

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

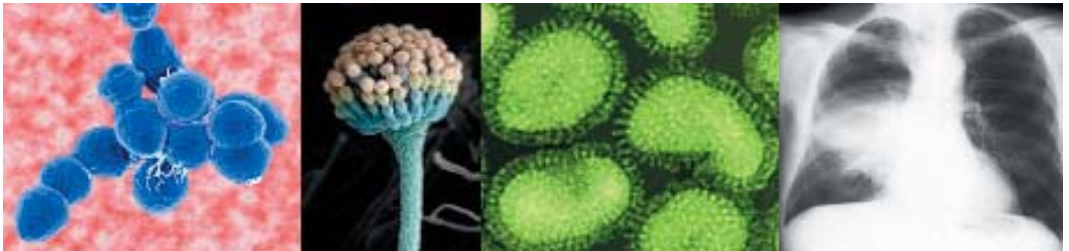
Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Medicina



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**IMPORTÀNCIA DIAGNÒSTICA I PRONÒSTICA DELS
MARCADORS D'INFLAMACIÓ EN PATOLOGIA INFECCIOSA.
NOVES MOLÈCULES ANTIINFLAMATÒRIES BACTERIANES.**



Cristina Prat i Aymerich
2006

Està prohibida la reproducció total o parcial del llibre per qualsevol medi: fotogràfic, fotocòpia, mecànic, reprogràfic, òptic, magnètic o electrònic, sense l'autorització expressa i per escrit dels propietaris del copyright.

Primera edició: Octubre de 2006

© Cristina Prat i Aymerich
© Universitat Autònoma de Barcelona

Diseny y compaginació: Oriol Arnal (oriol@aquamaris.org)

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Medicina

**IMPORTÀNCIA DIAGNÒSTICA I PRONÒSTICA DELS
MARCADORS D'INFLAMACIÓ EN PATOLOGIA INFECCIOSA.
NOVES MOLÈCULES ANTIINFLAMATÒRIES BACTERIANES.**

Memòria presentada per
Cristina Prat i Aymerich per optar
al grau de Doctora en Medicina
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Vist-i-plau del director de la tesi

Dr. Vicenç Ausina Ruiz
Badalona, setembre del 2006

Als meus pares

Només amb dubtes t'aproparàs al ritme de les certeses.
Miquel Martí i Pol

*Els principis de desenvolupament d'una ment plena: estudia la ciència de l'art.
Estudia l'art de la ciència. Desenvolupa els teus sentits –aprèn sobretot a veure-.
Adona't que tot està connectat a tot.*
Leonardo da Vinci

*Es que todo es muy raro, en cuanto te fijas un poco. Lo raro es vivir. Que estemos
aquí sentados, que hablemos y se nos oiga, poner una frase detrás de otra sin mirar
ningún libro, que no nos duela nada, que lo que bebemos entre por el camino que es
y sepa cuándo tiene que torcer, que nos alimente el aire y a otros ya no, que según el
antojo de las vísceras nos den ganas de hacer una cosa o la contraria y que de esas
ganas dependa a lo mejor el destino, es mucho a la vez, tú, no se abarca, y lo más
raro es que lo encontramos normal.*
Carmen Martín Gaité

*Of science and the human heart
There is no limit
There is no failure here sweetheart
Just when you quit
U2. Miracle Drug*

SUMARI

RESUM	i
ABREVIATURES	vii
ARTICLES GENERATS PER AQUESTA TESI	ix
1. INTRODUCCIÓ	13
1.1. Patogènia de la infecció	13
1.1.1. Components dels microorganismes inductors de resposta inflamatòria	13
1.1.2. Mecanismes de defensa de l'hostatger	15
1.1.2.1. Barrera cutànio-mucosa	15
1.1.2.2. Immunitat innata	17
1.1.2.2.1. Reconeixement de patrons moleculars associats al patògen	17
1.1.2.2.2. Nivell humoral: Pèptids antimicrobians, complement, coagulació	20
1.1.2.2.3. Nivell cel·lular: Fagòcits (neutròfils, monòcits i macròfags)	24
1.1.2.3. Immunitat adquirida	26
1.2. Mitjancers d'inflamació	28
1.2.1. Molècules d'adhesió	29
1.2.2. Citocines	30
1.2.2.1. Citocines fonamentalment proinflamatòries	30
1.2.2.2. Citocines fonamentalment antiinflamatòries	33
1.2.3. Factors quimiotàctics	34
1.2.3.1. Quimiocines	34
1.2.4. Eicosanoids: prostaglandines, leucotriens, tromboxans, PAF	36
1.2.5. Òxid nítric i radicals lliures	37
1.2.6. Resposta de fase aguda	37
1.3. Diagnòstic de la infecció	39
1.3.1. Clínica	39
1.3.2. Eines diagnòstiques	42
1.3.3. Diagnòstic diferencial	43
1.3.4. Mesura de la resposta de fase aguda	43
1.3.4.1. Velocitat de sedimentació globular (VSG)	44
1.3.4.2. Proteïna C reactiva (CRP)	44

1.3.4.3.	Neopterina	45
1.3.4.4.	Procalcitonina (PCT)	45
1.3.4.5.	Lypopolysaccharide binding protein (LBP)	48
1.3.4.6.	Amiloide A del sèrum (SAA)	49
1.3.4.7.	Fosfolipasa A2	49
1.4.	Tractament	50
1.4.1.	Tractament etiològic: antibiòtics, pèptids antibiòtics, bacteriòfags	50
1.4.2.	Tractaments immunomoduladors	50
2.	JUSTIFICACIÓ	57
3.	OBJECTIUS	63
3.1.	Establir la utilitat dels marcadors d'inflamació en el diagnòstic de la sèpsia d'origen bacterià, tot diferenciant de les infeccions víriques i de la resposta inflamatòria d'origen no infeccios.	63
3.2.	Caracteritzar les propietats antiinflamatòries de dues molècules estafilocòcciques	63
4.	MATERIAL I MÈTODES	67
4.1.	Objectiu 1	67
4.2.	Objectiu 2	71
5.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	77
5.1.	Utilitat diagnòstica i pronòstica dels marcadors d'inflamació	77
5.1.1.	Diferències en funció de l'agent etiològic	77
5.1.2.	Diferències en funció de l'extensió anatòmica i la severitat	78
5.1.3.	Diferències segons edat	80
5.1.4.	Especificitat d'infecció	81
5.1.5.	Cinètica dels marcadors d'inflamació	82
5.1.6.	Comparació amb la mesura de citocines	83
5.1.7.	Tècniques de determinació	84
5.1.8.	Funció dels nous marcadors d'inflamació	84
5.1.8.1.	Receptors de mitjancers d'inflamació	84
5.1.8.2.	Funció mitjancers d'inflamació	85
5.2.	Nous mecanismes d'evasió de la resposta immunitària: molècules antiinflamatòries bacterianes	88
5.2.1.	Agonistes i antagonistes de pèptids formilats (FPR)	90
5.2.2.	Formyl peptide receptor-like inhibitory protein (FLIPr)	91
5.3.	Aportacions de la línia de recerca en inflamació	94

5.3.1. Utilitat de la mesura de marcadors d'inflamació	94
5.3.2. Noves possibilitats terapèutiques	95
6. CONCLUSIONS	101
6.1. Utilitat diagnòstica i pronòstica dels marcadors d'inflamació	101
6.2. Nous mecanismes d'evasió de la resposta immunitària: molècules antiinflamatòries bacterianes	102
7. BIBLIOGRAFIA	105
ANNEXES	124
AGRAÏMENTS	201

RESUM

La resposta inflamatòria consisteix en l'activació d'un seguit de mecanismes humorals i cel·lulars en resposta a un estímul, amb l'objectiu de limitar-ne els potencials efectes nocius. Quan l'estímul que desencadena la resposta inflamatòria és la presència d'un microorganisme viable als teixits, o bé els seus productes, els mecanismes de defensa de l'hostatger poden autolimitar-ne els efectes i confinar la infecció a un òrgan o fins i tot erradicar-la, o bé, si falla aquesta contenció, pot persistir i evolucionar donant lloc a l'alliberament de microorganismes, toxines i múltiples mitjancers al torrent circulatori, produint una resposta inflamatòria sistèmica i fallida orgànica. Els mecanismes varien en funció de factors depenents del microorganisme, i de factors depenents de l'hostatger. En tot el procés intervenen un seguit de mitjancers que s'interrelacionen entre sí en una complexa i orquestrada xarxa que dóna lloc a les diferents manifestacions clíniques.

La primera barrera defensiva enfront l'entrada de microorganismes la constitueix la integritat morfològica de les superfícies de pell i mucoses. Si aconsegueixen superar aquesta barrera, es troben amb els mecanismes de la immunitat innata¹. La resposta immunitària innata es caracteritza per actuar enfront qualsevol agent infeccios, sense dependre d'un contacte previ amb aquest, per la seva ràpida inducció o bé presència constant, i per l'absència de memòria immunològica. No es tracta d'una resposta inespecífica, donat que és capaç de reconèixer un seguit de components microbians mitjançant l'expressió de receptors codificats al genoma.

Aquests components són els anomenats patrons moleculars associats al patògen (PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*), estructures conservades en l'evolució i presents únicament als microorganismes i no al propi organisme, que inclouen molècules estructurals com el lipopolisacàrid, peptidoglicà, flagelina, lipopèptids, manans, glicans, RNA víric, etc. El sistema immunitari innat utilitza gran varietat de receptors de patrons moleculars, que poden expressar-se a la superfície cel·lular, en compartiments intracel·lulars o secretar-se al torrent circulatori o altres fluids orgànics, de manera que només es necessita un nombre limitat de receptors per reconèixer una gran varietat de microorganismes. Entre els receptors destaquen els no fa gaire temps descrits *toll-like receptors* (TLR)², el receptor CD14 i els receptors de pèptids formilats (FPR). Un cop reconeguts, els components microbians activen la via alternativa del complement, a més d'altres components humorals com els pèptids antimicrobians, la coagulació i el sistema calicreïna-cinina, i les cèl·lules fagocitàries (leucòcits polimorfonuclears i macròfags). La fixació a un receptor dóna lloc a l'activació de factors de transcripció com el *Nuclear Factor-kappaB* (NF-κB), fonamental per les respostes immunitària i inflamatòria, que s'uneix al DNA i actua com a promotor de múltiples gens de molècules implicades en la inflamació: citocines, quimiocines, proteïnes de fase aguda, molècules d'adhesió (selectines i integrines). Les vies de senyalització intracel·lular indueixen també la generació d'altres mitjancers com els radicals lliures (incloent òxid nítric) i els metabòlits de l'àcid araquidònic. Si els patògens superen la capacitat defensiva dels components humorals i els fagòcits, s'inicia una reacció coordinada i generalitzada però no específica anomenada resposta de fase aguda. Aquesta resposta implica una complexa xarxa de mitjancers amb activitats complementàries. La producció de citocines proinflamatòries tals com TNF-α i IL-1, es balanceja amb la producció de citocines antiinflamatòries tals com IL-4, IL-10 i IL-13. La

immunitat innata decideix seleccionar o no el desenvolupament de limfòcits efectors per iniciar la immunitat adaptativa.

Així, la principal distinció entre els sistemes immunitaris innat i adaptatiu resideix en els receptors i mecanismes utilitzats per al reconeixement. Els gens implicats en el reconeixement per la immunitat innata estan codificats al genoma i no requereixen del reordenament genètic essencial per la immunitat adquirida. El reconeixement de la immunitat adquirida té lloc mitjançant anticossos i receptors de cèl·lules T, amb memòria. El mecanisme de generació de receptors en el sistema immunitari adaptatiu requereix gran variabilitat i reordenament de segments genòmics³, donant lloc al reconeixement específic d'antígens foranis i memòria immunològica. El que la immunitat adquirida afegeix a la innata és reconeixement específic de detalls de l'estructura molecular: proteïnes, carbohidrats, lípids i àcids nucleics. El sistema innat instrueix a l'adquirit de la naturalesa del patògen mitjançant l'expressió de molècules coestimuladores tals com CD80 i CD86 a la superfície de cèl·lules presentadores d'antigen especialitzades, especialment les cèl·lules dendrítiques. Els gens de CD80 i CD86 són també regulats pel factor de transcripció NF- κ B.

La immunitat innata pretèn retardar la necessitat de l'adquirida en el temps que es triga en generar l'expansió clonal i diferenciació de limfòcits efectors, i alertar a la immunitat adquirida de l'atac per un microorganisme patògen. La immunitat innata controla l'expressió a la superfície cel·lular de molècules coestimuladores i indueix la secreció de citocines i quimiocines apropiades que dirigeixen els limfòcits efectors cap al lloc adequat. Els avantatges de tenir una immunitat adquirida són l'habilitat de recordar o adaptar-se a un agent infeccios, però aquesta memòria està confinada a un determinat individu. Excepte el pas transplacentari d'anticossos, no hi ha més pas de memòria d'una generació a la següent.

Si més no, molècules fonamentals en la resposta immunitària com les defensines o les citocines poden ser perjudicials si alliberades de forma excessiva a la circulació sistèmica; d'altra banda, nivells excessivament baixos d'aquestes molècules al lloc d'infecció poden donar lloc a insuficient aclariment dels microorganismes invasors. L'alteració de l'homeostasi entre aquests mitjancers dona lloc a les manifestacions del shock sèptic si la resposta inflamatòria és excessiva o desproporcionada (col·lapse vascular, dany tissular i disfunció multiorgànica) o bé dona lloc, si és insuficient, a una infecció greu. Aquestes manifestacions, com la síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS), tenen encara una elevada mortalitat, i cal que siguin detectades precoçment.

Disposar de marcadors que permetin mesurar el grau de resposta inflamatòria ha de permetre instaurar mesures terapèutiques més adequades a cada situació, fent especial èmfasi en el desenvolupament de tractaments immunomoduladors, que actuïn de forma complementària a l'administració d'agents antimicrobians i mesures de suport hemodinàmic i metabòlic.

El disseny d'estratègies que permetin prevenir la cascada de resposta als productes bacterians implica la identificació de les diverses molècules implicades en la fisiopatologia de la sèpsia i la seva monitorització per dissenyar fàrmacs que reverteixin els efectes

perjudicials dels mitjancers inflamatoris sense bloquejar els seus efectes beneficiosos en la lluita contra la infecció.

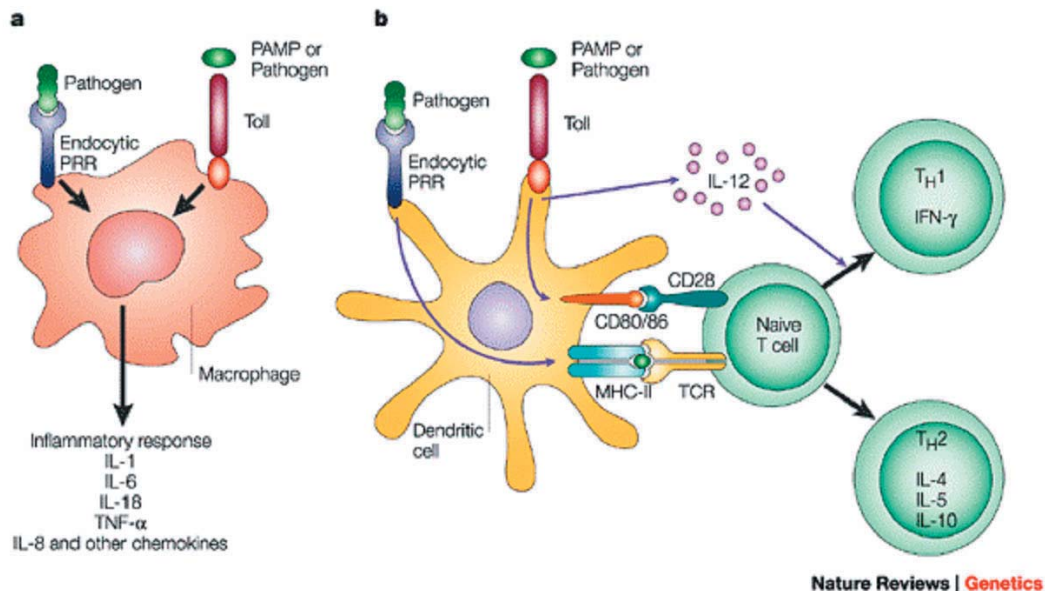


Figura 1. Immunitat innata i adaptativa. Els fagòcits (neutròfils i macròfags) fagociten els microorganismes, un cop reconeguts a través de receptors específics que reconeixen patrons moleculars associats al patògen (PAMPs), i secreten citocines i factors quimiotàctics que orquestran la resposta innata i adaptativa (figura 1.a). Les cèl·lules dendrítiques presenten els antigens als limfòcits mitjançant molècules co-estimuladores per tal d'iniciar la immunitat adaptativa (figura 1.b). De: Buer, J and Balling, R. Mice, Microbes and Models of Infection. Nature Reviews Genetics 2003;4:195-205

Els patrons de citocines i mitjancers alliberats poden ser diferents en funció de l'especificitat dels patògens i de les vies de reconeixement implicades i, per tant, les immunoteràpies també han de ser específiques en funció del patògen desencadenant. Els assajos clínics amb noves teràpies antiinflamatòries utilitzant agents anti-citocines proinflamatòries o bé citocines antiinflamatòries recombinants no han tingut en compte, en incloure els pacients en l'estudi, la mesura de marcadors d'inflamació tot i ser-ne les dianes. És important, a més, la seva administració durant el pic proinflamatori donat que la seva administració durant la fase compensatòria o antiinflamatòria pot alterar els mecanismes de defensa de l'hostatger.

Només una part dels canvis fisiopatològics que es produeixen durant l'anomenada "fase aguda" poden ser monitoritzats. Són paràmetres inespecífics, donat que poden elevar-se en resposta a qualsevol tipus d'estímul inflamatori: malalties autoimmunitàries, neoplàsies, situacions d'estrès tals com traumatismes, cremades, intervencions quirúrgiques, etc. En ocasions poden ser fins i tot detectables en individus sans. Tot i que actualment tenim a l'abast la mesura d'una gran varietat de marcadors de fase aguda en sèrum, és encara necessària una millor i més específica predicció de la sèpsia i els desordres relacionats.

La descripció de marcadors modulats per citocines que presenten elevació sèrica en resposta a la infecció, mesurables en sèrum per tècniques senzilles, amb poques variacions en els nivells diaris, ha suposat una nova aproximació a aquest objectiu. Destaquen la proteïna C reactiva, la procalcitonina, la neopterina o les proteïnes fixadores del lipopolisacàrid (*Lipopolysaccharide binding proteins*, LBP), a més de la amiloide A del sèrum. La determinació d'aquests marcadors gaudeix d'especial importància en situacions en què la clínica i els paràmetres habituals de laboratori són més inespecífics, com les edats extremes de la vida (nens i ancians), els estats d'immunodepressió, i les situacions de resposta inflamatòria alterada a nivell basal (traumatismes, cremades, post-cirurgia,...). A més, donat que diferents vies de senyalització són activades en resposta a diferents patrons moleculars associats al patogen, poden orientar en l'etiologia abans de disposar de resultats microbiològics. Dels múltiples estudis de la resposta inflamatòria en pacients amb sèpsia es desprèn que el que predomina és una desregulació de la immunitat innata en resposta als productes microbians⁴. Determinats marcadors indiquen primàriament la severitat de la inflamació però no són específics d'infecció, com per exemple la IL-6, i altres indiquen infecció però no la resposta de l'hostager, com per exemple endotoxina o LBP⁵.

Els microorganismes han anat desenvolupant mecanismes per evadir o interferir amb la resposta immunitària mitjançant sofisticades interaccions. Els patògens extracel·lulars entren al territori subepitelial mitjançant la destrucció de les cèl·lules epitelials o de les unions intercel·lulars mitjançant exotoxines, penetrant a l'espai intersticial on es multipliquen, estimulants la via alternativa del complement, els limfòcits B CD5 i els mastòcits. Els bacteris piògens segreguen complexos barrejats de col·lagenases, hialuronidases, lecitinasas i estreptocinasas que destrueixen el teixit connectiu i permeten la invasió i la disseminació de la infecció. Les toxines bacterianes són proteïnes segregades (exotoxines) o bé porcions estructurals (endotoxines). Els patògens intracel·lulars obligats com els virus, alguns protozous i alguns bacteris posseeixen molècules de superfície que actuen com a mitjancers per fixar-se i penetrar a les cèl·lules diana. Alguns microorganismes són a més capaços d'interferir en pràcticament tots els nivells de la resposta inflamatòria, condicionant les seves manifestacions.

Els objectius d'aquesta Tesi han estat, d'una banda, avaluar la utilitat de la mesura dels marcadors d'inflamació, fonamentalment els de més recent descripció, en el diagnòstic i monitorització de diverses síndromes clíniques d'origen infeccios i, paral·lelament, estudiar la influència de l'agent etiològic i de l'extensió i severitat de la infecció en la resposta inflamatòria. D'altra banda, des del punt de vista del microorganisme, es descriuen dues noves molècules antiinflamatòries d'origen estafilocòccic, que actuen interferint en la resposta immunitària innata.

Els resultats presentats mostren que els marcadors d'inflamació testats: procalcitonina (PCT), proteïna C reactiva i neopterina reflexen el grau de resposta inflamatòria i que varien en funció de l'etiologia, l'edat, la severitat, i el temps d'evolució de la infecció. La utilitat de cada marcador s'ha de contextualitzar, en base a la situació clínica, l'existència de comorbiditat i el lloc d'infecció (sistema nerviós central, respiratòria, urinària,...). La PCT es mostra superior a la proteïna C reactiva quan es tracta de distingir entre infecció bacteriana i infecció vírica, i també entre infeccions bacterianes i causes no infeccioses d'inflamació, no només en la nostra experiència sinó en una metaanàlisi dels articles publicats⁶. La determinació de PCT aporta informació sobre la infecció però també sobre

la resposta inflammatòria de l'hostatger. Si més no, per a la interpretació dels resultats cal tenir en compte tots els factors citats, que afecten fins i tot el *cut-off* i, al mateix temps, tenir presents les possibles causes de falsos positius i falsos negatius. Com a limitacions de la PCT destacaríem que no augmenta, o només discretament, quan es tracta d'una infecció confinada a un òrgan o sense manifestacions sistèmiques, sent poc útil en aquest tipus d'infeccions, en les que la proteïna C reactiva aportaria més informació. Tampoc no és útil en la monitorització d'infeccions víriques ni de malalties inflammatòries cròniques i, en aquests cassos, la neopterina i/o la proteïna C reactiva poden ser-ne complementàries. Cal tenir en compte també que disminueix en sèrum quan el tractament és adequat però no indica erradicació de la infecció, únicament que la resposta sèptica sembla estar sota control.

Les infeccions clínicament aparents són massa complexes en les interaccions entre hostatger i microorganisme com per reduir-les a la mesura d'un determinat marcador. Per tant, l'ús de marcadors no ha de substituir mai un correcte diagnòstic i seguiment clínic i microbiològic, però pot aportar una més acurada informació diagnòstica i pronòstica i, fins i tot, s'obren noves opcions terapèutiques quant a les possibilitats d'immunoneutralització i utilització de tractaments immunomoduladors en general.

És probable que l'òptima rendibilitat s'obtingui amb l'adequada combinació de marcadors, tenint en compte els avantatges i limitacions de cadascun (incloent els que es troben en procés d'avaluació), en funció de l'edat, la síndrome clínica, la/es malaltia/es de base i el context clínic (atenció primària, hospitalització, cures intensives,...) així com la utilització de determinacions seriades en funció de la cinètica del marcador.

Els microorganismes han evolucionat paral·lelament als seus hostatgers. Per tal de sobreviure a la primera línia de defensa, han desenvolupat mecanismes per superar els diversos obstacles de la immunitat innata. En el cas dels estafilococs, s'han descrit diverses proteïnes amb activitat immunomoduladora.

La segona part d'aquesta Tesi ha consistit en la caracterització de dues noves molècules estafilocòcciques, que presenten cert grau d'homologia amb la prèviament descrita CHIPS (*Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*). Els resultats obtinguts demostren que la proteïna excretada *FPR-like 1 Inhibitory protein* (FLIPr) actua bloquejant el receptor de pèptids formilats FPRL1. La troballa de FLIPr com a antagonista d'aquest receptor és de gran importància clínica, per la seva potencial intervenció en la patogènesi de la malaltia estafilocòccica. FPRL1 és el receptor de diverses molècules implicades en la resposta inflammatòria, i s'ha implicat en processos patològics de la importància de l'amiloïdosi sistèmica, la malaltia d'Alzheimer o la malaltia prionica. La segona proteïna, que s'ha anomenat FLIPr-like, actua bloquejant tant FPR com FPRL1.

El millor coneixement dels mecanismes d'evasió del sistema immunitari a càrrec de microorganismes prototípicus com *S.aureus* ens ha de permetre un també millor coneixement dels fonaments de la patogenicitat bacteriana, les vies de senyalització de la immunitat innata i les possibles vies d'intervenció.

L'estudi coordinat dels factors depenents del microorganisme, i la resposta inflamatòria generada per l'hostatger ha de donar lloc a la major comprensió de les complexes interaccions entre hostatger i patogen que donen lloc a la malaltia infecciosa i en condicionen les seves manifestacions i pronòstic. La propera via d'aproximació, encara no explorada en aquest treball, és l'estudi dels polimorfismes genètics en gens crucials en la resposta immune innata, resposta inflamatòria i sistema de la coagulació de l'hostatger, que resulten en variacions en la susceptibilitat i pronòstic de la infecció, fins i tot heretables⁷. Tot plegat ha de donar lloc, en els propers anys, al disseny de noves eines per a la prevenció, diagnòstic i tractament de les infeccions.

ABREVIATURES

Aβ	Amiloide β
APACHE	<i>Acute physiology and chronic health evaluation</i>
APC	Cèl·lules presentadores d'antigens
BPI	<i>Bactericidal permeability-increasing protein</i>
CARS	<i>Compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> . Nomenclatura de les proteïnes de superfície dels leucòcits
CGRP	<i>Calcitonin-gene related peptide</i>
CHIPS	<i>Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus</i>
CID	<i>Coagulació intravascular disseminada</i>
CpG-DNA	<i>Cytidine-phosphate-guanosine desoxyribonucleic acid</i>
CRP (PCR)	Proteïna C reactiva
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzimoimmunoassaig)
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
FLIPr	<i>Formyl peptide receptor-like 1 inhibitory protein</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
FPR	<i>Formyl peptide receptor</i>
FPRL-1	<i>Formyl peptide receptor-like 1</i>
FPRL-2	<i>Formyl peptide receptor-like 2</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HMGB-1	<i>High mobility group box-1</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecules</i>
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulina
iNOs	Òxid nítric sintasa induïble
IL	Interleucina
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolisacàrid
LTB4	Leucotriè B4
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MODS	Síndrome de disfunció multiorgànica
NAMLAA	N-acetil-muramil-L-alanina-amidasa
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	Cèl·lules <i>natural killer</i>
NO	Òxid nítric
Nod	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OKT3	Anticossos monoclonals anti-CD3 per prevenció del rebuig posttrasplantament
ORF	<i>Open reading frame</i> (pauta oberta de lectura)
PAF	<i>Platelet activating factor</i>

PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (cèl·lules mononuclears de sang perifèrica)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
PCT	Procalcitonina
PE	Ficoeritrina
PGRP	<i>Peptidoglycan recognition proteins</i>
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PMN	Leucòcit polimorfonuclear o granulòcit
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSI	<i>Pneumonia severity index</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediates</i>
ROI	<i>Reactive oxygen intermediates</i>
SAA	Amiloide A del sèrum
SAP	Component amiloide P del sèrum
SCIN	<i>Staphylococcal Complement Inhibitor</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TREM-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i>

ARTICLES GENERATS PER AQUESTA TESI

1. Use of quantitative and semiquantitative procalcitonin measurements to identify children with sepsis and meningitis. Cristina Prat, Josep Domínguez, Carlos Rodrigo, Montse Giménez, Marta Azuara, Silvia Blanco and Vicenç Ausina. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;23(2):136-138.
2. Elevated serum procalcitonin values correlate with renal scarring in children with urinary tract infection. Cristina Prat, Josep Domínguez, Carlos Rodrigo, Montse Giménez, Marta Azuara, Orlando Jiménez, Núria Galí and Vicenç Ausina. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 2003;22(5):438-442
3. Procalcitonin, C reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. Cristina Prat, Josep Domínguez, Carlos Rodrigo, Montse Giménez, Marta Azuara, Orlando Jiménez, Núria Galí and Vicenç Ausina. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 2003; 22(11):963-968
4. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. Cristina Prat, Josep Domínguez, Felipe Andreo, Silvia Blanco, Ángeles Pallarés, Federico Cuchillo, Carmen Ramil, Juan Ruiz-Manzano and Vicenç Ausina. *Journal of Infection* 2006;52:169-177
5. Serum concentrations of procalcitonin after cardiac surgery. Cristina Prat, Pilar Ricart, Xavier Ruyra, Josep Domínguez, Jordi Morillas, Silvia Blanco, Teresa Tomasa, Tomás Torres, Luisa Cámara, Ángeles Pallarés and Vicenç Ausina. *Manuscript in preparation*.
6. Evaluation of procalcitonin, neopterin, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia. Cristina Prat, Juan Manuel Sancho, Josep Domínguez, Blanca Xicoy, Montse Giménez, Christelle Ferrà, Silvia Blanco, Josep M Ribera and Vicenç Ausina. *Manuscript in preparation*.
7. A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1). Cristina Prat, Jovanka Bestebroer, Carla J.C. de Haas, Jos A.G. van Strijp and Kok P.M. van Kessel. *Journal of Immunology* 2006. *In press*.
8. Characterization of the molecular properties of staphylococcal formyl-peptide receptor-like antagonists. Cristina Prat, Jovanka Bestebroer, Carla J.C. de Haas, Jos A.G. van Strijp and Kok P.M. van Kessel. *Manuscript in preparation*.



INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Patogènia de la infecció

La malaltia infecciosa es defineix com el conjunt de signes i símptomes resultants de la inflamació o perturbació funcional d'un o més òrgans a càrrec d'un microorganisme o els seus components. Això pot ser degut a infecció, si l'agent etiològic es multiplica a l'hostatger, o a intoxicació, si és deguda a les toxines generades per un microorganisme. El balanç entre la virulència microbiana i la immunitat de l'hostatger és el que determina el resultat final del procés. La magnitud i la naturalesa de la resposta inflamatòria desencadenada condiciona les manifestacions, gravetat i evolució de la malaltia.

1.1.1. Components dels microorganismes inductors de resposta inflamatòria

Els factors de virulència són propietats dels microorganismes que els permeten colonitzar, proliferar, envair i destruir els teixits de l'hostatger^{8, 9}. El sistema immunitari ha desenvolupat un seguit d'estratègies per lluitar contra els microorganismes patògens requerint, en primer lloc, el seu reconeixement. Els microorganismes presenten un alt índex de mutació i heterogeneïtat molecular; si més no, presenten un seguit de patrons moleculars que són reconeguts per receptors (PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*) i són capaços de generar una resposta immunitària. Cal destacar el lipopolisacàrid dels bacteris gramnegatius com un dels més potents inductors de citocines inflamatòries, però molts altres components bacterians són capaços d'estimular la síntesi de citocines, un cop reconeguts pels seus receptors¹⁰. Els grampositius poden produir sèpsia per almenys 2 mecanismes: components que produeixen activació del sistema immune innat via *toll-like receptors* (TLR)¹¹ (àcids lipoteicoics, peptidoglicà i DNA bacterià: *cytidine-phosphate-guanosine DNA* -CpG-DNA-) o bé producció d'exotoxines que actuen com a superantígens.

Lipopolisacàrid. El lipopolisacàrid (LPS), component de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius, està format per un component polisacàrid i el lípid A, que és la part més conservada. La part sacàrida està composta per un domini antigen O i un segment core. Es considera el lípid A com el responsable de la major part de l'activitat endotòxica del LPS¹². El LPS activa la immunitat innata un cop reconegut pel TLR-4. L'endotoxina activa també el complement i pot activar directament tant el sistema de la coagulació com el de les cinines a través del seu efecte sobre el factor XII ó factor de Hageman.

Àcids teicoics i Peptidoglicà. La paret cel·lular dels bacteris grampositius està formada bàsicament pel peptidoglicà, un polímer polisacàrid format per cadenes alternant subunitats de N-acetilglucosamina i N-acetilmuràmic, present també als gramnegatius. A més, s'hi troben unides molècules d'àcids teicoics. Activen bàsicament la immunitat innata, un cop reconeguts pel TLR-2. S'ha descrit la inducció de TNF- α per sobrenedants de bacteris grampositius^{13, 14}. L'àcid lipoteicoic i també els proteoglicans¹⁵ desencadenen l'alliberament de gran varietat de productes per part dels fagòcits, com IL-1 i TNF- α , variant

considerablement entre diferents espècies bacterianes. El peptidoglicà i, concretament els pèptids que el constitueixen, són potents inductors de l'alliberament de citocines proinflamatòries, quimiocines i òxid nítric sintasa induïble (iNOs)^{16, 17}.

CpG-DNA (*cytidine-phosphate-guanosine desoxyribonucleic acid*). El DNA es va considerar durant molt de temps com una molècula immunològicament inert, fins la identificació del CpG-DNA com a component amb activitat immunoestimuladora^{18, 19}. El DNA procariota presenta oligonucleòtids no metilats contenint CpG. Tot i que el DNA dels mamífers també conté dinucleòtids CpG, la freqüència és menor i la majoria de bases de citosina estan metilades, fet infreqüent en el DNA bacterià²⁰. Els residus CpG donen lloc a activació de respostes cel·lulars i activació de citocines proinflamatòries mitjançant la interacció amb TLR-9²¹, que s'ha identificat com el seu receptor, i sembla expressar-se bàsicament al compartiment endosomal²². L'ús de CpG sintètics s'està explorant com a immunoteràpia^{18, 23}.

Superantígens. Són un grup de proteïnes, entre les que destaquen les exotoxines pirogèniques estafilocòcciques i estreptocòcciques²⁴ que comparteixen el mateix mecanisme per interaccionar amb cèl·lules del sistema innat i del sistema adaptatiu: estimulen els limfòcits T tot lligant les molècules del complex major d'histocompatibilitat de classe II (MHC-II) de les cèl·lules presentadores d'antígens (sense previ processament intracel·lular, a diferència de la clàssica presentació d'antígens) a determinades cadenes del receptor de cèl·lules T (cadenes V β del receptor $\alpha\beta$ heterodimèric de les cèl·lules T) donant lloc a l'alliberament massiu de citocines proinflamatòries^{25, 26}. El nombre de segments V β és limitat, de manera que els superantígens poden reaccionar amb aproximadament el 25% de tots els limfòcits T perifèrics, molt més inespecíficament que quan es presenten antígens processats²³. Així, les cèl·lules positives pel MHC-II (macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules B), activen les cèl·lules T per produir fonamentalment TNF- α , IL-2 i IFN- γ ²⁷ a més d'induir iNOs²⁸. Els superantígens presenten, a més, sinèrgia amb el LPS, tot i que actuen a diferents nivells, i indueixen l'anomenada reacció de Shwartzman, que sensibilitza el sistema immunitari a l'endotoxina²⁹.

Pèptids formilats. Tots els bacteris (cap altre organisme, ni *Archae* ni *Eukarya*) inicien la síntesi de proteïnes amb una N-formil-metionina. L'enzim metionil-tRNA-formiltransferasa afegeix un grup formil al grup amino. Aquests pèptids envolten els bacteris en forma de gradient, i actuen com a factors quimiotàctics per als neutròfils, atraient-los direccionalment³⁰. El prototipus de pèptid formilat és el fMLP (*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*)³¹, que va ser sintetitzat per a avaluar la seva activitat quimiotàctica, però posteriorment es va purificar del sobrenedant d' *Escherichia coli*. Els bacteris grampositius, com *S.aureus*, també produeixen pèptids similars³². Les formes sintètiques d'aquests pèptids han permès l'estudi del seu mecanisme d'acció^{33, 34}. Es fixen als receptors de pèptids formilats, amb afinitat variable (FPR, *formyl peptide receptors*)³⁵. Els bacteris no són l'única font de pèptids formilats, els mitocondris de les cèl·lules eucariotes també utilitzen N-formilmetionina com a iniciador de la síntesi de proteïnes, i també presenten propietats quimiotàctiques quan aquests pèptids són alliberats com a resultat de dany cel·lular³⁶. Es considera que poden intervenir en el tràfic de fagòcits en situacions de dany tissular com isquèmia-reperfusió.

Altres components considerats com a PAMPs inclouen **flagelina** (proteïna conservada de grampositius i gramnegatius)³⁷, **lipopèptids**, **glicans**, **manans** (components conservats de les parets cel·lulars dels fongs) o bé el **RNA víric**.

A més dels mecanismes de patogenicitat que permeten l'adherència, multiplicació, invasió i toxigenicitat, els microorganismes han desenvolupat múltiples **mecanismes d'evasió del sistema immunitari**³⁸. La interferència amb la resposta immune té lloc per diversos mecanismes i a diversos nivells:

- o evasió de la IgA secretora a les superfícies mucoses (glicosidases, proteases d'IgA, proteïnes fixadores d'IgA,...)
- o evasió dels pèptids antibacterians mitjançant barreres fisicoquímiques (matriu del *biofilm* bacterià)
- o mimicitat molecular (mimetitzen antígens presents a l'hostatger donant lloc a autoimmunitat, o bé s'uneixen a proteïnes de l'hostatger)
- o variabilitat antigènica
- o evasió de les citocines (secreció d'inhibidors de citocines, expressió de receptors de citocines a la superfície bacteriana, proteases que inactiven les citocines, inhibició del sistema NF-κB,...)
- o evasió del complement (proteases que inactiven components del complement o que donen lloc a components biològicament inactius)
- o evasió de la fagocitosi (indirectament mitjançant inhibició de l'opsonització o bé directament per injecció d'inhibidors, inducció d'apoptosi o supervivència intracel·lular)³⁹
- o inhibició de la quimiotaxi⁴⁰.

Els virus sintetitzen proteïnes específiques que inhibeixen o modulen l'activitat de molècules crítiques del sistema immunitari⁴¹. S'han descrit les "virocines" i els "viroreceptors", que mimetitzen les funcions de les citocines i els seus receptors, sobretot TNF ó IFN⁴². Aquest fet es dona, sobretot, en membres dels grups dels Poxvirus i Herpesvirus. Els fongs elaboren proteases que els permeten creuar barreres i també hidrolitzar pèptids antimicrobians endògens⁴³.

1.1.2. Mecanismes de defensa de l'hostatger

1.1.2.1. Barrera cutànio-mucosa

La integritat morfològica de la pell i les mucoses constitueix una important primera barrera defensiva. L'entrada de microorganismes ha d'anar necessàriament precedida de modificació d'aquesta barrera per mecanismes físico-químics. Les superfícies epitelials disposen de barreres mecàniques, químiques i microbiològiques per evitar la infecció. La flora normal competeix amb els patògens pels llocs d'adherència i els nutrients essencials, a més de produir substàncies inhibidores^{38, 44}.

A la **pell**, la relativa sequedat i acidesa, mantinguda per la presència d'àcids grassos i àcid làctic (a suor i secrecions sebàcies), així com la flora cutània normal actuen com a medi hostil a la infecció. Les **membranes mucoses** contenen una gran quantitat de microorganismes degut al seu elevat grau d'humitat, però les secrecions orgàniques

contenen potents agents antimicrobians, com la lisozima o la N-acetil-muramil-L-alanina-amidasa (NAMLAA), que són especialment efectives enfront microorganismes grampositius, donat que hidrolitzen l'esquelet aminoacídic del peptidoglicà. Les secrecions locals també contenen immunoglobulines, fonamentalment IgG i IgA secretora, que actuen aglutinant microorganismes o bloquejant competitivament la unió dels microorganismes als receptors. A més, les secrecions mucoses contenen grans quantitats de proteïnes fixadores de ferro, que actuen evitant la utilització d'aquest element pels microorganismes i dificulten, per tant, la seva supervivència.

Al **tracte respiratori**, una de les accions més importants enfront l'entrada de microorganismes és el flux turbulent de les vies respiratòries altes, sins paranasals i l'arbre traqueobronquial, així com l'acció de les cèl·lules ciliades. A més, les secrecions bronquials també contenen NAMLAA. Un cop el microorganisme ha aconseguit assolir l'alvèol, l'expulsió física és menys efectiva per l'absència d'epiteli mucociliar, i els histiòcits tissulars actuen com a fagòcits, així com les substàncies surfactants. L'arribada d'un inòcul elevat, així com l'exposició perllongada als microorganismes, permet superar aquestes barreres.

Al **tracte gastrointestinal**, els moviments peristàltics obstaculitzen l'adherència del patogen. El pH àcid de l'estómac, els enzims proteolítics pancreàtics, i les secrecions biliars i intestinals actuen amb efecte antibacterià. Les cèl·lules de Paneth del budell prim secreten lisozima i defensines. El moc protegeix les cèl·lules epitelials tot actuant com a barrera mecànica i pel contingut en anticossos IgA. La competició pels nutrients així com per una zona on adherir-se que duu a terme la flora normal juga també un paper defensiu molt important. L'alteració d'aquesta flora autòctona permet l'entrada de microorganismes virulents. En condicions normals les cèl·lules epitelials estan en contacte amb grans quantitats de LPS i peptidoglicà de la flora normal però no es genera resposta inflamatòria. Probablement els sistemes de reconeixement com els TLR es troben expressats a la làmina basal o bé els cal cofactors provinents de l'espai vascular i cal disrupció cel·lular perquè entrin en contacte ⁴⁵. L'alteració de la regulació d'aquests sistemes de reconeixement pot ser responsable de la malaltia inflamatòria intestinal ^{46, 47}

Al **tracte genitourinari**, el flux d'orina arrossega els microorganismes cap a l'exterior. L'orina és, a més, bactericida per determinades soques de microorganismes. També té una funció important la proteïna de Tamm-Horsfall, produïda al ronyó, que té la capacitat de fixar bacteris. El freqüent flux d'orina permet eliminació de microorganismes i l'entrada està també menys afavorida per la llargada de la uretra masculina. La presència dels bacils de Döderlein a l'epiteli vaginal (bacils grampositius, fonamentalment *Lactobacillus*) dona lloc a un ambient àcid (que és conseqüència del metabolisme del glicogen amb producció d'àcid làctic que duen a terme), desfavorable pels microorganismes patògens.

L'**epiteli conjuntivo-corneal** és lubricat per secrecions de la glàndula lacrimal, que contenen lisozima, entre altres substàncies antimicrobianes.

1.1.2.2. Immunitat innata

1.1.2.2.1. Reconeixement de patrons moleculars associats al patogen

La immunitat innata és capaç de reconèixer un seguit de components microbians (PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*)², compartits per un gran nombre de patògens, i limitant així el nombre de receptors necessaris, mitjançant l'expressió de receptors codificats al genoma. Els receptors reconeixadors de patrons (PRR: *Pattern recognition receptors*)⁴⁸ poden expressar-se a la superfície cel·lular, a compartiments intracel·lulars o bé secretar-se al torrent circulatori o altres fluids orgànics. En general, els receptors de reconeixement de patrons són tipus lectina i s'uneixen amb considerable especificitat als sucres exposats a les superfícies microbianes, amb la seva característica configuració tridimensional rígida, i no s'uneixen a la galactosa i àcid siàlic que acostumen a conformar els polisacàrids de superfície de les cèl·lules dels mamífers⁴⁹. La funció d'aquests receptors es l'opsonització, activació del complement i de les cascades de la coagulació, fagocitosis, activació de senyals proinflamatoris i inducció d'apoptosi. Entre els receptors de patrons de reconeixement destaquen el receptor CD14, els *toll-like receptors* (TLR), associats a la membrana, els *scavenger receptors* i els receptors de pèptids formilats (FPR), a més de les proteïnes Nod (*Nucleotide-binding oligomerization domain*), presents al citoplasma.

El **receptor CD14** és capaç de reconèixer el lípid A dels gramnegatius o l'àcid lipoteicoic dels grampositius. El lipoarabinomanà dels micobacteris també sembla activar cèl·lules via CD14. S'expressa a monòcits i macròfags⁵⁰ o bé es troba circulant en forma soluble. Les interaccions entre el LPS i el CD14 controlen la majoria de les respostes al LPS. S'ancora a la membrana cel·lular mitjançant una unió glicosil-fosfatidilinositol, que no conté domini transmembrana i no pot induir activació cel·lular sense un co-receptor transmembrana: el TLR exerceix aquesta funció⁵¹. Una molècula de LPS de l'endotoxina es fixa a la proteïna transportadora LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*), s'uneix a CD14 de la membrana externa que està unit a TLR i transmet el senyal transmembrana. Els senyals intracel·lulars després de la fixació al receptor donen lloc també a la translocació del factor NF-kappa B des del citosol cap al nucli on s'uneix al DNA i actua com a promotor de múltiples gens de molècules implicades en la inflamació^{52, 53}. Aquesta unió es veu també afavorida per la proteïna MD2⁵⁴. Els macròfags estan programats per retirar de la circulació les partícules que reconeixen. Un cop fagocitats, els microorganismes s'eliminen mitjançant la generació de metabòlits tòxics de l'oxigen i l'alliberament d'altres enzims lisosomals com la lisozima, elastasa, antileucoproteases, catepsina G o la *bactericidal permeability-increasing protein* (BPI). La LBP actua com opsonina i CD14 actua com a receptor d'opsonina. Aquestes molècules també s'alliberen al plasma i altres fluids biològics durant la inflamació. La BPI s'uneix a l'endotoxina bloquejant-la, evitant que el complex BPI-LPS interaccioni amb el receptor CD14, inhibint la reacció inflamatòria.

Els ***toll-like receptors***, inicialment descrits en *Drosophila* (receptor Toll) estan implicats en el reconeixement de gran varietat de PAMPs. Son proteïnes transmembrana tipus I amb un domini extracel·lular ric en leucina i un domini intracel·lular homòleg al receptor de la IL-1^{55, 56}. S'expressen a la superfície de diverses cèl·lules immunitàries i també en altres tipus cel·lulars en àrees de l'organisme habitualment estèrils. Difereixen en la seva especificitat pels lligands, patrons d'expressió i, presumiblement, en els gens diana que poden induir.

Diferents TLR tenen diferents localitzacions d'expressió cel·lular, i la majoria de les cèl·lules immunitàries expressen diversos TLR, de manera que diferents components microbians desencadenaran diferents patrons d'activació⁵⁶. Fins al moment actual, n'hi han 13 de descrits. Els principals lligands coneguts es descriuen a la següent taula⁵⁷.

Toll-like receptor	
TLR-1	grampositius, proteïnes triacetilades, PAM3 Cys
TLR-2	peptidoglicà, àcid teicoic, zimosà, lipoproteïnes bacterianes, PAM3 Cys, PaM3CSK4, glicosinotolfosfolipids
TLR-3	RNA víric de doble cadena
TLR-4	lipopolisacàrid i <i>heat-shock proteins</i>
TLR-5	flagelina bacteriana
TLR-6	grampositius, diacetil-lipoproteïnes
TLR-7	SsRNA (víric)
TLR-8	SsRNA (víric)
TLR-9	CpG DNA (víric i bacterià)
TLR-10	desconegut
TLR-11	Profilina de <i>Toxoplasma</i>
TLR-12 i TLR-13	desconegut

És a dir, els virus són reconeguts per TLR 3,7,8,9; els bacteris grampositius per TLR 1,2,6,9; els bacteris gramnegatius per TLR 4,5,9,11; els fongs per TLR 2,6; els paràsits per TLR 2. Interaccionen, doncs, amb PAMPs a l'espai extracel·lular o a l'interior de compartiments intracel·lulars especialitzats com l'aparell de Golgi. La resposta cel·lular als TLR és depenent d'una via de senyalització comú, mitjançada per la molècula adaptadora MyD88 i altres molècules de recent descripció (via independent de MyD88⁵⁸), que dona lloc, a través de l'activació d'altres mitjancers intracel·lulars i finalment del factor de transcripció NF-κB, a l'expressió de diversos gens implicats en orquestrar la resposta inflamatòria incloent l'expressió de diverses citocines i quimiocines com a molècules co-estimuladores necessàries per a l'activació de la resposta immune adaptativa⁵⁹. El NF-κB dimeritza, interacciona amb el DNA dels gens diana localitzats al nucli, i en modifica la seva expressió. Aparentment, diverses molècules adaptadores confereixen especificitat a les vies de senyalització intracel·lulars induïdes pels diversos patògens⁶⁰.

Els TLR donen lloc, doncs, a la producció de citocines i activació de mecanismes microbicides dels leucòcits i, a més, indueixen la maduració i activació de cèl·lules dendrítiques, constituint un pont entre immunitat innata i adquirida, a més de modular la funció de cèl·lules T⁶⁰.

La generació de mitjancers específics a partir de l'activació dels TLR pot ser el primer pas on el sistema immune confecciona la resposta a patògens específics. Així, l'endotoxina dels gramnegatius és reconeguda per la via CD14-TLR4, mentre que el peptidoglicà i l'àcid teicoic ho són per TLR-2 i, en menor mesura, TLR-4. Les respostes intracel·lulars són també diferents, en la mesura que TLR-4 utilitza vies dependents i independents de la proteïna adaptadora MyD88⁵⁵. Les diferències en la senyalització molecular de diferents TLR, juntament amb l'expressió en cèl·lules específiques i compartimentalitzada, pot haver evolucionat per permetre diferents respostes immunitàries enfront microorganismes

extracel·lulars, com la majoria de bacteris gramnegatius, i intracel·lulars, com els virus DNA. A més, els TLR2 direccionen la resposta immune adaptativa en sentit Th2, i els TLR4 i TLR9 en sentit Th1.

