si è avvalorata l'ipotesi che la PCT possa essere un buon indice prognostico, in particolare nella sepsi-grave e shock settico. Può essere d'aiuto nella diagnosi precoce delle infezioni postoperatorie dopo interventi di chirurgia maggiore [44], ma non sembra avere un ruolo diagnostico nei pazienti con infezioni di grado lieve o medio [45]. Numerosi sono stati gli studi mirati ad identificare il cut-off diagnostico ideale. Oggi vengono considerati significativi dosaggi superiori ai 2µg/L. Si è riscontrato che spesso i pazienti con sepsi grave o shock settico o esito infausto presentano dei valori al momento della diagnosi maggiori e in netto rialzo durante il periodo di osservazione [65, 60, 62] .

Uno studio francese, realizzato nel 2004 su 75 pazienti affetti da sepsi o shock settico, ha concluso che dosaggi elevati di PCT hanno valore prognostico negativo in una percentuale significativa di casi [66].

Dal punto di vista della cinetica i suoi livelli plasmatici aumentano e diminuiscono più rapidamente rispetto alla PCR e, rispetto ad essa, è migliore nella valutazione della severità, della prognosi e del decorso clinico [67,68].

Tra gli ultimi studi, uno di notevole rilievo è stato condotto presso l'Università di Copenaghen (tra Febbraio 2005 e 2006), e conferma che la PCT ha una SE e SP nettamente superiore rispetto ai bio-marker utilizzati di routine nella pratica clinica [65].

E già in precedenza erano stati ottenuti risultati affini da Harbarth et al. nel 2001 [81], da Simon et al. nel 2004 e Meisner M. nel 2000 (v.n. < 0.5 µg/L) [67] .

- PROTEINA C-coagulativa, aumenta la fibrinolisi, inattiva i fattori della coagulazione e, ad alte concentrazioni, riduce il rilascio di citochine infiammatorie. A causa di un aumentato consumo, degradazione o per una diminuita sintesi, la riduzione dei livelli della proteina C è caratteristica della sepsi severa e questa alterazione biochimica insorge prima della diagnosi clinica di insufficienza

d'organo. Il grado di diminuzione correla con un'aumentata morbilità e mortalità, e valori inferiori al 40% rispetto al range di normalità sono prognostici per una ridotta sopravvivenza, e depongono per un outcome sfavorevole (v.n. 71 – 142%) [69, 70].

Recentemente sono stati compiute numerose ricerche per identificare anche altri marker da utilizzare nella diagnosi precoce:

- l'IL-6 è una citochina correlata alla severità della sepsi e alla sua prognosi; ha un ruolo centrale nell'indurre la sintesi di proteina di fase acuta come la PCR e la LPB (lipopolysaccharide-binding protein). Il suo aumento è rapido (dopo interventi chirurgici i suoi livelli si innalzano entro 1-3 ore) ed è un indicatore precoce di sepsi postoperatoria dopo chirurgia oncologica [55,56]. Secondo alcuni studi è superiore alla PCT per la diagnosi di infezione e sepsi [45], altri studi danno risultati opposti [71,72];

- la LPB è una proteina di fase acuta suggerita come marker di infezione per il suo ruolo nella risposta immune innata: lega l'LPS e lo porta al recettore CD14 sui monociti-macrofagi, che in seguito interagiscono con i TLR-4 iniziando la produzione di citochine; nonostante ciò i suoi livelli si innalzano anche nelle infezioni da batteri gram positivi. Per questo è stata indicata come possibile marcatore di sepsi. L'LPB ha un'emivita maggiore delle citochine che induce, i suoi livelli aumentano con la severità dell'infezione ma non è un marker migliore di PCR e PCT [56]. Altri studi riguardano la misura di un sottotipo della forma solubile del CD14 (sCD14-ST), la pro-adrenomedullina e il DNA libero nel plasma.

Per quanto riguarda il sCD14-ST si è visto che la sua concentrazione è particolarmente elevata nei pazienti settici, che i suoi livelli variano con la severità dell'infezione e che si innalzano entro 6 ore dall'inizio della sepsi, ossia più rapidamente rispetto a PCR e PCT. E' quindi un marker più precoce e molto sensibile [73] e potrebbe facilitare la diagnosi precoce di sepsi e la somministrazione rapida di terapie adeguate.

L'adrenomedullina è un peptide formato da 52 aminoacidi che ha azioni immunomodulanti, metaboliche e vascolari. Ha anche attività battericida e i suoi livelli sono aumentati nella sepsi. E' però difficile da misurare perché è rapidamente eliminato dal circolo e nel circolo è mascherato dal fattore H del

complemento, che lo rende inaccessibile per le indagini immunometriche. Così, recentemente, è stato identificato un suo precursore, la pro-adrenomedullina, che si è rivelata utile come marker di prognosi nei pazienti settici: i suoi livelli plasmatici sono significativamente più alti in quei pazienti con sepsi che non sopravvivono rispetto a quelli che sopravvivono e la sua accuratezza prognostica è superiore a quella di PCR e PCT [74].

Infine è stato studiato come marker prognostico il DNA libero nel plasma, ossia frammenti di DNA che si possono rinvenire nei fluidi extracellulari in seguito alla necrosi cellulare o all'apoptosi associate alla sepsi. I livelli di DNA libero plasmatico sono significativamente più alti nei pazienti che sviluppano sepsi rispetto a quelli che non la sviluppano, e tra questi sono significativamente più alti nei pazienti che muoiono rispetto a quelli che sopravvivono [75].

In conclusione possiamo affermare che i markers attualmente più utilizzati sono i meno sensibili e specifici per una diagnosi tempestiva di sepsi-sepsi grave-shock settico e che i 'nuovi' marcatori che sembrano essere più utili dal punto di vista clinico e prognostico sono ancora in fase di studio, o non sono ancora state realizzate delle ricerche che hanno confermato la reale valenza clinica e prognostica, dando il via libera al loro utilizzo nella pratica medica.

INDICI DI GRAVITA'

Per valutare la gravità della sepsi e poter effettuare confronti tra pazienti con situazioni diverse sono stati introdotti dei sistemi di punteggio che vengono utilizzati soprattutto negli studi clinici.

I sistemi utilizzati più frequentemente e maggiormente studiati sono il SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), il SAPS (Simplified Acute Physiology Score) II.

Il SOFA è uno strumento eccellente per descrivere l'estensione della disfunzione d'organo nei pazienti critici al momento dell'ammissione in Terapia Intensiva e la sua variazione durante la degenza [76]. Bisogna infatti tener presente che l'insufficienza d'organo non può essere vista come fenomeno del tutto-o-nulla, ma

come un continuum di alterazioni.

Il SOFA ci permette di descrivere la disfunzione d'organo sulla base di variabili semplici, specifiche dell'organo o sistema in questione [77]: esso è composto dalla somma dei punteggi (che vanno da 0 a 4 a seconda della gravità) assegnati ad ognuno dei seguenti sistemi: respiratorio, cardiovascolare, epatico, coagulazione, renale e neurologico.

Il TMS (total maximum SOFA score) è calcolato sommando i peggiori punteggi per ogni sistema d'organo durante la degenza in Terapia Intensiva (Fig 10).

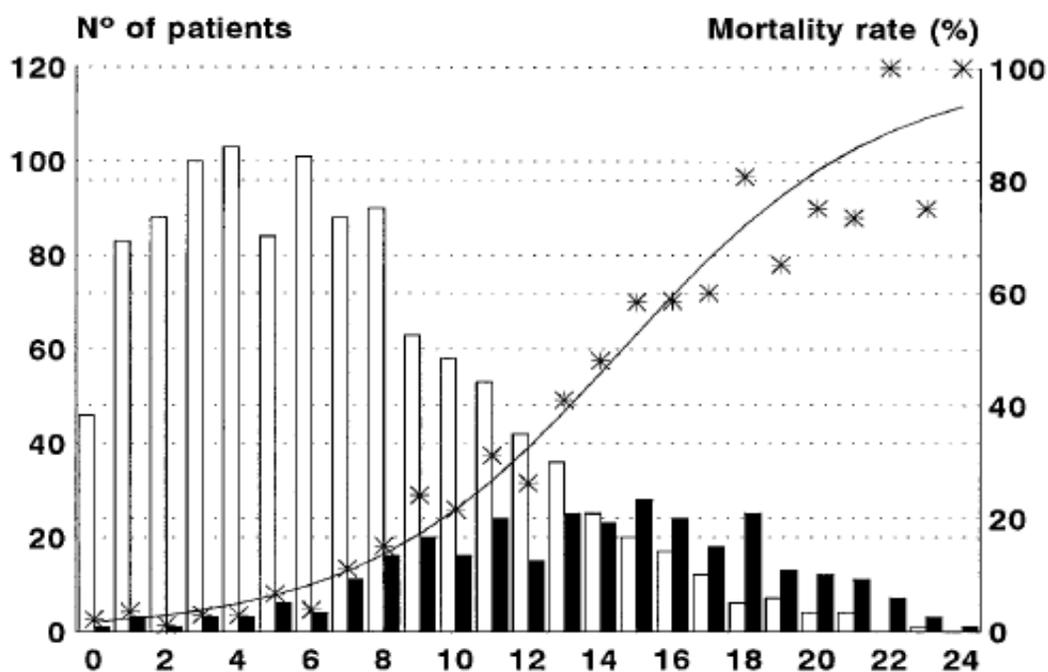


Fig 10: TMS: Distribuzione del TMS in pazienti sopravvissuti (barre bianche) e non-sopravvissuti (barre nere). Gli asterischi rappresentano la relazione tra il TMS e la mortalità in TI.

Il SAPS II è un sistema che ci consente di valutare il rischio di mortalità nei pazienti in Terapia Intensiva e quindi, confrontando la mortalità osservata nelle T.I. con quella predetta dal modello statistico in questione, di valutare il SMR (Standardized Mortality Ratio), comunemente usato per stimare le prestazioni delle T.I. [78].

Il SAPS II permette di confrontare dati tra pazienti eterogenei per età, sesso, malattie croniche, malattie sottostanti, severità della malattia attuale, assegnando

punteggi diversi a seconda della categoria a cui appartengono i pazienti studiati [79]. Il SAPS II oltre a questi valuta anche numerosi parametri fisiologici quali: frequenza cardiaca, pressione arteriosa sistolica, temperatura corporea, PaO₂/FiO₂ ratio, flusso urinario, conta globuli bianchi, urea, sodio, potassio, bicarbonati, bilirubina, GCS. Assegnando i diversi punteggi vanno considerati i valori peggiori nelle 24 ore.

NUOVI APPROCCI AL PROBLEMA

APPROCCIO GENETICO

La necessità di determinare il rischio personale e regimi terapeutici individualizzati ha portato a sviluppare gli studi genetici nei pazienti critici delle terapie intensive. La predisposizione personale ad avere una risposta infiammatoria maggiore o minore è determinata da variabilità genetiche nei mediatori che determinano le vie dell'infiammazione. Per capire i motivi per cui alcuni pazienti rispondono meglio di altri alle terapie è necessario andare a studiare il background genetico responsabile delle differenze interindividuali nella risposta infiammatoria alle infezioni: tutti i geni che codificano per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale nei processi infiammatori possono essere geni candidati a questo tipo di studi. Le diverse risposte interindividuali hanno indubbiamente importanti implicazioni cliniche e il genotipo differente contribuisce sostanzialmente all'esito delle infezioni. E' stato dimostrato che il contributo genetico alla mortalità per sepsi è molto maggiore rispetto all'ereditarietà per il rischio di malattie cardiovascolari e per il rischio di mortalità da cancro.

La sepsi è una patologia complessa che insorge a causa di interazioni tra il genotipo individuale e le influenze ambientali. Per questo la stima del genotipo individuale potrebbe migliorare la valutazione della prognosi, inoltre l'identificazione precoce di un genotipo a rischio potrebbe condurre ad interventi profilattici nelle persone ad alto rischio. Infine, gli effetti collaterali delle terapie potrebbero essere minimizzati negli individui a basso rischio [80].

La maggior parte delle variazioni stabili nel genoma umano è dato da polimorfismi

di singoli nucleotidi (SNPs), o cambiamento di singole basi nella sequenza del DNA. Una SNP ricorre circa ogni paio di basi su mille, più frequentemente sono sostituzioni di C o T. Questo può intralciare la traslazione dell'mRNA, o colpirne il clivaggio, la stabilità e l'esportazione. I polimorfismi dei promotori dei geni possono aumentare o diminuire l'espressione genica; mutazioni frameshift o alterazioni nello splicing possono dare origine a proteine tronche o con funzioni alterate. Se questo avviene nei geni che codificano per fattori pro o antinfiammatori la risposta alle infezioni sarà inevitabilmente anomala.

In questi anni sono stati compiuti numerosi studi sulla relazione tra alcuni polimorfismi genetici e la predisposizione alla sepsi.

Per esempio, è stato dimostrato che variazioni nei geni che codificano per i TLR causano aumentata suscettibilità alle infezioni da batteri gram negativi, una maggiore severità della malattia ed elevata frequenza di shock settico [81].

Molte citochine manifestano variazioni nelle regioni dei loro promotori: polimorfismi del TNF sono associate con diversi fenotipi di sepsi, mediastiniti o disfunzione d'organo indotta da infiammazione sistemica che segue interventi di chirurgia maggiore, in particolare il polimorfismo in posizione -308 del promotore del TNF- α sembra associato ad un'aumentata suscettibilità allo shock settico e conseguente aumentata mortalità [82]. Per quanto riguarda altre citochine, l'IL-6 sembra migliorare la sopravvivenza in pazienti con il genotipo CC-174 nel suo promotore mentre secondo altri studi aumenta la suscettibilità alla sepsi e influenza la mortalità dei pazienti affetti da ARDS, SIRS e sepsi [83]. L'IL-1 sembra invece non abbia, a livello del promotore, polimorfismi capaci di modificare la prognosi dei pazienti settici [84]. Per quanto riguarda le citochine antinfiammatorie, il polimorfismo -1082A/A del promotore dell'IL-10 è associato ad un'elevata mortalità nei pazienti critici [85] ed elevati livelli di IL-10 sarebbero responsabili di un esito fatale nei pazienti settici [13]. Secondo altri studi, invece, il polimorfismo -592A dello stesso promotore determinerebbe livelli significativamente ridotti di IL-10 con aumentata mortalità nei pazienti settici [86].

Altre mutazioni studiate sono quelle a carico del gene MBL-2, che codifica per la collectina MBL (mannose-binding lectin), che attiva il complemento indipendentemente dagli anticorpi ed ha un ruolo centrale nella risposta immune

innata: si è visto che i genotipi aberranti determinano ridotti livelli circolanti di MBL e predispongono gli individui alle infezioni determinando un'aumentata suscettibilità ai batteri, ai virus ed ai funghi [87,88].

Il sesso è un altro fattore confondente che influenza la risposta al danno: l'incidenza di sepsi post-traumatica ed insufficienza multi-organo è molto aumentata in pazienti maschi, mentre le femmine colpite da sepsi hanno una prognosi migliore e sono più resistenti alle infezioni batteriche, virali e da parassiti. La presenza del testosterone è un fattore negativo per l'esito dei maschi colpiti da shock settico e la protezione nelle femmine è legata al Cr. X [89].

Un ulteriore esempio riguarda il gene per la caspasi 12 (CASP12), che esiste in due forme: completo, attivo (la forma ancestrale) oppure troncato nel mezzo da un codone di stop nella posizione 125. Questo polimorfismo ha conseguenze importanti sul fenotipo: gli individui con la forma completa infatti producono bassi livelli di citochine dopo la stimolazione con LPS e hanno una risposta immune iniziale molto bassa e conseguentemente sono maggiormente esposti a sepsi [90].

Infine si è visto che anche mutazioni nei geni per i fattori della coagulazione determinano risposte diverse agli attacchi esterni. Per esempio, la mutazione del fattore V di Leiden causa una resistenza del fattore V alla proteina C attivata e determina un aumentato rischio di tromboembolia nella popolazione generale. Se un soggetto con questa mutazione va incontro a sepsi, che talvolta è associata a CID, ha un maggior rischio di morte per disturbi coagulativi [91].

Uno dei problemi principali di questi studi è che i risultati spesso sono in contrasto tra loro [92]. Inoltre l'approccio genomico può essere in parte limitativo perché si ferma alle variazioni a livello del DNA, che legano epifenomeni (come il fenotipo) a cambiamenti a livello dell'mRNA, senza tener conto della processazione dell'mRNA, dei processi di splicing, delle modificazioni posttraslazionali che danno origine ai veri attori dell'organismo, ossia le proteine: il principale obiettivo futuro della patologia molecolare [93].

Per questo nei gruppi di ricerca si stanno cercando nuove strade che consentano di avere una visione più approfondita che vada oltre la genomica per comprendere i meccanismi molecolari dell'insorgenza delle malattie ed il più intimo meccanismo

di azione dei farmaci: grosse speranze dà oggi il campo della proteomica [94].

APPROCCIO PROTEOMICO

La proteomica è lo studio del proteoma, cioè l'insieme delle proteine espresse da cellule, tessuti, organi o fluidi biologici in un certo istante nel tempo [95,96]. L'analisi proteomica include non solo la descrizione delle proteine in un dato compartimento, ma comprende anche le diverse isoforme, le modificazioni, le interazioni proteina-proteina e le informazioni strutturali [97]: qualsiasi proteina infatti può esistere in forme multiple che variano all'interno di una particolare cellula o tra le diverse cellule. Sono sempre le proteine che permettono di distinguere i diversi tipi di cellule: per quanto tutte le cellule abbiano essenzialmente lo stesso genoma, esse si differenziano in base a quali geni sono attivi e a quali proteine vengono prodotte [98].

La proteomica rappresenta il legame che c'è tra i geni, le proteine e le malattie e potrebbe promuovere una rivoluzione nella medicina clinica di laboratorio [96].

Quello che distingue la proteomica dalle scienze biologiche più classiche è la *filosofia* con cui ci si pongono i quesiti e si cercano le risposte. Con le tecniche classiche un ricercatore deve avanzare un'ipotesi a priori e poi pensare a realizzare un esperimento ad hoc che confermi o smentisca tale ipotesi. Al contrario la proteomica è una scienza con un approccio olistico: non dobbiamo fare ipotesi a priori - di solito restrittive perché ci obbligano a focalizzare l'attenzione su una particolare proteina o su uno specifico sistema. Con questo approccio noi scegliamo un sistema che ci interessa e lo analizziamo in toto. Il confronto tra un tessuto sano ed uno malato può mostrare un gran numero di proteine alterate. E' solamente l'identificazione di tutte queste proteine e della loro funzione che può permetterci a posteriori di comprendere il complesso meccanismo di insorgenza e progressione di una malattia. Quello proteomico è un approccio fortemente non riduzionistico, che ci aiuta a comprendere la realtà senza trascurarne la complessità, che è parte di tutti i fenomeni che caratterizzano la vita [93].

La proteomica comprende diverse aree di ricerca:

-la proteomica di *espressione*, che si occupa di stabilire le mappe di espressione

proteica in determinate condizioni fisiologiche o patologiche [97]. In campo biomedico questo approccio è usualmente impiegato per identificare proteine sovra- o sotto-regolate nelle specifiche malattie ed impiegarle come markers diagnostici o targets terapeutici [98];

-la proteomica *strutturale*, il cui obiettivo principale è l'identificazione della struttura dei complessi proteici o delle proteine a livello subcellulare o presenti negli organelli [94];

-la proteomica *funzionale*, che mira ad identificare il ruolo individuale di ogni proteina e le sue interazioni con altri ligandi [96]. I principali obiettivi di questo tipo di approccio sono elucidare le funzioni biologiche di proteine non ancora note e definire i meccanismi cellulari a livello molecolare [97]. (Fig. 11)

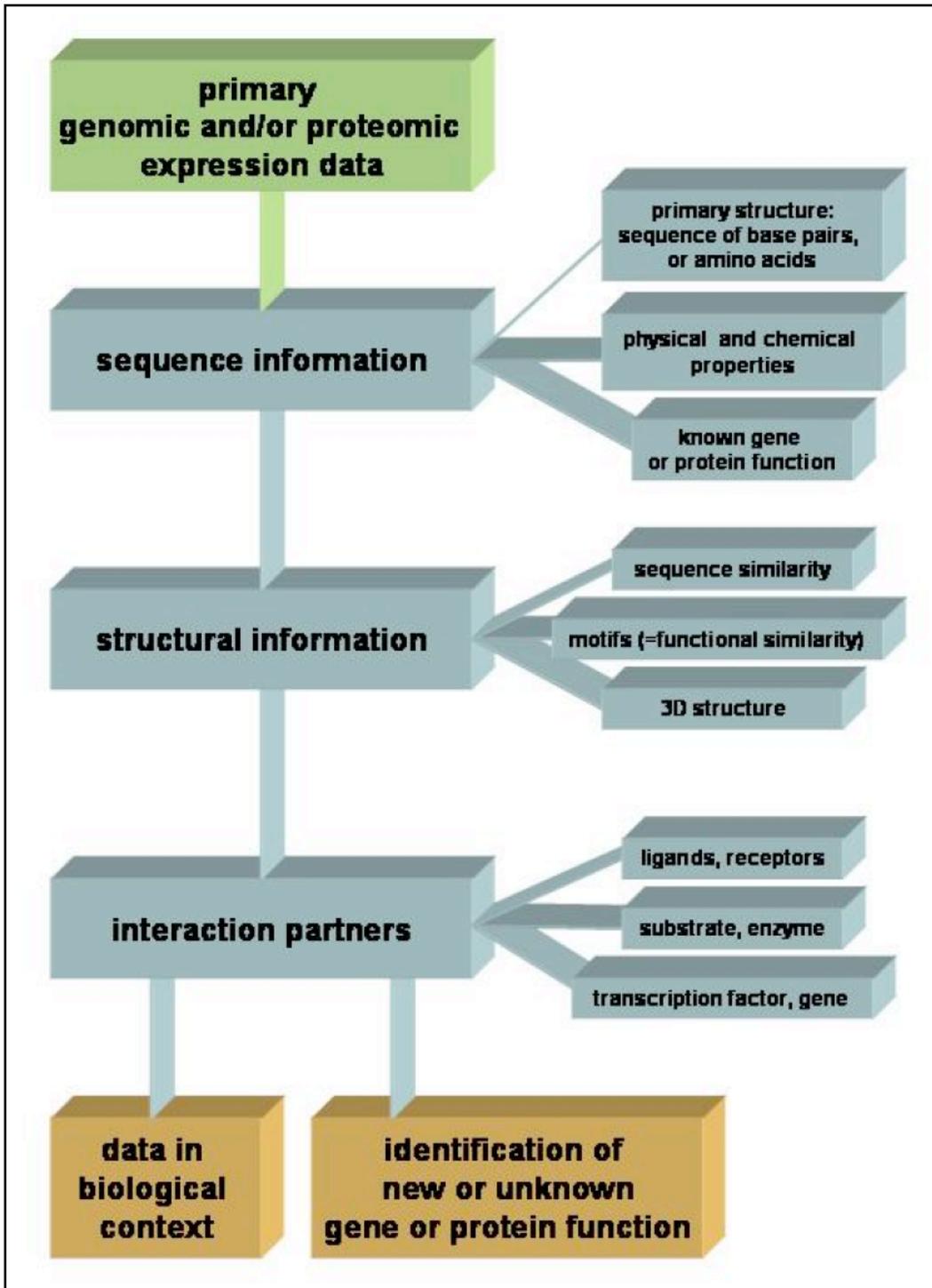


Fig. 11: diagramma di base del procedimento di ricerca [55]

I primi passi di questa materia in ambito clinico sono stati fatti in campo oncologico: le complesse alterazioni genetiche e proteomiche che conducono alla progressione delle neoplasie e che risultano in una eterogeneità di tumori creano

grosse difficoltà nella classificazione patologica tradizionale basata sulla morfologia, sul grado di differenziazione e sulla presenza o assenza di metastasi [99]. La nozione che il tumore è un prodotto del microambiente tissutale ha grosse implicazioni anche in ambito clinico. Il microambiente tumore-ospite in un ospite malato coinvolge eventi enzimatici e la partecipazione di fattori di crescita che potrebbero essere sorgente di biomarkers riversati nel siero. La proteomica è particolarmente adatta a scoprire questi biomarkers [100]. Per esempio la proteomica è stata fondamentale per diagnosticare precocemente i tumori dell'ovaio, che di solito venivano scoperti, e quindi trattati, in stadio avanzato, e ha permesso di effettuare le terapie in fase precoce e migliorare la prognosi della malattia [101].

Molto recentemente gli studi di analisi sieroproteomica si stanno diffondendo anche in altri settori. Pang et al. hanno effettuato uno studio su pazienti ricoverati in Terapia Intensiva colpiti da SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) ed hanno dimostrato come l'analisi sieroproteomica possa differenziare pazienti SARS da pazienti non-SARS con sintomi simili e possa anche identificare tra i pazienti SARS quelli con la prognosi peggiore. Infatti i potenziali biomarkers identificati riflettono le diverse risposte fisiologiche o patologiche dell'organismo all'infezione, comprese le risposte di fase acuta, il danno polmonare, il peggioramento della funzionalità epatica, l'attivazione dei neutrofili e la carica virale e potrebbero essere utilizzati per identificare i casi di SARS durante lo stadio precoce di malattia con un'elevata sensibilità e specificità, dare informazioni sullo stato fisiologico del paziente e sulla prognosi [102].

Allargando il discorso alle altre discipline mediche, possiamo affermare che uno degli obiettivi principali della proteomica è proprio la scoperta di biomarkers che abbiano ruoli importanti nella stima del rischio delle diverse patologie, nella diagnosi precoce, nella prognosi, nel monitoraggio e nella valutazione della risposta terapeutica [103]. Nella terapia intensiva potrebbe diventare possibile monitorare i progressi nella guarigione utilizzando marker proteomici [104], che hanno la potenzialità di ridurre drammaticamente i rischi e i tempi di scoperta e convalida di obiettivi terapeutici, di capire meglio i meccanismi di malattia, seguirne l'andamento e valutare l'efficacia delle terapie, oltre che mettere a punto terapie su

misura, personalizzate per i diversi pazienti.

Dal punto di vista tecnico, l'analisi si basa sul concetto della spettrometria di massa: un composto viene ionizzato (metodo di ionizzazione), gli ioni vengono separati in base al proprio rapporto massa/carica (analizzatore) e gli ioni prodotti raggiungono il rilevatore dove l'energia ricevuta è convertita in un segnale elettrico opportunamente amplificato per produrre lo spettro di massa corrispondente (detector). In pratica uno spettrometro di massa è in grado di determinare la massa molecolare delle molecole presenti in una miscela. In commercio ci sono diversi spettrometri di massa che si differenziano in base alla sorgente di ioni e al tipo di analizzatore.

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

In questo tipo di ionizzazione il campione viene miscelato insieme ad una matrice, una sostanza con una grande capacità di assorbire la radiazione UV e in grado di formare cristalli. Un impulso di raggio laser è utilizzato per colpire il cristallo e causare la ionizzazione delle molecole della matrice che poi a sua volta trasmetteranno la ionizzazione al campione. Le molecole si caricheranno positivamente (nel caso di proteine) e passeranno allo stato gassoso. Questo processo è chiamato desorbimento. Questo tipo di ionizzazione è detta blanda perchè generalmente causa la formazione di ioni monocarica. I principali vantaggi della spettrometria di massa MALDI sono la semplicità e la facilità con cui viene preparato il campione e inoltre permette l'analisi di proteine con un peso molecolare relativamente alto. Il limite è rappresentato dall'interferenza prodotta dai segnali della matrice nell'intervallo di massa tra 50-500 m/z. Il campione spesso non si trova uniformemente distribuito nel cristallo, per questo motivo questi spettrometri non sono adatti per l'analisi quantitativa.

Surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI)

E' una variante della spettrometria di massa MALDI dove il campione viene depositato su dei chip con una superficie cromatografica in grado di legare solo alcuni tipi di molecole. In questo modo è possibile rilevare peptidi e proteine poco

abbondanti che normalmente verrebbero oscurate da proteine più concentrate. Le principali cromatografie disponibili sono:

- Scambio anionico (forte e debole)
- Scambio cationico (forte e debole)
- Affinità per metalli (Ni, Cu, Zn, Cu, Ga)
- Cromatografie idrofobiche (mimano cromatografie C₆ , C₁₂ e C₁₈)

Su particolari chip è anche possibile legare anticorpi o frammenti di DNA per catturare specifiche molecole.

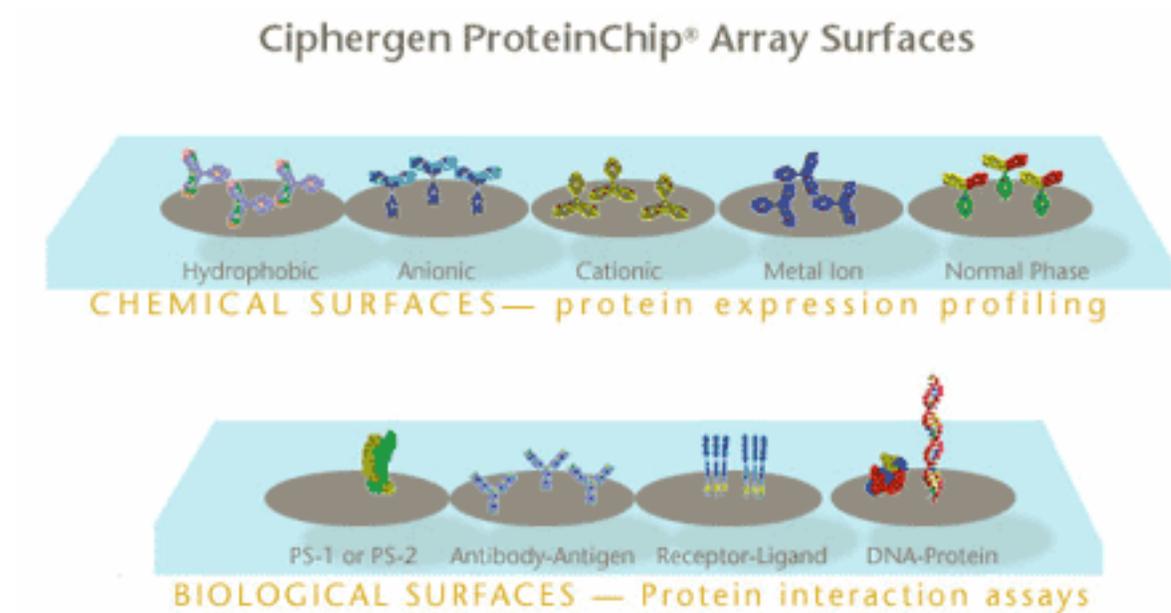


Fig 12: preparazione di un Chip per l'analisi sieroproteomica SELDI-TOF

Questa spettrometria si svolge in quattro fasi:

- Fase preliminare: Estrazione della componente proteica dai campioni da analizzare
- Attivazione/binding: Attivazione della superficie cromatografica con uno specifico Buffer e aggiunta della miscela proteica precedentemente estratta.

