

SEPSIS: BASES MOLECULARES ACTUALES

SEPSIS: NEW MOLECULAR BASIS

Roberto A. Ferro Valdés* y Francisco A. Medina Mosley†

* Estudiante de IX semestre; † Estudiante de X semestre; de la carrera de doctor en medicina. Universidad de Panamá.

Asesor: Dr. Rigoberto Samaniego

Infectólogo del Hospital Santo Tomás.

RESUMEN

Por consenso, sepsis se define como la combinación de infección patológica y cambios fisiológicos conocidos colectivamente como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad se están comenzando a comprender mejor, y a partir de ellos se están desarrollando mejores formas para el diagnóstico y tratamiento.

En la siguiente revisión se expondrán los conceptos nuevos de esta patología que fundamentalmente se trata en las unidades de cuidados intensivos, pero que involucra todas las especialidades médicas desde neonatología hasta urología.

Palabras clave. sepsis, shock séptico, proteína C activada, apoptosis.

ABSTRACT

By consensus, sepsis is defined as the combination of pathological infection and physiological changes known collectively as systemic inflammatory response syndrome.

The physiopathologic mechanisms of this illness are beginning to be understood in a better manner, resulting in improved ways for diagnosis and treatment.

In the following review, we will examine new concepts of this pathology that, for the most part, gets treated in Intensive Care unit, but involves all medical specialties from Neonatology to Urology.

Key words. sepsis, septic shock, activated C protein, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Por consenso, sepsis se define como la combinación de infección patológica y cambios fisiológicos conocidos colectivamente como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.¹

Sepsis es una entidad letal, con una mortalidad entre 20 y 50 %.² Es la décima causa de muerte en Estados Unidos.³ Martien et al⁴ en un estudio multicéntrico de más de 750 millones de hospitalizaciones en Estados Unidos reportó 10 319 418 casos de sepsis de 1979 al 2000 y un aumento de los mismos de 164 000 en 1979 a 660 000 casos en el 2000 (240,4 por 100 000 habitantes), lo cual indica un aumento considerable de esta patología. Razones posibles por las cuales se ha evidenciado este aumento en la incidencia incluyen: el envejecimiento de la población, el aumento de la longevidad en pacientes con enfermedades crónicas, el aumento de procedimientos invasivos, las drogas inmunosupresoras, la quimioterapia, los trasplantes, la infección por VIH y el aumento de la resistencia antimicrobiana.⁵ Una evidencia de la influencia de estos factores es el hecho que el