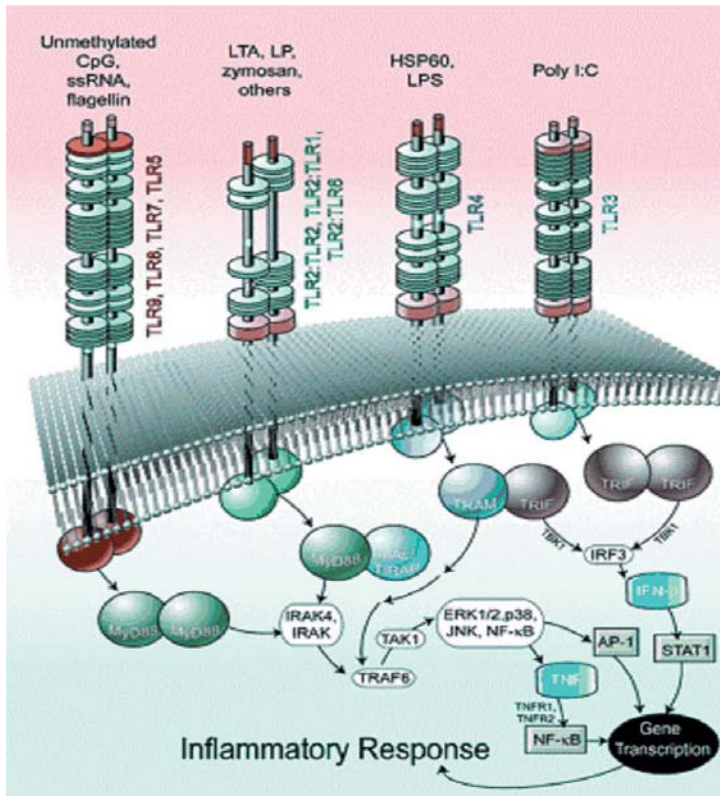


Figura 2. Vies de senyalització dels Toll-like receptors (TLR).
 Figura modificada de Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004;40:845–859.

Receptors de pèptids formilats (FPRs). Els pèptids formilats, dels quals el fMLP n'és el prototipus inclouen, com a receptor d'alta afinitat, FPR (*Formyl peptide receptor*)³⁴, i uns altres dos homòlegs, el FPRL1 (*Formyl peptide receptor like 1*) i el FPRL2 (*Formyl peptide receptor like 2*). Es consideren factors quimiotàctics clàssics, i activen receptors transmembrana units a proteïnes G (*G protein-coupled receptors*), que s'expressen a diversos tipus cel·lulars⁶¹. L'activació d'aquests receptors dóna lloc a mobilitat dirigida dels fagòcits, generació d'anions superòxid, fagocitosi i respostes de degranulació que culminen amb l'eliminació dels microorganismes invasors⁶². FPRL1 es considera un receptor de baixa afinitat⁶³⁻⁶⁵ i FPRL2 no s'uneix a fMLP. Els gens de FPR i FPRL1 estan localitzats a la mateixa regió del cromosoma 19 i es proposa que la seva expressió pot estar regulada coordinadament⁶⁶. En els darrers anys s'han identificat gran nombre d'agonistes i antagonistes dels receptors de pèptids formilats, incloent components bacterians i molècules endògenes^{35, 67} i es considera que poden exercir un major nombre de funcions immunitàries que les descrites fins al moment.

La **scavenger receptor family** (anomenats SR de classe A fins a classe F, i un grup de receptors encara no classificats) detecta estructures que contenen fosfolípids i, en general, poden reconèixer gran varietat de macromolècules carregades negativament, incloent lipoproteïnes de baixa densitat oxidades (implicades en el desenvolupament d'aterosclerosi i desordres relacionats amb l'acumulació de materials desnaturalitzats, com la malaltia d'Alzheimer o l'amiloidosi) i també productes de glicació avançada (AGE: *Advanced Glycation End products*), relacionats amb l'envelliment i les complicacions de la diabetes⁶⁸. Si més no, a diferència dels receptors de citocines, poden reconèixer una gran varietat de lligands polianiónics, incloent productes microbians com RNA de doble cadena, LPS i àcid lipoteicoic. En condicions fisiològiques, la seva funció és netejar (*scavenge*) residus cel·lulars i estructures relacionades. En estats patològics són mitjancers del reclutament, activació i transformació de macròfags i altres cèl·lules que poden estar relacionades amb el desenvolupament de les malalties anomenades més amunt. La seva unió a lligands dóna lloc a fenòmens com l'activació del NF-κB o la reducció de l'òxid nítric intracel·lular⁶⁹.

Altres sistemes de reconeixement s'expressen a nivell intracel·lular com les proteïn cinases i les oligoadenilat sintases, així com la família de **proteïnes Nod** (*Nucleotide-binding oligomerization domain*)⁵⁹. Les proteïnes Nod pertanyen a una família de proteïnes també riques en leucina, que són capaces de respondre als components bacterians un cop al citosol. Reconeixen bàsicament fragments del peptidoglicà. Es considera que enzims incloent amidases, lisozima o les proteïnes de reconeixement del peptidoglicà (PGRPs: *Peptidoglycan recognition proteins*) poden estar implicats en el processament del peptidoglicà, fent-ne fragments petits de manera que puguin ser abordats per les proteïnes Nod (també el presenten al TLR-2). L'activació de la transcripció de gens proinflamatoris és també mitjançada pel NF-κB.

Altres exemples de molècules de reconeixement⁴⁸ són la lectina fixadora de manosa (*mannose-binding lectin*: **MBL**), la **proteïna C reactiva** o el component amiloide P del sèrum (**SAP**). Proteïna C reactiva i SAP són membres de la família de la pentraxina i ambdues funcionen com a opsonines unint-se a la fosforilcolina de la superfície bacteriana. També es poden unir a C1q i activar la via clàssica del complement. El SAP degradat esdevé un component dels depòsits d'amiloides fibril·lar que acompanya les infeccions cròniques. MBL pertany a la família de les colectines, i s'uneix específicament a residus de manosa terminals i, juntament amb proteases pot activar la via lectina del complement. S'inclouen també amidases (reconeixen sucres), lisozima i lactoferrina (reconeix Fe). El reconeixement de proteïnes és dut a terme fonamentalment per la immunitat adaptativa (immunoglobulines i receptors de cèl·lules T).

1.1.2.2.2. Nivell humoral: Pèptids antimicrobians, complement, coagulació

Els **pèptids antimicrobians** són pèptids presents a tota la gama d'organismes pluricel·lulars amb la funció de col·laborar amb altres components de la immunitat innata per tal de neutralitzar o almenys retardar la disseminació dels patògens mentre s'organitza la resposta adaptativa⁷⁰.

El tamany mig dels pèptids és de 10 a 50 residus, tot i que també s'inclouen proteïnes microbicides. Es caracteritzen per la seva alta càrrega neta positiva i la seva estructura amfipàtica. Es classifiquen en funció de la seva estructura, segons es presentin en alfa-hèlix, siguin rics en un aminoàcid específic, cíclics amb ponts disulfur,... Els identificats en humans són presents a la pell i les secrecions mucoses, així com a les cèl·lules fagocítiques com els neutròfils. S'inclouen pèptids com **defensines**, **histatines**, **catelicidines** (i el seu producte de proteolisi LL-37), **dermicidina**, **hepcidina**, **trombocidina**, **lactoferricina**, **magainina**, **protequina**, **indolicidina** i el **pèptid aniònic pulmonar**. Les proteïnes microbicides com la **calprotectina**, que inhibeix el creixement bacterià per disminució dels nivells de Zn^{2+} disponibles; la **BPIP**, proteïna bactericida per l'increment de la permeabilitat, que permeabilitza les membranes dels bacteris gramnegatius, neutralitza el LPS i opsonitza el bacteri; la **lisozima**, que degrada el peptidoglicà i té activitat bactericida pel seu caràcter catiònic; la **fosfolipasa A2**, que degrada els fosfolípids bacterians o la **granulisina**, amb acció citolítica directa induint apoptosi en cèl·lules hostatgeres de patògens intracel·lulars.

Actuen despolaritzant la membrana, formant porus i alliberant metabòlits intracel·lulars degut a la interacció dels fosfolípids amb l'estructura amfipàtica del pèptid. El pèptid s'uneix a la bicapa lipídica, forma un porus transitori i s'interioritza, de manera que és accessible a dianes intracel·lulars. La seva diana són cèl·lules riques en fosfolípids amb càrrega negativa, com els bacteris, que tenen una membrana sense esterols. El pèptid s'acomplexa amb el lipopolisacàrid, sense que aquest complex tingui efectes biològics, i lisa el bacteri un cop accedeix a la bicapa. L'acció letal és estequiomètrica.

L'especificitat es basa en el major contingut en fosfolípids aniònics de la membrana plasmàtica dels patògens respecte a eucariotes superiors, on aquests fosfolípids es troben confinats a la cara citoplasmàtica de la membrana, inaccessibles al pèptid. També s'explica per l'absència d'esterols a la membrana bacteriana i la presència d'un potencial de membrana negatiu al citoplasma.

Per induir resistències caldria un canvi radical en la composició dels fosfolípids de la membrana plasmàtica. Altres pèptids antibiòtics eucariotes tenen dianes intracel·lulars específiques, com la mitocòndria per les histatines. També poden inhibir la fusió vírica o la transcripció. Inhibeixen efectes com la producció de TNF- α i IL-1, i impedeixen la unió del LPS a la LBP. Així l'eliminació bacteriana per part d'aquests pèptids comporta una baixa resposta inflamatòria. Molts d'aquests pèptids poden actuar com a factors quimiotàctics a més de ser defensines. D'altra banda, algunes quimiocines tenen similituds estructurals amb les defensines; per exemple, s'ha vist activitat antimicrobiana directa de les 3 quimiocines IFN- γ induïbles. També molts d'ells actuen induint l'òxid nítric sintasa induïble, produint òxid nítric. De les sis defensines humanes conegudes, 4 són expressades primàriament pels granulòcits i alguns limfòcits, i les altres dues per les cèl·lules de Paneth intestinals⁷¹. A més del seus efectes antimicrobians directes, les defensines semblen facilitar i amplificar la subseqüent resposta immune adaptativa mitjançant el reclutament de cèl·lules dendrítiques immadures. També poden modular la inflamació tot influenciant l'expressió de citocines i molècules d'adhesió.

El **complement** es va identificar inicialment com un principi termolàbil del sèrum que “complementava” als anticossos en la lisi dels bacteris. És un grup de més de trenta proteïnes sèriques que interaccionen de forma coordinada constituint la “cascada” del complement^{72, 73}. El complement pot ser activat per anticossos específics (via clàssica), o per components de la superfície dels microorganismes, preferentment els extracel·lulars (via alternativa). Existeix una tercera via, de més recent descripció, que és activada per carbohidrats microbians (via de la lectina fixadora de manosa).

La **via clàssica** s'inicia per la unió de C1 (composat per C1q, C1r i C1s) a immunocomplexes que contenen IgG o IgM (unió a la porció Fc dels anticossos units a antígens). També pot activar-se, en absència d'anticossos, per molts tipus de bacteris, virus i cèl·lules infectades per virus, lipíd A, compostos polianiónics, enzims lisosòmics, proteïna C reactiva, amiloide, etc. L'activació de C1 resulta en la formació de proteases actives C1r i C1s, que hidrolitzen consecutivament a C4 i C2, produint-se dos fragments grans, C4b i C2b, i dos petits, C4a i C2a, que s'alliberen al medi. C4b s'uneix a l'immunocomplexe, i posteriorment C2a s'uneix a C4b. El complex C4b2a és la C3 convertasa de la via clàssica, que activa nombroses molècules de C3, alliberant un fragment de 74 aminoàcids ó C3a, que és una potent anafilotoxina. Algunes molècules de C3b s'uneixen de forma covalent al C4b, que estava unit a l'activador, donant lloc a la formació de complexos covalents activador-C3b-C4b,2b. Aquest complex s'anomena C5 convertasa, que hidrolitza C5 i produeix una nova anafilotoxina, C5a, de gran potència biològica, i un fragment major, C5b, que és l'iniciador de la fase lítica.

La **via alternativa** s'inicia mitjançant el contacte del component C3b amb productes abundants a les superfícies bacterianes, tals com el dextrà o bé polisacàrids complexos com el zimosà. No requereix la presència d'anticossos (activació inespecífica). El component C3b es produeix constantment al sèrum a partir de la divisió espontània de C3. Normalment és inactivat pel Factor H, una proteïna inhibidora, a no ser que es lligui ràpidament després de la seva producció a una superfície bacteriana. En aquest cas el component C3b s'unirà al Factor B. Aquesta unió ocasiona un canvi conformacional al Factor B que permet l'exposició d'una zona d'aquest factor a una altra proteïna, el Factor D, que destrueix una unió arginina-lisina dins d'aquesta proteïna i permet l'alliberament d'un fragment anomenat Ba. La part que roman lligada s'anomena Bb, de forma que el complex passa a anomenar-se C3b-Bb. Aquest complex és el pas central de la via alternativa, donat que es comporta com un enzim: C3/C5 convertasa, convertint grans quantitats del component circulant C3 en C3b, de manera que la superfície bacteriana queda coberta per una gran quantitat de molècules C3b, amb efecte opsonitzant, és a dir, afavorint la fagocitosi. El component C3b activa també el component C5, que esdevé C5b.

Mannose-binding lectin pathway (MBL) La lectina lligadora de manosa és una proteïna oligomèrica plasmàtica de la família de les colectines⁷⁴, que posseeix dominis de lectina tipus C, per al reconeixement de sucres. Aquesta via s'inicia quan aquesta proteïna s'uneix a sucres presents a la superfície de microorganismes⁷⁵. La MBL activa consecutivament dos proenzims, MASP-1 i MASP-2 (serin proteases associades a MBL) que activen a C4 i C2 i donen lloc a la formació de la C3 convertasa (C4b,2b), que continua la cascada activant C3⁷⁶. La MBL és estructuralment similar al C1q (amb varis dominis globulars de reconeixement i un tronc comú) i MASP-1 i MASP-2 són similars a C1r i C1s,

respectivament. El complex MBL-MASP-1, MASP-2 és equivalent a C1, pel que aquesta via de les lectines pot considerar-se una altra manera d'activar la via clàssica.

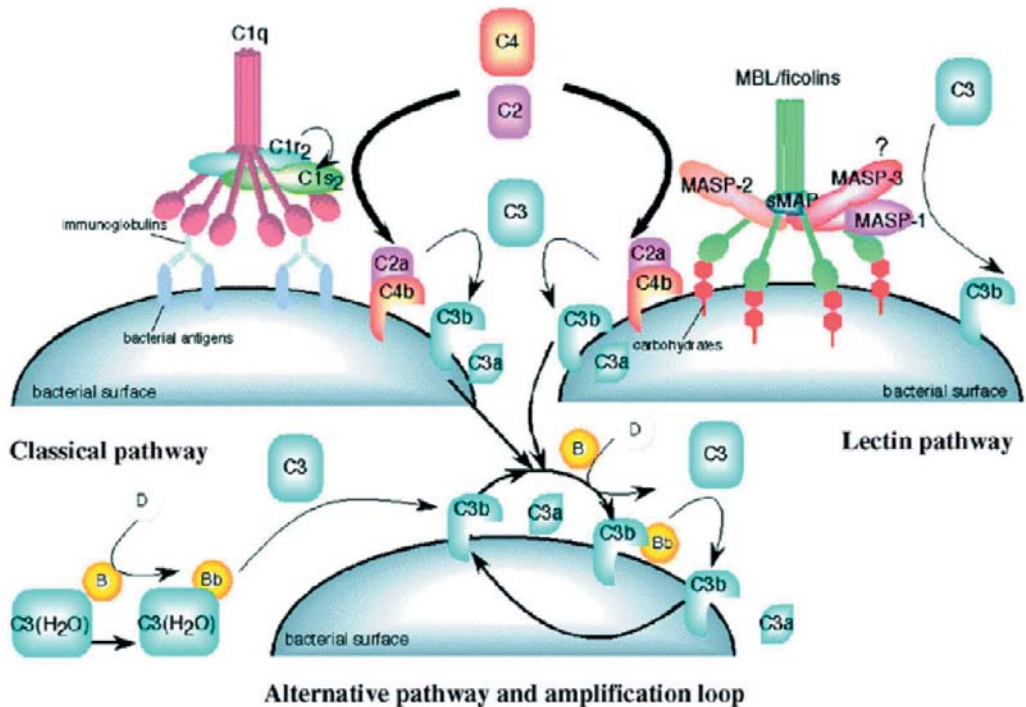


Figura 3. Vies de senyalització del complement. De: Fujita T et al. The lectin-complement pathway: its role in innate immunity and evolution. Immunol Rev 2004;198:185-202

La fase lítica és un procés no enzimàtic d'ensamblatge dels components finals que és comú a les tres vies d'activació. C5b s'uneix als components C6 i C7 formant un complex trimolecular (C5b-C6-C7) que permet lligar una quarta molècula, la C8, a la qual deixen descoberta una regió hidrofòbica que s'incrusta a la bicapa lipídica de la membrana bacteriana. El component final, el C9, es lliga a C8 que actua polimeritzant cert nombre de molècules C9 de manera que formen una estructura semicircular a la membrana per on flueixen molècules d'aigua a l'interior de la cèl·lula induint la seva lisi.

Així doncs, les **funcions del complement** són: 1. Oponització de microorganismes de manera que poden ser reconeguts pels fagòcits, facilitant i incrementant la fagocitosi, donat que tenen receptors per a la C3b. D'aquesta manera s'estimula la mateixa acció antimicrobiana que la desencadenada per la via clàssica, sense el retard de 5 a 7 dies que es requereix per a la producció d'anticossos. 2. Els pèptids C3a i C5a, generats amb l'activació de C3 i C5, s'anomenen anafilotoxines, donat que incrementen la inflamació local directament, incrementant la permeabilitat dels vasos sanguinis, i indirectament tot induint l'alliberament d'histamina. A més, C5a és quimiotàctic per la línia mieloide (neutròfils, eosinòfils, basòfils, macròfags i monòcits), estimulant també l'explosió respiratòria o alliberament d'espècies reactives d'oxigen⁷⁷. 3. Lisi microbiana a nivell extracel·lular.

Coagulació i sistema calicreïna-cinina La presència de superfícies carregades negativament, com el lipopolisacàrid bacterià o, en general, les membranes i proteases bacterianes, activen la via de contacte o via intrínseca de la coagulació, en activar el factor XII o factor de Hageman. Quan el factor de Hageman activat desdobra la precalicreïna en calicreïna es produeixen les cinines, que són potents vasodilatadors i augmenten la permeabilitat capilar i la motilitat gastrointestinal. L'hemodinàmica del shock sèptic es veu influenciada pels sistemes calicreïna-cinina i renina-angiotensina, que interaccionen entre si⁷⁸. Els productes intermitjos de l'angiotensina estimulen la formació d'òxid nítric (NO) i de prostaciclina, per produir vasodilatació. La formació de NO, afavorida també pel LPS, dona lloc a hipotensió i depressió de la contractilitat miocàrdica. Altres productes bacterians, com la coagulasa d'*Staphylococcus aureus*, és capaç d'unir-se a la protrombina, activar la trombina, i convertir el fibrinogen en fibrina. Durant la sèpsia, per l'activació de la via intrínseca de la coagulació, pot mesurar-se el recanvi accelerat dels factors XII, VIII, V i el fibrinogen. El factor tissular i el factor VIIa (i no directament el sistema calicreïna-cinina) donen lloc a la formació de trombina i la coagulació intravascular disseminada (CID)⁷⁹ amb trombotosi intraluminal i consum de factors de la fase plasmàtica i de l'anticoagulant fisiològic antitrombina III. La funció alterada de les proteïnes C i S, amb poder anticoagulant, potencia els efectes procoagulants. Paral·lelament es produeix una inhibició de la fibrinolisi per inactivadors de l'activador tipus 1 del plasminogen (PAI-1), fet que afavoreix la persistència de trombes intravasculares. La mesura dels marcadors de coagulació s'ha estudiat també com a indicador precoç de la progressió a sèpsia severa o shock sèptic⁸⁰.

1.1.2.2.3. Nivell cel·lular: Fagòcits (neutròfils, monòcits i macròfags)

Les cèl·lules que componen el sistema immunitari s'originen al moll d'os i, un cop madures, migren als teixits circulant a la sang o el sistema limfàtic. Els components cel·lulars més importants de la immunitat innata provenen de la línia mieloide, essent els leucòcits polimorfonuclears i els macròfags les principals cèl·lules fagocítiques⁸¹. En general i de forma simplificada, podríem dir que els polimorfonuclears actuen protegint enfront els bacteris piògens i els macròfags contra els bacteris, virus i protozous amb capacitat de supervivència intracel·lular⁴⁹. Un cop reconegut el patogen, s'inicia la ingestió mitjançant l'activació del sistema contràctil de la cèl·lula (actina-miosina) i, un cop fagocitat, s'inicia una bateria de mecanismes microbicides.

Els **leucòcits polimorfonuclears** (PMN) inclouen neutròfils, basòfils i eosinòfils, que es distingeixen per la diferent tinció dels seus grànuls citoplasmàtics. Els neutròfils són els més abundants i els efectors més importants de la immunitat innata per la seva elevada velocitat de flux des de la sang i la seva capacitat de generar grans quantitats de metabòlits antimicrobians de l'oxigen. Tenen una vida mitja curta, d'hores. Exerceixen una fagocitosi que és independent de l'opsonització, és estrictament física, pel contacte del microorganisme amb la superfície on resta. Contenen més de 50 tipus d'enzims diferents³⁸. Es distingeixen el grànuls azurofíllics, situats vora el nucli i desenvolupats més precoçment, que contenen la mieloperoxidasa i els enzims efectors no oxidatius, com les defensines ó la catepsina G, i els grànuls específics, que es generen a mesura que la cèl·lula madura, i contenen enzims com lisozima, lactoferrina o fosfatasa alcalina. Entre els enzims localitzats al citoplasma destaca la NADPH oxidasa, que té la capacitat de generar radicals intermediaris d'oxigen (ROI), com l'ió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen

(H₂O₂)⁸². La mieloperoxidasa, enzim lisosomal, incrementa l'activitat microbicida d'aquests oxidants, en formar àcid hipoclorós (HOCl) a partir de l'ió clorur i del peròxid d'hidrogen. Els pèptids catiónics rics en cisteïna i arginina, com les defensines o la catepsina G, tenen gran activitat bactericida. Altres, com la lactoferrina o la proteïna lligadora de vitamina B12, exerceixen una activitat bacteriostàtica. Quan els neutròfils són estimulats, la NADPH oxidasa comença a generar els radicals d'oxigen i els grànuls es fusionen amb la membrana i alliberen el seu contingut al medi extracel·lular o bé al vacúol fagocític un cop han fagocitat un element estrany.

Els **macròfags** maduren constantment a partir de monòcits, circulen de forma transitòria i després s'instal·len prolongadament als diversos teixits, constituint el sistema retículo-endotelial. Es troben especialment al teixit connectiu, amb especial densitat al tracte gastrointestinal i als vasos sanguinis de fetge (cèl·lules de Küpffer), pulmó (intersticial i alveolar) i melsa. Altres exemples són la microglia cerebral o els osteoclasts de l'os. Són cèl·lules de vida llarga, capaces de reconèixer els microorganismes i alguns dels seus components comuns a través de receptors que s'expressen a la superfície cel·lular. Els microorganismes intracel·lulars que són fagocitats pels macròfags estimulen mecanismes antimicrobians: a) depenents de l'oxigen: formació de radicals intermediaris d'oxigen (ROI, *Reactive oxygen intermediates*), més actius contra microorganismes extracel·lulars, i radicals intermediaris de nitrogen (RNI, *Reactive nitrogen intermediates*) com l'òxid nítric (format a l'interior del fagosoma a partir de L-arginina o per l'acció de l'òxid nítric sintasa induïble -iNOs- present a la membrana del macròfag), més actius contra microorganismes intracel·lulars, b) independents de l'oxigen: acidificació del fagosoma i unió fagosoma-lisosoma, exposant els microorganismes al contingut dels lisosomes, que són enzims hidrolítics, proteïnes que segresten nutrients com la lactoferrina i altres proteïnes antimicrobianes com la lisozima. Els macròfags són importants productors de citocines proinflamàtores, bàsicament IL-1, TNF- α , IL-12 i IL-8. També són capaços de produir interferó α i β , importants molècules antivíriques no específiques, que estimulen la immunitat mitjançada per cèl·lules T. Els macròfags també produeixen prostaglandines i altres metabòlits de l'àcid araquidònic. També produeixen citocines moduladores de l'activitat proinflamatòria, com la IL-10.

Els **mastòcits** s'activen quan els patògens creuen la barrera epitelial i estableixen una infecció local. Contenen un gran nombre de grànuls citoplasmàtics amb histamina, que produeix un augment del flux sanguini i de la permeabilitat vascular que permet l'acumulació ràpida de neutròfils i eosinòfils. També generen la producció de metabòlits de l'àcid araquidònic, tals com leucotriè B4 (LTB4), amb acció quimiotàctica per les cèl·lules fagocitàries, i fins i tot poden contenir TNF pre-format.

Les **cèl·lules dendrítiques** se situen estratègicament a la interfase entre la immunitat innata i l'adaptativa. Estan situades als teixits perifèrics, on activament mostregen el seu voltant per endocitosi i macropinocitosi. Quan troben un patògen, inicien un programa de maduració cel·lular, que inclou la inducció d'activitat coestimuladora, processament d'antígens, augment de l'expressió de la molècula del complex major d'histocompatibilitat (MHC) i migració cap al nòdul limfàtic, on poden estimular cèl·lules T antígen-específiques *naïves*⁸³. El reconeixement dels patògens està mitjançat pels TLR a la superfície de les cèl·lules dendrítiques. Són eficients estimuladores dels limfòcits T i B, i actuen com a sentinelles mòbils que duen els antígens fins a les cèl·lules T i expressen coestimuladors

per la inducció d'immunitat. No hi ha cap altra cèl·lula sanguínia que exhibeixi els canvis de forma i mobilitat de les cèl·lules dendrítiques. Els bacteris, el LPS, i citocines com IL-1, GM-CSF i TNF- α estimulen la maduració de les cèl·lules dendrítiques, mentre que IL-10 la inhibeix⁸³.

Les **cèl·lules *natural killer*** (NK) són una important font de producció d'interferó- γ en la resposta immune innata, abans de la producció de cèl·lules T sensibilitzades. Aquesta citocina és mitjançera de l'activitat microbicida dels macròfags, estimula la producció de superòxids a càrrec dels polimorfonuclears, i augmenta la resposta immune mitjançada per cèl·lules T, especialment el tipus 1 (Th1)⁸⁴. En general, les cèl·lules NK participen en les respostes immune innata i adaptativa contra patògens intracel·lulars i tumors malignes. Les cèl·lules NK reconeixen distintes molècules pròpies com l'antigen major d'histocompatibilitat classe I (MHC-I) a través de diversos tipus de receptors amb senyalitzacions inhibidores. Les NK, doncs, lisen cèl·lules que han perdut o expressen quantitats inadequades de MHC-I, fenomen freqüent en tumors i cèl·lules infectades per determinats virus. Les cèl·lules dendrítiques madures com a conseqüència de l'exposició a components microbians i amb eficient capacitat d'actuar com a cèl·lules presentadores d'antígens, expressen major quantitat de MHC-I que no pas les immadures. Per tant, les cèl·lules dendrítiques immadures són fàcilment lisades per les cèl·lules NK, interpretant-se com un mecanisme de regulació per evitar l'excessiva producció de citocines proinflamatòries quan no hi ha exposició a agents infecciosos⁸⁴.

1.1.2.3. Immunitat adquirida

La immunitat adquirida o adaptativa es genera en el cas que la resposta innata sigui sobrepasada, i implica la participació de mecanismes cel·lulars i humorals que actuen específicament contra els agents infecciosos generant una memòria immunitària. Consisteix en l'expansió clonal de poblacions de cèl·lules B i T, capaces d'interaccionar específicament amb microorganismes concrets. Aquest procés està mitjançat per la presentació d'antígens a càrrec de cèl·lules presentadores d'antígens (APC), essent les cèl·lules dendrítiques les més eficients. El primer pas és l'activació dels limfòcits T als teixits limfàtics; les cèl·lules presentadores d'antígens processen antígens i els presenten units a la molècula del complex major d'histocompatibilitat. Aleshores, els limfòcits T *naïve* proliferen i esdevenen limfòcits T activats que produeixen citocines com l'interferó. La immunitat adquirida està doncs constituïda bàsicament pels anticossos produïts per les cèl·lules plasmàtiques derivades dels limfòcits B i pels limfòcits T. La immunitat innata és capaç de modular el tipus de resposta de la immunitat adaptativa i generar una resposta de tipus cel·lular o humoral. Els microorganismes intracel·lulars fan que s'expressin citocines que estimulen la immunitat cel·lular i els extracel·lulars activen les proteïnes del sistema del complement que indueixen una resposta humoral.

L'interferó- γ i la IL-2 constitueixen el patró d'expressió característic de les cèl·lules Th1, que regulen la resposta cel·lular, i les cèl·lules de tipus Th2, que ho fan sobre la humoral, expressen les IL-4, 5 i 13. Una resposta polaritzada en el sentit Th1 protegeix de les infeccions per virus i bacteris intracel·lulars. La resposta Th2 és important per la defensa contra alguns virus, bacteris capsulats i grans eucariotes extracel·lulars, com els helmints.

Les pròpies citocines constitueixen un mecanisme de regulació indispensable en el balanç de les respostes de tipus Th1 i Th2, segons el paradigma Th1/Th2⁸⁵.

Anticossos. Són glucoproteïnes complexes, elaborades pels limfòcits B, que es fixen als antígens microbians i, a continuació, activen les reaccions microbicides. Tenen una regió variable per on s'uneix a l'antigen, i una regió constant, responsable d'iniciar l'activació del complement, la citotoxicitat cel·lular anticòs-depenent o la fagocitosi. Les regions constants dels anticossos determinen les 5 classes d'immunoglobulines: IgM, IgG, IgA, IgD i IgE⁴⁹.

Els **limfòcits T** són més eficaços per controlar els patògens intracel·lulars. Els limfòcits T són activats per l'antigen exposat conjuntament amb l'antigen d'histocompatibilitat principal a la superfície dels macròfags i els limfòcits B. Poden diferenciar-se en cèl·lules T capaces d'estimular el desenvolupament de cèl·lules B i la síntesi d'immunoglobulines. També poden segregar proteïnes que activen les funcions microbicides i citotòxiques dels macròfags i les cèl·lules T citotòxiques. A l'igual que els macròfags, segreguen citocines proinflamatòries que produeixen febre, augmenten els nivells en sèrum dels reactants de fase aguda o estimulen la producció de leucòcits al moll d'os.

Els **limfòcits B CD 5** poden reconèixer antígens de patògens extracel·lulars mitjançant immunoglobulines de superfície, produint anticossos, majoritàriament IgM, dirigits contra antígens polisacàrids. Aquesta acció és, principalment, limfòcit T independent.

1.2. Mitjancers d'inflamació

Els mecanismes de la immunitat innata actuen de forma immediata en resposta a la infecció però no confereixen protecció a llarg termini⁸¹. La resposta immunitària innata produeix mitjancers d'inflamació que recluten noves cèl·lules fagocítiques als llocs d'infecció. Els neutròfils i els monòcits són atrets al lloc de la inflamació a través de l'acció de factors quimiotàctics, per tal d'exercir la seva activitat fagocítica al focus infectiu. L'extravassació es veu afavorida per molècules d'adhesió, fonamentalment selectines i integrines. El pas a través de l'endoteli, anomenat diapedesi, és també mitjançat per integrines i la migració a través dels teixits és mitjançada per quimiocines. Les citocines alliberades pels fagòcits activen la resposta de fase aguda.

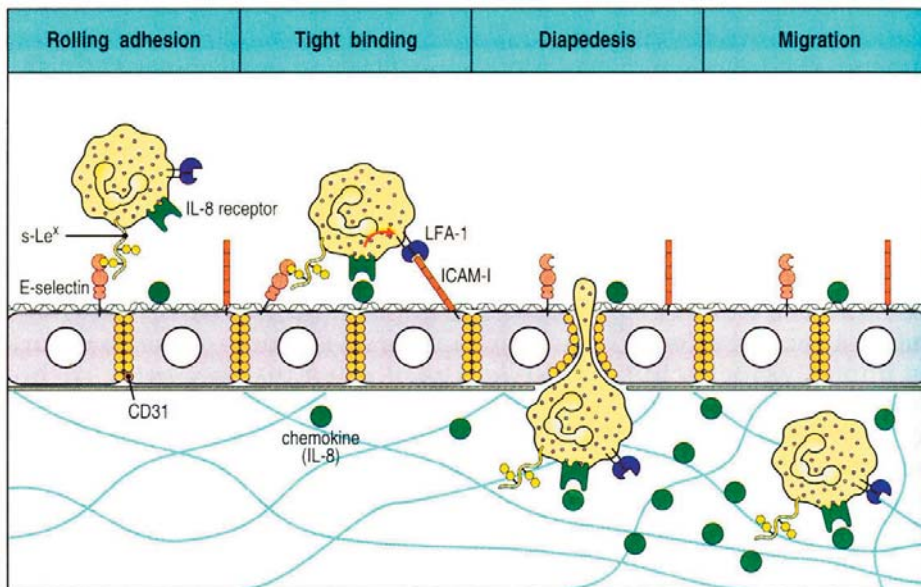


Figura 4. Arribada dels leucòcits als llocs d'inflamació mitjançant les interaccions entre molècules d'adhesió induïdes per citocines. En primer lloc, unió reversible mitjançant selectines (s-Le^x, sialil-Lewis^x moiety, lligand d'E-selectina), que permet el rodament per l'endoteli. A continuació unió ferma mitjançant integrines (LFA-1, *Lymphocyte function-associated antigen-1*; ICAM-1, *Intercellular adhesion molecules*), diapedesi, i migració cap a un gradient de factors quimiotàctics (ex. IL-8). De: Janeway-Travers. Immunobiology. The immune system in health and disease. Third ed. Churchill Livingstone.

Els efectes del conjunt de mitjancers alliberats pels fagòcits en resposta a components bacterians es coneixen col·lectivament com a resposta inflamatòria. Un gran nombre de molècules poden exercir funcions proinflamatòries i/o antiinflamatòries⁸⁶.

Molècules proinflamatòries		Molècules antiinflamatòries
TNF- α	Tromboxà	IL-1ra
IL-1 β	PAF	IL-4
IL-2	Molècules d'adhesió solubles	IL-10
IL-6	Neuropèptids vasoactius	IL-13
IL-8	Fosfolipasa A ₂	Receptor d'IL-1 tipus II
IL-15	Tirosin cinasa	TGF- β
Elastasa dels neutròfils	Inhibidor 1 de l'activador del plasminogen	Epinefrina
IFN- γ	Generació de radicals lliures	Receptors solubles de TNF- α
Proteïna cinasa	Neopterinina	<i>Leukotriene B₄-receptor antagonism</i>
MCP-1	CD14	CD14 recombinant soluble
MCP-2	Prostaciclina	LBP
<i>Leukemia inhibitory factor</i> (D-factor)	Prostaglandines	

Taula 2. Llistat parcial de molècules proinflamatòries i antiinflamatòries. Traduït de: Bone RC et al. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. Chest 1997;112:235-243.

TNF=*tumor necrosis factor*; MCP=*monocyte chemoattractant protein*; PAF=*platelet activating factor*; LBP=*lipopolysaccharide binding protein*; TGF=*transforming growth factor*

1.2.1. Molècules d'adhesió

La resposta immunitària, tant la seva inducció i regulació com la seva fase efectora, requereix de fenòmens d'adhesió cel·lular⁸⁷. Les molècules d'adhesió estan també implicades en la localització preferent de les cèl·lules immunitàries a certs teixits, cicatrització, metàstasis tumorals i trombosi. S'han identificat múltiples molècules d'adhesió cel·lular i s'han agrupat en quatre famílies principals: selectines, superfamília de les immunoglobulines, integrines i mucines.

La sèpsia i els mecanismes d'isquèmia-reperfusió produeixen activació de les cèl·lules endotelials, a través de la IL-8 i el PAF (*Platelet activating factor*), permetent que s'expressin a l'endoteli les molècules d'adhesió que controlen les relacions leucòcit-endoteli. Cal destacar-ne les **integrines** (ex. LFA-1, VLA-4, ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3) i les **selectines** (ex. L-selectina i E-selectina). Permeten l'adhesió i activació dels fagòcits, que produeixen un marcat efecte inflamatori. Les selectines exerceixen el seu paper en les etapes inicials de l'extravassació dels leucòcits i el rodament sobre l'endoteli (P-selectina i E-selectina per part de les cèl·lules endotelials i L-selectina per part dels leucòcits). Les integrines estarien implicades en la ferma adhesió que dona lloc a l'activació dels leucòcits i en la diapedesi⁸⁸. Són essencials, per a la seva funció, les següents característiques: a) posseeixen la capacitat d'incrementar reversiblement l'afinitat pel seu lligand, b) l'expressió dels receptors d'adhesió és variable en diferents tipus cel·lulars, c) l'expressió i funció d'aquestes molècules varia segons l'estat d'activació de les cèl·lules i d) en interaccionar amb el seu lligand són capaces de generar senyals intracel·lulars que influeixen sobre l'estat d'activació cel·lular⁸⁹.

1.2.2. Citocines

Les citocines són glucoproteïnes de baix pes molecular que actuen com a transmissores d'informació. La majoria són secretades per més d'un tipus cel·lular, i la majoria de cèl·lules productores secreten més d'un tipus de citocina. El terme citocina fa referència al seu origen cel·lular sense especificar el tipus de cèl·lula productora. El terme interleucina s'aplicaria a aquelles molècules que serveixen com a senyals de comunicació entre diversos tipus de leucòcits⁹⁰.

Les citocines generen els seus efectes mitjançant interaccions amb receptors ja presents en la superfície cel·lular, o bé induint la regulació de nous receptors. Són receptors en general d'elevada afinitat per la corresponent citocina, fent que puguin actuar a concentracions molt baixes. Hi han receptors de membrana i receptors solubles, com a resultat de la solubilització del fragment de receptor de membrana un cop s'ha unit a la citocina. Competeixen entre sí per la unió a la citocina, de manera que poden determinar la inhibició de la seva activitat biològica.

S'han establert quatre grups en base als seus efectes funcionals predominants⁹¹: 1) les que s'originen en la resposta immune innata i tenen, en general, caràcter proinflamatori, 2) les que regulen la resposta immune adaptativa i indueixen activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits cap a cèl·lules efectores, 3) les que tenen propietats immunodepressores i 4) les que regulen l'hematopoiesi. La classificació en citocines proinflamatòries i antiinflamatòries és una simplificació, donat que sovint presenten les dues activitats. En general, però, les citocines considerades clàssicament proinflamatòries (TNF, IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18, i diverses quimiocines, entre elles la IL-8) són mitjanceres de la immunitat innata i les considerades antiinflamatòries (IL-10, IL-4, IL-13, IL-6, TGF- β i G-CSF) són mitjanceres de la immunitat adaptativa. Les citocines implicades en la immunitat 1) inicien i amplien les respostes immune i inflamatòria mitjançant reclutament i activació cel·lular, 2) regulen l'activació i diferenciació dels limfòcits T i B, les funcions dels quals són crucials per la immunitat adaptativa i 3) inicien i regulen els processos de reparació local, crítics per a la resolució de les respostes inflamatòries.

Les funcions de les citocines es podrien agrupar en 1) canvis metabòlics, essent la febre el més representatiu, 2) augment de la síntesi de molècules defensives solubles, fonamentalment les proteïnes de fase aguda, 3) augment del nombre i de la funció fagocitària, estimulant la diferenciació de neutròfils i macròfags i també la síntesi de productes tòxics de l'oxigen i l'alliberament granular de molècules antimicrobianes, així com 4) l'augment de l'expressió de les molècules d'adhesió a les cèl·lules endotelials, neutròfils, monòcits i cèl·lules NK.

1.2.2.1. Citocines fonamentalment proinflamatòries

TNF- α . (*Tumor Necrosis Factor α*). Va ser la primera citocina identificada al sèrum de pacients amb septicèmia⁹². És produït fonamentalment per monòcits, macròfags i limfòcits. Actua iniciant la resposta inflamatòria, com a conseqüència dels canvis que indueix als vasos sanguinis locals: en primer lloc, incrementant el diàmetre vascular, que implica un

increment del flux sanguini i de la permeabilitat vascular, induint l'acumulació local de fluids, així com l'acumulació d'immunoglobulines i de complement. En segon lloc, indueix l'expressió de molècules d'adhesió (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) per part de les cèl·lules endotelials, capaces de lligar-se a la superfície dels monòcits i polimorfonuclears circulants, incrementant la proporció de cèl·lules fagocitàries que poden migrar cap al teixit infectat. Finalment, indueix l'expressió, per part de les cèl·lules endotelials, de molècules que estimulen la coagulació als petits vasos locals, ocluint-los per tal d'evitar que el patògen entri a la circulació sistèmica i es dissemini cap a altres òrgans. Si la infecció, si més no, es dissemina, l'alliberament sistèmic de TNF- α causa vasodilatació i pèrdua de volum degut a l'augment global de la permeabilitat vascular, conduint a un quadre de shock hipovolèmic. El TNF ha demostrat participar en la inducció de la sèpsia per gramnegatius⁹³ i també per grampositius⁹⁴. S'han descrit 3 formes de TNF, el TNF o caquectina, la limfotoxina- α , i la limfotoxina- β . La limfotoxina- α és una citocina produïda per limfòcits T que comparteix els receptors del TNF- α i també moltes de les seves activitats, però sembla alliberar-se únicament en la sèpsia per grampositius, donat que són els superantígens els que actuen com a activadors de cèl·lules T en aquestes circumstàncies⁹⁵.

IL-1. La IL-1 té dues formes: α i β . Presenten una homologia de només un 26% però actuen sobre un mateix receptor, sobre el que també competeix l'antagonista del receptor de la IL-1. Els macròfags activats són la principal font d'IL-1. És pirogen endogen, incrementant la temperatura corporal a través de la seva acció a nivell hipotalàmic. En presència de febre, la majoria de patògens disminueixen la seva capacitat de replicació, mentre que s'incrementa el processament dels antígens⁹⁶. Indueix la producció d'IL-6 per part de les cèl·lules de Kupffer hepàtiques.

IL-6. Diferents cèl·lules són capaces de sintetitzar la IL-6, incloent els monòcits/macròfags, els fibroblastes, les cèl·lules endotelials, els queratinòcits, els hepatòcits, les cèl·lules mastoïdals, les cèl·lules T i diverses línies cel·lulars tumorals⁹⁷. Qualsevol inflamació local s'associa a la producció sistèmica d'IL-6 però les cèl·lules productores varien en funció de la localització de la inflamació⁹⁸. El cDNA de la IL-6 codifica per un polipèptid de 212 aminoàcids, que és escindit en una proteïna madura de 184 aminoàcids. Degut a diferents graus de glicosilació i fosforilació, té un pes molecular entre 21.5 i 28 kDa. És també pirogen endogen. La IL-6 actua com un factor de diferenciació per les cèl·lules B i com un activador per les cèl·lules T. La IL-6 es considera una citocina proinflamatòria, però la majoria de les seves activitats estan probablement relacionades amb un control negatiu de la inflamació com a resultat de la seva potent capacitat d'induir la producció de proteïnes de fase aguda a càrrec dels hepatòcits⁹⁹, proteïnes amb la propietat de limitar el procés inflamatori via les seves activitats antiproteasa i *scavenger*. Nivells elevats d'IL-6 a sèrum es produeixen en diferents situacions, incloent sèpsia, malalties autoimmunes, limfomes, SIDA, hepatopatia alcohòlica i rebuig de trasplantament. Els nivells d'IL-6 són similars en sèpsia per grampositius i per gramnegatius.

La **IL-12** i la **IL-18** promouen la secreció de IFN- γ a càrrec de les cèl·lules NK, dirigint la immunitat específica cap a resposta Th1, caracteritzada per la producció de grans nivells de IFN- γ , hipersensibilitat retardada i defensa contra microorganismes intracel·lulars. La **IL-4** regula més aviat la resposta Th2.

Els **interferons** són un ampli grup de proteïnes caracteritzades per tenir una potent acció antivírica i antineoplàsica, així com un efecte regulador de les cèl·lules del sistema immune. Són produïts fonamentalment per cèl·lules T i cèl·lules NK, i la seva síntesi és induïda per la combinació d'IL-12 i IL-18. Es distingeixen alfa, beta i gamma, inicialment classificats segons les cèl·lules d'origen predominants (α , leucòcits; β , fibroblastes; γ , cèl·lules T)¹⁰⁰. Els interferons α i β actuen sobre un mateix tipus de receptor i són designats com interferó de tipus I. L'estímul més potent per a la seva producció és la infecció vírica i té capacitat per inhibir-ne la replicació. L'interferó- γ és produït per limfòcits T activats per superantígens o per virus i, en general, és crític en la defensa contra les infeccions intracel·lulars (micobacteris, *Leishmania*, *Toxoplasma*). Entre altres funcions, és capaç d'activar els neutròfils i els macròfags per produir òxid nítric i superòxid, a més d'augmentar l'expressió de molècules de classe I del complex major d'histocompatibilitat i receptors Fc. La combinació d'IFN- γ i TNF- α és sinèrgica en la inducció de NO¹⁰¹.

La **leptina** és un mitjancer implicat en la regulació del pes corporal i en la funció reproductora i, en general, l'homeostasi energètica/nutricional. Té també funcions com a citocina proinflamatòria i sembla ser l'enllaç entre l'estat nutricional i una resposta immune òptima¹⁰². No induïx la síntesi d'altres proteïnes de fase aguda, fet que la distingeix d'altres membres de la família d'IL-6¹⁰³. La immunosupressió associada a la malnutrició es relaciona amb nivells baixos de leptina, afectant bàsicament la immunitat cel·lular, i es perfila com una possible diana per a intervenció farmacològica¹⁰⁴. L'administració exògena de leptina ha donat bons resultats en models animals d'immunosupressió associada a restricció calòrica.

El **MIF** (*Macrophage migration inhibitory factor*) va ser una de les primeres citocines identificades, amb efectes sobre l'adhesió cel·lular i la fagocitosi¹⁰⁵. Inicialment es va pensar que s'expressava únicament en cèl·lules T, però és secretat per molts altres tipus cel·lulars, com monòcits/macròfags i fins i tot cèl·lules hipofisàries i adrenals. És una proteïna preformada, que s'emmagatzema en grànuls citoplasmàtics però també, a l'igual que altres citocines, se sintetitza *de novo* en resposta a estímuls com el lipopolisacàrid, les toxines de grampositius o els glucocorticoides. Durant la sèpsia tant les concentracions de MIF com les de glucocorticoides estan elevades, i sembla que MIF actua com a antagonista fisiològic de l'activitat glucocorticoide. Per tal de mantenir el balanç pro-antiinflamatori, el MIF exerceix efectes proinflamatoris tot revertint la inhibició de la síntesi de TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-8, així com de metabòlits de l'àcid araquidònic, que exerceixen els corticoides¹⁰⁶.

HMGB-1 (*High mobility group box-1*)^{107, 108} és una proteïna nuclear no histònica i també citoplasmàtica, tradicionalment coneguda com a fixadora del DNA i implicada en el manteniment de l'estructura del nucleosoma i la regulació de la transcripció. Posteriorment es va descriure la seva alliberació per macròfags activats i cèl·lules necròtiques i la seva funció com a mitjancer tardà (cinètica retardada en comparació amb IL-1 i TNF- α) en l'endotoxèmia, així com en la inflamació local. Les seves activitats biològiques inclouen l'activació dels monòcits/macròfags per alliberar citocines proinflamatòries, així com l'expressió de molècules d'adhesió a les cèl·lules endotelials. En models animals, la immunització amb anticossos anti-HMGB1 confereix disminució de la letalitat causada pel LPS.

TREM-1 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*)¹⁰⁹. És un receptor activador que és present a nivells elevats a neutròfils i monòcits que infiltren els teixits humans infectats per bacteris. Exerceix una funció crítica en la resposta inflamatòria aguda, i és una potencial diana per al tractament del shock sèptic. La forma soluble pot ser un candidat com a marcador d'infecció, havent-se trobat nivells elevats en pacients amb sèpsia¹¹⁰.

1.2.2.2. Citocines fonamentalment antiinflamatòries

IL-10. És produïda pels limfòcits de tipus Th2. Exerceix les seves propietats antiinflamatòries particularment sobre monòcits/macròfags, neutròfils, cèl·lules NK i limfòcits Th1¹¹¹, inhibint l'activitat del NF- κ B¹¹², i per tant la síntesi de IL-1 i IL-6 i del TNF- α així com augmentant l'expressió dels receptors solubles de TNF p55 i p75¹¹³. Inhibeix l'activació dels macròfags, la producció de radicals lliures, la generació d'espècies reactives de nitrogen, i l'expressió de mitjancers de la presentació antigènica com HLA-DR ó CD86. Inhibeix també la producció d'IL-12, estimula la proliferació de cèl·lules B i síntesi d'immunoglobulines, i dirigeix la immunitat específica cap a resposta Th2, caracteritzada per producció de grans nivells d'IL-4 i síntesi d'anticossos, particularment IgE. S'han descrit recentment un grup d'interleucines que s'han agrupat com a família de la IL-10: IL-19, IL-20, IL-22/TIF i IL-26⁹¹.

IL-1ra (*IL-1 receptor antagonist*) és un inhibidor natural de la IL-1 que competeix amb el receptor tipus I de la IL-1, produït per molts tipus cel·lulars, incloent monòcits/macròfags, però és també produït pel fetge com a proteïna de fase aguda¹¹⁴.

Els **receptors solubles de TNF- α** , tipus I ó p55 i tipus II ó p75, actuen com a inhibidors naturals de TNF, donat que competeixen amb els receptors units a membrana, prevenint la hiperestimulació de les cèl·lules diana.

La **IL-4** i la **IL-13** tenen també potents activitats antiinflamatòries i la capacitat d'inhibir la síntesi de citocines proinflamatòries. IL-4 promou la diferenciació de precursors de cèl·lules T cap a Th2, així com la inducció de limfòcits B.

