

PROTOCOLLO DELLO STUDIO

<p style="text-align: center;">RICERCA DI MARKERS PRECOCI PER LA STRATIFICAZIONE PROGNOSTICA DEI PAZIENTI AFFETTI DA SEPSI SEVERA O SHOCK SETTICO NELLA AOU CAREGGI STUDIO PROSPETTICO OSSERVAZIONALE</p>

BACKGROUND E RAZIONALE DELLO STUDIO:

La sepsi è una sindrome clinica la cui incidenza è gradualmente aumentata negli ultimi 20 anni; la mortalità di tale patologia appare anch'essa molto elevata (30-60%) e sostanzialmente invariata negli ultimi 20 anni. Sebbene la maggior parte del decorso clinico di un paziente affetto da sepsi si svolga nelle Terapie Intensive, un ruolo fondamentale nella gestione di tale patologia è svolto dal Dipartimento di Emergenza (DEA) (1), dove accedono e trascorrono le prime 6-12 ore di ricovero i pazienti con quadri settici acquisiti in comunità. Nonostante l'enorme mole di studi volti alla ricerca di nuovi trattamenti farmacologici per la sepsi ed alcuni risultati promettenti in ambito sperimentale, l'applicazione clinica è risultata fortemente deludente, probabilmente perché il numero di mediatori infiammatori coinvolti in tale patologia è estremamente elevato, con complesse interconnessioni fra i vari sistemi, e il controllo di uno solo di essi non determina alcun beneficio, se non provoca addirittura qualche danno (2).

Sulla scia di ciò che è avvenuto recentemente con altre patologie acute (infarto del miocardio, ictus cerebrale, politrauma), in cui è stata ottenuta una significativa riduzione della mortalità attraverso trattamenti estremamente precoci, entro la cosiddetta "golden hour", è stato proposto anche per la sepsi un protocollo di trattamento precoce, non di tipo farmacologico, ma finalizzato alla gestione della instabilità emodinamica determinata dal processo settico. Ad ulteriore supporto di questa ipotesi, una recente meta-analisi ha confermato che un protocollo di rianimazione precoce con obiettivi prefissati riduce la mortalità dei pazienti settici (3).

Protocollo di Rivers per la gestione della sepsi in fase acuta

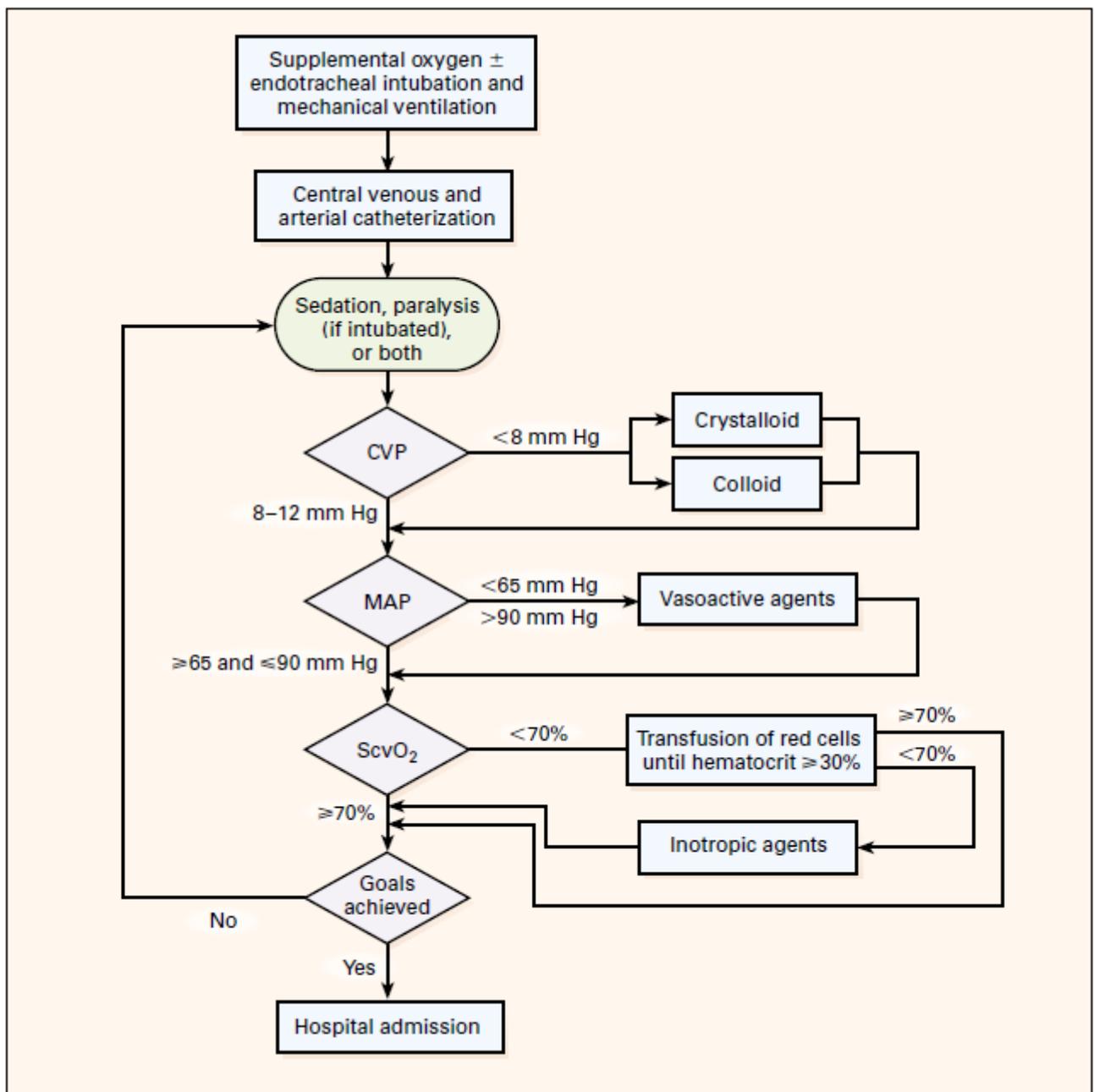
Nei pazienti con sepsi grave o shock settico, una significativa riduzione della mortalità è stata ottenuta attraverso un protocollo di precoce gestione emodinamica del paziente, con precisi obiettivi quantitativi prefissati (Early Goal Directed Therapy, EGDT, Terapia precoce per obiettivi) (4), al fine di risolvere più precocemente possibile lo stato di ipoperfusione determinato dalla sepsi stessa (Fig.1).