- Fase lavaggio: lavaggio delle molecole non legate o legate in modo aspecifico. Questa fase permette la rimozione di Sali, detergenti e altre molecole utilizzate nell'estrazione proteica iniziale.

- Ionizzazione: Aggiunta della matrice, le stesse utilizzate nella ionizzazione MALDI e ionizzazione con laser ad azoto

Questa tecnologia è molto utilizzata su campioni biologici (estratti cellulari, plasma, siero, urine e campioni alimentari) per studi di proteomica e di biomarker discovery.

Gli spettrometri di massa possiedono diversi metodi per determinare il rapporto massa/carica dello ione; uno metodo molto comune è il tempo di volo (*Time of flight*). Gli ioni provenienti dalla sorgente ionica sono accelerati da un potenziale (V) alla stessa energia cinetica, quindi sono lasciati andare alla deriva lungo un tubo verso un rivelatore. Se si assume che tutti gli ioni che arrivano all'ingresso del tubo di volo possiedono la stessa energia, data da:

$$z e V = mv^2 / 2 = Ec$$

dove:

V = potenziale applicato

z = il numero di cariche

e = la carica dell'elettrone

m = la massa dello ione

v = la velocità dello ione

allora ioni aventi masse diverse possiederanno differenti velocità:

$$v = (2 z e V / m)^{1/2}$$

Se uno spettrometro possiede un tubo di volo di lunghezza L, il tempo di volo per un dato ione è dato da:

$$t = (L^2 m / 2 z e V)$$

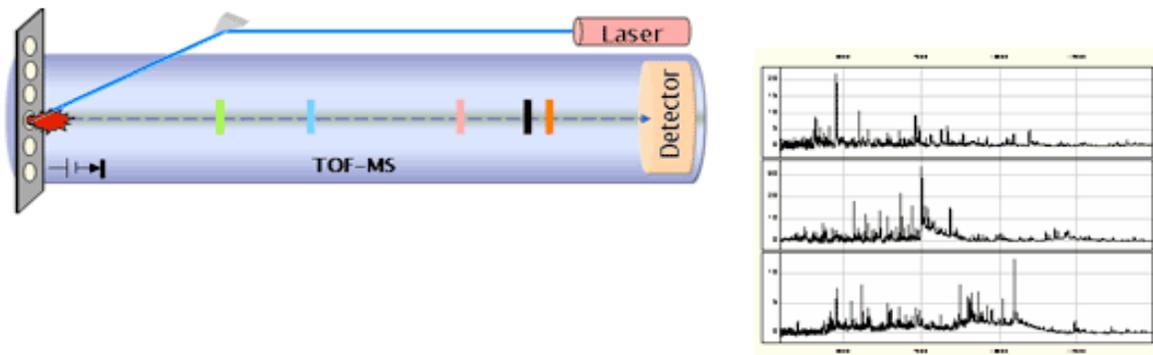


Fig 13: Tubo di volo ed esempio di analisi

Partendo dal rapporto m/z funzione del tempo di permanenza nel tubo di volo, può essere calcolata la massa di un dato ione. Il vantaggio di questo analizzatore è la possibilità di analizzare anche macromolecole di elevato peso molecolare (fino a 60000 – 80000 Da). Generalmente questo tipo di analizzatore è accoppiato ad una sorgente di ioni MALDI. Il tubo di volo ha però una bassa risoluzione (bassa capacità di discriminare due ioni con m/z simili) per ovviare a questo la maggiorparte di questi analizzatori sono dotati di un “Reflectron” cioè uno specchio in grado di riflettere gli ioni e quindi di fare percorrere il doppio della strada all’ione. In questo modo è possibile distinguere 2 ioni aventi tempo di percorrenza nel tubo di volo molto simili. L’uso del “Reflectron” limita il range di massa molecolare analizzabile che è compreso tra 200 e 5000-10000 Da.

DESCRIZIONE DELLO STUDIO

Scopo dello studio

Obiettivo di questo studio è di identificare, attraverso l'analisi sieroproteomica, eventuali nuovi marcatori in pazienti affetti da sepsi, sepsi grave e shock settico; di trovare correlazioni tra pazienti responders e non responders a determinate terapie farmacologiche; di mettere in luce differenze nel pattern proteomico tra pazienti che sopravvivono o meno alla sepsi grave e allo shock settico.

Per fare ciò è stato necessario prima analizzare i pazienti secondo le caratteristiche cliniche e bioumorali, classificarli identificando i migliori markers prognostici e indici di gravità, attraverso un'analisi accurata di parametri ematochimici. Fatto ciò, si sono analizzati i pattern sieroproteomici e cercata una relazione con i dati clinici e bioumorali.

Disegno dello studio

Lo studio condotto è di tipo prospettico-osservazionale, basato sull'analisi giornaliera di alcuni indici clinici/ematochimici e di altri, più specifici, al momento della diagnosi e poi in maniera standardizzata ogni tre giorni, vale a dire in 1[^], 3[^], 6[^], 9[^] e 12[^] giornata, per un massimo di 5 prelievi "mirati" per ciascun paziente e un follow-up di circa 28 gg. Un prelievo per l'analisi sieroproteomica è stato eseguito negli stessi intervalli temporali fino ad un massimo di 5 campioni per paziente.

Concluso il periodo di osservazione è stato annotato l'esito finale: "risoluzione del quadro settico", "persistenza del quadro settico" o "decesso".

Pazienti

Sono stati analizzati 61 pazienti affetti da sepsi, sepsi grave, shock settico e 20 controlli sani, necessari questi ultimi per il pattern sieroproteomico di riferimento. Ad ogni volontario sano è stato effettuato un unico prelievo.

Criteri di inclusione

Sono stati inclusi nello studio pazienti adulti affetti da sepsi, sepsi grave, shock settico secondo i criteri dell'American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference del 1992 [2]:

SEPSI: condizione in cui sia presente una risposta infiammatoria sistemica (due o più tra le seguenti condizioni: temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$; frequenza cardiaca > 90 battiti al minuto; frequenza respiratoria > 20 atti al minuto oppure $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg oppure ventilazione meccanica; conta leucocitaria $> 12000/\text{mm}^3$ oppure $> 10\%$ di forme immature) contemporaneamente ad un'infezione presunta o documentata.

SEPSI GRAVE: quando la sepsi è associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione: l'ipotensione o le anomalie della perfusione possono comprendere acidosi lattica, oliguria o alterazione dello stato mentale. La disfunzione degli organi può interessare uno più dei seguenti apparati o sistemi: cardiovascolare, respiratorio, renale, epatico, coagulazione, sistema nervoso centrale o presenza di acidosi metabolica altrimenti inspiegabile.

SHOCK SETTICO: una sepsi con ipotensione nonostante adeguata infusione di liquidi e che necessita di sostegno inotropo.

I controlli sono definiti come soggetti volontari, adulti, presumibilmente sani.

Durata dello studio

Il reclutamento dei pazienti è durato da Marzo 2006 a Febbraio 2008.

Materiali e Metodi

Sono stati studiati campioni di siero di pazienti ricoverati presso le Unità di Rianimazione e di Terapia Intensiva dell'Istituto di Anestesiologia e Rianimazione dell'Università di Padova presso l'Azienda Ospedaliera di Padova con diagnosi di sepsi, sepsi grave e shock settico. Di ogni paziente arruolato nello studio sono state raccolte le seguenti informazioni: data di nascita, sesso, diagnosi di ammissione in Terapia Intensiva, anamnesi patologica prossima e remota, trattamenti effettuati durante il ricovero in T.I., indici di gravità (SAPS II score ogni 3 giorni, SOFA score giornaliero), eventuali positività microbiologiche, test di

laboratorio comprendenti i seguenti esami ematologici ed ematochimici: esame emocromo ionemia, glicemia, coagulazione, completo dosaggio di AT III, PROTEINA C-COAGULATIVA, PT; dosaggio di FIBRINOGENO, D-dimero; dosaggio plasmatico di urea e creatinina; valutazione della funzionalità epatica; dosaggio plasmatico di PROCALCITONINA (mediante metodo immunoenzimatico); dosaggio di Proteina C-reattiva.

Per quanto riguarda la terapia farmacologia in atto per ogni soggetto sono stati annotati: nome del farmaco (principio attivo); posologia (dose massima); inizio e fine terapia; eventuale infusione di emoderivati.

In caso di ricorso a ventilazione meccanica, CVVH o dialisi sono stati registrati i relativi periodi di utilizzo.

Al momento della diagnosi, preferibilmente prima dell'inizio di qualsiasi terapia antibiotica, sono stati realizzati esami colturali nei focus d'infezione sospetti (quali emocoltura, urocoltura, coltura di liquido derivante da drenaggio toracico o peritoneale, esame colturale su punta di CVC o di altro catetere, BAL), successivo isolamento microbiologico e relativo antibiogramma specifico, per una terapia antibiotica mirata.

Tutte le informazioni clinico-patologiche sono state registrate su apposito database informatizzato. I prelievi di sangue sono stati effettuati in maniera standardizzata a diversi livelli temporali (al momento della diagnosi e successivamente ogni tre giorni, fino ad un massimo di cinque prelievi totali per paziente). Il follow-up è stato di 28 giorni.

I prelievi sono poi stati inviati presso il Laboratorio Centrale dell'Azienda Ospedaliera di Padova dove è stata effettuata la sieratura, aliquotazione e stoccaggio a -80° C.

Per all'analisi sieroproteomica e bioinformatica dei dati, i campioni sono stati inviati presso un laboratorio della George Mason University, Manassas, VA (USA). Il monitoraggio e la terapia in atto sui pazienti arruolati in tale studio hanno seguito le linee guida internazionali della Surviving Sepsis Campaign.

Criteri di esclusione

Non sono stati ritenuti idonei all'indagine i pazienti che o non soddisfacevano i

criteri d'inclusione sopra elencati oppure presentavano un quadro clinico già troppo compromesso, di difficile valutazione e una aspettanza di vita troppo breve per rendere significativo l'avvio dello studio.

ANALISI STATISTICA

I valori plasmatici dei 9 parametri dosati nelle varie giornate sono stati inseriti in un data-base realizzato con Microsoft Office Excel 2007, rielaborati e riportati nelle tabelle successive come valori medi \pm SD, mediane, valori minimi e massimi.

L'analisi statistica è stata realizzata con GraphPad InStat 3 Software Inc., San Diego, USA 2007.

Per il confronto tra due campioni indipendenti è stato utilizzato il Mann-Whitney U-test per dati non parametrici (in quanto i valori in esame non hanno superato il test di 'normalità').

E' stato considerato significativo un p-value < 0.05.

La forza di correlazione tra PCT e SOFA score è stata calcolata mediante il coefficiente di Pearson (numero adimensionale) e sono state riportate anche le rette di regressione lineare e i relativi intervalli di confidenza.

Per quanto riguarda l'analisi sieroproteomica, la corrispondenza tra i *tandem mass spectra* e le sequenze di peptidi è stata effettuata attraverso l'utilizzo del motore di ricerca SEQUEST (Thermo Science). I peptidi identificati sono stati ordinati in base alla differenza percentuale di espressione tra pazienti morti e vivi secondo la formula: (n°spettri campioni dei morti - n°spettri dei campioni dei vivi / media del numero degli spettri) x 100.

RISULTATI

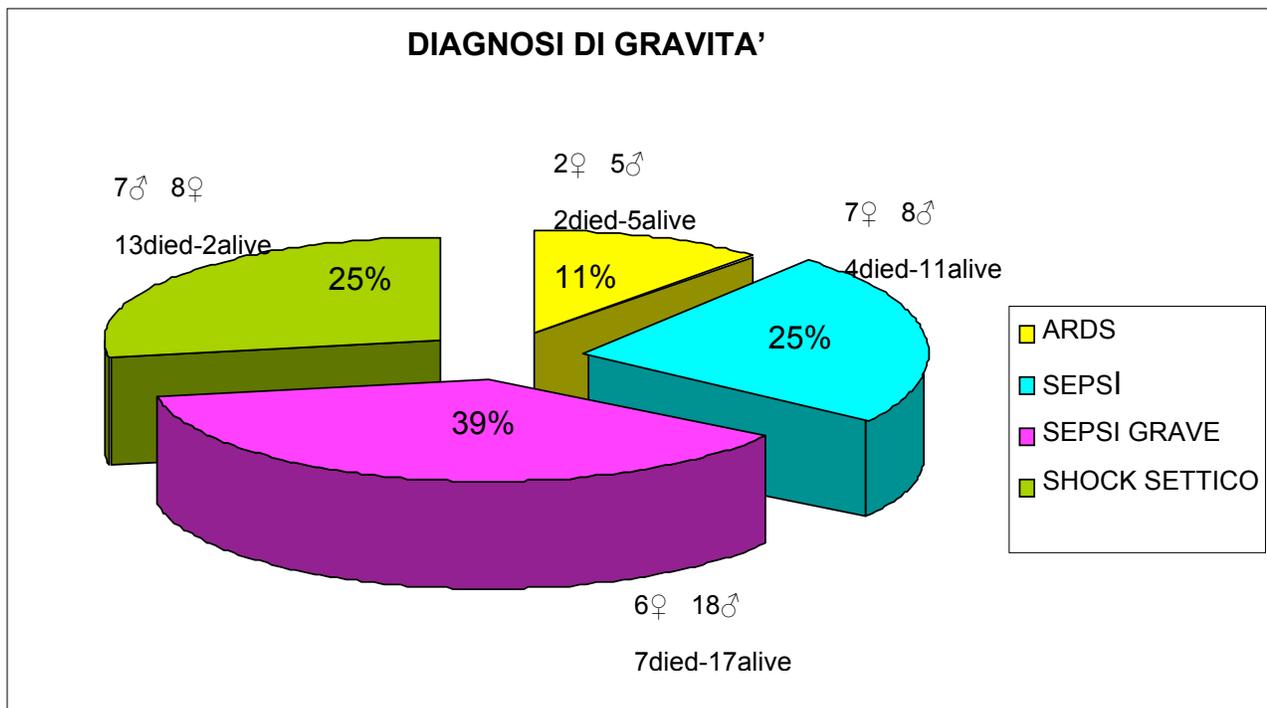
Analisi parametri sieroematici

Nel nostro studio abbiamo analizzato 61 pazienti, 22 femmine e 39 maschi, con un'età media di 64.33 ± 14.5 (SD) anni.

In base ai criteri diagnostici dell'ACCP/SCCM Concensus Conference [2], 15 soggetti (25%) erano affetti da SEPSI (4 deceduti), 24 (39%) da SEPSI GRAVE (7 deceduti), 15 (25%) da SHOCK SETTICO (13 deceduti) e 7 (11%) da ARDS (2 deceduti).

In totale non sono sopravvissuti fino al 28^a giorno 26 pazienti (circa 43%); nello specifico 3 sono deceduti tra la 1^a e 3^a giornata, 7 tra la 3^a e la 6^a, 3 tra la 6^a e la 9^a, 3 tra la 9^a e la 12^a ed infine 9 tra la 12^a e 28^a.

Tab.III : Numerosità nelle varie classi di gravità



Per quanto riguarda la “TIPOLOGIA D’INGRESSO”, per 6 pazienti era di tipo “chirurgico”, per 28 di tipo “medico” e per 27 di tipo “chirurgia d’urgenza” (tale distinzione è necessaria per la valutazione del punteggio negli indici di gravità).

Le foci d’infezione possibili sono state distinte in 7 tipi con differente numerosità:

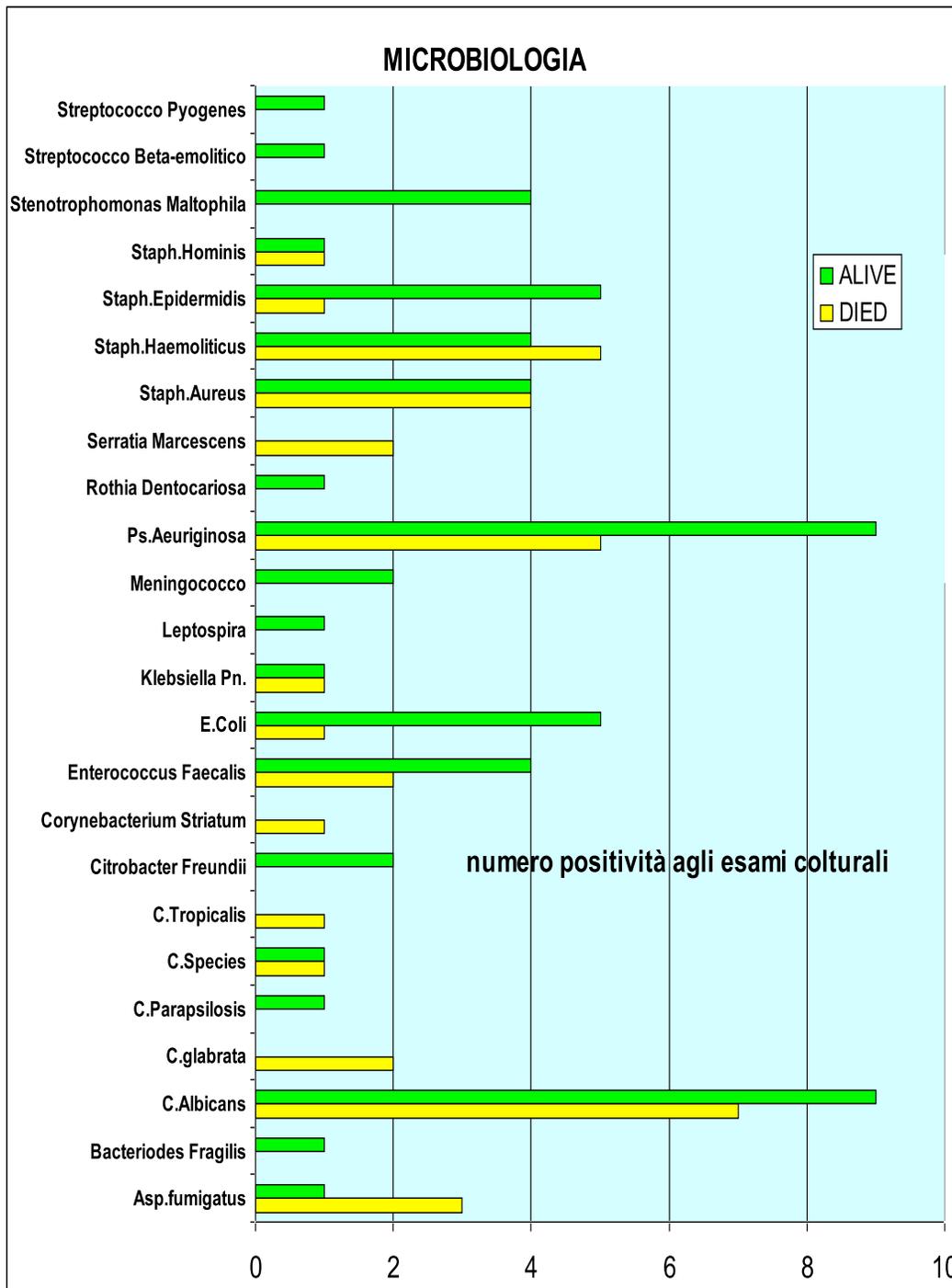
- ‘vie urinarie’, 1 soggetto (sopravvissuto);
- ‘vie aeree’, 21 soggetti (11 deceduti e 10 sopravvissuti);
- ‘addome’, 15 soggetti (6 deceduti e 9 sopravvissuti);
- ‘tessuti molli’, 7 soggetti (tutti sopravvissuti);
- ‘cuore’, 2 soggetti (1 deceduto ed 1 sopravvissuto);
- ‘fegato e vie biliari’, 1 soggetto (deceduto);
- ‘torace’, 6 soggetti (2 deceduti e 4 sopravvissuti);
- ‘reni’, 1 soggetto (sopravvissuto).

In sette pazienti non è stata identificata un’origine infettiva precisa, mentre la partenza di tipo ‘vie aeree-polmonare’ è stata la più frequente sia nei pazienti

deceduti (11/26), sia nei soggetti affetti da sepsi grave (10/24) sia da shock settico (6/15).

Gli agenti infettivi riscontrati a seguito di opportuni esami colturali (quali emocoltura, BAL, urocoltura, esame colturale da punta di CVC, tampone cutaneo o oro-rino-faringeo) sono stati 24, con una frequenza riportata nel grafico che segue:

Tab IV: Agenti infettivi rilevati negli esami colturali e relativa frequenza



Tra tutti i pazienti esaminati solo 13 (21%) non hanno presentato alcuna positività agli esami microbiologici, ma sono stati 'arruolati' comunque nello studio perché rispecchiavano i criteri d'inclusione precedentemente descritti, in accordo con

l'ACCP/SCCM Consensus Conference [2]. Inizialmente i soggetti selezionati sono stati suddivisi in 4 gruppi (affetti da ARDS, SEPSI, SEPSI GRAVE e SHOCK SETTICO).

A causa dell'elevata percentuale di mortalità nei pazienti più gravi (26 deceduti: 13 da shock settico, 7 affetti da sepsi grave, 4 da sepsi e 2 da ards) abbiamo optato per una nuova suddivisione in 2 "classi di gravità" (1^ classe: 22 affetti da SEPSI/ARDS; 2^ classe: 39 affetti da SEPSI GRAVE/SHOCK SETTICO) e poi per una successiva distinzione in relazione all' outcome.

Qui di seguito sono riportati i valori plasmatici dei nove parametri dosati ogni 3 giorni, tramite prelievo ematico da accesso arterioso, fino ad un massimo di cinque osservazioni per ciascun soggetto.

Tab V: Livelli plasmatici di PCR, AT III, GB, FIBRINOGENO, D-DIMERO, PIASTRINE, PT, PCT, Proteina C-coagulativa in relazione alla "classe di gravità" di appartenenza [2].

PARAMETRO	SEPSI/ARDS	SEPSI GRAVE/ SHOCK SETTICO	p-value **
PCR (mg/L) - level			
Mean, at admission	141,228(±75,033)	163,494(±116,61)	NS
Median (min-max) (n=61)	154 (8,86-260) (n=22)	125 (8,5-462) (n=39)	
Mean, 3 rd -day	121,423(±77,271)	129,675(±84,14)	
Median (min-max) (n=55)	135,6 (8,9-250) (n=22)	127 (14-378) (n=33)	NS
Mean, 6 th -day	99,746(±60,52)	95,926(±72,198)	
Median (min-max) (n=45)	89,75 (5,04-210) (n=18)	78 (21-300) (n=27)	NS

Mean, 9 th -day	108,17(±83,275)	110,54(±88,1)	
Median (min-max)	107 (22,5-352)	104,7 (11,3-330)	NS
(n=37)	(n=17)	(n=20)	
Mean, 12 th -day	109,045(±95,155)	89,781(±66,644)	
Median (min-max)	72,75 (16,4-313)	104,3 (9,4-227)	NS
(n=32)	(n=16)	(n=16)	
ATIII (%) - level			
Mean, at admission (n=61)	70,891(±24,081)	62,718 (±20,649)	NS
Median (min-max)	68,5 (33,6-131)	61 (17-100)	
Mean, 3 rd -day (n=55)	76,954(±24,604)	65,727(±16,510)	
Median (min-max)	78,5 (37-130)	66 (28-98)	NS
Mean, 6 th -day (n=45)	82,111(±23,594)	75,148(±19,86)	
Median (min-max)	78 (37-128)	75 (34-130)	NS
Mean, 9 th -day	89,588(±21,384)	82,15(±30,222)	
Median (min-max)	93 (58-128)	77,5 (44-176)	NS
Mean, 12 th -day	87,625(±20,353)	85,75(±21,904)	
Median (min-max)	87 (60-126)	83 (50-138)	NS
WBC (x10⁹/L)- level			
Mean, at admission	15,505(±8,645)	15,783(±10,02)	NS
Median (min-max)	13,64 (1,8-37,34)	15,7 (0,54-49,17)	
Mean, 3 rd -day	14,516(±8,645)	15,562(±5,462)	

Median (min-max)	15,15 (6,2-23,8)	13,64 (6,2-23,8)	NS
Mean, 6 th -day	16,039(±7,229)	17,841(±8,555)	
Median (min-max)	14,49 (6,7-31,28)	14,97 (5,51-54)	NS
Mean, 9 th -day	14,674(±5,1)	15,873(±7,35)	
Median (min-max)	14,8 (5,7-24,3)	16,21 (4,2-26,7)	NS
Mean, 12 th -day	14,579(±4,485)	11,799(±5,933)	
Median (min-max)	13,9 (8,1-23,8)	11,58 (4,43-24,6)	NS
FIBRINOGENO(g/L)- level			
Mean, at admission	6,59(±2,431)	5,52(±2,182)	NS
Median (min-max)	6,3 (2,76-13,5)	5,7 (1,4-9,2)	
Mean, 3 rd -day	5,77(±2,146)	5,45(±2,021)	
Median (min-max)	5,9 (2,5-9)	5,4 (0,6-9)	NS
Mean, 6 th -day	5,396(±2,02)	5,25(±2,796)	
Median (min-max)	5,115 (1,5-9)	4,83 (1-14,7)	NS
Mean, 9 th -day	5,8(±2,234)	5,122(±2,362)	
Median (min-max)	5,7 (1,6-11)	4,9 (0,9-9)	NS
Mean, 12 th -day	5,455(±1,72)	5,265(±2,285)	
Median (min-max)	5 (1,4-9,2)	5,025 (1-9)	NS
D-DIMERO(ug/L)-level			
Mean, at admission	800,45(±721,85)	1512,44(±1630)	0.09
Median (min-max)	595,5 (88-2742)	1016 (50-7500)	
Mean, 3 rd -day	1003,72(±1317,0)	1228,12(±1032)	
Median (min-max)	476,5 (70-4970)	1023 (50-4125)	NS

Mean, 6 th -day	826,88(±853,09)	1696,77(±1791,2)	
Median (min-max)	604,5 (65-2185)	1512 (179-8499)	0.08
Mean, 9 th -day (n=)	744,76(±674,11)	1133,9(±745,82)	
Median (min-max)	462 (67-2025)	1190 (166-2552)	0.08
Mean, 12 th -day (n=)	705,375(±615,22)	1091,25(±797,27)	
Median (min-max)	456,5 (67-2025)	957 (160-3127)	NS
PIASTRINE(x10⁹/L)-level			
Mean, at admission	230,227(±123,47)	197,575(±136,89)	NS
Median (min-max)	202 (70-459)	170,5 (9-595)	
Mean, 3 rd -day	242,227(±128,75)	191,06(±108,92)	
Median (min-max)	229 (33-555)	174,5 (24-551)	NS
Mean, 6 th -day	297,833(±224,48)	226,964(±139,24)	
Median (min-max)	219 (85-1111)	213,5 (52-503)	NS
Mean, 9 th -day	328,294(±221,99)	213,6(±161,37)	
Median (min-max)	253 (68-1001)	201 (55-656)	NS
Mean, 12 th -day	372,375(±233,03)	232,882(±190,85)	
Median (min-max)	327 (69-1000)	140 (35-687)	NS
PT (%) -level			
Mean, at admission	59,818(±13,106)	57,923(±12,698)	NS
Median (min-max)	60 (38-94)	61 (32-89)	
Mean, 3 rd -day	60,045(±15,845)	59,818(±14,67)	
Median (min-max)	62 (28-101)	59 (36-101)	NS
Mean, 6 th -day	64(±14,225)	61,296(±13,237)	
Median (min-max)	64 (44-94)	59 (29-84)	NS

Mean, 9 th -day	67,294(±12,732)	63,85(±17,117)	
Median (min-max)	66 (42-101)	65 (32-90)	NS
Mean, 12 th -day	62,625(±10,954)	67,185(±15,109)	
Median (min-max)	60,5 (40-64)	70 (36-92)	NS
PCT(µg/L)- level			
Mean, at admission	3,794(±6,167)	14,364(±24,25)	0.012
Median (min-max)	0,5 (0,1-25,4)	4 (0,2-98)	
Mean, 3 rd -day	2,118(±3,26)	11,535(±16,569)	
Median (min-max)	0,55 (0,1-13,3)	2,9 (0,2-56,1)	0.001
Mean, 6 th -day	1,297(±2,0296)	11,167(±17,93)	
Median (min-max)	0,45 (<0,1-6,5)	2,35 (0,3-68)	0.001
Mean, 9 th -day	1,006(±2,513)	6,097(±10,744)	
Median (min-max)	0,3 (<0,1-10,6)	1,5 (<0,1-40,1)	0.003
Mean, 12 th -day	0,912(±1,858)	3,19(±9,547)	
Median (min-max)	0,25 (<0,1-7,1)	0,5 (<0,1-40)	NS
PC-coagulat.(mg/L)-level			
Mean, at admission	75,316(±30,41)	73,81(±36,7)	NS
Median (min-max)	75,5 (31-140)	73 (20-140)	
Mean, 3 rd -day	87,5(±38,676)	78,86(±32,41)	
Median (min-max)	80,5 (33-164)	82 (26-137)	NS
Mean, 6 th -day	93,94(±32,266)	83(±36,552)	
Median (min-max)	84 (49-170)	68 (39-161)	NS
Mean, 9 th -day	99,65(±33,06)	81,39(±28,149)	
Median (min-max)	85 (70-200)	81,5 (26-138)	NS

Mean, 12 th -day	88,812(±23,167)	85,125(±36,66)	NS
Median (min-max)	85 (53-140)	92,5 (21-142)	

(Dati espressi in valore medio ± SD, mediana , valore massimo e minimo.