El **TGF- β** (*Transforming growth factor- β*), és una proteïna de 25 kDa, produïda en forma inactiva per diversos tipus cel·lulars, essent les plaquetes una font especialment rica de TGF- β . Estimula la quimiotaxi de neutròfils i macròfags i l'alliberament de citocines proinflamatòries quan és secretada a nivell local, però exerceix activitats immunosupressores quan és secretada a nivell sistèmic¹¹⁵. La seva activitat més important és la regeneració de teixits danyats i remodelació òssia, però també generació de fibrosi en el curs d'inflamacions cròniques. S'ha implicat en la fisiopatologia de condicions associades a hiperinflamació tals com la malaltia inflamatòria intestinal o l'hepatitis crònica¹¹⁵. En un model murí d'endotoxèmia redueix els nivells de iNOs a nivell de RNA missatger i de síntesi de proteïna¹¹⁶, limitant la hipotensió induïda pel LPS.

Entre les citocines estimuladores de l'hematopoesi destaquen **IL-3**, **GM-CSF**, **G-CSF**⁹¹.

La IL-3, coneguda també com a multi-CSF, és produïda per limfòcits T activats i indueix proliferació i diferenciació de tots els progenitors hematopoiètics. G-CSF (*Granulocyte*

colony stimulating factor) i GM-CSF (*Granulocyte-monocyte colony stimulating factor*) són produïts fonamentalment per monòcits/macròfags, fibroblastes i cèl·lules endotelials⁹⁰. G-CSF té funcions en la regulació de la granulopoiesi i estimula la mobilitat, el metabolisme oxidatiu i l'activitat bactericida dels neutròfils¹¹⁷. El GM-CSF intervé en el creixement i diferenciació de cèl·lules hematopoietiques pluripotencials i estimula les activitats fisiològiques de neutròfils, eosinòfils i monòcits/macròfags. Poden reduir l'apoptosi natural dels neutròfils, però poden també amplificar la producció d'IL-1 i TNF i comportar-se com a citocines proinflamàtoies¹¹⁸.

1.2.3. Factors quimiotàctics

El moviment dels neutròfils cap al lloc de la infecció està regulat pels factors quimiotàctics, que estan produïts endògenament per cèl·lules epitelials o pels propis neutròfils, però també exògenament pel patogen invasor. Es divideixen en dos grans grups: les quimiocines i els anomenats factors quimiotàctics "clàssics" que inclouen els pèptids formilats derivats de bacteris, els fragments de complement C5a i C3a i molècules lipídiques com LTB4 (leucotriè B4) o PAF (*Platelet activating factor*). La interacció dels factors quimiotàctics amb els leucòcits inicia una sèrie de processos bioquímics i cel·lulars coordinats que inclouen alteracions en els fluids iònics, avidesa per integrines i potencials transmembrana, canvis en la forma cel·lular, secreció d'enzims lisosòmics i producció d'anions superòxid. Actuen en general a través de receptors units a proteïnes G (GPCRs: *G-protein-coupled receptors*)¹¹⁹.

1.2.3.1. Quimiocines

Són un conjunt de citocines amb característiques bioquímiques comuns que posseeixen propietats quimiotàctiques per als leucòcits^{62, 120}. Són proteïnes de baix pes molecular (8-12 kDa) produïdes per molts tipus cel·lulars (cèl·lules endotelials, monòcits i polimorfonuclears) en resposta a altres citocines (IL-1, TNF- α) o productes microbians. S'han identificat unes 50 quimiocines i més de 20 receptors de quimiocines¹²¹. Modulen l'expressió de molècules d'adhesió i exerceixen senyals quimiotàctics que promouen l'extravassació i migració dels leucòcits des de la sang cap al lloc de la inflamació, determinant el tipus d'infiltrat inflamatori. La característica bioquímica d'aquestes molècules és la conservació de quatre residus cisteïnics essencials per a la seva activitat. Depenent del nombre i de la relació seqüencial dels dos primers dels quatre residus de cisteïna conservats, se subclassifiquen en quatre famílies: CXC ó α -quimiocines i CC ó β -quimiocines i també CX3C i XC, però les més nombroses són les CXC i les CC. Les quimiocines s'uneixen a proteoglicans i a proteïnes de la matriu extracel·lular, on es creu que romanen immobilitzades al seu lloc de producció, sense passar a la circulació. L'expressió de quimiocines i els seus receptors és duta a terme mitjançant l'activació dels *toll-like* receptors, que activen el factor de transcripció NF- κ B.

El sistema de les quimiocines sembla ser un regulador crucial per a la circulació de cèl·lules dendrítiques i limfòcits necessària per a generar la resposta immune adaptativa: les cèl·lules dendrítiques activades per estímuls innats i carregades amb antígens foranis

viatgen als nòduls limfàtics regionals on activen els limfòcits T i B que tornaran cap al lloc d'inflamació¹²². El reclutament de Th2 és dut a terme per quimiocines induïdes per citocines Th2; el reclutament de Th1 és dut a terme per quimiocines induïdes per IFN- γ . A més, les quimiocines induïdes per limfòcits antígen-específics atreuen altres cèl·lules inflamatòries, com els fagòcits professionals, amplificant la resposta mitjançant la inclusió de cèl·lules efectores del sistema immune innat. D'aquesta manera, les quimiocines i els seus receptors actuen coordinant els interdependents sistema immune innat i adaptatiu.

Les quimiocines exerceixen la seva activitat biològica a través de receptors específics que pertanyen a l'ampli grup de la superfamília de receptors "serpentina" que s'uneixen a la proteïna G (GPCRs). Tots els identificats fins ara consten de 7 dominis transmembrana, N terminal extracel·lular i C-terminal intracel·lular⁶².

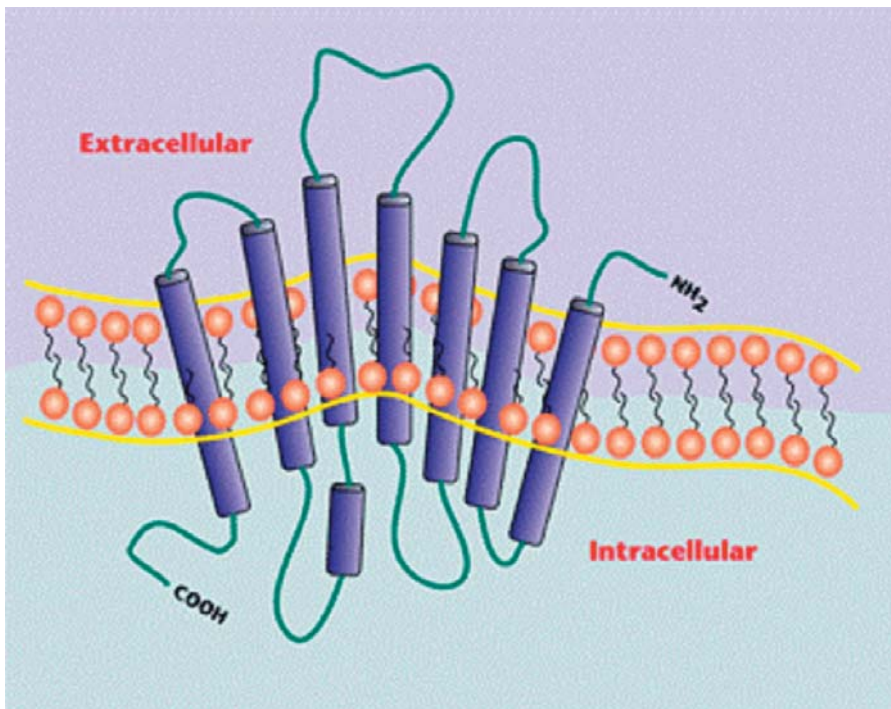


Figura 5. Representació esquemàtica dels receptors units a proteïna G (GPCR: *G-protein coupled receptor*), amb els set dominis transmembrana. Font: www.upstate.com

Es classifiquen també en funció de l'arranjament espacial dels residus de cisteïna¹²³. Els diferents tipus de leucòcits posseeixen una combinació única de receptors de quimiocines¹²⁴. En estat actiu, les proteïnes G es dissocien en subunitats $G\alpha$ i $G\beta$, aquesta última capaç de clivar PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfat) per formar IP3 (fosfatidilinositol trifosfat) i DAG (diacilglicerol). L'IP3 mobilitza calci des dels magatzems intracel·lulars, mentre DAG actua en conjunció amb calci per activar diverses isoformes de la proteïna cinasa C, que catalitza la fosforilació de proteïnes, donant lloc a respostes cel·lulars. S'han relacionat amb desordres com la psoriasi, esclerosi múltiple, artritis reumatoide, infecció pel VIH, aterosclerosi, reaccions d'hipersensibilitat, etc, oferint noves possibilitats terapèutiques

per aquestes malalties¹²⁵. No només s'expressen receptors a cèl·lules immunitàries sinó també a endotelials, epitelials, implicant acció en angiogènesi i en tumorogènesi.

La molècula més representativa de la família CXC és la **IL-8**. És una proteïna no glicosilada amb un pes molecular de 8 kDa. Una de les funcions biològiques més importants és la d'actuar com a factor quimiotàctic de neutròfils, induint degranulació i canvis morfològics. A més, té activitat quimiotàctica sobre eosinòfils i basòfils, i és un potent factor angiogènic. La IL-8 es produeix als monòcits/macròfags i a molts altres tipus cel·lulars, com les cèl·lules endotelials, les cèl·lules epitelials, els hepatòcits, els fibroblastes i els condrocits, a més de cèl·lules tumorals. És preferencialment induïda per agonistes específics del TLR-2 (peptidoglicà dels grampositius o zimosà dels llevats) però el seu alliberament pot ser induït per una gran varietat d'estímuls com el LPS, la IL-1, el TNF, virus i cristalls d'urat¹²⁰. S'han trobat nivells elevats d'IL-8 en sèpsia però també en processos com psoriasi, fibrosi quística, fibrosi pulmonar idiopàtica i artritis reumatoide.

La família de les quimiocines CC conté moltes molècules que s'han clonat recentment. Actuen sobretot sobre macròfags, i destaquen *Macrophage inflammatory protein (MIP)*, distingint 1 α i 1 β), *Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES)* i *eotaxina*, que indueixen cèl·lules NK i com a conseqüència coordinen el reclutament d'eosinòfils i de limfòcits. S'ha establert una nova nomenclatura en funció de la seva estructura i el lligand (ex. CXCL1), correlacionant amb el receptor.

1.2.4. Eicosanoids: prostaglandines, leucotriens, tromboxans, PAF.

Els tromboxans, elaborats per les plaquetes i els neutròfils activats, són agents que afavoreixen l'agregació plaquetar i l'arterioloconstricció. Les prostaciclines, elaborades per les cèl·lules endotelials, s'oposen a l'acció dels tromboxans, són vasodilatadores potents i augmenten la permeabilitat capilar. La producció de les prostaglandines clàssiques de la sèrie E (PGE₂) al centre regulador hipotalàmic cerebral dona lloc a la febre. Com a conseqüència de l'acció de les prostaglandines es produeix una lesió endotelial generalitzada, amb augment de la permeabilitat capilar, agregació plaquetar a la microcirculació, causant isquèmia que pot evolucionar a dany per reperfusió, activació de la coagulació i deteriorament de la via inhibidora de la proteïna C- proteïna S, i vasodilatació molt marcada.

Les fosfolipases juguen un paper fonamental en la resposta immune duta a terme pels neutròfils, destacant l'enzim **fosfolipasa A₂**, que hidrolitza els fosfolípids de membrana. Dóna lloc a la producció estequiomètrica d'àcids grassos lliures, fonamentalment l'àcid araquidònic, i lisofosfolípids. L'àcid araquidònic està implicat en la regulació de diverses respostes cel·lulars, incloent fluxes de calci i generació de superòxid a les cèl·lules fagocítiques¹²⁶. L'àcid araquidònic derivat dels neutròfils serveix de substrat per la 5-lipoxigenasa per generar el factor quimiotàctic leucotriè B₄. Si més no, a mesura que els neutròfils infiltren els teixits, també proporcionen araquidonat a les cèl·lules tissulars tot expressant 15-lipoxigenasa, que produeix **lipoxines**, eicosanoids amb activitat antiinflamatòria¹²⁷. Un altre producte és el **PAF** (*Platelet activating factor*), que constitueix també un dels factors quimiotàctics clàssics¹²⁸.

1.2.5. Òxid nítric i radicals lliures

L'òxid nítric (i en general els *reactive nitrogen intermediates*) és un dels mitjancers més versàtils del sistema immunitari¹²⁹. Està implicat en la patogènesi i control de les malalties infeccioses, tumors, processos autoimmunes i malalties degeneratives cròniques. És produït per 3 isoformes de NO sintases diferents: endotelial (eNOS) i neuronal (nNOS), que s'expressen constitutivament, i induïble (iNOS), que s'expressa sota l'estímul de citocines donant lloc a síntesi *de novo*. Els efectes del NO no estan restringits al seu lloc de producció i no interacciona amb un receptor definit sinó que pot reaccionar amb altres molècules inorgàniques, proteïnes o grups prostètics. La majoria de dianes són molècules reguladores, per tant els efectes són molt heterogenis. Pot ser alliberat per cèl·lules pertanyents al sistema immunitari però també per altres tipus de cèl·lules. Depenent de la citocina que actui, es pot promoure o inhibir l'expressió de la iNOS. També està regulada per immunocomplexes i per productes bacterians i vírics (proteïnes, lípids, polisacàrids). A més, el propi NO alliberat exerceix efectes reguladors sobre l'enzim per evitar-ne la sobreproducció. L'NO exerceix efectes citotòxics i vasodilatadors, amb la funció d'actuar en la defensa antimicrobiana. És capaç de lesionar els enzims responsables de la cadena respiratòria dels microorganismes, dificultant la utilització d'oxigen. També inhibeix l'adhesió de les plaquetes i dels leucòcits a l'endoteli. Igualment, pot modular la producció de quimiocines, i també participar en la regeneració tissular. Així, té efectes sobre la microcirculació (hipòxia hipòxica) i sobre la funció mitocondrial (hipòxia citopàtica)¹³⁰. Si més no, també té efectes citolítics sobre l'hostatger, i pot causar lesió endotelial. És un mitjancer fonamental en els canvis hemodinàmics del shock sèptic: hipotensió arterial per vasodilatació i funció cardíaca alterada per l'efecte depressor miocàrdic. La inhibició selectiva de iNOs (aminoguanidina) és, si més no, deletèria¹³¹.

1.2.6. Resposta de fase aguda

Els canvis sistèmics referits com a resposta de fase aguda es van descriure inicialment amb el descobriment de la proteïna C reactiva el 1930, anomenada així perquè reaccionava amb el polisacàrid C de *Streptococcus pneumoniae* en el plasma de pacients amb pneumònia pneumocòccica¹³². Es defineix com el conjunt de canvis, distants del lloc d'inflamació i implicant múltiples sistemes, que poden acompanyar el procés inflamatori, amb l'objectiu de restaurar l'homeostasi, tot intentant eliminar el microorganisme o procés que ha motivat l'alteració, i iniciar el procés de reparació. La resposta de fase aguda es pot dividir en canvis (increment o disminució) en les concentracions de diverses proteïnes plasmàtiques, conegudes com a proteïnes de fase aguda, així com canvis a nivell neuroendocrí (febre, somnolència, augment de secreció de cortisol i catecolamines), hematopoiètics (anèmia, leucocitosi, trombocitosi) i metabòlics (augment del catabolisme de proteïnes, de la lipogènesi, lipolisi i gluconeogènesi)^{99, 133}. Les condicions que donen lloc a canvis en les concentracions plasmàtiques de proteïnes de fase aguda inclouen la infecció, traumatismes, cirurgia, cremades, infarts tissulars, malalties autoimmunitàries i neoplàsies. Poden produir-se variacions fins i tot en situacions tals com l'exercici físic extenuant, malalties cerebrovasculars o el naixement. Les principals proteïnes de fase

aguda, enteses com aquelles que augmenten o disminueixen la seva concentració en un 25% durant els desordres inflamatoris¹³⁴, es resumeixen a la taula 3⁹⁹.

Les diverses variacions en els nivells de proteïnes de fase aguda s'expliquen per la regulació de la seva síntesi hepàtica a càrrec de citocines específiques o els seus moduladors en diferents estats patofisiològics. La IL-6 és l'estimulador de la producció de la majoria de proteïnes de fase aguda, mentre que les altres citocines n'influencien determinats subgrups. Si més no, en processos infecciosos, components com el lipopolisacàrid poden causar la producció d'altres citocines capaces d'estimular la producció de proteïnes de fase aguda. S'han descrit dues famílies de reactants de fase aguda: classe I, que són induïdes per la IL-1 sinèrgicament amb la IL-6 (incloent proteïna C reactiva i MBL), i classe II, que són induïdes únicament per la IL-6, mentre que la IL-1 no té cap efecte o bé és inhibitori (antiproteases, alfa2-macroglobulina i fibrinogen). Es distingeixen també les regulades per glucocorticoides, i els factors de creixement. Les citocines regulen l'expressió gènica de proteïnes de fase aguda, i els glucocorticoides i factors de creixement regulen fonamentalment la secreció de citocines¹³³. El fetge no és l'únic òrgan productor de proteïnes de fase aguda; la ceruloplasmina, els components del complement o SAA tenen una producció extrahepàtica.

Proteïnes que augmenten la seva concentració en sèrum		Proteïnes que disminueixen la seva concentració en sèrum
<p>Sistema del complement C3, C4, C9, Factor B, inhibidor de C1, C4b <i>binding protein</i>, <i>Mannose-binding lectin</i></p> <p>Sistema de coagulació i fibrinolisi (fibrinogen, plasminogen, activador tissular del plasminogen, proteïna C, proteïna S, urocinasa, vibronectina, inhibidor 1 de l'activador del plasminogen)</p> <p>Antiproteases (inhibidor de l'α_1 proteasa, α_1-antiquimotripsina, inhibidor de la secreció pancreàtica de tripsina)</p>	<p>Proteïnes transportadores (haptoglobina, ceruloplasmina, hemopexina)</p> <p>Participants en resposta inflamatòria (fosfolipasa A₂ secretada, LBP, antagonista del receptor de la IL-1, G-CSF)</p> <p>Altres Proteïna C reactiva Amiloide A del sèrum α_1- acid glicoproteïna fibronectina ferritina angiotensinogen</p>	<p>Albúmina Transferrina Transtretina α_2-HS- glicoproteïna α-fetoproteïna <i>Thyroxine-binding-globulin</i> <i>Insulin-like growth factor I</i> Factor XII.</p>

Taula 3. Proteïnes de fase aguda. Adaptat de: Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340(6):448-54.

Quan l'estímul que desencadena la resposta de fase aguda és la infecció, aquestes proteïnes incrementen el nombre i funció de les cèl·lules fagocitàries, faciliten l'alliberament de components humerals i cel·lulars als llocs d'inflamació, i dirigeixen la resposta immune antigen-específica. L'activació del sistema de proteïnes de fase aguda contribueix a l'aparició dels símptomes de la sèpsia i el shock sèptic, com la febre, la hipotensió i els trastorns de la coagulació. La resposta de fase aguda està mitjançada per

cèl·lules T gamma-delta, reaccions de defenses humorals preexistents i per la producció *de novo* de molècules reguladores com són les citocines, quimiocines, prostaglandines i altres eicosanoids, hormones, i també per fagòcits, limfòcits i cèl·lules endotelials. Un cop desencadenades, les interaccions esdevenen molt complexes, acumulant-se un ampli repertori de mitjancers de la inflamació. Les cinines, C3a, C5a i la histamina alliberades pels mastòcits, els metabòlits de l'àcid araquidònic, les proteases i els productes amb oxigen alliberats pels neutròfils, monòcits i macròfags activats poden contribuir a les alteracions vasomotores característiques de la sèpsia i participar en la lesió dels capilars. La funció de la resposta de fase aguda s'entèn com a beneficiosa, en tant que permet l'adaptació a l'estímul que l'ha desencadenada. Si més no, quan els canvis són extrems, la resposta pot ser fatal, com el shock sèptic. La resposta de fase aguda no només exerceix una important activitat antimicrobiana sinó que també senta les bases pel desenvolupament de la immunitat adquirida. Amb l'objectiu de controlar els potencials efectes deleteris de la resposta de fase aguda, se secreten també algunes proteïnes amb funcions anti-inflamatòries, com per exemple la ceruloplasmina amb funció antioxidant contra la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROI) o els inhibidors de proteases per frenar l'excessiva destrucció¹³³. La regulació negativa de la resposta de fase aguda implica els glucocorticoides, o citocines com IL-4 i IL-10, i els antagonistes dels receptors de les citocines proinflamatòries (IL-1Ra i IL-6Ra).

1.3. Diagnòstic de la infecció

1.3.1. Clínica

La malaltia infecciosa és l'expressió clínica de la infecció i indica que els microorganismes no només estan presents i es repliquen sinó que a més provoquen a l'hostatger alguna perturbació, de manera que apareixen signes i símptomes d'infecció. La resposta inflamatòria està dissenyada per confinar la infecció a l'òrgan on s'ha originat, i les citocines i quimiocines han de tenir un efecte autocrí o paracrí, però si passen a la circulació exerceixen un efecte endocrí, donant lloc a una resposta inflamatòria sistèmica. El desenvolupament de sèpsia a partir d'una infecció local depèn del balanç entre l'inòcul bacterià i la seva virulència per una banda, i la immunocompetència de l'hostatger per l'altra.

La sèpsia és un conjunt de canvis humorals i cel·lulars com a resposta a la invasió de microorganismes. La sèpsia i les seves seqüeles representen estadis progressius de la mateixa malaltia, una resposta sistèmica mitjançada per citocines derivades de macròfags⁸⁶. La resposta inflamatòria generalitzada pot ser desencadenada, a més de per agents infecciosos, per altres situacions com traumatismes, cremades o pancreatitis. Aquesta resposta s'anomena **SIRS** (Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica) i consisteix en una reacció inflamatòria generalitzada a òrgans remots de l'insult inicial. Hi intervien les citocines proinflamatòries (mitjançat per Th1), essent les més importants TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ i el PAF. Els aminoàcids procedents del catabolisme muscular s'utilitzen per la síntesi de cèl·lules defensives i proteïnes. També s'incrementa la producció d'hormona estimulants del tiroides, vasopressina, insulina i glucagó.

Simultàniament (i no a continuació com s'havia postulat inicialment) s'inicia una resposta antiinflamatòria amb l'objectiu de limitar l'efecte lesiu de la sèpsia als diferents òrgans i modular els efectes de l'alliberament de citocines proinflamatòries. Les citocines antiinflamatòries són IL-4, IL-10, IL-11 i IL-13 (mitjançada per Th2), que disminuiran els nivells de TNF- α i IL-1. També s'elevan els nivells dels antagonistes dels receptors de la IL-1 (IL-1Ra), els receptors solubles de TNF- α , el TGF- β i el cortisol¹³⁵. El receptor soluble CD14 actua també inhibint la resposta inflamatòria. La resposta clínica a una àmplia varietat d'agressions greus que limita i antagonitza l'efecte inflamatori rep el nom de síndrome de resposta antiinflamatòria compensatòria (**CARS**, *Compensatory antiinflammatory response syndrome*). Es caracteritza per una disminució en la capacitat dels monòcits de produir citocines inflamatòries i per una reducció a <30% de l'expressió de l'antigen leucocitari humà HLA-DR a la superfície dels monòcits. Els leucòcits responen pitjor al LPS i els pacients són més susceptibles a infeccions secundàries.

En condicions normals, l'organisme és capaç d'assolir un balanç entre els mitjancers inflamatoris i antiinflamatoris, i es restaura l'homeostasi. L'evolució clínica dependrà de l'estímul que ha desencadenat la infecció així com de la resposta de l'organisme a la infecció. L'homeostasi alterada en la sèpsia greu es recupera més fàcilment quan SIRS i CARS estan equilibrats. Es parla també de **MARS** (*Mixed antagonists response syndrome*) que consisteix en signes de SIRS en un pacient amb CARS⁸⁶. Durant la inflamació sistèmica, SIRS i CARS semblen estar presents concomitantment, el SIRS predominant als teixits inflamats, mentre en sang els leucòcits mostren hiporreactivitat¹³⁶. Probablement, la resposta antiinflamatòria sistèmica no és només compensatòria sinó que domina fora del lloc d'inflamació local per tal de prevenir la inflamació sistèmica excessiva¹³⁷.

Si predomina l'efecte inflamatori (SIRS) es progressa a la disfunció orgànica (MODS), es manté el shock sèptic i s'evoluciona cap a l'apoptosi. La durada de la malaltia pot donar lloc a un estat de desordres metabòlics en què l'organisme no té control sobre la seva pròpia resposta inflamatòria. L'alliberament excessiu de citocines dóna lloc a efectes deletèris: els efectes tòxics de la injecció de TNF- α inclouen inestabilitat hemodinàmica, febre, diarrea, acidosi metabòlica, activació de la coagulació, hipoglucèmia, inducció d'estat catabòlic, neurotoxicitat, caquèxia i desordres renals i hematològics¹³⁸. La injecció d'IL-1 dóna lloc a augment de la freqüència cardíaca, leucopènia, trombocitopènia, hemorràgia i edema pulmonar¹³⁹. Les quimiocines, amb la seva funció quimiotàctica reclutant fagòcits, afavoreixen el dany tissular provocat per aquests. L'IFN- γ presenta una activitat sinèrgica amb les activitats deletèries del LPS, tot induint la síntesi de TNF. Així, una infecció vírica silent pot donar lloc a hipersensibilitat a l'endotoxina dels gramnegatius mitjançant l'activació de cèl·lules T i subseqüent producció d'IFN- γ , donant lloc a hiperproducció de TNF¹⁴⁰. Una resposta sistèmica exagerada pot donar lloc a dany a òrgans que no estan implicats en el focus primari de la infecció. A les localitzacions de major activitat infecciosa és possible observar agregats de neutròfils i macròfags així com un augment generalitzat de la permeabilitat capilar. La implicació del sistema cardiovascular dóna lloc a hipotensió: les lesions per hipoperfusió són més evidents en òrgans en què el flux no és preferencial en cas de baixa despesa cardíaca: fetge amb lesions isquèmiques centrelobulilars, mucosa gàstrica i intestinal amb isquèmia i ulceracions i ronyó amb necrosi tubular aguda. El shock pot afectar l'endoteli dels capilars dels alvèols pulmonars i ocasionar en primer lloc edema intersticial i, posteriorment, edema intraalveolar i exsudació de fibrina que es deposita a la superfície de les parets alveolars formant les "membranes hialines". Aquestes lesions

alveolars difoses constitueixen el pulmó de shock o síndrome de *distress* respiratori de l'adult (SDRA).

Si predomina l'efecte antiinflamatori (CARS) es produeix una depressió de la funció monòcitària, donant lloc a immunosupressió amb anèrgia i augment de susceptibilitat a noves infeccions. Es considera fase d'immunoparàlisi, en què els pacients serien tributaris de tractament immunoestimulador¹⁴¹. Si més no, la reducció de la capacitat dels leucòcits circulants per produir citocines no és un defecte global, i termes com immunoparàlisi o anèrgia poden resultar excessius, es tractaria més aviat de "reprogramació" dels leucòcits¹⁴².

La **conferència de consens** de 1992¹⁴³ va permetre definir conceptes com bacterièmia, sèpsia, sèpsia greu i shock sèptic, permetent establir un diagnòstic de l'estadi evolutiu de la síndrome, per tal d'establir diferents pautes de tractament en funció d'aquest, i permetre disminuir-ne la morbiditat i mortalitat. Les definicions es van confirmar en la conferència de consens del 2001¹⁴⁴.

- o **Infecció:** Resposta inflamatòria a la presència de microorganismes
- o **Bacterièmia:** és la presència de bacteris viables a la sang. La presència de virus, fongs o paràsits rep el nom de virèmia, fungèmia i parasitèmia respectivament. Pot ser deguda a l'existència d'un focus infecciós en algun lloc de l'organisme o bé al pas transitori de microorganismes al torrent circulatori per altres circumstàncies, com són instrumentacions realitzades amb finalitats diagnòstiques i/o terapèutiques.
- o **Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS).** És una reacció inflamatòria generalitzada que pot ser de causa infecciosa, però que també pot tenir lloc en altres processos com: pancreatitis, isquèmia, grans cremats, hemorràgies, malalties autoimmunitàries, politraumatismes. Es manifesta mitjançant dos o més dels següents signes: 1. temperatura central $>38^{\circ}\text{C}$ ó $<36^{\circ}\text{C}$; 2. freqüència cardíaca >90 batecs/minut; 3. freqüència respiratòria >20 respiracions/minut ó $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$ i 4. recompte leucocitari amb més de $12 \cdot 10^9/\text{L}$ o menys de $4 \cdot 10^9/\text{L}$, o fòrmula amb més del 10% de formes immadures.
- o **Sèpsia.** Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica degut a una infecció. Requereix la presència de dos o més criteris de SIRS i ser degut a infecció.
- o **Sèpsia severa.** Sèpsia que cursa amb alteració de la perfusió orgànica i un o més dels següents signes: acidosi làctica ($>2\text{mmol/L}$), oligúria ($<30\text{mL/h}$) o alteracions mentals agudes (agitació, confusió, obnubilació)
- o **Shock sèptic:** Sèpsia que cursa amb hipotensió, malgrat una correcta expansió de volum i amb trastorns de la perfusió orgànica. Els pacients que reben fàrmacs inotròpics o amines poden no estar hipotensos però continuen presentant alteracions en la perfusió d'algun òrgan.
- o **Síndrome de disfunció multiorgànica secundari a sèpsia (MODS)** Afectació de diferents òrgans en un pacient agut greu, en el què la homeostasi no pot mantenir-se sense intervenció mèdica.

Es considera que hi han cinc fases per al desenvolupament de **disfunció orgànica múltiple**⁸⁶:

- o **reacció local al lloc d'infecció** (o traumatisme, cremada, pancreatitis): alliberament de mitjancers proinflamatoris amb l'objectiu de destruir teixit danyat, promoure el creixement de nou teixit i combatre microorganismes patògens, cèl·lules neoplàsiques o antigens foranis; s'inicia també resposta antiinflamatòria amb l'objectiu de disminuir l'expressió monocítica del complex major d'histocompatibilitat classe II i de reduir la capacitat de les cèl·lules de produir citocines inflamatòries. Els nivells locals d'aquests mitjancers poden ser més elevats que els que després es trobaran a nivell sistèmic;
- o **resposta sistèmica inicial**; si l'insult inicial és suficientment sever, es trobaran en circulació nivells de mitjancers primer proinflamatoris i després antiinflamatoris;
- o **inflamació sistèmica massiva**, que es manifesta per les troballes clíniques del SIRS, i que es caracteritza per una progressiva disfunció endotelial donant lloc a augment de la permeabilitat vascular, agregació plaquetar (*sludging*), inducció de *heat shock proteins*, activació del sistema de la coagulació i alteració de la via proteïna C-proteïna S, profunda vasodilatació i transsudació de fluids;
- o immunosupressió excessiva, que s'ha anomenat "**immunoparàlisi**" i que és el resultat d'un CARS excessiu amb una disminució de l'expressió d'HLA-DR a la superfície dels monòcits;
- o **dissonància immunològica**, és una resposta inapropiada del sistema immunomodulador, amb excessiva inhibició de la síntesi d'agents proinflamatoris necessaris per permetre la recuperació dels òrgans.

1.3.2. Eines diagnòstiques

Etiologia. El diagnòstic es basa en els símptomes i signes, així com en dades de laboratori (bioquímiques i hematològiques) però el diagnòstic de seguretat de la sèpsia és microbiològic, mitjançant l'aïllament de l'agent etiològic a l'hemocultiu i/o a mostres del focus de la sèpsia, o bé mitjançant la detecció d'antígens o anticossos per tècniques immunològiques. Algunes tècniques ràpides permetran el diagnòstic immediat, com la tinció de Gram de mostres del focus com els líquid cefalorraquidi, pleural o ascític, o bé la detecció d'antigen en fluids biològics, o la detecció d'anticossos mitjançant tècniques serològiques ràpides. Si més no, en un gran nombre de casos, els resultats no seran immediats donat que no sempre és possible aconseguir mostres adequades del focus de la sèpsia i les tècniques d'aïllament requeriran un processament i un temps d'incubació. A més, no sempre és possible assolir un diagnòstic etiològic; els hemocultius negatius no exclouen la sèpsia bacteriana donat que freqüentment el pacient ha rebut antibioteràpia prèvia i determinades infeccions (com per exemple les pneumònies) són bacterièmiques només en un baix percentatge. Així, davant la sospita de sèpsia, el diagnòstic es basa inicialment en les dades clíniques (símptomes i signes generals o bé símptomes propis del focus d'infecció), dades analítiques (recompte leucocitari i fórmula: leucocitosi o leucopènia amb desviació a l'esquerra, trombocitopènia i hiperfibrinogenèmia, alteracions de l'equilibri àcid-base). Si més no, hi ha moltes situacions en què aquesta informació serà insuficient. Les manifestacions clíniques, així com els paràmetres analítics, especialment el recompte

leucocitari, es veuen modificats o absents en individus immunodeprimits (neutropènics, trasplantats, infectats pel VIH, cirròtics, pacients en tractament amb glucocorticoides, etc) o són de difícil interpretació en determinats grups d'edat com nens o ancians, així com en aquells malalts que ja presenten un grau de resposta inflamatòria basal no secundària a infecció (post-operats, cremats, malalts amb *distress* respiratori o amb processos inflamatoris crònics com la malaltia inflamatòria intestinal o l'artritis reumatoide, etc).

Severitat. Els criteris clínics i microbiològics són encara insuficients per identificar el grau de resposta inflamatòria que ha de permetre definir la població que es beneficiaria de mesures adjuvants. La utilització d'índexs de gravetat basats en les alteracions clíniques i bioquímiques com per exemple l'APACHE-II (*Acute physiology and chronic health evaluation*) permeten determinar la gravetat i el pronòstic dels pacients amb sèpsia¹⁴⁵. La sèpsia segueix essent causa d'elevada mortalitat malgrat els avenços en les tècniques de diagnòstic i tractament i el millor coneixement de la seva fisiopatologia¹⁴⁶. Els patrons d'expressió genètica de mitjancers, així com els perfils de citocines trobades en sèrum poden ser diferents en funció del microorganisme implicat, i els índexs d'estratificació no ho tenen en compte. La resposta als patògens microbians varia depenent del patògen¹⁴⁷ o producte microbià específic, la seva concentració i la durada de l'exposició¹⁴⁸.

1.3.3. Diagnòstic diferencial

Quadres similars al produït per la infecció sistèmica es produeixen en altres situacions en què s'allibera TNF- α . Es tracta de les lisis tumorals espontànies o per quimioteràpia, la rabdomiolisi aguda, les lesions del sistema nerviós central, ja siguin traumàtiques o per accidents vasculars, així com quadres d'hipertonia muscular amb febre i obnubilació (hipertèrmia maligna, síndrome neurolèptica maligna). Aproximadament el 90% dels pacients ingressats a una unitat de cures intensives pateixen una síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS), i sovint és deguda a causes no infeccioses: pancreatitis tòxica, grans cremats, politraumatismes, etc. S'han trobat nivells d'endotoxina elevats, de manera que un cop s'ha desencadenat la SIRS es considera que hi ha una disfunció de la barrera intestinal que dona lloc a translocació bacteriana i productes bacterians de la llum intestinal desencadenen la sèpsia¹⁴⁹. Cal distingir-la també del shock hipovolèmic i del shock cardiogènic.

Els criteris clínics i microbiològics són, doncs, insuficients per definir l'etiologia en determinades ocasions però, sobretot, per definir el grau d'inflamació. Han anat adquirint progressiva importància la mesura dels marcadors d'inflamació¹⁵⁰ i, particularment, dels reactants de fase aguda com a marcadors d'infecció, amb resultats variables.

1.3.4. Mesura de la resposta de fase aguda

La **mesura de citocines** en plasma és difícil, tot i que les tècniques d'immunoanàlisi són molt senzilles, però la seva vida mitja en plasma és curta, i la presència de factors bloquejants (receptors solubles d'interleucines) pot falsejar-ne la mesura. A més, són molt poc estables *in vivo* i *ex vivo*, dificultant les tècniques de determinació. La citometria

de flux permet estudiar l'expressió d'una citocina per part d'un tipus cel·lular concret que pot ser identificat mitjançant l'ús de marcadors de superfície específics. La majoria dels immunoassajos, però, poden detectar mitjancers circulants però no aquells que es troben units a cèl·lules o receptors. De fet, la producció compartimentalitzada correspon a la major quantitat de les citocines secretades, i no pas les circulants¹⁵¹. Les anàlisis immunohistoquímiques dels teixits, així com la detecció de RNAm han revelat la presència de citocines a molt variades localitzacions orgàniques. Les tècniques que s'utilitzen per mesurar l'activitat funcional de les citocines sovint tenen poca especificitat o poden sobreestimar la quantitat de mitjancer present¹⁵².

De tota manera, existeix abundant bibliografia sobre la utilitat de la mesura de citocines en la monitorització de la sèpsia. En la sèpsia per gramnegatius podem trobar nivells elevats d'IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, receptors solubles d'IL-1 i TNF, , IL-1ra (IL-1 *receptor antagonist*) i IL-10. Els nivells plasmàtics d'IL-6 s'han correlacionat amb sèpsia, i s'ha demostrat correlació amb severitat¹⁵³. La IL-8 és detectable al compartiment sanguini durant la sèpsia¹⁵⁴. Els nivells locals d'IL-8 es correlacionen amb el nombre de neutròfils. Altres citocines, com IL-18, els CSF o el TGF- β mostren resultats més controvertits¹³⁶. Els nivells d'IL-2, IL-15 ó IL-12, tot i que sovint detectables en plasma, no tenen ben caracteritzada la seva importància clínica.

Les **proteïnes de fase aguda** són més estables, tenen una vida mitja més llarga, i les tècniques de determinació són més reproduïbles.

1.3.4.1. Velocitat de sedimentació globular (VSG)

La VSG és també un marcador utilitzat amb freqüència, com una mesura indirecta dels nivells plasmàtics de diversos reactants de fase aguda, particularment de les alteracions en els nivells de fibrinogen que influeixen en l'agregació eritrocitària. Pot estar influenciada pel tamany, forma i nombre dels eritròcits, donant lloc a falsos positius i falsos negatius quan existeix anèmia, policitèmia o altres alteracions en la sèrie eritrocitària, així com per altres constituents plasmàtics com les immunoglobulines. Així, els resultats són imprecisos i de vegades confosos. S'eleva més lentament que la proteïna C reactiva i pot trigar setmanes en recuperar els nivells normals. S'utilitza com a indicador d'activitat en processos inflamatoris crònics però no necessàriament com a conseqüència d'infecció. Donat que el fibrinogen és directament mesurable, ja no és necessària la mesura de la VSG.

1.3.4.2. Proteïna C reactiva (CRP)

És un marcador molt sensible d'inflamació, que s'ha utilitzat àmpliament en diverses situacions clíniques¹⁵⁵. El seu mecanisme d'acció és la unió a la fosfocolina¹⁵⁶, exposada als components fosfolipídics de cèl·lules danyades (per exemple al lloc d'unió de la fosfocolina de les proteïnes de la matriu extracel·lular com fibronectina o laminina)¹⁵⁷, així com a la membrana dels bacteris, amb la funció d'opsonització i activació del complement. És capaç de prevenir l'adhesió dels neutròfils a les cèl·lules endotelials mitjançant el descens

de l'expressió de L-selectina a la seva superfície, per tal d'inhibir la generació de superòxid pels neutròfils, i estimular la síntesi de l'antagonista del receptor de la IL-1 per les cèl·lules mononuclears. La proteïna C reactiva i el SAP (*Serum amyloid P*) són els dos membres de la família de les pentraxines que circulen en sèrum¹⁵⁸. Com a funcions biològiques, és una opsonina mitjancera de fagocitosi, activa la via clàssica del complement a través de C3, i augmenta la producció de citocines a càrrec dels monòcits¹⁵⁷. La proteïna C reactiva augmenta en la resposta inflamatòria aguda, incloent infeccions víriques i infeccions bacterianes localitzades, essent el paràmetre més útil en aquests cassos, així com en inflamacions cròniques, com l'artritis reumatoide, utilitzant-se com a marcador d'activitat. Les tècniques de determinació són molt senzilles però la seva vida mitja és llarga, i pot mantenir-se elevada fins i tot dies després de finalitzat el procés inflamatori, presentant limitacions per a la monitorització terapèutica i pronòstica a curt termini.

1.3.4.3. Neopterina

La neopterina és una 2-amino-4-OH-pteridina. Se sintetitza als monòcits/macròfags¹⁵⁹ així com a les cèl·lules dendrítiques¹⁶⁰ en resposta a l'interferó gamma, que és secretat pels limfòcits T. Actua com a mitjancer de la immunitat cel·lular. Les concentracions de neopterina reflexen el grau d'activació de les cèl·lules Th1. S'ha utilitzat fins i tot la mesura de neopterina en sèrum com a marcador indirecte de l'activitat de l'interferó després de la seva infusió amb finalitats terapèutiques, tant IFN- α ¹⁶¹ com IFN- β ^{162, 163}. Donat que l'IFN- γ també estimula l'alliberament d'espècies reactives d'oxigen (ROI) a càrrec de les cèl·lules immunocompetents, la quantitat de neopterina produïda és també un indicador indirecte de l'estrès oxidatiu¹⁶⁴. En models experimentals s'ha vist que l'estimulació de cèl·lules de múscul llis amb neopterina o TNF- α causava l'expressió del gen de l'òxid nítric sintasa induïble i per tant la producció d'òxid nítric¹⁶⁵. Així, és possible que contribueixi a l'alliberament excessiu d'òxid nítric que es produeix durant la sèpsia i la conseqüent apoptosi cel·lular¹⁶⁶. La citotoxicitat mitjançada per l'òxid nítric s'exerceix fonamentalment a través de la nitració de la tirosina a càrrec del peroxinitrit. Entre els diferents derivats de la pteridina, la neopterina és el que exerceix un major increment de la nitració en interaccionar amb el peroxinitrit¹⁶⁴. L'endotoxèmia derivada de la translocació bacteriana des del budell que es produeix durant la sèpsia o durant la disfunció multiorgànica que segueix les hemorràgies severes, traumatismes i cremades sembla donar lloc a la formació i alliberament de mitjancers d'inflamació com la neopterina¹⁶⁷. Els nivells de neopterina als fluids biològics estan elevats en infeccions mitjançades per la immunitat cel·lular¹⁶⁸, malalties autoimmunitàries, neoplàsies, rebuig de trasplantament, malaltia coronària i desordres neurològics^{169, 170}.

1.3.4.4. Procalcitonina (PCT)

Una primera publicació al 1983 constata els nivells elevats de calcitonina en sèrum en pacients amb la síndrome del shock tòxic estafilocòccic¹⁷¹, i a partir d'aquí es van iniciar múltiples estudis sobre la implicació dels precursors de calcitonina en la inflamació. Des de la descripció de la procalcitonina al 1993¹⁷², múltiples estudis han demostrat la seva utilitat com a marcador específic d'infecció bacteriana sistèmica.

Síntesi. La procalcitonina (PCT) és un pèptid de 116 aminoàcids, precursor de la calcitonina. Procedeix del gen CALC-I, situat al cromosoma 11, que dona lloc, per *splicing* alternatiu, al CGRP (*Calcitonin gene related peptide*) a cèl·lules del sistema nerviós central, i a la pre-pro-calcitonina a les cèl·lules C del teixit tiroïdal. La PCT secretada és ràpidament clivada per dipeptidases en un pèptid de 114 aminoàcids i, posteriorment, dona lloc a la calcitonina hormonalment activa (38 aas), el carboxipèptid de la calcitonina o katalcalcina (21 aas) i el segment N-terminal o aminoprocalcitonina (57 aas). En condicions normals se sintetitza a les cèl·lules C de la glàndula tiroïdes i cèl·lules neuroendocrines de pulmó, i l'hormona madura s'emmagatzema en grànuls secretors i s'allibera de forma regulada¹⁷³.

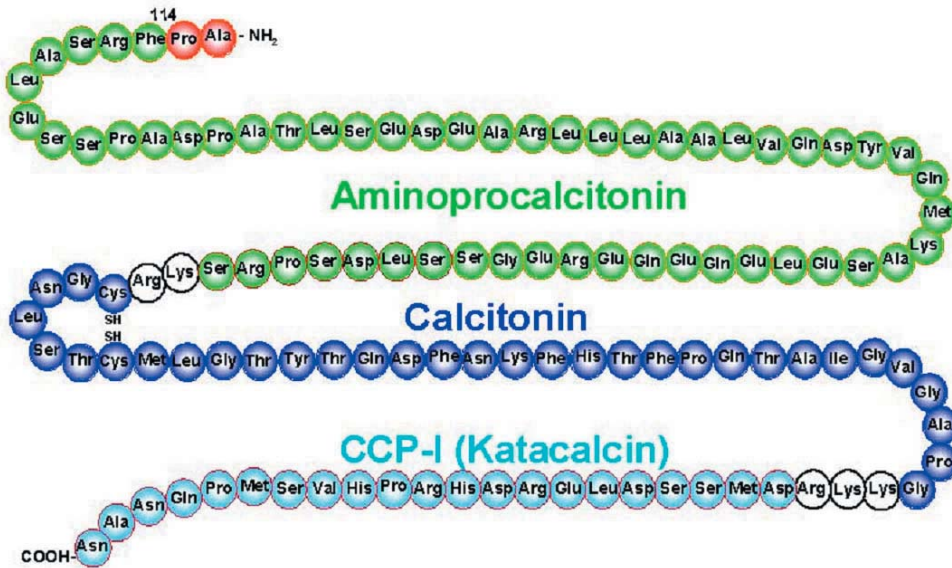


Figura 6. Seqüència d'aminoàcids de la procalcitonina. CCP-I (*calcitonin carboxypeptide*) De: Christ-Crain, M and Muller B. Procalcitonin in bacterial infections-hype, hope, more or less? Swiss Med Wkly 2005;135:451-60

Si més no, durant les infeccions severes, és capaç de sintetitzar-se a teixits extratiroïdals, fonamentalment a cèl·lules parenquimatoses sense grànuls secretors, de forma que la PCT és secretada de forma constitutiva, no regulada. Inicialment es van considerar les cèl·lules del sistema mononuclear fagocític com la font més probable, tot i que amb resultats contradictoris^{174, 175}, després d'observar la seva elevació en condicions sèptiques fins i tot en pacients tiroïdectomitzats¹⁷². L'elevació de PCT en pacients neutropènics¹⁷⁶ va fer dubtar d'aquesta hipòtesi. Mitjançant citometria de flux (marcatge intracel·lular amb anticossos anti-calcitonina i anti-catalcalcina) s'ha demostrat la seva presència en monòcits i també en polimorfonuclears durant la infecció¹⁷⁷. La hipòtesi més probable és, si més no, que els leucòcits no són la font predominant de síntesi de PCT, sinó que la producció és generalitzada a nivell multiorgànic durant el procés sèptic: en models animals s'ha observat la producció de PCT en una gran varietat d'òrgans després de l'estímul amb LPS, tant en un model de peritonitis en hamster¹⁷⁸ com en primats (babuí)¹⁷⁹ demostrant la seva síntesi a múltiples teixits extratiroïdals després de la injecció d'endotoxina, essent absent en controls. En el model en primats, es troben concentracions de PCT per sobre de 0.2 ng/g de teixit humit en gran nombre d'òrgans, destacant fetge, ronyó, aorta, teixit

adipós, ovaris, bufeta i glàndula adrenal¹⁷⁹. En aquest estudi, l'anàlisi de RNAm mitjançant RT-PCR permet demostrar la seva síntesi en aquests òrgans, i descartar que es tracti d'una troballa com a conseqüència de vies d'excreció (ex fetge i ronyó), o per unió de la PCT al seu putatiu receptor en aquests òrgans. Finalment, un estudi utilitzant preparacions de cDNA de diversos teixits humans, detecta expressió de RNAm de PCT i CGRP-I a budell prim, timus, bufeta urinària, pulmó i fetge i, en menor quantitat, a cervell, cor, ovari o leucòcits¹⁸⁰. Es considera que les cèl·lules parenquimatoses, incloent adipòcits, fetge, pulmó, cervell i cèl·lules musculars, constitueixen la principal font de PCT durant la sèpsia¹⁸¹. De fet, la major part de mitjancers, fonamentalment les citocines, són secretats a múltiples teixits durant el procés sèptic⁹⁸.

S'ha considerat la PCT com una proteïna de fase aguda d'acord amb un estudi que mesura la inducció a càrrec de TNF- α o IL-6 en pacients tractats amb aquestes citocines, i també en un model de cultiu cel·lular hepàtic huma¹⁸². Des de fa molt de temps es coneix l'expressió del gen de calcitonina al fetge¹⁸³. S'ha proposat també el terme de "*hormokine*"¹⁷⁸ per a aquest tipus de mitjancer, donat que productes del gen de calcitonina són produïts com a hormones de forma teixit-específica en individus no infectats, però durant la infecció es produeixen en òrgans no endocrins i amb propietats, bàsicament el patró d'expressió, similars a les citocines¹⁸¹. S'ha vist que la PCT trobada al sèrum de pacients sèptics és 2 aminoàcids més curta (PCT₃₋₁₁₆), mancant els primers dos aminoàcids (Ala-Pro)¹⁸⁴.