Tale protocollo, proposto da Rivers nel 2001, è la parte operativa di una più ampia strategia di gestione dei pazienti affetti da sepsi (5), che prevede alcuni importanti passaggi, quali

- ✓ Verifica della prevalenza di sepsi nell'ospedale in cui si opera

- ✓ Identificazione dei pazienti ad elevato rischio
- ✓ Identificazione delle risorse disponibili
- ✓ Preparazione di un protocollo condiviso per il trattamento dell'instabilità emodinamica precoce
- ✓ Identificazione di indicatori di qualità
- ✓ Quantificazione delle risorse necessarie
- ✓ Verifica dell'esito del programma

Fig.1: Protocollo della EGDT



Tale protocollo è stato sottoposto a numerose critiche; in particolare, è stata messa in discussione la reale rappresentatività della casistica di Rivers rispetto alla media dei pazienti affetti da sepsi afferenti al DEA nel mondo (6;7), in quanto la casistica riportata sembra di fatto “più malata” della media dei pazienti osservati

nei successivi studi, con una ricaduta anche sulla riduzione di mortalità osservata. Nonostante queste critiche, il protocollo di Rivers è stato sostanzialmente accettato e raccomandato dalle Surviving Sepsis Campaign del 2004 e 2008 (8;9), con l'aggiunta di alcune misure, quali la precoce somministrazione di antibiotici e l'esecuzione precoce di esami colturali. Sono stati successivamente pubblicati numerosi trial finalizzati all'implementazione di un protocollo di gestione condiviso della sepsi in DEA (10-13) e nelle Terapie Intensive (14-17), per lo più sul modello della EGDT, applicato non da personale aggiunto, ma dai medici ordinariamente responsabili della gestione dei pazienti, opportunamente formati; è stata ripetutamente confermata la fattibilità di un approccio standardizzato alla sepsi, spesso associata ad un vantaggio dal punto di vista prognostico, sia a breve che a lungo termine, mai osservato con un trattamento farmacologico specifico.

Ricerca di markers precoci di sepsi

Una difficoltà nel trattamento precoce della sepsi deriva dal fatto che il quadro clinico della sepsi all'esordio è spesso molto subdolo, con un possibile rilevante ritardo di diagnosi ed una sottostima della gravità del quadro clinico complessivo e della compromissione d'organo. Ad oggi non è disponibile alcun marker sierologico, come la troponina per l'ischemia miocardica, precoce ed accettato dalla comunità scientifica internazionale, per la diagnosi e la stratificazione prognostica dei pazienti affetti da un processo settico.

Una ulteriore difficoltà nell'inquadramento dei pazienti settici nasce dal fatto che, per ora, la sepsi viene considerata come un *unicum*, a prescindere dalla sede del focolaio di infezione, dall'agente infettante e dalle comorbilità di base del soggetto affetto, tutti parametri che possono marcatamente influenzare l'attivazione della cascata infiammatoria ed il conseguente pattern di danno d'organo: nasce da qui l'esigenza di una più accurata caratterizzazione, da un punto di vista immunologico, di diversi sottogruppi di pazienti (18). Tutto questo allo scopo di una possibile gestione differenziata non tanto nella fase iniziale di instabilità emodinamica, per la quale una stabilizzazione precoce rimane l'unica opzione percorribile, ma per l'impiego di terapie specifiche nel successivo decorso, il cui insuccesso in alcuni trials clinici potrebbe anche essere almeno in parte dovuto ad una scorretta selezione della casistica.

Esistono alcuni report preliminari, relativi a casistiche limitate, che hanno valutato la performance di alcuni biomarcatori, appartenenti alla classe delle citochine, nella identificazione e nella stratificazione diagnostica dei pazienti settici (19-21). La sepsi infatti determina un massivo rilascio di mediatori pro- e anti-infiammatori nel torrente circolatorio, causato da una inadeguata risposta ad una infezione, che sono poi i veri responsabili del danno d'organo e dell'instabilità emodinamica. Il dosaggio seriato di tali mediatori potrebbe consentire un più accurato inquadramento precoce dei pazienti settici, in particolare offrire la possibilità di identificare precocemente i pazienti a più alto rischio di sviluppare danno d'organo.

Il sempre maggior sviluppo delle tecniche laboratoristiche disponibili potrebbe permettere, inoltre, l'identificazione di nuovi marcatori specifici, sensibili e precoci, per sepsi, ed, in particolare, appare interessante l'applicazione clinica della ricerca metabolica (22;23). Per *metabolita* si intende l'insieme di

molecole di piccole dimensioni (endogene od esogene), riscontrabili in una cellula vitale od in un organismo vivente. Il *metaboloma* può essere considerato come un prodotto diretto del genoma, del trascrittoma e del proteoma e costituisce una buona rappresentazione del fenotipo di un individuo. Il metaboloma amplifica i cambiamenti causati da perturbazioni biologiche e la *metabolomica*, o *metabonomica*, è definibile come la misura quantitativa della risposta metabolica multi-parametrica dei sistemi viventi agli stimoli pato-fisiologici od a modificazioni genetiche (22;23).