NS= non significativo; p-value** Mann Whitney U-test)

Tab VI: Livelli plasmatici di PCR, AT III, GB, FIBRINOGENO, D-DIMERO, PIASTRINE, PT, PCT, proteina C-coagulativa in base all' "outcome".

PARAMETRO	DIED	ALIVE	p-value **
PCR (mg/L)- level			
Mean, at admission	165,91(±122,4)	147,7(±87,816)	NS
Median (min-max)	116,5 (8,5-462)	154 (8,86-342)	
(n=61)	(n=22)	(n=39)	
Mean, 3 rd -day	136,7(±76,75)	119,99(±83,74)	NS
Median (min-max)	132 (27,8-300)	120 (8,9-378)	
(n=55)	(n=22)	(n=33)	
Mean, 6 th -day	108,66(+/-73,583)	91,85(+/-64,149)	NS
Median (min-max)	80,6 (31,5-300)	79 (5,04-246)	
(n=45)	(n=18)	(n=27)	
Mean, 9 th -day	108,13(±88,092)	110,08(±84,923)	NS
Median (min-max)	113,5 (11,3-330)	89 (18,6-352)	
(n=37)	(n=17)	(n=20)	

Mean, 12 th -day	78,6(±67,968)	106,353(±85,58)	
Median (min-max) (n=32)	55,75 (9,4-165) (n=16)	94,5 (12,2-313) (n=16)	NS
ATIII (%) - level			
Mean, at admission	62,57(±23,07)	67,96(±21,4)	NS
Median (min-max)	64,5 (17-100)	68 (33-131)	
Mean, 3 rd -day	65,42(±19,19)	73,17(±21,284)	
Median (min-max)	66 (28-98)	69 (37-130)	NS
Mean, 6 th -day	79,2(±25,06)	77,3(±19,834)	
Median (min-max)	76 (34-130)	75 (37-128)	NS
Mean, 9 th -day	80,75(±27,04)	87,88(±26,397)	
Median (min-max)	75,5 (44-139)	80 (58-176)	NS
Mean, 12 th -day	86,62(±26,02)	86,7(±19,448)	
Median (min-max)	83 (50-138)	83 (60-126)	NS
WBC (x10⁹/L) - level			
Mean, at admission	12,97(±7,54)	17,69(±10,328)	NS
Median (min-max)	14,09 (0,54-27,4)	17,06 (1,8-49,17)	
Mean, 3 rd -day	13,34(±3,39)	16,25(±8,949)	
Median (min-max)	12,9 (7,45-19,2)	15,9 (2,53-48,22)	NS
Mean, 6 th -day	16,92(±11,06)	17,21(±8,441)	
Median (min-max)	13 (5,51-54)	15,55 (6,7-37,86)	NS
Mean, 9 th -day	15,17(±5,69)	15,232(±6,754)	
Median (min-max)	15,28 (4,27-24,69)	15,13 (4,2-26,7)	NS
Mean, 12 th -day	12,68(±4,85)	13,35(±5,611)	

Median (min-max)	14,25 (5,09-17,9)	12,46 (4,43-24,6)	NS
FIBRINOGENO(g/L)- level			
Mean, at admission	6,13(±2,67)	5,74(±2,03)	NS
Median (min-max)	6,15 (1,4-13,5)	5,7 (1,5-9,2)	
Mean, 3 rd -day	5,42(±2,23)	5,67(±1,973)	
Median (min-max)	5,2 (0,6-8,2)	5,6 (1,2-9)	NS
Mean, 6 th -day	4,68(±2,072)	5,62(±2,652)	
Median (min-max)	4,71 (1,7-9)	5,43 (1-14,7)	NS
Mean, 9 th -day	5,19(±2,779)	5,43(±2,069)	
Median (min-max)	4,67 (1,8-9)	5,2 (0,9-9)	NS
Mean, 12 th -day	4,34(±1,807)	5,69(±1,969)	
Median (min-max)	3,8 (2-7,4)	5,17 (1-9)	0.07
D-DIMERO (ug/L) - level			
Mean, at admission	1407,53(±1644,3)	1141,82(±1218,5)	NS
Median (min-max)	764,5 (50-7500)	898 (50-5934)	
Mean, 3 rd -day	1375,9(±1148,4)	991,64(±1139,9)	
Median (min-max)	1066 (185-4970)	506 (50-4500)	0.0474
Mean, 6 th -day	1463,8(±996,16)	1291,33(±1708,5)	
Median (min-max)	1719 (250-3659)	597 (65-8499)	NS
Mean, 9 th -day (n=)	1185,66(±745,08)	844,44(±712,4)	
Median (min-max)	1338,5 (205-2025)	515 (67-2552)	NS
Mean, 12 th -day (n=)	1083,87(±626,51)	836,45(±760,1)	
Median (min-max)	1170 (200-1981)	651 (50-3127)	NS

PIASTRINE(x10⁹/L)- level			
Mean, at admission	224,11(±169,32)	198,36(±98,472)	NS
Median (min-max)	157 (9-595)	188 (44-459)	
Mean, 3 rd -day	187,85(±131,61)	225,14(±109,8)	
Median (min-max)	159 (24-551)	196 (69-555)	NS
Mean, 6 th -day	178,13(±118,41)	291,74(±192,21)	
Median (min-max)	140 (52-436)	257 (63-1111)	0.02
Mean, 9 th -day	176(±137,17)	309,64(±209,4)	
Median (min-max)	131,5 (56-532)	255 (55-1001)	0.02
Mean, 12 th -day	157,5(±120,95)	346,28(±227,24)	
Median (min-max)	97,5 (45-362)	327,5 (35-1000)	0.012
PT (%) - level			
Mean, at admission	56,19(±9,98)	60,4(±15,3)	NS
Median (min-max)	57,5 (32-73)	61 (33-94)	
Mean, 3 rd -day	57,42(±14,53)	61,44(±15,3)	
Median (min-max)	57 (38-101)	62 (28-101)	NS
Mean, 6 th -day	56,13(±12,15)	65,5(±13,3)	
Median (min-max)	55 (29-82)	65,5 (44-94)	0.04
Mean, 9 th -day	59,25(±19,27)	68,4(±12,083)	
Median (min-max)	57,5 (32-90)	68 (43-101)	NS
Mean, 12 th -day	59,87(±16,97)	66,58(±11,617)	
Median (min-max)	59,5 (36-82)	64,5 (48-92)	NS
PCT (µg/L) - level			
Mean, at admission	12,06(±25,008)	9,42(±16,26)	

Median (min-max)	2,45 (0,8-98)	3,3 (0,1-63,6)	NS
Mean, 3 rd -day	8,18(±13,44)	7,61(±14,212)	
Median (min-max)	2,5 (0,2-45)	2,1 (0,1-56,1)	NS
Mean, 6 th -day	10,47(±14,63)	5,77 (±14,828)	
Median (min-max)	4,2 (0,4-41,4)	0,8 (<0,1-68)	0.06
Mean, 9 th -day	9,12(±13,32)	1,36(±2,87)	
Median (min-max)	2,05 (0,4-41,4)	0,4 (<0,1-14)	0.026
Mean, 12 th -day	6,39(±13,77)	0,71(±1,1)	
Median (min-max)	0,85 (<0.1-40)	0,3 (<0,1-4,3)	NS
PC coagulativa (mg/L) - level			
Mean, at admission	72,385(±36,939)	75,814(±32,7)	0.07
Median (min-max)	64,5 (24-140)	76 (20-140)	
Mean, 3 rd -day	72(±32,646)	88,68(±35,282)	
Median (min-max)	60 (26-137)	84,5 (33-164)	0.07
Mean, 6 th -day	88,06(±44,25)	87,04(±30,117)	
Median (min-max)	72 (39-170)	82,5 (48-148)	NS
Mean, 9 th -day	84,5(±45,886)	92,31(±22,314)	
Median (min-max)	74,5 (26-200)	91 (55-140)	NS
Mean, 12 th -day	74,5(±39,756)	91,125(±26,041)	
Median (min-max)	74 (21-134)	94,5 (40-142)	NS

(Ciascun dato è espresso in valore medio ± SD, mediana , valore massimo e minimo.

NS= non significativo; p-value** Mann Whitney U-test)

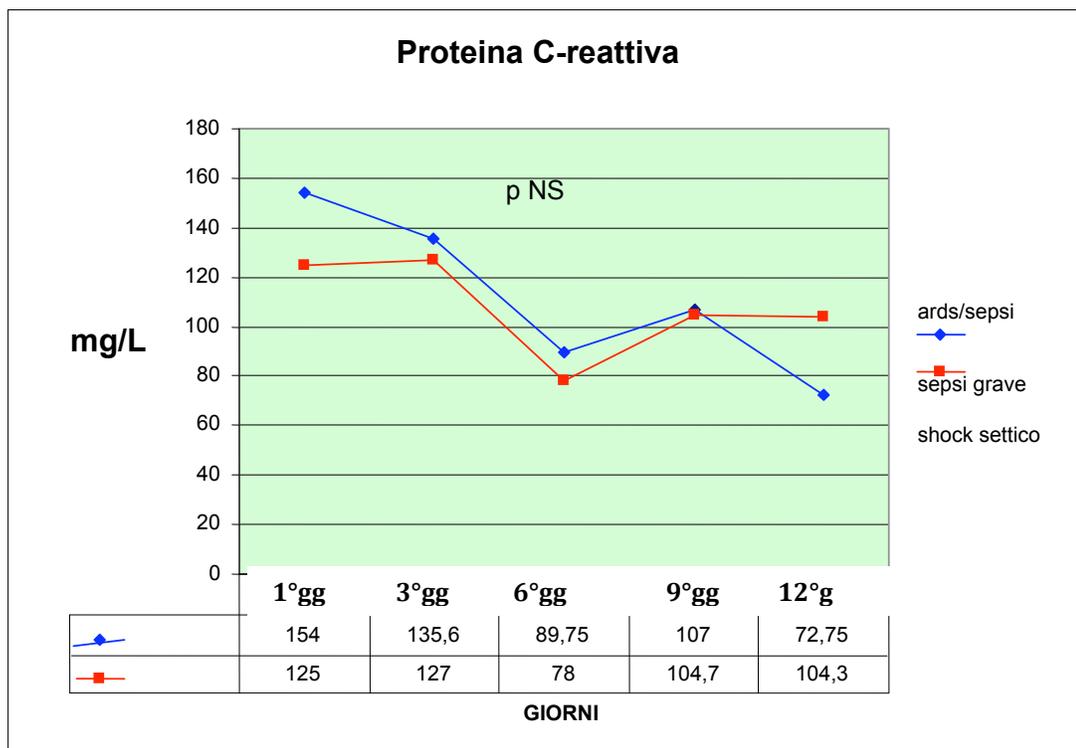
Inizialmente abbiamo confrontato le concentrazioni plasmatiche di PCR, ATIII, GLOBULI BIANCHI, FIBRINOGENO, D-DIMERO, PIASTRINE, PT, PROCALCITONINA ed infine di PROTEINA C-coagulativa nelle due classi di gravità principali (22 affetti da “SEPSI/ARDS” e 39 affetti da “SEPSI GRAVE/SHOCK SETTICO”).

Nei grafici seguenti sono riportati i valori mediani rilevati nelle varie giornate.

Per il confronto tra valori indipendenti e non parametrici è stato applicato il Mann Whitney U-test e considerato significativo un ‘p-value’ < 0.05.

Per quanto riguarda il dosaggio di PCR , ATIII, GLOBULI BIANCHI, PIASTRINE, FIBRINOGENO e Proteina C-coagulativa non abbiamo riscontrato differenze sufficientemente significative nelle diverse giornate.

Fig. 14 : Andamento della PCR nelle due classi di gravità in 1[^]-3[^]-6[^]-9[^]-12[^] giornata



Nello specifico, l'andamento medio della PCR nei due gruppi è simile, con valori affini nelle varie giornate, dosaggi lievemente superiori nei pazienti con sepsi/ards in 1^a giornata, mentre in 12^a la concentrazione mediana risulta leggermente in rialzo nei più gravi.

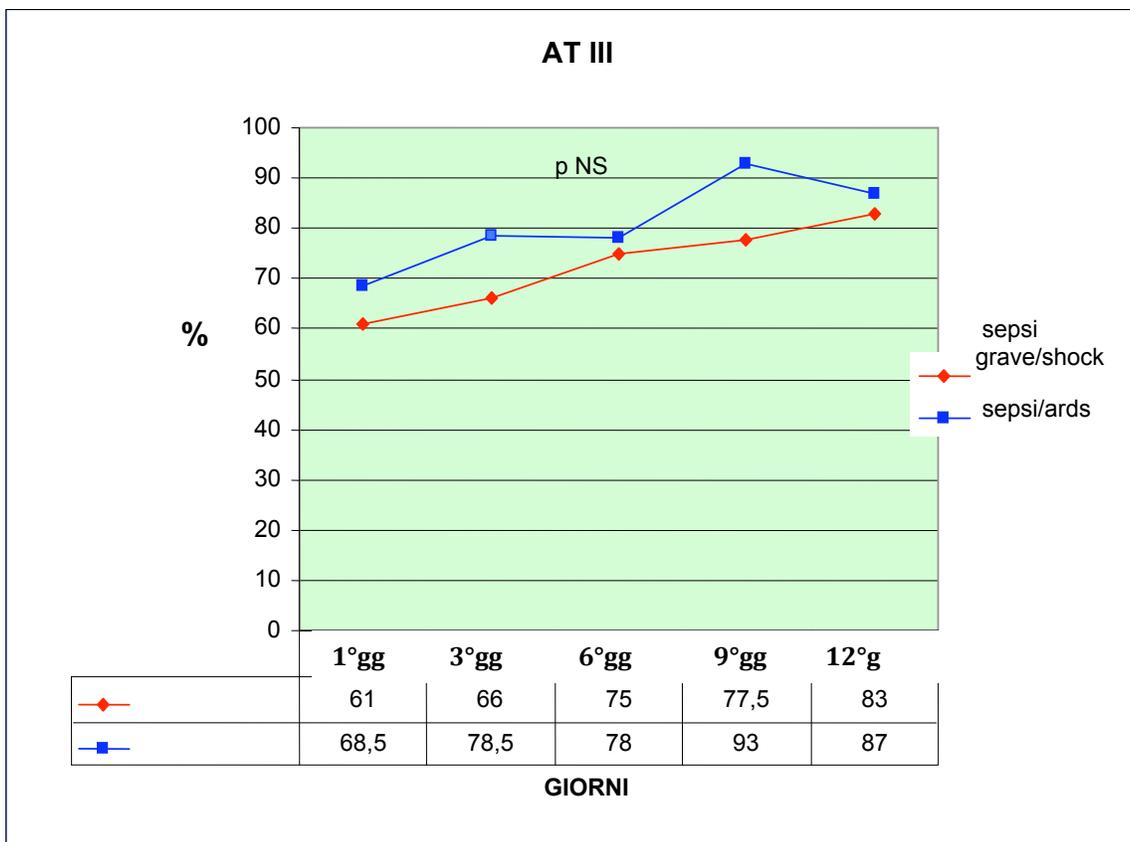


Fig. 15: Andamento dell'ATIII nelle due classi di gravità alla 1^a-3^a-6^a-9^a-12^a giornata

Per quanto riguarda l'ATIII nessuna differenza significativa e valori inferiori nei soggetti affetti da sepsi grave-shock settico durante tutto il periodo di osservazione.

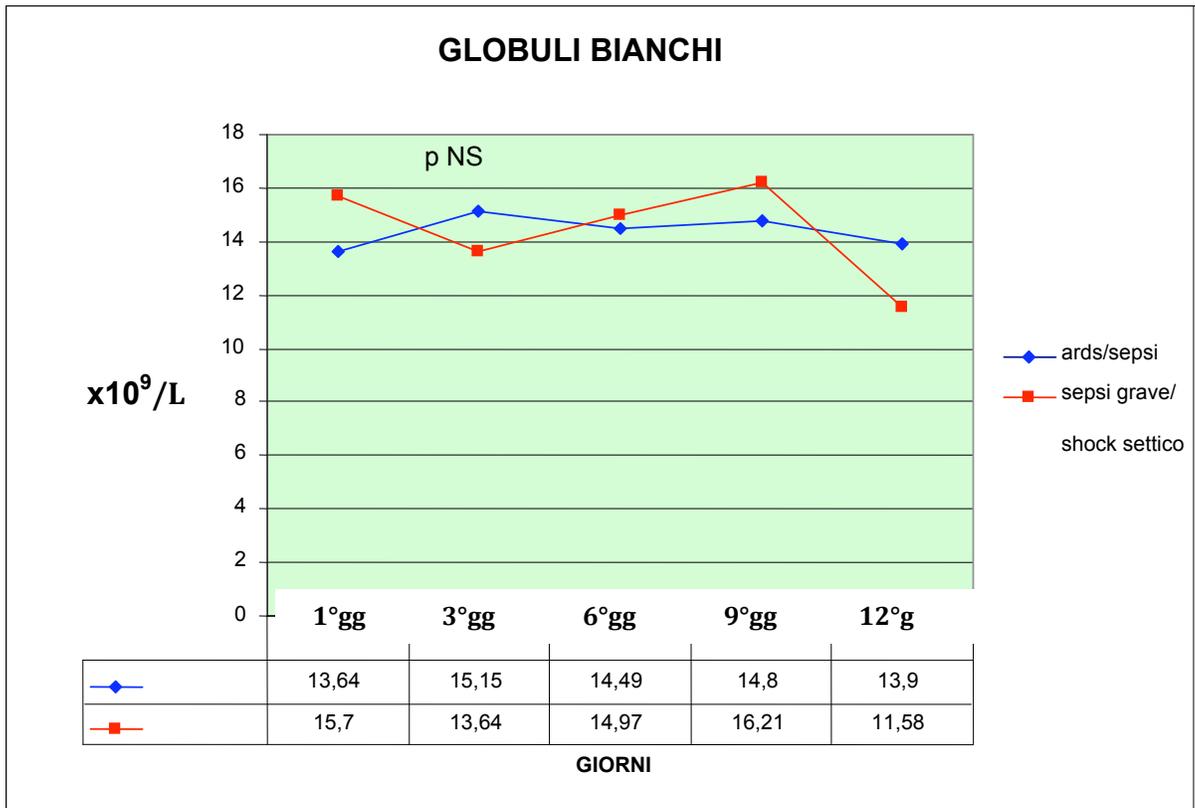


Fig.16 : Andamento dei GB nelle due classi di gravità al 1[^]-3[^]-6[^]-9[^] e 12[^] giorno.

Andamento simile tra le due classi anche per quanto riguarda i globuli bianchi. Nei soggetti più gravi il dosaggio risulta più elevato in prima giornata e tende ad aumentare nuovamente alla penultima rilevazione.

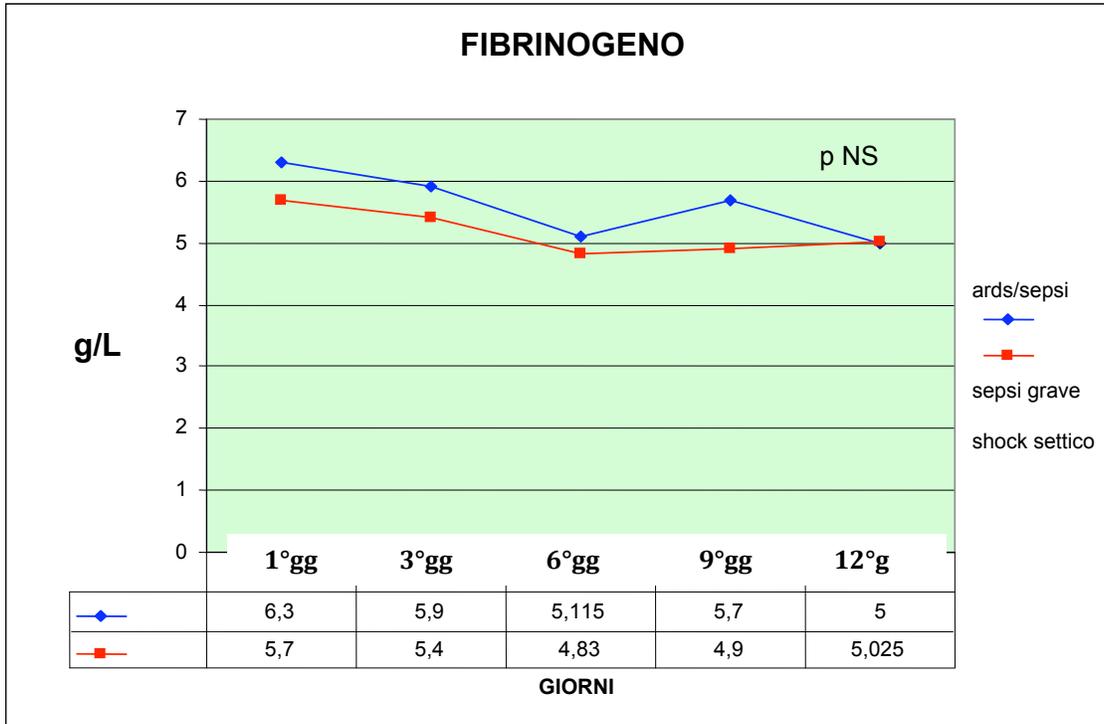


Fig.17 : Andamento del FIBRINOGENO nelle due classi di gravità al 1[^]-3[^]-6[^]-9[^] e 12[^]gg

Le concentrazioni plasmatiche di FIBRINOGENO sono risultate superiori per tutto il follow-up nei soggetti meno gravi (ma p NS).

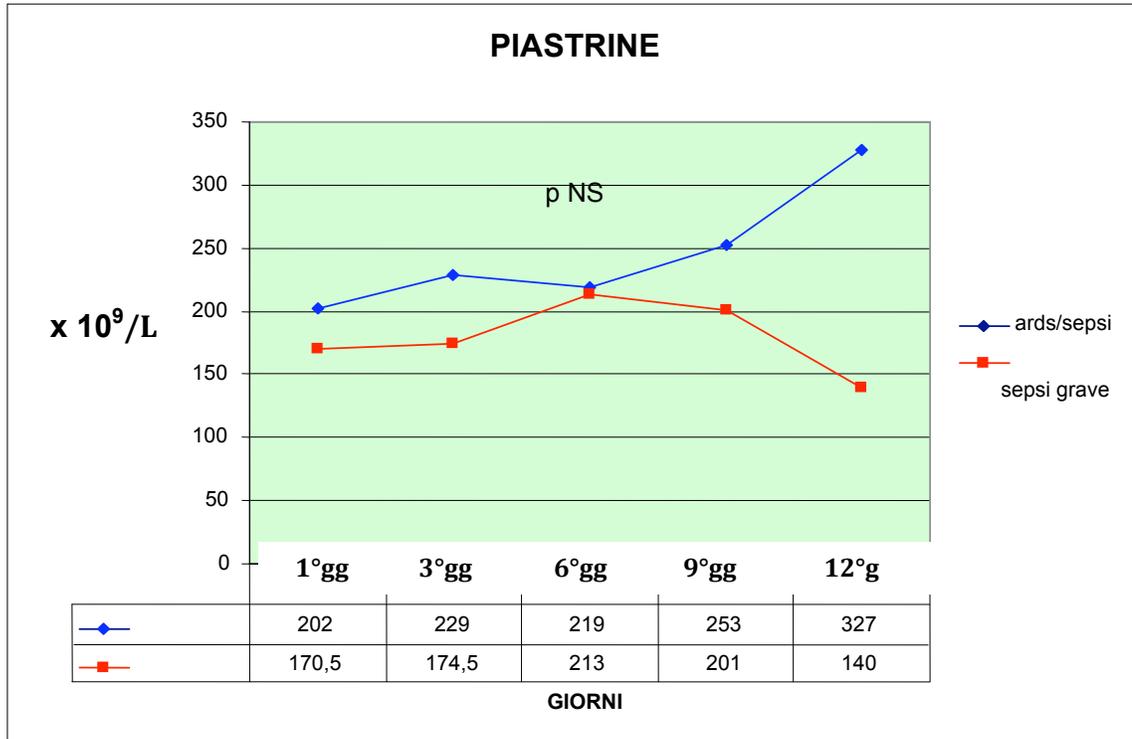


Fig.18: Andamento delle PIASTRINE nelle due classi di gravità al 1[^]-3[^]-6[^]-9[^] e 12[^]gg

Per quanto riguarda le PLT si sono registrati dosaggi superiori negli affetti da sepsi/ards, con netta differenza nelle ultime osservazioni (pNS).

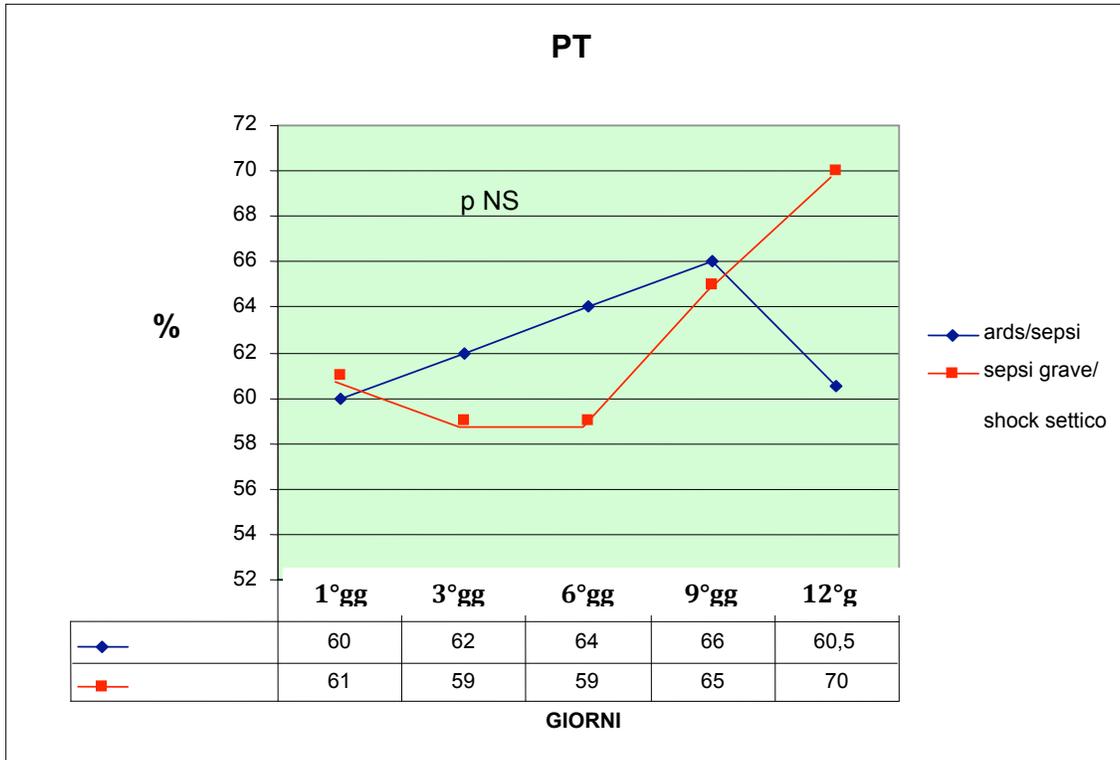


Fig. 19 : Andamento della PT nelle due classi di gravità (1[^]-3[^]-6[^]-9[^]-12[^] giornata)

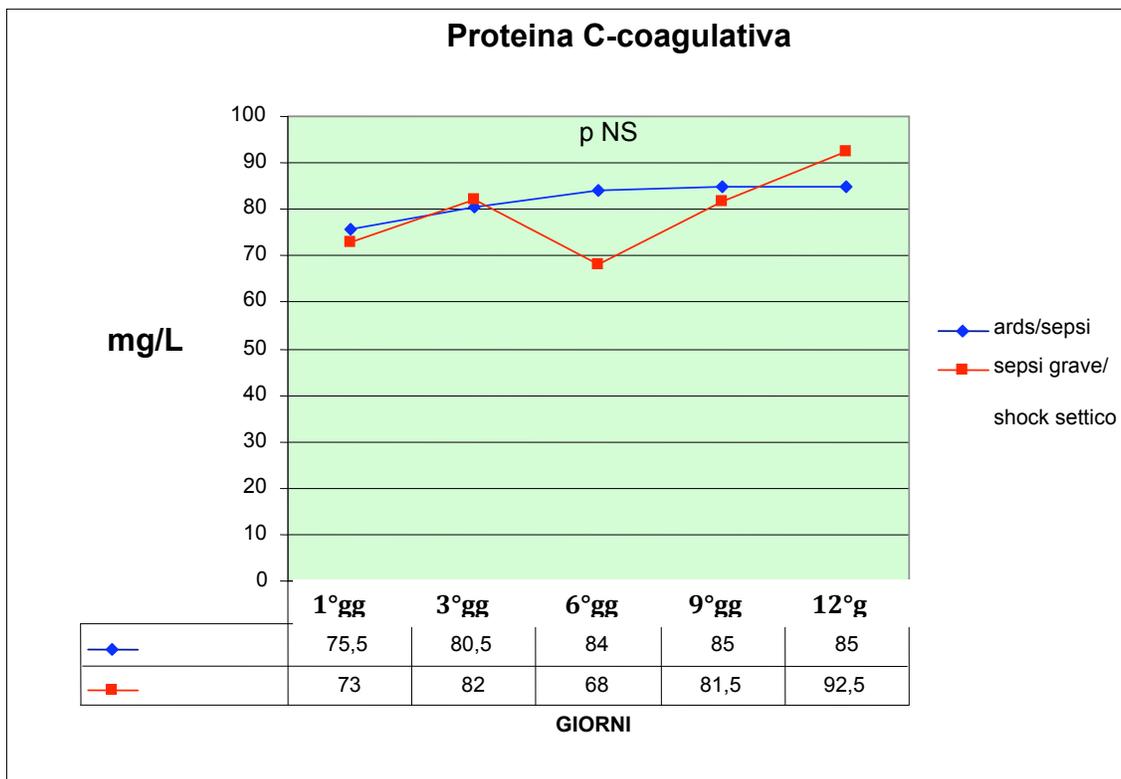


Fig.20: Andamento della PC-coagulativa nelle 2 classi di gravità al 1[^]-3[^]-6[^]-9[^] e 12[^]gg

Anche per quanto riguarda la valutazione del tempo di protrombina e le concentrazioni plasmatiche di PC-coagulativa non sono state rilevate differenze significative.