59 % de los gérmenes aislados en pacientes sépticos son nosocomiales.⁶

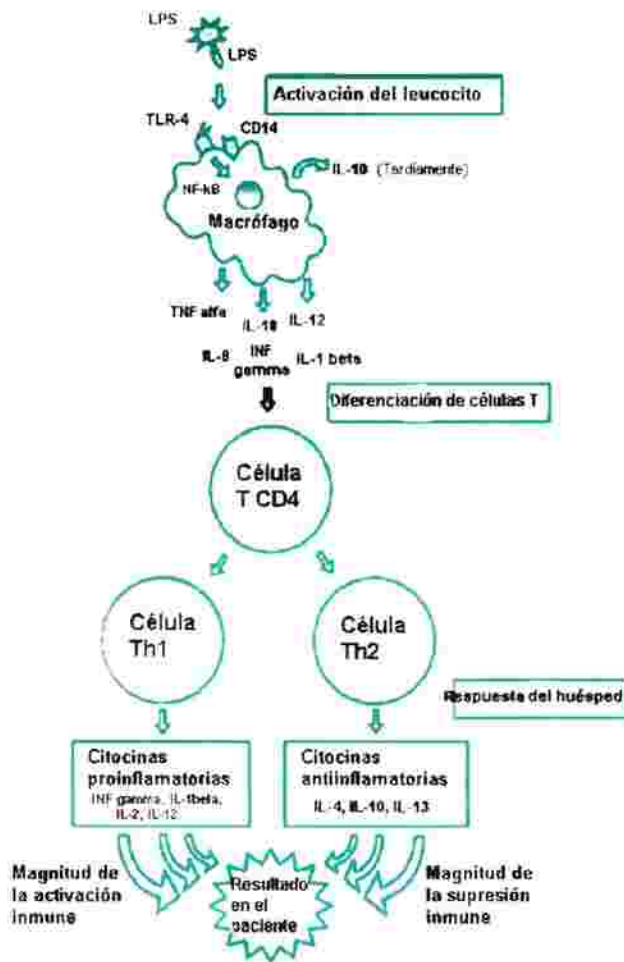
FISIOPATOLOGÍA

Originalmente, Thomas en 1972 popularizó la noción que la sepsis representa una respuesta inflamatoria no controlada⁷ y muchos otros secundaron esta teoría.^{1,8} Numerosos conflictos surgieron con esta teoría ya que al bloquear la cascada inflamatoria no disminuían las muertes por sepsis en modelos animales sino que aumentaban, con lo cual esta teoría se ponía en jaque.^{2,5}

Finalmente esta teoría se refutó tras varios hallazgos muy interesantes:

- En investigaciones en ratones^{9,10} y humanos,¹¹ se identificaron mutaciones del *toll like receptors*, los receptores que reconocen la endotoxina de los gram negativos, estos sujetos tenían un aumento en la mortalidad por sepsis pese a la resistencia a la endotoxina y a la baja respuesta inflamatoria del individuo; por lo tanto, la respuesta endógena no era la causante de la enfermedad (figura 1).

Figura 1. Esquema simplificado del inicio de la respuesta del huésped al LPS.



Fuente: Carrigan, S., Scott, G., Tabrizian, M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 1303.

- En investigaciones realizadas por Lederer y cols.¹² y Oberholzer y cols.¹³ descubrieron que a medida que la sepsis persiste se evidencia un cambio en los mediadores inflamatorios: primero los linfocitos Th1 secretan mediadores proinflamatorios y luego, a medida que la sepsis persiste, los linfocitos Th2 secretan mediadores antiinflamatorios (figura 2).

Se han propuesto varios mecanismos que explican esta supresión o cambio en el perfil de los mediadores inflamatorios,¹⁴⁻¹⁶ pero la teoría más aceptada en la actualidad involucra a la apoptosis o muerte celular programada.¹⁷ En varios estudios por Hotchkiss et al¹⁸⁻²⁰ en autopsias de pacientes fallecidos con sepsis, se encontraron grandes

Figura 2. Esquema que demuestra los cambios de la respuesta inmune durante el curso de la sepsis. Diferencias en la respuesta inflamatoria en el tiempo indicando el cambio del perfil inflamatorio a medida que progresa la respuesta inmune del huésped séptico.



Fuente: Carrigan, S., Scott, G., Tabrizian, M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chemistry* 2004; 50:1309.

cantidades de linfocitos T CD4⁺, linfocitos B, células dendríticas y células epiteliales apoptóticas, probablemente causado por la liberación endógena de glucocorticoides, pero esto todavía no está claro.²¹ Lo que ya está comprobado es que en la apoptosis se expresan mayormente citocinas antiinflamatorias ya que las células apoptóticas expresan fosfatidilserina en las capas externas de sus membranas plasmáticas. Esta se desliza desde las capas internas o también se puede expresar una glucoproteína adhesiva, la trombospondina y estas alteraciones permiten el reconocimiento precoz de las células muertas por los macrófagos y las células adyacentes, de manera que se produce la fagocitosis sin liberación de componentes celulares proinflamatorios.²² Y la importancia de la depleción quedó demostrada en varios estudios en animales en los cuales la prevención de la apoptosis linfocitaria aumentó la sobrevivencia.²³⁻²⁶

DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA

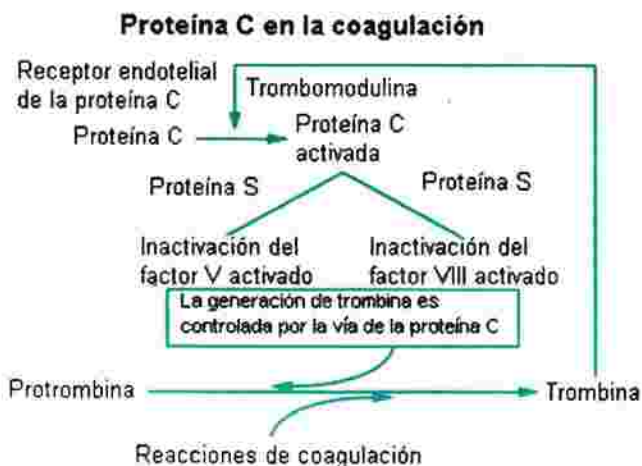
A pesar que la apoptosis de células del sistema inmune explica la persistencia de la enfermedad, el cómo las fuerzas pro y antiinflamatorias contribuyen a la hipotensión y a la disfunción de órganos distantes al sitio de infección no se conoce con precisión pero hay varias teorías al respecto:

1. Daño al endotelio vascular:²⁷ la mayoría de los investigadores apoyan esta teoría como el mecanismo responsable de la disfunción multiorgánica, ya que mediadores derivados de leucocitos, trombos de plaquetas-leucocitos-fibrina y células endoteliales, ante estímulos como el FNTalfa, las células endoteliales producen y liberan citocinas, moléculas pro-coagulantes, factor activador de plaquetas (PAF), óxido nítrico y otros mediadores que promueven en su conjunto el aumento de la permeabilidad vascular, la formación de trombos microvasculares, coagulación intravascular diseminada e hipotensión.²⁸ La hipoperfusión es el resultado final, lo cual clínicamente en la oligoemia y la necrosis tubular aguda,²⁹ cambios en el estatus mental por la isquemia neuronal,³⁰ disminución del gasto cardíaco³¹ por mencionar algunas.

Vale la pena ampliar dentro de esta teoría del daño al endotelio a la proteína C activada (PCA), de ella podemos mencionar lo siguiente: primero, la mayoría de los pacientes con sepsis severa tienen niveles disminuidos de PCA, en parte debido a que las citoquinas inflamatorias generadas en la sepsis regulan hacia abajo la trombomodulina y el receptor de la célula endotelial de la proteína C, componentes del sistema de coagulación que son necesarios para la conversión de la proteína C inactiva a PCA. Segundo, la PCA inhibe el factor activado V y VIII, por lo tanto al estar la proteína C disminuida la formación de trombina no se regula y se forma en exceso. Finalmente, la PCA estimula la fibrinólisis reduciendo la concentración del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1^{32,33} (Figura 3).

2. Hibernación celular: Hotchkiss,³⁴ un renombrado experto en sepsis, especula que la disfunción multiorgánica en pacientes con sepsis se puede explicar por un "cell stunning" como ocurre durante la isquemia miocárdica.³⁵ Presumiblemente, la sepsis activa mecanismos de defensa que causan que los procesos celulares se reduzcan al máximo, en lo que él describe como roles de "housekeeping". Una posible base molecular de este "cell stunning"

Figura 3. Control normal de la coagulación.



Fuente: Seligsohn U, Lubetsky A. Medical Progress: Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis. N Engl J Med 2001;344:1222.

podría involucrar el consumo de oxígeno, como demostraron Khan et al. en un experimento en enterocitos donde la depleción de NADPH secundario a la activación de la enzima nuclear poliadenosina difosfato (ADP)-polimerasa de ribosa por peroxinitrito u otros oxidantes producía disminución de ATP secundario a lo que llamaron hipoxia citopática.³⁶

3. Apoptosis celular: esta teoría de reciente advenimiento sugiere que es la apoptosis de células parenquimatosas la responsable de la disfunción multiorgánica. Por ahora, se ha logrado evidenciar esta apoptosis en el corazón, donde se han encontrado miocitos apoptóticos. Esta teoría todavía cuenta con relativamente poca evidencia y es más que todo especulativa por lo cual se están realizando numerosas investigaciones en este campo.³⁷