Nonostante il neologismo coniato nel 2000, nella sua accezione più ampia, la metabolomica è utilizzata nella pratica clinica da circa 100 anni nella forma di monitoraggio emogasanalitico, dosaggio della concentrazione urinaria di glucosio o quantificazione della creatinina serica. Il recente sviluppo di tecniche laboratoristiche sofisticate come l'elettroforesi microcapillare, la nano-HPLC (High Performance Liquid Chromatography), la FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), la spettrometria di massa (MS) e la spettrometria a risonanza magnetica (NMR), associato alla creazione di software dedicati alla rapida rielaborazione dei *patterns* spettrometrici o cromatografici, ha permesso il dosaggio simultaneo di centinaia di metaboliti, molti dei quali sino ad oggi ignoti, in modo semplice, rapido ed economico (23). Rispetto al più diffuso approccio genomico, proteomico od istologico, il vantaggio della metabolomica è rappresentato dalla possibilità di rilevare, identificare e dosare nei liquidi organici quei metaboliti che rispecchiano, in modo "istantaneo", il profilo funzionale di un organo od apparato. Le modificazioni del profilo metabolico, confrontato con un campione di riferimento, avvengono infatti in tempo reale rispetto all'alterazione omeostatica prodotta dalla noxa patogena, a differenza del profilo proteomico che può impiegare giorni o settimane per produrre modificazioni rilevabili. Allo stesso tempo la possibilità di utilizzare fluidi organici, come ad esempio l'urina o il siero, rende poco invasivo e dispendioso il prelievo dei campioni in studio. Infatti, per le loro caratteristiche di facile campionamento, le urine sono, ad oggi, il fluido organico più suscettibile all'approccio metabolomico nella pratica clinica. Le applicazioni cliniche della metabolomica, perlopiù limitate a studi preliminari, sono state finalizzate alla monitorizzazione della funzionalità (o disfunzione) e del danno da ischemia/riperfusionazione d'organo; la metabolomica si è dimostrata affidabile anche nella monitorizzazione della funzionalità degli organi solidi trapiantati. La definizione dei profili metabolomici peculiari di specifiche affezioni d'organo, unita allo sviluppo di metodi laboratoristici rapidi ed economici, potrebbero, in prospettiva, permettere la diagnosi ed il trattamento tempestivo di altre patologie, come la sepsi.

Ruolo della componente genetica nella risposta infiammatoria

È ormai un dato acquisito che la suscettibilità e la risposta alle malattie infettive sono almeno in parte ereditarie. È stato dimostrato che il contributo della predisposizione genetica alla mortalità per malattie infettive è cinque volte maggiore del contributo allo sviluppo di malattia oncologica (24).

Da un punto di vista genetico, l'infezione è una patologia complessa che deriva dall'interazione fra il genotipo dell'individuo affetto e l'ambiente (25). Nella risposta ad un agente infettante, i sottotipi cellulari ed

i mediatori umorali implicati sono moltissimi, e chiamano in causa un'ampia varietà di possibili variazioni genetiche sottostanti.

Nello studio della predisposizione genetica all'infezione, l'attenzione si è focalizzata su alcuni polimorfismi di geni che codificano noti mediatori infiammatori, quali il TNF α , l'IL-6 ed alcuni recettori cellulari, quali il CD14, che costituisce una parte del recettore per il lipopolisaccaride, e i Toll-like receptors (TLR) (26) e sui polimorfismi di geni che codificano per alcuni fattori correlati dell'emostasi (27). Una variante geneticamente determinata di un mediatore infiammatorio o di un componente della cascata coagulativa può determinare una attivazione inappropriata della risposta infiammatoria, con conseguente peggioramento del danno dell'organo e della prognosi complessiva del paziente infetto.

L'importanza della componente genetica nella prognosi del paziente settico rimane per ora argomento di ricerca e di discussione, perché le evidenze sono limitate e spesso ricavate da popolazioni di numerosità ridotta (27;28). Inoltre, se è stato verificato che alcune varianti genetiche del TNF α o dei TLR sono associate ad una produzione significativamente aumentata di mediatori infiammatori in corso di sepsi, non è chiara per ora la correlazione clinica di questo reperto (29). L'identificazione di varianti genetiche associate ad una maggiore suscettibilità alla sepsi e/o ad una prognosi infausta potrebbe dare un contributo significativo all'inquadramento del paziente settico.

Sono necessari pertanto studi su casistiche ampie sia per l'identificazione di polimorfismi genetici con una ricaduta sulla risposta infiammatoria del paziente settico, sia per la comprensione della reale ricaduta clinica di tali varianti.

DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio proposto si presenta come studio osservazionale, che non implica alcuna modifica del percorso diagnostico-terapeutico a cui viene usualmente sottoposto ogni paziente con stato settico ricoverato nella Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (AOUC). L'unica variazione consiste nell'esecuzione di alcuni prelievi seriati per il dosaggio della concentrazione plasmatica ed urinaria dei marcatori biologici, per eseguire uno studio "metabolomico" e per la ricerca di polimorfismi genetici. Qualunque sia il destino del paziente (ricovero in reparto ordinario o terapia intensiva), questo verrà seguito nel tempo, durante tutto il ricovero fino alla risoluzione della sindrome settica. L'analisi dei suddetti campioni, eseguita a posteriori, verrà secondariamente correlata ai dati clinici dei pazienti in oggetto e non potrà influire in nessun modo sulla valutazione decisionale di trattamento.

Come riportato nell'Allegato 1, per la definizione del protocollo di studio e la sua applicazione sono coinvolte varie SOD dell'AOUC. La responsabilità dell'archiviazione, elaborazione e conservazione dei dati sarà a carico della SOD Osservazione Breve Intensiva.

Il titolare e responsabile del trattamento dei dati genetici sarà il Prof. Riccardo Pini.

Nello specifico il presente studio osservazionale si articola in tre Fasi Operative (FO).

Fase Operativa 1: Stesura condivisa di un protocollo operativo

Nel corso della Fase Operativa 1 i medici referenti delle SOD coinvolte nello studio, basandosi sui dati della letteratura attualmente disponibili, elaboreranno un protocollo condiviso di inquadramento dei pazienti affetti da sepsi severa e shock settico a partire dalla fase precoce di riconoscimento.

Tale fase prevede anche la programmazione di incontri con tutto il personale medico ed infermieristico delle SOD coinvolte per illustrare il protocollo operativo elaborato e per sensibilizzare il personale stesso alla ricerca di segni precoci, e spesso misconosciuti, di sepsi.