Da notare che nei soggetti più gravi in 6^a gg si è registrata una netta riduzione dei livelli di PC-coag. e un evidente aumento percentuale del PT.

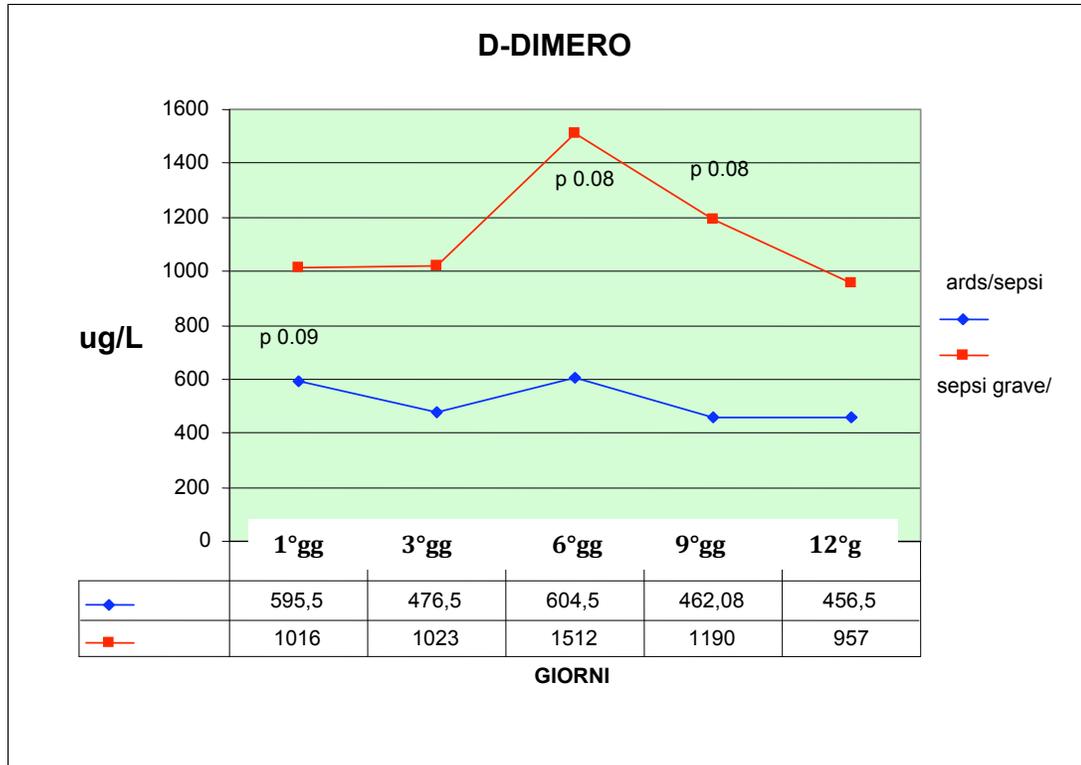


Fig.21 : Andamento del D-DIMERO nelle due classi di gravità in 1^a-3^a-6^a-9 e 12^a giornata

Per quanto riguarda il dosaggio del D-DIMERO, si sono riscontrati valori medi nettamente superiori nei pazienti più gravi, durante tutto il periodo di osservazione, e 'p-values' quasi significativi (pari a 0.09-0.08 e 0.08 rispettivamente in 1^a, 6^a e 9^a giornata).

L'unico parametro che ha portato ad ottimi risultati, dopo analisi mediante Mann-Whitney-U-test per osservazioni non parametriche, e che ha differenziato nettamente le due classi di gravità, è stata la PROCALCITONINA, come riportato nel grafico che segue.

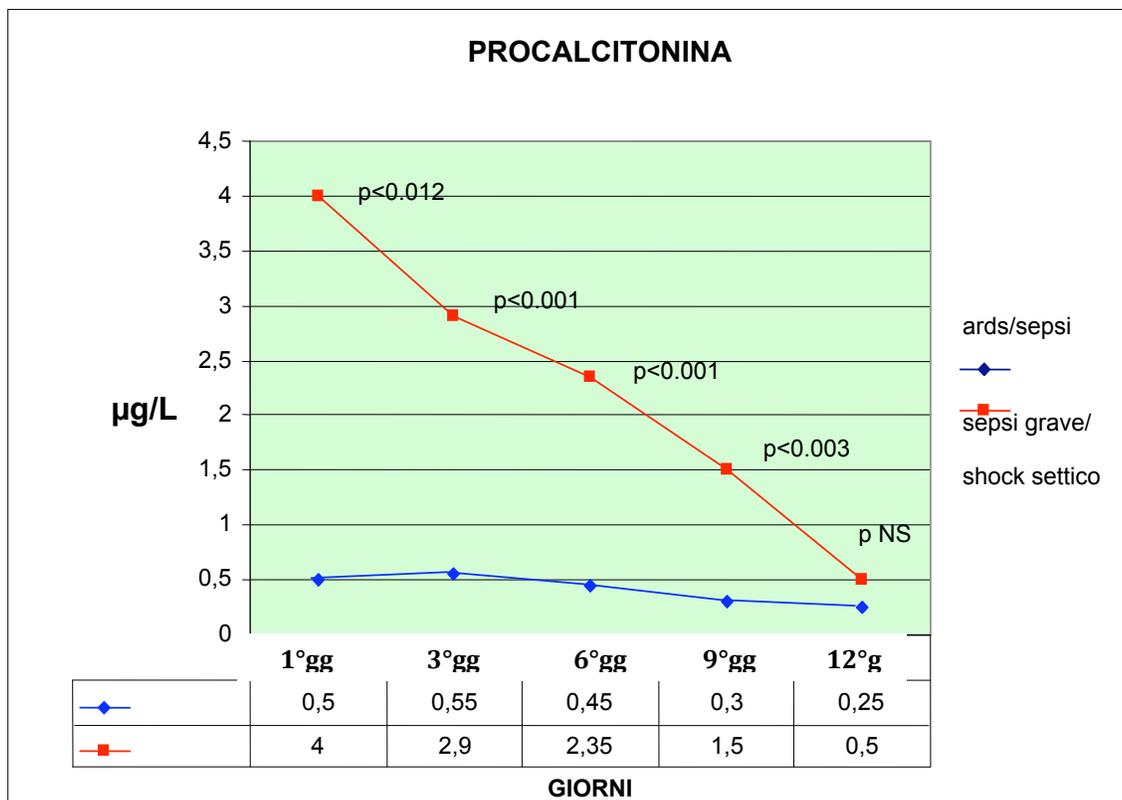


Fig.22: Andamento della PCT nelle due classi di gravità al 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giorno

Nei soggetti affetti da sepsi grave-shock settico si sono registrate concentrazioni plasmatiche nettamente superiori in 1^a-3^a-6^a e 9^a giornata, con 'p-values' significativi in tutte le rilevazioni (inferiori rispettivamente a 0.012-0.001-0.001-0.003), eccetto in 12^a giornata.

Valori 'mediani' superiori a 2.35 µg/L nelle prime tre rilevazioni negli affetti da sepsi grave/shock settico.

Successivamente abbiamo analizzato le variazioni plasmatiche di PCR, ATIII, GLOBULI BIANCHI, FIBRINOGENO, D-DIMERO, PIASTRINE, PT, PROCALCITONINA ed infine di PC-coagulativa in relazione all' "outcome", suddividendo i pazienti in "sopravvissuti" (35) e "deceduti" (26) al 28^agiorno.

Qui di seguito sono riportati i valori medi dei 9 parametri registrati nei due gruppi e nell'intero campione.

Per quanto riguarda la PCR, ATIII, GB, FIBRINOGENO e PC-coagulativa non sono state registrate differenze significative in relazione all'esito finale, come riportato nei grafici seguenti.

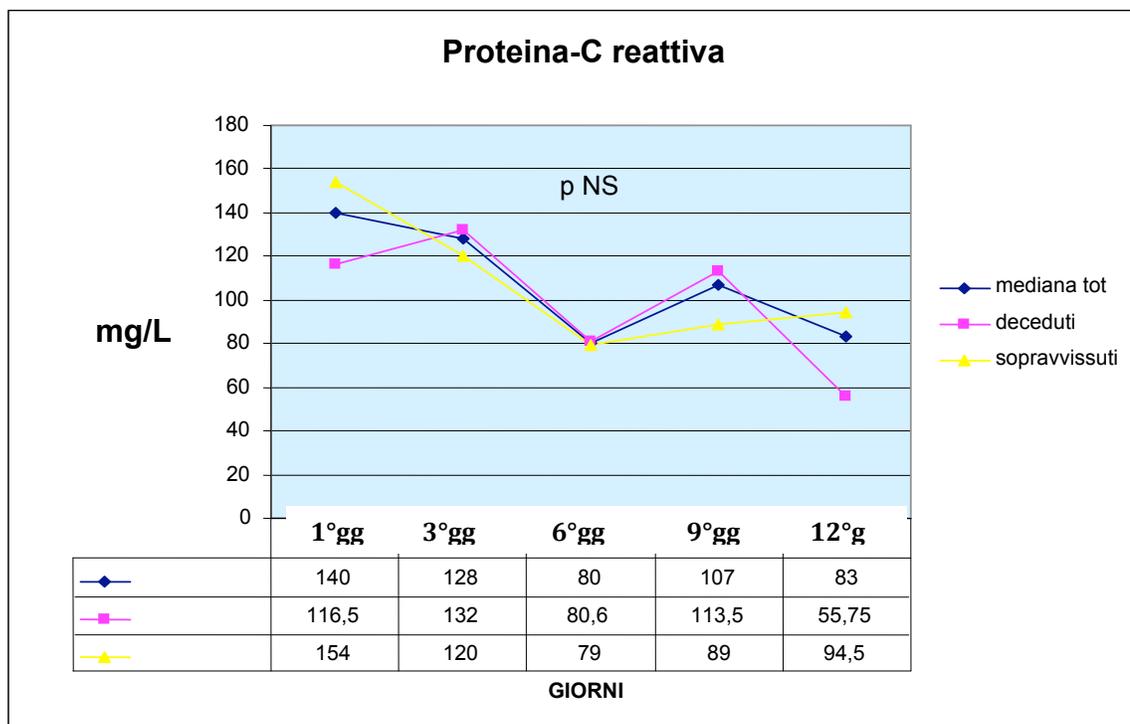


Fig.23 : Andamento della PCR in relazione all'outcome in 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata

Come possiamo notare c'è un andamento affine tra le due classi con valori plasmatici di PCR superiori nelle prime rilevazioni rispetto alle successive in entrambi i gruppi.

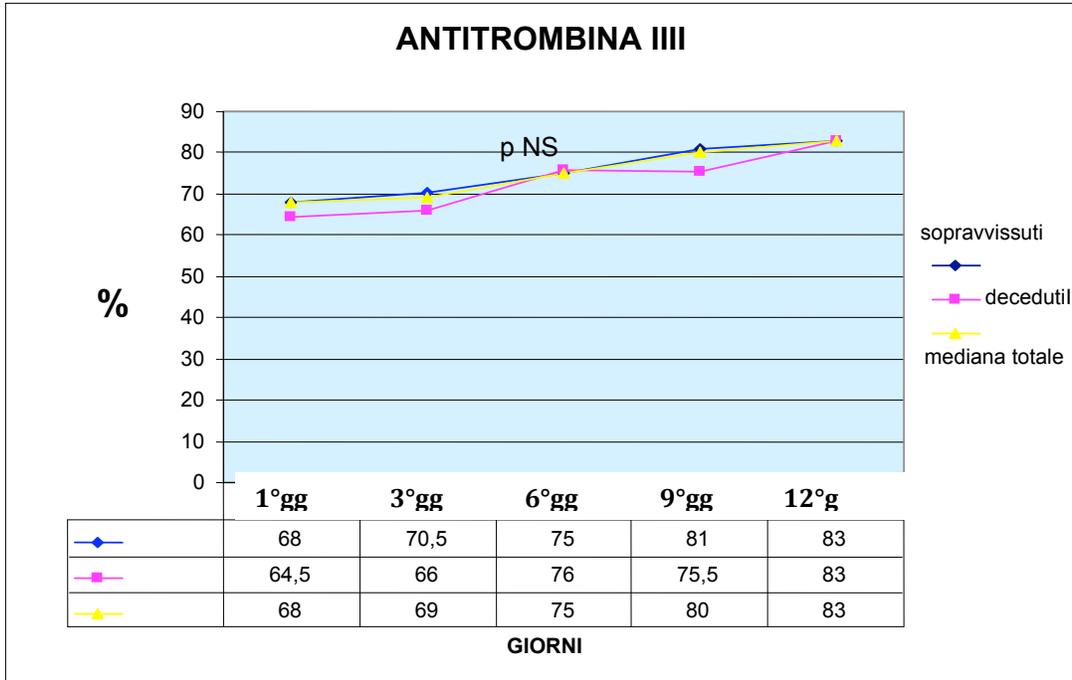


Fig.24 : Andamento della ATIII in relazione all'outcome al 1[^]-3[^]-6[^]-9[^] e 12[^] giorno

Per quanto riguarda l'ATIII non è stata evidenziata alcuna differenza saliente tra le due classi.

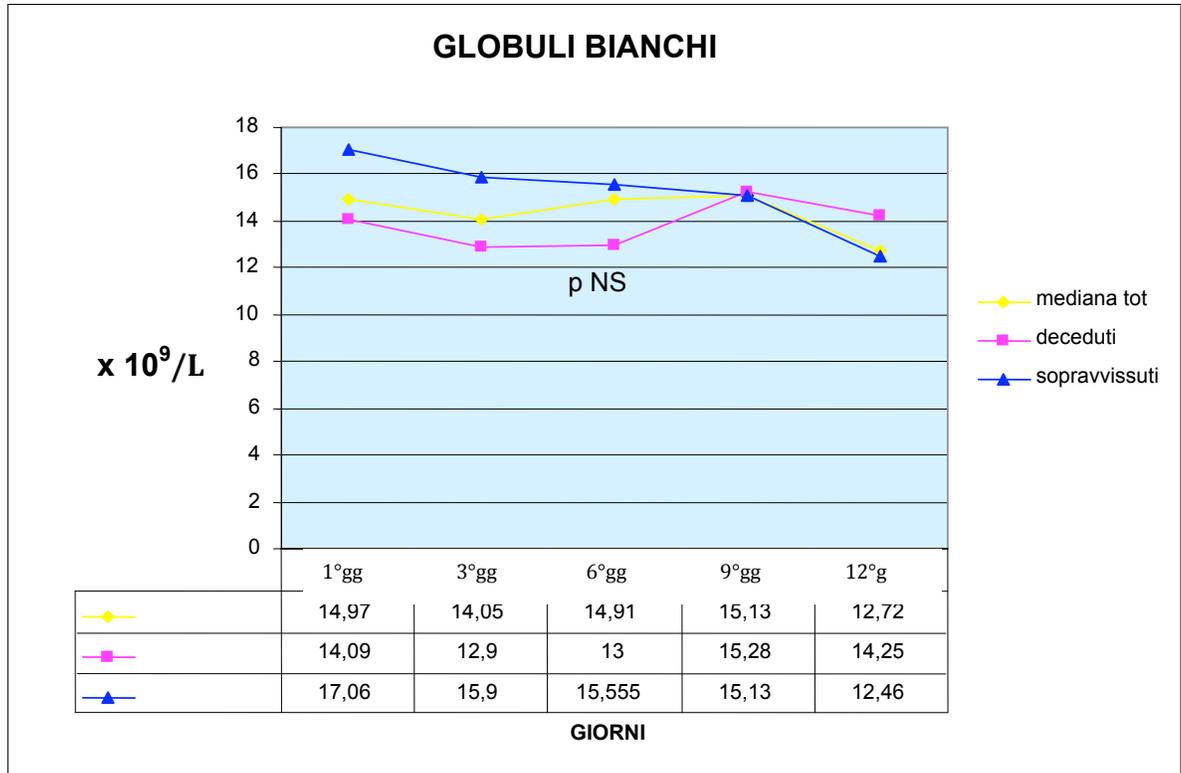


Fig.25: Andamento della GB in relazione all'outcome alla 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata

Anche per quanto riguarda il dosaggio di GB non ci sono differenze rilevanti, e nei soggetti sopravvissuti si sono registrati valori superiori nelle prime giornate (ma 'p-values' non sufficientemente significativi).

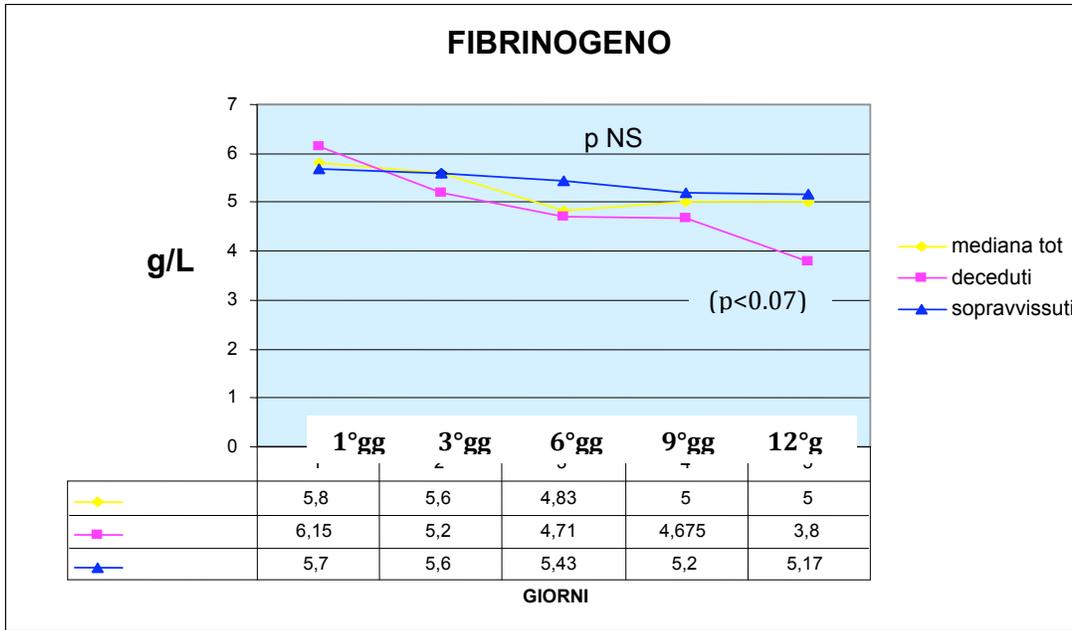


Fig.26 : Andamento del FIBRINOGENO in relazione all'outcome alla 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a gg

Riguardo al FIBRINOGENO, nei pazienti deceduti lento declino nella concentrazione plasmatica tra il primo e il dodicesimo giorno, mentre andamento più costante nei sopravvissuti (da segnalare $p < 0.07$ nell'ultima rilevazione).

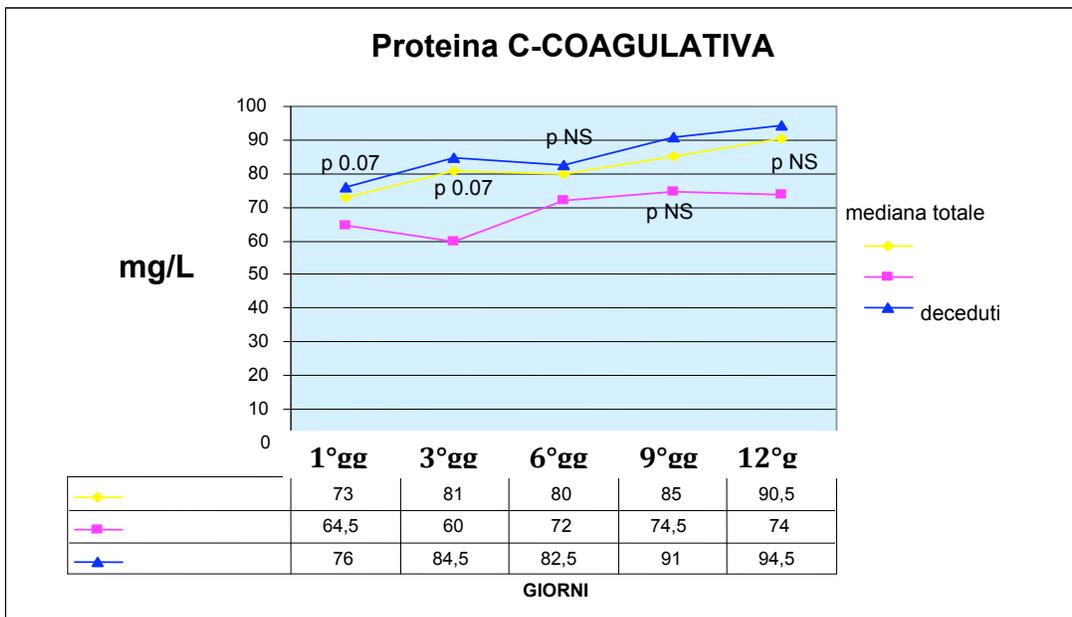


Fig.27 : Andamento della PC-coagulativa in relazione all'outcome al 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^agg

Per la PC-coagulativa è importante sottolineare che i valori nei pazienti ad esito infausto sono risultati inferiori durante tutto il follow-up ('p-values' < 0.07 alla 1^ e 2^ rilevazione, ma non sufficientemente significativi).

Per quanto riguarda lo studio delle variazioni plasmatiche di D-DIMERO, PIASTRINE, PT e PCT abbiamo ottenuto risultati importanti.

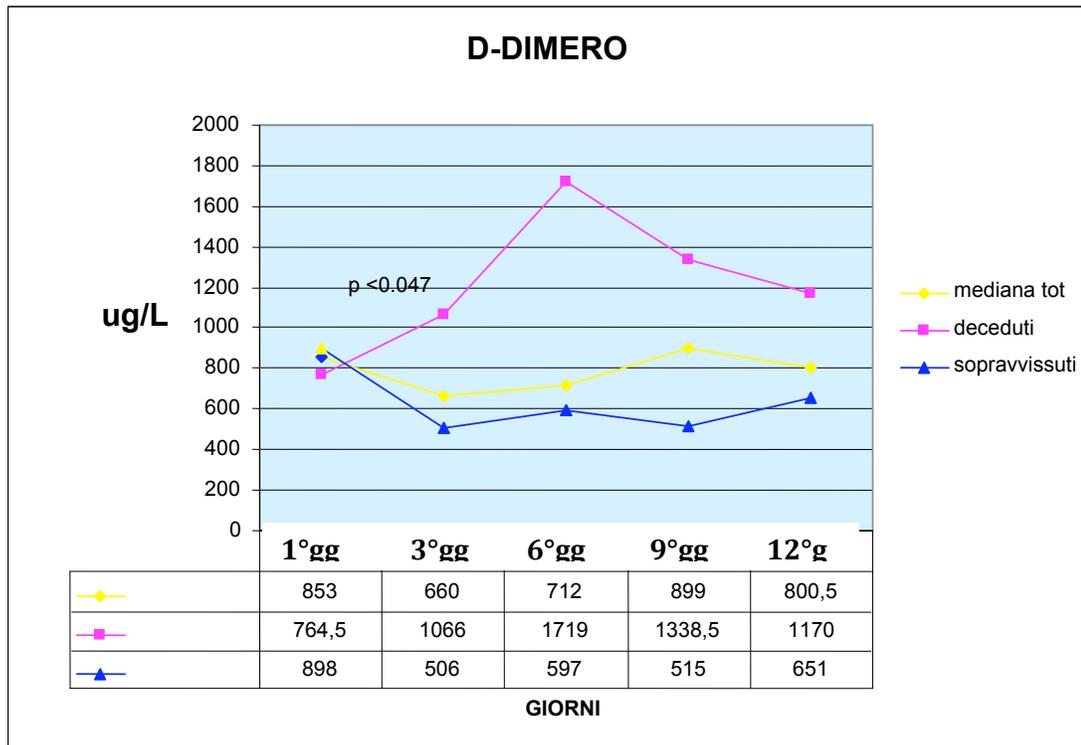


Fig.28 : Andamento del D-DIMERO in relazione all'outcome al 1^, 3^, 6^, 9^ e 12^gg

Per il D-DIMERO, c'è stato un aumento significativo dei valori rilevati in 3^ giornata nei pazienti deceduti ($p < 0.047$); seguito da un picco al 6^ giorno e da un lento declino in quelli successivi.

Nei sopravvissuti invece l'andamento medio si è dimostrato molto più costante per tutto il periodo di osservazione.

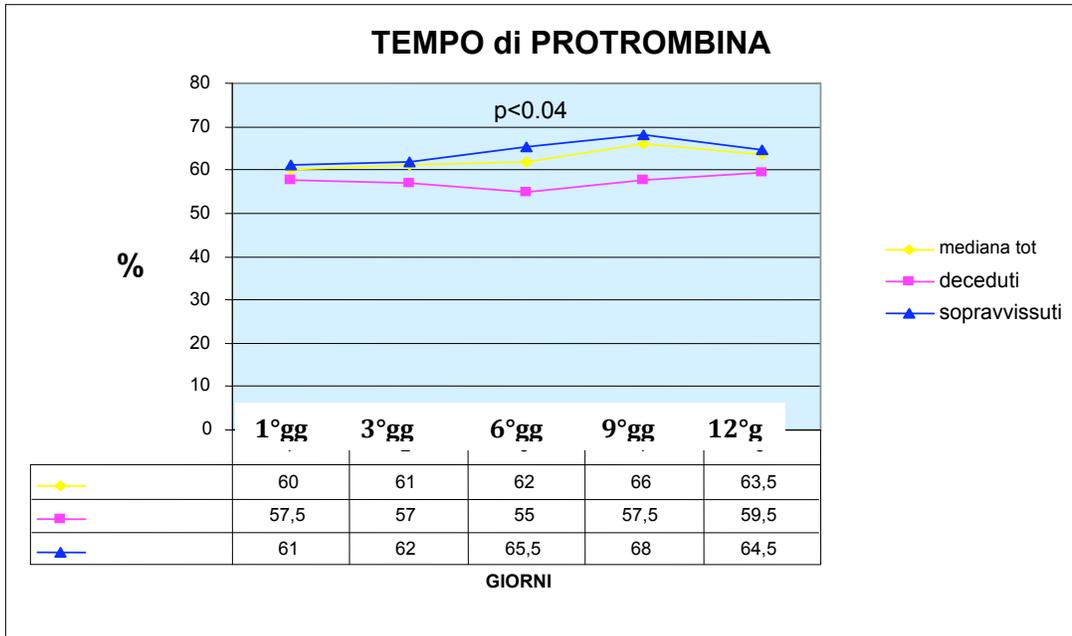


Fig.29 : Andamento della PT in relazione all'outcome alla 1^a-3^a-6^a-9^a-12^a giornata

Per quanto riguarda il PT abbiamo riscontrato una differenza tra i sopravvissuti e i deceduti soprattutto in 6^a giornata, con tendenza ad un aumento percentuale del tempo di protrombina nei primi e un 'p-value' < 0.04.

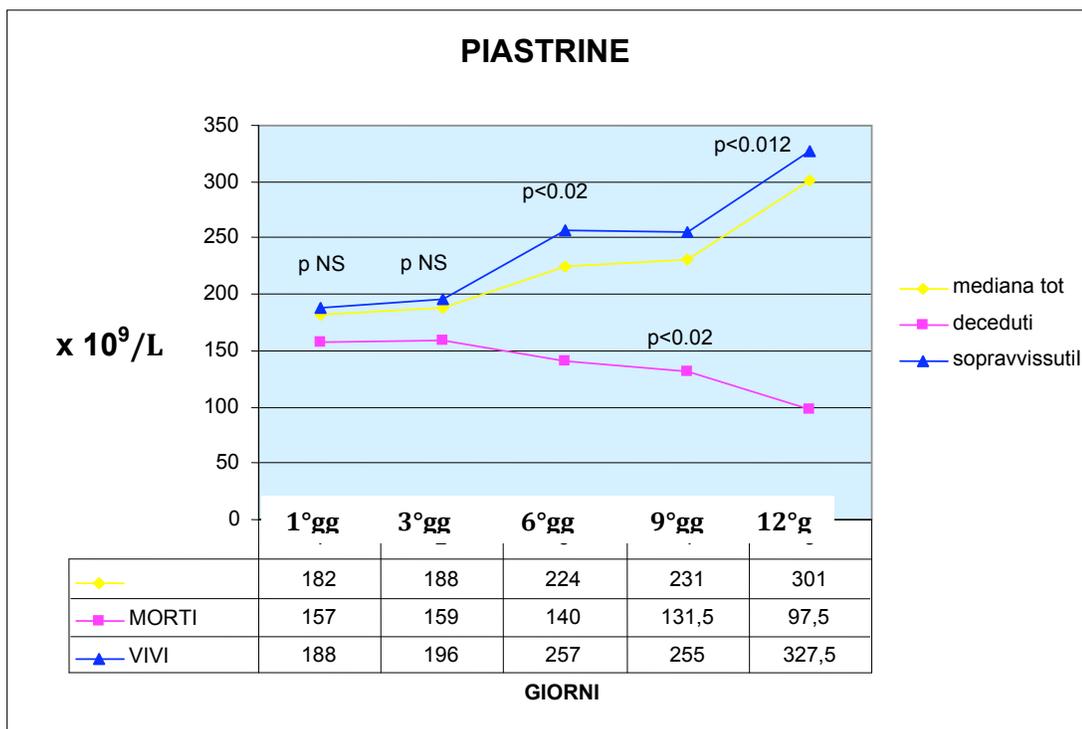


Fig.30 : Andamento delle PIASTRINE in relazione all'outcome

Per quanto riguarda le PIASTRINE è stata rilevata una netta discrepanza tra i deceduti e non, specie nelle ultime tre rilevazioni ('p-values' rispettivamente inferiore a 0.02-0.02 e 0.012).