DIAGNÓSTICO

Las organizaciones Society of Critical Care Medicine, European Society of Intensive Care Medicine, American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Surgical Infection Society se reunieron en el año 2001 debido a que una encuesta reveló que el 71% de los médicos encuestados consideraban que la definición existente de sepsis era insuficiente. Además de los criterios previos, en esta reunión se agregaron varios criterios diagnósticos para la sepsis.³⁸

La recomendación principal del grupo fue la implementación del sistema de estadiaje PIRO (Predisposición, Infección, Respuesta y disfunción Orgánica) para determinar el tratamiento óptimo para cada paciente, estratificando sus síntomas y factores de riesgo. El sistema PIRO es un sistema de clasificación conceptual para sepsis severa originalmente descrito por John Marshall. Esta idea surgió al reconocer que la sepsis es una condición heterogénea y que puede ser posible describirla basándose en cuatro características de la misma forma en que se describe el cáncer con el sistema TNM³⁹ (figura 4). Este sistema permite el estudio

Figura 4. Sistema de clasificación PIRO.



de poblaciones más homogéneas en términos de pronóstico y la probabilidad de respuesta al tratamiento. Actualmente el sistema PIRO es un marco de referencia para investigaciones posteriores, más que un sistema con aplicación clínica inmediata, debido a que se requiere mucho trabajo para caracterizar aquellos factores en cada grupo que afectan el pronóstico y la posible respuesta al tratamiento,⁴⁰ además falla al no referirse a la importancia del diagnóstico temprano.⁴¹

En la actualidad, los sistemas de clasificación tienen como objetivo ayudar a hacer el diagnóstico clínico en ausencia de un cultivo positivo. El diagnóstico tradicional de sepsis incluye técnicas de cultivo y sistemas de clasificación de los síntomas. Un cultivo positivo de la sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o secreciones bronquiales representa el método más certero de diagnóstico. Desafortunadamente,

los síntomas clínicos frecuentemente se manifiestan en ausencia de un cultivo positivo, en muchos estudios podemos evidenciar esto: cultivos positivos en neonatos fueron de 8 % a 73 %⁴²⁻⁵⁰ y en adultos fueron de 8 % a 88 %.⁵¹⁻⁶⁰ Sistemas como el *Acute Physiology Age and Chronic Health Examination* (APACHE) y el *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS) representan intentos para estratificar pacientes de acuerdo a varios índices fisiológicos.⁶¹

La búsqueda de un biomarcador es de suma importancia para realizar un diagnóstico temprano. Entre estos biomarcadores tenemos:

- El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa): se considera el factor inicial de la activación de la respuesta del huésped y de la subsecuente liberación de citoquinas durante la infección. Sin embargo, existen dificultades para utilizar el TNF-alfa para el diagnóstico de sepsis, a pesar que esta citocina juega un papel central en la respuesta inflamatoria, ya que tiene una concentración a corto plazo en respuesta al patógeno, su vida media es corta (17 minutos) y las concentraciones excesivas de receptores solubles p55 (sTNF-RI) y p75 (sTNF-RII) durante la sepsis hacen su concentración cambie rápidamente.⁶²
- Algunas secuencias de ADN específicas: estudios genéticos del genoma bacteriano indican que algunas secuencias podrían servir como método diagnóstico, pero todavía la evidencia no es concluyente.⁶³⁻⁶⁵

Sin embargo, la identificación del patógeno basada en cultivo se mantiene como parte esencial del diagnóstico, lo cual permite verificar la eficacia del tratamiento antimicrobiano. Los sistemas de cultivo automatizados detectan el crecimiento de bacterias basándose en el pH de la solución o en la presencia de CO₂, con un tiempo de detección de 11 a 31 horas y un porcentaje de falsos positivos y falsos negativos de 2 % a 3 %.^{66,67}

La necesidad de mejorar las medidas de diagnóstico de la infección y monitorización del estado inmune se refleja cuando consideramos la tasa de tratamiento antimicrobiano inadecuado (23 a 30 %) evidenciado en estudios de autopsias, los cuales han confirmado que la falla en diagnosticar y

proveer intervención antimicrobiana es el error evitable más común relacionado con la mortalidad de la sepsis.^{34,68,69}