Fase Operativa 2: Reclutamento dei pazienti

Lo studio si propone di arruolare tutti i pazienti che afferiscono al DEA della AOUC, nell'arco temporale di 12 mesi, con diagnosi di ingresso di sepsi severa o shock settico, e tutti i pazienti che sviluppino tale quadro nel corso della degenza presso la stessa AOUC.

Tali pazienti verranno sottoposti, ad intervalli predeterminati, a prelievi ematici ed urinari per la determinazione delle citochine circolanti e la valutazione dell'attivazione dei sistemi plasmatici coinvolti nell'infiammazione (vedi Organizzazione dello Studio).

Su uno dei prelievi verrà inoltre eseguita estrazione del DNA per la ricerca dei polimorfismi genetici, oggetto del progetto di ricerca.

Ciascun paziente verrà seguito per tutta la durata del ricovero, fino alla dimissione, con lo scopo di ottenere tutte le notizie cliniche, compresi i dati laboratoristici e strumentali, necessarie a valutare il decorso della patologia settica e ad individuare le complicanze che potrebbero insorgere durante il ricovero.

Fase Operativa 3: Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione del profilo immunologico

Oltre ai prelievi ematici normalmente inviati al Laboratorio Centrale della AOUC per l'inquadramento standard dei pazienti settici, lo stesso Laboratorio Centrale provvederà a processare e conservare i campioni raccolti durante la fase di reclutamento dei pazienti (Fase Operativa 2) per la caratterizzazione del profilo immunologico e coagulativo dei pazienti settici e per l'estrazione del DNA. I campioni verranno quindi resi disponibili per le analisi successive che verranno eseguite presso il Laboratorio della SOD Malattie Aterotrombotiche del Dipartimento Cuore e Vasi.

Per l'analisi metabolomica i campioni plasmatici e urinari raccolti nel corso della Fase Operativa 2 verranno inviati ai laboratori di Toscana Biomarkers.

Una volta analizzati tutti i campioni, sarà possibile effettuare un'analisi statistica dei dati ottenuti e fare una correlazione con la diagnosi definitiva del paziente ed il suo decorso clinico. Da tale analisi statistica potremo ottenere importanti informazioni sulla correlazione fra profilo immunologico, pattern di danno d'organo e decorso clinico complessivo.

TIPOLOGIA DELLO STUDIO:

Lo studio proposto è concepito come locale e si svolgerà presso l'AOUC. Tale struttura rappresenta un bacino di utenza sufficiente ad ottenere un congruo numero di osservazioni per lo studio proposto, oltre a rappresentare una realtà operativa che offre le possibilità organizzative e professionali per una adeguata gestione della patologia settica, in conformità alle linee guida internazionali.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'**obiettivo primario** sarà quello di identificare uno o più biomarcatori in grado di stratificare da un punto di vista prognostico i pazienti settici; l'outcome primario valutato sarà la mortalità intraospedaliera. Ciò consentirebbe di identificare precocemente quei soggetti a prognosi infausta che necessitano di un trattamento precoce e aggressivo.

Obiettivi secondari sono:

- la correlazione fra i diversi pattern di marcatori biologici e le differenti tipologie di danno d'organo, sviluppate dai pazienti e valutate attraverso il punteggio SOFA (vedi allegato 2, in cui si riportano le modalità di calcolo del punteggio SOFA), e la loro correlazione con la risposta al trattamento;
- il ruolo della predisposizione genetica nel decorso della malattia e nella risposta al trattamento.

ORGANIZZAZIONE DELLO STUDIO:

Fase Operativa 1: Stesura condivisa di un protocollo operativo di inquadramento

Per tale fase, della durata di due mesi, all'interno di ogni SOD coinvolta nello studio dovrà essere individuato un referente medico ed uno infermieristico che parteciperanno alla stesura di un protocollo condiviso di inquadramento della sepsi severa e dello shock settico.

I referenti avranno l'incarico di formare tutto il personale delle SOD di appartenenza al precoce riconoscimento della sepsi ed alla applicazione del protocollo elaborato nei pazienti arruolati.

Risultati attesi

- Elaborazione di un protocollo condiviso
- Formazione e sensibilizzazione del personale medico ed infermieristico delle SOD coinvolte
- Miglioramento della capacità di identificazione precoce dei pazienti con potenziale sepsi severa/shock settico.

La Fase Operativa 1 prevede una durata complessiva di 2 mesi con il coinvolgimento del seguente personale qualificato afferente alle SOD indicate nell'**Allegato 1**:

Prof. Riccardo Pini

Professore Associato di Medicina di Emergenza e Urgenza presso l'Università degli Studi di Firenze e direttore della SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza). Attuale direttore della Scuola di Specializzazione in Medicina di Emergenza e Urgenza.

Dott.ssa Francesca Innocenti

Dirigente medico presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Tania Brogi

Infermiera presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Sandra Cecchini

Infermiera presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott. Giuseppe Giannazzo

Dirigente medico presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Rita Piovelli

Infermiera presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Monica Fratini

Infermiera presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dr Filippo Pieralli

Dirigente medico presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dr Antonio Mancini

Dirigente medico presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Stefania Del Plato

Infermiera presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Ilaria Becchi

Infermiera presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott.ssa Manuela Bonizzoli

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott. Giovanni Zagli

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Simona Bacci

Infermiera presso la SOD di Anestesia e Rianimazione (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott.ssa Chiara Adembri

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 2 (Dipartimento di Medicina e Chirurgia Generale).

Diego Sonnini

Infermiere presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 2 (Dipartimento di Medicina e Chirurgia Generale).