I pazienti ad esito infausto hanno sempre presentato una conta piastrinica inferiore a quella dei sopravvissuti e al di sotto del range di normalità soprattutto nelle ultime giornate, mentre nelle prime due rilevazioni non risultano differenze significative.

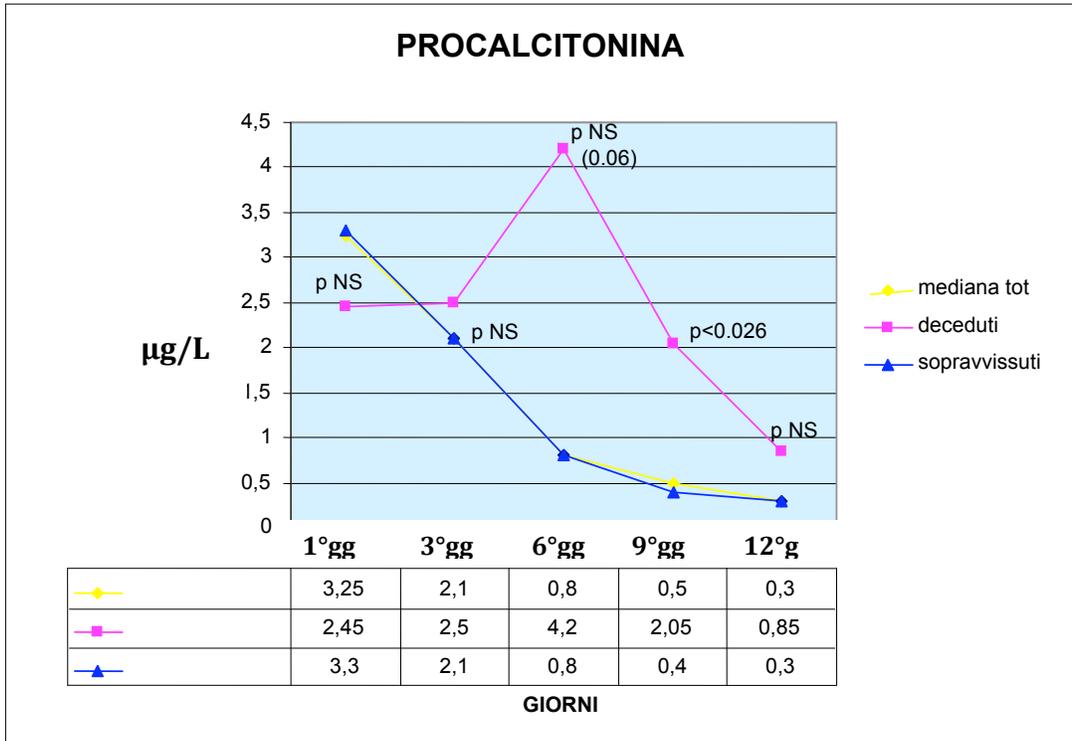


Fig.31 : Andamento della PCT in relazione all'outcome in 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata

Per quanto riguarda la PROCALCITONINA la differenza maggiore è stata rilevata in 9^a giornata ('p-value' < 0.026), con concentrazioni plasmatiche nettamente superiori nei non sopravvissuti a partire dalla 6^a giornata ('p-value' < 0.06, quasi significativo).

Per ciascun paziente inoltre abbiamo valutato i punteggi SAPS II (alla 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata) e SOFA (ogni giorno) e li abbiamo posti in relazione con le concentrazioni plasmatiche di PCT al 1^a-3^a e 6^a giorno.

Abbiamo rilevato che il dosaggio di PCT nei pazienti affetti da sepsi-sepsi grave e shock settico correla fortemente con i SOFA-score registrati in 1^a e 3^a giornata, mentre non c'è una relazione significativa con i punteggi dei giorni successivi e tra PCT e punteggi-SAPS II, come riportato nei grafici seguenti.

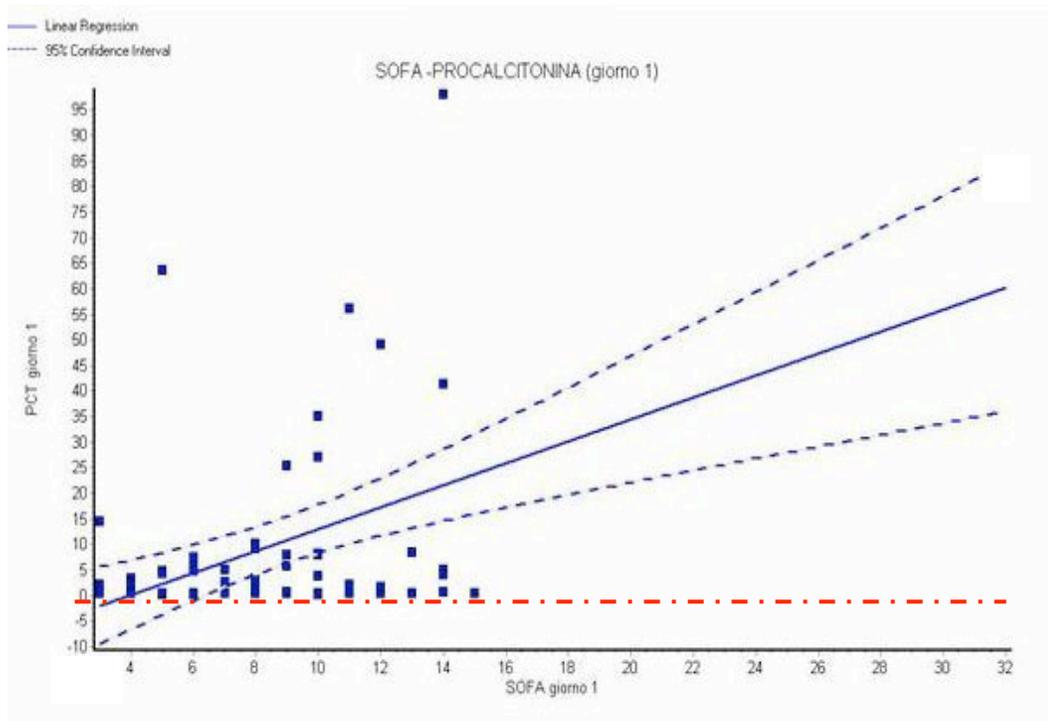


Fig.32: Retta di regressione ed I.C. tra i valori di PCT e SOFA in 1^agiornata

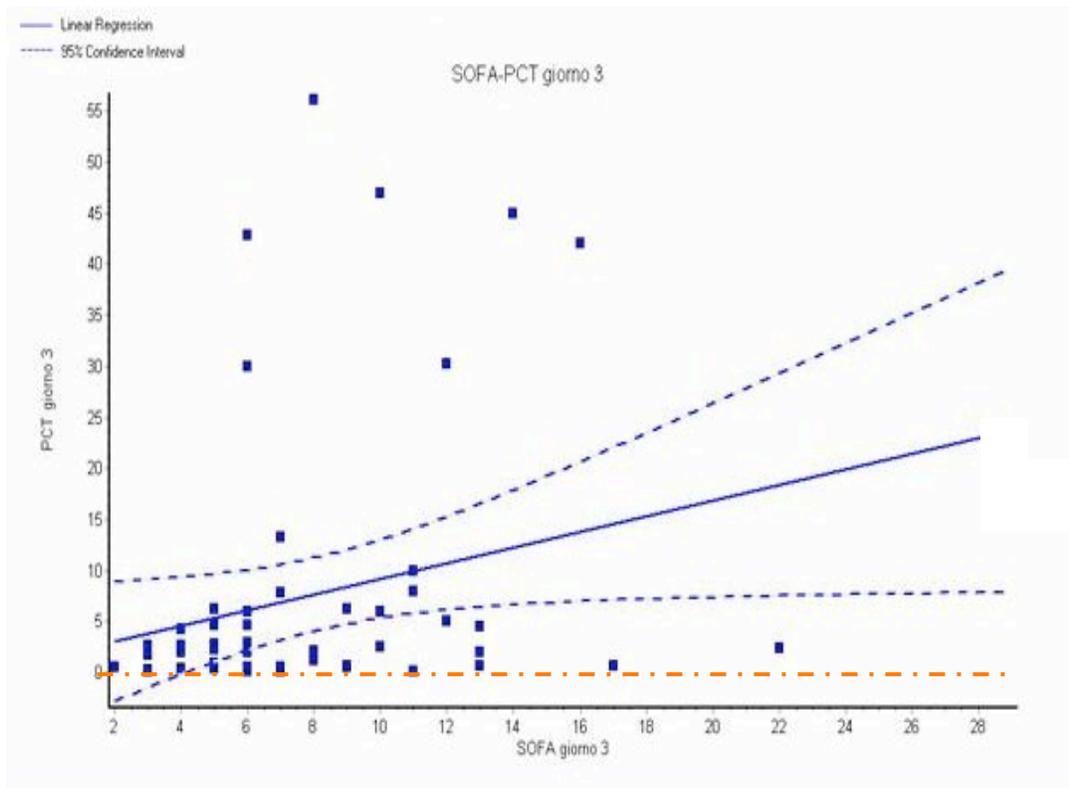


Fig.33: Retta di regressione ed I.C. tra i valori di PCT e SOFA in 3^a giornata

Le concentrazioni plasmatiche di PCT aumentano con l'incremento della disfunzione d'organo in maniera estremamente significativa in 1^a giornata (coefficiente di Pearson pari a 0.4777, 'p-value' 0.0001, I.C. 0.25-0.65); come pure in 3^a giornata (Pearson's pari a 0.2704, 'p-value' 0.0438, I.C. 0.008-0.07).

Qui di seguito sono riportate le concentrazioni medie (\pm SD) di PCT riscontrate nei pazienti in relazione alla categoria SOFA di appartenenza durante la prima e la seconda rilevazione :

**[Media±SD] di PCT nelle varie classi SOFA
(1°gg)**

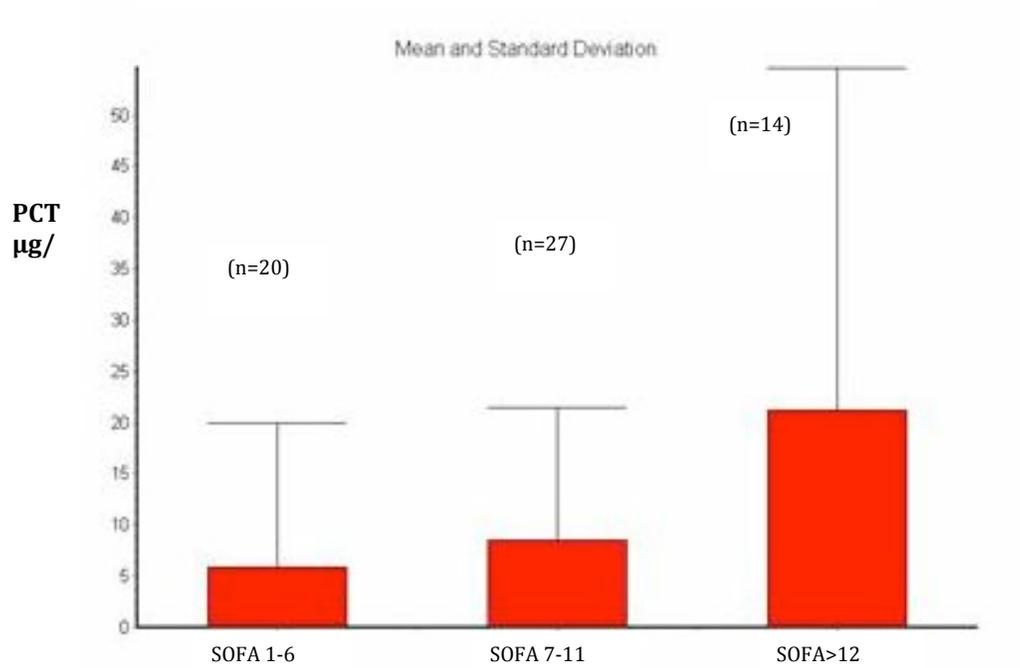


Fig.34 :Livelli medi (±SD) di PCT in relazione al SOFAscore (1^ giornata),

(PCT1°gruppo 5.885±14.02 µg/L, mediana 2.1 µg/L;

PCT2°gruppo 8.47±12.98 µg/L, mediana 3.2 µg/L;

PCT3°gruppo 21.22±33.35 µg/L, mediana 4.0 µg/L).

[Media±SD] di PCT nelle varie classi SOFA (3°gg)

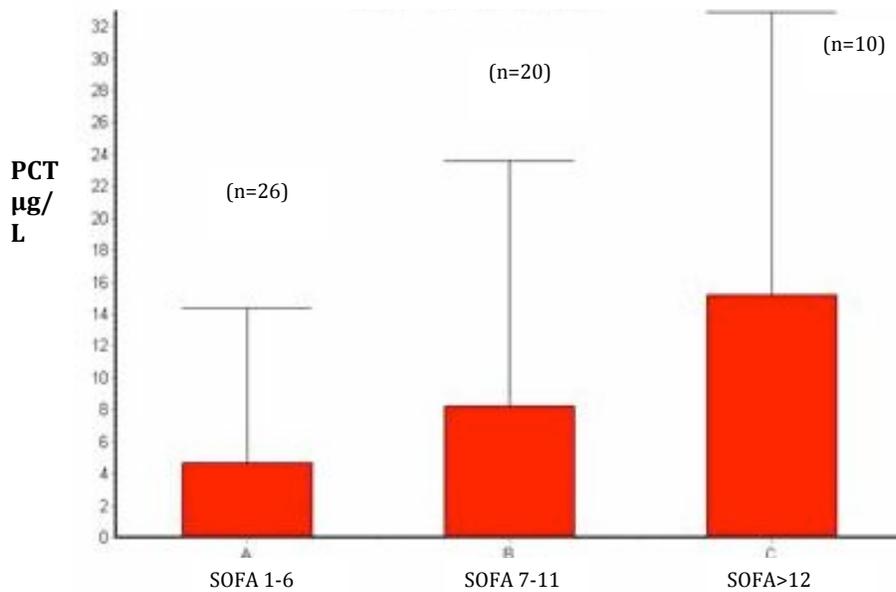


Fig.35: Livelli medi (\pm SD) di PCT in relazione al SOFA score (3^a giornata),

(PCT1° gruppo 4.7 ± 9.67 $\mu\text{g/L}$, mediana 2 $\mu\text{g/L}$;

PCT2° gruppo 8.22 ± 15.38 $\mu\text{g/L}$, mediana 1.7 $\mu\text{g/L}$;

PCT3° giorno 15.2 ± 17.72 $\mu\text{g/L}$, mediana 4.750 $\mu\text{g/L}$).

Analisi Sieroproteomica

Un problema di carattere tecnico, interno al laboratorio di Manassas, ha ritardato di molto la processazione dei campioni rendendo l'analisi sieroproteomica limitata rispetto agli obiettivi prefissati dallo studio. La scelta del laboratorio a cui affidare l'analisi è ricaduta sul laboratorio della Virginia per l'estrema competenza e l'avanzata tecnologia applicata alla processazione dei campioni. L'analisi sieroproteomica ha interessato però solo 20 pazienti al giorno 0, tra quelli sopra descritti, più 20 soggetti sani; 10 pazienti sopravvissuti e 10 deceduti. La diagnosi di ingresso nei due gruppi di pazienti è omogenea con 5 pazienti affetti da sepsi e 5 da sepsi severa per gruppo. L'età media dei soggetti sopravvissuti è di 73,9 anni, dei morti 75,6 anni e dei soggetti sani 65,2. La percentuale dei soggetti maschi è superiore in entrambi i gruppi di pazienti.

Tab: 7 pazienti inclusi nell'analisi sieroproteomica

GROUP ALIVE	NAME	AGE	SEX	INITIAL DIAGNOSIS
1	RMA perforazione intestinale	74	F	SEPSIS
2	BM fascite necrotizzante	82	F	SEPSIS
3	VA polmonite	70	M	SEPSIS
4	CO addome chirurgico urgenza	73	M	SEPSIS
5	CS trapianto di rene	83	M	SEPSIS
6	GG urosepsi	66	F	SEPSIS SEVERE
7	SB polmonite	76	F	SEPSIS SEVERE
8	MV empiema pleurico	72	M	SEPSIS SEVERE

9	DS ignota	73	M	SEPSIS SEVERE
10	GB perforazione intestinale	70	M	SEPSIS SEVERE

GROUP DEAD	NAME	AGE	SEX	INITIAL DIAGNOSIS
11	CL endocardite	80	F	SEPSIS
12	PS perforazione intestinale	82	F	SEPSIS
13	AG trauma	65	M	SEPSIS
14	LG peritonite batterica spontanea	78	M	SEPSIS
15	ME polmonite	75	M	SEPSIS
16	PC polmonite	85	M	SEPSIS SEVERE
17	RF perforazione intestinale	77	M	SEPSIS SEVERE
18	PI perforazione intestinale	76	M	SEPSIS SEVERE
19	PL resezione epatica	73	M	SEPSIS SEVERE
20	GI perforazione intestinale	65	M	SEPSIS SEVERE

Tab.8: controlli sani dell'indagine sieroproteomica

Controlli			
	N	Sex	Age
21	37	M	41
22	22	M	53
23	51	M	53

24	48	M	56
25	7	M	63
26	12	M	70
27	53	M	72
28	11	M	75
29	16	M	84
30	3	M	89
31	47	F	42
32	14	F	52
33	40	F	52
34	13	F	58
35	8	F	66
36	2	F	72
37	6	F	72
38	1	F	74
39	35	F	74
40	10	F	87

La corrispondenza tra i *tandem mass spectra* e le sequenze di peptidi è stata effettuata attraverso l'utilizzo di un motore di ricerca chiamato SEQUEST (Thermo Science). I peptidi identificati sono stati ordinati in base alla differenza percentuale di espressione tra pazienti morti e vivi secondo la formula: $(n^{\circ}\text{spettri dei campioni dei morti} - n^{\circ}\text{spettri dei campioni dei vivi} / \text{media del numero degli spettri}) \times 100$.

Sono state identificate 182 proteine: 52 proteine espresse maggiormente dai soggetti morti rispetto ai soggetti vivi, 80 espresse indifferentemente da entrambi i gruppi, 50 espresse più dai vivi che dai morti, ma solo alcune di esse hanno rivelato un livello di significatività nell'espressione.

Tab 9: Proteine isolate, peso molecole e significatività di espressione. Le proteine sono ordinate in base alla differenza percentuale di espressione tra pazienti morti e vivi secondo la formula: $(n^{\circ}\text{spettri dei campioni dei morti} - n^{\circ}\text{spettri dei campioni dei vivi} / \text{media del numero degli spettri}) \times 100$. In giallo le proteine espresse maggiormente dai soggetti morti (>100%), in bianco indifferentemente da entrambi, in azzurro maggiormente dai soggetti vivi.

#	Proteine	MW	T-Test (P-Value)
49	mitochondrial ribosomal protein S17 [Homo sapiens]	15 kDa	0% (1.00)
55	coagulation factor XII precursor [Homo sapiens]	68 kDa	0% (0.16)
73	complement factor H-related 5 [Homo sapiens]	64 kDa	0% (0.15)
75	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	167 kDa	0% (0.33)
78	S100 calcium-binding protein A8 [Homo sapiens]	11 kDa	0% (1.00)
84	hypothetical protein LOC642938 [Homo sapiens]	53 kDa	0% (1.00)
91	lysozyme precursor [Homo sapiens]	17 kDa	0% (0.33)
101	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.28)
103	phospholipase A2, group IIA [Homo sapiens]	16 kDa	0%

	sapiens]	kDa	(1.00)
111	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 [Homo sapiens]	82 kDa	0% (1.00)
117	complement component 1, r subcomponent [Homo sapiens]	80 kDa	0% (0.33)
119	cathelicidin antimicrobial peptide [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.33)
124	hypothetical protein LOC255057 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.33)
153	transcription factor 20 isoform 2 [Homo sapiens]	210 kDa	0% (1.00)
154	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	27 kDa	0% (1.00)
161	secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor [Homo sapiens]	14 kDa	0% (1.00)
171	ash1 (absent, small, or homeotic)-like [Homo sapiens]	333 kDa	0% (1.00)
173	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	33 kDa	0% (1.00)
182	PREDICTED: similar to ZK84.1 [Homo sapiens]	72 kDa	0% (0.33)
184	death-associated protein 3 [Homo sapiens]	46 kDa	0% (1.00)
187	RAB, member of RAS oncogene family- like 2B isoform 2 [Homo sapiens]	26 kDa	0% (0.33)
191	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1E subunit [Homo sapiens]	257 kDa	0% (1.00)
201	TBC1 domain family, member 16 [Homo sapiens]	86 kDa	0% (1.00)

203	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	35 kDa	0% (1.00)
206	sex-determining region Y-box 2 [Homo sapiens]	34 kDa	0% (0.33)
209	PREDICTED: similar to K06A9.1b isoform 6 [Homo sapiens]	204 kDa	0% (1.00)
210	pancreatitis-associated protein precursor [Homo sapiens]	19 kDa	0% (1.00)
213	bone morphogenetic protein 6 precursor [Homo sapiens]	57 kDa	0% (0.33)
214	plasminogen [Homo sapiens]	91 kDa	0% (0.33)
222	zinc finger protein 658 [Homo sapiens]	122 kDa	0% (0.33)
224	alpha 1 type XVII collagen [Homo sapiens]	151 kDa	0% (1.00)
225	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	14 kDa	0% (1.00)
233	solute carrier family 35, member B3 [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.33)
236	R-spondin family, member 2 [Homo sapiens]	28 kDa	0% (1.00)
243	zinc finger protein 213 [Homo sapiens]	51 kDa	0% (1.00)
244	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	43 kDa	0% (1.00)
246	discs large-associated protein 2 [Homo sapiens]	109 kDa	0% (1.00)
249	double homeobox A [Homo sapiens]	24	0%

		kDa	(1.00)
250	hypothetical protein LOC64788 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (0.33)
251	Cip1-interacting zinc finger protein [Homo sapiens]	100 kDa	0% (1.00)
254	ATP-binding cassette, sub-family A, member 9 [Homo sapiens]	184 kDa	0% (1.00)
255	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	24 kDa	0% (1.00)
258	PREDICTED: similar to zinc finger protein 654 [Homo sapiens]	96 kDa	0% (1.00)
60	hemopexin [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.16)
43	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo sapiens]	39 kDa	0% (0.051)
41	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 [Homo sapiens]	103 kDa	0% (0.18)
89	complement component 2 precursor [Homo sapiens]	83 kDa	0% (0.32)
123	gelsolin isoform b [Homo sapiens]	81 kDa	0% (0.89)
54	hypothetical protein LOC649897 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.078)
62	complement factor H isoform a precursor [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.29)
67	ATP-binding cassette, sub-family F, member 1 isoform a [Homo sapiens]	96 kDa	0% (0.45)
97	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 precursor [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.52)

69	selenoprotein P precursor [Homo sapiens]	43 kDa	0% (0.49)
36	complement factor H-related 1 [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.45)
27	small inducible cytokine A18 precursor [Homo sapiens]	10 kDa	95% (0.030)
38	complement component 5 [Homo sapiens]	188 kDa	0% (0.52)
61	chemokine-like receptor 1 [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.39)
65	complement component 1, s subcomponent [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.73)
95	angiotensinogen preproprotein [Homo sapiens]	53 kDa	0% (1.00)
126	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.33)
131	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 10 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.19)
35	histidine-rich glycoprotein precursor [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.52)
70	tsukushi [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.42)
4	serum amyloid A2 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.19)
45	transthyretin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.55)
33	vitamin D-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.37)

26	clusterin isoform 1 [Homo sapiens]	58 kDa	0% (0.37)
44	serum amyloid A4, constitutive [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.66)
34	apolipoprotein E precursor [Homo sapiens]	36 kDa	0% (0.68)
59	selenophosphate synthetase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.33)
86	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.34)
110	early endosome antigen 1, 162kD [Homo sapiens]	162 kDa	0% (0.33)
1	albumin precursor [Homo sapiens]	69 kDa	95% (0.020)
21	orosomuroid 1 precursor [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.40)
25	apolipoprotein F precursor [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.28)
53	matrix Gla protein [Homo sapiens]	12 kDa	0% (0.47)
83	kinesin family member 3C [Homo sapiens]	89 kDa	0% (0.34)
57	complement factor H isoform b precursor [Homo sapiens]	51 kDa	0% (0.47)
12	apolipoprotein H precursor [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.89)
42	S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]	13 kDa	0% (0.79)
32	kininogen 1 [Homo sapiens]	48	0%

		kDa	(0.82)
37	H2A histone family, member D [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.86)
76	alpha 1 type XVIII collagen isoform 1 precursor [Homo sapiens]	154 kDa	0% (0.34)
30	orosomuroid 2 [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.68)
68	serum amyloid P component precursor [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.47)
6	complement component 3 precursor [Homo sapiens]	187 kDa	0% (0.94)
13	complement component 4A preproprotein [Homo sapiens]	193 kDa	0% (0.56)
63	hypothetical protein LOC388533 [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.95)
48	lipopolysaccharide-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.86)
2	serum amyloid A1 isoform 1 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.70)
40	C-reactive protein, pentraxin-related [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.68)
64	insulin-like growth factor binding protein 4 precursor [Homo sapiens]	28 kDa	0% (0.37)
77	complement factor D preproprotein [Homo sapiens]	27 kDa	0% (0.63)
79	centrosomal protein 76kDa [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.67)
85	PREDICTED: similar to Protein KIAA0226 [Homo sapiens]	124 kDa	0% (0.33)

99	cystatin C precursor [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.33)
102	cofilin 1 (non-muscle) [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.98)
105	matrix metalloproteinase 14 preproprotein [Homo sapiens]	66 kDa	0% (0.24)
116	R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) containing [Homo sapiens]	121 kDa	0% (0.63)
121	heparanase [Homo sapiens]	61 kDa	0% (0.39)
138	enolase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.33)
142	phospholipase A2, group IVA [Homo sapiens]	85 kDa	0% (1.00)
145	lectin, mannose-binding 2 [Homo sapiens]	40 kDa	0% (0.34)
149	catalase [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.33)
160	keratin 1 [Homo sapiens]	66 kDa	0% (0.33)
168	myeloid cell nuclear differentiation antigen [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.36)
169	regulating synaptic membrane exocytosis 1 [Homo sapiens]	189 kDa	0% (1.00)
183	PML-RARA regulated adaptor molecule 1 [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.33)
3	apolipoprotein A-I preproprotein [Homo sapiens]	31 kDa	0% (0.34)

18	PREDICTED: similar to Neutrophil defensin 1 precursor (HNP-1) (HP-1) (HP1) (Defensin, alpha 1) [Homo sapiens]	10 kDa	0% (0.38)
8	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.41)
15	vitronectin precursor [Homo sapiens]	54 kDa	0% (0.25)
22	alpha 1 globin [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.51)
9	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4) [Homo sapiens]	11 kDa	95% (0.025)
17	pro-platelet basic protein precursor [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.30)
16	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.25)
23	coagulation factor II precursor [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.10)
10	apolipoprotein C-I precursor [Homo sapiens]	9 kDa	0% (0.11)
104	defensin, alpha 4 preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.79)
7	apolipoprotein A-II preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	95% (0.044)
24	beta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.45)
74	plasma carboxypeptidase B2 isoform a preproprotein [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.99)

114	hyaluronan binding protein 2 [Homo sapiens]	63 kDa	0% (0.65)
47	insulin-like growth factor 2 [Homo sapiens]	20 kDa	0% (0.22)
14	fibrinogen, alpha polypeptide isoform alpha-E preproprotein [Homo sapiens]	95 kDa	0% (0.095)
56	mannan-binding lectin serine protease 2 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.20)
11	apolipoprotein C-II precursor [Homo sapiens]	11 kDa	95% (0.012)
31	delta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.35)
81	paraoxonase 1 [Homo sapiens]	40 kDa	0% (0.81)
29	transferrin [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.18)
20	apolipoprotein A-IV precursor [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.10)
80	A-gamma globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.33)
90	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1 [Homo sapiens]	41 kDa	0% (0.33)
92	arsenate resistance protein ARS2 isoform a [Homo sapiens]	101 kDa	0% (1.00)
106	H1 histone family, member 3 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.34)
143	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precursor [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.33)
28	apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	21 kDa	95% (0.012)

	sapiens]	kDa	(0.017)
5	apolipoprotein C-III precursor [Homo sapiens]	11 kDa	95% (0.00088)
72	haptoglobin [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.13)
94	cardiac muscle alpha actin proprotein [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.50)
98	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.077)
115	alpha 1 type II collagen isoform 2, preproprotein [Homo sapiens]	134 kDa	0% (0.34)
139	ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein) [Homo sapiens]	18 kDa	0% (0.29)
71	PREDICTED: similar to PRKC, apoptosis, WT1, regulator [Homo sapiens]	18 kDa	0% (0.13)
58	alpha 2 type I collagen [Homo sapiens]	129 kDa	0% (0.38)
112	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1 [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.33)
19	alpha 1 type I collagen preproprotein [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.36)
100	echinoderm microtubule associated protein like 5 [Homo sapiens]	220 kDa	0% (0.17)
120	myoglobin [Homo sapiens]	17 kDa	0% (0.33)

122	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]	42 kDa	0% (1.00)
125	apolipoprotein M [Homo sapiens]	21 kDa	0% (1.00)
127	D-dopachrome tautomerase [Homo sapiens]	13 kDa	0% (0.17)
129	golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 [Homo sapiens]	206 kDa	0% (1.00)
132	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [Homo sapiens]	223 kDa	0% (0.33)
146	dynein heavy chain domain 3 [Homo sapiens]	508 kDa	0% (0.33)
147	insulin-like growth factor binding protein 3 isoform b precursor [Homo sapiens]	32 kDa	0% (0.33)
148	splicing factor, arginine/serine-rich 14 [Homo sapiens]	120 kDa	0% (0.22)
150	peptidoglycan recognition protein L precursor [Homo sapiens]	68 kDa	0% (0.33)
151	proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen) [Homo sapiens]	28 kDa	0% (0.33)
152	galectin 3 binding protein [Homo sapiens]	65 kDa	0% (1.00)
156	coiled-coil domain containing 36 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (1.00)
158	apolipoprotein C-IV [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.33)
159	prolactin receptor [Homo sapiens]	70 kDa	0% (1.00)

162	procollagen, type III, alpha 1 [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.33)
163	troponin I, skeletal, slow [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.33)
165	keratin 2 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (0.26)
166	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1) isoform gamma [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.26)
167	profilin 1 [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.33)
170	PREDICTED: similar to RAS related protein 1b [Homo sapiens]	21 kDa	0% (1.00)
176	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	50 kDa	0% (0.33)
179	alpha 1B-glycoprotein [Homo sapiens]	54 kDa	0% (1.00)
189	keratin 83 [Homo sapiens]	54 kDa	0% (1.00)
193	plexin D1 [Homo sapiens]	212 kDa	0% (1.00)
194	type I hair keratin 3B [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.33)
196	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 [Homo sapiens]	117 kDa	0% (1.00)
202	collapsin response mediator protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.33)
211	plasma glutathione peroxidase 3 precursor [Homo sapiens]	26 kDa	0% (0.33)

212	keratin 9 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.33)
215	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) [Homo sapiens]	17 kDa	0% (1.00)
216	kinase suppressor of ras 2 [Homo sapiens]	94 kDa	0% (1.00)
226	PREDICTED: similar to Zinc finger protein 506 isoform 1 [Homo sapiens]	52 kDa	0% (1.00)
230	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	31 kDa	0% (0.33)
234	PREDICTED: similar to zinc finger protein 697 [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.33)
237	SH3-domain binding protein 2 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.33)
238	dpy-19-like 3 [Homo sapiens]	83 kDa	0% (0.33)
248	ribosomal protein L24 [Homo sapiens]	18 kDa	0% (1.00)
253	rhopilin-like protein [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.33)
256	axonemal dynein heavy chain 7 [Homo sapiens]	461 kDa	0% (1.00)
257	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 [Homo sapiens]	116 kDa	0% (0.33)

Tab.10:Proteine isolate nei soggetti sopravvissuti e confrontate per gruppi Sepsis severa Vs Sepsis; in giallo le proteine maggiormente espresse dal gruppo sepsis severa, in bianco indifferentemente, in azzurro dal gruppo sepsis.