S'ha observat la síntesi de PCT, tant en voluntaris sans^{185, 186} com en models experimentals^{174, 179} sota l'estímul de l'endotoxina bacteriana, concretament el fragment lipopolisacàrid. No es descarta, però, que altres productes bacterians produeixin el mateix efecte, o que la síntesi de PCT sigui secundària a la inducció de TNF per part del LPS¹⁸⁷, havent-se observat també rera l'estímul amb grampositius com a inductor de TNF¹⁷⁷. En aquestes circumstàncies, les citocines inflamatòries com el TNF- α i la IL-6 alterarien el *triage* de l'aparell de Golgi i donarien preferència a la síntesi de precursors de la calcitonina d'alt pes molecular. Així, durant les infeccions severes s'alliberen altres precursors de la calcitonina en major o menor grau¹⁸⁸, però la PCT n'és el principal. Paral·lelament, s'ha demostrat que l'interferó, incloent IFN- γ , pot actuar com a potent inhibidor de la inducció del gen CALC-I mitjançada per IL-1 β ¹⁸¹. La cinètica de la PCT consisteix en una inducció molt ràpida en resposta a un estímul, dins de les primeres 2-6 hores. Després d'un increment inicial, els valors depenen del balanç entre la seva vida mitja a plasma (aproximadament 25-30 hores) i la nova producció de PCT¹⁸⁵. En el sèrum normal, els nivells són de l'ordre de 0.19 fmol/mL¹⁷³.

La **funció** de la PCT durant les infeccions severes és encara subjecte d'estudi. S'ha plantejat la hipòtesi de la seva intervenció en el metabolisme fosfo-càlcic, com l'hormona a la que dona lloc quan se sintetitza en condicions fisiològiques¹⁸⁹, en la regulació de la síntesi d'òxid nítric, responsable de la hipotensió durant la sèpsia¹⁹⁰, així com la regulació de l'alliberament de TNF^{177, 191} o la quimiotaxi¹⁹².

Indicacions. S'han descrit múltiples aplicacions de la PCT com a marcador d'infecció bacteriana sistèmica. La seva utilitat en infeccions fúngiques o parasitàries és més controvertida. Les principals indicacions consistirien, en general, en distingir la resposta inflamatòria deguda a infecció bacteriana sistèmica de la deguda a infecció vírica, infecció bacteriana localitzada i reacció inflamatòria a estímuls no infecciosos. Aquest paràmetre

resultarà especialment útil en situacions en què les manifestacions clíniques siguin més inespecífiques, com és el cas d'edats extremes de la vida (nens i ancians), immunodeprimits, i pacients que ja presenten una resposta inflamatòria basal no secundària a infecció: post-quirúrgics, traumàtics, grans cremats, distress respiratori, neoplàsies, etc.

Podríem resumir les indicacions de la determinació de PCT en:

- o Diagnòstic d'infecció bacteriana amb inflamació sistèmica:
 - infecció bacteriana sistèmica versus localitzada,
 - infecció bacteriana sistèmica versus vírica,
 - inflamació d'origen bacterià o no bacterià en pacients amb resposta inflamatòria alterada (nens i ancians, pacients immunodeprimits i pacients crítics).
- o Control de teràpia i curs de les infeccions bacterianes: una resposta adequada al tractament antibiòtic produirà un ràpid descens dels nivells de PCT, tenint en compte la seva vida mitja de 25-30 hores. Si els nivells de PCT es mantenen elevats, és indicatiu de mal pronòstic.

1.3.4.5. Lypopolysaccharide binding protein (LBP)

La LBP és una proteïna de 58 kilodaltons produïda al fetge¹⁹³. Després del primer contacte del bacteri amb les cèl·lules immunitàries, el lipopolisacàrid (que actua com agent pirogen dels gramnegatius) s'allibera de la membrana bacteriana. La LBP, que en principi és sempre present al torrent sanguini, es fixa al LPS amb gran afinitat i n'actua com a proteïna transportadora cap a cèl·lules immunoefectores que exposin el receptor CD14 a la seva superfície¹⁹⁴. El complex LBP-LPS és capaç d'activar específicament els monòcits/macròfags mitjançant el receptor CD14. Tot plegat condueix a l'alliberament de citocines proinflamatòries, que regulen l'activació de la resposta immunitària. A més, les citocines indueixen la producció de les proteïnes de fase aguda, és a dir també una producció augmentada de LBP. Els canvis en els nivells sèrics de LBP tenen efectes en l'habilitat de l'hostatger per reaccionar a l'estímul de l'endotoxina, i defensar-se contra la sèpsia. S'ha descrit que també pirògens dels bacteris grampositius, com l'àcid lipoteicoic, s'uneixen a LBP i duen a l'activació de les cèl·lules immunitàries. Les persones sanes presenten uns nivells d'aproximadament 5-20 µg/mL. Un increment indica, en principi, la participació de bacteris. També la **BPI** (*Bactericidal/permeability-increasing* protein), una proteïna de 55kD emmagatzemada als grànuls azurofíllics i també expressada en la membrana dels neutròfils, participa en la regulació de l'activació d'aquestes cèl·lules en resposta al LPS¹⁹⁵. Alguns assajos en pacients crítics mostren elevació de LBP i BPI (i no sCD14) en cas de bacterièmia demostrada, tant per grampositius com per gramnegatius, i correlació amb la gravetat¹⁹⁵. Altres estudis, però, el mostren com un marcador no específic, que no permet distingir entre causes infeccioses i no infeccioses de SIRS¹⁹⁶. S'ha avaluat LBP també com a predictor de SIRS, ja sigui de causa infecciosa o no, mostrant una bona correlació en comparació amb voluntaris sans, però s'exclouen pacients sotmesos a cirurgia prèvia, o a tractament immunosupressor¹⁹⁷. Pacients amb sèpsia severa presenten nivells més elevats de LBP, sense associació amb el tipus de microorganisme causant ni amb els

nivells d'endotoxina¹⁹⁸. Es considera que causes no infeccioses d'endotoxèmia com la circulació extracorpòria o fallida de la barrera mucosa intestinal amb translocació bacteriana per hipoperfusió o isquèmia regional poden donar lloc a elevació dels nivells de LBP¹⁹⁵. D'altra banda, la lenta cinètica d'inducció i eliminació fa que no sigui un bon marcador de la severitat de la resposta inflamatòria.

La mesura dels nivells d'**endotoxina** mitjançant *Limulus amoebocyte lysate reactivity assay*, estan sotmeses a múltiples variabilitats¹⁹⁹, presentant limitada sensibilitat i especificitat¹⁹⁹. La recentment desenvolupada i aprovada per la FDA (*Federal Drug Administration*) tècnica de quimioluminiscència per a la mesura d'endotoxina, sembla de major utilitat pel seu elevat valor predictiu negatiu, permetent descartar la infecció per gramnegatius²⁰⁰. Si més no, es tracta d'un marcador unidimensional, indicant la presència d'infecció, però no la severitat de la resposta de l'hostatger, i dona lloc a algunes inespecificitats⁵. Es considera, a més, que els nivells detectables estan subestimats donat que es troba lligada en gran quantitat a plaquetes, eritròcits i monòcits⁹⁸.

1.3.4.6. Amiloide A del sèrum (SAA)

SAA es va identificar inicialment com una proteïna circulant que reaccionava amb anticossos contra el pèptid constituent de la fibril·la amiloide A²⁰¹. Es considera que SAA és la proteïna precursora circulant de la proteïna amiloide A que es troba als dipòsits d'amiloide. És una proteïna de 104 aminoàcids i un pes molecular de 12kD. La SAA es produeix al fetge com a proteïna de fase aguda en resposta a citocines proinflamatòries, però també s'ha descrit la seva expressió en teixits extrahepàtics, i està sotmesa a diversos mecanismes de regulació²⁰². Exerceix funcions en el metabolisme de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), actuant com a apoproteïna i intervenint en la unió i neutralització del lipopolisacàrid²⁰³, així com activitats immunomoduladores, tals com inhibició del metabolisme oxidatiu, i inducció de mecanismes d'adhesió i quimiotaxi, presuntament mitjançant *G-protein coupled receptors*, suggerint-se FPRL1 com el més probable²⁰⁴. Si més no, sembla que les funcions de la SAA recombinant i la proteïna de fase aguda difereixen substancialment. Es considera que durant infeccions localitzades, SAA és produïda per cèl·lules epitelials amb la funció de neutralitzar el LPS i altres productes bacterians hidrofòbics; durant la inflamació sistèmica, és produïda al fetge i s'allibera a la circulació com a proteïna de fase aguda. El complex SAA-LPS és neutralitzat per HDL amb la funció de detoxificació²⁰⁵. Si la inflamació persisteix o té lloc una expressió incontrolada de SAA es produeix la deposició tissular d'amiloide a diversos òrgans, com a conseqüència d'un canvi conformacional de SAA cap al pèptid insoluble AA.

1.3.4.7. Fosfolipasa A₂

Fosfolipasa A₂ és un grup d'enzims secretoris i també intracel·lulars que alliberen fosfolípids com un pas inicial en la resposta inflamatòria i exerceixen també funcions en la digestió. Es distingeix la fosfolipasa A₂ secretora, de baix pes molecular (sPLA₂), i la fosfolipasa A₂ citosòlica, d'alt pes molecular (cPLA₂). Intervenien en el metabolisme de l'àcid araquidònic, és a dir la regulació de la síntesi d'eicosanoids: prostaglandines, leucotriens i *Platelet*

activating factor (PAF)²⁰⁶. La sPLA₂-II s'ha utilitzat com a marcador d'inflamació, i predictor de complicacions sistèmiques. S'ha associat, juntament amb SAA, amb la fisiopatologia de l'aterosclerosi, i modulació de l'expressió de CD40, que pertany a la família de receptors de TNF-alfa²⁰⁷. Sembla ser, però, que és la forma citosòlica (cPLA₂) l'enzim predominantment implicat en l'alliberament d'eicosanoids durant la inflamació.

1.4. Tractament

1.4.1. Tractament etiològic: antibiòtics, pèptids antibiòtics, bacteriòfags

El tractament de la infecció inclou agents antimicrobians i, si és possible, tractament quirúrgic del focus de la infecció. A més, especialment en el cas d'infecció sistèmica, cal un suport funcional dels òrgans afectats, suport hemodinàmic, suport nutricional i mesures profilàctiques per reduir les complicacions. El manteniment precoç de la pressió arterial i la saturació d'oxigen permet millorar la supervivència²⁰⁸. Si més no, l'encara elevada mortalitat atribuïda a la sèpsia, i l'increment d'infeccions per microorganismes multirresistents, ha dut a explorar nous agents farmacològics. Agents alternatius com els **pèptids antibiòtics** s'estan estudiant com a possibles tractaments: presenten menor citotoxicitat per baixa inducció de resposta inflamatòria, ampli rang de patògens susceptibles, majors especificitat i índex terapèutic. La inducció de resistències és molt baixa o nul·la, perquè caldria canviar la conformació de la membrana del microorganisme, i és molt improbable. Una de les aplicacions amb més futur és la teràpia gènica antiinfecciosa, tot i que el cost és encara massa elevat. Un altre problema és el delicat equilibri entre la flora bacteriana local i els pèptids antibiòtics^{70, 209}. També s'ha reactivat l'estudi de l'ús de **bacteriòfags** com a agents antimicrobians²¹⁰.

Cada cop és més clara la necessitat d'una combinació terapèutica, intervenint en les diferents branques del procés fisiopatològic de la sèpsia, tenint en compte la necessitat d'intervenir sobre l'agent infeccios, però també sobre la resposta inflamatòria desencadenada per l'hostatger²¹¹.

1.4.2. Tractaments immunomoduladors

La recerca d'agents immunomoduladors ha anat adquirint progressiva importància en el disseny de noves teràpies antiinfeccioses. En les darreres dècades, l'interès s'ha centrat en incrementar la supervivència tot dissenyant estratègies que permetin prevenir la cascada de resposta als productes bacterians. D'altra banda, en pacients immunodeprimits, la reconstitució de la resposta immune mitjançant administració exògena de citocines o bé la transfusió de fagòcits al·logènics amb citocines sembla prometedora per administrar per exemple juntament amb teràpia antifúngica en micosis invasives. També la potencial inhibició dels efectes supressius exercits per citocines antiinflamatòries¹¹⁷. L'administració de citocines s'ha utilitzat com a tractament adjuvant en diverses patologies. S'ha utilitzat teràpia complementària amb IFN-γ per a la reducció del nombre d'infeccions severes en

la malaltia granulomatosa crònica, la infecció disseminada per micobactèries atípiques o la leishmaniasi visceral²¹². L'administració d'IL-2 com a adjuvant en el tractament crònic de la infecció per VIH ha aportat beneficis en la reconstitució de la resposta immunitària²¹³. Cal destacar també l'ús terapèutic de G-CSF i GM-CSF en pacients neutropènics²¹⁴. Agents bloquejants de les activitats biològiques d'IL-1 o TNF- α han mostrat beneficis com a tractaments crònics per reduir la severitat de malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide, la malaltia de Crohn o la psoriasi: els processos d'emigració de neutròfils via increment de la producció de molècules d'adhesió endotelials i de quimiocines són els mateixos en un teixit infectat o en una inflamació crònica. La producció de citocines en la defensa de l'hostatger està regulada, mentre que en una malaltia crònica està desregulada²¹⁵. Si més no, algunes citocines proinflamatòries són essencials per la resistència natural contra microorganismes específics, especialment els patògens intracel·lulars com *Mycobacterium* o *Listeria* i s'ha observat increment d'infeccions oportunistes associades amb la neutralització de TNF- α ²¹⁶, tot i que pot estar influenciat per les dosis i ritme d'administració²¹⁵.

L'ús de teràpies similars en la sèpsia i el SIRS, si més no, no han mostrat un clar efecte en disminució de la morbiditat i mortalitat²¹⁷. Fins al moment els resultats obtinguts no han aportat beneficis clínics evidents, no han augmentat els índexs de supervivència²¹⁸⁻²²⁰, tot i que alguns assajos clínics han mostrat reducció de la mortalitat mitjançant l'administració de diversos tractaments coadjuvants en particular, com la proteïna C activada recombinant (rhAPC: *recombinant human activated protein C*) i altres teràpies anti-coagulació, amb resultats prometedors^{221, 222} o l'ús de suplement corticoide en cas de fallida adrenal²²³. En general, si més no, els bons resultats obtinguts en models animals no s'han reproduït en assajos clínics, tot i que agrupats en metaanàlisi mostren una petita però significant millora de la supervivència²²⁴.

Els motius pels pobres resultats individuals, si més no, poden ser atribuïbles a diversos factors²¹⁸:

- En primer lloc, existeix gran variabilitat interespècies en l'alliberament de citocines i és difícil extrapolar resultats d'estudis animals als humans. No hi ha cap model animal que recapituli totalment el perfil de presentació local i sistèmic de la sèpsia en humans.
- En segon lloc, els criteris utilitzats per la inclusió de pacients no sempre són prou adequats. Sovint s'han exclòs pacients amb símptomes menors de disfunció orgànica o símptomes de menys de 24-48 hores d'evolució. A més, el *timing* i dosi d'administració no sempre han estat els adequats i la diana elegida no té perquè ser la idònia: els intents s'han basat en l'assumpció de que l'antagonisme d'un sol mitjancer antiinflamatori pot modular la cascada d'aconteixements que constitueix la sèpsia en un grup heterogeni de pacients. També s'han ignorat les condicions preexistents que puguin haver induït mitjancers proinflamatoris; alguns dels agents testats no eren suficientment potents per bloquejar el mitjancer d'interès o estaven dirigits a mitjancers que no tenen importància crucial en determinar la millora clínica. A més, tot i que s'han utilitzat com a diana mitjancers específics, com l'endotoxina, IL-1 o TNF- α , que són considerats amb paper fonamental en la cascada inflamatòria que condueix a fallida orgànica, la presència de nivells elevats d'aquest marcadors

no era requerida per entrar a l'estudi. Cal un millor coneixement dels efectes depenents de la concentració de citocines per dissenyar fàrmacs que reverteixin els efectes perjudicials de les citocines inflamatòries sense bloquejar els seus efectes beneficiosos en la lluita contra la infecció.

- En tercer lloc, donat que calia incloure els pacients en una fase precoç del curs clínic, els resultats microbiològics no eren disponibles, i retrospectivament només una part dels pacients tenien bacterièmia documentada. La majoria dels assajos no han tingut en consideració el temps d'evolució del procés infecció ni la seva localització anatòmica (a diferència dels models animals). Cada cop hi ha major evidència de que la resposta inflamatòria induïda per diferents patògens té característiques pròpies. L'ús satisfactori de teràpies antiinflamatòries requereix d'un millor coneixement dels mitjancers implicats en la seva inducció inicial¹⁴⁸. Els patrons de citocines i mitjancers alliberats poden ser diferents en funció de l'especificitat dels patògens i de les vies de reconeixement implicades: per exemple hi han diferències entre cascades inflamatòries de grampositius i gramnegatius²²⁵. Per tant, les immunoteràpies també han de ser específiques en funció del patogen incitant.

Un estudi mitjançant metaanàlisi dels diferents assajos practicats, tant en fase pre-clínica en models animals com en fase clínic en pacients amb sèpsia²¹⁹ posa de relleu que les discrepàncies poden ser també degudes a la no inclusió del risc de mort: els agents antiinflamatoris són més efectius en pacients amb alt risc de mort, i poden ser perjudicials si el risc és baix, assessorat per índexs com l'APACHE (*Acute physiology and chronic health evaluation*). Agents com la proteïna C activada han demostrat la màxima eficàcia en pacients amb alt risc de mort. Es a dir, quan el risc de mort es elevat, inhibir una resposta inflamatòria excessiva millora la supervivència; d'altra banda, quan el risc es baix, alterar la resposta inflamatòria que està funcionant correctament resulta perjudicial. Així, els assajos clínics han d'incorporar criteris com el *risk prediction scores* per assegurar que els pacients que es poden beneficiar de tractaments antiinflamatoris siguin inclosos, i que aquells que poden ser desfavorits siguin exclosos. El desenvolupament de mètodes que puguin definir millor aquesta població d'alt risc augmentarà l'eficàcia dels agents antiinflamatoris²²⁶.

Diferents agents immunomoduladors:

Els **glucocorticoides** exerceixen els seus efectes antiinflamatoris per diversos mecanismes, tant genòmics com no genòmics, destacant la inhibició de la transcripció dels gens de citocines, en part via interacció amb NF- κ B^{227, 228}. Si més no, l'expressió de MIF, amb activitat proinflamatòria, és més induïda que no pas inhibida pels glucocorticoides¹⁰⁶. També són capaços d'inhibir l'alliberament d'àcid araquidònic, mitjançant la inducció de la proteïna annexina 1²²⁹. El seu ús en el tractament de la sèpsia ha tingut resultats variables; no es pot recomanar el seu ús generalitzat²³⁰ tot i que han mostrat especialment bons resultats en cas d'insuficiència suprarenal²²³. L'èxit o fracàs dels estudis publicats depèn del tipus d'agent glucocorticoide i la dosi utilitzada. En general sembla més recomanable l'ús de dosis baixes (200-300 mg) d'hidrocortisona en períodes de 5-11 dies i no pas dosis altes de dexametasona. S'estan duent a terme diversos estudis al respecte, destacant l'estudi CORTICUS (*Corticosteroid Therapy of Septic Shock*)²²³.

Les **teràpies antiendotoxina** inclouen les inespecífiques, com les immunoglobulines endovenoses (IVIG), i les específiques, com els anticossos contra el lípid A muri (E5) i humanitzat (HA1A). L'administració d'IVIG ha mostrat neutralització dels efectes de les citocines induïdes per superantígens en la sèpsia per grampositius²³¹. Els anticossos específics antiendotoxina no han mostrat beneficis clínics. Els candidats ideals són sèpsies per gramnegatius no evolucionades. Altres teràpies més específiques contra els receptors de productes bacterians, com l'ús de BPI (*Bactericidal permeability increasing protein*)²³² o teràpies capaces d'interrompre la senyalització, implicant a LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*), poden ser efectives en condicions com la meningococcèmia, en què l'alliberació d'endotoxina juga un paper fonamental en la disfunció orgànica i la mort²³³. Altres potencials dianes són fragments de CD14 soluble que competeixin amb la unió al LPS i els seus productes o els *toll-like* receptors i els seus lligands¹⁸, així com les molècules de senyalització intracel·lular com el MyD88.

Anticossos neutralitzants de citocines²³⁴. El bloqueig de les dues principals citocines proinflamatòries, IL-1 i TNF- α , amb bons resultats en inflamacions cròniques²³⁵⁻²³⁷, s'ha explorat en el tractament de la sèpsia, donat que es consideren responsables de la dramàtica hipotensió observada en el shock sèptic com a conseqüència de l'activació de l'expressió gènica i síntesi de la iNOs. Si més no, la producció compartimentalitzada de les citocines il·lustra que els tractaments bloquejants poden afectar distintament diferents compartiments. Els resultats han estat, en general, modestos.

L'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1ra) és un inhibidor natural d'IL-1 que s'uneix competitivament al receptor de la IL-1. L'anakinra (IL-1ra recombinant) ha mostrat resultats conflictius en el tractament de la sèpsia, tot i que en un estudi retrospectiu inclouent el risc de mort els beneficis són més clars²³⁸. S'esperaria també eficàcia en pacients amb nivells molt elevats d'aquesta citocina.

Les **teràpies anti-TNF** inclouen anticossos monoclonals contra TNF (infiximab, etanercept, adalimumab), tots ells en ús clínic en inflamacions cròniques²¹⁵, o bé proteïnes de fusió en què la porció extramembrana (p55 o bé p75) del receptor de TNF està unida al fragment Fc d'una IgG1 humana. Els resultats en el tractament de la sèpsia han estat pobres. Només un estudi que inclou pacients amb nivells elevats de TNF presenta discreta disminució de la mortalitat²³⁹. Els resultats han estat millors en la prevenció de la reacció de Jarisch-Herxheimer²⁴⁰.

Estan en estudi o s'han assajat intervencions a gairebé tots els nivells del procés sèptic^{211, 234}: antagonistes del PAF, de la bradixinina, inhibidors de la ciclooxygenasa (ibuprofè), inhibició terapèutica del complement (anticòs monoclonal anti-C5a), inhibidors de molècules d'adhesió (anticossos monoclonals contra integrines presents als leucòcits o contra els seus lligands expressats a l'endoteli), inhibidors d'òxid-nítric sintasa, antioxidants, inhibidors de citocines més recentment descrites (anti-MIF, anti-HMGB-1) i fins i tot molècules bacterianes inhibidores de la quimiotaxi⁴⁰. Altres agents que disminueixen la síntesi de citocines²³⁴: pentoxifilina, talidomida, clorpromazina.

Els darrers anys s'han desenvolupat també antagonistes de receptors de quimioquinas¹²⁵ alguns dels quals es troben en fase clínica, tot i els freqüents exemples de reactivitat

creuada amb altres GPCRs, com els receptors d'amines (adrenoreceptors i receptors muscarínics).

Finalment, alguns **polimorfismes genètics** fan que augmenti la susceptibilitat a la sèpsia. La susceptibilitat individual a la infecció ve també determinada per factors genètics predisposants, que venen determinats bàsicament per variants genètiques de mitjancers endògens, amb especial rellevància pels gens de les citocines, però també receptors de patrons moleculars, factors de la coagulació, del complement o gens essencials en els fenòmens d'apoptosi²⁴¹. Per exemple s'ha descrit major susceptibilitat individual a la resposta als superantígens i per tant a la sèpsia severa per grampositius en relació a elements immunogenètics com els gens de l'HLA de classe II²⁴². La capacitat genètica d'alliberament de citocines pot donar lloc a un ampli ventall de manifestacions d'una mateixa malaltia infecciosa. Els gens candidats a aquests polimorfismes són els de TNF i IL-1. El coneixement de la predisposició genètica a la infecció pot donar lloc a noves aproximacions terapèutiques²⁴³.

En general, la manca de requeriment d'infecció demostrada ni de nivells elevats del mitjancer diana, així com la manca de diferenciació segons l'agent etiològic i d'inclusió del risc de mort, poden haver fet que els resultats dels tractaments assajats siguin poc positius. Caldria classificar els pacients en base a anormalitats demostrables en vies de senyalització bioquímiques o immunològiques que permetin la inclusió més precoç, no quan ja hi ha presentació clínica irreversible. El desenvolupament de tècniques que permetin mesurar el nivell d'activació de la resposta immune innata ha de permetre identificar pacients que es beneficiarien de teràpies immunomoduladores, probablement una combinació de tractaments dirigits contra diverses branques del procés sèptic²¹¹. Els tractaments haurien d'anar dirigits a pacients molt seleccionats, amb els criteris d'inclusió molt ben acotats.



JUSTIFICACIÓ

2. JUSTIFICACIÓ

Malgrat la disponibilitat de tècniques diagnòstiques cada cop més ràpides i acurades i tractaments antibiòtics d'ampli espectre, en la pràctica clínica diària es presenten situacions d'encara difícil resolució en el diagnòstic i tractament de les malalties infeccioses. En les darreres dècades s'ha fet evident la necessitat de marcadors que permetin mesurar la resposta inflamatòria, però cal tenir en compte un seguit de factors.

1. La sèpsia és encara responsable d'elevada morbiditat i mortalitat, atribuïble probablement a un tractament insuficient, que no acostuma a incloure el control de la resposta inflamatòria. El maneig de la sèpsia implica tractament antibiòtic i/o quirúrgic del focus de la infecció, així com mesures de suport hemodinàmic, nutricional i mecanismes de restitució de fallida orgànica. Si més no, cada cop és més evident la **necessitat d'instaurar tractaments immunomoduladors, que permetin estimular la resposta inflamatòria quan és insuficient, i inhibir-la quan és excessiva**. Diversos models animals han mostrat resultats satisfactoris amb tractaments immunomoduladors, però els estudis humans encara mostren resultats molt pobres. Això pot ser degut a que els pacients inclosos en els estudis pertanyien a grups molt heterogenis, amb diferents agents etiològics i diferents temps d'evolució i, sobretot, al fet que en general no s'han inclòs els paràmetres de mesura de la resposta inflamatòria, que no són presents a la majoria de *risk scores*, ni tan sols la mesura de l'agent que es pretenia antagonitzar (per exemple, teràpies anti-TNF α). El desconeixement de la funció específica de determinats mitjancers i els seus mecanismes contrarreguladors fa difícil la instauració indiscriminada de tractaments immunomoduladors. Mesures molt concretes com l'administració de proteïna C activada, estricte control glucèmic o suplement esteroide en fallida adrenal han mostrat beneficis²¹¹. El diagnòstic de la sèpsia es realitza encara únicament per criteris clínics en un terç dels cassos.

2. De la mateixa manera que les infeccions bacterianes no tractades poden donar lloc a complicacions serioses, tractar infeccions víriques o bé causes no infeccioses d'inflamació amb antibiòtics no és només ineficaç sinó que, a més, contribueix a l'aparició de resistències, toxicitat i fenòmens al·lèrgics. Si més no, sovint s'instauen **tractaments antibiòtics innecessaris** degut a que existeixen situacions de difícil diagnòstic mitjançant els paràmetres habituals, com són les edats extremes de la vida (nounsats i ancians), els pacients que presenten síndrome de resposta inflamatòria sistèmica de forma basal (post-quirúrgics, politraumàtics, cremats, etc) i el creixent nombre de pacients immunodeprimits, degut a l'augment dels tractaments citotòxics, així com pacients amb insuficiència renal o bé hepàtica. En totes aquestes situacions, els signes i símptomes d'infecció són molt inespecífics, i també la majoria de paràmetres de laboratori, de manera que es tendeix a instaurar antibiòtics d'ampli espectre indiscriminadament, donant lloc a toxicitat innecessària, a més d'infeccions per microorganismes multirresistents i oportunistes. Els marcadors d'inflamació poden resultar d'utilitat en aquestes situacions.

3. **Diferents microorganismes poden donar lloc a un tipus de resposta inflamatòria diferent**, en funció que estigui orientada cap a Th1 o Th2. Influeixen també el temps d'evolució de la infecció, la quantitat d'inòcul i la localització de la infecció. En determinades formes de sèpsia, per exemple la meningococcèmia, els nivells de TNF- α són molt elevats

i es correlacionen amb la mortalitat²⁴⁴. Si més no, en altres tipus d'infecció, el rol de les citocines proinflamatòries no és tan prominent, limitant l'ús de teràpies dirigides contra una determinada citocina. De fet, tenint en compte les complexes vies de senyalització de la resposta inflamatòria, teràpies com per exemple l'anti-endotoxina poden resultar una mica simplistes. El temps d'evolució de la infecció és un altre aspecte fonamental: a mesura que el procés sèptic avança, hi ha una tendència cap a l'estat antiinflamatori i immunosupressor. La manca de resposta de fase aguda pot reflexar la fase immunosupressora de la sèpsia¹⁴¹, l'anomenada immunoparàlisi.

4. S'han implicat **fenòmens inflamatoris en la fisiopatologia de diverses malalties**, no únicament infeccioses (aterosclerosi, malalties neurodegeneratives, malalties reumàtiques), que poden actuar com a variable confusora en la utilització de marcadors d'inflamació amb finalitats diagnòstiques. Al mateix temps, aquest fet obre noves possibilitats terapèutiques per als mitjancers d'inflamació, així com pels factors immunomoduladors secretats per diversos microorganismes. S'ha descrit la interacció entre dislipèmia i mitjancers inflamatoris, de manera que les lipoproteïnes presenten propietats neutralitzadores del lipopolisacàrid²⁴⁵, mentre que la inflamació és un important mecanisme en la patogènesi de l'aterosclerosi²⁴⁶. El reclutament de leucòcits i expressió de citocines proinflamatòries caracteritza l'inici del procés d'aterogènesi, mentre que la malfunció de mitjancers d'inflamació contribueix a la seva progressió²⁴⁷. S'ha descrit l'activació de molècules d'adhesió com VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*) en resposta a components de lipoproteïnes, donant lloc a l'activació de citocines proinflamatòries mitjançant la inducció de NF- κ B²⁴⁷, o la sobreexpressió de factors quimiotàctics com MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) ó IL-8²⁴⁷ així com factors de creixement tals com PDGF i TGF- β . Un gran nombre de mitjancers d'inflamació amb importants funcions en el procés sèptic, s'han associat també a risc cardiovascular, tals com la proteïna C reactiva^{248, 249}, amiloide A del sèrum²⁵⁰, IL-6²⁴⁸ ó fosfolipasa A2 secretora²⁵¹, confirmant un important rol de la immunitat innata en el desenvolupament de l'aterosclerosi. S'han atribuït funcions antiinflamatòries a fàrmacs clàssics en el tractament de l'aterosclerosi com les estatines, o els inhibidors de l'angiotensina II, a més de la seva funció inhibint la síntesi de colesterol i hipotensora, respectivament²⁴⁷.

5. La intervenció de **factors genètics** en el tipus de resposta inflamatòria desencadenada en un determinat individu és també un factor condicionant. Els polimorfismes en els gens reguladors de citocines o altres molècules immunoefectores i els seus receptors, poden determinar les concentracions de citocines pro- i antiinflamatòries produïdes i la resposta a aquests mitjancers²⁵².

Així, cada cop és més evident que, en determinades situacions, per a una correcta orientació diagnòstica i terapèutica es fan necessaris, a més del diagnòstic clínic i microbiològic, els marcadors d'inflamació, que ens han d'orientar sobre el grau de resposta inflamatòria. Idealment han de tenir valor pronòstic, i han de ser fàcils de mesurar. El tipus de resposta ve determinat, doncs, per diversos factors, incloent la virulència del microorganisme, el tamany de l'inòcul, els mecanismes d'evasió de la resposta immunitària, la localització de la infecció i les condicions de l'hostatger, tals com l'estat nutricional, l'edat, l'estat immunitari, i fins i tot els polimorfismes genètics¹⁴¹. Tot considerant aquestes variables, la mesura de marcadors d'inflamació hauria de permetre seleccionar la població diana de potencials tractaments immunomoduladors.

D'altra banda, el millor **coneixement de les interaccions entre hostatger i microorganisme** ha de permetre una millor interpretació dels fenòmens associats amb la resposta inflamatòria enfront determinats agents etiològics. Els microorganismes han desenvolupat diversos sistemes per evadir el reconeixement per part de la immunitat innata i en els darrers anys s'han anat descrivint noves molècules que actuarien com a factors de virulència.

Amb l'objectiu d'estudiar aspectes de la resposta inflamatòria des del punt de vista de l'hostatger i des del punt de vista del microorganisme, en la primera part d'aquesta Tesi s'estudia la utilitat dels marcadors d'inflamació en el diagnòstic i pronòstic de la infecció i en la segona part es descriuen les propietats de dues noves proteïnes estafilocòcciques amb funcions immunomoduladores.



OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

3.1. Establir la utilitat dels marcadors d'inflamació en el diagnòstic de la sèpsia d'origen bacterià, tot diferenciant de les infeccions víriques i de la resposta inflamatòria d'origen no infecciós.

- Estudiar la utilitat de la determinació dels marcadors d'inflamació en diferents síndromes clíniques: infecció del sistema nerviós central, infecció urinària, infecció respiratòria, i en diferents grups de malalts: nens, adults, pacients amb síndrome de resposta inflamatòria sistèmica i pacients immunodeprimits.
- Establir la utilitat dels marcadors d'inflamació com a factor pronòstic en la monitorització de les infeccions severes.

3.2. Caracteritzar les propietats antiinflamatòries de dues molècules estafilocòcciques

- Reproduir els resultats d'experiments previs que havien demostrat inhibició de l'activació dels neutròfils induïda per fMLP.
- Clonació i expressió de nova proteïna en *Escherichia coli* i posterior purificació.
- Realització d'assajos funcionals amb neutròfils, monòcits i cèl·lules que expressin els receptors FPR (*Formyl peptide receptor*), FPRL1 (*Formyl peptide receptor-like 1*) ó C5aR, amb l'objectiu d'identificar l'especificitat i l'eficàcia d'aquestes noves proteïnes antiinflamatòries. Els assajos funcionals inclouen mobilització de calci i monitorització de canvis en la forma cel·lular mitjançant citometria de flux, així com assajos de quimiotaxi.
- Realitzar assajos de *binding* amb les proteïnes marcades amb FITC amb l'objectiu d'estudiar la seva associació amb diversos subtipus cel·lulars, mitjançant citometria de flux, tant en cèl·lules aïllades de sang perifèrica com en línies cel·lulars transfectades per clonació amb els receptors FPR, FPRL1 i C5aR.
- Identificar el receptor putatiu.
- Identificar altres propietats de les proteïnes diferents a la inhibició de l'activació dels neutròfils induïda per fMLP.



***MATERIAL I
MÈTODES***

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Objectiu 1

Establir la utilitat dels marcadors d'inflamació en el diagnòstic de la sèpsia d'origen bacterià, tot diferenciant de les infeccions víriques i de la resposta inflamatòria d'origen no infeccios.

Selecció de pacients i recollida de mostres

L'estudi prospectiu per tal d'establir la utilitat dels marcadors d'inflamació en el diagnòstic de la sèpsia d'origen bacterià es va dur a terme al Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

En primer lloc, conjuntament amb el Servei de Pediatria, es van recollir, de forma prospectiva, mostres de sèrum de pacients que arribaven a Urgències amb símptomes i signes d'infecció, fonamentalment febre. Les mostres de sèrum eren correctament etiquetades i congelades a -20°C fins a la seva determinació. Simultàniament es recollien les mostres adequades per al diagnòstic microbiològic de la infecció, fonamentalment hemocultius, i les mostres procedents del possible focus (líquid cefaloraquidi, orina, aspirat nasofaríngi, sèrum) per tal de realitzar els estudis microbiològics pertinents (cultiu, detecció d'antigen, detecció d'anticossos, ...) per arribar al diagnòstic microbiològic de seguretat. Les dades de filiació, paràmetres clínics i de laboratori (incloent hemograma i proteïna C reactiva, realitzats de forma rutinària al Servei d'Hematologia, i al Servei d'Anàlisis Clíniques, respectivament), i el diagnòstic inicial s'introdueixen en una base de dades (Microsoft Access).

En una segona fase, es van recollir totes les dades microbiològiques de cadascun dels pacients, i es va realitzar una revisió exhaustiva de totes les històries clíniques, en alguns casos repetidament, fins a finalitzar tot l'estudi de la infecció (com en el cas de les infeccions urinàries, en què es realitzen proves d'imatge de forma seqüencial durant el seguiment de l'episodi a Consultes Externes de Pediatria). A partir d'aquí es van establir grups de pacients en funció de la síndrome clínica (infecció del sistema nerviós central, infecció respiratòria de vies baixes, infecció urinària) i en funció del diagnòstic etiològic de seguretat (infecció bacteriana sistèmica, infecció bacteriana localitzada, infecció vírica) i d'extensió (infecció de vies baixes o pielonefritis en el cas de la infecció urinària).

Un cop seleccionats els pacients en base als criteris anomenats, establint els grups de **meningitis, infecció bacteriana localitzada, infecció urinària i infecció respiratòria de vies baixes**, es van realitzar de forma retrospectiva les determinacions de procalcitonina mitjançant un mètode immunoluminomètric (LUMItest® PCT, Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin) i, en un grup seleccionat de pacients, també mitjançant un test immunocromatogràfic (PCT-Q®, Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin).

Finalment, amb els resultats obtinguts, es va realitzar l'estudi estadístic per tal d'establir els valors de sensibilitat, especificitat, valors predictiu positiu i negatiu mitjançant el *software* SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Un cop obtinguts els primers resultats en pacients pediàtrics, que mostraven una bona correlació entre els nivells de procalcitonina i la infecció bacteriana sistèmica, distingint-la d'infecció bacteriana localitzada i d'infecció vírica, es va decidir estudiar la seva utilitat en pacients adults amb altres tipus d'infecció i explorar també la utilitat de la determinació de neopterina.

Per a l'estudi de la utilitat de la determinació de PCT i neopterina en el diagnòstic i pronòstic de la **infecció respiratòria de vies baixes en adults**, es van recollir, durant un període de 2 anys, totes les mostres procedents del Servei d'Urgències on se sol·licitava l'estudi de serologia de pneumònies, i es va congelar una alíquota de sèrum a -20°C. Les dades es van introduir en una base de dades. Posteriorment, mitjançant la revisió d'històries clíniques i de les dades microbiològiques, es van seleccionar les mostres de pacients en què, en base a criteris clínics i radiològics, el diagnòstic final era de pneumònia. Dins d'aquest grup, que va correspondre a aproximadament un 30% de les mostres recollides, es van seleccionar únicament aquelles en què es va establir el diagnòstic etiològic de seguretat i es va realitzar la determinació de PCT mitjançant una tècnica immunoluminomètrica (LUMItest PCT, Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin) i neopterina per una tècnica d'enzimoinmunoassaig (Neopterin ELISA, IBL Hamburg). L'anàlisi dels resultats es va realitzar també mitjançant el *software* SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Per a l'estudi de la utilitat de la determinació de PCT en pacients amb **síndrome de resposta inflamatòria sistèmica de forma basal** es van recollir, conjuntament amb el Servei de Cures Intensives, mostres de sèrum en el post-operatori immediat de pacients sotmesos a cirurgia de revascularització així com de recanvi valvular, a càrrec del Servei de Cirurgia Cardíaca. El procediment de recollida, emmagatzematge i anàlisi de les dades va ser el mateix que s'ha descrit prèviament.

Per a l'estudi de la utilitat de la determinació de PCT, i també de neopterina, IL-6 i IL-8 en el diagnòstic d'infecció en pacients **immunodeprimits** es van recollir, conjuntament amb el Servei d'Hematologia, mostres de sèrum en els episodis febrils de pacients neutropènics des de l'inici de la febre i de forma seriada fins al vuitè dia. El procediment de recollida, emmagatzematge i anàlisi de les dades va ser el mateix que s'ha descrit prèviament. Es van recollir també mostres de pacients amb neoplàsia hematològica en el moment del diagnòstic, per estudiar-ne els nivells basals de PCT, donat que s'ha considerat el sistema mononuclear fagocític com una potencial font de síntesi.

Tècniques de determinació de marcadors d'inflamació avaluades

Tècniques de determinació de procalcitonina

La PCT té una vida mitja de 25-30 hores¹⁸⁵ i és molt estable *in vivo* i *ex vivo*, permetent la seva determinació en sèrum o plasma mitjançant tècniques senzilles. Actualment existeixen, com a tècniques de determinació, dos tests quantitius: immunoluminomètric i immunofluorescent automatitzat, i un test semiquantitatiu immunocromatogràfic. Recentment s'ha desenvolupat un test ultrasensible²⁵³ que no s'ha evaluat en aquesta Tesi.

La **tècnica immunoluminomètrica** (LUMItest® PCT, Brahms Diagnostica) permet la determinació quantitativa de la concentració de PCT a sèrum. Es tracta d'una reacció enzimàtica tipus *sandwich*, que consta d'una fase sòlida que duu fixat un anticòs monoclonal contra el fragment catacalcina de la PCT, on s'afegeix la mostra de sèrum (20µL) i, posteriorment, anticòssos monoclonals contra el fragment calcitonina marcats amb un derivat d'acridina (250 µL). Es realitza una incubació d'una hora i, posteriorment, es realitzen rentats successius i, a continuació, lectura de les mostres, estàndards i controls mitjançant un luminòmetre, que permet mesurar les unitats relatives de llum (RLUs), que són directament proporcionals a les concentracions de PCT a la mostra, un cop extrapolats els valors a la corba d'estàndards.

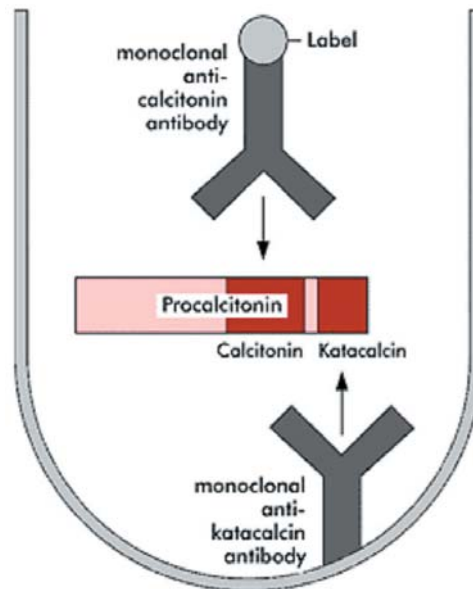


Figura 7. Esquema del mètode immuno-luminomètric per a la determinació de procalcitonina en mostres de sèrum (LUMItest® PCT, Brahms Diagnostica). De: Meisner, M. Procalcitonin (PCT) A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag Eds. Stuttgart-New York 2000

La **tècnica immunofluorescent automatitzada** (KRYPTOR® PCT, Brahms Diagnostica) està basada en la tecnologia TRACE® (*Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*)²⁵⁴ Consisteix en la transferència no radiant d'energia des d'un donant (criptat) fins un acceptant (XL 665), ambdós marcats fluorescentment. El kit consta d'anticòssos policlonals anti-calcitonina que es troben conjugats amb criptat, i d'anticòssos monoclonals anti-catacalcina conjugats amb XL 665. Les molècules de PCT presents a la mostra són insertades entre els anticòssos formant un immunocomplexe. Quan la mostra a mesurar és excitada, el criptat emet un senyal fluorescent de vida llarga a 620 nm, mentre que el XL 665 emet un senyal de vida curta a 665 nm. Quan ambdós components es troben units a un immunocomplexe, s'amplifica el senyal de la fluorescència emesa pel criptat com a donant pel fet d'estar proper a l'acceptant (XL 665), i té lloc també a 665nm. Aquest senyal

de vida llarga emès per l'immunocomplexe és proporcional a la concentració de PCT a la mostra. El volum requerit és de 50 µL i el temps d'incubació és de 20 minuts.

La **tècnica immunocromatogràfica** (PCT-Q®, Brahms Diagnostica) utilitza un anticòs monoclonal anti-catacalcina conjugat amb or coloidal, i un anticòs policlonal anti-calcitonina com a fase sòlida. Quan la mostra de sèrum (200 µL) s'aplica sobre la tira, el traçador s'uneix a la PCT present a la mostra i es forma un complex antigen-anticòs marcat. Aquest complex es desplaça per capilaritat, passant a través de l'àrea que conté la banda del test, on s'uneix als anticòs anti-calcitonina fixats i es forma un complex *sandwich*. Quan la concentració de PCT és major de 0.5 ng/mL, aquest complex pot observar-se com una banda acolorida. La intensitat de color de la banda és directament proporcional a la concentració de PCT present a la mostra, amb quatre rangs de valors (≤ 0.5 , ≥ 0.5 , ≥ 2 , ≥ 10) que es comparen amb una tarja de referència. El traçador que no s'ha unit difon fins a la zona de la banda control, on es fixa produint una banda colorida visible, que serà utilitzada per tal d'avaluar la fiabilitat del test.

Tècnica de determinació de neopterin

Per a la mesura de **neopterin** s'ha utilitzat una **tècnica d'enzimoimmunoassaig** (Neopterin ELISA, IBL Hamburg). Es tracta d'un ELISA competitiu que es basa en la competició entre antigens (neopterin) conjugats i no conjugats per un nombre determinat de llocs d'unió de l'anticòs (anti-neopterin de conill). L'assaig utilitza pouets de *microtiter* marcats amb anticòs de cabra anti-conill en què la mostra de sèrum o orina (10 µL), que presuntament conté neopterin, s'incuba amb neopterin conjugada amb peroxidasa (100 µL) i antisèrum de conill anti-neopterin (50 µL) durant 90 minuts. Els complexos anticòs-antigen conjugat amb peroxidasa s'uneixen als pouets i l'antigen no unit s'elimina per rentats. A continuació s'afegeix substrat (200 µL) i s'atura la reacció en 10 minuts mitjançant l'addició de solució de parada (100 µL). Finalment, es mesura la densitat òptica a 450 nm mitjançant un lector d'ELISA. Donat que es tracta d'un ELISA competitiu, la densitat òptica obtinguda és inversament proporcional a la concentració de neopterin present a la mostra, calculada en relació a una corba d'estàndards.

Tècnica de determinació de citocines

Per a la determinació d'**IL-6** i **IL-8** s'ha utilitzat una **tècnica d'enzimoimmunoassaig** (Endogen Human IL-6 ELISA Kit/ Endogen Human IL-8 ELISA Kit. Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL). L'assaig utilitza pouets de *microtiter* marcats amb anticòs anti-IL-6 ó IL-8 humana, on s'afegeix la mostra de sèrum (50 µL) i un anticòs biotinitat (50 µL) i s'incuba durant 120 minuts a temperatura ambient. Els complexos antigen-anticòs conjugat amb biotina s'uneixen als pouets i l'anticòs no unit s'elimina per rentats successius. A continuació s'afegeix una solució d'estreptavidina (100 µL) i s'incuba durant 30 minuts. Després de nous rentats, s'afegeix substrat (100 µL) i s'incuba de nou durant 30 minuts, aturant la reacció amb l'addició de 100 µL de solució de parada. Es mesura la densitat òptica a 450 nm mitjançant un lector d'ELISA. La densitat òptica obtinguda és directament proporcional a la concentració de IL-6 ó IL-8 present a la mostra, calculada en relació a una corba d'estàndards.

4.2. Objectiu 2

Caracteritzar les propietats antiinflamatòries de dues molècules estafilocòcciques.

La part experimental d'aquesta Tesi es va dur a terme durant una estada pre-doctoral de 12 mesos al Departament d'Inflamació de l'Eijkman-Winkler Centre for Medical Microbiology, Infectious Diseases and Inflammation (*Universitair Medisch Centrum*, Utrecht, Països Baixos). El treball ha consistit en la integració en un projecte d'investigació bàsica que ha implicat diverses aproximacions tècniques, des de la separació de diversos tipus cel·lulars mitjançant tècniques de gradient, fins a la clonació i expressió en sistemes procarïotes i eucariotes, així com química proteica, seqüenciació, cultiu cel·lular i un gran nombre d'assajos amb citometria de flux.

El grup treballa en la caracterització de nous factors de virulència de *Staphylococcus aureus* que actuen evadint la resposta inflamatòria. Prèviament havia descrit la proteïna **CHIPS** (*Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*), que actua inhibint l'activació dels fagòcits a càrrec de fMLP i C5a, mitjançant el bloqueig del receptor de pèptids formilats (FPR) i del receptor del factor del complement C5a (C5aR). Cercant en el genoma de *S.aureus* es va trobar una altra proteïna que comparteix un 29% d'homologia amb la seqüència de CHIPS. Els experiments inicials van permetre veure que la proteïna, inicialment anomenada CHIPS-like, exercia també funcions antiinflamatòries inhibint l'activació dels neutròfils per part de fMLP però de forma més dèbil.

Durant la primera part de l'estada, es van reproduir els resultats previs d'inhibició de l'activació dels neutròfils induïda per fMLP. En primer lloc, es va realitzar la clonació i l'expressió de nova proteïna en *Escherichia coli* i posteriorment es va purificar. A continuació es van realitzar assajos funcionals utilitzant citometria de flux utilitzant neutròfils, monòcits i cèl·lules que expressaven els receptors de factors quimiotàctics amb l'objectiu d'identificar l'especificitat i eficàcia d'aquesta nova proteïna antiinflamatòria. De la mateixa manera, també es van dur a terme assajos de quimiotaxi utilitzant els mateixos factors quimiotàctics. Simultàniament es van realitzar assajos de *binding* mitjançant citometria de flux, utilitzant proteïna marcada amb FITC, amb l'objectiu d'estudiar la seva associació a diversos subtipus cel·lulars i intentar identificar el receptor putatiu de la proteïna, així com identificar-ne altres funcions.

Per a la **clonació i expressió de les proteïnes**, a partir de la seqüència publicada, es van dissenyar els primers per a la clonació del fragment d'interès al vector pRSET (figura 8), utilitzant el programa informàtic SECentral, tot contenint els punts de tall per als enzims de restricció EcoRI i Xba. El vector conté el fragment polihistidina i el punt de tall per enterocinasa per a la posterior purificació de la proteïna. Els detalls de les reaccions d'amplificació es descriuen a l'annex II.