Dott. Alberto Sardu

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Dott.ssa Maria Pia Nucera

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Annalisa Ermini

Infermiere presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Dott. Paolo Valoti

Dirigente medico presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Elisa Moncini

Infermiera presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Paola Brembilli

Infermiera presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Dott.ssa Serafina Valente

Dirigente medico presso la SOD di Cardiologia 1 (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Dott. Stefano Romagnoli

Dirigente medico presso la SOD di Cardioanestesia (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Tiziana Stefanelli

Infermiera della Terapia Intensiva Cardiologia 1 (Dipartimento Cuore e Vasi)

Fase Operativa 2: Reclutamento dei pazienti e applicazione del protocollo di gestione

Il reclutamento dei pazienti, la valutazione clinica e strumentale, l'applicazione del protocollo elaborato e la registrazione dei dati clinici relativi verrà svolta dal personale medico ed infermieristico delle SOD coinvolte; lo stesso personale eseguirà i prelievi ematici ed urinari per la caratterizzazione del profilo immunologico ad intervalli prefissati. Il protocollo operativo per l'arruolamento dei pazienti e le valutazioni cliniche programmate è illustrato nell'**Allegato n. 2**; l'elenco dei mediatori che verranno dosati, il tipo di polimorfismi genetici ricercati ed il timing dei prelievi è descritto nell'**Allegato n. 3**.

Al fine di massimizzare il controllo dei fattori confondenti (quali ad esempio somministrazione di farmaci, squilibri metabolici, comorbilità) che possono condizionare la rielaborazione statistica dei dati, saranno annotati tutti i dati relativi all'anamnesi patologica, alla terapia farmacologica, al tipo di intervento condotto ed al decorso clinico successivo (**Allegato n.2 e CFR**).

Risultati attesi

- 1) arruolamento di almeno 200 casi;
- 2) raccolta completa dei dati clinici-laboratoristici e strumentali di almeno il 95% dei pazienti arruolati;

- 3) raccolta completa dei campioni ematici ed urinari previsti dal protocollo in almeno il 95% dei pazienti arruolati.

La Fase Operativa 2 prevede una durata complessiva di 12 mesi con il coinvolgimento del seguente personale qualificato:

Prof. Riccardo Pini

Professore Associato di Medicina di Emergenza e Urgenza presso l'Università degli Studi di Firenze e direttore della SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza). Attuale direttore della Scuola di Specializzazione in Medicina di emergenza e Urgenza.

Dott.ssa Francesca Innocenti

Dirigente medico presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Tania Brogi

Infermiera presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Sandra Cecchini

Infermiera presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott. Giuseppe Giannazzo

Dirigente medico presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Rita Piovelli

Infermiera presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Monica Fratini

Infermiera presso la SOD di Pronto Soccorso (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dr Filippo Pieralli

Dirigente medico presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dr Antonio Mancini

Dirigente medico presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Stefania Del Plato

Infermiera presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Ilaria Becchi

Infermiera presso la SOD di Medicina Generale 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott.ssa Manuela Bonizzoli

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott. Giovanni Zagli

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Simona Bacci

Infermiera presso la SOD di Anestesia e Rianimazione (DAI DEA e Medicina e Chirurgia Generale e D'Urgenza).

Dott.ssa Chiara Adembri

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 2 (Dipartimento di Medicina e Chirurgia Generale).

Diego Sonnini

Infermiere presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 2 (Dipartimento di Medicina e Chirurgia Generale).

Dott. Alberto Sardu

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Dott.ssa Maria Pia Nucera

Dirigente medico presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Annalisa Ermini

Infermiera presso la SOD di Anestesia e Rianimazione 1 (Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche).

Dott. Paolo Valoti

Dirigente medico presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Elisa Moncini

Infermiera presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Paola Brembilli

Infermiera presso la SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Dott.ssa Serafina Valente

Dirigente medico presso la SOD di Cardiologia 1 (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Dott. Stefano Romagnoli

Dirigente medico presso la SOD di Cardioanestesia (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Tiziana Stefanelli

Infermiera presso la SOD Cardiologia 1 (Dipartimento Cuore e Vasi)

Fase Operativa 3: Preparazione e analisi dei campioni per la caratterizzazione del profilo immunologico

In questa fase è pertanto previsto il dosaggio dei marcatori biologici indicati nell'Allegato n 2.

Questa fase prevede pertanto:

- 1) preparazione dei campioni;
- 2) analisi dei campioni;
- 3) elaborazione statistica dei dati ricavati dai dosaggi ematochimici e loro correlazione con i parametri clinici.

Preparazione dei campioni

Per il dosaggio dei mediatori infiammatori, il campione di sangue verrà centrifugato entro 30 minuti (1500xg, 4°C) dalla raccolta ed il siero così ottenuto verrà conservato a -80° presso il Laboratorio di Analisi della AOUC. I campioni saranno resi disponibili per la successiva valutazione delle concentrazioni dei marcatori biologici circolanti presso il Laboratorio della SOD Malattie Aterotrombotiche.

Per lo studio dei marcatori di attivazione della coagulazione, i campioni di sangue saranno prelevati in provette vacutainer [per ottenere aliquote di plasma] contenenti citrato di sodio (0,109 M). I campioni di sangue saranno centrifugati a 2000g x 10 minuti a 4°C e poi conservati fino all'esecuzione dell'analisi a -80°C presso il Laboratorio di Analisi della AOUC. I campioni saranno resi disponibili per la successiva valutazione delle concentrazioni dei marcatori biologici circolanti presso il Laboratorio della SOD Malattie Aterotrombotiche.

Per la ricerca dei polimorfismi genetici un campione di sangue verrà utilizzato per l'estrazione del DNA genomico che verrà conservato a -20°C ed analizzato presso il Laboratorio della SOD Malattie Aterotrombotiche.

I prelievi per l'analisi metabolica verranno preparati secondo la seguente procedura presso il Laboratorio della Unità Funzionale di Geriatria e Gerontologia:

- 1 mL di sangue verrà prelevato e lasciato coagulare in assenza di additivo per 2 h a temperatura ambiente; il siero verrà separato per centrifugazione a 3000g per 20 min.
- All'aliquota di siero (circa 0,4 mL) verrà aggiunto un volume doppio di acetonitrile (circa 0,8 mL) rispetto al siero ed il campione verrà agitato vigorosamente per 30 sec per favorire la precipitazione. Il campione verrà lasciato sedimentare per 10 min a temperatura ambiente e successivamente verrà centrifugato a 1000g per 5 min. Il supernatante verrà raccolto e conservato a -80 °C.
- Dal prelievo di urina verranno prelevati 5 cc di materiale che verranno congelati a -20°C e conservati per le successive analisi.