#	Proteins	MW	T-Test (P-Value)
40	histidine-rich glycoprotein precursor [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.26)
49	complement component 5 [Homo sapiens]	188 kDa	0% (0.21)
59	haptoglobin [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.41)
74	complement component 1, s subcomponent [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.36)
65	alpha 1 type XVIII collagen isoform 1 precursor [Homo sapiens]	154 kDa	0% (0.67)
76	H1 histone family, member 3 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.42)
93	hyaluronan binding protein 2 [Homo sapiens]	63 kDa	0% (0.36)
95	complement factor H isoform a precursor [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.37)
102	D-dopachrome tautomerase [Homo sapiens]	13 kDa	0% (0.17)
75	myoglobin [Homo sapiens]	17 kDa	0% (0.42)
79	selenoprotein P precursor [Homo sapiens]	43 kDa	0% (0.34)
91	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [Homo sapiens]	223 kDa	0% (0.41)

	sapiens]	kDa	
99	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo sapiens]	39 kDa	0% (0.41)
77	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.091)
105	peptidoglycan recognition protein L precursor [Homo sapiens]	68 kDa	0% (0.36)
115	coiled-coil domain containing 36 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (0.091)
121	troponin I, skeletal, slow [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.26)
122	keratin 2 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (0.26)
123	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1) isoform gamma [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.26)
126	PREDICTED: similar to RAS related protein 1b [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.26)
130	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	50 kDa	0% (0.26)
134	insulin-like growth factor binding protein 3 isoform b precursor [Homo sapiens]	32 kDa	0% (0.26)
142	type I hair keratin 3B [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.40)
144	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 precursor	48	0% (0.41)

	[Homo sapiens]	kDa	
68	centrosomal protein 76kDa [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.68)
83	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.68)
89	angiotensinogen preproprotein [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.25)
100	hemopexin [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.69)
106	golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 [Homo sapiens]	206 kDa	0% (0.25)
109	proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen) [Homo sapiens]	28 kDa	0% (0.26)
110	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 10 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.25)
131	alpha 1B-glycoprotein [Homo sapiens]	54 kDa	0% (0.39)
132	catalase [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.26)
136	phospholipase A2, group IVA [Homo sapiens]	85 kDa	0% (0.51)
138	keratin 83 [Homo sapiens]	54 kDa	0% (0.26)
143	galectin 3 binding protein [Homo sapiens]	65 kDa	0% (0.26)

150	regulating synaptic membrane exocytosis 1 [Homo sapiens]	189 kDa	0% (0.26)
152	keratin 9 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.26)
153	plasma glutathione peroxidase 3 precursor [Homo sapiens]	26 kDa	0% (0.26)
154	myeloid cell nuclear differentiation antigen [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.26)
156	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) [Homo sapiens]	17 kDa	0% (0.26)
157	kinase suppressor of ras 2 [Homo sapiens]	94 kDa	0% (0.26)
162	PREDICTED: similar to Zinc finger protein 506 isoform 1 [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.26)
167	SH3-domain binding protein 2 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (0.091)
168	dpy-19-like 3 [Homo sapiens]	83 kDa	0% (0.25)
175	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 [Homo sapiens]	117 kDa	0% (0.26)
176	rhopilin-like protein [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.26)
178	axonemal dynein heavy chain 7 [Homo sapiens]	461 kDa	0% (0.39)
33	kininogen 1 [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.24)

35	H2A histone family, member D [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.063)
60	plasma carboxypeptidase B2 isoform a preproprotein [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.052)
29	delta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.21)
61	cardiac muscle alpha actin proprotein [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.44)
28	clusterin isoform 1 [Homo sapiens]	58 kDa	0% (0.27)
6	complement component 3 precursor [Homo sapiens]	187 kDa	95% (0.015)
24	beta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.16)
69	hypothetical protein LOC649897 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.35)
82	kinesin family member 3C [Homo sapiens]	89 kDa	0% (0.16)
31	vitamin D-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.18)
88	cofilin 1 (non-muscle) [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.42)
27	transferrin [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.11)
47	lipopolysaccharide-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.37)
23	alpha 1 globin [Homo sapiens]	15	0% (0.079)

		kDa	
19	pro-platelet basic protein precursor [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.079)
37	insulin-like growth factor 2 [Homo sapiens]	20 kDa	0% (0.43)
51	complement factor H isoform b precursor [Homo sapiens]	51 kDa	0% (0.36)
63	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 [Homo sapiens]	103 kDa	0% (0.69)
108	ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein) [Homo sapiens]	18 kDa	0% (0.42)
16	complement component 4A preproprotein [Homo sapiens]	193 kDa	95% (0.023)
7	serum amyloid A2 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.51)
64	serum amyloid P component precursor [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.96)
26	apolipoprotein F precursor [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.31)
8	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.45)
9	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4) [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.13)
14	fibrinogen, alpha polypeptide isoform alpha-E preproprotein [Homo sapiens]	95 kDa	0% (0.45)

17	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.56)
34	S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]	13 kDa	0% (0.31)
1	albumin precursor [Homo sapiens]	69 kDa	0% (0.28)
11	apolipoprotein C-II precursor [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.43)
22	apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.45)
25	orosomuroid 1 precursor [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.62)
46	mannan-binding lectin serine protease 2 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	21 kDa	0% (1.00)
57	insulin-like growth factor binding protein 4 precursor [Homo sapiens]	28 kDa	0% (0.49)
18	PREDICTED: similar to Neutrophil defensin 1 precursor (HNP-1) (HP-1) (HP1) (Defensin, alpha 1) [Homo sapiens]	10 kDa	0% (0.80)
10	apolipoprotein C-I precursor [Homo sapiens]	9 kDa	0% (0.85)
30	small inducible cytokine A18 precursor [Homo sapiens]	10 kDa	0% (0.94)
32	orosomuroid 2 [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.86)

4	apolipoprotein C-III precursor [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.97)
13	apolipoprotein H precursor [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.68)
39	apolipoprotein E precursor [Homo sapiens]	36 kDa	0% (0.94)
55	hypothetical protein LOC388533 [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.91)
56	selenophosphate synthetase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.35)
67	echinoderm microtubule associated protein like 5 [Homo sapiens]	220 kDa	0% (0.35)
70	A-gamma globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.25)
78	ST8 alpha-N-acetyl- neuraminide alpha-2,8- sialyltransferase 1 [Homo sapiens]	41 kDa	0% (0.36)
85	PREDICTED: similar to Protein KIAA0226 [Homo sapiens]	124 kDa	0% (0.25)
87	arsenate resistance protein ARS2 isoform a [Homo sapiens]	101 kDa	0% (0.089)
96	heparanase [Homo sapiens]	61 kDa	0% (0.17)
97	matrix metalloproteinase 14 preproprotein [Homo sapiens]	66 kDa	0% (0.091)
124	profilin 1 [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.26)

127	splicing factor, arginine/serine-rich 14 [Homo sapiens]	120 kDa	0% (0.26)
15	vitronectin precursor [Homo sapiens]	54 kDa	0% (0.75)
5	apolipoprotein A-II preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.64)
21	coagulation factor II precursor [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.60)
20	apolipoprotein A-IV precursor [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.63)
3	apolipoprotein A-I preproprotein [Homo sapiens]	31 kDa	0% (0.29)
43	complement factor H-related 1 [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.55)
50	matrix Gla protein [Homo sapiens]	12 kDa	0% (0.23)
62	paraoxonase 1 [Homo sapiens]	40 kDa	0% (0.95)
92	defensin, alpha 4 preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.29)
2	serum amyloid A1 isoform 1 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.20)
45	transthyretin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.089)
71	complement factor D preproprotein [Homo sapiens]	27 kDa	0% (0.26)
72	tsukushi [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.26)
52	PREDICTED: similar to PRKC,	18	0% (0.31)

	apoptosis, WT1, regulator [Homo sapiens]	kDa	
44	serum amyloid A4, constitutive [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.34)
12	alpha 1 type I collagen preproprotein [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.35)
36	alpha 2 type I collagen [Homo sapiens]	129 kDa	0% (0.34)
81	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1 [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.34)
41	C-reactive protein, pentraxin- related [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.32)
90	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.25)
94	alpha 1 type II collagen isoform 2, preproprotein [Homo sapiens]	134 kDa	0% (0.33)
112	cystatin C precursor [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.33)
66	ATP-binding cassette, sub- family F, member 1 isoform a [Homo sapiens]	96 kDa	0% (0.39)
98	R3H domain (binds single- stranded nucleic acids) containing [Homo sapiens]	121 kDa	0% (0.51)
113	early endosome antigen 1, 162kD [Homo sapiens]	162 kDa	0% (0.26)

140	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precursor [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.33)
73	chemokine-like receptor 1 [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.17)
101	apolipoprotein M [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.26)
103	complement component 2 precursor [Homo sapiens]	83 kDa	0% (0.69)
114	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.091)
117	apolipoprotein C-IV [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.26)
118	prolactin receptor [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.39)
119	procollagen, type III, alpha 1 [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.091)
120	lectin, mannose-binding 2 [Homo sapiens]	40 kDa	0% (0.25)
139	gelsolin isoform b [Homo sapiens]	81 kDa	0% (0.26)
141	plexin D1 [Homo sapiens]	212 kDa	0% (0.26)
147	collapsin response mediator protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.51)
148	dynein heavy chain domain 3 [Homo sapiens]	508 kDa	0% (0.26)

151	keratin 1 [Homo sapiens]	66 kDa	0% (0.26)
155	enolase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.26)
163	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	31 kDa	0% (0.26)
165	PREDICTED: similar to zinc finger protein 697 [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.26)
170	PML-RARA regulated adaptor molecule 1 [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.26)
174	ribosomal protein L24 [Homo sapiens]	18 kDa	0% (0.26)
179	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 [Homo sapiens]	116 kDa	0% (0.26)

Tab.11: Proteine isolate nei soggetti morti e confrontate per gruppi: Sepsis severa Vs Sepsis; in giallo le proteine maggiormente espresse dal gruppo sepsis severa, in bianco indifferentemente, in azzurro dal gruppo sepsis.

#	Proteins	MW	T-Test (P-Value)
40	C-reactive protein, pentraxin-related [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.35)
45	transthyretin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.35)
50	mitochondrial ribosomal	15	0%

	protein S17 [Homo sapiens]	kDa	(1.00)
61	selenoprotein P precursor [Homo sapiens]	43 kDa	0% (0.14)
63	complement factor H-related 5 [Homo sapiens]	64 kDa	0% (0.14)
71	hypothetical protein LOC642938 [Homo sapiens]	53 kDa	0% (1.00)
78	haptoglobin [Homo sapiens]	45 kDa	0% (1.00)
81	S100 calcium-binding protein A8 [Homo sapiens]	11 kDa	0% (1.00)
83	PREDICTED: similar to Protein KIAA0226 [Homo sapiens]	124 kDa	0% (1.00)
91	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 [Homo sapiens]	82 kDa	0% (1.00)
94	A-gamma globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (1.00)
95	arsenate resistance protein ARS2 isoform a [Homo sapiens]	101 kDa	0% (1.00)
96	phospholipase A2, group IIA [Homo sapiens]	16 kDa	0% (1.00)
98	angiotensinogen preproprotein [Homo sapiens]	53 kDa	0% (1.00)
101	ST8 alpha-N-acetyl- neuraminide alpha-2,8- sialyltransferase 1 [Homo sapiens]	41 kDa	0% (1.00)

103	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	14 kDa	0% (1.00)
114	PREDICTED: similar to PRKC, apoptosis, WT1, regulator [Homo sapiens]	18 kDa	0% (0.35)
118	enolase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (1.00)
146	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	27 kDa	0% (1.00)
148	TBC1 domain family, member 16 [Homo sapiens]	86 kDa	0% (1.00)
157	secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor [Homo sapiens]	14 kDa	0% (1.00)
182	R-spondin family, member 2 [Homo sapiens]	28 kDa	0% (1.00)
194	double homeobox A [Homo sapiens]	24 kDa	0% (1.00)
196	Cip1-interacting zinc finger protein [Homo sapiens]	100 kDa	0% (1.00)
198	ATP-binding cassette, sub-family A, member 9 [Homo sapiens]	184 kDa	0% (1.00)
199	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	24 kDa	0% (1.00)
200	PREDICTED: similar to zinc finger protein 654 [Homo sapiens]	96 kDa	0% (1.00)
37	complement component 5 [Homo sapiens]	188 kDa	0% (0.16)

42	H2A histone family, member D [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.24)
33	apolipoprotein E precursor [Homo sapiens]	36 kDa	0% (0.24)
24	beta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.13)
36	delta globin [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.11)
53	S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]	13 kDa	0% (0.50)
31	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 [Homo sapiens]	103 kDa	0% (0.35)
76	complement component 2 precursor [Homo sapiens]	83 kDa	0% (0.37)
22	alpha 1 globin [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.16)
79	kinesin family member 3C [Homo sapiens]	89 kDa	0% (1.00)
43	hypothetical protein LOC649897 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.11)
5	complement component 3 precursor [Homo sapiens]	187 kDa	0% (0.21)
38	transferrin [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.62)
30	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo sapiens]	39 kDa	0% (0.59)
57	selenophosphate synthetase 2 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (1.00)
62	insulin-like growth factor	28	0%

	binding protein 4 precursor [Homo sapiens]	kDa	(0.41)
65	ATP-binding cassette, sub- family F, member 1 isoform a [Homo sapiens]	96 kDa	0% (0.80)
68	mannan-binding lectin serine protease 2 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.61)
90	cystatin C precursor [Homo sapiens]	16 kDa	0% (0.35)
97	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.35)
100	early endosome antigen 1, 162kD [Homo sapiens]	162 kDa	0% (0.35)
13	complement component 4A preproprotein [Homo sapiens]	193 kDa	0% (0.061)
12	apolipoprotein H precursor [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.55)
20	small inducible cytokine A18 precursor [Homo sapiens]	10 kDa	0% (0.26)
16	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.55)
7	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (0.25)
19	orosomucoid 1 precursor [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.56)

11	apolipoprotein C-II precursor [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.43)
29	vitamin D-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.99)
89	alpha 1 type XVIII collagen isoform 1 precursor [Homo sapiens]	154 kDa	0% (0.71)
1	albumin precursor [Homo sapiens]	69 kDa	0% (0.20)
8	apolipoprotein C-III precursor [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.73)
18	PREDICTED: similar to Neutrophil defensin 1 precursor (HNP-1) (HP-1) (HP1) (Defensin, alpha 1) [Homo sapiens]	10 kDa	0% (0.98)
23	apolipoprotein F precursor [Homo sapiens]	35 kDa	0% (0.88)
2	serum amyloid A1 isoform 1 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.58)
15	vitronectin precursor [Homo sapiens]	54 kDa	0% (0.60)
35	complement factor H-related 1 [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.68)
28	orosomuroid 2 [Homo sapiens]	24 kDa	0% (0.32)
26	coagulation factor II precursor [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.29)
27	kininogen 1 [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.75)

54	chemokine-like receptor 1 [Homo sapiens]	42 kDa	0% (0.35)
55	matrix Gla protein [Homo sapiens]	12 kDa	0% (0.47)
58	complement component 1, s subcomponent [Homo sapiens]	77 kDa	0% (0.85)
74	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 precursor [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.62)
84	lysozyme precursor [Homo sapiens]	17 kDa	0% (0.35)
109	cofilin 1 (non-muscle) [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.35)
121	transcription factor 20 isoform 2 [Homo sapiens]	210 kDa	0% (1.00)
125	H1 histone family, member 3 [Homo sapiens]	22 kDa	0% (0.35)
127	heparanase [Homo sapiens]	61 kDa	0% (0.35)
6	apolipoprotein A-II preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.11)
10	apolipoprotein C-I precursor [Homo sapiens]	9 kDa	0% (0.25)
25	apolipoprotein A-IV precursor [Homo sapiens]	45 kDa	0% (0.54)
9	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4) [Homo sapiens]	11 kDa	95% (0.0082)

3	apolipoprotein A-I preproprotein [Homo sapiens]	31 kDa	0% (0.077)
17	pro-platelet basic protein precursor [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.19)
67	hypothetical protein LOC388533 [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.12)
44	serum amyloid A4, constitutive [Homo sapiens]	15 kDa	0% (0.39)
66	tsukushi [Homo sapiens]	38 kDa	0% (0.71)
52	lipopolysaccharide-binding protein precursor [Homo sapiens]	53 kDa	0% (0.81)
14	fibrinogen, alpha polypeptide isoform alpha-E preproprotein [Homo sapiens]	95 kDa	0% (0.28)
21	clusterin isoform 1 [Homo sapiens]	58 kDa	0% (0.19)
4	serum amyloid A2 [Homo sapiens]	14 kDa	0% (0.20)
32	apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	21 kDa	0% (0.21)
72	serum amyloid P component precursor [Homo sapiens]	25 kDa	0% (0.29)
87	complement factor D preproprotein [Homo sapiens]	27 kDa	0% (0.23)
93	plasma carboxypeptidase B2 isoform a preproprotein [Homo sapiens]	48 kDa	0% (0.35)

34	histidine-rich glycoprotein precursor [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.20)
59	insulin-like growth factor 2 [Homo sapiens]	20 kDa	0% (0.089)
80	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	19 kDa	0% (0.26)
106	gelsolin isoform b [Homo sapiens]	81 kDa	0% (0.33)
64	complement factor H isoform b precursor [Homo sapiens]	51 kDa	0% (0.14)
46	hemopexin [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.16)
39	coagulation factor XII precursor [Homo sapiens]	68 kDa	0% (0.14)
51	complement factor H isoform a precursor [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.15)
56	alpha 1 type I collagen preproprotein [Homo sapiens]	139 kDa	0% (0.35)
75	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	167 kDa	0% (1.00)
92	centrosomal protein 76kDa [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.35)
102	complement component 1, r subcomponent [Homo sapiens]	80 kDa	0% (1.00)
113	defensin, alpha 4 preproprotein [Homo sapiens]	11 kDa	0% (0.35)
119	hyaluronan binding protein 2 [Homo sapiens]	63 kDa	0% (0.33)

122	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog [Homo sapiens]	70 kDa	0% (0.35)
134	PREDICTED: similar to ZK84.1 [Homo sapiens]	72 kDa	0% (1.00)
136	hypothetical protein LOC255057 [Homo sapiens]	47 kDa	0% (1.00)
138	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 10 [Homo sapiens]	62 kDa	0% (1.00)
139	alpha 2 type I collagen [Homo sapiens]	129 kDa	0% (0.35)
140	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD precursor [Homo sapiens]	52 kDa	0% (0.35)
159	pancreatitis-associated protein precursor [Homo sapiens]	19 kDa	0% (1.00)
161	myeloid cell nuclear differentiation antigen [Homo sapiens]	46 kDa	0% (0.35)
162	lectin, mannose-binding 2 [Homo sapiens]	40 kDa	0% (0.35)
163	plasminogen [Homo sapiens]	91 kDa	0% (0.35)
170	zinc finger protein 658 [Homo sapiens]	122 kDa	0% (0.35)
175	RAB, member of RAS oncogene family-like 2B isoform 2 [Homo sapiens]	26 kDa	0% (1.00)

180	PML-RARA regulated adaptor molecule 1 [Homo sapiens]	74 kDa	0% (0.35)
184	catalase [Homo sapiens]	60 kDa	0% (0.35)
189	zinc finger protein 213 [Homo sapiens]	51 kDa	0% (0.35)
190	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	43 kDa	0% (1.00)
195	hypothetical protein LOC64788 [Homo sapiens]	65 kDa	0% (1.00)

DISCUSSIONE

La diagnosi precoce e l'adeguata terapia della sepsi costituiscono una sfida quotidiana per i reparti di pronto soccorso, di medicina e di terapia intensiva.

Oggi sono note varie strategie terapeutiche in grado di migliorare la sopravvivenza dei pazienti colpiti da sepsi, per cui è necessaria una diagnosi che sia rapida ed accurata.

La sepsi non presenta sintomi e segni clinici patognomonici.

La coltura microbiologica richiede troppo tempo, non rispecchia la risposta dell'ospite ad un'infezione sistemica, né la comparsa di disfunzione d'organo e potrebbe anche non essere positiva in alcuni pazienti.

Per cercare di fare chiarezza su questa complessa patologia abbiamo analizzato prima i parametri bioumorali e poi, attraverso l'analisi sieroproteomica, l'espressione dei peptidi nei campioni di siero degli stessi pazienti.

Per quanto riguarda le variazioni nelle concentrazioni plasmatiche di PCR, ATIII, GLOBULI BIANCHI, FIBRINOGENO, PT, PIASTRINE e PC-coagulativa in 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata nelle due 'classi di gravità' non abbiamo rilevato differenze sufficientemente significative.

Di rilievo il netto aumento nei valori medi di D-dimero registrati nei pazienti più gravi, con 'p-values' quasi significativi in 1^a e 9^a giornata (p 0.09-0.08), e con un picco in 6^a (valore medio 1696.77 ug/L vs 826.88 ug/L; mediana 1512 ug/L vs 604,5 ug/L, p 0.08).

Per quanto riguarda la PROCALCITONINA invece abbiamo ottenuto degli ottimi risultati. Essa si è dimostrata un buon indice di gravità fin dagli stadi iniziali, con 'p-value' pari a 0.012-0.001-0.001 e 0.003 in 1^a-3^a-6^a e 9^a giornata e concentrazioni medie molto superiori negli affetti da sepsi grave-shock settico, mentre nei pazienti meno gravi in genere si sono registrate concentrazioni plasmatiche inferiori a 0.6 µg/L ed un andamento molto più costante nel tempo. Qui di seguito sono riportati i valori medi (±SD) di PCT negli affetti da sepsi/ards o sepsi grave/shock settico nei giorni di maggiore significatività.

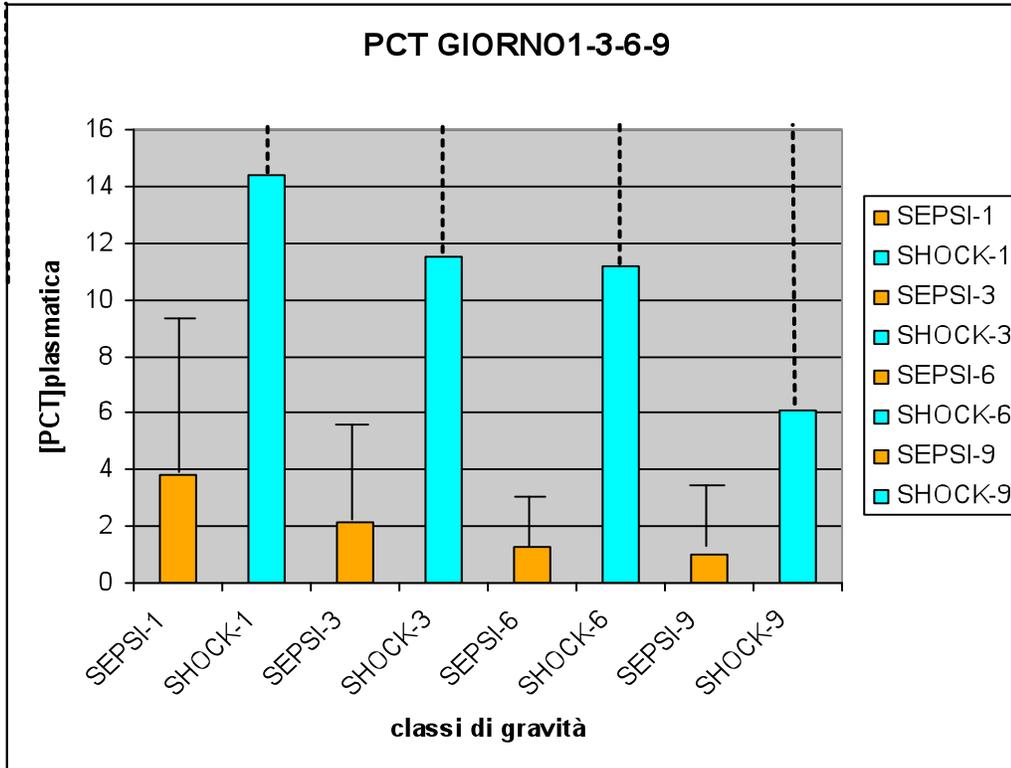


Fig. 30: Concentrazioni plasmatiche medie (\pm SD) di PCT in 1^a-3^a-6^a e 9^a giornata nelle due 'classi di gravità' (3,794 \pm 6,167 μ g/L vs 14,364 \pm 24,25 μ g/L giorno 1; 2,118 \pm 3,26 μ g/L vs 11,535 \pm 16,569 μ g/L giorno 3; 1,297 \pm 2,0296 μ g/L vs 11,167 \pm 17,93 μ g/L giorno 6; 1,006 \pm 2,513 μ g/L vs 6,087 \pm 10,744 μ g/L giorno 9).

Quindi la PCT risulta essere un indice di gravità altamente significativo e precoce. Tale dato è confermato da risultati ottenuti in altri studi condotti negli ultimi anni, ad esempio quello realizzato in Danimarca (pubblicato nel Gennaio 2006) [56]. Questo gruppo di ricerca ha dimostrato che nei pazienti più gravi le concentrazioni plasmatiche di PCT risultano nettamente superiori, circa 10 volte rispetto ai soggetti di minor gravità. Un altro studio condotto da Y.Heper et Al. [105], ha concluso che la PCT è un buon indice di gravità fin dagli stadi iniziali; risultati simili sono stati ottenuti anche da altri gruppi di ricerca [44,45,60,62,63].

Successivamente abbiamo analizzato i nove parametri in relazione all'outcome, confrontando i pazienti sopravvissuti con quelli deceduti entro il 28^agiorno d'osservazione.

Per quanto riguarda l'ATIII, PC-coagulativa, PCR, GLOBULI BIANCHI e FIBRINOGENO non abbiamo riscontrato differenze significative.

Nello specifico per quanto riguarda i dosaggi di ATIII e PC-coagulativa, importante segnalare che nei pazienti deceduti sono sempre stati inferiori, come pure nei pazienti più 'gravi', durante il follow-up.

Questo risultato trova conferma in studi precedenti, che hanno evidenziato riduzioni significative nelle concentrazioni plasmatiche di PC-coagulativa e ATIII anche prima della diagnosi clinica d'insufficienza d'organo. Il grado di diminuzione correla con un aumento della morbilità e mortalità [59,70].

Riguardo ai valori di PCR e conteggio dei globuli bianchi si sono dimostrati poco significativi sia in relazione all'outcome sia alla gravità.

Per quanto riguarda il dosaggio del PT segnaliamo una certa significatività in 6^a giornata ('p-value' pari a 0.04).

D-DIMERO significativo in 3^a giornata ('p-value' 0.0474), seguito poi da dosaggi nettamente superiori nei pazienti ad esito infausto, dato confermato da numerose ricerche [58]. La deposizione di fibrina intravascolare, la trombosi e la CID sono importanti aspetti della sepsi e contribuiscono in maniera rilevante all'aggravamento del quadro clinico.