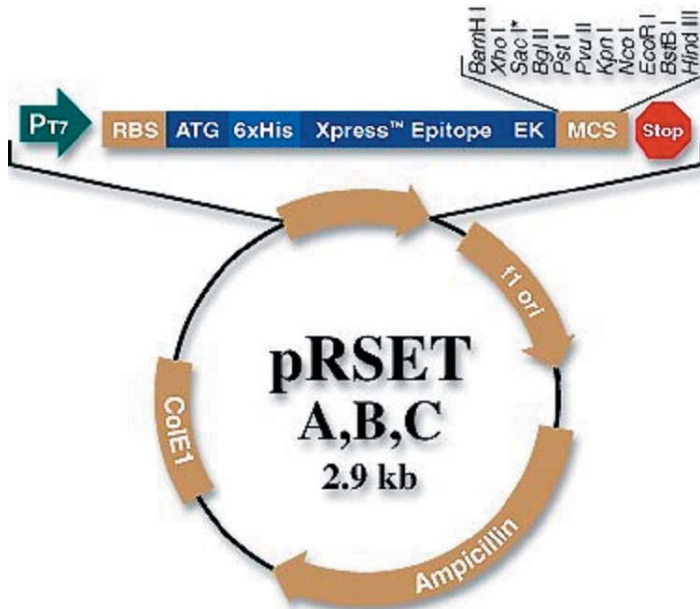


Figura 8. Estructura de pRSET vector (Invitrogen), amb el gen de resistència a ampil·lina (β -lactamasa), que permet la selecció del plàsmid en *E.coli*, el fragment polihistidina (6xHis) i el punt de tall d'enterocinasa (EK), que permeten la posterior purificació de la proteïna. MCS és el *Multiple cloning site*, que permet la inserció de la seqüència de la proteïna a clonar, amb les corresponents dianes d'enzims de restricció. La seqüència completa del vector es troba disponible a www.invitrogen.com.

Després de la lisi bacteriana, la proteïna marcada amb histidina es va purificar utilitzant una columna de níquel (HiTrap™ Chelating HP, 5 ml, Amersham Biosciences) i es va comprovar la puresa mitjançant SDS-PAGE (Mini Protean III® System, Bio-Rad) i tinció amb blau de Coomassie.

Els **assajos funcionals** van incloure, tot utilitzant neutròfils i cèl·lules mononuclears aïllades de sang perifèrica, o bé cèl·lules procedents de cultius cel·lulars, assajos de mobilització de calci, mesura de canvis en el *forward scatter* i assajos de polimerització d'actina, tots ells utilitzant citometria de flux. A més, es van realitzar també assajos de quimiotaxi amb un sistema transmembrana.

Els mètodes estan descrits amb detall a l'annex II. Si més no, com a exemple d'assaig funcional, un dels més utilitzats en aquest treball és l'assaig de **mobilització de calci**. El fonament és que l'activació dels neutròfils dona lloc a la mobilització de calci des dels calciosomes intracel·lulars. Fluo-3-AM és un fluorocrom que, després d'un període d'incubació roman retintut intracel·lularment (degut al *cleavage* de AM a càrrec d'una esterasa a l'interior de la cèl·lula) i incrementa la seva fluorescència en unir-se a calci lliure intracel·lular. L'acció de l'estímul s'observa per un increment de la fluorescència (FL1, Fluo-3-AM), que mesura el ràpid flux de calci intracel·lular. Donat que la resposta a l'estímul és extremadament ràpida, el test es realitza vora el citòmetre de flux. Una inhibició d'aquesta activació dels neutròfils es pot observar tot comparant l'acció de l'estímul en neutròfils en presència i en absència d'inhibidor.

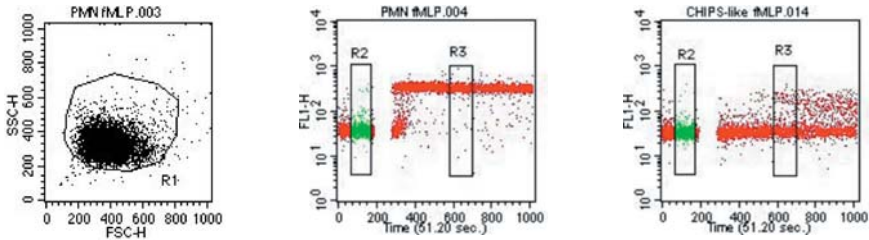


Figura 9. Un cop seleccionada la població de neutròfils (R1), podem veure en els neutròfils en absència d'inhibidor (PMN fMLP) l'augment de fluorescència (assenyalat per R3) després de l'aplicació de l'estímul respecte el nivell basal (assenyalat per R2). En presència de CHIPS-like (CHIPS-like fMLP), l'acció de l'estímul es troba inhibida.

Pel que fa als **assajos de binding**, es va utilitzar proteïna marcada amb FITC, i es va estudiar la seva unió a diversos tipus cel·lulars (tot utilitzant també anticossos monoclonals contra diferents subpoblacions leucocitàries) així com a cèl·lules HEK293 transfectades amb diversos receptors, mitjançant un sistema de clonació i transfecció a cèl·lules eucariotes del DNA dels receptors marcats amb una regió FLAG (descrita a l'annex II). A la figura 10 es descriu un exemple de *binding* a una determinada subpoblació limfocitària, i a la figura 11 es descriu l'assaig amb cèl·lules HEK293 transfectades amb els receptors.

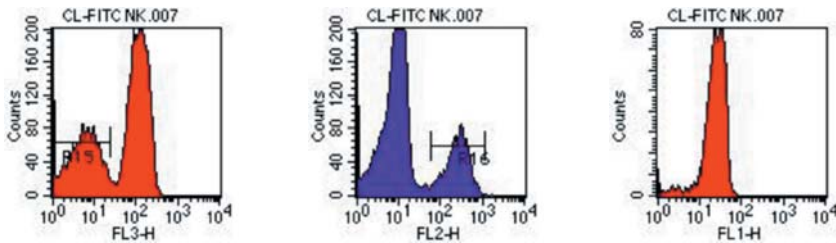


Figura 10. Unió de proteïna marcada amb FITC a cèl·lules *natural killer*. Un cop seleccionada la població de limfòcits, se selecciona la població CD3 negativa (FL3), a continuació la CD56+ CD16+ (FL2) i es pot observar el *binding* de la proteïna marcada amb FITC (FL1).

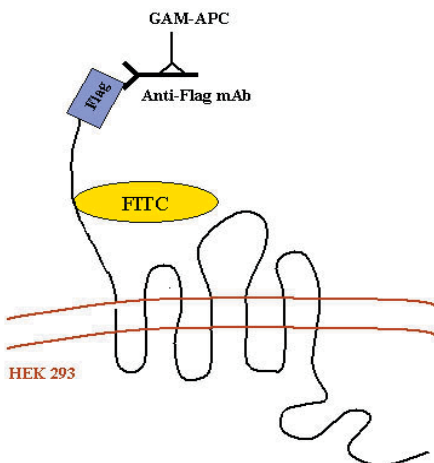


Figura 11. Cinquanta µl de cadascun dels tipus de cèl·lules transfectades s'incuben amb 5µl d'anticossos de ratolí anti-FLAG (tots els receptors transfectats contenen una regió FLAG) durant 45 minuts a 4°C. Després de rentar amb RPMI-HSA es resuspenen en 50µl, s'afegeix anticòs de cabra anti-ratolí (GAM-APC) en una proporció 1:100 i també diferents concentracions de les proteïnes marcadades amb FITC en una proporció 1:10. S'incuba 45 min a 4°C, i després s'afegeixen 200µl de RPMI-HSA amb iodur de propidi 5µg/ml. Es mesura FL1 (FITC, cèl·lules que s'uneixen a la proteïna marcada amb FITC), FL2 (*propidium iodide*, cèl·lules mortes) i FL 4 (*goat anti-mouse*, GAM-APC, cèl·lules que contenen el receptor) en un citòmetre de flux (FACScalibur, Becton Dickinson).

Els resultats de la primera fase de l'estudi van justificar el canvi de nom de la proteïna CHIPS-like, que va passar a anomenar-se **FLIPr** (*Formyl peptide receptor-like 1 inhibitory protein*). Donada la importància de la funció exercida per aquesta proteïna, es va realitzar una nova cerca de proteïnes similars al genoma de *S.aureus* (seqüència d'aminoàcids sense el pèptid senyal) utilitzant *blastp* a www.ncbi.nlm.nih.gov i restringint als 6 genomes de *S.aureus* que han estat completats. Es va trobar una proteïna que presenta un 73% d'homologia amb FLIPr, present a 2 de les 6 soques:

hypothetical protein MW1038 (*Staphylococcus aureus subsp. aureus* MW2)

hypothetical protein SAS1089 (*Staphylococcus aureus subsp. aureus* MSSA476)

La nova proteïna es va anomenar **FLIPr-like**. A continuació es va dur a terme la clonació i expressió de la nova proteïna així com la seva purificació per tal de realitzar assajos funcionals i de *binding*, amb l'objectiu de determinar la seva funció. També es van construir mutants i quimeres, per tal d'intentar identificar el lloc d'acció de la proteïna. Els mètodes utilitzats estan descrits amb detall a l'annex II.

En una darrera fase es va dur a terme la separació de monòcits a partir de la suspensió de cèl·lules mononuclears mitjançant selecció positiva per un mètode immunomagnètic utilitzant *Human CD14 Selection Cocktail* (EasySep®, StemCell Technologies) seguint les instruccions del fabricant, i analitzant-ne la puresa mitjançant citometria de flux. A partir d'aquest punt, els monòcits es van cultivar utilitzant medis de cultiu adequats i M-CSF (*Macrophage-colony stimulating factor*) per tal de realitzar també assajos funcionals i de *binding* amb proteïna marcada. Es va estudiar també la potencial formació de fibril·les intracel·lulars després de la incubació amb Amiloide β i posterior tinció amb roig Congo per observar la formació d'amiloide i la potencial inhibició a càrrec de FLIPr.

Finalment, alguns dels assajos funcionals descrits es van realitzar també amb procalcitonina recombinant (subministrada per Brahms, Alemanya), donat que s'ha descrit la seva intervenció també en la regulació de la quimiotaxi.



***RESULTATS I
DISCUSSIÓ***

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. Utilitat diagnòstica i pronòstica dels marcadors d'inflamació

Els resultats dels estudis presentats en aquesta Tesi mostren que els marcadors d'inflamació testats: procalcitonina (PCT), proteïna C reactiva i neopterina reflexen el grau de resposta inflamatòria i que varien en funció de l'etiologia, l'edat, la severitat, i el temps d'evolució de la infecció, cadascun amb unes característiques particulars. S'estudia també la seva especificitat en el diagnòstic de la infecció.

5.1.1. Diferències en funció de l'agent etiològic

Des de la descripció dels *toll-like* receptors (TLR), cada cop és més evident que l'antigament anomenada immunitat inespecífica, en relació a la immunitat innata, està en realitat dotada de cert grau d'especificitat. Els TLRs reconeixen determinats patrons moleculars associats al patògen (PAMPs) i indueixen senyals responsables de l'activació de gens importants per una resposta defensiva eficaç, bàsicament citocines proinflamatòries. Estudis recents han identificat vies de senyalització intracel·lulars específiques per determinats TLRs, que donen lloc a l'alliberament de patrons de citocines específics per determinats PAMPs, conferint especificitat a la immunitat innata⁶⁰. És prou conegut que l'alliberament de citocines en resposta a, per exemple, bacteris grampositius i gramnegatius presenta diferències quantitatives i qualitatives¹⁴⁸. Els TLRs i les seves diverses molècules adaptades en les vies de senyalització intracel·lular són, en part, responsables d'aquesta especificitat⁶⁰. Els senyals resultants de l'activació d'una combinació específica de TLRs induïrien una resposta concreta per un determinat microorganisme; per exemple el TLR4 reconeix fonamentalment gramnegatius, i el TLR2 reconeix estructures com els àcids lipoteicoics dels grampositius, així com les lipoproteïnes i el lipoarabinomanà de les micobactèries, o el zimosà dels fongs²⁵⁵. Un estudi utilitzant *microarrays* per comparar els perfils d'expressió gènica *in vitro* de cèl·lules dendrítiques exposades a diversos microorganismes, va mostrar l'existència d'algunes vies comunes per al reconeixement del patògen, però variació en termes d'intensitat i temps transcorregut des de la infecció en funció del patògen (per exemple resposta més tardana i menys intensa a *Candida albicans* que a *E.coli*), a més d'un elevat nombre de gens modulats diferencialment segons el tipus de microorganisme²²⁵. Components dels grampositius com per exemple els àcids lipoteicoics de *Staphylococcus aureus* són capaços d'induir de forma potent factors quimiotàctics (IL-8, MIP-1 α , MCP-1, C5a, LTB4), G-CSF, i citocines antiinflamatòries com la IL-10²⁵⁶, però indueixen pobrament la secreció de TNF- α , IL-1 β i IL-6. D'altra banda, components del peptidoglicà indueixen la producció de citocines proinflamatòries de forma sinèrgica amb el lipopolisacàrid dels gramnegatius²⁵⁷. A més, és conegut que el pic de resposta de citocines en les infeccions per grampositius té lloc de forma més tardana (50 a 75 hores després de l'estímul), que en les infeccions per gramnegatius (entre 1 i 5 hores)¹⁵. Resulta, doncs, esperable, un patró de resposta diferent també pel que fa als mitjancers d'inflamació que es troben regulats per citocines, incloent les proteïnes de fase aguda.

En l'estudi en pacients amb **meningitis**, la PCT es mostra com un marcador molt específic d'infecció bacteriana sistèmica, permetent-la diferenciar d'infecció vírica (tot i que amb repercussió sistèmica) i de les infeccions bacterianes localitzades. La proteïna C reactiva es troba elevada de forma més inespecífica en relació a infecció. En el cas de les **infeccions respiratòries de vies baixes** el patró de resposta dels marcadors d'inflamació és diferent en funció de l'etiologia. La PCT presenta nivells elevats en la infecció pneumocòccica, especialment quan és bacterièmica, però presenta nivells molt discretament elevats en etiologies com *Mycoplasma*, *Chlamydia* o *Legionella* i nivells pràcticament indetectables en infeccions respiratòries víriques, infeccions per micobactèries i infeccions per *Pneumocystis jirovecii*. La proteïna C reactiva presenta nivells elevats en la infecció pneumocòccica però també per agents causals de pneumònia atípica. En el cas de la neopterina, els nivells són elevats en la infecció pneumocòccica sistèmica, però també en les infeccions per patògens intracel·lulars. En **pacients hematològics**, es van observar nivells de PCT més elevats en infeccions per gramnegatius que en infeccions per grampositius. Si més no, cal tenir en compte que les bacterièmies per grampositius que es van incloure van correspondre a microorganismes poc piògens.

Aquests resultats són consistents amb estudis previs, en què s'observa aquesta associació dels nivells elevats de PCT amb infecció bacteriana sistèmica, i la neopterina amb infeccions per patògens fonamentalment intracel·lulars. De fet, es coneix que els interferons, inclòs IFN- γ , que exerceix una funció fonamental en la defensa antivírica, és un potent inhibidor de la inducció del gen CALC-I mitjançada per IL-1 β ¹⁸¹ i un potent inductor de la síntesi de neopterina¹⁶². S'ha utilitzat la neopterina com a marcador d'infecció vírica fins i tot en el dengue o la síndrome respiratòria aguda severa (SARS)^{258, 259}. Múltiples factors de virulència dels microorganismes són capaços d'estimular resposta inflamatòria, i no únicament el LPS i el peptidoglicà. Alguns patògens, d'altra banda, tals com les micobactèries o *Bordetella pertussis* indueixen l'expressió de mitjancers antiinflamatoris com IL-10 ó TGF- β , tot modulant la resposta immunitària²⁶⁰.

En la nostra experiència, únicament les infeccions pneumocòcciques presenten nivells elevats de tots els marcadors testats. Resultaria interessant estudiar l'associació entre l'elevació de marcadors i les característiques individuals de la soca, tals com el serotip. En el cas de *Streptococcus pneumoniae*, múltiples factors contribueixen a la seva virulència i patogenicitat, amb potent activitat proinflamatòria²⁶¹. Es coneix que les infeccions per variants opaques o transparents de *S.pneumoniae*, (amb evidents diferències fenotípiques, com per exemple més polisacàrid capsular en les opaques i més àcid lipoteicoic en les transparents), donen lloc a diferent invasivitat i també diferent inducció de l'expressió de mitjancers d'inflamació²⁶¹. Els nivells d'expressió de TNF- α i altres mitjancers d'inflamació en resposta a *S.pneumoniae* es correlacionen amb el tamany de l'inòcul bacterià. La virulència de *S.pneumoniae*, però, no sembla afectar quantitativament l'expressió de TNF- α ²⁶². En el cas de les infeccions per *S.aureus*, també s'ha vist una major inducció de resposta inflamatòria en les soques productores de leucocidina de Pantón Valentine²⁶³.

5.1.2. Diferències en funció de l'extensió anatòmica i la severitat

Els nivells de marcadors d'inflamació, quantitativament parlant, s'han associat a l'extensió anatòmica i la severitat de la infecció, tot i que existeixen altres variables que hi influeixen.

En el cas de les citocines la secreció és compartimentalitzada, però les proteïnes de fase aguda presenten nivells elevats en sèrum, fet que permet aquesta comparació.

Els resultats dels estudis presentats mostren una tendència a l'associació entre els marcadors i l'extensió/severitat. La comparació dels marcadors d'inflamació en les **meningitis bacterianes** respecte les **infeccions bacterianes localitzades** permet observar que la PCT presenta nivells elevats en les infeccions bacterianes quan l'afectació és sistèmica. Aquesta correlació es pot analitzar de forma més clara en observar, en una infecció del mateix aparell, com la **infecció urinària**, diferències en els nivells de PCT entre la forma localitzada a la bufeta o la pielonefritis amb afectació severa del parènquima renal, demostrada per la presència de cicatrius renals. Com a curiositat, els nivells elevats de TGF β , citocina considerada fonamentalment antiinflamatòria, s'han associat també al desenvolupament de cicatrius renals²⁶⁴. Estudis previs havien mostrat aquestes diferències tot estratificant la severitat mitjançant la gammagrafia DMSA (*dimercaptosuccinic acid*) en fase aguda²⁶⁵.

Recentment un estudi multicèntric que inclou els pacients del nostre centre, mostra una associació dels nivells de PCT amb la severitat del reflux vesico-ureteral (RVU), atribuint-se al fet que el risc de cicatrius renals s'incrementa amb la presència de RVU, essent més freqüent l'afectació renal retrògrada en aquesta situació²⁶⁶.

En els pacients hematològics amb infecció bacteriana confirmada microbiològicament, no es van observar diferències en els nivells de marcadors entre infecció sistèmica (entenen hemocultiu positiu) i localitzada.

La mateixa comparació segons extensió anatòmica s'observa en les **pneumònies unilobars** respecte les multilobars en què els nivells de PCT i de neopterina es troben elevats de forma significativa en augmentar l'extensió radiològica. A més, la comparació dels marcadors amb el risc de mort estratificat pel *Pneumonia Severity Index* en el cas de les infeccions respiratòries en adults reflexa una associació entre els nivells elevats de PCT i neopterina i el risc elevat de mort.

Estudis previs han mostrat la correlació entre marcadors com PCT i neopterina (i no la majoria d'interleucines) i el risc de mort en pacients amb pneumònia²⁶⁷. En pacients amb sèpsia severa es considera que la mesura de PCT pot ser útil com a predictor del pronòstic, particularment si es combina amb l'APACHE III *scoring system*^{268, 269}. En un estudi més recent, pacients amb pneumònia associada a ventilació mecànica, documentada microbiològicament, en què el tractament va fracassar (definit com a mort, pneumònia recurrent o infecció extrapulmonar), presentaven nivells més elevats de PCT que aquells que van presentar una evolució favorable²⁷⁰. En aquest estudi observacional, una anàlisi multivariant mostra la PCT com un factor predictor d'evolució desfavorable. Els nivells inicials de PCT van ser també més elevats en pacients amb pneumònia greu adquirida a la comunitat que van morir durant l'ingrés a la unitat de cures intensives²⁷¹.

Els mètodes que permeten identificar pacients amb un risc elevat de mortalitat, ofereixen la possibilitat de definir la indicació d'hospitalització o de millorar el cost-eficàcia de les cures intensives, per l'identificació precoç i maneig profilàctic dels individus amb risc elevat²⁶⁸. La informació proporcionada per índexs com el PSI o el CURB (*confusion, urea, respiratory rate and blood pressure*)²⁷² fa referència al risc de mort però no tenen la

capacitat de preveure la resposta un cop iniciat el tractament. Per assolir aquest objectiu, cal una anàlisi més acurada dels factors relacionats amb el microorganisme, però també amb l'hostatger, de forma que la mesura de l'excés o el defecte en la resposta inflamatòria permetin intervencions a nivell d'immunomodulació. S'ha observat que, en pacients amb sèpsia severa, els nivells d'IL-10 i de PCT són més elevats en els no-supervivents²⁶⁸. En aquest estudi, els nivells de PCT en els primers tres dies van ser més elevats en el grup de no supervivents, correlacionant-se amb l'APACHE-III score, però només el primer dia amb el SAPS II score (*Simplified Acute Physiology Score*). Els nivells d'IL-6 no van mostrar diferències, i els nivells d'IL-10 van ser clarament més elevats en els dies 1 i 2 en els no-supervivents, però més baixos en el dia 3. La hipòtesi és que després de 3 dies del diagnòstic de sèpsia severa, l'activitat antiinflamatòria està guanyant en els supervivents mentre que perd terreny en els no-supervivents. En l'anàlisi multivariant, només APACHE III i PCT mostraven correlació amb el pronòstic. IL-6 és útil però no per predir supervivència, ni la progressió de sèpsia a sèpsia severa o shock sèptic²⁷³.

És possible, però, que pacients amb shock ràpidament progressiu siguin incapaços de sintetitzar correctament diverses proteïnes de fase aguda. El sistema immunitari pot també claudicar en cas de fallida multiorgànica. La capacitat de respondre a la infecció varia entre els individus i es considera la contribució de fins i tot alguns factors genètics: en pacients amb pneumònia adquirida a la comunitat existeix una tendència al shock sèptic i la fallida respiratòria en pacients amb determinats polimorfismes de TNF²⁷⁴.

S'ha demostrat que existeixen variacions en els factors de virulència, i per tant en la resposta inflamatòria, depenent de quin sigui el lloc d'infecció. Per exemple la regulació de factors de virulència específica de teixit és important en la patogènesi de *S.pneumoniae*²⁶¹. S'ha descrit fins i tot que les vies de senyalització en resposta a un mateix microorganisme poden ser específiques de teixit. Cada lloc d'infecció té unes característiques distintives. Per exemple la infecció pulmonar per *S.aureus* té lloc per vies de senyalització diferents que en una altra localització²⁷⁵. Els perfils genètics d'expressió de citocines són també òrgan-específics²⁷⁶; per exemple, la presència local de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) al pulmó, que confereix resistència a la infecció local, pot resultar perjudicial en fer sinèrgia amb el lipopolisacàrid, donant lloc a què el pulmó sigui sovint l'òrgan afectat en primer lloc durant el shock sèptic⁹⁸.

5.1.3. Diferències segons edat

Diversos paràmetres de laboratori, tant hematològics com bioquímics, presenten diferències en els nivells de referència segons l'edat. Aquest fenomen pot observar-se també amb els paràmetres d'inflamació, afegint-hi factors de maduresa del sistema immunitari que fan que els nens presentin respostes diferents als adults enfront el mateix tipus d'agent infecciosos. La comparació més clara es pot establir quan parlem del mateix tipus d'infecció, amb el mateix agent etiològic.

En el cas de les pneumònies pneumocòcciques, els nens presenten nivells més elevats de PCT que en el mateix tipus d'infecció en adults. En el grup d'adults, independentment de la severitat, hi ha una correlació entre els nivells de PCT i l'edat, de manera que en pacients joves s'observa una resposta inflamatòria més marcada.

Aquest fet s'ha de tenir en compte a l'hora d'establir els punts de tall. S'han observat fenòmens similars amb altres marcadors.

Tot i que no s'ha estudiat àmpliament la relació de PCT i edat, diversos paràmetres d'inflamació presenten nivells de normalitat més elevats en pacients pediàtrics. Per exemple, els nivells de LBP són més elevats en pacients joves amb sèpsia¹⁹⁸ malgrat similar classificació APACHE II i freqüència de shock sèptic. En models experimentals animals s'ha observat variació entre nivells de citocines pro- i antiinflamatòries respecte el sexe i l'edat, tot plegat associat a factors hormonals²⁷⁷. La resposta metabòlica a l'endotoxina pot variar en funció de l'edat, afectant a la susceptibilitat a la toxicitat mitjançada per l'endotoxina¹⁹⁹. Pel que fa a la proteïna C reactiva, s'ha descrit també que els nivells sèrics basals poden fins i tot duplicar-se en relació amb l'edat²⁷⁸.

5.1.4. Especificitat d'infecció

Diversos estats inflamatoris es poden presentar clínicament de forma similar a la infecció, tals com post-operatori, traumatismes, pancreatitis, rebuig de trasplantaments o vasculitis. Els nivells dels marcadors analitzats han mostrat inespecificitats donat que s'han observat nivells elevats en determinades situacions d'inflamació d'origen no infecciosos. En el cas de la neopterinina, els nivells es poden trobar elevats, a més d'en infeccions mitjançades per la immunitat cel·lular, en malalties autoimmunitàries, neoplàsies, rebuig de trasplantament, malaltia coronària i desordres neurològics²⁷⁹. La proteïna C reactiva també es mostra elevada en molts processos inflamatoris diferents de la infecció²⁸⁰. S'ha utilitzat àmpliament en la monitorització d'infeccions agudes però també de diversos tipus d'inflamacions cròniques, tals com les malalties sistèmiques i fonamentalment l'artritis reumatoide²⁸¹ o també en pacients trasplantats. En els darrers anys està assolint importància la seva utilització en la monitorització de risc cardiovascular^{248, 249}.

Enfront d'altres marcadors, la PCT s'ha presentat en la majoria dels estudis com un paràmetre d'elevada especificitat per al diagnòstic d'infecció¹⁷². Si més no, existeixen determinades situacions d'etiologia no infecciosa en què els nivells de precursors de calcitonina es troben elevats, fonamentalment neoplàsies de cèl·lules neuroendocrines com el carcinoma medul·lar de tiroides, el carcinoma de cèl·lules petites del pulmó, el tumor carcinoide, el feocromocitoma o la neoplàsia dels illots pancreàtics³¹. S'ha descrit l'increment de PCT (i també proteïna C reactiva) en resposta al tractament amb anticossos contra limfòcits T, tant policlonals (ATG) com monoclonals (OKT3), que s'utilitzen en règims de condicionament pel trasplantament al·logènic de cèl·lules progenitores, o pel tractament de l'anèmia aplàsica severa, dificultant el diagnòstic diferencial entre febre secundària a infecció o a l'alliberament inespecífic de citocines en pacients hematològics²⁸². Prèviament s'havia descrit aquest fenomen en pacients tractats amb OKT3 després de trasplantament renal^{283, 284}. Si més no, no es presenten variacions en resposta a tractaments citotòxics ni transfusió de productes sanguinis²⁸². En la nostra experiència, els valors de PCT no es veuen influenciats per aquests factors en pacients hematològics.

Finalment, s'han descrit nivells elevats de precursors de calcitonina en altres situacions d'inflamació sistèmica com pneumonitis, cremades²⁸⁵ i pancreatitis²⁸⁶, així com en pacients politraumàtics²⁸⁷.

En el present treball, com a exemple de resposta inflamatòria sistèmica d'origen no infecciós, s'estudien **pacients sotmesos a cirurgia cardíaca amb circulació extracorpòria**. Es considera que l'exposició de la sang a superfícies no fisiològiques durant la circulació extracorpòria, així com els fenòmens d'isquèmia-reperfusió, poden donar lloc a resposta inflamatòria sistèmica, amb alliberament de citocines. Com a conseqüència seria esperable poder trobar nivells elevats de PCT de forma inespecífica, sense relació amb la infecció. Tot i que l'estudi no aporta un nombre prou elevat de pacients amb complicacions per avaluar la utilitat de la PCT com a marcador d'infecció en aquest tipus de malalts, la troballa més interessant és que els nivells basals no es troben elevats, mentre altres marcadors utilitzats tradicionalment per al diagnòstic d'infecció es troben anormalment elevats en pacients post-quirúrgics.

5.1.5. Cinètica dels marcadors d'inflamació

La cinètica de les citocines proinflamatòries ha estat àmpliament descrita. Després de l'administració intravenosa d'endotoxina bacteriana, el TNF- α i la IL-6 assolixen els seus pics màxims entre 1.5 i 3 hores, respectivament, assolint els nivells basals a les 6 i a les 8 hores, respectivament¹⁸⁶. La vida mitja de la proteïna C reactiva és d'aproximadament 19 hores, i l'únic determinant de la seva concentració sèrica és el grau de síntesi²⁸⁸. Pel que fa a la neoptèrina, es considera que les concentracions incrementen fins un pic a les 12-24h després de l'estímul^{162, 163}, i s'estima la seva vida mitja en uns 90 minuts, amb posterior eliminació renal²⁸⁹. La cinètica de la PCT consisteix en una inducció molt ràpida en resposta a un estímul, dins de les primeres 2-6 hores. Després d'un increment inicial, els valors depenen del balanç entre la seva vida mitja a plasma (aproximadament 25-30 hores) i la nova producció de PCT^{185, 186}. En el sèrum normal, els nivells són de l'ordre de 0.19 fmol/mL¹⁷³.

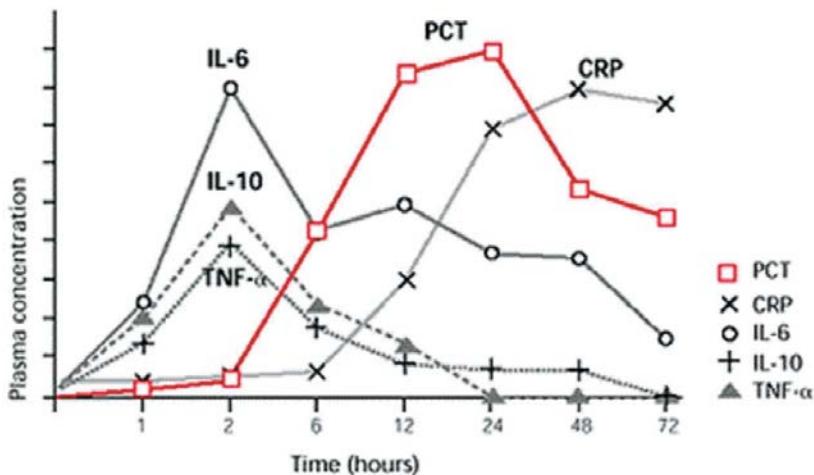


Figura 12. Representació esquemàtica de la vida mitja en sèrum de PCT, proteïna C reactiva (CRP) i citocines després d'inducció. De: Meisner, M. Procalcitonin (PCT) A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag Eds. Stuttgart-New York 2000.

En un estudi en voluntaris humans es va observar un augment persistent de la concentració de precursors de calcitonina després de la injecció d'endotoxina, assolint un pic màxim a les 24 hores, però mantenint-se per sobre dels nivells normals durant més de 7 dies, mentre que les citocines experimenten pics transitoris²⁹⁰. En aquest estudi, la vida mitja en voluntaris sans després d'un únic estímul oscil·la entre 26.9 i 45.7 hores. En models animals, després de la injecció d'endotoxina, la cinètica és també similar¹⁷⁹. En el model en primats, si més no¹⁷⁹, un segon estímul amb LPS no dona lloc a un major increment de PCT en sèrum ni a nivell orgànic. Es considera que pot ser degut a la contraregulació de receptors al monòcit, efecte referit com a "immunoparàlisi".

Si més no, tal i com s'ha descrit en la literatura, i també en la nostra experiència, infeccions incontrolades, donen lloc a nivells persistentment elevats de PCT, permetent el seu ús amb finalitats pronòstiques. Determinacions seriades ens permeten establir una millor aproximació diagnòstica i pronòstica.

Aquest fenomen es pot observar molt clarament en el cas de les infeccions urinàries, i també en les infeccions respiratòries.

La cinètica de la PCT, amb una vida mitja més curta, però no tant com les citocines, permet observar més ràpidament la resposta al tractament, essent útil per a la monitorització de les infeccions. En el grup de pacients neutropènics, determinacions seriades permeten augmentar el nombre de diagnòstics.

5.1.6. Comparació amb la mesura de citocines

La mesura de citocines permetria, *a priori*, dibuixar el patró de resposta inflamatòria en un moment determinat. S'han demostrat diferències en els patrons de citocines en funció de l'agent etiològic. En l'estudi de Feezor et al¹⁴⁸, els nivells basals de TNF- α , IL-1 Ra, IL-8, IL-10, IL-18BP i PCT no van ser significativament diferents en pacients amb sèpsia per grampositius o per gramnegatius. Si més no, els nivells d'IL-1 β , IL-6 i IL-18 van ser significativament més elevats en la sèpsia per gramnegatius, malgrat no haver-hi diferències significatives en els índexs de gravetat, ni el nivell de dany orgànic (*MODS score*). L'estudi amb *microarrays* de Huang et al²²⁵ mostra també un patró diferent d'expressió de citocines en funció de l'agent etiològic.

A nivell pràctic, si més no, la mesura en sèrum dels nivells de citocines és de limitada utilitat, donat que varien àmpliament en terminis curts de temps, ja que la seva vida mitja és curta, i estan sotmeses a múltiples mecanismes de *down-regulation*^{291, 292}, amb breus i intermitents variacions en els nivells diaris, fent difícil la seva utilització per la monitorització de la infecció. Són poc estables *in vivo* i *ex vivo*, dificultant la interpretació de tècniques de mesura i, a més, no són específiques d'infecció. La IL-6 té la seva utilitat en el diagnòstic d'infecció, amb una cinètica més estable, trobant-se nivells elevats en pacients amb shock d'origen sèptic però també d'origen cardiogènic²⁹³. Es coneix que agents com les catecolamines poden donar lloc a l'augment d'IL-6²⁹⁴. En estudis comparatius, la mesura dels nivells d'IL-6 no ha resultat més eficaç que la PCT en el diagnòstic de la sèpsia²⁶⁹.

En aquesta Tesi només s'ha avaluat la determinació de citocines en el cas dels pacients neutropènics, i no s'observa cap avantatge de la determinació d'IL-6 i IL-8 respecte a la PCT. S'ha demostrat que la producció de citocines, fonamentalment les proinflamatòries, és més compartimentalitzada al lloc de la infecció, de forma que sovint els valors en sèrum són baixos malgrat una elevada producció⁹⁸.

En general, els avantatges de les proteïnes de fase aguda tals com la proteïna C reactiva són que són estables en les mostres clíniques i tenen una vida mitja més llarga, fent més senzilla i interpretable la seva determinació. En el cas de les anomenades "*hormokines*" tals com la PCT s'hi afegeix, a més, la seva especificitat d'infecció.

5.1.7. Tècniques de determinació

Diferents avaluacions han mostrat una bona correlació dels resultats del test semiquantitatiu per a la determinació de PCT amb el test quantitatiu²⁹⁵.

En la nostra experiència, els resultats del test semiquantitatiu es corresponen amb els del test quantitatiu (article meningitis) i també els del test immunoluminomètric amb els de l'immunofluorescent (dades no presentades). Si més no, considerem que el test semiquantitatiu mostra uns punts de tall massa poc precisos, essent útil per distingir sèpsia bacteriana severa d'infecció vírica, per exemple, però molt més imprecís en infeccions com les de les vies respiratòries.

5.1.8. Funció dels nous marcadors d'inflamació

Malgrat que els resultats obtinguts en el present treball i també en molts altres estudis mostren la utilitat dels marcadors d'inflamació en diverses situacions clíniques, abans de poder adoptar la mesura de marcadors per a la monitorització de pacients sèptics amb finalitats no únicament diagnòstiques sinó també per establir possibles tractaments immunomoduladors, és necessari un millor coneixement del rol precís d'aquests mitjancers en el procés inflamatori. A més, en els darrers anys la inflamació ha emergit com a agent causal de diverses malalties d'elevada prevalença que prèviament no s'havien considerat com a relacionades amb el procés inflamatori, tals com la malaltia cardiovascular o les malalties neurodegeneratives.

Entre les molècules utilitzades com a marcadors d'inflamació, de la majoria se'n coneix el seu mecanisme d'acció i la seva funció durant la infecció, però existeixen encara molts interrogants sobre el paper d'alguns d'aquests mitjancers.

5.1.8.1. Receptors de mitjancers d'inflamació

Les citocines, els factors de creixement i les hormones (components peptídics i proteïnes), tenen en comú la funció de mitjançar la comunicació intercel·lular. La regulació de funcions cel·lulars i nuclears s'inicia a través de l'activació de receptors de superfície

cel·lulars. Tots aquests receptors tenen dos components principals: 1) un domini que assegura l'especificitat del lligand (*ligand-binding domain*) i 2) un domini efector que inicia la generació de la resposta biològica un cop es produeix la unió del lligand. El receptor activat pot llavors interaccionar amb altres components cel·lulars per tal de completar el procés de transducció cel·lular. Molts factors de creixement s'uneixen a receptors que estan associats a proteïnes G i fosfolipasa C unida a membrana²⁹⁶.

Els *G-protein coupled receptors* engloben una de les famílies amb el més ampli i divergent repertori de lligands endògens i exògens, convertint-se per aquest motiu en una de les més fèrtils dianes per intervencions terapèutiques. Entre els diversos tipus de GPCRs¹²⁵ destacarem els de classe A, com per exemple els receptors de quimiocines, i els de classe B, com el receptor de calcitonina.

El receptor de calcitonina és un *G-protein coupled receptor*, capaç d'activar múltiples senyals intracel·lulars. A l'igual que molts altres receptors, pot desensibilitzar-se per altres factors quimiotàctics o pel seu propi lligand. Per exemple, s'ha vist que en individus sotmesos a tractaments perllongats amb calcitonina, la resposta quimiotàctica dels monòcits es troba alterada²⁹⁷. Es considera que, donat que la calcitonina actua com a factor quimiotàctic pels monòcits, es probable que també el seu precursor, que conté la seqüència sencera de la calcitonina, exerceixi funcions similars a través dels mateixos receptors. Als llocs d'inflamació es troben presents múltiples mitjancers, i és prou lògic que les respostes presentin regulacions creuades. D'altra banda, el CGRP, l'altre producte del gen de la calcitonina actua, igual que altres neuropèptids, com a mitjancer d'inflamació tot regulant la quimiotaxi²⁹⁸⁻³⁰⁰.

5.1.8.2. Funció mitjancers d'inflamació

La correlació entre els nivells sèrics dels marcadors analitzats amb determinats agents etiològics així com amb el risc de mort, no es anecdòtica, sinó que implica un paper d'aquests mitjancers en el procés inflamatori. Pel que fa a les proteïnes de fase aguda, el més probable és que siguin multifuncionals, i es coneix la seva intervenció en diferents estadis de la resposta inflamatòria, tot i que algunes funcions biològiques no es coneixen amb precisió¹³³. Proteïnes plasmàtiques com la proteïna fixadora de lipopolisacàrid (LBP), la proteïna C reactiva o la proteïna amiloide P sèrica (SAP) s'uneixen als bacteris i faciliten el seu aclariment mitjançant l'activació del complement o fagocitosi, però a determinades concentracions poden tenir un efecte antiinflamatori. S'ha demostrat la intervenció de diverses proteïnes de fase aguda en la inhibició de la migració dels leucòcits en resposta als factors quimiotàctics clàssics, suggerint la seva implicació en la regulació de la resposta inflamatòria³⁰¹⁻³⁰³. El fibrinogen inhibeix l'activitat quimiotàctica dels neutròfils desencadenada per *zymosan-activated serum*, C5a o IL-8³⁰¹. L'haptoglobina s'ha descrit com a inhibidor de l'explosió respiratòria dels neutròfils i l'elevació de calci intracel·lular induïda per fMLP (*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*), acid araquidònic i zimosà opsonitzat³⁰². Altres proteïnes presenten funcions pleiotròpiques: la leptina inhibeix la migració dels neutròfils en resposta als factors quimiotàctics clàssics i està dotada en si mateixa d'activitat quimiotàctica envers els neutròfils. D'altra banda, els neutròfils exposats a leptina no van donar lloc a mobilització de calci detectable ni producció d'oxidants, pel que es considera un factor quimiotàctic "pur"³⁰³.

Un punt crucial en la resposta de fase aguda és la migració de fagòcits als llocs de dany tissular o infecció, per tal d'iniciar les respostes de fagocitosi, destrucció microbiana i posteriorment els mecanismes de reparació. La migració de fagòcits cap als llocs d'inflamació és un fenomen complex que requereix la cooperació coordinada de múltiples receptors de superfície, incloent els receptors de factors quimiotàctics que dirigeixen els senyals de migració, receptors d'adhesió que modulen les interaccions entre les cèl·lules que migren i l'endoteli, i receptors de proteases que regulen les interaccions de les cèl·lules amb el seu medi extracel·lular³⁰⁴. Es considera que hi han múltiples vies que interconnecten la xarxa de senyalització entre el receptor i el citoesquelet i, en general, la maquinària per a la mobilització cel·lular. L'alteració de la quimiotaxi dels leucòcits és també un fenomen de gran importància en la fisiopatologia de la immunoparàlisi. Fins i tot s'ha utilitzat la mesura de la migració dels leucòcits polimorfonuclears com un marcador de risc de desenvolupar infecció en pacients politraumàtics³⁰⁵. El reclutament dels leucòcits als diversos teixits s'ha relacionat amb la disfunció cardíaca, pulmonar, renal i hepàtica. D'altra banda, la proteïna C reactiva es considera efectora de la immunitat innata donat que activa la via clàssica del complement i es opsònica, a través de receptors específics (CRP-R), identificats en fagòcits, tant neutròfils com monòcits¹⁵⁸. Al mateix temps, actua com agent antiinflamatori, ja que inhibeix la producció de superòxid i la resposta quimiotàctica al fMLP i la IL-8^{157, 306}. La proteïna C reactiva no és quimiotàctica per neutròfils però sí actua com a feble factor quimiotàctic per monòcits³⁰⁷. De fet es considera que actua activant monòcits i macròfags però que inhibeix l'activació dels neutròfils.

També la proteïna de fase aguda serum amiloide A (SAA) exerceix un paper antiinflamatori, donat que *in vitro* va donar lloc a la inhibició de l'alliberació de mieloperoxidasa pels neutròfils, així com la producció d'espècies reactives d'oxigen i la migració de PMN³⁰⁸, suggerint una funció de *down-regulation* del procés inflamatori. Altres proteïnes amb un rol antiinflamatori a nivell sistèmic com el TGF- β , exerceixen si més no activitat proinflamatòria a nivell local, tot estimulant la quimiotaxi¹¹⁵.

La majoria dels mitjancers d'inflamació actuen a diversos nivells del procés de resposta inflamatòria, i poden exercir diferents funcions en funció del compartiment on són presents⁹⁸. El més probable és que aquest sigui el cas també de la PCT. Tot i que la funció durant la sèpsia és encara parcialment desconeguda, s'ha associat amb desordres en l'homeostasi del calci¹⁸⁹, en la síntesi d'òxid nítric¹⁹⁰ i també en la regulació de la quimiotaxi. Les funcions descrites fins al moment van a favor d'un rol antiinflamatori d'aquestes proteïnes: els nivells circulants dels precursors de calcitonina tals com la PCT, així com els de *Calcitonin gene related peptide* (CGRP) es troben dramàticament elevats en resposta a la infecció bacteriana. Alguns estudis han demostrat la inducció directa de la secreció de PCT sota l'estímul de TNF^{309, 310}, així com la inhibició de la producció de TNF induïda pel lipopolisacàrid. Mecanismes contrarreguladors s'han descrit també respecte a la inducció d'òxid nítric: s'ha mostrat que la PCT és capaç de modular l'expressió gènica de la òxid nítric sintasa induïble (iNOS) i la síntesi de NO, tot inhibint la seva expressió en cèl·lules endotelials natives, i estimuland-la en cèl·lules pre-estimulades, de forma dosi-dependent^{311, 312}. La neopterinina s'ha implicat també en la estimulació de iNOS¹⁶⁶. L'òxid nítric es considera el mitjancer final que dona lloc a la hipotensió característica del shock sèptic³¹³, pel que tot plegat fa pensar que aquests pèptids poden tenir un paper com a mitjancers antiinflamatoris en la immunoparàlisi induïda per la sèpsia. En models animals

s'ha descrit fins i tot un efecte beneficiós de la neutralització de PCT¹⁷³, incrementant la supervivència.

Pel que fa a la regulació de la quimiotaxi, diversos models experimentals han mostrat inhibició de la migració de monòcits en resposta a factors quimiotàctics, tals com el fMLP, a càrrec de la PCT. A determinades concentracions, la PCT s'ha mostrat com un factor quimiotàctic pels monòcits, desactivant la quimiotaxi en presència d'altres mitjancers inflamatoris addicionals: la pre-incubació dels monòcits amb PCT o calcitonina va desactivar ràpidament la seva resposta migratòria envers fMLP¹⁹². A nivell molecular, s'ha observat que CGRP i N-PCT modulen l'expressió de CD11b, induïda pel LPS, que és una de les principals integrines implicades en la quimiotaxi en neutròfils i monòcits¹⁹¹. En un altre model, la PCT va estimular la producció de monofosfat d'adenosina cíclic (AMPC) en monòcits, de forma dosi-depenent, amb màxims efectes observats a nivells picomolars¹⁹². La proteïna cinasa A depenent d'AMPC està involucrada en la resposta migratòria de les cèl·lules mononuclears CD14+ envers la calcitonina³¹⁴. Altres pèptids de la família han demostrat propietats antiinflamatòries, com l'adrenomedulina³¹⁵, o el propi CGRP, que inhibeix citocines tipus 1 i estimula la producció de citocines antiinflamatòries³¹⁶, a més d'actuar a altres nivells³¹⁷. El fet que la PCT sigui factor quimiotàctic a baixes concentracions i la seva interacció amb el factor quimiotàctic prototípic fMLP fa pensar en una funció similar a la de la proteïna C reactiva. A nivell de les cèl·lules fagocítiques, la secreció de PCT és transitòria, limitada en quantitat, i té lloc durant un període curt de temps després de la unió de les cèl·lules a l'endoteli, mentre migren cap al lloc d'infecció. El reordenament del citoesquelet i la quimiotaxi tenen lloc a través de vies de senyalització que requereixen petites dosis d'agonista per assolir respostes màximes, mentre que l'activació citotòxica com l'exocitosi d'enzims lisosomals o la producció de superòxid requereix elevades dosis del lligand.

En la nostra experiència (dades no publicades), si més no, la PCT no va induir mobilització de calci ni polimerització d'actina en neutròfils ni en monòcits, ni va ser capaç d'inhibir la seva activació en resposta a factors quimiotàctics com fMLP.

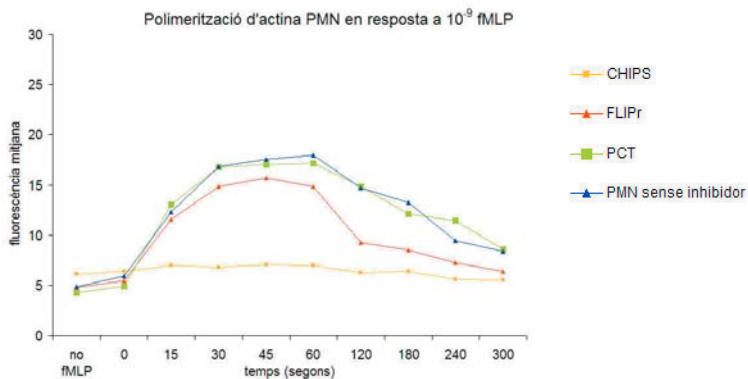


Figura 13. Polimerització d'actina al llarg del temps en neutròfils marcats amb falocidina (que s'uneix a F-actina, l'estat actiu de l'actina), en resposta a fMLP, mesurada per citometria de flux. Mentre la pre-incubació dels neutròfils amb CHIPS (*Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*) i, de forma menys potent, amb FLIPr (*FPRL1 inhibitory protein*) inhibeix la polimerització d'actina, la incubació amb procalcitonina (PCT) no dona lloc a aquesta inhibició.

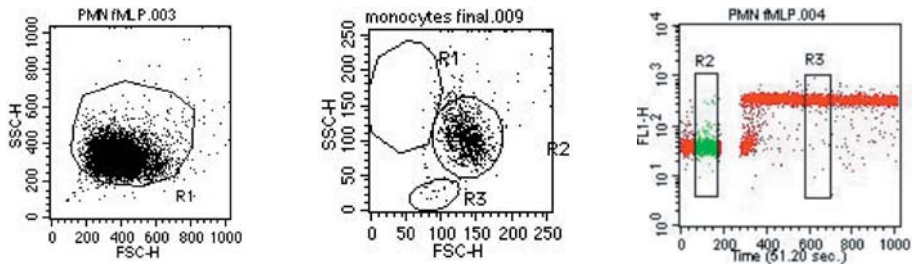


Figura 14. Assajos de mobilització de calci mitjançant citometria de flux (veure material i mètodes). Després de la separació de leucòcits polimorfonuclears (Histopaque-Ficoll) o monòcits (Ficoll i posteriorment separació magnètica), es marquen amb Fluo-3, i es mesura la mobilització de calci després de l'estimulació amb factors quimiotàctics com fMLP. La pre-incubació de les cèl·lules amb PCT no va inhibir aquesta mobilització.

Tot i que amb les experiències realitzades no s'han pogut reproduir els resultats, en principi la funció biològica de la PCT seria dosi i temps-depenent, actuant com a factor quimiotàctic només en un període inicial, i essent secretada de forma massiva únicament per monòcits adherents, és a dir, estimulats, i no per leucòcits circulants⁵. Per aquest mateix motiu, no s'elevaria en relació a infecció vírica, rebuig d'òrgans, o desordres autoimmunes, que donen lloc a una resposta mitjançada per limfòcits T i no per monòcits. La inducció de la PCT depèn, doncs, de la presència d'infecció, però les conseqüències immunitàries de la infecció intervien també en la seva inducció⁵. La font de síntesi, doncs, és variable en funció de l'òrgan afectat, però el més probable és que es produeixi a múltiples teixits, tal i com han mostrat estudis experimentals¹⁷⁸ de forma similar a les citocines. L'estudi en pacients hematològics fa pensar que el sistema mononuclear fagocític no és pas la principal font de síntesi.