Al termine dello studio i campioni di sangue verranno eliminati.

Analisi dei campioni

Tale fase prevede l'analisi dei prelievi precedentemente processati sia tramite metodica ELISA (utilizzando kit già presenti in commercio), sia tramite metodica di tipo "Multiple-Analyte Profiling" (Multiplex) che permette l'esecuzione di più misurazioni su un campione di volume ridotto (50 microlitri).

Ricerca di polimorfismi

Tale fase prevede l'estrazione del DNA dai campioni precedentemente conservati e la ricerca dei polimorfismi precedentemente indicati.

Analisi dei dati e correlazione con la patologia

Ricerca di cluster di citochine circolanti che si associano in modo statisticamente significativo con la prognosi e gravità del danno d'organo associato alla sepsi.

Risultati attesi:

- 1) Identificazione di un panel di marcatori in grado di stratificare i pazienti settici da un punto di vista prognostico
- 2) Verifica della correlazione tra citochine circolanti e danno d'organo.

La Fase Operativa 3 prevede una durata complessiva di 12 mesi con il coinvolgimento del seguente personale qualificato:

Prof. Rosanna Abbate

Professore Ordinario di Medicina Interna, Direttore del Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica dell'Università di Firenze, SOD Malattie Aterotrombotiche (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Dott.ssa Anna Maria Gori

Ricercatore presso l'Università di Firenze, SOD Malattie Aterotrombotiche (Dipartimento del Cuore e dei Vasi)..

Dott.ssa Lucia Caldini

Dirigente medico presso la SOD Diagnostica di Laboratorio (Dipartimento di Laboratorio Generale).

Dott. Alessandro Terreni

Dirigente medico presso la SOD Diagnostica di Laboratorio (Dipartimento di Laboratorio Generale).

Prof. Francesca Tarantini

Professore Associato presso l'Unità Funzionale di Gerontologia e Geriatria del Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica dell'Università di Firenze, SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi)..

Dr.ssa Claudia Di Serio

Tecnico di laboratorio presso l'Unità Funzionale di Gerontologia e Geriatria del Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica dell'Università di Firenze, SOD di Cardiologia e Medicina Geriatrica (Dipartimento del Cuore e dei Vasi).

Prof. Riccardo Pini

Professore Associato di Medicina di Emergenza e Urgenza presso l'Università degli Studi di Firenze e direttore della SOD di Osservazione Breve Intensiva (Dipartimento di Emergenza e Accettazione). Attuale direttore della Scuola di Specializzazione in Medicina di emergenza e Urgenza.

Dott.ssa Francesca Innocenti

Dirigente medico presso la SOD di Osservazione Breve Intensiva (Dipartimento di Emergenza e Accettazione).

POPOLAZIONE IN STUDIO:

Saranno arruolati tutti i pazienti afferenti al DEA dell'AOUC con diagnosi d'ingresso di "sepsi severa o shock settico" e tutti i pazienti che durante la degenza nella AOUC svilupperanno tale quadro patologico.

Criteri di inclusione:

1. Almeno due dei seguenti 4 criteri diagnostici di SIRS:
 - a. Frequenza cardiaca superiore a 90 b/min
 - b. Frequenza respiratoria superiore a 20 atti/min
 - c. Temperatura superiore a 38°C o inferiore a 36°C
 - d. Conta dei leucociti inferiore a 4000/mm³ o superiore a 12000/mm³
2. Infezione come causa certa o presunta di SIRS
3. Almeno un segno di danno d'organo secondo la classificazione Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) di cui si riporta la tabella di riferimento; il valore minimo dovrà essere >1.
4. Instabilità emodinamica caratterizzata da ipotensione arteriosa (PAS<90 mmHg) dopo bolo di fluidi 20 ml/Kg in mezz'ora e/o segni di ipoperfusione tissutale (lattati > 2 mmol/L)

Per includere il paziente nello studio sono necessari almeno due criteri del punto 1, il punto 2 e il punto 3 e/o il punto 4.

Tab.1: SOFA score

	0	1	2	3	4
Respirazione PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	<= 400	<= 300	<= 200	<= 100
Emostasi Piastrine (n/mm ³)	>150	<= 150	<= 100	<= 50	<= 20

Fegato Bilirubina (mg/dL)	<1.2	1.2-1.9	2-5.9	6-11.9	>12
Cardiovascolare		Pressione arteriosa media <70 mmHg	Dopamina ≤ 5 γ/kg/min o Dobutamina	Dopamina > 5 γ/kg/min o Adrenalina o Noradrenalina ≤0.1 γ/kg/min	Dopa >15 γ/kg/min o Adrenalina o Noradrenalina >0.1 γ/kg/min
Neurologico (Glasgow Coma Scale)	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renale Creatinina (mg/dl) Flusso urinario		1.2-1.9	2-3.4	3.5-4.9 o <500ml/24 ore	>5 o <200 ml/

Criteri di esclusione sono:

1. Rifiuto del paziente alla partecipazione allo studio
2. Età inferiore ai 18 anni
3. Gravidanza in atto
4. Stato di aplasia midollare post-chemioterapia
5. Sindrome da allettamento della durata superiore a tre mesi secondaria a grave decadimento cognitivo

TRATTAMENTI:

Lo studio è osservazionale in quanto il protocollo non prevede nessun trattamento sperimentale. Ovviamente, tutti i pazienti arruolati saranno trattati secondo le good clinical practices relative alle varie patologie.

SOSPENSIONE DEI TRATTAMENTI IN STUDIO:

N/A

CRITERI DI VALUTAZIONE: (EFFICACIA SICUREZZA-TOLLERABILITA')

N/A

FARMACOGENETICA:

N/A

DIMENSIONE CAMPIONARIA:

Pubblicazioni anche molto recenti (30) hanno evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra severità di danno d'organo e concentrazione di marcatori biologici in pazienti con sepsi severa arruolando campioni di circa 220 pazienti. Dai dati pubblicati (31), ad esempio possiamo ipotizzare differenze di concentrazione di citochine tra pazienti con prognosi favorevole o

infausta che richiedono dimensioni campionaria variabili tra 42 (per l'Interleuchina 6) e 448 (per l'Interleuchina 10).