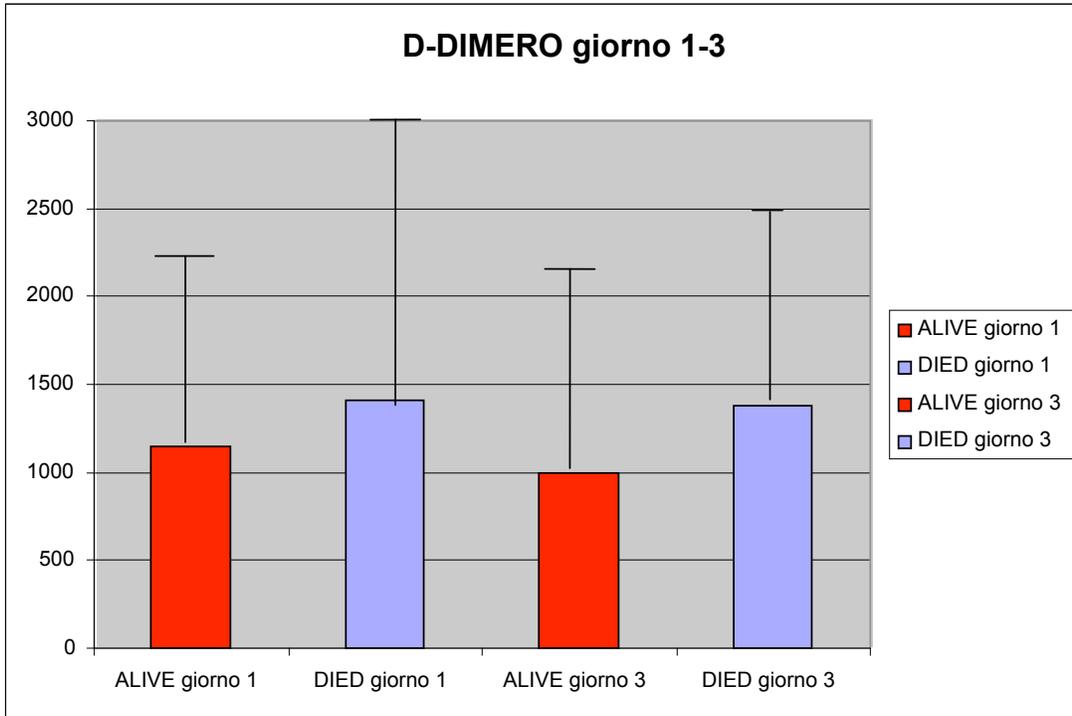


Fig.31: Concentrazioni plasmatiche medie (\pm SD) di D-DIMERO in 1^a-3^a giornata nei sopravvissuti e non (1141,82 \pm 1281,5 μ g/L vs 1407,53 \pm 1644 μ g/L giorno 1; 991,64 \pm 1139,9 μ g/L vs 1375,9 \pm 1148,4 μ g/L giorno 3).

I risultati migliori sono stati ottenuti dal confronto dei livelli medi di PIASTRINE e PCT in relazione all'esito finale.

Per quanto riguarda le prime è stata rilevata una netta differenza nei due gruppi, soprattutto in 6^a-9^a e 12^a giornata, con netto deficit nei pazienti deceduti per tutto il periodo di osservazione, come si può notare dal grafico che segue.

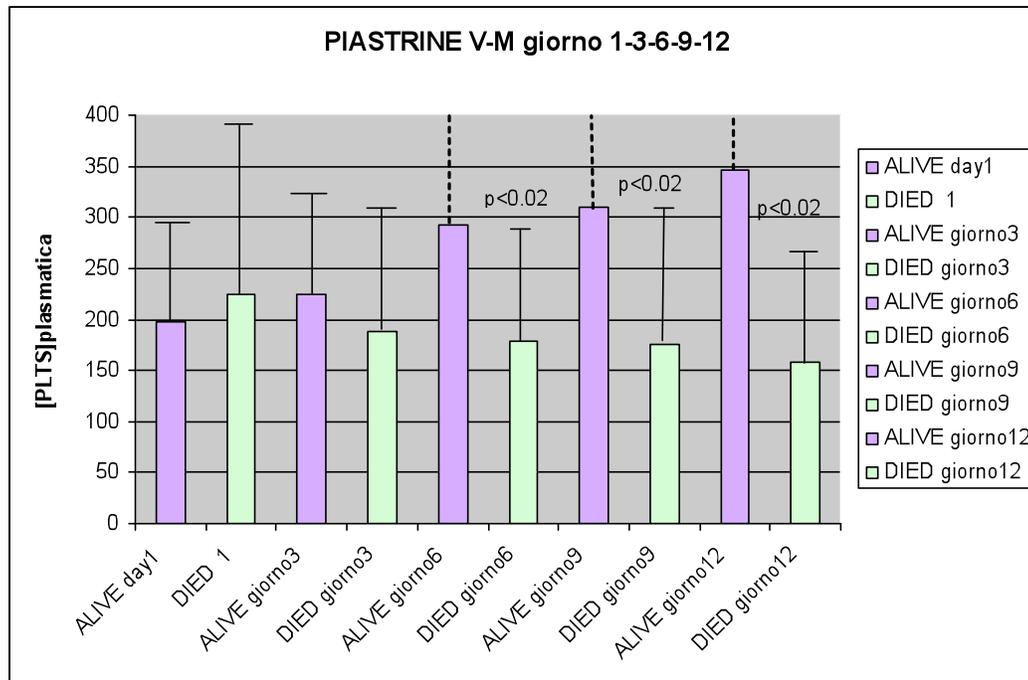


Fig.32 :Livelli plasmatici medi(SD) di PLTS in 1^a-3^a-6^a-9^a e 12^a giornata

(alive 198,36±98,472 x10⁹/L vs 224,11±169,32 x10⁹/L died giorno1;

225,14±109,472 vs 187,85±131,61 x10⁹/L giorno3; 291,74±192,21 vs

178,13±118,41 x10⁹/L giorno6; 309,64±209,4 vs 176±137,17 x10⁹/L giorno 9;

346,28±227,24 vs 157,5±120,95 x10⁹/L giorno 12).

Sebbene la trombocitopenia si sviluppi nel 10-30% dei pazienti, i meccanismi che la provocano non sono stati ancora del tutto chiariti. Conte piastriniche molto basse (<50.000/ μ L) si osservano di solito in pazienti con CID e riflettono tipicamente un danno endoteliale diffuso o una trombosi microvascolare.

Per quanto riguarda la PROCALCITONINA è da segnalare una certa significatività in 6^a giornata ('p-value' pari a 0.06) e molto più netta in 9^a giornata ('p-value' pari a 0.026) nei pazienti deceduti, attribuendo a tale ormone una buona valenza sia come indice di gravità precoce sia come marker prognostico.

Dato confermato da studi già citati in precedenza [55,56] e dal più recente condotto da K.Kofoed et al. presso l'Università di Copenhagen a sostegno di una peculiare

capacità diagnostica e prognostica della PCT nei pazienti settici, soprattutto affetti da sepsi grave e shock settico [65].

Il ruolo specifico di tale ormone non è ancora molto chiaro. La sua induzione può essere provocata da diversi stimoli, sia in vitro che in vivo. Le endotossine batteriche e le citochine pro-infiammatorie rappresentano potenti stimoli per la sua produzione; tale proteina ha proprietà chemiotattiche per i linfociti e modula la produzione di NO da parte delle cellule endoteliali e probabilmente essa gioca un ruolo attivo nella patogenesi della sepsi.

E per finire abbiamo posto in relazione ciascun punteggio SOFA e SAPS II con le relative concentrazioni plasmatiche di PCT in 1^a-3^a e 6^a giornata (tramite Pearson's correlation), dimostrando che PCT correla fortemente con il punteggio SOFA nelle prime due rilevazioni (Pearson's 0.4777 e 'p-value' 0.001 in 1^a giornata; Pearson's 0.2704 e 'p-value' pari a 0.0438 in 3^a giornata).

Tutto ciò dimostra che la concentrazione di PCT plasmatica aumenta con l'aggravarsi della disfunzione d'organo e il peggioramento del quadro clinico.

Ciò presuppone che un suo dosaggio routinario potrebbe essere utile nella valutazione dell'efficacia della terapia in atto.

Non c'è correlazione invece tra i dosaggi plasmatici dei giorni successivi e i rispettivi punteggi SAPS II.

Quindi dosando periodicamente PCT, piastrine, PT, D-dimero e monitorando con particolare attenzione il SOFA-score abbiamo maggiori possibilità di individuare i soggetti più a rischio.

Tali dati sono stati integrati con l'analisi sieroproteomica cercando di delineare un quadro biochimico caratteristico dei nostri pazienti settici.

L'indagine sieroproteomica è per definizione uno studio di tipo osservazionale: viene iniziato senza un'ipotesi iniziale, che in questo caso non potrebbe che risultare restrittiva, e si pone come obiettivo quello di mostrare un quadro, una fotografia, dell'assetto proteico del paziente al momento del prelievo. Dal 2006, anno in cui fu progettato questo studio, poco era stato pubblicato sull'indagine sieroproteomica del paziente settico. Ciò rendeva il lavoro ipoteticamente arduo poichè privo di riferimenti ma allo stesso tempo molto stimolante. Nello stesso anno iniziarono ad apparire i primi lavori e ora, nel 2010, ci troviamo a fare i conti

con diverse pubblicazioni sull'argomento, molte riguardanti un esiguo numero di pazienti, che però pongono le basi per la creazione di un pattern sieroproteomico del paziente settico. La non omogeneità dei risultati ottenuti tra i vari gruppi di lavoro internazionali è legata alla mancanza di un metodo univoco di analisi, all'evoluzione tecnologica che ha presentato tecniche sempre più raffinate di studio del proteoma ma soprattutto al limite della metodica, che risiede nella grande quantità di informazioni perse sia tra il momento del prelievo e quello dell'analisi, per la degradazione proteica, e sia durante la processazione del campione. Il proteoma umano racchiude circa 1.000.000 di proteine comprese le possibili varianti, e non si configura come una miscela stabile, ma piuttosto come un complesso dinamico derivato da subproteomi di diversi organi, tessuti, cellule [106]. Tuttavia le 26 proteine maggiormente espresse rappresentano da sole più del 99% della quantità totale del proteoma umano e l'albumina da sola più del 50%; da ciò ne deriva che le informazioni portate da proteine contenute in concentrazioni nell'ordine di ng/ml, spesso fondamentali (citokine, ormoni), vengano mascherate dalle proteine espresse maggiormente o perse nel tentativo di eliminare queste ultime [107]. Le differenze nel trattamento del campione di siero è quindi alla base dei risultati discordanti di studi simili ben strutturati. Il laboratorio di Manassas è all'avanguardia nel trattamento dei campioni per l'indagine sieroproteomica: da qualche anno utilizza una matrice di nanoparticelle da loro brevettata (Smart Hydrogel Particles) [108] che permette l'isolamento di quantità molto piccole di proteine e le preserva dalla degradazione; inoltre dal loro laboratorio sono usciti i lavori più importanti sull'applicazione clinica della sieroproteomica grazie all'indagine con SELDI-TOF sul siero di pazienti affetti da tumore dell'ovaio. L'identificazione proteica nel nostro lavoro si è avvalsa dell'analisi tramite SELDI-TOF, grazie alla quale abbiamo potuto ottenere gli elenchi di proteine sopra esposti. In alcuni casi le proteine vengono precedute dal termine PREDICTED: ciò sta a significare che le proteine vengono identificate non in modo certo ma in base alla massa calcolata e alla similitudine con i database proteomici di riferimento.

Si è dunque cercato di comparare i nostri dati con quelli di lavori analoghi cercando, quando possibile, di formulare ipotesi sul ruolo delle proteine in

questione nel determinato contesto clinico.

Le uniche proteine che abbiano raggiunto una significatività statistica ($p < 0,05$) nell'espressione si sono rivelate: small inducible cytokine A18 precursor, il precursore dell'albumina, platelet factor 4, apolipoproteina A2, il precursore dell'apolipoproteina c2, apolipoproteina D e C3.

Il gruppo di proteine sovraesprese nei pazienti presi in esame rispetto ai soggetti sani, ma senza differenze di espressione in base alla gravità, può racchiudere al suo interno proteine utili come marker di sepsi e indicatori di outcome del paziente. In questo nutrito gruppo troviamo la PCR che tuttavia, nell'indagine sieroproteomica, si dimostra poco sensibile se confrontata con il dato bioumorale. Ci aspetteremmo di trovare la PCT che però non ritroviamo in alcun gruppo. Tale mancanza è legata alle dimensioni della proteina e alle difficoltà di isolamento di peptidi molto piccoli che vengono persi nel momento in cui viene preparato il campione. Senza soffermarsi sull'albumina, si nota una significatività di espressione della citokina A18 e del Platelet Factor 4; in particolare quest'ultimo, presente con una significatività pari a $p = 0,025$, può risultare di particolare interesse in quanto negli ultimi anni è stata approfondito il suo ruolo nello stato ipercoagulativo del paziente settico e studiata la sua relazione con l'espressione e la funzione della Proteina C Attivata [109]. Se da un lato PF4 sembra stimolare la produzione di APC in risposta ad uno stimolo infiammatorio, dall'altra sembra inibirne la funzione anticoagulativa [110]. PF4, una chemokina rilasciata in seguito all'attivazione piastrinica ad alta affinità per l'eparina, interagisce con la trombomodulina e con la APC aumentando la produzione di APC stessa dal complesso trombina-trombomodulina [111]. Tuttavia in tale interazione con APC, PF4 non solo ne stimola la produzione, ma anche ne regola la funzione. Secondo un recente studio di Preston et al. [109] il PF4, interagendo con APC, inibisce la funzione anticoagulante di APC bloccando l'attività della proteina S, fattore necessario per l'azione di APC; APC mantiene tuttavia la funzione citoprotettiva PAR-1 mediata. Difficile verificare ciò sui dati bioumorali poichè PF4 viene espresso indistintamente dai soggetti morti e dai sopravvissuti e con densità di mass spectra sovrapponibile tra i vari soggetti; inoltre anche se si considerano i dati di Proteina C coagulativa degli stessi, l'omogeneità di valori di PC sierica nei

pazienti in esame al primo punto (vivi: media 69 mg/L; morti: media 74 mg/L) rende qualsiasi differenza non percepibile. Analizzando la presenza di alterazioni nella via coagulativa nei nostri pazienti, si nota nel gruppo di proteine espresse maggiormente nei morti la presenza del precursore del Fattore XII (FXII) della coagulazione (differenza in percentuale del 200%, $p=0.16$). Il FXII è una glicoproteina zimogeno di serina-proteasi, richiede per l'attivazione superfici con cariche negative, quali ad esempio vetro, collagene, acidi grassi. Il fattore XIIa è a sua volta in grado di attivare la precallicreina in callicreina, tagliando un legame Arg-Ile. La callicreina, serina-proteasi costituita da una catena leggera e una pesante legate da ponti disolfuro, taglia a sua volta altre molecole di fattore XII per attivarle enzimaticamente. Il deficit di tale fattore solitamente è un difetto di coagulazione a carattere ereditario e si correla con un aumento del rischio protrombotico. Psuja et al. nel 2002 [112] analizzando l'assetto coagulativo di pazienti affetti da sepsi batterica, notarono un'associazione tra l'aumento di FXII e l'evoluzione verso lo shock settico. Studi molto recenti [113] suggeriscono che nell'alterato bilancio tra coagulazione e anticoagulazione nella sepsi, la via intrinseca svolge un ruolo molto importante finora poco considerato. Tale via viene attivata dalla bradikina, peptide proinfiammatorio che non abbiamo potuto evidenziare nel lavoro a causa della sua massa esigua (1,6 kD), dando luogo alla cascata coagulativa e alla microtrombosi vasale. La bradikina viene metabolizzata dall'angiotensin converting enzyme (ACE), aminopeptidasi P (APP), e carbossipeptidasi N (CPN); è possibile che elevati livelli di bradikina fungano da stimolo eccessivo per l'attivazione della cascata coagulativa intrinseca e comportino una maggiore possibilità di sviluppare insufficienza d'organo e quindi sepsi grave o shock settico. Un ruolo dei farmaci ACE inibitori nel possibile outcome sfavorevole del paziente settico è un'ipotesi che al momento non trova riscontri. Analizzando i nostri dati, si nota che i pazienti con una sovraespressione di FXII sono tutti soggetti con età > 75 anni, 3 con diagnosi di ingresso "sepsi" e uno "sepsi severa". Una maggiore attivazione della cascata coagulativa con il conseguente fenomeno della CID (coagulazione intravascolare disseminata) può aver contribuito all'evoluzione della storia clinica dei pazienti. Per verificare ciò abbiamo controllato l'andamento di parametri laboratoristici normalmente alterati

durante la CID quali il D-dimero, il fibrinogeno, le piastrine, senza trovare una correlazione. Nei grafici seguenti si può vedere come il D-dimero e la conta piastrinica dei 4 pazienti morti che avevano espresso significativamente il precursore del fattore XII della coagulazione non differisca dalla media dei parametri dei pazienti settici vivi. Tuttavia l'esiguità del campione non permette di trarre conclusioni e lascia aperta la strada ad ulteriori indagini.

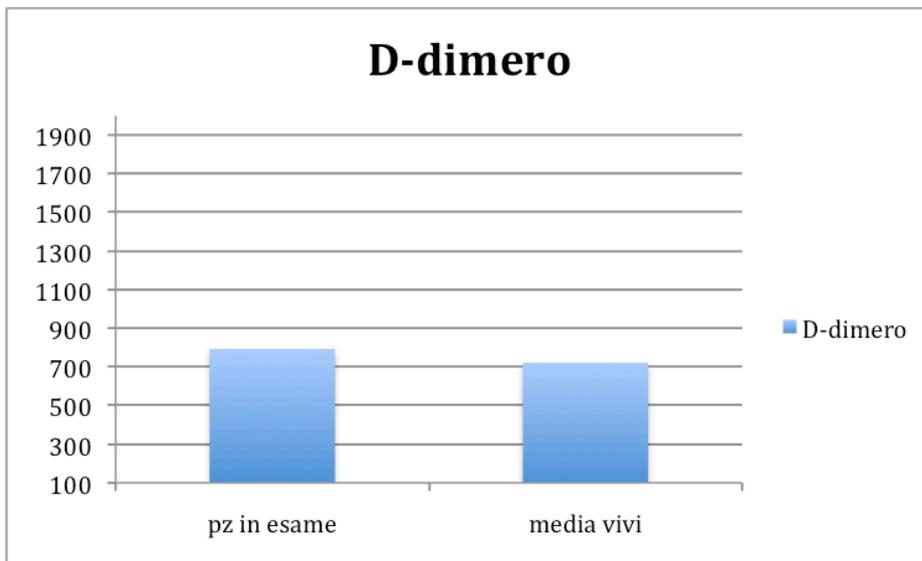


Grafico 1: valori del D-dimero tra i pazienti in esame e i sopravvissuti

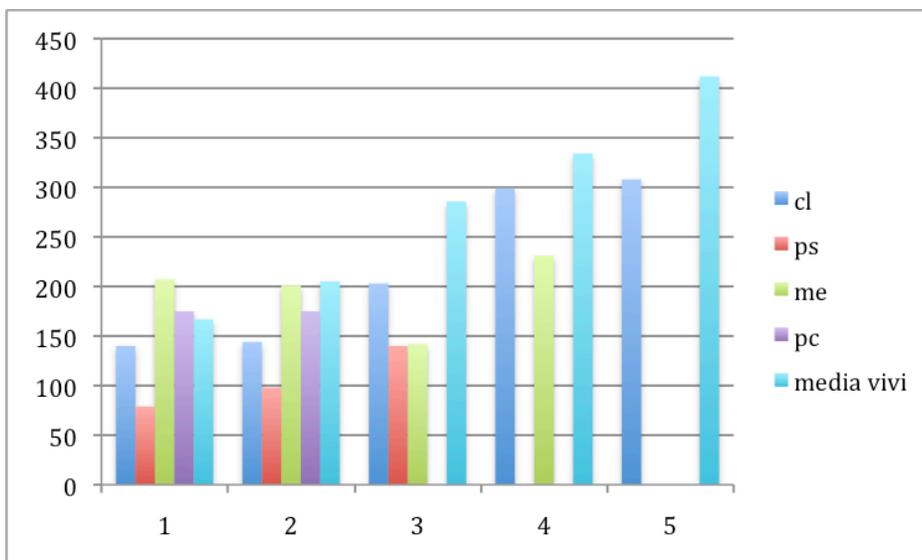


Grafico 2: conta piastrinica nei 5 giorni dei pazienti morti che avevano espresso significativamente il precursore del fattore XII della coagulazione e la media di PLT dei pazienti vivi

Tra le proteine sovraespresse dai pazienti settici indipendentemente dall'outcome troviamo le apolipoproteine quali A1, A2, C2, C3, D. Un ruolo delle lipoproteine ed in particolare delle HDL nella sepsi è già stato proposto recentemente [114] in quanto sembra che le HDL possano legare e inattivare il lipopolisaccaride (LPS), componente della membrana batterica, mediare il rilascio di citokine protettive, e stimolare l'espressione dell'ossido nitrico sinetasi endoteliale. Le apolipoproteine, componenti strutturali delle lipoproteine con funzioni regolatorie, possono svolgere un ruolo determinante nel guidare l'attività antiinfiammatoria delle lipoproteine stesse [115]. Tuttavia, il dato interessante riguarderebbe la variazione nel tempo della concentrazione delle apolipoproteine con la loro possibile associazione all'outcome del paziente o all'evoluzione della sepsi. In corso di sepsi la produzione di HDL si modifica dando luogo ad una HDL di fase acuta, povera di apolipoproteina A1 e ricca di sostanza amiloide A. Nei campioni analizzati si può evidenziare la presenza di Apo A 1 con una $p=0,34$ e sostanza amilode A1 e A2, quest'ultima probabilmente correlabile in parte a questo processo. E' già stata dimostrata da van Leeuwen et al. [117] una significativa variazione nella concentrazione di lipoproteine nei pazienti settici con una riduzione fino al 50% in particolare delle HDL; non è stata dimostrata alcuna correlazione tra survivors e non survivors. Tuttavia tale studio aveva il grosso limite di aver analizzato esclusivamente 17 pazienti. Essendo la numerosità del nostro campione ben superiore, è possibile che, se avessimo potuto analizzare la variazione nei giorni delle apolipoproteine in 61 pazienti, i dati sarebbero potuti essere significativi anche per quanto riguarda la previsione di outcome. La diminuzione dei livelli plasmatici dell'apolipoproteina C1 è stata correlata nel topo settico ad un outcome sfavorevole [116]. Apo C1 circola nel sangue quasi completamente legata alle HDL e sembra coinvolta nei processi di protezione dell'organismo nei confronti della sepsi batterica. I nostri dati mostrano la presenza di Apo C1 precursor nei pazienti settici rispetto ai controlli sani con una $p=0,11$; anche in questo caso sarebbe interessante monitorare la variazione della concentrazione plasmatica nel tempo per associarla all'outcome. Shen et al nel 2006 [118] analizzando il siero di pazienti con SIRS hanno evidenziato come possibili marker di sepsi tra gli altri Apo A1, Apo

A2 e sostanza amiloide A. I nostri dati confermerebbero dunque un'ipotesi che sta prendendo piede negli ultimi anni cioè che le lipoproteine svolgano un ruolo importante nella sepsi e che il monitoraggio della variazione della loro concentrazione nel plasma possa essere un indice prognostico affidabile. Infine è importante considerare che 4/20 pazienti tra quelli analizzati avevano in corso un'infusione di Propofol al momento del prelievo, farmaco in soluzione che tra gli eccipienti contiene glicerolo, lecitina di uovo, olio di semi soia, acido oleico e che tali elementi possono aver interferito con l'indagine sieroproteomica.

Tra le proteine sovraespresse nel gruppo dei pazienti morti troviamo complement factor H related 5 (CFHR5), espresso con una percentuale del 200% nei morti > vivi, con una significatività pari a $p=0.15$; è una proteina coinvolta nell'attivazione del complemento, espressa dal fegato e secreta nel plasma. Espresse nel medesimo gruppo ma con significatività minore troviamo altre componenti del complemento quali complement component 1, r subcomponent; complement component 2 precursor; complement factor H isoform a precursor. Nel gruppo di proteine espresse nei morti come nei vivi troviamo anche complement H related 1, complement component 5, complement component 1 S, complement H isoform B, complement 3 precursor, complement 4 A preprotein, complement D preprotein. Tutti i pazienti deceduti tranne due (8/10) hanno espresso in quantità maggiore rispetto ai controlli le proteine del complemento sovraespresse nel gruppo morti > vivi. Con il termine complemento ci si riferisce ad un gruppo di circa 20 proteine sintetizzate da varie cellule (epatociti, macrofagi, cellule epiteliali, et al.) coinvolte nei processi di opsonizzazione batterica, reclutamento di cellule quali macrofagi e polimorfonucleati, regolazione della risposta anticorpale e, tramite la via alternativa del complemento, all'attacco diretto del batterio non anticorpo mediato. La via alternativa, con l'attivazione finale del fattore 5, monta una sorta di difesa preliminare nei confronti dell'aggressore prima che sia instaurata la risposta anticorpale; viene attivata da batteri gram+, gram-, alcuni virus e parassiti. CFHR5 è una proteina di recente identificazione (2001) [119] il cui ruolo appare simile a quello del Fattore H, cioè la regolazione della cascata alternativa del complemento. In particolare sembra interagire con la Convertasi C5, ultimo step della via litica [119]. Il fattore H è esclusivo della via alternativa e, fatta eccezione per l'isoforma B

che viene espressa in una percentuale appena sotto i limiti inferiori del gruppo dei pazienti morti (77%), è espresso da tutti i nostri pazienti poi morti. Kalenka et al. [120] hanno identificato un pattern sieroproteomico in 18 pazienti settici comprendente il fattore B del complemento e lo stesso Shen et al. nel 2006 [118] per altri fattori. I nostri dati vanno a confermare quelli già ipotizzati in questi primi studi, sottolineando un particolare ruolo della via alternativa rispetto alle vie classica e di adesione alla membrana e suggerendo un ruolo del componente H e delle sue isoforme e proteine correlate sull'outcome dei pazienti. Una maggior attivazione del complemento rappresenterebbe così un marker di sepsi ed un fattore prognostico negativo, quasi a sottolineare un ruolo nell'intensità di risposta all'insulto infettivo nell'evoluzione del quadro clinico. Essendo la sepsi grave una conseguenza piuttosto dell'attivazione eccessiva delle difese dell'ospite che una conseguenza dell'effetto dell'agente infettivo stesso, l'evidenza di una maggior attivazione del complemento nei pazienti con prognosi sfavorevole può essere spiegata con maggior chiarezza in questo contesto. Analizzando invece le differenze di espressione all'interno del gruppo dei sopravvissuti e confrontando le categorie sepsi severa Vs sepsi, l'unica proteina che mostra una significatività di espressione nei soggetti con sepsi severa è il precursore del componente 3 del complemento (CF3); tale dato preso singolarmente potrebbe suggerire che i pazienti che esprimono il CF3 in fase di sepsi severa mostrano poi un'outcome migliore; tuttavia, se analizziamo il gruppo dei morti confrontando sepsi severa Vs sepsi, notiamo che CF3 è appena sotto il limite di significatività e di percentuale di espressione nel gruppo sepsi severa. Si può quindi concludere che CF3 è un ottimo marcatore di gravità della sepsi, espresso quindi maggiormente dai soggetti in sepsi severa rispetto a quelli in sepsi. Non possiamo fare correlazioni con l'outcome dei pazienti, poichè, benchè appaia ad una prima analisi come un fattore protettivo, se confrontato nella sua espressione globale perde ogni significato predittivo.

Alfa-1-microglobulina / bikunin precursor è una proteina significativamente espressa nei morti ($p=0.051$) con differenza in percentuale del 157%. Svolge molteplici funzioni: transporter, inibitore dell'attività dei canali calcio, inibitore dell'attività della plasmina, è coinvolta nell'adesione cellulare, nei processi

catabolici dell'emoglobina e infine nella risposta immunitaria insieme alla ITIH4 (vedi sotto).

Inter alfa tripsina (globulina) inibitore IαI H 4 (ITIH4) è stata espressa con significatività pari a $p=0.18$ e percentuale di espressione 140%; la famiglia delle IαI è composta da geni che codificano mRNA di H1, H2, H3, e H4 insieme ad AMBP.

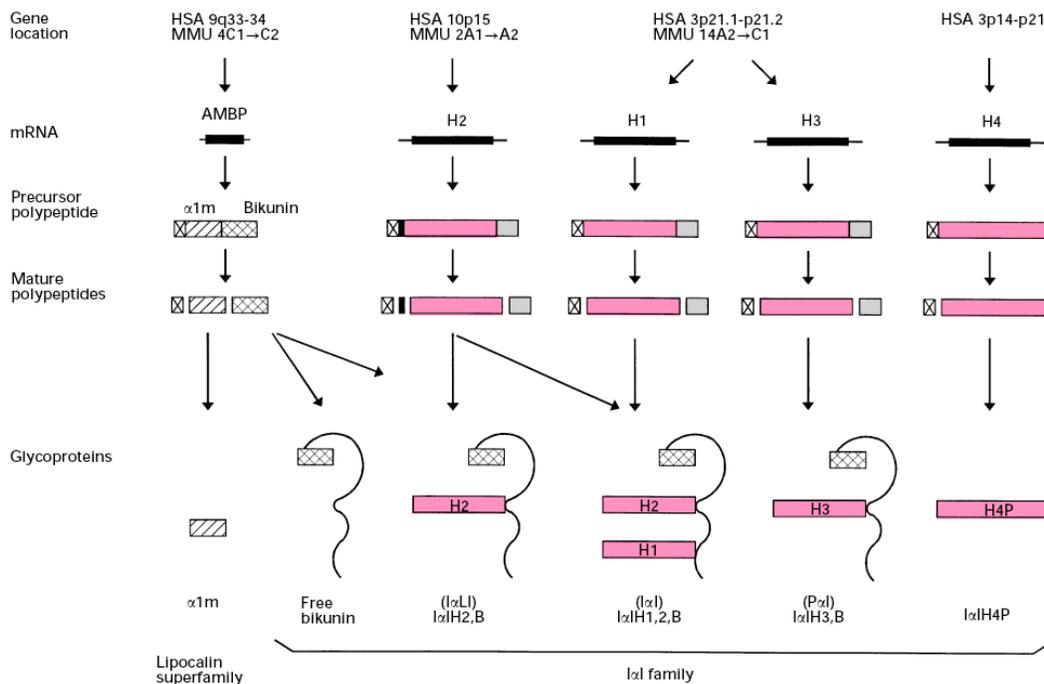


Fig.33: struttura delle proteine della famiglia IαI

In particolare da H1, H2, H3 si sintetizza un polipeptide che si unisce alla bikunin sintetizzata dal gene AMBP, mentre H4 non forma legami con bikunin; durante il processo infiammatorio, il gene H2 e AMBP risultano down-regolati da sostanze quali IL-6 e IL-1 che mediano il cambiamento della trascrizione genica. H3 e H4, invece, sembrano essere up-regolati dai medesimi stimoli [121].