Tot plegat fa pensar que el més probable és que les proteïnes de fase aguda i les anomenades "*hormokines*" exerceixin efectes pleiotròpics, actuant a diversos nivells de la resposta inflamatòria, incloent tots els esllaons, el reconeixement, l'adhesió, la quimiotaxi i fins i tot la reactivitat vascular, i que els efectes siguin dosi-depenents. Es considera, a més, que els mateixos mitjancers poden exercir funcions proinflamatòries a nivell local i antiinflamatòries a nivell sistèmic, també depenent de quin sigui l'òrgan afectat, donant lloc al concepte de compartimentalització⁹⁸.

5.2. Nous mecanismes d'evasió de la resposta immunitària: molècules antiinflamatòries bacterianes

La interpretació de la complexa xarxa de mitjancers inflamatoris durant els processos infecciosos es fa encara més complicada si tenim en compte que els microorganismes han desenvolupat eficients mecanismes d'evasió del sistema immunitari i, concretament, dels primers efectors de la immunitat innata, tals com els factors quimiotàctics, el complement o els pèptids antimicrobians. El desenvolupament d'infeccions invasives es caracteritza sovint per l'evasió de la primera línia de defensa, silenciant la resposta inflamatòria inicial. Els microorganismes han coevolucionat paral·lelament als seus hostatgers, i han anat desenvolupant mecanismes per evadir o interferir amb la resposta immunitària de l'hostatger mitjançant sofisticades interaccions²⁶¹. La patogenicitat dels microorganismes

resideix precisament en evadir o neutralitzar els mecanismes de defensa, i donar lloc a lesions tissulars característiques, secundàries a la resposta inflamatòria desencadenada per l'activació de diversos components del patogen. Així, són capaços d'estimular la resposta inflamatòria, però al mateix temps d'utilitzar-la en el seu benefici, modulant-la a diferents nivells. S'han descrit múltiples mecanismes d'evasió de la immunitat innata i adaptativa²⁶⁰ que actuarien com a factors de virulència. Diversos microorganismes són capaços de modular la resposta quimiotàctica mitjançant la interacció amb *G-protein-coupled receptors*, essent la toxina de *Bordetella pertussis* el més representatiu³¹⁸.

Quant als factors estimuladors de la resposta inflamatòria, gran part de la recerca en sèpsia s'ha focalitzat en el lipopolisacàrid, i la descripció de les vies de senyalització com el receptor CD14 i el *toll like receptor-4* han obert noves rutes d'intervenció, fonamentalment pel que fa a la seva immunopatogenicitat. Si més no, en les darreres dècades i especialment a nivell hospitalari, s'ha enregistrat un augment de les infeccions per bacteris grampositius, especialment els estafilococs, probablement degut a l'habilitat de *Staphylococcus aureus* de colonitzar catèters intravasculars o materials implantats quirúrgicament, a més de l'extensió de les soques meticilin-resistents¹⁵.

La patogenicitat de *S.aureus* és deguda a la producció d'un ampli repertori de toxines, exoenzims, adhesines i proteïnes immunomoduladores³¹⁹. Amb l'excepció de les síndromes produïdes per toxines, no hi ha cap factor de virulència que aïlladament sigui suficient per donar lloc a la infecció estafilocòccica. *S.aureus* és un patogen piogen que dona lloc a invasió tissular i evasió de la fagocitosi a càrrec dels neutròfils³²⁰. Diversos components de *S.aureus* són capaços d'induir el reclutament de neutròfils i macròfags via molècules com IL-8, i donar lloc als fenòmens de dany tissular²⁵⁶. Al mateix temps, però, *S.aureus* i, de forma similar, *Streptococcus pyogenes* produeixen molècules capaces d'interferir en pràcticament cadascun dels estadis de la resposta immunitària innata³¹⁹⁻³²², des de la inhibició de la fagocitosi i de l'acció de pèptids antimicrobians fins al complement o la quimiotaxi.

Pel que fa a la resposta inflamatòria generada per *S.aureus* hi intervenen diverses molècules com el peptidoglicà o els àcids lipoteicoics, que generen respostes fonamentalment a través de TLR2, però també cooperant amb TLR6, CD36, o el propi CD14, les proteïnes Nod o les proteïnes reconeixedores de peptidoglicà (PGRP)²⁵⁷. D'altra banda, la proteïna A pot estar implicada en la fisiopatologia de la pneumònia per *S.aureus* via activació del receptor 1 de TNF- α , que indueix una intensa resposta inflamatòria, deletèria per l'hostatger³²³. Altres potents inductors de la resposta inflamatòria serien les hemolisines, o el DNA bacterià, pel seu contingut en CpG, reconegut per TLR9. Finalment, els pèptids formilats produïts pels bacteris, inclòs *S.aureus* són capaços d'exercir funcions quimiotàctiques sobre neutròfils i macròfags³⁰.

Així, gran nombre de molècules estafilocòcciques interaccionen amb el sistema immunitari innat per induir la producció de citocines i la resposta inflamatòria, donant lloc a una interacció complexa entre els estafilococs i les cèl·lules eucariotes²⁵⁷. Receptors com TLR2, Nod2 o TNFR1 tenen funcions ben establertes en el reconeixement d'estructures de *S.aureus* però altres receptors, com els receptors de pèptids formilats o TLR-9 poden contribuir també a l'activació de NF- κ B i producció de citocines en resposta a la infecció estafilocòccica²⁵⁷.

El grup d'Inflamació de l'Eijkman-Winkler Institute (*Universitair Medisch Centrum*, Utrecht, Països Baixos) ha descrit dues noves molècules antiinflamatòries produïdes per soques de *S.aureus*¹³. La proteïna **CHIPS** (*Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*) és capaç d'inhibir els receptors de pèptids formilats (FPR) i de C5a (C5aR) i, per tant, inhibir l'activació dels neutròfils a càrrec de fMLP i C5a⁴⁰. S'ha demostrat que CHIPS s'uneix directament als receptors C5aR i FPR, evitant la seva activació per part dels lligands naturals³²⁴. Es coneixen també els llocs d'unió a C5aR^{325, 326}. D'altra banda, la proteïna **SCIN** (*Staphylococcal Complement Inhibitor*)³²⁷, també descrita pel mateix grup, s'uneix i estabilitza les C3 convertases (C4b2a i C3bBb), interferint en la deposició de C3b que es precisa per activar les tres vies del complement, donant lloc a un dramàtic descens de la fagocitosis de *S.aureus* a càrrec dels neutròfils. Totes dues proteïnes (CHIPS i SCIN) es troben codificades a la mateixa illa de patogenicitat (SaPI5), que també conté l'estafilocinasa (*sak*) i l'enterotoxina A (*sea*) estafilocòccica, fàcilment transferibles mitjançant bacteriòfags³²⁸.

En aquest treball es descriuen dues noves molècules antiinflamatòries d'origen estafilocòccic que actuen bloquejant el receptor FPRL1, un altre receptor de pèptids formilats, constituint un altre mecanisme d'evasió de la resposta immunitària.

5.2.1. Agonistes i antagonistes de pèptids formilats (FPR)

El reclutament de neutròfils als llocs d'inflamació, com a resposta precoç a l'entrada de microorganismes, depèn de la presència d'un gradient de factors quimiotàctics. Es distingeixen la superfamília de les quimiocines i els factors quimiotàctics "clàssics", que inclouen els pèptids formilats, tals com *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine* (fMLP), el component 5 del complement activat (C5a), el leucotriè B4 (LTB4) i el factor activador de plaquetes (PAF). Els receptors de pèptids formilats inclouen FPR, FPRL1 i FPRL2.

S'han identificat gran varietat d'agonistes i antagonistes dels receptors de pèptids formilats³⁵, incloent agonistes lipídics (lipoxina A4)³²⁹ i diversos **pèptids sintètics**, tals com WKYMVM, que utilitza tant FPR com FPRL1 per a estimular els fagòcits, amb major eficàcia per FPRL1; WKYMVM, que utilitza FPRL1 i FPRL2³³⁰, ó MMK-1 (LESIFRSLFRVM) que és un potent i específic agonista de FPRL1³³¹.

FPRL1 interacciona també amb **molècules endògenes**, tals com el fragment de catelicidina LL-37³³² o una forma truncada d'una β -quimiocina³³³. A més, FPRL1 és el receptor de la proteïna de fase aguda *serum amyloid A* (SAA)²⁰⁴, del pèptid precursor d'amiloide β de 42 aminoàcids ($A\beta_{1-42}$)¹⁷⁸ i del fragment de proteïna prionica PrP₁₀₆₋₁₂₆³³⁴. SAA, $A\beta_{1-42}$ i PrP₁₀₆₋₁₂₆ són proteïnes endògenes que, quan s'agreguen, tendeixen a precipitar i determinen el depòsit d'amiloide en estats patològics tals com l'amiloidosi sistèmica, la malaltia d'Alzheimer o la malaltia prionica^{35, 335}. FPRL1 és també el receptor de la lipoxina A4, descrita com a agent antiinflamatori, tot i que sembla tenir diferents funcions en funció del tipus cel·lular. S'han descrit també diversos neuropèptids, que exerceixen funcions immunomoduladores quan són secretats per cèl·lules inflamatòries, que tindrien com a receptor el FPRL1, tals com PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*)³³⁶.

S'han identificat també **components microbians** que interaccionen amb FPRL1, tals com dominis peptídics derivats de l'embolcall del virus VIH-1^{337, 338}, o un pèptid derivat de *Helicobacter pylori*, Hp (2-20)³³⁹.

És evident la implicació de receptors de factors quimiotàctics (FPR, FPRL1, C5aR, IL-8R) en els fenòmens de la immunitat innata, i la participació de les proteïnes de fase aguda en aquestes vies de senyalització, tal com s'ha explicat prèviament. El lligand endogen de FPR annexina 1, donaria lloc a l'expressió de proteïnes de fase aguda en activar aquest receptor³⁴⁰. L'annexina és una proteïna regulada pels glucocorticoides, amb funcions pro- i antiinflamatòries que s'expressa en una gran varietat de cèl·lules, essent particularment abundant en neutròfils. L'annexina 1 inhibeix l'expressió i l'activitat de la fosfolipasa A₂, però també d'altres enzims inflamatoris com iNO_s ó la ciclooxigenasa induïble (COX-2), a més de la inhibició de la migració de neutròfils i monòcits²²⁹. Els efectes en la migració cel·lular tindrien lloc mitjançant l'activació dels receptors de pèptids formilats. Un fragment N-terminal de l'annexina 1 activaria els 3 receptors de pèptids formilats (FPR, FPRL1 i FPRL2)³⁴⁰.

5.2.2. Formyl peptide receptor-like inhibitory protein (FLIPr)

En el present estudi, a partir de la recerca al genoma de *S.aureus* de proteïnes amb cert grau d'homologia a la prèviament descrita CHIPS, es descriuen les propietats de dues noves proteïnes amb propietats antiinflamatòries, FLIPr i FLIPr-like. Els mètodes han implicat la utilització de tècniques de biologia molecular, clonació de proteïnes en sistemes procarïotes i eucariotes, cultius cel·lulars, cromatografia i citometria de flux, tal i com es descriu als apartats de material i mètodes dels articles. Així doncs, la proteïna sintetitzada per *S.aureus* que hem anomenat **FLIPr**, actua inhibint l'acció dels factors quimiotàctics, que actuen a través de FPRL1. Els resultats obtinguts confirmen la hipòtesi de FPRL1 com el receptor de FLIPr.

Les dades a favor d'aquesta hipòtesi són:

- Inhibició de l'activació dels neutròfils induïda per fMLP (mobilització de calci, canvis en el *forward scatter* i assajos de quimiotaxi) de forma més dèbil que l'exercida per CHIPS: mentre fMLP és un agonista d'alta afinitat per FPR, interacciona amb FPRL1 i induïx mobilització de calci només a elevades concentracions.
- Inhibició de l'activació dels neutròfils (mobilització de calci i assajos de quimiotaxi) induïda pel pèptid sintètic WKYMVm (*W-peptide*) i, de forma més potent, WKYMVM i MMK-1 (*L-peptide*). WKYMVm utilitza tant FPR com FPRL1 per a estimular els fagòcits, amb major eficàcia per FPRL1; WKYMVM utilitza FPRL1 y FPRL2, i MMK-1 és un potent i específic agonista de FPRL1.
- *Binding* a cèl·lules HEK 293 transfectades amb FPRL1. Els resultats mostren una clara unió de CHIPS a les cèl·lules transfectades amb FPR i amb C5aR, i no a les transfectades amb FPRL1, i clara unió de FLIPr a les cèl·lules transfectades amb FPRL1, en menor grau a les transfectades amb FPR i no a les transfectades amb C5aR.

- Inhibició de la resposta (mobilització de calci i quimiotaxi) a pèptids endògens descrits com agonistes de FPRL1, tals com $A\beta_{1-42}$ i el fragment de proteïna priònica PrP₁₀₆₋₁₂₆.

La unió de FLIPr a diferents subtipus cel·lulars, és encara difícil d'explicar. Neutròfils i monòcits expressen el receptor FPRL1, i s'ha descrit en algunes subpoblacions de limfòcits, però no està àmpliament estudiat. En el cas de les cèl·lules *natural killer*, s'ha descrit l'expressió de receptors per a quimiocines CXCL1, CXCL2 i CXCL3³⁴¹ però, fins al moment, no a càrrec de FPRL1.

Els assajos funcionals amb les formes mutants de FLIPr ens indiquen que la primera part de la molècula, l'extrem N-terminal, és el més important per a la funció sobre fMLP.

FLIPr-like exerceix una funció pràcticament idèntica a la de FLIPr, tot i que amb major potència sobre fMLP. Els resultats amb el fragment de FLIPr-like sense els primers 7 aminoàcids (FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴), confirmen que el lloc d'acció sobre fMLP es troba situat a l'extrem N-terminal. En els assajos de *binding* amb cèl·lules HEK293, FLIPr-like s'uneix també de forma potent a FPRL1, però presenta també certa afinitat per FPR, que podria explicar la seva major acció sobre fMLP. En el grup de soques de *S.aureus* testades, el gen de FLIPr-like es troba present en aquelles que no contenen el gen de FLIPr. Donat que la funció és tan similar, es considera lògica aquesta distribució.

La confirmació de **FPRL1** com a receptor de FLIPr i de FLIPr-like, sobre el que actuarien com a antagonistes, és de gran importància clínica, per la seva potencial intervenció en la patogènesi de les malalties estafilocòcciques. A més, s'ha implicat aquest receptor en estats patològics de tanta importància com l'amiloidosi sistèmica, la malaltia d'Alzheimer o la malaltia priònica. L'activació de FPRL1 per $A\beta_{1-42}$ o pel fragment de la proteïna priònica (**PrP**₁₀₆₋₁₂₆) s'ha descrit com a responsable de l'acumulació i activació de fagòcits mononuclears (monòcits i microglia) així com la formació fibril·lar present a les plaques neurítiques de la malaltia d'Alzheimer³³⁵, així com en les malalties priòniques³⁴³. S'ha descrit que el pèptid endogen *humanin* exerciria els seus efectes neuroprotectors mitjançant la inhibició competitiva de l'accés de $A\beta_{1-42}$ a FPRL1³⁴⁴. S'ha descrit també la participació de FPRL1 en el procés d'endocitosi i posterior agregació de $A\beta_{1-42}$ en fagòcits mononuclears³⁴⁵. Si més no, en la nostra experiència no ha estat possible reproduir aquests resultats, ni inhibir el *binding* de $A\beta_{1-42}$ -FITC mitjançant FLIPr. Les vies de senyalització utilitzades pels diversos lligands de FPRL1 poden ser diferents. S'ha vist per exemple que $A\beta$ utilitza un mecanisme esfingosin-cinasa dependent per induir quimiotaxi, i que els neuropèptids VIP (pèptid intestinal vasoactiu), substància P i fins i tot CGRP són capaços d'inhibir la migració dels monòcits en resposta a $A\beta$ per aquesta via³⁰⁰.

La separació immunomagnètica de monòcits va permetre aconseguir una puresa entre el 95-98%. El cultiu de monòcits, així com la seva diferenciació a macròfags mitjançant incubació amb M-CSF, va mostrar resultats satisfactoris, sense problemes de contaminació o inhibició del creixement. Si més no, la incubació amb $A\beta_{1-42}$ i posterior tinció amb roig Congo no va permetre observar la formació d'agregats fibril·lars a diferència dels resultats descrits per Yazawa et al³⁴⁵. Els assajos de *binding* mitjançant citometria de flux van mostrar unió de $A\beta_{1-42}$ -FITC a neutròfils, cèl·lules mononuclears i a macròfags, de forma dosi-dependenta, així com de FLIPr-FITC, indicant la presència del seu receptor en aquests

tipus cel·lulars. Si més no, la pre-incubació amb FLIPr no va permetre inhibir el *binding* de $A\beta_{1-42}$ -FITC de forma concloent.

És important destacar que s'han descrit, no únicament FPRL1, sinó un no despreciable nombre de receptors de superfície que interaccionarien amb $A\beta_{1-42}$ ³⁴⁶⁻³⁴⁹, fet pel qual FPRL1 seria una de les possibles dianes però no pas la única. El pacient amb malaltia d'Alzheimer es beneficiaria d'una combinació de diversos agents, pel què diverses aproximacions terapèutiques estan en investigació^{350, 351}. A més, el receptor FPRL1 ha estat implicat en la desensibilització d'importants receptors de quimiocines (CCR5 y CXCR4), que actuen com a co-receptors en la infecció per VIH^{338, 352}. En la mateixa línia, existeix un component fisiopatològic similar entre el complex demència-SIDA i altres malalties neurodegeneratives³⁵³. D'altra banda, s'ha implicat al receptor soluble de urocinasa en la fisiopatologia d'ambdues malalties³⁵⁴ i, un fragment d'aquest receptor, actua a la seva vegada a través de FPRL1³⁵⁵.

En qualsevol cas, un millor coneixement de les interaccions entre FPRL1 i els seus agonistes, així com el desenvolupament d'antagonistes específics, seria d'un potencial terapèutic prometedor. En aquest sentit, la caracterització d'aquestes dues noves molècules antiinflamatòries estafilocòcciques: FLIPr i FLIPr-like, que actuen a través de FPRL1, inicien una línia d'investigació amb interessants possibilitats.

De forma més general, el millor coneixement dels mecanismes d'evasió del sistema immune a càrrec de microorganismes tan ben armats com *S.aureus* ens ha de permetre un millor coneixement dels fonaments de la patogenicitat bacteriana, la immunitat innata i les possibles vies d'intervenció.

5.3. Aportacions de la línia de recerca en inflamació

5.3.1. Utilitat de la mesura de marcadors d'inflamació

En els darrers anys s'han anat descrivint nous mitjancers implicats en la resposta inflamatòria a la infecció i altres desordres relacionats, coneixent-se cada cop amb major detall les vies de senyalització utilitzades. Paral·lelament s'han multiplicat els assajos comercialitzats per mesurar els nivells d'aquests mitjancers, i s'han publicat gran nombre d'estudis avaluant la utilitat de tota mena de marcadors, tot descrivint combinacions diferents en cada tipus d'estudi, sovint en funció de la disponibilitat de determinades tècniques de mesura. Aquests estudis han obert noves vies d'intervenció, a nivell diagnòstic i terapèutic, però sovint han donat lloc a una creixent confusió en la pràctica clínica, sobre què i quan cal mesurar paràmetres diferents dels utilitzats habitualment. La confusió augmenta en llegir revisions segons les quals la mesura de marcadors no aporta més informació que la semiologia clàssica³⁵⁶. Alguns estudis indiquen que la mesura de marcadors d'inflamació no millora la predicció de bacterièmia en comparació amb la febre, per exemple^{357, 358}. Aquesta visió és absolutament certa en determinades situacions i, com en qualsevol altra exploració complementària, tant pel que fa a paràmetres de laboratori com a tècniques de diagnòstic per la imatge, cal ser selectiu en determinar les situacions en què aquestes determinacions ens aportarien informació addicional, per tal de millorar l'orientació diagnòstica i terapèutica i no pas fer-la més complicada. Sovint hi ha un retard en el diagnòstic, i els tests immunològics i genòmics ràpids requereixen una prèvia sospita de l'agent etiològic. És evident que la utilitat dels marcadors es fa palesa quan restringim el seu ús a determinats grups poblacionals. Determinats marcadors indiquen primàriament la severitat de la inflamació però no són específics d'infecció, com per exemple la IL-6, i altres indiquen infecció però no la resposta de l'hostager, com per exemple l'endotoxina o la LBP⁵.

El present treball pretèn resumir la complexa xarxa d'interaccions que tenen lloc en el procés de resposta inflamatòria, i establir les situacions concretes en què la mesura de marcadors pot aportar algun benefici. La monitorització de la resposta immunitària ens ajuda a entendre els aspectes fisiopatològics de la inflamació, la immunodeficiència i la infecció en general, i poder decidir les mesures terapèutiques més adequades. Aquesta monitorització es fa necessària, però, en les situacions enumerades com a de complex diagnòstic i tractament: edats extremes de la vida, pacients immunodeprimits, pacients amb síndrome de resposta inflamatòria sistèmica. En general, a més, per a la potencial utilització de teràpies antiinflamatòries, és fonamental conèixer l'estat inflamatori.

És també de gran importància el valor predictiu negatiu dels marcadors, que ha de permetre reduir l'ús excessiu i innecessari d'agents antimicrobians, que dona lloc a un augment de les resistències. Cal tenir en compte, en general, que la precisió dels tests diagnòstics pot ser diferent en diverses fases de la malaltia, i sempre cal tenir també en compte la cinètica del marcador que s'està mesurant. En el present treball s'han descrit diferències importants en base a diferents factors, tals com l'edat, l'etiologia, l'extensió de la infecció o la localització.

Així, la monitorització ha d'estar adaptada a cada tipus d'aproximació, tenint en compte si l'objectiu de la determinació de marcadors és diagnòstic o bé pronòstic. L'edat, la malaltia

de base i la font probable d'infecció s'han de tenir en compte en analitzar els resultats. La utilitat de cada marcador s'ha de contextualitzar, en base a la situació clínica, l'existència de comorbiditat i el lloc d'infecció (sistema nerviós central, respiratòria, urinària,...). La PCT es mostra superior a la proteïna C reactiva quan es tracta de distingir entre infecció bacteriana i infecció vírica, i també entre infeccions bacterianes i causes no infeccioses d'inflamació, no només en la nostra experiència sinó en una metaanàlisi dels articles publicats⁶. Si més no, per a la interpretació dels resultats cal tenir en compte tots els factors citats, que afecten fins i tot el *cut-off*, i tenir presents les possibles causes de falsos positius (ex. tractaments amb citocines) i falsos negatius (infeccions localitzades, fases inicials de la infecció). Com a limitacions de la PCT destacaríem que no augmenta, o només discretament, quan es tracta d'una infecció confinada a un òrgan o sense manifestacions sistèmiques, essent poc útil en aquest tipus d'infeccions, en les que la proteïna C reactiva aportarà més informació. Tampoc no és útil en la monitorització d'infeccions víriques ni de malalties inflamatòries cròniques. Cal tenir en compte també que disminueix en sèrum quan el tractament és adequat però no indica erradicació de la infecció, únicament que la resposta sèptica sembla estar sota control. El mètode ultrasensible permetrà probablement l'exclusió de la infecció bacteriana amb un més elevat valor predictiu negatiu.

El marcador ideal hauria de permetre un diagnòstic precoç, permetre diferenciar causes d'inflamació sistèmica d'origen bacterià de les d'altre origen, i hauria d'informar del curs clínic i el pronòstic. Les infeccions clínicament aparents són massa complexes en les interaccions entre hostatger i microorganisme per ser reduïdes a la mesura d'un determinat marcador. Per tant, l'ús de marcadors no ha de substituir mai un correcte diagnòstic i seguiment clínic i microbiològic, però pot aportar una més acurada informació diagnòstica i pronòstica i, fins i tot, s'obren noves opcions terapèutiques quant a les possibilitats d'immunoneutralització i utilització de tractaments immunomoduladors en general.

La utilització de marcadors com la PCT, mitjançant mètodes sensibles i ràpids de determinació, així com de nous marcadors en procés d'avaluació, tals com la proadrenomedulina, la copeptina, el pro-pèptid natriurètic atrial³⁵⁹⁻³⁶¹, marcadors del sistema de la coagulació (dímers D, antitrombina III, proteïna C)^{80, 221} ó TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells*)¹¹⁰ enceten una nova etapa en el diagnòstic, tractament i monitorització de les malalties infeccioses.

És probable que la fórmula consisteixi en l'adequada combinació de marcadors, tenint en compte els avantatges i limitacions de cadascun, en funció de l'edat, la síndrome clínic, la/es malaltia/es de base i el context clínic (atenció primària, hospitalització, cures intensives,...) així com les determinacions seriades en funció de la cinètica del marcador.

5.3.2. Noves possibilitats terapèutiques

La inflamació consisteix en un complex conjunt d'interaccions entre factors solubles i cel·lulars, que es poden originar en qualsevol teixit en resposta a estímuls infecciosos, traumàtics, post-isquèemics, tòxics o autoimmunitaris¹²⁷. El manteniment de l'homeostasi requereix no només la correcta estimulació sinó també la correcta supressió d'aquests mecanismes. La inflamació *per se* segueix sent una de les majors dianes terapèutiques en diversos desordres¹²⁷, especialment quan no es coneixen els mecanismes fisiopatològics

inicials. En diverses malalties d'origen infeccioses, la resposta inflamatòria pot contribuir a la patologia tant com ho fa la toxicitat microbiana per si mateixa. Exemples en sèrie són la meningitis meningocòccica i pneumocòccica, la glomerulonefritis post-estreptocòccica, la síndrome sèptica, la pneumònia pel virus Influenza, la tuberculosi, l'hepatitis C o la gastritis per *Helicobacter pylori*¹²⁷.

Es considera que la sobreproducció de citocines proinflamatòries és un dels principals mecanismes per la susceptibilitat al shock sèptic. Si més no, la deficiència en l'alliberament de citocines durant les infeccions dona lloc a una ràpida multiplicació del microorganisme invasor. La majoria de models experimentals mimetitzen l'endotoxèmia i no les fases finals del shock sèptic, i els tractaments anti-citocines proinflamatòries poden mostrar resultats beneficiosos. Si més no, es correspondria només a una finestra molt estreta del procés inflamatori. En processos finals, seria més beneficiosa la teràpia immunoestimuladora³⁶². Deficiències relatives en la producció de citocines proinflamatòries, per exemple com a conseqüència de polimorfismes genètics, resultarien en l'activació defectiva de la defensa de l'hostatger enfront microorganismes invasors³⁶².

Un dels principals problemes per l'ús d'agents immunomoduladors és la dificultat en identificar els pacients que se'n poden beneficiar, donat que existeixen múltiples diferències individuals com a conseqüència de múltiples variables. Els mitjancers actuen com a inductors o reguladors de la resposta en funció de factors tals com la seva concentració. Inicialment es podria considerar que elucidar els mitjancers que causen/mitjancen els signes cardinals d'inflamació ha de dur al disseny i al desenvolupament d'inhibidors. S'han descrit centenars de mitjancers, incloent citocines, quimiocines, factors de creixement, enzims, proteïnes de fase aguda, espècies reactives de l'oxigen i del nitrogen, etc. Els més novedosos tractaments antiinflamatoris testats inclouen agents neutralitzants de TNF, agents bloquejants dels receptors de leucotriens, inhibidors de la ciclooxigenasa (COX-2), i l'agonisme de *protease-activated receptor 1* a càrrec de proteïna C activada¹²⁷. Si més no, els mitjancers endògens d'antiinflamació ofereixen la possibilitat de desenvolupar-ne agonistes. Hi ha un interès creixent pels "frens" a la inflamació, que sovint són molècules amb funcions pleiotròpiques, tals com els autacoids lipídics, les estatines, els neuropèptids o la IL-10. Entre aquests mitjancers podríem probablement incloure la PCT.

Pel que fa als **autacoids lipídics**, cal recordar que l'àcid araquidònic derivat dels neutròfils serveix de substrat per la 5-lipoxigenasa per generar el factor quimiotàctic leucotriè B₄. Si més no, a mesura que els neutròfils infiltren els teixits, també proporcionen araquidonat a les cèl·lules tissulars expressant 15-lipoxigenasa, que produeixen lipoxines, eicosanoids amb activitat antiinflamatòria¹²⁷. Els antiinflamatoris no esteroïdals inhibeixen la síntesi de prostaglandines, i els inhibidors selectius de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) inhibeixen la producció dels metabòlits inflamatoris de l'àcid araquidònic però preserven el seu rol protector en no afectar la seva síntesi en cèl·lules en què és mitjançada per COX-1. Els inhibidors de fosfolipasa A₂ també tenen important potencial terapèutic³⁶³.

Altres mitjancers poden canviar de "sentit" al llarg del procés, tals com l'IFN- γ , el TGF- β o els RNIs (*Reactive nitrogen intermediates*), exhibint accions pro- o antiinflamatòries depenent del *timing* i el context¹²⁷. Així doncs, sovint els productes proinflamatoris són a la seva vegada efectors essencials per l'homeostasi antiinflamatòria, confirmant el plantejament simplista de bloquejar una determinada molècula proinflamatòria o

l'endotoxina pròpiament com a teràpia. El reconeixement de senyals antiinflamatoris pot ajudar en aquest objectiu.

L'alliberament de **neuropèptids** als teixits contribueix a afavorir o bé limitar la resposta inflamatòria. S'ha vist que substàncies com el pèptid intestinal vasoactiu (VIP), substància P, ó CGRP (*Calcitonin gene related peptide*), actuen com a mitjancers amb diferents funcions tot depenent de la concentració, però fonamentalment antiinflamatòria^{300, 364}.

Les **estatives** actuen a diversos nivells de la resposta inflamatòria, amb propietats antioxidatives, modulació de la immunitat cel·lular, millora de la funció endotelial,... S'ha documentat una disminució del risc de sèpsia i sèpsia severa en pacients amb malaltia cardiovascular tractats amb estatives³⁶⁵, i s'està explorant el seu potencial terapèutic en el tractament de la sèpsia.

La citocina antiinflamatòria **IL-10** podria resultar també d'utilitat. En un model experimental murí de peritonitis amb bacterièmia³⁶⁶, induïda per lligament cecal i punció, que mimetitzava millor el shock sèptic humà que no la simple injecció d'endotoxina, es postula que la IL-10 regularia la transició entre sèpsia reversible i shock irreversible, definida com el punt en què la ressecció quirúrgica del cec necròtic deixa de ser efectiva com a teràpia de rescat. La hipòtesi és que la IL-10 actua com a regulador del "punt de no retorn" en la sèpsia severa. El tractament amb IL-10 augmentaria la supervivència, tant en els ratolins que són deficientes en IL-10 com en els que no, considerant que suprimiria l'excessiva producció de citocines proinflamatòries observada en els ratolins *knock-out*, i que augmentaria la "finestra" en què la cirurgia és encara efectiva en els no *knock-out*. L'administració és efectiva en un moment concret, però és deletèria si és massa tardana.

En el cas de la **PCT**, s'ha demostrat àmpliament la seva correlació amb el risc de mort. En models experimentals, s'ha vist que l'administració de PCT durant la sèpsia augmenta la mortalitat i, fins al moment, dos models animals diferents (en hamster i en porc) han demostrat els avantatges de la immunoneutralització de la PCT com a tractament de la sèpsia severa^{367, 368}. La vida mitja de la PCT, d'entre 25-45 hores²⁹⁰, la converteix en una potencial diana més duradora per la possibilitat d'immunoneutralització terapèutica. Per la seva banda, els agents antiinflamatoris tenen efectes variables en els nivells de precursors de calcitonina²⁹⁰. L'ibuprofè, inhibidor de ciclooxigenasa, suprimeix la febre i els símptomes d'endotoxèmia. Com que també es perd la supressió de la producció de citocines a càrrec de les prostaglandines, els nivells de TNF- α estan elevats i es considera que aquest seria el mecanisme per l'elevació en els nivells de precursors de calcitonina observada en administrar endotoxina i ibuprofè conjuntament. L'administració de dosis baixes de TNFR: Fc (receptor soluble de TNF, inhibidor dels efectes de TNF) junt amb endotoxina dóna lloc a un menor augment dels nivells de precursors de calcitonina. Finalment, l'administració de sIL-1R1 (receptor soluble d'IL-1, que inhibeix la resposta a IL-1), no altera l'increment d'aquests mitjancers²⁹⁰. Així, els agents antiinflamatoris alteren els nivells de precursors de calcitonina, degut en part a l'activitat de TNF- α , concordant amb estudis previs³⁶⁹.

És prou evident que els efectes beneficiosos o deleteris dels mitjancers d'inflamació depenen de la seva concentració, la cinètica i del "*milieu*" humoral circumdant. Probablement l'alliberament inicial té una funció protectora, com altres mitjancers antiinflamatoris, però la persistència pot donar lloc al fenomen d'immunoparàlisi. Aquesta hipòtesi és concordant

amb el fet que la persistència de nivells elevats de PCT es correlaciona amb fallida multiorgànica i elevat risc de mort.

Així, com a marcadors, els precursors de la calcitonina ofereixen mitjans per evaluar l'eficàcia de la teràpia antiinflamatòria. D'altra banda, com a mitjancer susceptible a agents antiinflamatoris o immunoneutralització, la seva vida mitja més prolongada pot facilitar intervencions terapèutiques²⁹⁰.

Per part del microorganisme, múltiples factors de virulència modulen la resposta immune i inflamatòria. Aquests factors varien depenent del gènere, l'espècie i fins i tot de la soca, i també en funció de la població bacteriana, el microambient i el lloc d'infecció. En aquest treball es descriuen dues noves molècules estafilocòcciques amb funcions immunomoduladores. La complexitat i especificitat de l'expressió de factors de virulència i patogenicitat dels microorganismes, juntament amb els polimorfismes genètics dels hostatgers humans, fan més complexa la comprensió dels mecanismes de la sèpsia²⁶¹. Si més no, el coneixement de l'agent etiològic i dels mecanismes d'evasió que és capaç d'expressar, ha de permetre dissenyar tractaments específics amb, per exemple, aquestes molècules com a diana, a més de les implicacions terapèutiques per altres malalties inflamatòries, no únicament infeccioses. Els bacteris que són capaços d'evadir o incapacitar les defenses de l'hostatger tenen un major potencial per produir malaltia.

El coneixement de les interaccions entre microorganisme invasor i hostatger, així com del lloc d'unió de cada tipus de component, i les implicacions a nivell estructural de la interacció entre agonistes/antagonistes i els seus receptors, és fonamental per a la seva potencial utilització terapèutica, especialment en el cas de les molècules que utilitzen GPCRs, per tal d'evitar una reactivitat creuada indesitjable¹²⁵. L'objectiu és identificar els punts de control susceptibles d'intervencions que siguin al mateix temps relativament segures i efectives¹²⁷, a més del desenvolupament de mitjans d'administració més refinats com la incorporació a liposomes, microesferes o teràpia gènica.



CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

6.1. Utilitat diagnòstica i pronòstica dels marcadors d'inflamació

- Els marcadors d'inflamació varien en funció de l'etiologia, l'edat i la severitat de la infecció.
- Els punts de tall òptims varien en funció del context clínic, l'edat, i el focus de la infecció, així com del tipus d'assaig utilitzat per a la seva mesura.
- La procalcitonina distingeix infecció bacteriana sistèmica de localitzada, i infecció bacteriana d'infecció vírica.
- Els nivells de procalcitonina no augmenten en situacions d'inflamació d'origen no infeccios, excepte en relació a l'administració de determinades citocines o derivats.
- Les determinacions seriades dels marcadors d'inflamació tenen un valor pronòstic, podent-se utilitzar en la monitorització de la resposta al tractament. Cal tenir en compte la cinètica i la vida mitja dels marcadors, en cas de trobar-los en una fase molt precoç de la infecció, i les determinacions repetides poden ser d'utilitat.
- L'ús de marcadors no ha de substituir mai un correcte diagnòstic i seguiment clínic i microbiològic, però pot aportar una més acurada informació diagnòstica i pronòstica i, fins i tot, s'obren noves opcions terapèutiques quant a les possibilitats d'immunoneutralització i utilització de tractaments immunomoduladors en general.
- La procalcitonina compleix els criteris d'estabilitat, vida mitja, correlació amb infecció i també amb severitat, essent un marcador útil per al diagnòstic i monitorització de la infecció bacteriana sistèmica.
- És probable que l'òptima rendibilitat s'obtingui amb l'adequada combinació de marcadors, tenint en compte els avantatges i limitacions de cadascun (incloent els que es troben en procés d'avaluació), en funció de l'edat, la síndrome clínica, la/es malaltia/es de base i el context clínic (atenció primària, hospitalització, cures intensives,...) així com la utilització de determinacions seriades en funció de la cinètica del marcador.
- Els marcadors d'inflamació actuen probablement a diferents nivells durant la infecció, amb funcions pleiotròpiques sobre els diferents esglaons de la resposta inflamatòria.

6.2. Nous mecanismes d'evasió de la resposta immunitària: molècules antiinflamatòries bacterianes

- El coneixement dels mecanismes d'evasió dels microorganismes permet aprofundir en el coneixement de les vies de senyalització de la immunitat innata, afavorint el disseny de noves estratègies terapèutiques.
- La proteïna sintetitzada per *Staphylococcus aureus* que hem anomenat FLIPr, actua inhibint l'acció dels factors quimiotàctics que actuen a través de FPRL1.
- FLIPr és, probablement, un nou factor de virulència de *Staphylococcus aureus*, que actua evadint la resposta immunitària innata.
- FLIPr té una potencial utilització terapèutica donat que FPRL1 està implicat en la patogènesi de les infeccions estafilocòcciques, així com de diverses malalties de la importància de l'amiloïdosi sistèmica, la malaltia d'Alzheimer, o la malaltia priònica.
- FLIPr-like actua també sobre els agonistes de FPRL1, però amb major potència sobre fMLP. El fragment N-terminal és crucial per la seva activitat.
- La identificació del lloc actiu de la proteïna ha de permetre el disseny de molècules que conservin la seva activitat antiinflamatòria, tot reduint la seva immunogenicitat.



BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

1. Delves P, Roitt I. Advances in immunology: the immune system. *N Engl J Med.* 2000;343:37-49 and 108-117
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
3. Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today.* 1992;13:11-16.
4. Glauser MP. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med.* 2000;28:S4-8.
5. Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care.* 2005;11:473-480.
6. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:206-217.
7. Sutherland AM, Russell JA. Issues with polymorphism analysis in sepsis. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 7: S396-402.
8. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med.* 1994;154:26-34.
9. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest.* 1991;100:802-808.
10. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000;8: 452-456.
11. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, et al. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature.* 1997;386:336-337.
12. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267:54-61.
13. Veldkamp KE, Heezius HC, Verhoef J, van Strijp JA, van Kessel KP. Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect Immun.* 2000;68:5908-5913.
14. Bayston K, Tomlinson M, Cohen J. In-vitro stimulation of TNF-alpha from human whole blood by cell-free supernatants of gram-positive bacteria. *Cytokine.* 1992;4:397-402.
15. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med.* 1999;27:1608-1616.
16. Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13:397-412.
17. Wang JE, Jorgensen PF, Almlof M, et al. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun.* 2000;68:3965-3970.
18. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med.* 2003;9:831-835.
19. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:775-779.
20. Shimizu TS, Takahashi K, Tomita M. CpG distribution patterns in methylated and non-methylated species. *Gene.* 1997;205:103-107.
21. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408: 740-745.
22. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9237-9242.
23. Heeg K. Superantigens and bacterial DNA as cytokine inducers. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:93-108.

24. Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit Rev Microbiol.* 1990;17:251-272.
25. Kappler J, Kotzin B, Herron L, et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science.* 1989;244:811-813.
26. Kotb M. Superantigens of gram-positive bacteria: structure-function analyses and their implications for biological activity. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1:56-65.
27. Gaus H, Miethke T, Wagner H, Heeg K. Superantigen-induced anergy of V beta 8+ CD4+ T cells induces functional but non-proliferative T cells in vivo. *Immunology.* 1994;83:333-340.
28. Won SJ, Huang WT, Lai YS, Lin MT. Staphylococcal enterotoxin A acts through nitric oxide synthase mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells to stimulate synthesis of pyrogenic cytokines. *Infect Immun.* 2000;68:2003-2008.
29. Ozmen L, Pericin M, Hakimi J, et al. Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J Exp Med.* 1994;180:907-915.
30. Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72:1059-1062.
31. Marasco WA, Phan SH, Krutzsch H, et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1984;259:5430-5439.
32. Rot A, Henderson LE, Copeland TD, Leonard EJ. A series of six ligands for the human formyl peptide receptor: tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:7967-7971.
33. Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, et al. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *J Exp Med.* 1976;143:1154-1169.
34. Prossnitz ER, Ye RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther.* 1997;74:73-102.
35. Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:91-105.
36. Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med.* 1982;155:264-275.
37. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410:1099-1103.
38. Cardona P, Pujol R, Ausina V. Patogenia de las enfermedades infecciosas. In: Farreras P, Rozman B, eds. *Medicina Interna.* Madrid: Elsevier España S.A.; 2004:2189-2196.
39. Celli J, Finlay BB. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol.* 2002;10:232-237.
40. de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med.* 2004;199:687-695.
41. Smith GL. Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol.* 1994;2:81-88.
42. McFadden G. Viroceptors: virus-encoded receptors for cytokines and chemokines. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003: 285-300.
43. Elstad MR. Aspergillosis and lung defenses. *Semin Respir Infect.* 1991;6:27-36.
44. Tramont E, Hoover D. Innate (General or Nonspecific) Host Defense Mechanisms. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:31-38.
45. Arbibe L, Sansonetti P. Host response to pathogenic bacteria at mucosal sites. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003: 59-64.

46. Elson CO, Cong Y, Sundberg J. The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis. *Int Rev Immunol*. 2000;19:63-75.
47. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599-603.
48. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002;111:927-930.
49. Roitt I, Delves P. *Roitt's Essential Immunology*. Oxford; 2001.
50. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249:1431-1433.
51. Yang RB, Mark MR, Gray A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 1998;395:284-288.
52. Wright SD. CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol*. 1995;155:6-8.
53. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:52-58.
54. Akashi S, Ogata H, Kirikae F, et al. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268:172-177.
55. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand*. 2001;59:124-130.
56. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:135-145.
57. DeFranco A, Locksley R, Robertson MJ. The Toll-Like receptor family of innate immune receptors. In: *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease*. New Science Press Ltd 2006.
58. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet*. 2003;4:195-205.
59. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7:25-32.
60. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol*. 2004;75:749-755.
61. Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*. 1995;9:1059-1066.
62. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95:3032-3043.
63. Bao L, Gerard NP, Eddy RL, Jr., Shows TB, Gerard C. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics*. 1992;13:437-440.
64. Ye RD, Cavanagh SL, Quehenberger O, Prossnitz ER, Cochrane CG. Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte N-formyl peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;184:582-589.
65. Murphy PM, Ozcelik T, Kenney RT, Tiffany HL, McDermott D, Francke U. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J Biol Chem*. 1992;267:7637-7643.
66. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:593-633.
67. Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol*. 2002;23:541-548.
68. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycosylated proteins. *Amino Acids*. 2003;25:283-292.
69. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:628-640.

70. Rivas L, Andreu D. [Eukaryotic antibiotic peptides: a new alternative in clinical practice?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21:358-365.
71. Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:96-102.
72. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1058-1066.
73. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1140-1144.
74. Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* 1996;17:532-540.
75. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* 2000;68:688-693.
76. Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:50-55.
77. Gerard C, Gerard NP. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:775-808.
78. Shariat-Madar Z, Schmaier AH. The plasma kallikrein/kinin and renin angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. *J Endotoxin Res.* 2004;10:3-13.
79. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003;101:3765-3777.
80. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, et al. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med.* 2005;33:341-348.
81. Janeway CA, Jr., Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* Third ed. London/New York: Current Biology Ltd/ Garland Publishing Inc; 1997.
82. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-1476.
83. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-252.
84. Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine.* 2003;21 Suppl 2:S38-42.
85. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today.* 1997;18:263-266.
86. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112:235-243.
87. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346:425-434.
88. Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:714-723.
89. Sánchez Madrid F, González Amaro R. Integrinas y otras moléculas de adhesión. In: Farreras P, Rozman B, eds. *Medicina Interna.* Madrid: Elsevier España S.A.; 2004:2717-2725.
90. Liles WC, Van Voorhis WC. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis.* 1995;172:1573-1580.
91. Gutiérrez M, Suárez A, Mazo L, Juan M. Interleucinas, quimiocinas y otras citocinas que intervienen en las respuestas inmunitarias e inflamatorias. In: Farreras P, Rozman B, eds. *Medicina Interna.* Madrid: Elsevier España S.A.; 2004.
92. Waage A, Espevik T, Lamvik J. Detection of tumour necrosis factor-like cytotoxicity in serum from patients with septicaemia but not from untreated cancer patients. *Scand J Immunol.* 1986;24:739-743.
93. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest.* 1988;81:1925-1937.
94. Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, et al. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect Immun.* 1993;61:4167-4172.

95. Muller-Alouf H, Alouf JE, Gerlach D, Ozegowski JH, Fitting C, Cavaillon JM. Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1994;62:4915-4921.
96. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87:2095-2147.
97. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990;11:443-449.
98. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2006;12:151-170.
99. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448-454.
100. Gresser I. Wherefore interferon? *J Leukoc Biol*. 1997;61:567-574.
101. Murray HW. Current and future clinical applications of interferon-gamma in host antimicrobial defense. *Intensive Care Med*. 1996;22 Suppl 4:S456-461.
102. Lord G. Leptin: its role in immunomodulation and susceptibility to infection. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:9-22.
103. Agnello D, Meazza C, Rowan CG, Villa P, Ghezzi P, Senaldi G. Leptin causes body weight loss in the absence of in vivo activities typical of cytokines of the IL-6 family. *Am J Physiol*. 1998;275:R913-919.
104. Chandra RK, Kumari S. Nutrition and immunity: an overview. *J Nutr*. 1994;124:1433S-1435S.
105. Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol*. 1997;17:77-88.
106. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995;377:68-71.
107. Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock*. 2001;15:247-253.
108. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*. 2004;255:320-331.
109. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*. 2001;410:1103-1107.
110. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med*. 2004;141:9-15.
111. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol*. 1992;12:239-247.
112. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1995;270:9558-9563.
113. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol*. 1994;24:2699-2705.
114. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest*. 1997;99:2930-2940.
115. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit*. 2002;8:RA145-151.
116. Perrella MA, Hsieh CM, Lee WS, et al. Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor beta1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2054-2059.
117. Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis*. 1991;163:579-583.

118. Cohen L, David B, Cavailon JM. Interleukin-3 enhances cytokine production by LPS-stimulated macrophages. *Immunol Lett.* 1991;28:121-126.
119. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem.* 1998;273:17299-17302.
120. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338:436-445.
121. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-242.
122. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:129-135.
123. Kelvin DJ, Michiel DF, Johnston JA, et al. Chemokines and serpentine: the molecular biology of chemokine receptors. *J Leukoc Biol.* 1993;54:604-612.
124. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:336-341.
125. Onuffer JJ, Horuk R. Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:459-467.
126. Wu D, Huang CK, Jiang H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 17):2935-2940.
127. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420:846-852.
128. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest.* 1987;79:1498-1509.
129. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2:907-916.
130. 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.
131. Metcalf K, Jungersten L, Lisander B. Effective inhibition of nitric oxide production by aminoguanidine does not reverse hypotension in endotoxaemic rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46:17-23.
132. Tillett W, Francis TJ. Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930;52:561-571.
133. Cecilian F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett.* 2002;9:211-223.
134. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;389:406-418.
135. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E433-437.
136. Cavailon JM. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators of gram-negative sepsis. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:33-58.
137. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:316-321.
138. Van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol.* 1991;261:E457-465.
139. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest.* 1988;81:1162-1172.
140. Nansen A, Christensen JP, Marker O, Thomsen AR. Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T cell-dependent production of interferon-gamma. *J Infect Dis.* 1997;176:151-157.
141. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138-150.

142. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 2005;11:311-320.
143. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20:864-874.
144. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31:1250-1256.
145. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med.* 1981;9:591-597.
146. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med.* 1998;26:2078-2086.
147. Bjork L, Andersson J, Ceska M, Andersson U. Endotoxin and Staphylococcus aureus enterotoxin A induce different patterns of cytokines. *Cytokine.* 1992;4:513-519.
148. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun.* 2003;71:5803-5813.
149. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119:771-778.
150. Oberhoffer M, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bogel D, Fassbinder J, Reinhart K. Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 1999;27:1814-1818.
151. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock.* 1992;38:145-152.
152. Remick DG. Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care.* 1995;10:198-212.
153. Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg.* 1992;215:356-362.
154. Friedland JS, Suputtamongkol Y, Remick DG, et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infect Immun.* 1992;60:2402-2408.
155. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:735-746; quiz 746-737.
156. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE. C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunol Res.* 1997;16:127-136.
157. Mortensen RF, Zhong W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol.* 2000;67:495-500.
158. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:54-64.
159. Weiss G, Murr C, Zoller H, et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:435-440.
160. Wirleitner B, Reider D, Ebner S, et al. Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. *J Leukoc Biol.* 2002;72:1148-1153.
161. Talpaz M, Rakhit A, Rittweger K, et al. Phase I evaluation of a 40-kDa branched-chain long-acting pegylated IFN-alpha-2a with and without cytarabine in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6247-6255.
162. Chiang J, Gloff CA, Yoshizawa CN, Williams GJ. Pharmacokinetics of recombinant human interferon-beta ser in healthy volunteers and its effect on serum neopterin. *Pharm Res.* 1993;10:567-572.
163. Mager DE, Neuteboom B, Jusko WJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated IFN-beta 1a following subcutaneous administration in monkeys. *Pharm Res.* 2005;22:58-61.

164. Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Weiss G, Fuchs D. Cellular immune activation, neopterin production, tryptophan degradation and the development of immunodeficiency. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000;48:251-258.
165. Hoffmann G, Frede S, Kenn S, et al. Neopterin-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in vascular smooth muscle cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116:240-245.
166. Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B, et al. Neopterin induces nitric oxide-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. *Immunobiology*. 1998;199:63-73.
167. Yao YM, Yu Y, Wang YP, Tian HM, Sheng ZY. Elevated serum neopterin level: its relation to endotoxaemia and sepsis in patients with major burns. *Eur J Clin Invest*. 1996;26:224-230.
168. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;101:1-6.
169. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther*. 2001;26:319-329.
170. Hamerlinck FF. Neopterin: a review. *Exp Dermatol*. 1999;8:167-176.
171. Chesney RW, McCarron DM, Haddad JG, et al. Pathogenic mechanisms of the hypocalcemia of the staphylococcal toxic-shock syndrome. *J Lab Clin Med*. 1983;101:576-585.
172. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*. 1993;341:515-518.
173. Becker KL, Nylen ES, White JC, Muller B, Snider RH, Jr. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1512-1525.
174. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med*. 1999;134:49-55.
175. Monneret G, Laroche B, Bienvenu J. Procalcitonin is not produced by circulating blood cells. *Infection*. 1999;27:34-35.
176. Bernard L, Ferriere F, Casassus P, et al. Procalcitonin as an early marker of bacterial infection in severely neutropenic febrile adults. *Clin Infect Dis*. 1998;27:914-915.
177. Balog A, Ocsovszki I, Mandi Y. Flow cytometric analysis of procalcitonin expression in human monocytes and granulocytes. *Immunol Lett*. 2002;84:199-203.
178. Muller B, White JC, Nylen ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-i gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:396-404.
179. Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, et al. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res*. 2003;35:290-295.
180. Russwurm S, Stonans I, Stonane E, et al. Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues. *Shock*. 2001;16:109-112.
181. Linscheid P, Seboek D, Schaer DJ, Zulewski H, Keller U, Muller B. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med*. 2004;32:1715-1721.
182. Nijsten MW, Olinga P, The TH, et al. Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro. *Crit Care Med*. 2000;28:458-461.
183. Bracq S, Machairas M, Clement B, et al. Calcitonin gene expression in normal human liver. *FEBS Lett*. 1993;331:15-18.
184. Weglohner W, Struck J, Fischer-Schulz C, et al. Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides*. 2001;22:2099-2103.
185. Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med*. 1998;24:888-889.

186. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:1605-1608.
187. Whang KT, Vath SD, Becker KL, et al. Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock.* 2000;14:73-78.
188. Snider RH, Jr., Nylén ES, Becker KL. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *J Investig Med.* 1997;45:552-560.
189. Müller B, Becker KL, Kranzlin M, et al. Disordered calcium homeostasis of sepsis: association with calcitonin precursors. *Eur J Clin Invest.* 2000;30:823-831.
190. Hoffman G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann F, Schobersberger W. In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med.* 2001;29:112-116.
191. Monneret G, Arpin M, Venet F, et al. Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils. *Intensive Care Med.* 2003;29:923-928.
192. Wiedermann FJ, Kaneider N, Egger P, et al. Migration of human monocytes in response to procalcitonin. *Crit Care Med.* 2002;30:1112-1117.
193. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249:1429-1431.
194. Schroder NW, Opitz B, Lamping N, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *J Immunol.* 2000;165:2683-2693.
195. Fron AH, Dentener MA, Greve JW, Ramsay G, Buurman WA. Lipopolysaccharide toxicity-regulating proteins in bacteremia. *J Infect Dis.* 1995;171:1250-1257.
196. Prucha M, Herold I, Zazula R, et al. Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. *Crit Care.* 2003;7:R154-159.
197. Myc A, Buck J, Gonin J, Reynolds B, Hammerling U, Emanuel D. The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4:113-116.
198. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 1999;180:1584-1589.
199. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:268-292.
200. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care.* 2002;6:342-348.
201. Eriksen N, Benditt EP. Isolation and characterization of the amyloid-related apoprotein (SAA) from human high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:6860-6864.
202. Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J.* 1998;334 (Pt 3):489-503.
203. Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* 2004;21:210-221.
204. Su SB, Gong W, Gao JL, et al. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med.* 1999;189:395-402.
205. 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;31:1359-1366.
206. van den Bosch H, Aarsman AJ, van Schaik RH, Schalkwijk CG, Neijls FW, Sturk A. Structural and enzymological properties of cellular phospholipases A2. *Biochem Soc Trans.* 1990;18:781-785.

207. Fuentes L, Hernandez M, Fernandez-Aviles FJ, Crespo MS, Nieto ML. Cooperation between secretory phospholipase A2 and TNF-receptor superfamily signaling: implications for the inflammatory response in atherogenesis. *Circ Res*. 2002;91:681-688.
208. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001;345:1368-1377.
209. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood*. 2000;96:2664-2672.
210. Broxmeyer L. Bacteriophages: antibacterials with a future? *Med Hypotheses*. 2004;62:889-893.
211. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med*. 2003;138:502-505.
212. Holland S, Gallin J. Interferon-gamma in the treatment of infectious diseases. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:331-344.
213. Poli G, Fortis C, Lazzarin A, Tambussi G. Interleukin-2 for the treatment of HIV infection. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:345-360.
214. Dale DC. Potential role of colony-stimulating factors in the prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 1994;18 Suppl 2:S180-188.
215. Dinarello CA. Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 2:S24-34.
216. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345:1098-1104.
217. Kox WJ, Bone RC, Krausch D, et al. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med*. 1997;157:389-393.
218. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med*. 1999;25:556-566.
219. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1197-1205.
220. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*. 2003;326:262-266.
221. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344:699-709.
222. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:238-247.
223. Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 2002;288:862-871.
224. Natanson C, Esposito CJ, Banks SM. The sirens' songs of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling error. *Crit Care Med*. 1998;26:1927-1931.
225. Huang Q, Liu D, Majewski P, et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*. 2001;294:870-875.
226. Minneci P, Deans K, Natanson C, Eichacker PQ. Increasing the efficacy of anti-inflammatory agents used in the treatment of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22:1-9.
227. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995;270:286-290.
228. van Leeuwen HJ, van der Bruggen T, van Asbeck BS, Boereboom FT. Effect of corticosteroids on nuclear factor-kappaB activation and hemodynamics in late septic shock. *Crit Care Med*. 2001;29:1074-1077.

229. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*. 2004;53:125-132.
230. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med*. 1995;23:1430-1439.
231. Norrby-Teglund A, Kotb M. Cytokine patterns in severe invasive Group A streptococcal infections. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:77-92.
232. Levin M, Quint PA, Goldstein B, et al. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. *Lancet*. 2000;356:961-967.
233. Giroir BP, Quint PA, Barton P, et al. Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. *Lancet*. 1997;350:1439-1443.
234. Bochud PY, Glauser MP, Calandra T. Anticytokine therapies in patients with severe sepsis and septic shock. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:381-408.
235. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*. 1998;41:2196-2204.
236. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:1594-1602.
237. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*. 1997;337:141-147.
238. Knaus WA, Harrell FE, Jr., LaBrecque JF, et al. Use of predicted risk of mortality to evaluate the efficacy of anticytokine therapy in sepsis. The rhIL-1ra Phase III Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med*. 1996;24:46-56.
239. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med*. 2004;32:2173-2182.
240. Fekade D, Knox K, Hussein K, et al. Prevention of Jarisch-Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med*. 1996;335:311-315.
241. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock*. 2005;24:300-312.
242. Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med*. 2002;8:1398-1404.
243. Stüber F. Cytokine gene polymorphism and host susceptibility to infection. In: Kotb M, Calandra T, eds. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:23-30.
244. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med*. 1988;319:397-400.
245. Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest*. 1979;64:1516-1524.
246. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
247. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
248. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002;347:1557-1565.
249. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med*. 2004;116 Suppl 6A:9S-16S.

250. Fyfe AI, Rothenberg LS, DeBeer FC, Cantor RM, Rotter JI, Lulis AJ. Association between serum amyloid A proteins and coronary artery disease: evidence from two distinct arteriosclerotic processes. *Circulation*. 1997;96:2914-2919.
251. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:1148-1155.
252. van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med*. 2000;26 Suppl 1:S98-102.
253. Morgenthaler NG, Struck J, Fischer-Schulz C, Seidel-Mueller E, Beier W, Bergmann A. Detection of procalcitonin (PCT) in healthy controls and patients with local infection by a sensitive ILMA. *Clin Lab*. 2002;48:263-270.
254. Steinbach G, Rau B, Debard AL, et al. Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:440-449.
255. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-680.
256. von Aulock S, Morath S, Hareng L, et al. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology*. 2003;208:413-422.
257. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:521-540.
258. Chan CP, Choi JW, Cao KY, et al. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *J Infect*. 2006.
259. Zheng B, Cao KY, Chan CP, et al. Serum neopterin for early assessment of severity of severe acute respiratory syndrome. *Clin Immunol*. 2005;116:18-26.
260. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2002;3:1033-1040.
261. Moine P, Abraham E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock*. 2004;22:297-308.
262. Simpson SQ, Singh R, Bice DE. Heat-killed pneumococci and pneumococcal capsular polysaccharides stimulate tumor necrosis factor- α production by murine macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10:284-289.
263. Bocchini CE, Hulten KG, Mason EO, Jr., Gonzalez BE, Hammerman WA, Kaplan SL. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *Pediatrics*. 2006;117:433-440.
264. Cotton SA, Gbadegesin RA, Williams S, Brenchley PE, Webb NJ. Role of TGF- β 1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Kidney Int*. 2002;61:61-67.
265. Benador N, Siegrist CA, Gendrel D, et al. Procalcitonin is a marker of severity of renal lesions in pyelonephritis. *Pediatrics*. 1998;102:1422-1425.
266. Leroy S, Romanello C, Galetto-Lacour A, et al. Procalcitonin as a predictor of vesicoureteral reflux after a first urinary tract infection in children: European validation study. *J. Pediatr*. In press.
267. Brunkhorst FM, Al-Nawas B, Krummenauer F, Forycky ZF, Shah PM. Procalcitonin, C-reactive protein and APACHE II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:93-100.
268. Wunder C, Eichelbronner O, Roewer N. Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res*. 2004;53:158-163.
269. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, 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.
270. Luyt CE, Guerin V, Combes A, et al. Procalcitonin Kinetics as a Prognostic Marker of Ventilator-Associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004.

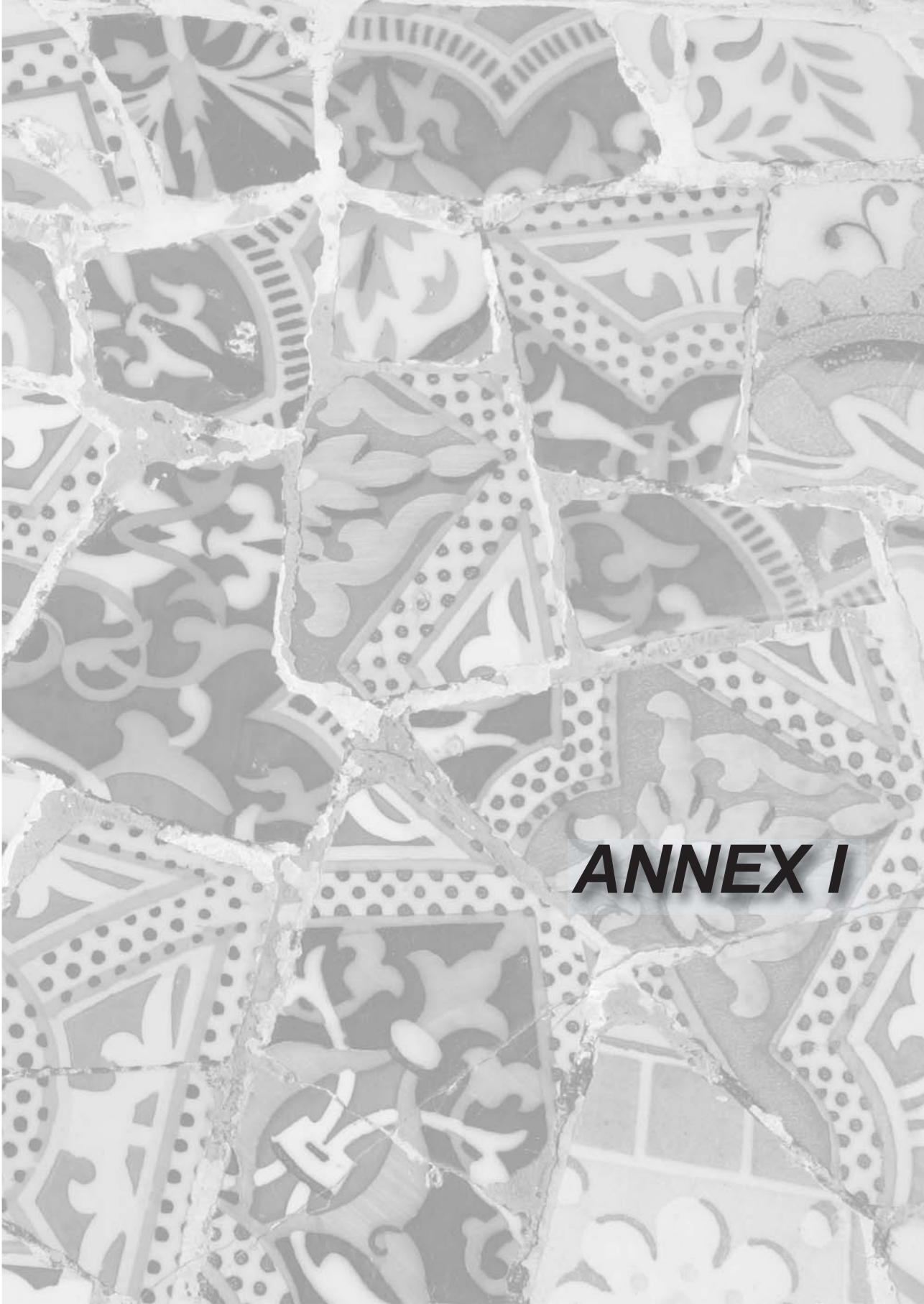
271. Boussekey N, Leroy O, Georges H, Devos P, d'Escrivan T, Guery B. Diagnostic and prognostic values of admission procalcitonin levels in community-acquired pneumonia in an intensive care unit. *Infection*. 2005;33:257-263.
272. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*. 2003;58:377-382.
273. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*. 2005;29:169-175.
274. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1599-1604.
275. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2004;172:3377-3381.
276. Chinnaiyan AM, Huber-Lang M, Kumar-Sinha C, et al. Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation. *Am J Pathol*. 2001;159:1199-1209.
277. Kahlke V, Angele MK, Ayala A, et al. Immune dysfunction following trauma-haemorrhage: influence of gender and age. *Cytokine*. 2000;12:69-77.
278. Hutchinson WL, Koenig W, Frohlich M, Sund M, Lowe GD, Pepys MB. Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: age-related values in the adult general population. *Clin Chem*. 2000;46:934-938.
279. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1992;29:307-341.
280. Young B, Gleeson M, Cripps AW. C-reactive protein: a critical review. *Pathology*. 1991;23:118-124.
281. Otterness IG. The value of C-reactive protein measurement in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1994;24:91-104.
282. Dornbusch HJ, Strenger V, Kerbl R, et al. Procalcitonin and C-reactive protein do not discriminate between febrile reaction to anti-T-lymphocyte antibodies and Gram-negative sepsis. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:941-945.
283. Sabat R, Hoflich C, Docke WD, et al. Massive elevation of procalcitonin plasma levels in the absence of infection in kidney transplant patients treated with pan-T-cell antibodies. *Intensive Care Med*. 2001;27:987-991.
284. Kuse ER, Langefeld I, Jaeger K, Kulpmann WR. Procalcitonin in fever of unknown origin after liver transplantation: a variable to differentiate acute rejection from infection. *Crit Care Med*. 2000;28:555-559.
285. Nylen ES, O'Neill W, Jordan MH, et al. Serum procalcitonin as an index of inhalation injury in burns. *Horm Metab Res*. 1992;24:439-443.
286. Bihari D. Monitoring procalcitonin is of value in acute pancreatitis. *BMJ*. 2004;329:232.
287. Mimoz O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med*. 1998;24:185-188.
288. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest*. 1993;91:1351-1357.
289. Fuchs D, Stahl-Hennig C, Gruber A, Murr C, Hunsmann G, Wachter H. Neopterin--its clinical use in urinalysis. *Kidney Int Suppl*. 1994;47:S8-11.
290. Preas HL, 2nd, Nylen ES, Snider RH, et al. Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *J Infect Dis*. 2001;184:373-376.
291. Burger D, Dayer JM. Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. *Neurology*. 1995;45:S39-43.

292. Inagaki-Ohara K, Hanada T, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling and inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:435-442.
293. de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med*. 1997;25:607-613.
294. Takaki A, Huang QH, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *Neuroimmunomodulation*. 1994;1:335-342.
295. Meisner M, Brunkhorst FM, Reith HB, Schmidt J, Lestin HG, Reinhart K. Clinical experiences with a new semi-quantitative solid phase immunoassay for rapid measurement of procalcitonin. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:989-995.
296. Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, et al. G-protein-coupled receptors and their regulation: activation of the MAP kinase signaling pathway by G-protein-coupled receptors. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1997;31:263-277.
297. Sacerdote P, Bianchi M, Panerai AE. Human monocyte chemotactic activity of calcitonin and somatostatin related peptides: modulation by chronic peptide treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70:141-148.
298. Foster CA, Mandak B, Kromer E, Rot A. Calcitonin gene-related peptide is chemotactic for human T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;657:397-404.
299. Kaneider NC, Egger P, Djanani AM, Wiedermann CJ. Leukocyte motility in response to neuropeptides is heparan sulfate proteoglycan dependent. *Peptides*. 2003;24:695-700.
300. Kaneider NC, Lindner J, Feistritz C, et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine-kinase-dependent migration of human monocytes in response to amyloid beta-protein and its precursor. *FASEB J*. 2004;18:1309-1311.
301. Higazi AA, Barghouti, II, Ayesk SK, Mayer M, Matzner Y. Inhibition of neutrophil activation by fibrinogen. *Inflammation*. 1994;18:525-535.
302. Oh SK, Pavlotsky N, Tauber AI. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol*. 1990;47:142-148.
303. Ottonello L, Gnerre P, Bertolotto M, et al. Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2366-2372.
304. Pluskota E, Soloviev DA, Plow EF. Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood*. 2003;101:1582-1590.
305. Egger G, Aigner R, Glasner A, Hofer HP, Mitterhammer H, Zelzer S. Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive Care Med*. 2004;30:331-334.
306. Zhong W, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall M, Mortensen RF. Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J Immunol*. 1998;161:2533-2540.
307. Whisler RL, Proctor VK, Downs EC, Mortensen RF. Modulation of human monocyte chemotaxis and procoagulant activity by human C-reactive protein (CRP). *Lymphokine Res*. 1986;5:223-228.
308. Gatt ME, Urieli-Shoval S, Preciado-Patt L, et al. Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. *J Lab Clin Med*. 1998;132:414-420.
309. Monneret G, Pachot A, Laroche B, Picollet J, Bienvenu J. Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnfr production by human circulating blood cells. *Cytokine*. 2000;12:762-764.
310. Kettelhack C, Hohenberger P, Schulze G, Kilpert B, Schlag PM. Induction of systemic serum procalcitonin and cardiocirculatory reactions after isolated limb perfusion with recombinant human tumor necrosis factor-alpha and melphalan. *Crit Care Med*. 2000;28:1040-1046.

311. Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, Schobersberger W. Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit Care Med.* 2002;30:2091-2095.
312. Hoffmann G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann FJ, Schobersberger W. In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med.* 2001;29:112-116.
313. Kilbourn R. Nitric oxide synthase inhibitors--a mechanism-based treatment of septic shock. *Crit Care Med.* 1999;27:857-858.
314. Kaneider NC, Egger P, Wiedermann FJ, Ritter M, Woll E, Wiedermann CJ. Involvement of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase A and pertussis toxin-sensitive G proteins in the migratory response of human CD14+ mononuclear cells to katalcalcin. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1872-1882.
315. Saito Y, Nakagawa C, Uchida H, Sasaki F, Sakakibara H. Adrenomedullin suppresses fMLP-induced upregulation of CD11b of human neutrophils. *Inflammation.* 2001;25:197-201.
316. Torii H, Hosoi J, Beissert S, et al. Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol.* 1997;61:216-223.
317. Fox FE, Kubin M, Cassin M, et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol.* 1997;108:43-48.
318. Rozdzinski E, Jones T, Burnette WN, Burroughs M, Tuomanen E. Antiinflammatory effects in experimental meningitis of prokaryotic peptides that mimic selectins. *J Infect Dis.* 1993;168:1422-1428.
319. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1179-1181.
320. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339:520-532.
321. Voyich JM, Musser JM, DeLeo FR. *Streptococcus pyogenes* and human neutrophils: a paradigm for evasion of innate host defense by bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 2004;6:1117-1123.
322. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999;29:1128-1132.
323. Gomez MI, Lee A, Reddy B, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med.* 2004;10:842-848.
324. Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol.* 2004;172:6994-7001.
325. Haas PJ, de Haas CJ, Kleibeuker W, et al. N-terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. *J Immunol.* 2004;173:5704-5711.
326. Postma B, Kleibeuker W, Poppelier MJ, et al. Residues 10-18 within the C5a receptor N terminus compose a binding domain for chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2005;280:2020-2027.
327. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol.* 2005;6:920-927.
328. van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol.* 2006;188:1310-1315.
329. Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med.* 1994;180:253-260.
330. Bae YS, Yi HJ, Lee HY, et al. Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands. *J Immunol.* 2003;171:6807-6813.
331. Hu JY, Le Y, Gong W, et al. Synthetic peptide MMK-1 is a highly specific chemotactic agonist for leukocyte FPRL1. *J Leukoc Biol.* 2001;70:155-161.

332. De Y, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 2000;192:1069-1074.
333. Elagoz A, Henderson D, Babu PS, et al. A truncated form of CKbeta8-1 is a potent agonist for human formyl peptide-receptor-like 1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2004;141:37-46.
334. Le Y, Yazawa H, Gong W, et al. The neurotoxic prion peptide fragment PrP(106-126) is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol.* 2001;166:1448-1451.
335. Cui Y, Le Y, Yazawa H, Gong W, Wang JM. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol.* 2002;72:628-635.
336. Kim Y, Lee BD, Kim O, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 is a functional ligand for formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol.* 2006;176:2969-2975.
337. Deng X, Ueda H, Su SB, et al. A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood.* 1999;94:1165-1173.
338. Li BQ, Wetzel MA, Mikovits JA, et al. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood.* 2001;97:2941-2947.
339. Betten A, Bylund J, Christophe T, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest.* 2001;108:1221-1228.
340. Ernst S, Zobiack N, Boecker K, Gerke V, Rescher U. Agonist-induced trafficking of the low-affinity formyl peptide receptor FPRL1. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:1684-1692.
341. Maghazachi AA. G protein-coupled receptors in natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74:16-24.
342. Erwin PJ, Lewis H, Dolan S, et al. Lipopolysaccharide binding protein in acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2000;28:104-109.
343. Bacot SM, Lenz P, Frazier-Jessen MR, Feldman GM. Activation by prion peptide PrP106-126 induces a NF-kappaB-driven proinflammatory response in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74:118-125.
344. Ying G, Iribarren P, Zhou Y, et al. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol.* 2004;172:7078-7085.
345. Yazawa H, Yu ZX, Takeda, et al. Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J.* 2001;15:2454-2462.
346. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Loike JD, Silverstein SC. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998;19:S81-84.
347. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 2002;4:449-460.
348. Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 2000;275:5626-5632.
349. Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci.* 2003;23:2665-2674.
350. Walter J, Kaether C, Steiner H, Haass C. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11:585-590.
351. Blanchard BJ, Chen A, Rozeboom LM, Stafford KA, Weigele P, Ingram VM. Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14326-14332.
352. Su SB, Gong WH, Gao JL, et al. T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. *Blood.* 1999;93:3885-3892.

353. Smits HA, Boven LA, Pereira CF, Verhoef J, Nottet HS. Role of macrophage activation in the pathogenesis of Alzheimer's disease and human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *Eur J Clin Invest.* 2000;30:526-535.
354. Cinque P, Nebuloni M, Santovito ML, et al. The urokinase receptor is overexpressed in the AIDS dementia complex and other neurological manifestations. *Ann Neurol.* 2004;55:687-694.
355. Resnati M, Pallavicini I, Wang JM, et al. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1359-1364.
356. van Dissel JT. Procalcitonin and other markers of infection. What should be their role in clinical practice? *Clin Microbiol Infect.* 2002;8:70-73.
357. Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Repo H. Laboratory markers of systemic inflammation as predictors of bloodstream infection in acutely ill patients admitted to hospital in medical emergency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:699-704.
358. van Dissel JT. Procalcitonin: what should be its role in the clinical management of febrile patients admitted to the hospital? *Clin Infect Dis.* 2003;36:824-825; author reply 826-827.
359. Morgenthaler NG, Struck J, Christ-Crain M, Bergmann A, Muller B. Pro-atrial natriuretic peptide is a prognostic marker in sepsis, similar to the APACHE II score: an observational study. *Crit Care.* 2005;9:R37-45.
360. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem.* 2005;51:1823-1829.
361. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides.* 2005;26:2500-2504.
362. Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* 2003;24:254-258.
363. Meyer MC, Rastogi P, Beckett CS, McHowat J. Phospholipase A2 inhibitors as potential anti-inflammatory agents. *Curr Pharm Des.* 2005;11:1301-1312.
364. Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:151-163.
365. Hackam DG, Mamdani M, Li P, Redelmeier DA. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet.* 2006;367:413-418.
366. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun.* 2002;70:4441-4446.
367. Becker KL, Nylén ES, Snider RH, Muller B, White JC. Immunoneutralization of procalcitonin as therapy of sepsis. *J Endotoxin Res.* 2003;9:367-374.
368. Wagner KE, Martinez JM, Vath SD, et al. Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med.* 2002;30:2313-2321.
369. Wang X, Han C, Yang L, Chen M, Fiscus RR. Ibuprofen, indomethacin, and high-dose aspirin, but not low-dose aspirin or imidazole, inhibit CGRP elevations in plasma during endotoxemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;657:502-504.



ANNEX I

BRIEF REPORT

C. Prat · J. Domínguez · C. Rodrigo · M. Giménez ·
M. Azuara · S. Blanco · V. Ausina

Use of Quantitative and Semiquantitative Procalcitonin Measurements to Identify Children with Sepsis and Meningitis

Published online: 19 December 2003
© Springer-Verlag 2003

During infancy and childhood, clinical signs of infection and conventional laboratory markers are not specific in the early phase of disease [1]. The availability of a parameter that more rapidly identifies children suspected to have bacterial sepsis before microbiological results are available would minimize unnecessary treatments and hospitalization. Since its original description, the importance of procalcitonin (PCT) as an indicator of systemic bacterial infection has been demonstrated in many reports [2, 3, 4, 5]. The aim of our study was to evaluate the reliability of PCT measurement by quantitative luminometric immunoassay (LIA) in distinguishing between systemic bacterial infection (sepsis and/or meningitis), localized bacterial infection and aseptic meningitis in children, compared to leukocyte count and C-reactive protein (CRP) levels. We also evaluated the correlation of a rapid immunochromatographic test (ICT) for semiquantitative PCT measurement in comparison with quantitative test results.

The study was carried out on selected children aged between 1 month and 12 years who were admitted to the pediatric emergency department of our hospital after presenting with fever of less than 12-h duration. At the time of admission, blood samples were collected for leukocyte count, CRP and PCT measurement. Clinical specimens were collected for microbiological testing in order to correctly establish the etiology. Serial serum samples for PCT and CRP assays were collected daily when possible.

Patients were grouped retrospectively according to the type of illness. Group 1 included 25 children diagnosed

with bacterial sepsis and/or meningitis by culture of blood and/or cerebrospinal fluid (CSF) samples: *Neisseria meningitidis* was isolated in 18 cases, *Streptococcus pneumoniae* in 6 and *Haemophilus influenzae* in 1. Bacteria were isolated from CSF culture only in 8 patients, blood culture only in 10 and both culture types in 7. Group 2 included 18 children diagnosed with aseptic meningitis by compatible clinical presentation, negative Gram stain, cultures and antigen tests for bacterial infection using blood and CSF samples, compatible CSF analysis (pleocytosis with a predominance of mononuclear cells) and successful recovery without antibiotic therapy. Viral cultures were not performed. Group 3 included 22 children presenting with localized bacterial infection such as purulent conjunctivitis, acute otitis media, streptococcal pharyngitis, cellulitis or sinusitis, confirmed by culture of the site of infection and negative blood cultures. The bacteria isolated were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*.

In order to establish normal PCT levels for comparison, serum samples were also collected from a control group of 25 similarly aged healthy children admitted to the hospital for elective surgery. PCT was measured using LIA (Lumitest PCT; Brahms Diagnostica, Germany) for quantitative detection and ICT (PCT-Q; Brahms Diagnostica) for semiquantitative detection following the manufacturer's instructions. LIA requires 20 µl of serum and 90–120 min to be performed. ICT requires 200 µl of serum and results can be obtained in 30 min; samples can be measured individually. CRP was measured using a turbidimetric assay (C-Reactive Protein Flex^T reagent cartridge, Dimension; Dade Behring, USA) and leukocyte count was measured with Coulter Counter Maxm (Coulter, USA).

Comparison between groups for quantitative parameters was performed using the non-parametric Mann-Whitney U test for CRP, leukocyte count and PCT. Diagnostic accuracy and optimum cut-off points were determined using a receiver operating characteristic curve. Comparisons between the two methods were made

C. Prat (✉) · J. Domínguez · M. Giménez · S. Blanco · V. Ausina
Servei de Microbiologia,
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,
C/Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain
e-mail: crisprat@ns.hugtip.scs.es
Tel.: +34-93-4978894
Fax: +34-93-4978895

C. Rodrigo · M. Azuara
Servei de Pediatria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol,
C/Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain

Table 1 Median, range and 5–95 percentiles of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) and leukocyte count for systemic bacterial infection (group 1), aseptic meningitis (group 2) and localized bacterial infection (group 3)

Group	PCT (ng/ml)	CRP (mg/l)	Leukocyte/mm ³
1 (n=25)			
Median	12.10	170	19700
Range	250.74	322.20	26900
5–95 percentiles	2.36–207.10	11.31–324.36	3430–28980
2 (n=18)			
Median	0.55	19.20	12500
Range	1.61	329.50	26100
5–95 percentiles	0.10–1.71	0.50–330	6900–33000
3 (n=22)			
Median	0.35	39.40	15950
Range	1.77	97.6	30500
5–95 percentiles	0.08–1.78	0.4–98	3490–32160

using a statistical descriptive test with a 95% confidence interval for the mean and the Friedman test. Huber's M-estimator was used to calculate the estimated mean.

The control group showed a median PCT value of 0.363 ng/ml (standard deviation, 0.2903). Table 1 shows the median, range and 5–95 percentile values for PCT, CRP and leukocyte count in the three groups of patients with infection. In group 1 (patients with systemic bacterial infection), no significant differences were found for PCT and CRP levels when comparing patients with sepsis and meningitis. Comparison of medians among the three groups showed significant differences for PCT and CRP ($P<0.0001$) levels but not for the leukocyte count ($P=0.248$). Both PCT and CRP were significantly higher in patients with systemic bacterial infection than in those with aseptic meningitis and localized bacterial infection ($P<0.0001$), although the ranges of the CRP values did overlap. No significant differences were found for the leukocyte count ($P=0.140$ and $P=0.201$, respectively).

The area under the receiver operating characteristic curve when comparing group 1 versus group 2 was 1 for PCT, 0.871 for CRP and 0.633 for the leukocyte count. When comparing group 1 versus group 3, the area was 1 for PCT, 0.854 for CRP and 0.587 for the leukocyte count. Hence, using a cut-off of 2 ng/ml, the sensitivity and specificity of PCT for distinguishing systemic bacterial infection from aseptic meningitis and from localized bacterial infection were 100%. Positive and negative predictive values for the diagnosis of systemic bacterial infection were also 100%. The same comparison for CRP, using a cut-off of 40 mg/l, showed a sensitivity of 88%, but a specificity of 72.2% for distinguishing systemic bacterial infection from aseptic meningitis and 50% to distinguish it from localized infection. The positive predictive value was 63.6% and the negative predictive value was 90.9%.

Daily serial measurements were performed in 16 of the 25 patients with systemic bacterial infection. In 11 of them, the PCT levels increased slightly during the first

24 h but reached normal levels within 48 h. In the other five patients, the levels had already decreased by the time of the second measurement, taken at 24 h. All patients had PCT levels <1 ng/ml at recovery. CRP levels remained high until the fourth sample in all of them. In 7 of the 18 patients with aseptic meningitis, a second sample was also measured, and levels remained below 1 ng/ml in all of them. PCT was measured by ICT in 55 of the 65 patient samples (20 from group 1, 19 from group 2 and 16 from group 3). Comparisons made between the ICT and LIA test results showed significant correlation ($P<0.0001$).

Our results are consistent with the observations of Gendrel et al. [6] and Schwarz et al. [7] for children with meningitis; however, both of those studies used 0.5 ng/ml as the cut-off for PCT. In our study, this cut-off level would have kept sensitivity at 100%, but specificity would have been reduced to 62%. In diagnosing cases of potentially severe infection, such as meningitis, the main objective is to achieve high sensitivity. The advantage of PCT over CRP is better specificity, which aids in avoiding unnecessary treatments, combined with the same sensitivity. Carrol et al. [8] reported PCT as a good predictor of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash using 2 ng/ml as the cut-off.

The measurements obtained using ICT correlated closely with those obtained using LIA, as reported previously [9, 10]. ICT can be a useful tool in emergency departments since the fast diagnosis can help in initial therapeutic decision-making; it is also useful in hospitals not equipped with a measuring device to determine PCT concentrations. LIA would be more useful for close monitoring of the course of treatment and disease in equipped hospitals where the number of samples collected is high. We conclude that PCT is as sensitive and more specific than CRP as a marker of systemic bacterial infection in children. However, PCT is not an etiologic diagnostic method. Therefore, the results still have to be interpreted together with careful clinical examination before microbiological results are available.

References

- Lindquist L, Linné T, Hansson O, Kalin M, Axelsson G (1988) Value of cerebrospinal fluid analysis in the differential diagnosis of meningitis: a study in 710 patients with suspected central nervous system infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:374–380
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C (1993) High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 341:515–518
- Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellman A, Reinhart K (1997) Procalcitonin—a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 25:329–334
- Gendrel D, Raymond J, Coste J, Moulin F, Lorrot M, Guérin S, Ravilly S, Lefèvre H, Royer C, Lacombe C, Palmer P, Bohuon C (1999) Comparison of procalcitonin with C reactive protein, interleukin-6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial versus viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 18:875–881
- Lacour AG, Gervais A, Zamora SA, Vadas L, Lombard PR, Dayer JM, Suter S (2001) Procalcitonin, IL-6, IL-8, IL-1 receptor antagonist and C-reactive protein as identifiers of

- serious bacterial infections in children with fever without localising signs. *Eur J Pediatr* 160:95–100
6. Gendrel D, Raymond J, Assicot M, Moulin F, Iniguez JL, Lebon P, Bohuon C (1997) Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis* 24:1240–1242
 7. Schwarz S, Bertram M, Schwab S, Andrassy K, Hacke W (2000) Serum procalcitonin levels in bacterial and abacterial meningitis. *Crit Care Med* 28:1828–1832
 8. Carrol ED, Newland P, Riordan FA, Thomson APJ, Curtis N, Hart CA (2002) Procalcitonin as a diagnostic marker of meningococcal disease in children presenting with fever and a rash. *Arch Dis Child* 86:282–285
 9. Meisner M, Brunkhorst FM, Reith HB, Schmidt J, Lestin HG, Reinhart K (2000) Clinical experiences with a new semi-quantitative solid phase immunoassay for rapid measurement of procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 38:989–995
 10. Gervaix A, Lacour AG, Gueron T, Vadas L, Zamora S, Suter S, Girardin E (2001) Usefulness of procalcitonin and C-reactive protein rapid tests for the management of children with urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis* 20:507–511

- Sundar S, More D, Singh MK, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000;31:1104-7.
- Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001;6:849-54.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, et al. Trial of oral miltefosine treatment for visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998;352:1821-4.
- Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:589-97.
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, et al. Miltefosine, an oral agent for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 1999;341:1795-800.
- Sundar S, Makharia A, DK More DK, et al. Short-course oral miltefosine treatment for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2000;31:1110-3.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002;347:1739-46.
- Chulay, JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:475-9.
- Knebel NG, Grieb S, Winkler M, Locher M, van der Vliet E, Verheij ER. Quantification of perfosine, an alkylphosphocholine anti-tumour agent in plasma by pneumatically assisted electrospray-tandem mass spectrometry coupled with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;721:257-69.

Pediatr Infect Dis J, 2003;22:438-42
Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins, Inc.

Vol. 22, No. 5
Printed in U.S.A.

Elevated serum procalcitonin values correlate with renal scarring in children with urinary tract infection

CRISTINA PRAT, MD, JOSEP DOMÍNGUEZ, PHD, CARLOS RODRIGO, MD, PHD, MONTSE GIMÉNEZ, MD, PHD, MARTA AZUARA, MD, ORLANDO JIMÉNEZ, MD, NÚRIA GALÍ, MSC AND VICENÇ AUSINA, MD, PHD

Background. Urinary tract infection (UTI) in young children carries the risk of parenchymal damage and sequelae. The location of the infection within the urinary tract influences decisions regarding both therapeutics and follow-up. Because clinical features and laboratory markers of infection at an early age are not specific, it is difficult to make a distinction between lower UTI and acute pyelonephritis. Procalcitonin (PCT) has been studied as a marker of severe bacterial infection. The aim of this study was to test the usefulness of PCT concentration in serum to distinguish between uncomplicated UTI and severe acute pyelonephritis with renal scars.

Methods. PCT was measured by immunoluminometric assay in serum samples from children with microbiologically documented infection. Se-

vere renal involvement was assessed by ^{99m}Tc-dimercaptosuccinic acid gammagraphy done 5 to 6 months after the episode to check for the presence of parenchymal scars. C-reactive protein (CRP) and leukocyte count were also measured.

Results. PCT at presentation showed a significant correlation ($P < 0.001$) with the presence of renal scars in children with UTI. Using a cutoff of 1 ng/ml for PCT and 20 mg/l for CRP, sensitivity and specificity in distinguishing between urinary tract infection with and without renal damage were 92.3 and 61.9%, respectively, for PCT and 92.3 and 34.4% for CRP. Positive and negative predictive values were 32 and 97.5%, respectively, for PCT and 23 and 95%, respectively, for CRP.

Conclusions. A low PCT value at admission indicates a low risk of long term renal scarring. Increased PCT values at admission correlate with the presence of scars. PCT values have proved to be more specific than CRP and leukocyte count for identifying patients who might develop renal damage.

INTRODUCTION

Young children are at higher risk than older children to incur acute renal injury after an urinary tract

Accepted for publication Feb. 6, 2003.

From Serveis de Microbiologia (CP, JD, MG, OJ, NG, VA) y Pediatria (CR, MA), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.

Key words: Procalcitonin, urinary tract infection, renal scars, children.

Address for reprints: Cristina Prat, M.D., Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, C/Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain. Fax 34-93-4978895; E-mail crisprat@ns.hugtip.scs.es.

infection (UTI)^{1, 2} and thus subsequent renal scarring. That leads to long term medical problems such as uremia, arterial hypertension and end stage renal disease.³ Location of the site of infection within the urinary tract influences decisions regarding the choice, duration and route of administration of antimicrobial therapy. It also influences the decision of hospitalization as well as the follow-up needed.⁴⁻⁶ During the acute phase the distinction between lower UTI and acute pyelonephritis is difficult. Symptoms and signs in infants are nonspecific; failure to thrive, irritability, vomiting and fever are the most frequent. Because young children usually have a febrile illness with no localizing findings, delay in diagnosis and treatment is bound to happen. Children older than 2 years of age are more likely to display localizing symptoms such as increased urinary frequency, dysuria and abdominal or flank pain. Urinalysis is useful in detecting infection and also for urine culture, but not for location of the disease within the urinary tract.¹ Indicators of inflammation in febrile infants such as leukocyte count or C-reactive protein (CRP) can suggest the infection but do not provide confirmatory evidence that they have pyelonephritis.^{7, 8} Bacteremia during pyelonephritis is uncommon in children.⁹

The radionuclide renal scan helps to distinguish cystitis from pyelonephritis.^{99mTc}-dimercaptosuccinic acid (DMSA) gammagraphy is the reference method for identification of renal lesions secondary to acute inflammation of parenchyma.¹⁰⁻¹² Its performance 5 to 6 months after the infection episode detects the presence of renal scarring. Imaging techniques are not cost-effective methods for acute UTI diagnosis, and they expose the patient to radiation. A test that distinguishes lower UTI from acute pyelonephritis at the time of diagnosis would help to guide its management.

Procalcitonin (PCT) is a 116-amino acid propeptide of calcitonin.¹³ In healthy humans it is produced in the C cells of the thyroid gland, and during severe infections it is produced by the monocyte-macrophage system.¹⁴ Since its original description in children, many series have shown the importance of procalcitonin as an indicator of systemic bacterial infection,¹⁵ distinguishing it from organ-confined bacterial infection, viral infection and fever of noninfectious origin.

The aim of our study was to test the usefulness of PCT concentration in serum as a discriminator between uncomplicated UTI and severe acute pyelonephritis with renal scars. The PCT results were compared with other inflammatory markers: leukocyte count and CRP.

MATERIALS AND METHODS

Study population. We studied children 1 month to 12 years old who were admitted to the Pediatric Emergency Department with clinical signs (fever and ab-

dominal pain in older children and non specific signs of irritability or vomiting in young children) and abnormal urinalysis. Blood was sampled for routine laboratory investigations (leukocyte count and CRP) at the time of admission. A serum sample was also collected for PCT measurement and stored at -20°C . A second sample was taken 24 h later when possible. After blood and urine cultures were performed, antibiotic therapy was started. Urine specimens were obtained by suprapubic aspiration or transurethral bladder catheterization in incontinent infants and by midstream collection in continent children.

Patients were eligible for the study entry when microbiologically confirmed infection was achieved (positive urine culture, defined by $\geq 10^5$ colony-forming units/ml in midstream clean void urine, $\geq 10^4$ in transurethral catheterization specimens and $\geq 10^2$ in suprapubic aspiration specimens).¹ Children with known previous UTI were not enrolled in the study, because scars could have resulted from the previous episode. Patients with recurrent UTI after the first episode were also excluded for the same reason. Imaging techniques were performed in all children with confirmed UTI. During the acute phase, within the first days of admission, abdominal sonography was conducted to detect urinary tract abnormalities or urinary flow obstruction. After 4 to 6 weeks, direct cystography was performed to rule out the presence of vesicoureteral reflux. Five to six months after the episode, DMSA gammagraphy was done to demonstrate the presence of renal scars.

We used the presence of scars as evidence of severe renal involvement. Acute pyelonephritis does not necessarily lead to parenchymal damage, but the presence of kidney scars after an episode of UTI confirms localization of infection within the renal parenchyma and its severity. To establish the range of normal PCT values in our pediatric population, we obtained serum samples from a control group of 38 healthy children without infection, from the same range of age, who were admitted to the hospital for elective surgery.

PCT detection. PCT was measured by immunoluminometric assay (Lumitest PCT; Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. Luminescence was measured by luminometer Leader 50i (Gen-Probe; San Diego, CA).

Statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction was used to check the data for parametric distribution. Differences between medians of the groups were evaluated by the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant when P was < 0.05 . Data were analyzed by sensitivity, specificity and positive and negative predictive values derived from the receiver operating characteristics (ROC) curve. Data are expressed on median, range and 5 to 95 percentiles. The

commercial statistical software package used was SPSS 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Seventy-seven patients diagnosed with UTI were included in the study. *Escherichia coli* was isolated in urine culture in 72 patients, *Klebsiella pneumoniae* in 3, *Proteus mirabilis* in 1 and *Enterococcus faecalis* in 1.

Sixty-four children had no renal damage by DMSA gammagraphy. Of those, 19 patients had low fever (<38°C) and no clinical signs of systemic involvement. They were clinically considered to have a lower UTI. Only one of them showed vesicoureteral reflux on cystography. Clinical findings for the other 45 patients suggested systemic involvement, including high fever (38°C or more), and the patients were clinically diagnosed with acute pyelonephritis. In this group abnormal sonography was found in 7 patients, and vesicoureteral reflux on cystography was found in another 7 patients.

Thirteen children showed the presence of renal parenchymal damage by DMSA gammagraphy, confirming severe renal involvement. All had been clinically diagnosed with acute pyelonephritis. For three of them DMSA gammagraphy was also performed during the acute phase and was abnormal. *E. coli* was also isolated in the blood culture in another two patients. All of these patients had pathologic findings on ecography (hydronephrosis) and/or cystography (vesicoureteral reflux) except one.

Age groups presented equal variances ($P = 0.082$). Table 1 shows the median, range and 5 to 95 percentiles for PCT, CRP and leukocyte count at the time of admission in subjects with and without renal damage. In those without renal damage, we distinguish the subjects clinically diagnosed as having lower UTI and those clinically diagnosed as having acute pyelonephritis. These data are also shown in Figures 1 to 3. Control group showed a median PCT value of 0.363 ng/ml (SD 0.29). When comparing subjects having UTI with renal damage vs. UTI without renal damage, median PCT and CRP values yielded significant differences ($P < 0.0001$ and $P = 0.002$, respectively), but no significance was found for the leukocyte count ($P = 0.174$). Median values were also compared between clinically diag-

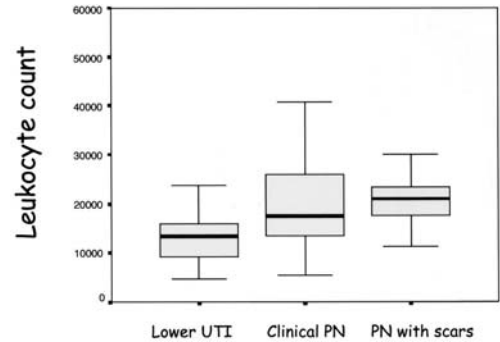


FIG. 1. Leukocyte count/mm³ (median, range, 5 to 95 percentiles) at the time of admission in clinically diagnosed lower urinary tract infection (*Lower UTI*), clinically diagnosed acute pyelonephritis without scars (*Clinical PN*) and pyelonephritis with scars on DMSA gammagraphy (*PN with scars*).

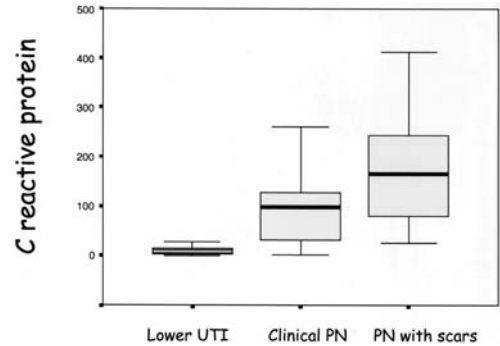


FIG. 2. C-reactive protein concentrations (median, range, 5 to 95 percentiles) at the time of admission in clinically diagnosed lower urinary tract infection (*Lower UTI*), clinically diagnosed acute pyelonephritis without scars (*Clinical PN*) and pyelonephritis with scars on DMSA gammagraphy (*PN with scars*).

nosed pyelonephritis without scars and pyelonephritis with scars, and significant differences were also found for PCT and CRP ($P = 0.003$ and $P = 0.026$, respectively), but not for leukocyte count ($P = 0.544$).

The area under the ROC curve obtained for PCT in distinguishing between UTI with and without renal

TABLE 1. Laboratory parameters at time of admission

	Procalcitonin (ng/ml)			C-reactive Protein (mg/l)			Leukocyte Count/mm ³		
	Median	Range	5-95 percentiles	Median	Range	5-95 percentiles	Median	Range	5-95 percentiles
UTI without renal damage									
Clinical lower UTI	0.312	0.79	0.0033-0.7610	7.20	59	0.0001-46.68	12 100	19 300	4600-21 620
Clinical PN	1.16	191.94	0.125-77.53	97.0	325.5	4.98-250.98	18 000	25 900	8100-32 680
UTI with renal damage	9.28	61.52	0.68-48.36	162.2	412	0.001-350.4	21 000	35 300	5000-40 260

PN, pyelonephritis.

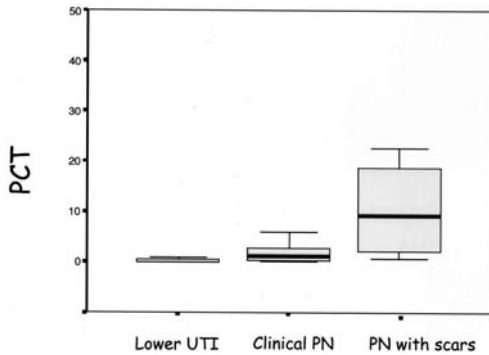


FIG. 3. Procalcitonin concentrations (median, range, 5 to 95 percentiles) at the time of admission in clinically diagnosed lower urinary tract infection (*Lower UTI*), clinically diagnosed acute pyelonephritis without scars (*Clinical PN*) and pyelonephritis with scars on DMSA gammagraphy (*PN with scars*).