D'altra parte, analisi della presenza di varianti genetiche associate alla differente prognosi in corso di sepsi sono state condotte su campioni di circa 160 pazienti (32). I dati pubblicati consentono di ipotizzare che sia necessaria una dimensione campionaria di circa 70 pazienti.

Tutte le simulazioni per la valutazione della dimensione campionaria sono state eseguite con un valore di significatività del 95% e una potenza di 80%.

Sulla base dei dati disponibili relativi all'anno 2010 sulla prevalenza della diagnosi di sepsi severa/shock settico fra i pazienti che accedono al DEA e fra i pazienti ricoverati nelle Terapie Intensive coinvolte nello studio si può prevedere di arruolare circa 250 pazienti in un anno. Tale numero sembra quindi coerente con le dimensioni campionarie calcolate sulla base degli studi pubblicati per raggiungere una potenza sufficiente all'analisi di quasi tutti i parametri presi in considerazione nel presente studio.

Inoltre, essendo 250 pazienti la numerosità prevista, si ipotizza di inserire nella analisi multivariata al massimo 15 variabili in modo da mantenere un rapporto numerosità del campione/numero di variabili superiore a 10.

METODOLOGIA DI ANALISI STATISTICA

L'elaborazione dei dati verrà eseguita mediante il programma di analisi statistica SPSS versione 17.

La presentazione statistica dei dati rilevati al momento dell'arruolamento nello studio e nei successivi controlli verrà attuata come percentuale per le variabili qualitative, come media \pm deviazione standard (DS) per le variabili con distribuzione prevedibilmente normale e come mediana con intervallo di confidenza del 95% (CI 95%) per le variabili a distribuzione non normale. Il confronto fra i due gruppi (rispettivamente a prognosi favorevole e avversa) verrà eseguito, per i parametri continui, con test del T di Student per dati non appaiati per i parametri a distribuzione normale e con test di Mann-Whitney per i parametri a distribuzione non normale. Per i parametri dicotomici verrà utilizzato il test del χ^2 e Fisher exact test.

Per analizzare eventuali differenze nell'andamento temporale della concentrazione di marcatori biologici circolanti tra i due gruppi di pazienti a differente prognosi, verrà utilizzato il Modello Lineare Generale, prendendo in esame i valori ottenuti nei prelievi seriatati eseguiti al tempo 0 ed a 6, 24 e 48 ore. Verrà inoltre valutata la presenza di una correlazione fra la concentrazione di differenti marcatori biologici attraverso il calcolo dei coefficienti di correlazione di Spearman (valore di r), con valutazione del valore di p associato. Una simile analisi verrà eseguita anche fra la concentrazione di marcatori circolanti e il punteggio SOFA di valutazione del danno d'organo; in

considerazione del fatto che la distribuzione del valore di SOFA non è normale, verrà eseguita una trasformazione logaritmica di tale parametro nel corso dell'analisi.

Per valutare la relazione fra il livello di marcatori biologici circolanti e la presenza di specifici danni d'organo (polmone, rene, cervello, apparato cardiovascolare, sistema emopoietico, fegato), verrà eseguita una regressione logistica utilizzando il valore del marcatore come parametro continuo, corretto per età, sesso e comorbidità valutata mediante indice di Charlson; la variabile dipendente sarà la presenza o l'assenza di uno specifico danno d'organo, definita come $SOFA \geq 1$ o $SOFA=0$ relativo a quel particolare organo, considerando il valore peggiore raggiunto nel corso delle 48 ore di osservazione.

Per valutare la performance dei singoli marcatori esaminati nella stratificazione prognostica dei pazienti, in particolare nella previsione di mortalità, verrà calcolata l'area sotto la curva ROC, con la definizione dell'intervallo di confidenza del 95%. Sulla base dei valori di specificità e sensibilità, verrà valutata la possibilità di stabilire un cut-off e verrà inoltre eseguito un confronto statistico per determinare la presenza di differenze statisticamente significative fra le varie curve.

Verrà testata anche la capacità di stratificazione prognostica di modelli comprendenti più marcatori biologici differenti attraverso regressione logistica univariata.

I predittori indipendenti di gravità del danno d'organo o di prognosi infausta che all'analisi univariata hanno dimostrato una significatività <0.05 saranno successivamente inseriti in una analisi multivariata (significatività di ingresso <0.05 e significatività in uscita dal modello >0.10) per determinare il rischio relativo (RR) e l'intervallo di confidenza del 95%.

Per la selezione delle variabili metabolomiche maggiormente collegate con la patologia in esame, sarà impiegata la cosiddetta tecnica del "bucketing". Infine, prima dell'analisi statistica, i bucket saranno trasformati logaritmicamente in modo da compensare l'intrinseca non-gaussianità dell'informazione metabolica.

Analisi statistica dei dati genetici

Per ciascuna delle varianti genetiche esaminate, il gruppo portatore di variante è stato identificato nel seguente modo:

- Polimorfismo PAI-1 4G/5G: pazienti omozigoti 4G/4G per il polimorfismo 4G/5G posto nella regione del promotore
- Polimorfismo Fattore V Leiden: pazienti omozigoti o eterozigoti per il polimorfismo Arg506Gln del gene codificante il Fattore V
- Polimorfismo Fattore II: Pazienti omozigoti o eterozigoti per il polimorfismo G20210A a carico della regione 3' untranslated del gene codificante la protrombina

- Polimorfismi del fibrinogeno:
- pazienti omozigoti o eterozigoti per il polimorfismo Thr312Ala del gene codificante la catena α del fibrinogeno
 - pazienti omozigoti o eterozigoti per il polimorfismo G/A 455 o 448 del gene codificante la catena β del fibrinogeno
- Polimorfismo dell'enzima di conversione dell'angiotensina: pazienti omozigoti o eterozigoti per il polimorfismo I/D posto nell'introne 16.
- Polimorfismi dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale:
 - polimorfismo eNOS 894 G/T posto a livello dell'esone 7,
 - polimorfismo -786T/C posto nella regione adiacente al promotore
 - polimorfismo *eNOS 4a4b* (27-base bp- variable tandem repeat) posto nell'introne 4

La distribuzione delle varianti genetiche verrà testata rispetto all'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Il valore prognostico delle varianti genetiche sopraelencate, corretto per età e comorbilità, verrà analizzato mediante regressione logistica univariata, considerando come outcome la mortalità intraospedaliera.