Nel 1996 Salier et al. [122] hanno ipotizzato un ruolo di ITIH4 come proteina di fase acuta; nel 1999 Pineiro et al. [123] hanno in parte confermato questi dati ritrovando ITIH4 in quantità da 1,5 a 3 volte superiore nel plasma di pazienti con

infarto miocardico, angina o post-operati di chirurgia di elezione. Lim et al. [121] hanno ipotizzato non solo una correlazione tra ITIH4 e sepsi, ma anche un rapporto inversamente proporzionale tra concentrazione e sopravvivenza. Nei nostri pazienti, ITIH4 si è dimostrata espressa significativamente nei pazienti poi morti (7/10) e solo in 3 pazienti sopravvissuti (in quantità minore). Alla luce delle relazioni con AMBP, si è cercato se gli stessi pazienti che esprimevano ITIH4, esprimessero anche AMBP, confermando che tutti i pazienti con ITIH4 esprimono anche AMBP. Alla luce di ciò possiamo ipotizzare che, considerate insieme, AMBP e ITIH4 possano svolgere un ruolo di marcatore predittivo per l'outcome del paziente settico. Il dato sull'outcome, in contrasto con quello di Lim et al. [121] va confermato da analisi su campioni più numerosi. E' da notare che gli stessi pazienti deceduti, inoltre, esprimono almeno uno dei componenti del complemento illustrati sopra. Si potrebbe così iniziare a delineare un pattern proteomico sfavorevole per l'evoluzione clinica dei pazienti in sepsi e sepsi grave.

Tra le proteine espresse maggiormente dai pazienti sopravvissuti possiamo citare curiosamente Similar to PRKC, Par-4/PAWR, ($p=0.13$; -125%) una proteina pro-apoptotica ubiquitaria, identificata inizialmente nelle cellule tumorali prostatiche destinate all'apoptosi. I Par-4 knockout mice sviluppano spontaneamente tumori del polmone, dell'endometrio e della prostata. Il suo ruolo pro-apoptotico è mediato da una serie di stimoli differenti (azione Ca mediata, TNF, INF gamma) e si esplica attraverso la traslocazione nucleare di Par-4/PAWR e l'attivazione di Fas con l'inibizione di NF-KappaB. E' coinvolto nella sensibilizzazione all'apoptosi dei neuroni e viene ritrovata espressa in diverse malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer.

Anche Aptoglobina è espressa in questo gruppo con $p=0.13$; e' una glicoproteina sintetizzata dal fegato, costituita da due subunita', a e b, in grado di combinarsi con l'emoglobina libera e trasportarla al sistema reticoloendoteliale. Il complesso aptoglobina-emoglobina è rimosso rapidamente dal sistema reticolo-endoteliale ed è metabolizzato ad aminoacidi liberi e ferro in poche ore, rappresentando un mezzo di conservazione del ferro. La sua diminuzione è indice di emolisi intra ed extravascolare. Può essere diminuita in caso di anemia megaloblastica con componente emolitica. E' inoltre diminuita in corso di mononucleosi infettiva e in

caso di insufficienza epatica. Un aumento è documentato finora in infiammazioni acute e croniche, neoplasie metastatizzanti, infarto miocardico, collagenopatie, ustioni. Thongboonkerd et al. [124] e Kalenka et al. [120] hanno inserito aptoglobina tra le proteine significativamente espresse nei pazienti settici, quest'ultimo insieme ad alfa 1 glicoproteina; alfa 1 glicoproteina risulta sovraespressa anche nei nostri campioni rispetto ai controlli sani ma in quantità esigue.

Un ruolo simile all'aptoglobina è svolto dall'emopessina, che lega l'eme e lo trasporta al fegato per la lisi e il recupero di Fe; poichè l'eme è altamente tossico e proinfiammatorio, l'aptoglobina svolge un ruolo antiinfiammatorio e di scavenger ossidativo. Nei nostri campioni è stata evidenziata nel gruppo dei pazienti non sopravvissuti con una $p=0,16$ e un'espressività pari al 167%. Aptoglobina e emopessina sono stati evidenziate entrambe in un pattern sieroproteomico nel paziente settico nel già citato lavoro di Thongboonkerd et al.[124].

Tra i pazienti sopravvissuti troviamo anche espressa Serine proteinase inhibitor (Serpina) clade f (143%; $p=0.33$): è uno dei più efficienti inibitori della elastasi dei neutrofili oltre che di una serie di proteasi tissutali e circolatorie. Coinvolta nella regolazione della risposta immunitaria innata, sembra svolgere un ruolo nel limitare il danno d'organo durante l'aggressione del sistema immunitario ai batteri. E' inoltre coinvolta in processi di coagulazione, fibrinolisi, sviluppo embrionale e neuromuscolare. E' ben nota la relazione tra gli inibitori delle alfa 1 proteasi e l'insorgenza di enfisema e cirrosi, dell'inibitore della C1 esterasi con l'angioedema, del deficit di ATIII congenito con malattie trombofiliche [125]. Topi transgenici che sovraesprimono la serpina mostrano un'eccessiva reazione fibrotica polmonare alla bleomicina, a significare l'importanza della proteina nel rimodellamento tissutale [125]. Benarafa et al. nel 2007 [126] hanno evidenziato come topi privi del gene per la codifica di Serpinb1, inoculati con *Pseudomonas Aeruginosa*, non erano in grado di debellare il microorganismo, mostravano un aumento della necrosi tissutale e un aumento della proteolisi della proteina D del surfactante, normale componente della struttura polmonare. Ipotizzando un simile comportamento nei nostri pazienti, abbiamo verificato quali pazienti abbiano espresso elevati livelli di Serpina. I pazienti erano affetti da polmonite (2) e da

perforazione intestinale (1). Tra i pazienti sopravvissuti, prendendo in esame ad esempio il paziente VA, diagnosi di ingresso "sepsi in polmonite", nonostante l'aggravarsi del quadro, trasformatosi da sepsi a sepsi grave, non ha sviluppato ARDS ma anzi il suo quadro polmonare è migliorato fino alla guarigione. Si potrebbe ipotizzare che elevati livelli di serpina nel siero potrebbero autolimitare l'aggressione batterica da parte dei neutrofili almeno nel tessuto polmonare, e potrebbero essere quindi collegati ad un outcome favorevole. Tale considerazione si basa sull'osservazione di due pazienti, il cui quadro clinico può essere stato influenzato da numerosi fattori indipendenti da quello preso in esame, e pertanto rimane nell'ambito delle speculazioni. Nello stesso ambito rientrano le considerazioni su D dopachrome tautomerasi (DDT), espressa al 200% con $p=0.17$ nei pazienti sopravvissuti. Si tratta di un enzima capace di catalizzare un cambiamento tautomerico del dopacromo con formazione dell'isomero più stabile DHICA o acido diidrossindolcarbossilico. La DT è da 105 a 106 volte più potente rispetto a Cu^{2+} nel catalizzare la reazione di riarrangiamento del dopacromo in DHICA, ma non è detto che l'azione ionica ed enzimatica si escludano a vicenda, anzi, potrebbero entrare in cooperazione.

Nel 2009 Hiyoshi et al. [127] hanno notato che nel tessuto epatico murino danneggiato da CCl_4 , DDT veniva up-regolato fino a 12 volte con alte concentrazioni di melanina attorno agli epatociti non danneggiati. Ciò era stato notato anche nei fegati murini post-epatectomia e con HBV, senza però destare particolare interesse. Poiché la melanina estratta dal the ha dimostrato recentemente nel topo una protezione del fegato sottoposto a stress ossidativo indotto da idralazina [128], gli autori hanno ipotizzato che in condizioni di forte stress ossidativo (come il danno da CCl_4 , HBV o post-epatectomia), DDT venga up-regolato per accelerare la sintesi di melanina e far fronte allo stress ossidativo negli epatociti non ancora danneggiati, conferendo così una protezione d'organo. Un'altra teoria riguarda la similitudine di DDT a livello aminoacidico (33% di omologia) con il fattore di inibizione della migrazione dei macrofagi (MIF) [129]: tale omologia conferirebbe alla DDT un ruolo nella regolazione del processo infiammatorio. I nostri pazienti che hanno espresso DDT sono entrambi stati ricoverati con diagnosi di sepsi grave (1 causa polmonite, 1 causa ignota). Il loro

profilo epatico, ricavato dai dati relativi agli indici di sintesi (PT, Albumina, ATIII), di citolisi (AST, ALT) e di funzionalità escretoria (bilirubina), dopo aver dimostrato un possibile inizio di sofferenza d'organo, appare normalizzarsi nonostante siano presenti due insufficienze d'organo (entrambi insufficienza respiratoria e cardiocircolatoria). Nessuno dei pazienti che ha espresso DDT ha mostrato segni di insufficienza epatica. I pazienti in sepsi grave possono sviluppare una sofferenza epatica dalla prima giornata di ricovero. Maggiori dati sono necessari per indagare su un possibile ruolo protettivo della DDT nei confronti del danno epatico ossidativo sepsi indotto.

CONCLUSIONI

Dal nostro studio emerge che la Procalcitonina è il migliore indice prognostico e di gravità nei nostri pazienti affetti da sepsi, sepsi grave e shock settico.

L'aumento o la riduzione plasmatica correla rispettivamente con il peggioramento o miglioramento del quadro clinico, e con le variazioni dei punteggi SOFA registrati in prima e terza giornata. La valutazione quotidiana dei nove parametri si è dimostrata utile nel predire la gravità e l'evoluzione della malattia, ponendo particolare attenzione alle variazioni plasmatiche di D-dimero, PIASTRINE e PT, risultati accettabili indici prognostici.

A tali dati si associano quelli derivati dall'analisi sieroproteomica dei pazienti che rivelano un ruolo della via intrinseca della coagulazione, di PF4, delle apolipoproteine e del complemento come marker di malattia e, per quanto riguarda il CF3, anche come indice di gravità. Ulteriori indagini sugli stessi pazienti sono attese per completare e definire meglio l'assetto proteico dei pazienti in sepsi grave e shock settico.

Tale studio non vuole trarre delle conclusioni, quanto piuttosto porre delle basi di partenza per l'indagine sul reale meccanismo alla base della sepsi. Le prossime indagini, se i nostri risultati fossero confermati anche dall'analisi degli altri campioni prelevati dagli stessi pazienti, dovrebbero forse basarsi sull'approfondimento del ruolo di PF4 come regolatore della cascata coagulativa, sul suo legame con la via intrinseca della coagulazione, e sul ruolo del complemento e delle apolipoproteine nello sviluppo del quadro settico.

BIBLIOGRAFIA

1. Angus D.C, Linde-Zwirble W.T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M.P. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; Vol. 29, No. 7: 1303-10.
2. 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. *Critical Care Med.* 1992; 20: 864-74.
3. Levy M.M, Fink M.P, Marshall J.C, Abraham E, Angus D.C, Cook D, Cohen J, Opal S.M, Vincent J.L, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 29:530–38.
4. E.Braunwald, A., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. Sepsis e shock settico.. In : *Harrison's Principles of Internal Medicine 15/e*. Donatella Nebulone eds Edizione Paperback Publ., Milano, 2002, pg. 940-946.
5. Rivers EP, Nguyen HB, Huang DT, Donnino M. Early goal-directed therapy. *Crit Care Med.* 2004;32:314-5
6. Parrillo J.E, Parker M.M, Natanson C, et al: Septic shock in humans: advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 1990; 113: 227-42.
7. The EPISEPSIS Study Group: EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004; 30:580–88.
8. Martin G.S, Mannino D.M, Eaton S, and Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1546-54.

9. Angus D.C, Wax R.S. Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med.* 2001 Vol. 29, No. 7: S109-S116.
10. Nguyen A, Yaffe M.B. Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis. *Crit Care Med.* 2003 Vol. 31, No. 1 (Suppl.).
11. Tsiotou A.G, Sakorafas G.H, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* 2005; 11(3): RA76-85.
12. Aird W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003; 101: 3765-77.
13. Qiang S, Chang-chun S, Xiang-hong Z, Zhuo S, Shan-shan S, Xiang-ming F, Qi-xing D, and Stuber F. Interleukin 10.G microsatellite in the promoter region of the interleukin-10 gene in severe sepsis. *Chinese Medical Journal.* 2006; 119 (3):197-201.
14. Fink M.P. Prostaglandins and sepsis: still a fascinating topic despite almost 40 years of research. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281: L534–L536.
15. Levi M. and van der Poll T.: Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Critical Care.* 2004, 8:99-100.
16. Ostermann H.: Antithrombin III in Sepsis. New evidences and open questions. *Minerva Anesthesiol.* 2002; 68:445-8.
17. Baudo F. Coagulazione ed infiammazione: dalla fisiopatologia alla clinica. *Minerva Anesthesiol.* 2002; 68:443-4.
18. Hoffman M, Monroe. A cell based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 958-65
19. D'Angelo A, Della Valle P, Giudici D, Vigano D'Angelo S. La proteina C e la coagulazione nella sepsi. *Minerva Anesthesiol.* 2004; 70:339-50.
20. Zeerleder S, Schroeder V, Hack C, Kohler H.P, and Wuillemin W.A. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thrombosis Research.* 2006; 118, 205—212.

21. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2003; 16(1/2), 43–47.
22. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G. Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. *Crit Care Med*. 2006 Vol. 34: 307-13.
23. Gattinoni L, Vagginelli F, Taccone P, Carlesso E, Bertoja E. Sepsis: state of the art. *Minerva anesthesiol*. 2003; 69: 539-61.
24. Novotny W.F, Brown S.G, Miletich J.P, Rader D.J, Broze G.J.J. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood*. 1991; 78: 387-93
25. Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Ogura H, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S, Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation (JAAM DIC) Study Group. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: Comparing current criteria. *Crit Care Med*. 2006 Vol. 34, No. 3: 625-31.
26. Franchini M, Lippi G, and Manzato F. Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Journal*. 2006, 4:4.
27. Levi M, De Jonge E, and Van der Poll T. New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology. *Ann Med*. 2004; 36: 41-49.
28. Bone R.C, Fisher C.J Jr, Clemmer T.P, Slotman G.J, Metz C.A, Balk R.A. Sepsis Syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med*. 1989; 17: 389-93.
29. Parker M.M, Fink M.P. Septic shock. In: Intensive Care Medicine. Irwin and Rippe's. 5th edition, January 2003.
30. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin*. 2000 Apr;16(2):179-92.

31. Wheeler AP, and Bernard G.R. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 1999; Volume 340 Number 3: 207-14.
32. Dellinger R.P, Carlet J.M, Henry Masur, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall J.C, Parker M.M, Ramsay G, Zimmerman J.L, Vincent, J.L, Levy M.M. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004 Vol. 32, No. 3: 858-73.
33. Van Berghe, Wouters P., Weekers P. et al: Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *New England J. Med* 2001; 345: 1359-67.
34. Marshall JC. Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: What have we learned? *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 1:S75-S83.
35. Warren BL., Eid A., Singer P, Novak I. et al.: Caring for critically ill patient. High dose of ATIII in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286:1869-78.
36. Bernard G.R, Wheeler A.P, Russell J.A, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *N Engl J Med.* 1997; 336: 912-8.
37. Task Force of the American College of Critical Care Medicine, Society of Critical Care Medicine. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients in sepsis. *Crit Care Med.* 1999; 27: 639-660.
38. Kumar A, Wood K, Gurka D, Feinstein D, Roberts D. Duration of hypotension prior to antimicrobial administration is a critical determinant of outcome in human septic shock. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy 2004, Washington DC, abst K-415.
39. Natanson C. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 771-783.
40. Bernard, G, Artigas, A, Carlet, J, et al. The American-European consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:818.

41. Artigas, A, Bernard, GR, Carlet, J, et al. The American-European consensus conference on ARDS, part 2. Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1332.
42. Rubenfeld, GD, Caldwell, E, Peabody, E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005; 353:1685.
43. Iribarren, C, Jacobs, DR Jr, Sidney, S, et al. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting. *Chest* 2000; 117:163.
44. Meade, MO, Cook, RJ, Guyatt, GH, et al. Interobserver variation in interpreting chest radiographs for the diagnosis of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:85.
45. Doyle, RL, Szaflarski, N, Modin, GW, et al. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1818.
46. Pepe, P, Potkin, R, Reus, D, et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982; 144:124.
47. Hudson, LD, Milberg, JA, Anardi, D, Maunder, RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:293.
48. Fein, A, Lippman, M, Holtzman, H, et al. The risk factors, incidence and prognosis of the adult respiratory distress syndrome following septicemia. *Chest* 1983; 83:40.
49. Fowler, A, Hamman, R, Good, J, et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 1983; 98:593.
50. Tietjen, P, Kaner, R, Quinn, C. Aspiration emergencies. *Clin Chest Med* 1994; 15:117.
51. Beskow, CO, Drachenberg, CB, Bourquin, PM, et al. Diffuse alveolar damage. Morphologic features in bronchoalveolar lavage fluid. *Acta Cytol* 2000; 44:640.

52. Kim, DS, Park, JH, Park, BK, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J* 2006; 27:143.
53. Estenssoro, E, Dubin, A, Laffaire, E, et al. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30:2450.
54. Marik PE, Krikorian J. Pressure controlled ventilation in ARDS: a practical approach. *Chest* 1997; 112:1102-1106]
55. Mokart D, Merlin M, Sannini A, Brun J.P, Delpero J.R, Houvenaeghel G, Moutardier V. and Blache J.L. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *British Journal of Anaesthesia*. 2005; 94 (6): 767–73.
56. Gaiini S, Græsbøll Koldkjær O, Pedersen C. and Pedersen S.S. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care*. 2006; 10:R53.
57. Macias William L. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. *Critical Care Med*. 2004; Vol 32, n°5 (suppl): s223-s228.
58. Karamarkovic A. et al. Protein C as an Early Marker of Severe Septic Complications in Diffuse Secondary Peritonitis. *World Journal of Surgery*. 2005; 29: 759 – 765.
59. LaRosa S.P., Opal S.M., Utterback B., Betty Yan S.C., Heterbarnd J., Simpson J.H., Chaowagul W., White N.J., Fisher C.J. Jr.: Decreased protein C, protein S and ATIII levels are predictive of poor outcome in Gram-negative sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei*. *International Journal of Infectious Diseases* 2006; 10, 25-31.
60. Hatherill M., Tibby S.M., Sykes K., Murdoch I.A.: Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C-reactive- protein and leucocyte count. *Arch. Dis. Child*. 1999; 81: 417-421.

61. Dhainut J.F., Shorr A.F., Macias W.L., Kollef M.J., Levi M., Reinhart K., Nelson D.R.: Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Critical Care Med.* Vol. 33, No. 2: 341-347.
62. Kinausewitz G.J., Yan S.B., Basson B., Comp P., Russel J.A., Caroiu A., Um S.L., Utterback B., Laterre P.P., Dhainut J.F.: Universal change in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism. *Crit. Care Med.* 2004; 8:R82-90.
63. Dahaba A.A., Hagata B., Fall A., Rehak P.H., List W.F., Metzeler H.: Procalcitonin for early prediction of survival outcome in postoperative critically ill patients with severe sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 2006; 97:503-8.
64. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2010 [Epub Ahead of print]
65. Kofoed K., Andersen O., Kronborg G., Tuede M., Pettersen J., Eugen-Olsen J., Larsen K.: Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, PMN, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-T in combination to diagnose infection: a prospective study. *Crit. Care Med.* 2007; 11:R30 .
66. Clec'h C., Ferriere F., Karoubi P., Fosse J. P., Cupa M., Hoang P., Cohen Y.,: Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 2004, Vol. 32, No 5: 1166-1169.
67. Castelli G.P, Pognani C, Cita M, Stuani A, Sgarbi L, Paladini R. Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. *Minerva Anesthesiol.* 2006;72:69-80.
68. Muller B, Becker K.L, Schachinger H, Rickenbacher P.R, Huber P.R, Zimmerli W, Ritz R. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med.* 2000; 28:977-983.

69. Fisher CJ Jr, Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med*. 2000 Sep; 28(9 Suppl):S49-56.
70. Shorr A.F., Bernard G.R., Dhainaut J.F., Russel J.R., Macias W.L., Nelson D.R., Sundin D.P.: Protein C-concentration in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Critical Care Med*. 2006; 10:R92.
71. Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le TY, Lavoue S, Feuillu A, Thomas R. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU? *Intensive Care Med* 2000, 26:1232-1238.
72. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L and Pugin J. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164:396-402.
73. Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, Suzuki Y, Kojika M, Imai S, Takahashi G, Miyata M, Furusako S and Endo S. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother*. 2005; 11:234-238.
74. Christ-Crain M, Morgenthaler N.G, Struck J, Harbarth S, Bergmann A. and Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Critical Care*. 2005; 9:R816-R824.
75. Rhodes A, Wort S.J, Thomas H, Collinson P, Bennet E.D. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care*. 2006; 10(2):R60.
76. Moreno R, Vincent J. L, Matos R, Mendonça A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, and Willatts S. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. *Intensive Care Med*. 1999; 25: 686±696.
77. Vincent J.L, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter P, Sprung C.L, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med*. 1998; 26:1793-1800.

78. Le Gall J.R, Neumann A, Hemery F, Bleriot J.P, Fulgencio J.P, Garrigues B, Gouzes C, Lepage E, Moine P, and Villers D. Mortality prediction using SAPS II: an update for French intensive care units. *Critical Care*. 2005; 9:R645-R652.
79. Metnitz P.G.H, Lang T, Vesely H, Valentin A, and Le Gall J. R. Ratios of observed to expected mortality are affected by differences in case mix and quality of care. *Intensive care med*. 2000; 26:1466-72.
80. Winning J, Claus RA, Huse K, Bauer M. Molecular biology on the ICU. From understanding to treating sepsis. *inerva Anesthesiol*. 2006 May;72(5):255-67.
81. van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med*. 2000;26 Suppl 1:S98-102
82. Tomasdottir H, Hjartarson H, Ricksten A, Wasslavik C, Bengtsson A, Ricksten SE. Tumor necrosis factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesth Analg*. 2003 Oct;97(4):944-9
83. Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (2174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30:32–37.
84. Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit Care Med* 2002; 30:1046–1050.
85. Scumpia P.O, MoldawerL.L. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med* 2005; Vol. 33, No. 12 (Suppl.) S468-71.
86. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR: Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med* 2003; 31:34–38.
87. Gordon A.C, Waheed U, Hansen T.K, Hitman G.A, Garrard C.S, Turner M.W, Klein N.J, Brett S.J, and Hinds C.H. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock*, Vol. 25, No. 1, pp. 88–93, 2006

88. Siassi M, Riese J, Steffensen R, Meisner M, Thiel S, Hohenberger W, and Schmidt J. Mannan-binding lectin and procalcitonin measurement for prediction of postoperative infection. *Critical Care* 2005, 9:R483-R489.
89. Torres M.B, Trentzsch H, Stewart D, Mooney M.L, Fuentes J.M, Saad D.F, Reeves R.H, and De Maio A. Protection from lethal endotoxic shock after testosterone depletion is linked to chromosome X. *Shock*, Vol. 24, No. 4, pp. 318–323, 2005.
90. Xue Y, Daly A, Yngvadottir B, Liu M, Coop G, Kim Y, Sabeti P, Chen Y, Stalker J, Huckle E, Burton J, Leonard S, Rogers J, and Tyler-Smith C. Spread of an Inactive Form of Caspase-12 in Humans Is Due to Recent Positive Selection. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;78:659–670.
91. Benfield T.L, Dahl M, Nordestgaard B.G, and Hansen A.T. Influence of the Factor V Leiden Mutation on Infectious Disease Susceptibility and Outcome: A Population-Based Study. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192:1851–7.
92. Arcaroli J, Fessler M.B, and Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock*, Vol. 24, No. 4, pp. 300–312, 2005
93. Dietel M, Sers C. Personalized medicine and development of targeted therapies: the upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. A review. *Virchows Arch*
94. Blake C.A. Physiological Proteomics: Cells, Organs, Biological Fluids, and Biomarkers
95. Plebani M. Proteomics: The next revolution in laboratory medicine? *Clinica Chimica Acta* 357 (2005) 113–122.
96. Maurer M.H. The Path to Enlightenment: Making Sense of Genomic and Proteomic Information. *Geno. Prot. Bioinfo.* 2004; Vol. 2 No. 2 May: 123-31.
97. Barrett J, Brophy P.M, Hamilton J.V. Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology* 35 (2005) 543–553
98. Monti M, Orru` S, Pagnozzi D, Pucci P. Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta* 357 (2005) 140–150.

99. Gillette M.A, Mani D.R, and Carr S.A. Place of Pattern in Proteomic Biomarker Discovery. *Journal of Proteome Research* 2005, 4, 1143-1154. Hopf H.W.
100. Molecular diagnostics of injury and repair responses in critical illness: what is the future of “monitoring” in the intensive care unit? *Crit Care Med* 2003 Vol. 31, No. 8 (Suppl.): S518-23.
101. Garcia-Foncillas J, Bandres E, Zarate R, Ramirez N. Proteomic analysis in cancer research: potential application in clinical use. *Clin Transl Oncol*. 2006 Apr;8(4):250-61.
102. Ciordia S, de Los Rios V, Albar JP. Contributions of advanced proteomics technologies to cancer diagnosis. *Clin Transl Oncol*. 2006 Aug;8(8):566-80.
103. Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer*. 2004 Nov;40(17):2604-12.
104. Pang RT, Poon TC, Chan KC, Lee NL, Chiu RW, Tong YK, Wong RM, Chim SS, Ngai SM, Sung JJ, Lo YM. Serum proteomic fingerprints of adult patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*. 2006 Mar;52(3):421-9. Epub 2006 Jan 19.
105. Heper Y, Akalin EH, Mistik R, Akgöz S, Töre O, Göral G, Oral B, Budak F, Helvaci S. Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 Aug;25(8):481-91.
106. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov;1(11):845-67
107. Evans DR, Romero JK, Westoby M. Concentration of proteins and removal of solutes *Methods Enzymol*. 2009;463:97-120.
108. Luchini A, Geho DH, Bishop B, Tran D, Xia C, Dufour RL, Jones CD, Espina V, Patanarut A, Zhou W, Ross MM, Tessitore A, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. Smart hydrogel particles: biomarker harvesting: one-step affinity

purification, size exclusion, and protection against degradation. *Nano Lett.* 2008 Jan;8(1):350-61.

109. Preston RJ, Tran S, Johnson JA, Ainle FN, Harmon S, White B, Smith OP, Jenkins PV, Dahlbäck B, O'Donnell JS. Platelet factor 4 impairs the anticoagulant activity of activated protein C. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27;284(9):5869-75.
110. . Slungaard A, Key NS. Platelet factor 4 stimulates thrombomodulin protein C-activating cofactor activity. A structure-function analysis *J Biol Chem.* 1994 Oct 14;269(41):25549-56.
111. Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* . [Epub ahead of print]
112. Psuja P, Zozulińska M, Turowiecka Z, Cieślikowski W, Vinazzer H, Zawilska K. Plasma markers of hypercoagulability in patients with serious infections and risk of septic shock. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2002 Jul;8(3):225-30.
113. Oehmcke S, Herwald H. Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med.* 2009 Nov 24. [Epub ahead of print]
114. Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* 2004 Mar;21(3):210-21
115. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984 Dec 1;25(12):1277-94.
116. Berbée JF, van der Hoogt CC, de Haas CJ, van Kessel KP, Dallinga-Thie GM, Romijn JA, Havekes LM, van Leeuwen HJ, Rensen PC. Plasma apolipoprotein CI correlates with increased survival in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2008 May;34(5):907-11.

117. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003 May;31(5):1359-66.
118. Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, Gentle TM, Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, three-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006 Nov;5(11):3154-60.
119. McRae JL, Cowan PJ, Power DA, Mitchelhill KI, Kemp BE, Morgan BP, Murphy BF. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6747-54.
120. Kalenka A, Feldmann RE Jr, Otero K, Maurer MH, Waschke KF, Fiedler F. Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth Analg.* 2006 Dec;103(6):1522-6.
121. Lim YP, Bendelja K, Opal SM, Siryaporn E, Hixson DC, Palardy JE. Correlation between mortality and the levels of inter-alpha inhibitors in the plasma of patients with severe sepsis *J Infect Dis.* 2003 Sep 15;188(6):919-26.
122. Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J.* 1996 Apr 1;315 (Pt 1):1-9.
123. Piñeiro M, Alava MA, González-Ramón N, Osada J, Lasierra P, Larrad L, Piñeiro A, Lampreave F. ITIH4 serum concentration increases during acute-phase processes in human patients and is up-regulated by interleukin-6 in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Sep 16;263(1):224-9.
124. Thongboonkerd V, Chiangjong W, Saetun P, Sinchaikul S, Chen ST, Kositanont U. Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*: potential pathogenic and virulence factors. *Proteomics.* 2009 Jul;9(13):3522-34.

125. Rubin H. Serine protease inhibitors (SERPINS): where mechanism meets medicine. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):632-3.
126. Benarafa C, Priebe GP, Remold-O'Donnell E. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1901-9.
127. Hiyoshi M, Konishi H, Uemura H, Matsuzaki H, Tsukamoto H, Sugimoto R, Takeda H, Dakeshita S, Kitayama A, Takami H, Sawachika F, Kido H, Arisawa K. D-Dopachrome tautomerase is a candidate for key proteins to protect the rat liver damaged by carbon tetrachloride. *Toxicology*. 2009 Jan 8;255(1-2):6-14.
128. Hung YC, Huang GS, Sava VM, Blagodarsky VA, Hong MY. Protective effects of tea melanin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity: antioxidant activity and aryl hydrocarbon receptor suppressive effect. *Biol Pharm Bull*. 2006 Nov;29(11):2284-91.
129. Sugimoto H, Taniguchi M, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*. 1999 Mar 16;38(11):3268-79.