Los sitios primarios de infección reportados son: tracto respiratorio (40-44 % de los casos), sistema genitourinario (9-18 % de los casos) e infecciones intraabdominales (9-14 % de los casos).^{6,70}

TRATAMIENTO

Algunos abordajes parecen ser prometedores para la prevención o el tratamiento de la sepsis y el shock séptico. Estos incluyen un control estricto de la glicemia, una terapia hemodinámica temprana, la infusión de PCA y el uso de corticosteroides.³⁴ La corrección de la hiperglicemia y la prevención de la apoptosis quizás sean responsables de los efectos terapéuticos más importantes en la sepsis.⁴¹

En un estudio realizado por Bernard y cols.,⁷¹ la administración de PCA estuvo asociada con la reducción de los niveles de dímero D en el plasma, evidencia que los efectos procoagulantes de la sepsis disminuyeron con esta terapia. También hubo una reducción en los niveles séricos de interleucina 6, indicando que el tratamiento atenúa la cascada inflamatoria. Estos resultados concuerdan con la evidencia que la PCA reduce la producción de TNF-alfa de los monocitos inhibiendo la unión de la endotoxina y el CD14, sin afectar las propiedades antimicrobianas de los monocitos. Más aún, la PCA reduce la interacción entre los neutrófilos y las células endoteliales y disminuye la isquemia de los tejidos, en parte reduciendo la expresión endotelial de E-selectina. Estos mecanismos pueden dar como resultado los efectos combinados anticoagulantes y antiinflamatorios de esta droga. En este estudio, involucrando pacientes adultos con sepsis severa, mostró una reducción de 19,4 % del riesgo relativo de muerte de cualquier causa y una reducción absoluta de 6,1 % a los 28 días en los pacientes tratados con drotrecogin alfa (activada) (DrotAA). En base a análisis de los subgrupos, las agencias reguladoras aprobaron el uso de DrotAA para pacientes con alto riesgo de muerte (definido como un APACHE mayor o igual a 25 o falla multiorgánica), como población en la cual el riesgo beneficio parece más favorable. En un estudio reciente se encontró que pacientes con

APACHE menor de 25 no se beneficiaban de la terapia con PCA, sino que eran más propensos a tener eventos hemorrágicos.^{71,72}

En cuanto al uso de corticoesteroides actualmente hay mucha controversia entre los expertos, pero podemos mencionar lo siguiente: por un lado las elevadas concentraciones de glucocorticoides suprimen la respuesta inmune aumentada y no regulada por medio de varios mecanismos, y regulación hacia arriba de la función adrenorreceptora.^{73,74} Sin embargo, las secuelas adversas están bien descritas, algunas de las que hay que tener en cuenta son el desarrollo de infecciones nosocomiales, la reactivación de una infección latente, hiperglicemia y psicosis.⁷⁵

Vale la pena mencionar un estudio francés muy influyente que demostró una disminución de la mortalidad del 11% con el uso de hidrocortisona y fludrocortisona en pacientes con shock séptico, luego que otros estudios similares no habían reportado dichos beneficios.^{76,77} Pero en este estudio se utiliza el agente anestésico etomidato, esta droga es un potente inhibidor de la esteroidogénesis adrenal inhibiendo la 11B-hidroxilasa. Los investigadores se dieron cuenta de esto tarde, ya que a mitad del estudio cambiaron los criterios de inclusión con respecto a esta droga para evitar sus efectos, pero ya era muy tarde.⁷⁸

Por lo tanto, se concluye que el uso de hidrocortisol a dosis bajas, sólo está indicado en insuficiencia adrenal relativa o franca (enfermedad de Addison) y cuando se utilice etomidato o anestésicos de perfil similar.⁷⁹⁻⁸¹

La diálisis mejora la sobrevida de pacientes con sepsis que tienen insuficiencia renal establecida. Sin embargo, no se ha demostrado que la diálisis, plasmaféresis o intercambio de plasma mejore los resultados en pacientes con sepsis que no desarrollan falla renal aguda.⁸²