ASSICURAZIONE:

Lo studio è coperto da una polizza assicurativa per la Responsabilità Civile verso Terzi stipulata dalla AOU Careggi Firenze a tutela di tutti i pazienti ricoverati. Data la natura osservazionale dello studio non è necessaria altra polizza assicurativa aggiuntiva rispetto a quella prevista per la normale pratica clinica.

LO STUDIO PROPOSTO E' CONFORME AI PRINCIPI DI BUONA PRATICA CLINICA (GCP) ED AI PRINCIPI ETICI DELLA DICHIARAZIONE DI HELSINKI ED AI SUOI AGGIORNAMENTI.

Reference List

- (1) Wang HE, Shapiro NI, Angus DC, Yealy DM. National estimates of severe sepsis in United States emergency departments. *Crit Care Med* 2007; 35(8):1928-1936.
- (2) Nasraway SA. The problems and challenges of immunotherapy in sepsis. *Chest* 2003; 123(5 Suppl):451S-459S.
- (3) Jones AE, Brown MD, Trzeciak S, Shapiro NI, Garrett JS, Heffner AC et al. The effect of a quantitative resuscitation strategy on mortality in patients with sepsis: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2008; 36(10):2734-2739.
- (4) Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345(19):1368-1377.
- (5) Otero RM, Nguyen HB, Huang DT, Gaieski DF, Goyal M, Gunnerson KJ et al. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock revisited: concepts, controversies, and contemporary findings. *Chest* 2006; 130(5):1579-1595.
- (6) Perel A. Bench-to-bedside review: the initial hemodynamic resuscitation of the septic patient according to Surviving Sepsis Campaign guidelines--does one size fit all? *Crit Care* 2008; 12(5):223.
- (7) Ho BC, Bellomo R, McGain F, Jones D, Naka T, Wan L et al. The incidence and outcome of septic shock patients in the absence of early-goal directed therapy. *Crit Care* 2006; 10(3):R80.
- (8) Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30(4):536-555.
- (9) Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008; 36(1):296-327.
- (10) Micek ST, Roubinian N, Heuring T, Bode M, Williams J, Harrison C et al. Before-after study of a standardized hospital order set for the management of septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34(11):2707-2713.
- (11) Trzeciak S, Dellinger RP, Abate NL, Cowan RM, Stauss M, Kilgannon JH et al. Translating research to clinical practice: a 1-year experience with implementing early goal-directed therapy for septic shock in the emergency department. *Chest* 2006; 129(2):225-232.
- (12) Jones AE, Focht A, Horton JM, Kline JA. Prospective external validation of the clinical effectiveness of an emergency department-based early goal-directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock. *Chest* 2007; 132(2):425-432.
- (13) Puskarich MA, Marchick MR, Kline JA, Steuerwald MT, Jones AE. One year mortality of patients treated with an emergency department based early goal directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock: a before and after study. *Crit Care* 2009; 13(5):R167.

- (14) Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, Lahey D, Ngo L, Buras J et al. Implementation and outcomes of the Multiple Urgent Sepsis Therapies (MUST) protocol. *Crit Care Med* 2006; 34(4):1025-1032.
- (15) Kortgen A, Niederprum P, Bauer M. Implementation of an evidence-based "standard operating procedure" and outcome in septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34(4):943-949.
- (16) Girardis M, Rinaldi L, Donno L, Marietta M, Codeluppi M, Marchegiano P et al. Effects on management and outcome of severe sepsis and septic shock patients admitted to the intensive care unit after implementation of a sepsis program: a pilot study. *Crit Care* 2009; 13(5):R143.
- (17) Funk D, Sebat F, Kumar A. A systems approach to the early recognition and rapid administration of best practice therapy in sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(4):301-307.
- (18) Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008; 83(3):471-482.
- (19) Shorr AF, Nelson DR, Wyncoll DL, Reinhart K, Brunkhorst F, Vail GM et al. Protein C: a potential biomarker in severe sepsis and a possible tool for monitoring treatment with drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2008; 12(2):R45.
- (20) Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007; 11(2):R49.
- (21) Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM et al. A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(1):96-104.
- (22) Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, Muschik GM, Veenstra TD. Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J Sep Sci* 2009; 32(13):2183-2199.
- (23) Wishart DS. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5(12):2814-2820.
- (24) Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318(12):727-732.
- (25) Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 2009; 13(2):210.
- (26) Imahara SD, O'Keefe GE. Genetic determinants of the inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10(5):318-324.
- (27) Tsantes AE, Tsangaris I, Bonovas S, Kopterides P, Rapti E, Dimopoulou I et al. The effect of four hemostatic gene polymorphisms on the outcome of septic critically ill patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21(2):175-181.
- (28) Surbatovic M, Grujic K, Cikota B, Jevtic M, Filipovic N, Romcic P et al. Polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cluster of differentiation-14 and interleukin-1ra in critically ill patients. *J Crit Care* 2010; 25(3):542-548.

- (29) Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, Hamann L, Mouktaroudi M, Oh DY et al. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 2010; 14(3):R103.
- (30) Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010; 14(5):R182.
- (31) Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP et al. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 2005; 23(6):488-493.
- (32) Garcia-Segarra G, Espinosa G, Tassies D, Oriola J, Aibar J, Bove A et al. Increased mortality in septic shock with the 4G/4G genotype of plasminogen activator inhibitor 1 in patients of white descent. *Intensive Care Med* 2007; 33(8):1354-1362.