Estudios controlados aleatorizados de purificación sanguínea en pacientes críticamente enfermos con sepsis o disfunción multiorgánica han mostrado que mejora los resultados clínicos y hemodinámicos y la restauración de la respuesta monocítica. El uso de absorbentes para mejorar la remoción de endotoxinas y citoquinas todavía está bajo evaluación.⁴¹

Los tratamientos enfocados en la supresión de la respuesta inflamatoria, incluyendo la administración de anticuerpos de TNF-alfa, el receptor soluble de TNF, el factor estimulante de colonias de granulocitos y la IL-1, han fallado en proveer reducciones sustanciales en la mortalidad.⁸³⁻⁸⁵

Van den Berghe y cols. demostró que la terapia intensiva con insulina que mantiene la glicemia entre 80 y 110 mg/dL produce una disminución de la morbilidad y mortalidad en pacientes críticamente enfermos, en comparación con aquellos que mantuvieron su nivel de glucosa entre 180 y 200 mg/dL durante su tratamiento. La terapia con insulina reduce la tasa de mortalidad a causa de falla multiorgánica en pacientes con sepsis, independientemente de que tengan historia de diabetes.^{86,87}

Se desconoce el mecanismo protector de la insulina en la sepsis. La función fagocítica de los neutrófilos está alterada en pacientes con hiperglicemia, y la corrección de la hiperglicemia quizás mejore la fagocitosis bacteriana. Otro mecanismo potencial involucra el efecto antiapoptótico de la insulina.⁸⁸ La insulina parece prevenir la apoptosis celular activando la vía del fosfatidilinositol 3-kinasa-Akt.⁸⁹

Antibióticos en sepsis.⁹⁰ La terapia depende del foco infeccioso y del microorganismo aislado, pero en términos generales podemos mencionar que los carbapenems (imipenem o meropenem) son los de primera elección. Como alternativa se puede utilizar un aminoglucósido antipseudomona junto con uno de los siguientes: cefalosporina de tercera o cuarta generación, piperacilina/tazobactam o ticarcilina/clavulanato. Si se sospecha infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, agregar vancomicina. Si se sospecha de resistencia a la vancomicina, agregar linezolid.

CONCLUSIÓN

La sepsis constituye un reto para todos los médicos que la tratan pero poco a poco estamos entendiendo ésta compleja entidad.

Avances clínicos en el tratamiento de sepsis incluyen a la PCA y terapia intensiva con insulina. La terapia en el futuro puede estar dirigida a mejorar o inhibir la respuesta inmune del huésped.

Finalmente, los trabajos revisados reflejan los prometedores avances en el cuidado de pacientes con sepsis, que poco a poco harán disminuir su mortalidad.

AGRADECIMIENTOS

El mayor sentimiento de gratitud a nuestro asesor el Dr. Rigoberto Samaniego, así como también al Dr. Xavier Saez Llorenz, al Dr. Francisco Lagrutta y a la Dra. Amalia Rodríguez por su desinteresada colaboración.

REFERENCIAS

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992;101:1644-55.
2. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. N Engl J Med 1999;340:207-14.
3. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: final data for 1999. National vital statistics reports. Vol. 49. No. 8. Hyattsville, Md.: National Center for Health Statistics, 2001.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.
5. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Intern Med 1990;113:227-42.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29:1303-10.
7. Thomas L. Germs. N Engl J Med 1972;287:553-5.
8. Stone R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. Science 1994;264:365-7.
9. Hagberg L, Briles DE, Eden CS. Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to gram-negative infections. J Immunol 1985;134:4118-22.
10. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. J Immunol 1999;162:4148-56.
11. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 2000;25:187-91.
12. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. Shock 1999;11:153-9.
13. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. Shock 2001;16:83-96.
14. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, et al. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. Am J Surg 1999;178:288-92.
15. Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C. Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. J Surg Res 2000;88:200-6.
16. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. Shock 1996;5:79-90.

17. Haslett C, Savill J. Why is apoptosis important to clinicians? *BMJ* 2001;322:1499-500.
18. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-51.
19. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg Jr RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952-63.
20. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168:2493-500.
21. Fukuzuka K, Edwards CK III, Clare-Saltier M, Copeland EM III, Moldawer LL, Mazingo DW. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:1005-18.
22. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:491-5.
23. Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, Minter RM, Tannahill CL, Abouhamze A, et al. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11503-8.
24. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000;1:496-501.
25. Weaver JGR, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD. Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. *FASEB J* 2004;18:1185-91.
26. Bommhardt U, Chang KC, Swanson PE, Wagner TH, Tinsley KW, Karl IE, et al. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 2004;172:7583-91.
27. Munford RS. Severe sepsis and septic shock. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th edition Vol II. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc;2005:1606-12.
28. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:98-104.
29. Sayeed MM. Intestinal epithelial regenerative capacity: an "Achilles heel" in trauma/burn/sepsis injuries? *Crit Care Med* 2003;31:1864-6.
30. Wilson, JX, Young GB. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci* 2003;20:98-105.
31. Fowler DE, Wang P. The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and its binding protein. *Int J Mol Med* 2002;9:443-9.
32. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;1:17-25.
33. Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest* 2003;124:26-32.
34. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
35. Sawyer DB, Loscalzo J. Myocardial hibernation: restorative or preterminal sleep? *Circulation* 2002;105:1517-9.
36. Khan AU, Delure RL, Han YY, Sappington PL, Han X, Carcillo JA, et al. Liposomal NAD(+) prevents diminished O(2) consumption by immunostimulated Caco-2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:1082-91.
37. Lancel S, Joulin O, Favory R. Ventricular Myocyte Caspases Are Directly Responsible for Endotoxin-Induced Cardiac Dysfunction. *Circulation* 2005;111:2596-604.
38. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250-6.
39. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada. October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003;31:1560-7.
40. Gomersall, Charles. "PIRO". Department of Anaesthesia and Intensive Care. 29 Jun. 2005. University of Hong Kong. 15 Sept. 2005 <http://www.aic.cuhk.edu.hk/web8/piro.htm>.
41. Carrigan, S, Scott, G, Tabrizian, M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chemistry* 2004;50:1301-14.
42. Blanco A, Solis G, Arranz E, Coto GD, Ramos A, Tellería J. Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Paediatr* 1996; 85:728-732.
43. Blommendahl J, Janas M, Laine S, Miettinen A, Ashorn P. Comparison of procalcitonin with CRP and differential white blood cell count for diagnosis of culture-proven neonatal sepsis. *Scand J Infect Dis* 2002;34:620-2.
44. Bonac B, Derganc M, Wraber B, Hojker S. Interleukin-8 and procalcitonin in early diagnosis of early severe bacterial infection in critically ill neonates. *Pfugers Arch* 2000; 440:72-4.
45. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-Reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem* 2003;49:60-8.
46. De Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, et al. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr* 1994;83:696-9.
47. Doellner H, Arntzen KJ, Haereld PE, Aag S, Austgulen R. Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr* 1998; 132:295-9.
48. Nupponen I, Andersson S, Jarvenpaa AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expressions and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics* 2001;108:12.
49. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 2001;160:345-50.
50. Silveira RC, Prodanov RS. Evaluation of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 1999;88:647-50.
51. Balci C, Sungurtekin H, Gurses E, Sungurtekin U, Kaptanoglu B. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit Care* 2003;7:85-90.
52. Blairon L, Wittebole X, Laterre PF. Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J Infect Dis* 2003;187:287-91.
53. Casado-Flores J, Blanco-Quiros A, Asensio J, Arranz E, Garrote JA, Nieto M. Serum procalcitonin in children with suspected sepsis: a comparison with C-reactive protein and neutrophil count. *Pediatr Crit Care Med* 2003;4:190-5.
54. Cummings CJ, Sessler CN, Beall LD, Fisher BJ, Best AM, Fowler AA III. Soluble E-selectin levels in sepsis and critical illness. Correlation with infection and hemodynamic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:431-7.
55. Han YY, Doughty LA, Kofos D, Sasser H, Carcillo JA. Procalcitonin is persistently increased among children with poor outcome from bacterial sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2003;4:21-5.
56. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. 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.
57. Muller B, Becker KL, Schachinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, et al. Calcitonin precursors are reliable markers

- of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000;28:977-83.
58. Ruokonen E, Ilkka L, Niskanen M, Takala J. Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:398-404.
 59. Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le Tulz Y, Lavoue S, Feuilli A, et al. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU? *Intensive Care Med* 2000;26:1232-8.
 60. Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, Goldie AS, Ross JA, Grant IS, et al. Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. *Br J Surg* 1998;85:818-25.
 61. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-29.
 62. Opal S. Tumor necrosis factor receptor expression on inflammatory cells in sepsis. *Critical Care Medicine* 1999;27:240-1.
 63. Ashok K, Yadav C, Wilson G, Prasad PL, Menon PK. Polymerase Chain Reaction in Rapid Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Indian Pediatr* 2005;42:681-5.
 64. Jordan JA, Durso MB. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. *Mol Diagn* 2005;7:575-81.
 65. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the mec A and van genes from positive-testing blood cultures. *J Clin Microbiol* 2005;43:5256-62.
 66. Spanjaard L, Kuijper EJ, Dankert J. Clinical comparison of two commercial blood culture systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:881-5.
 67. Wilson ML, Mirrett S, McDonald LC, Weinstein MP, Fune J, Reller LB. Controlled clinical comparison of bioMérieux VITAL and BACTEC NR-660 blood culture systems for detection of bacteremia and fungemia in adults. *J Clin Microbiol* 1999;37:1709-13.
 68. Mort T, Yeston NS. The relationship of pre mortem diagnoses and post mortem findings in a surgical intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27:299-303.
 69. Blosser SA, Zimmerman HE, Stauffer JL. Do autopsies of critically ill patients reveal important findings that were clinically undetected? *Crit Care Med* 1998;26:1332-6.
 70. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 2003;115:529-35.
 71. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
 72. Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, et al. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med* 2005;353:1332-41.
 73. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, et al. Immunologic and hemodynamic effects of low-dose hydrocortisone in septic shock. A double-blind, randomized placebo-controlled crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:512-20.
 74. Annane D. Corticosteroids for septic shock. *Crit Care med* 2001;29:117-20.
 75. McCombs CC, de Shazo RD. Immune system disorders. In: Speight TM, Holford NHG, eds. *Drug Treatment*, 4th Edn. Chester: Adis International Ltd, 1997;1304.
 76. Lefering R, Neugebauer EAM. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. *Crit Care Med* 1995;23:1430-9.
 77. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, et al. Corticosteroids treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995;23:1430-9.
 78. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862-71.
 79. Annane D. Glucocorticoids in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:449-53.
 80. D Keh, S Goodman, CL Sprung. Corticosteroid therapy in patients with severe sepsis and septic shock. *Semin Respir Crit Care Med* 2004;25:713-9.
 81. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003;348:727-34.
 82. De Vriese A. Prevention and Treatment of Acute Renal Failure in Sepsis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:792-805.
 83. Opal SM, Cross AS, Jhung JW, Young LD, Palardy JE, Parejo NA, et al. Potential hazards of combination immunotherapy in the treatment of experimental septic shock. *J Infect Dis* 1996;173:1415-21.
 84. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001;29:121-5.
 85. Eichacker PQ, Parent C, Kail A, Esposito C, Cui X, Banks SM, et al. Risk and the efficacy of anti-inflammatory agents. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1197-205.
 86. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345:1359-67.
 87. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, F Weekers, C Verwaest, M Schetz, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003;31:359-66.
 88. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, López BL, Christopher TA, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002;105:1497-502.
 89. Siegel JP. Assessing the use of activated protein C in the treatment of severe sepsis. *N Engl J Med* 2002;347:1030-4.
 90. Gilbert D, Moellering R, Eliopoulos G, Sande M. *The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy*. 13th edition. Antimicrobial Therapy, Inc. 2004:41.