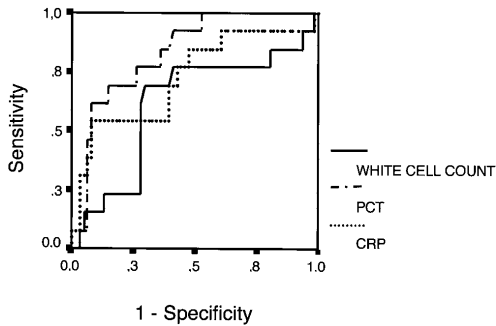


FIG. 4. ROC curve of PCT, CRP and white blood cell count in predicting renal parenchymal damage in children with UTI.

damage was 0.83, for CRP it was 0.72 and for leukocyte count it was 0.62 (Fig. 4). Using a cutoff value of 1 ng/ml for PCT and 20 mg/l for CRP, sensitivity and specificity were 92.3 and 61.9% for PCT, and for CRP they were 92.3 and 34.4%, respectively. Positive and negative predictive values for PCT were 32 and 97.5%, respectively, and for CRP they were 23 and 95%.

To evaluate whether PCT values were influenced by factors other than the urinary tract infection that is bound to develop renal scarring, correlation with presence of vesicoureteral reflux and with early age was also analyzed. Of 61 patients without reflux, 5 developed scars; 8 of 16 patients with reflux developed scars. There was no significant correlation between PCT values and vesicoureteral reflux ($P = 0.192$). The influence of an early age on PCT values was also evaluated, and no correlation was found ($P = 0.659$).

A second sample of serum was obtained within the first 24 h in 42 patients. Median, range and 5 to 95 percentiles for PCT and CRP of the second sample are shown in Table 2. Eight of 19 patients with clinical lower UTI had a second determination, and the value remained <1 ng/ml. Twenty-seven of 45 patients with clinical pyelonephritis without scars had a second determination. In 14 of them the second PCT value was higher than the first. In 3 of these cases the first measurement was normal, and the second was high. Nine of 13 patients with renal scars had a second determination, and all had a high PCT value but lower than the first one.

DISCUSSION

The aim of our study was to evaluate the usefulness of PCT measurement in distinguishing between uncomplicated UTI and pyelonephritis with renal scarring, comparing the results with other inflammatory markers.

The leukocyte count did not correlate with the severity of UTI, as previously reported in other studies.¹⁶ Also CRP alone is not a risk predictor for serious renal damage and in combination with fever does not improve the predictive value of fever alone.⁷ In our study low specificity of CRP was confirmed.

Many clinical studies have confirmed PCT as a specific marker of bacterial infection and as a good predictor of disease severity and efficacy of antibiotic therapy.^{15, 17, 18} PCT values might help to distinguish severe bacterial infection from localized and viral disease in febrile children.¹⁹ Furthermore PCT values are related to the anatomical extent of the inflamed tissue involved. Benador et al.²⁰ demonstrated a highly significant correlation between elevated PCT values and

TABLE 2. Laboratory parameters 24 h after admission

	Procalcitonin (ng/ml)			C-reactive Protein (mg/l)		
	Median	Range	5-95 percentiles	Median	Range	5-95 percentiles
UTI without renal damage						
Clinical lower UTI	0.4995	0.92	0.1270-0.5742	6.0	22.0	1.0-21.5
Clinical PN	1.31	58.52	0.3664-39.6	105	222.2	4.5-203.15
UTI with renal damage	2.80	8.74	0.5770-7.50	206.0	259.6	3.0-240.25

PN, pyelonephritis.

the severity of renal involvement assessed by DMSA scintigraphy done within the first 5 days of admission and ranked according to the extent of the lesions. This correlation was reported in other studies.^{21, 22} The results of our study show a significant correlation between high PCT values at the time of admission and renal damage. When scars are present, severity and parenchymal location of the UTI are the most likely.

Serum PCT values at the time of admission are influenced by the severity of infection as well as by its kinetics in serum, which depends on the lapse of time taken by the bacteria to trigger the inflammatory response.^{23, 24} Serial measurements reflect the course of this inflammatory activity. In our study PCT values in clinical lower UTI were very low or not detectable and remained low on a second determination 24 h later. Alternatively PCT values in pyelonephritis with scars were elevated at the time of admission and still high 24 h later, but lower than initially. Some of the patients (14) clinically diagnosed with acute pyelonephritis showed low values at admission but increased PCT values on the second determination. Nevertheless none of them developed renal scars. All these patients had received one injection of gentamicin (once daily dose of 5 to 6 mg/kg) within the first hours. PCT has a half-life of ~25 to 30 h after a single stimulus.²⁴ When the bacteria have triggered a systemic response, high levels can still be in serum within the first day although effective antibiotic therapy has been started. Therefore a second measurement can help to identify patients at risk of severe pyelonephritis but who reach the Emergency Department early in the inflammatory response.

We can conclude that PCT yields a high negative predictive value of renal damage. Therefore a low PCT value at the time of admission, in spite of clinical signs of pyelonephritis, points out a low risk of renal scarring. PCT measurement can be useful to identify patients at risk of developing renal parenchymal damage who would then benefit from additional therapies.

REFERENCES

- American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics* 1999;103:843-51.
- Benador D, Benador N, Slosman D, Mermillod B, Girardin E. Are younger children at highest risk or renal sequelae after pyelonephritis? *Lancet* 1997;349:17-9.
- Jacobson SH, Eklöf O, Eriksson CG, Lins LE, Tidgren B, Winberg J. Development of hypertension and uraemia after pyelonephritis in childhood: 27 years follow-up. *Br Med J* 1989;229:703-6.
- Smellie JM, Poulton A, Prescott NP. Retrospective study of children with renal scarring associated with reflux and urinary infection. *Br Med J* 1994;308:1193-6.
- Jacobson SH, Eklöf O, Lins LE, Wikstad I, Winberg J. Long-term prognosis of post-infectious renal scarring in relation to radiological findings in childhood: 27-year follow-up. *Pediatr Nephrol* 1994;8:275-7.
- Johnson CE. New advances in childhood urinary tract infections. *Pediatr Rev* 1999;20:335-43.
- Jaye D, Waites K. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735-47.
- Morgan MG, McKenzie H. Controversies in the laboratory diagnosis of community-acquired urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:491-504.
- Johnson JR. Pathogenesis of bacteremia during pyelonephritis. *Clin Infect Dis* 1997;18:1014-5.
- Majd M, Rushton HG. Renal cortical scintigraphy in the diagnosis of acute pyelonephritis. *Semin Nucl Med* 1994;22:98-111.
- Benador D, Benador N, Slosman D, Nusslé D, Marmillat B, Girardin E. Cortical scintigraphy in the evaluation of renal parenchymal changes in children with pyelonephritis. *J Pediatr* 1994;125:334-6.
- Rushton HG. The evaluation of acute pyelonephritis and renal scarring with technetium 99m-dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy: evolving concepts and future directions. *Pediatr Nephrol* 1997;11:108-20.
- Jacobs JW, Lund PK, Potts JT Jr, Bell NH, Habener JF. Procalcitonin is a glycoprotein. *J Biol Chem* 1981;256:2803-7.
- Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M, Stonans I, Zipfel P, Reinhart K. Molecular aspects and natural source of procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:789-97.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993;341:515-8.
- Hatherill M, Tibby S, Sykes K, Turner C, Murdoch J. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C-reactive protein and leukocyte count. *Arch Dis Child* 1999;81:417-21.
- Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellman A, Reinhart K. Procalcitonin: a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 1997;6:329-34.
- Al-Nawas B, Krammer I, Shah PM. Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur J Med Res* 1996;1:331-3.
- Gendrel D, Raymond J, Assicot M, et al. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997;24:1240-2.
- Benador N, Siegrist CA, Gendrel D, et al. Procalcitonin is a marker of severity of renal lesions in pyelonephritis. *Pediatrics* 1998;102:1422-5.
- Gervais A, Galetto-Lacour A, Gueron T, et al. Usefulness of procalcitonin and C-reactive protein rapid tests for the management of children with urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:507-11.
- Smolkin V, Koren A, Raz R, Colodner R, Sakran W, Halevy R. Procalcitonin as a marker of acute pyelonephritis in infants and children. *Pediatr Nephrol* 2002;17:409-12.
- Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1605-8.
- Brunkhorst FM, Heinz U, Forycky ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med* 1998;24:888-92.

Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection

CRISTINA PRAT, MD, JOSEP DOMÍNGUEZ, PHD, CARLOS RODRIGO, MD, PHD, MONTSE GIMÉNEZ, MD, PHD, MARTA AZUARA, MD, ORLANDO JIMÉNEZ, MD, NÚRIA GALÍ, MSC AND VICENÇ AUSINA, MD, PHD

Background. Lower respiratory tract infection is the most common infection leading to unnecessary antibiotic treatment in children. Etiologic diagnosis is not immediately achieved, and the pathogen remains unidentified in a large number of cases. Neither clinical nor laboratory factors allow for a rapid distinction between bacterial and viral etiology. The aim of our study was to evaluate the reliability of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) and leukocyte count in distinguishing pneumococcal, atypical and viral lower respiratory tract infection.

Methods. PCT, CRP and leukocyte count were measured in children with microbiologically documented diagnoses of lower respiratory tract infection. The results were compared of children with pneumococcal, atypical and viral etiologies.

Results. PCT and CRP showed significant correlation with a bacterial etiology of lower respiratory tract infection. No significance was found for leukocyte count. Using a cutoff point of 2 ng/ml for PCT and 65 mg/l for CRP, the sensitivities and specificities for distinguishing bacterial from viral lower respiratory tract infections were 68.6 and 79.4% for PCT and 79.1 and 67.1% for CRP. The sensitivities and specificities for distinguishing pneumococcal from other etiologies were 90.3 and 74.1% for PCT and 90.3 and 60% for CRP, respectively.

Conclusions. High PCT and CRP values show a significant correlation with the bacterial etiology of lower respiratory tract infection. PCT and CRP show good sensitivity for distinguishing pneumococcal from other etiologies. PCT shows

higher specificity than CRP. PCT and CRP can help make decisions about antibiotic therapy in children with lower respiratory tract infections.

INTRODUCTION

An early etiologic diagnosis of lower respiratory tract infection in children is important because decisions concerning antibiotic therapy must be made immediately. Identifying the specific etiology is difficult because of the lack of accurate tests for rapid diagnosis of the most common respiratory pathogens.^{1,2} A clinical distinction between bacterial and viral origins is difficult, because symptoms, signs and radiographic findings are similar, at least when the illness begins.² Mixed viral-bacterial etiology is common in pediatric pneumonia patients.^{1,3} Microbiologic results are not immediately available and, even when an extensive diagnostic testing is performed, the pathogen remains unidentified in a large number of patients. For these reasons most children with pneumonia are treated with antibiotics without knowledge of the causative agent.¹ Finding early indicators of etiology and severity would help with the decision either to prescribe or to withhold antimicrobials.

Many tests have aimed to distinguish bacterial from viral acute lower respiratory tract infection. The utility of C-reactive protein (CRP) has been studied, but no significant association was found⁴ or, when significant differences were present, sensitivity for detecting bacterial pneumonia was too low for use in clinical practice.⁵ Elevated CRP values are associated with invasive infection but not necessarily of bacterial etiology.⁶ The erythrocyte sedimentation rate and leukocyte count did not reliably differentiate the different etiologies.^{7,8} Serum interleukin 6 values also failed to discriminate.⁹ It has been hypothesized that cytokines are produced locally in the lung at the site of infection, and they cannot be detected in serum in large amounts. This compartmentalized production of cytokines may explain why serum detection is not useful as a diagnostic method¹⁰

Procalcitonin (PCT), a propeptide of calcitonin, has been reported to be a sensitive marker of severe bacte-

Accepted for publication Aug. 12, 2003.

From the Serveis de Microbiologia (CP, JD, MG, OJ, NG, VA) and Pediatria (CR, MA), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.

Key words: Procalcitonin, C-reactive protein, lower respiratory tract infection, children.

Address for reprints: Cristina Prat, M.D., Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, C/Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain. Fax 34-93-4978895; E-mail crisprat@ns.hugtip.scs.es.

rial infection.^{11, 12} Monocyte-macrophage system cells are capable of synthesizing PCT¹³ as well as neuroendocrine cells from intestine and lung.¹⁴ The main stimulus under experimental conditions is the systemic effect of bacterial endotoxins.¹⁵ Since its original description in children, several studies have demonstrated the importance of PCT as an indicator of systemic bacterial infection.^{16, 17} The aim of our study was to evaluate the reliability of PCT, CRP and leukocyte count in discriminating between bacterial and viral lower respiratory tract infections in children and, among bacterial infections, to learn whether differences exist between different etiologies.

PATIENTS AND METHODS

The patient population was children seen in the pediatric emergency department with clinical signs of lower respiratory tract infection: fever; difficulty in breathing; or a pneumonic infiltrate in a chest radiograph. At the time of admission, samples were collected for microbiologic diagnosis: blood cultures; nasopharyngeal aspirate for viral studies; serum for antibody assays; urine for antigen detection; and pleural fluid cultures when pneumonia was associated with pleural effusion. A serum sample was collected on admission; leukocyte count and CRP were measured during routine diagnostic evaluation, and serum samples for PCT measurement were then stored at -20°C until analyzed. Only those with etiologic diagnosis were eligible for the study. Patients with demonstrated mixed etiology were excluded.

A total of 85 patients between 6 months and 10 years of age were clinically, radiologically and microbiologically diagnosed as having lower respiratory tract infection. According to microbiologic results, patients were grouped as follows.

Pneumococcal pneumonia. Thirty-one patients were diagnosed as pneumococcal pneumonia. *Streptococcus pneumoniae* was isolated in blood cultures in five patients and also in pleural fluid in two of them. The remainder were diagnosed with detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis.

Atypical pneumonia. Twenty patients diagnosed by antibody assays were included in this group. Eighteen patients were diagnosed with *Mycoplasma pneumoniae* by agglutinating gelatin particles sensitized

with *M. pneumoniae* cell components (Serodia Myco II particle agglutination test; Fujerebio, Inc., Tokyo, Japan) and two with *Chlamydia pneumoniae* by micro-immunofluorescence (*Chlamydia* MIF IgG; MRL Diagnostics).

Viral pneumonia or bronchiolitis. Thirty-four patients were diagnosed as viral lower respiratory tract infection by indirect immunofluorescence (Light Diagnostics Respiratory panel 1 viral screening and identification kit; Chemicon International, Inc. Tomecula, CA) on nasopharyngeal aspirates. Respiratory syncytial virus was detected in 19 patients, influenza in 13 and adenovirus in 2.

Control group. A serum sample was collected from a control group of 38 healthy children of the same age admitted to the hospital for elective surgery.

PCT was measured by immunoluminometric assay (Lumitest PCT; Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin, Germany) following the manufacturer's instructions. CRP was analyzed using turbidimetric assay (C-reactive protein Flex reagent cartridge, Dimension, Dade Behring, Inc.). Leukocyte count was analyzed by Coulter Counter Maxm (Coulter Corp., Miami, FL).

Comparison among the groups was conducted with the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Data were analyzed for sensitivity and specificity derived from the receiver operating characteristics (ROC) curve. Data were expressed as median, range and 5 to 95 percentiles. The commercial statistical software package used was SPSS 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

There were no significant age differences among the groups. PCT, CRP and leukocyte count were measured in the serum samples collected on admission from all of them. The patient's median, range and 5 to 95 percentiles for PCT, CRP and leukocyte count in the different groups are shown in Table 1. Individual values as well as medians are shown in Figures 1 to 3. Control group showed a median PCT value of 0.247 ng/ml (SD 0.29).

There were significant differences among the three groups for leukocyte count ($P = 0.031$), CRP ($P < 0.001$) and PCT ($P < 0.001$). When comparing pneumococcal with the other etiologies, there were significant differences for the three tests ($P < 0.0001$ for PCT and CRP and $P = 0.007$ for leukocyte count). When com-

TABLE 1. Median, range and 5 to 95 percentile values of PCT, CRP and leukocyte count at the time of admission

Status	PCT (ng/ml)			CRP (mg/l)			Leukocyte Count/mm ³		
	Median	Range	5-95 percentiles	Median	Range	5-95 percentiles	Median	Range	5-95 percentiles
Pneumococcal	9.42	100.96	0.078-63.32	268	584.30	9.62-575.8	19 700	37 100	8420-44 380
Atypical	0.913	8.05	0.076-8.02	66.1	325	5-232.16	12 000	23 000	4500-27 260
Viral	0.854	6.06	0.128-6.08	37.35	262.5	10.03-229.74	14 100	35 300	4350-36 500

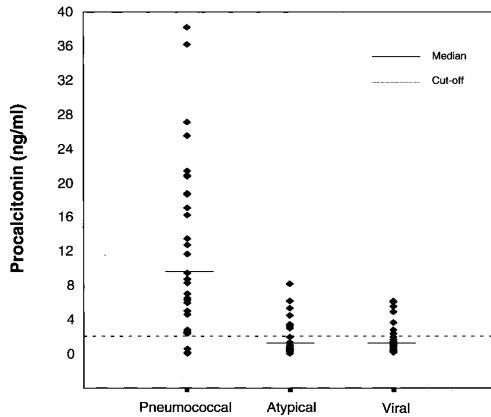


FIG. 1. Procalcitonin serum concentrations (nanograms/ml) at the time of admission in children with pneumococcal, atypical and viral lower respiratory tract infections.

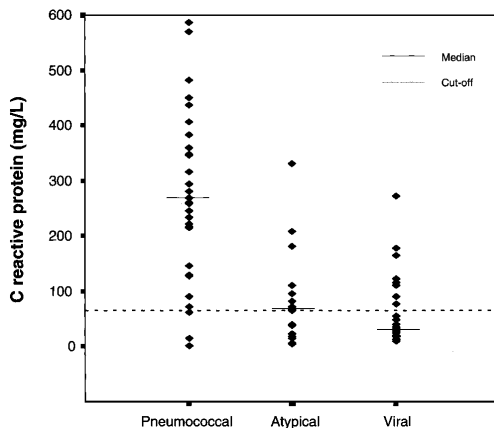


FIG. 2. C-reactive protein concentrations (milligrams/l) at the time of admission in children with pneumococcal, atypical and viral lower respiratory tract infection.

paring bacterial to viral, no significant differences were found for leukocyte count ($P = 0.120$), but CRP and PCT yielded significant differences ($P < 0.001$). There were no significant differences between bacteremic and urinary antigen-diagnosed pneumococcal pneumonia for leukocyte count ($P = 0.179$), or CRP ($P = 0.747$) or PCT ($P = 0.979$).

The areas under the ROC curve obtained for bacterial (pneumococcal and atypical) lower respiratory tract infection (Fig. 4A) were 0.602 [$P = 0.140$, 95% confidence interval (95% CI) 0.473 to 0.731] for leukocyte count, 0.775 ($P < 0.0001$, 95% CI 0.671 to 0.880) for CRP and 0.761 ($P < 0.0001$, 95% CI 0.660 to 0.861) for PCT. The areas under the ROC curve obtained

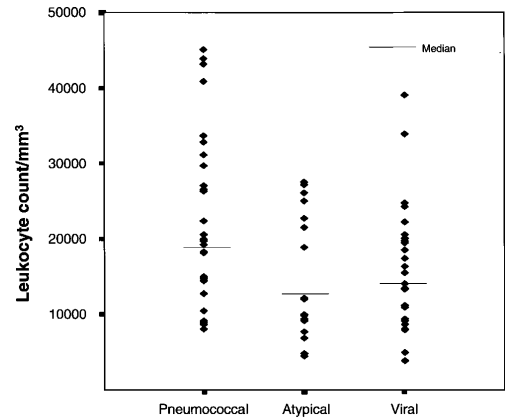


FIG. 3. Leukocyte count/mm³ at the time of admission in children with pneumococcal, atypical and viral lower respiratory tract infection.

between pneumococcal and other etiologies (atypical and viral) of lower respiratory tract infection (Fig. 4B) were 0.678 ($P = 0.009$, 95% CI 0.557 to 0.799) for leukocyte count, 0.880 ($P < 0.001$, 95% CI 0.789 to 0.970) for CRP and 0.873 ($P < 0.001$, 95% CI 0.779 to 0.968) for PCT. Using a cutoff point of 2 ng/ml for PCT and 65 mg/l for CRP, the sensitivities and specificities for distinguishing bacterial (pneumococcal and atypical) from viral lower respiratory tract infection were 68.6 and 79.4% for PCT and 79.1 and 67.1% for CRP. The sensitivities and specificities for distinguishing pneumococcal from other etiologies (atypical and viral) were 90.3 and 74.1% for PCT and 90.3 and 60% for CRP.

DISCUSSION

We found a significant association of CRP with bacterial etiology of lower respiratory tract infection. This association was also found by Virkki et al.,⁵ but with a low sensitivity. In our study CRP yielded good sensitivity for distinguishing between pneumococcal and other etiologies, although specificity was low. Elevated CRP values are associated with invasive infection, but not necessarily a bacterial etiology. Any clinical disease characterized by tissue injury and/or inflammation is accompanied by a significant elevation of serum CRP.⁶ On the other hand PCT in our study showed the same sensitivity but higher specificity than CRP in differentiating pneumococcal and atypical from viral etiology. In previous studies PCT was a specific marker of systemic inflammatory response in bacterial infections.¹¹ PCT concentrations strongly correlate with disease severity in several bacterial infections such as meningitis or urinary tract infection.^{14, 15, 18} There has been controversy regarding the use of PCT

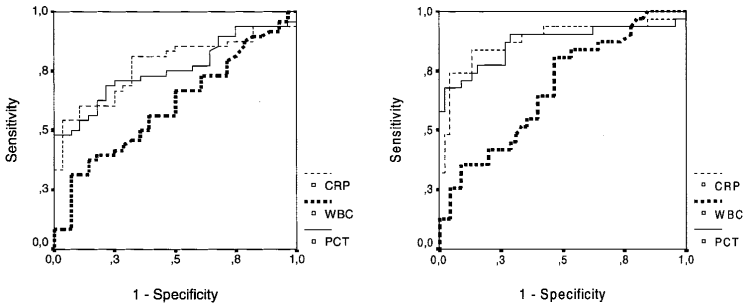


FIG. 4. ROC curve for PCT, CRP and leukocyte count in predicting pneumonia. A, bacterial pneumonia; B, pneumococcal pneumonia.

in acute lower respiratory tract infections because of high overlapping between different etiologies.^{9, 19} The results of our study show more significant association between both CRP and PCT and pneumococcal pneumonia than previous studies. When evaluating the usefulness of PCT, results can depend on the accuracy of the etiologic diagnosis of lower respiratory tract infection. Difficulties in determining the causative agent affect the results. Taking these factors into account, results in different studies are heterogeneous. Our results are consistent with those of Moulin et al.²⁰ They found that PCT was more sensitive and specific and had greater positive and negative predictive values than CRP, IL-6 or white blood cell count for differentiating bacterial and viral causes of community-acquired pneumonia. They used blood culture and sputum analysis for diagnosis of pneumococcal pneumonia. On the other hand, Toikka et al.⁹ found higher PCT values in bacterial pneumonia but also found a marked overlap within etiologies, suggesting that some bacterial pneumonias are mild with only minor changes in the chest radiograph and with a modest host inflammatory response, and some of the viral pneumonias are severe with major changes in the chest radiograph and in the host response. Korppi and Remes¹⁹ also state that serum PCT cannot be used to discriminate between pneumococcal and viral pneumonia. They used serologic methods to diagnose pneumococcal pneumonia. It is possible that some of the children they diagnosed only by immune complexes could have had pneumococcal otitis media or sinusitis without true bacterial pneumonia. Bacteremic pneumococcal pneumonia is a more severe illness than the serologically diagnosed disease.²¹ In our study neither clinical features nor laboratory markers differed between bacteremic and urinary antigen-diagnosed pneumococcal pneumonia, although there are only five patients with bacteremic pneumonia because it is uncommon in children. Detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigen in clinical samples by counterimmunoelectrophoresis has been performed, showing its usefulness for pneu-

mococcal pneumonia.²² During pneumococcal pneumonia it is possible to detect urinary antigen as a result of circulating organisms in the bloodstream and release of pneumococcal antigen from the lung.²³

Elevated PCT values in pneumococcal pneumonia are expected because PCT release depends on bacterial endotoxin and probably other bacterial products.^{13, 15} Purified Gram-positive cell wall components induce inflammatory response and cytokine production.^{24, 25} Components of the pneumococcal cell wall play a critical role in the induction of host inflammation. Exposure to lipoteichoic acid, which is present only in Gram-positive bacterial cell walls, increases macrophage release of tumor necrosis factor and nitric oxide (NO).²⁵ Pneumolysin, a protein toxin of *S. pneumoniae*, has also been described as inducing NO production from macrophages.²⁶ PCT participates in this pathway by having an inhibitory effect on the release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in a dose-dependent manner as a counterregulatory mechanism against the large production of NO and the concomitant systemic hypotension in severe sepsis.²⁷

It is possible that as many as one-half of the children with community-acquired pneumonia could have a mixed infection,³ and this possibility cannot be excluded even when microbiologically demonstrating a single etiologic agent. We have excluded from the study the children with demonstrated mixed infection to make the etiologic comparison as accurate as possible. Although data were not shown, all cases with mixed bacterial-viral etiology had elevated CRP and PCT values. On the other hand there were six patients with diagnosis of viral etiology who had high PCT values. These were all considered bacterial superinfection by clinical features before the PCT measurement. This supports the usefulness of these factors for therapeutic decisions.

In a study of adults with community-acquired pneumonia by Hedlund and Hansson,²⁸ PCT on admission was strongly associated with severity of the disease, measured by APACHE II score. Because PCT values

increase with increasing severity of the inflammatory response to infection, it may be of prognostic value. In another study by Brunkhorst et al.,²⁹ PCT showed a slight but limited prognostic value in patients with severe pneumonia. Etiologic diagnosis is more feasible in adult patients because appropriate specimens can be more easily obtained.

We can conclude that elevated PCT and CRP serum concentrations on admission have a significant correlation with bacterial etiology of lower respiratory tract infection. CRP and PCT show good sensitivity for distinguishing pneumococcal from other etiologies of lower respiratory tract infection. PCT has greater specificity than CRP. In children with lower respiratory tract infection, PCT and CRP measurement can have an additive value to rationalize antibiotic therapy before microbiologic results are obtained and to identify patients who might benefit from additional therapies.

REFERENCES

1. Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, et al. Etiology of childhood pneumonia; serologic results of a prospective, population based study. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:986–91.
2. Isaacs D. Problems in determining the etiology of community-acquired childhood pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:143–8.
3. Ruuskanen O, Nohynek H, Ziegler T, et al. Pneumonia in childhood: etiology and response to antimicrobial therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:217–23.
4. Heiskanen-Kosma T, Korppi M. Serum C-reactive protein cannot differentiate bacterial and viral aetiology of community-acquired pneumonia in children in primary healthcare settings. *Scand J Infect Dis* 2000;32:399–402.
5. Virkki R, Juven T, Rikalainen H, Svedstrom E, Mertsola J, Ruuskanen O. Differentiation of bacterial and viral pneumonia in children. *Thorax* 2002;57:438–41.
6. Jayle DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in Pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735–47.
7. Nohynek H, Valkeila E, Leinonen M, Eskola J. Erythrocyte sedimentation rate, white blood cell count and serum C-reactive protein in assessing etiologic diagnosis of acute lower respiratory infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:484–90.
8. Korppi M, Heiskanen-Kosma T, Leinonen M. White blood cells, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in pneumococcal pneumonia on children. *Eur Respir J* 1997;10:1125–9.
9. Toikka P, Irjala K, Juven T, et al. Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:598–602.
10. Dehoux M, Boutten A, Ostinelli J, et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:710–16.
11. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993;341:515–8.
12. Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellman A, Reinhart K. Procalcitonin: a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 1997;6:329–34.
13. Oberhoffer M, Stonnans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999;134:49–55.
14. Nylen E, Snider R, Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL. Pneumonitis associated hyperprocalcitonemia. *Am J Med Sci* 1996;312:12–18.
15. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1605–8.
16. Gendrel D, Raymond J, Assicot M, et al. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997;24:1240–2.
17. Gendrel D, Raymond J, Coste J, et al. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial vs. viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:875–81.
18. Benador N, Siegrist CA, Gendrel D, et al. Procalcitonin is a marker of severity of renal lesions in pyelonephritis. *Pediatrics* 1998;102:1422–5.
19. Korppi M, Remes S. Serum procalcitonin in pneumococcal pneumonia in children. *Eur Respir J* 2001;17:623–7.
20. Moulin F, Raymond J, Lorrot M, et al. Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneumonia. *Arch Dis Child* 2001;84:332–6.
21. Juven T, Mertsola J, Toikka P, Virkki R, Leinonen M, Ruuskanen O. Clinical profile of serologically diagnosed pneumococcal pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1028–33.
22. Rusconi F, Rancilio L, Assael G, et al. Counterimmunoelectrophoresis and latex particle agglutination in the etiologic diagnosis of presumed bacterial in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:781–5.
23. Coonrod JD, Rytel MW. Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis: I. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. *J Lab Clin Med* 1973;81:770–7.
24. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985;151:859–68.
25. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann O. Mechanism of Gram positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998;188:305–15.
26. Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 1999;67:3750–6.
27. Hoffmann G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann F, Schobersberger W. *In vitro* modulation of inducible nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med* 2001;29:112–16.
28. Hedlund J, Hansson O. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000;28:68–73.
29. Brunkhorst FM, Al-Nawas B, Krummenauer F, Forycki ZF, Shah M. Procalcitonin, C-reactive protein and APACHE II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:93–100.



ELSEVIER



www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia

Cristina Prat^{a,*}, Josep Domínguez^a, Felipe Andreo^b, Silvia Blanco^a, Angeles Pallarés^a, Federico Cuchillo^a, Carmen Ramil^a, Juan Ruiz-Manzano^b, Vicente Ausina^a

^aServei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain

^bServei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain

Accepted 25 May 2005

Available online 18 July 2005

KEYWORDS

PCT;
Neopterin;
Pneumonia severity index;
Aetiology

Summary Objective: Clinical outcome of pneumonia depends on a multifaceted treatment approach. Not only diagnostic methods but also early indicators of the degree of inflammatory response can aid in therapeutic decisions. The objective was to evaluate the usefulness of procalcitonin and neopterin in distinguishing among aetiologies as well as severity in patients with pneumonia.

Patients: A total of one hundred sixteen patients with clinical, radiographic and microbiological diagnosis of pneumonia were grouped by aetiology, pneumonia severity index, and by the presence of unilobar or multilobar radiographic pulmonary infiltrates. Procalcitonin and neopterin were measured by immunoassays.

Results: Patients with pneumococcal pneumonia presented elevated procalcitonin and neopterin levels, being higher in bacteraemic than in non-bacteraemic pneumonia. Patients with *Legionella* pneumonia presented elevated neopterin levels and slightly elevated procalcitonin levels. Patients with tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia presented elevated neopterin and low or not detectable procalcitonin. Procalcitonin and neopterin levels were increased in high-risk classes of pneumonia severity index. Both parameters yielded significant correlation to the radiographic extent and also to young age.

Conclusions: Procalcitonin and neopterin levels vary depending on age, aetiology and severity of pneumonia. Together with clinical and microbiological data, combined measurement can help to identify patients who might benefit from additional therapies.

© 2005 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Pneumonia is still the leading infectious disease cause of death.¹ For early and effective treatment,

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4978894; fax: +34 93 4978895.

E-mail address: crisprat@telefonica.net (C. Prat).

consistent diagnosis is essential. Despite the availability of several diagnostic and therapeutic methods, a better and more specific prediction of sepsis is still needed. Even when a correct antibiotic treatment is set up, there are patients with a poor outcome. Not only anti-microbial but also immunomodulatory therapies can condition the clinical outcome and a multifaceted treatment approach is needed.² Scoring systems primarily measure the physiological effect of the infection on the host, not the microbial and inflammatory mechanisms of the organ injury response. Early indicators of the degree of inflammatory response can aid in therapeutic decisions. Developing better methods to define high-risk septic populations for treatment with anti-inflammatory agents will increase the efficacy of this therapeutic approach and minimize its potential for harm.

Inflammatory response in lower respiratory tract is triggered by bacterial products as lipopolysaccharide or peptidoglycan, which stimulate alveolar macrophages that produce cytokines, mainly IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α , as well as neutrophils recruitment.^{3,4} The induced reactive nitrogen species as nitric oxide (NO) may play a role in the pathogenesis of acute lung injury.⁵ Cytokines have been tested with the purpose of measuring inflammatory response, but they are produced locally in the lung at the site of infection and they cannot be detected in serum in large amounts.⁶ This compartmentalized production of cytokines may explain why their serum detection is not useful as a diagnostic method. Only interleukin-6 can be found in serum in large amounts and it has been associated with pneumococcal pneumonia^{7,8} and also as a prognostic factor in severe pneumonia.⁹ Nevertheless, cytokines undergo a fast down regulation in serum and interpretation of results is difficult. In addition, elevated plasma levels of several cytokines are found in different stages of acute respiratory distress syndrome.^{10,11}

Blood levels of acute phase proteins are thought to reflect closely the acute-phase protein synthesis by mediators of the local inflammatory process.¹²⁻¹⁶ Their increase in serum depends on cytokines stimulus, they have a longer half-life, they are more stable in vivo and ex vivo, and laboratory tests for their measurement are easy to perform. Procalcitonin (PCT), one of the calcitonin precursor peptides, has been reported as a sensitive marker of severe bacterial infection.^{12,13} There is evidence to suggest that monocyte-macrophage system cells are capable of synthesizing PCT,¹⁴ as well as other non-thyroidal tissues, mostly parenchymal cells, under the stimulus of bacterial products.¹⁵ Neopterin is a 2-amino-4-OH-pteridine¹⁶ which is

produced by monocytes/macrophages¹⁷ and monocyte-derived dendritic cells¹⁸ after induction by IFN-gamma that is secreted by T lymphocytes. It has been reported to act as a mediator of cell immunity against intracellular pathogens. Both parameters seem to be involved in regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) during inflammation.¹⁹⁻²¹

The aim of our study was to evaluate the usefulness of procalcitonin (PCT) and neopterin in distinguishing among aetiologies as well as severity of inflammatory response in patients with pneumonia. Disease severity and organ injury were assessed by pneumonia severity index (PSI) and by the radiographic extent of the pneumonia.

Methods

The study population was adult patients admitted to Emergency Department presenting clinical signs of lower respiratory tract infection and a new infiltrate on the chest radiograph. The study was approved by the institutional ethics committee, and informed consent was signed by all the patients included. At the time of arrival to the Emergency, samples were collected for microbiological diagnosis: blood cultures, sputum or bronchial lavage specimens for culture, urine for antigen detection and serum for antibody assays. An aliquot of the serum sample collected at admission was stored at -20°C for determination of PCT and neopterin. Serial serum samples were collected when possible. Data were collected prospectively for clinical, analytical, radiological and microbiological features. Samples from a total of 289 patients were collected during an 18 months period and, of these, 217 were considered, after retrospective analysis by expert clinicians, to present lower respiratory tract infection. Were eligible for the study entry only those patients with aetiologic diagnosis, which were 116. PCT and neopterin were measured only in this selected population. Patients were grouped as follows:

1. Pneumococcal pneumonia. Seventy-six patients. *Streptococcus pneumoniae* was isolated in blood culture in 15 patients. The other patients were diagnosed by detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis (CIE).^{22,23} Patients with only presumptive diagnosis by isolation in sputum sample were excluded, as it is not considered a gold standard.
2. *Legionella pneumophila* pneumonia. Twenty-one patients were diagnosed by urinary antigen detection of *L. pneumophila* serogroup 1 by

enzyme immunoassay (Bartels EIA *Legionella* urinary antigen. Bartels Inc., A Trinity Biotech Company, Wicklow, Ireland).²⁴

3. Tuberculosis. Thirteen patients were diagnosed with pulmonary tuberculosis by Ziehl-Nielsen positive smear in sputum and culture isolation in solid (Lowenstein-Jensen medium, Biomedics SL, Madrid, Spain) as well as liquid culture media (Bact ALERT[®] MP, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).
4. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Six patients were diagnosed by direct observation of *Pneumocystis* trophozoites by May-Grunwald-Giemsa stain of bronchoalveolar lavage.

In addition, serum samples were collected from a control group of 24 healthy subjects. Patients with pneumococcal and *Legionella* pneumonia were stratified by the prediction rule calculated according to the pneumonia severity index (PSI) scores, developed by the Pneumonia Outcomes Research Team.²⁵ The rule groups patients into five risk classes with respect to the risk of death within 30 days. Risk class is obtained by assigning points based on age and the presence of coexisting disease, abnormal physical findings and abnormal laboratory findings. Patients were grouped not only by PSI but also by the presence of unilobar or multilobar radiographic pulmonary infiltrates in order to establish the anatomical extent of the infection. PCT was measured by immunoluminometric assay (Lumitest[®] PCT, Brahms Diagnostica, Hennigsdorf/Berlin, Germany) and neopterin was measured by competitive enzyme immunoassay (Neopterin ELISA, IBL Hamburg, Germany) following the manufacturer's instructions.

Comparison between groups for continuous dependent variables PCT and neopterin was conducted with the non-parametric Mann-Whitney *U*-test for categorical independent variables, and Spearman's correlation for continuous independent variables. Data are expressed on median and 5-95 percentiles. Graphical representation is based on non-parametric boxplots. Associations were considered statistically significant if the *P* value was <0.05. The commercial statistical software package used was SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Patients characteristics are described in Table 1. The mean age of the patients included in the study was 56.62 years (standard deviation 19.15, 95% confidence interval for mean 53.09-60.14).

Control group showed a mean PCT value of 0.35 ng/ml (standard deviation 0.048) and mean neopterin value of 0.28 (standard deviation 0.38). The distribution of the parameters in the different groups using median and 5-95 percentiles is described in Table 2. The values of PCT and neopterin in the different aetiologies are shown in boxplots in Figs. 1 and 2, respectively. PCT values in pneumococcal pneumonia showed significant differences compared to the other aetiologies grouped together ($P=0.016$). No such association was found with neopterin ($P=0.234$). Pneumococcal pneumonia was the unique aetiology that presented with both PCT and neopterin elevated values. It was evaluated if there were differences between the values of bacteraemic and non-bacteraemic pneumococcal pneumonia. Differences were significant for neopterin ($P=0.015$) and nearly significant for PCT ($P=0.059$). In *Legionella* pneumonia, PCT levels were moderately elevated but neopterin levels were highly increased, although only nearly significantly higher than in the other aetiologies grouped together ($P=0.058$). In both tuberculosis and *P. jirovecii* pneumonia, neopterin levels were increased and PCT levels were low or not detectable.

Patients with both pneumococcal and *Legionella* pneumonia (97) were stratified using PSI²⁵ to elucidate the prognostic value of PCT and neopterin. PSI classes were as follows: class I, 13 patients; class II, 26 patients; class III, 25 patients; class IV, 27 patients; class V, six patients. Only three patients died, two from class V and one from class IV. The values of PCT and neopterin are shown in Table 3 and Figs. 3 and 4. Patients in high-risk class (IV and V) had significantly more elevated PCT levels ($P=0.021$). Not such association was found for neopterin ($P=0.091$), although values were significantly more elevated when the risk class was V. Twenty-five of the 97 patients presented multilobar radiographic infiltrates and both PCT and neopterin were significantly more elevated ($P=0.002$ and $P=0.020$, respectively) than in unilobar pneumonia. Values are also shown in Table 3. The same analysis was performed also separately, that is, analyzing solely the pneumococcal group or the *Legionella* group, in order to unmask more clearly differences by severity. In the group of pneumococcal pneumonia, both PCT and neopterin levels correlated with high-risk class ($P=0.011$ and $P=0.016$, respectively). The correlation with radiographic extension was maintained although it became not significant for neopterin ($P=0.002$ for PCT and $P=0.069$ for neopterin). In the group of *Legionella* pneumonia, correlations were not significant for both parameters: $P=0.910$ for PCT

Table 1 Patient characteristics

Patient characteristic	N	%
Men	73	62.9
Aetiology		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	76	65.5
<i>Legionella pneumophila</i>	21	18.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13	11.2
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	6	5.2
Coexisting illnesses		
Neoplastic disease	11	9.5
Liver disease	12	10.3
Congestive heart failure	12	10.3
Cerebrovascular disease	7	6
Renal disease	7	6
Multilobar radiographic infiltrate	35	30.2
Dead	4	3.4

and $P=0.267$ for neopterin when comparing to high-risk class, and $P=0.381$ for PCT and $P=0.178$ for neopterin when comparing to radiographic extension.

Association between age and PCT as well as neopterin levels was screened. Indirect correlation was found only when analyzing the groups of low-risk class (Spearman's correlation -0.153 for PCT and -0.336 for neopterin).

Discussion

The aim of our study was to evaluate the usefulness of PCT and neopterin in distinguishing among aetiologies as well as severity in patients with pneumonia. The utility of PCT in the diagnosis of lower respiratory tract infection has been studied in prior reports, but its correlation with severity has been mostly evaluated in ventilator-associated pneumonia and acute respiratory distress syndrome. Fewer studies have assessed the value of the combined measurement of PCT and neopterin,

and its different response depending on the aetiology. There is increasing evidence that the recognition pathways for different pathogens are also different. Distinct patterns of cytokine production may be induced by products of different micro-organisms.²⁶ Release of cytokine-induced mediators can, therefore, be different. According to our results, PCT reach significantly more elevated values in pneumococcal pneumonia, being higher when bacteraemic. Neopterin values are elevated in bacteraemic pneumococcal pneumonia as well as in intracellular pathogens aetiologies. Our results are consistent with previous studies. Hedlund et al.²⁷ found a significant correlation between elevated PCT values and pneumonia caused by *S. pneumoniae* and low PCT values when caused by atypical agents. The fact that both PCT and neopterin show increased values in patients with bacteraemic pneumococcal pneumonia can be related to the pathophysiology, although the position of these mediators in sepsis is still unclear. It has been demonstrated that purified Gram-positive cell wall components as lipoteichoic acid induces inflammatory response

Table 2 Distribution (5 and 95 percentiles and median) of procalcitonin (PCT) and neopterin of control group and according to aetiology

Groups of patients	n	PCT (ng/ml)			Neopterin (ng/ml)		
		5	Median	95	5	Median	95
Control group	24	0.26	0.35	0.44	0.014	0.18	1.53
Pneumococcal pneumonia	76	0.02	0.74	74.64	0.62	22.14	632.33
Bacteraemic	15	0.11	3.4	74.1	0.41	39.70	630.04
Non-bacteraemic	61	0.02	0.66	66.75	0.66	17.62	314.38
<i>Legionella</i> pneumonia	21	0.03	0.54	4.55	0.27	62.84	309.13
Tuberculosis	13	0.11	0.38	0.60	1.15	9.37	78.03
<i>Pjirovecii</i> pneumonia	6	0.15	0.42	0.48	9.88	57.51	93.76

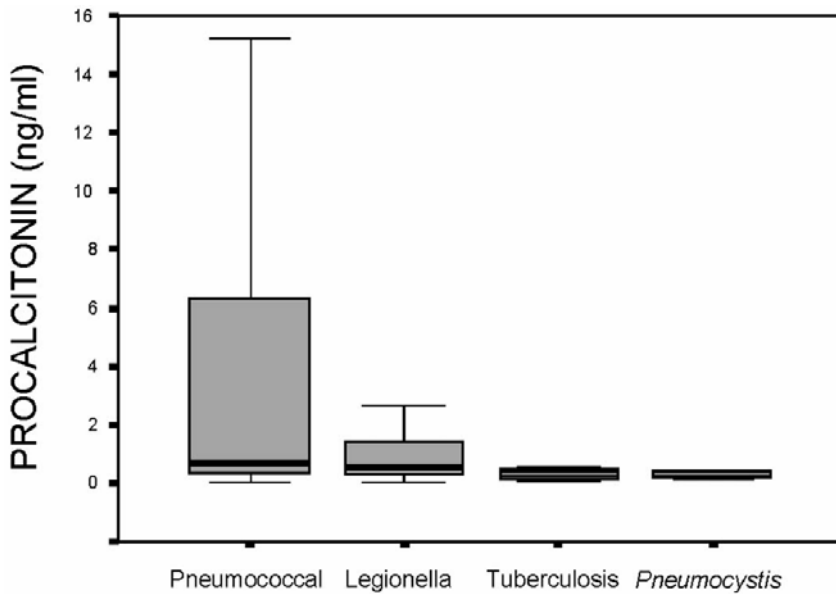


Figure 1 Procalcitonin serum concentrations (ng/ml) in adults with pneumococcal pneumonia, *Legionella* pneumonia, tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.

and increases macrophage production of $\text{TNF-}\alpha$ and NO .²⁸ Both PCT and neopterin have been reported to participate in iNOs pathway.^{19,21} Expression of PCT is increased by pro-inflammatory cytokines as

IL-1 and inhibited by $\text{IFN-}\gamma$, explaining the observation that serum PCT concentrations increase less in systemic viral compared with bacterial infections.²⁹

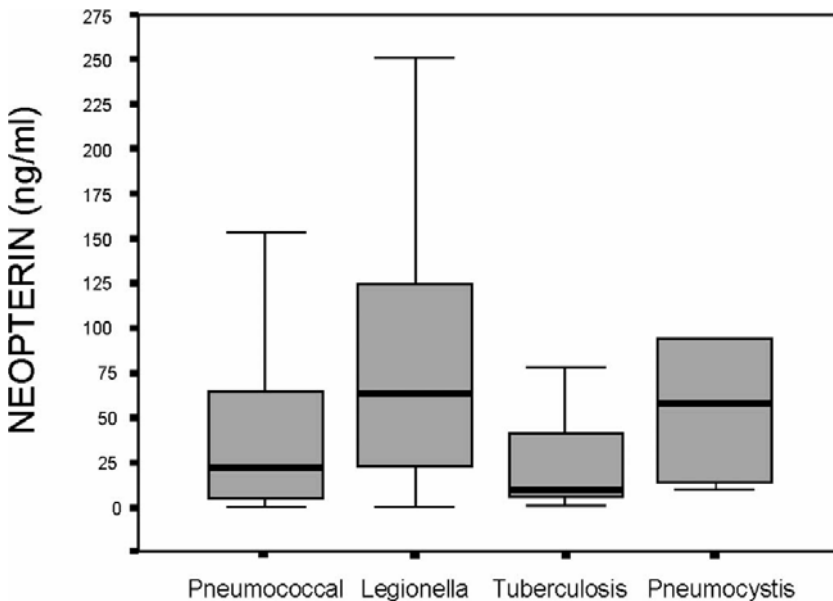


Figure 2 Neopterin serum concentrations (ng/ml) in adults with pneumococcal pneumonia, *Legionella* pneumonia, tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.

Table 3 Distribution (5 and 95 percentiles and median) of procalcitonin (PCT) and neopterin in patients with pneumococcal and *Legionella* pneumonia according to pneumonia severity index (PSI) and extent of the pneumonia

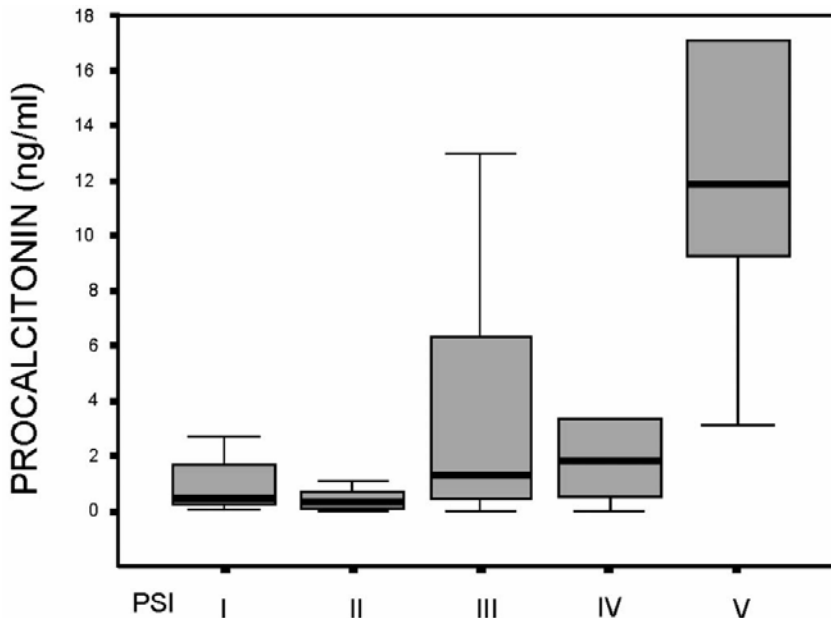
Groups of patients	n	PCT (ng/ml)			Neopterin (ng/ml)		
		5	Median	95	5	Median	95
PSI class							
High-risk class (IV and V)	33	0.02	2.07	116.19	0.53	39.70	692.28
Low-risk class (I-III)	64	0.72	0.53	41.05	1.02	19.36	236.10
Radiographic extent							
Unilobar	72	0.02	0.51	38.31	0.52	19.40	583.81
Multilobar	25	0.12	3.4	72.63	1.37	47.12	547.79

In the cases of *Legionella* pneumonia, neopterin is more elevated than procalcitonin. Neopterin is produced after induction by IFN-gamma, and it is considered an indirect marker of the activity of cytotoxic T lymphocytes.¹⁷ There is a relative predominance of Th1 cytokine production such as IFN-gamma and IL-12 in *Legionella* pneumonia.³⁰ Interferon and other cytokines that define Th1 vs. Th2 cell activity are known to have a crucial role in activating macrophages to control infection by *L. pneumophila*.³¹

Finally, we found low PCT values and elevated neopterin values in patients with tuberculosis and *P. jirovecii* pneumonia. Previous studies have shown no correlation between PCT and tuberculosis³² but a marked association between elevated

neopterin levels and cell-mediated immunity lung diseases as tuberculosis has been reported.³³⁻³⁵ Neopterin is considered a more sensitive indicator for the activation of monocytic and lymphocytic system and less specific for bacterial diseases, but did not seem to be of value in distinction between *P. jirovecii* and bacterial pneumonia in HIV-positive subjects.³⁶

The association between severity of infection and serum levels of inflammatory markers could be important in terms of a successful identification of those patients who might benefit from early intervention strategies. The current scoring systems for assessing the magnitude of the physiological insult and the degree of organ injury examine the host response at a single point in

**Figure 3** Procalcitonin serum concentrations (ng/ml) in pneumococcal and *Legionella* depending on pneumonia severity index (PSI).

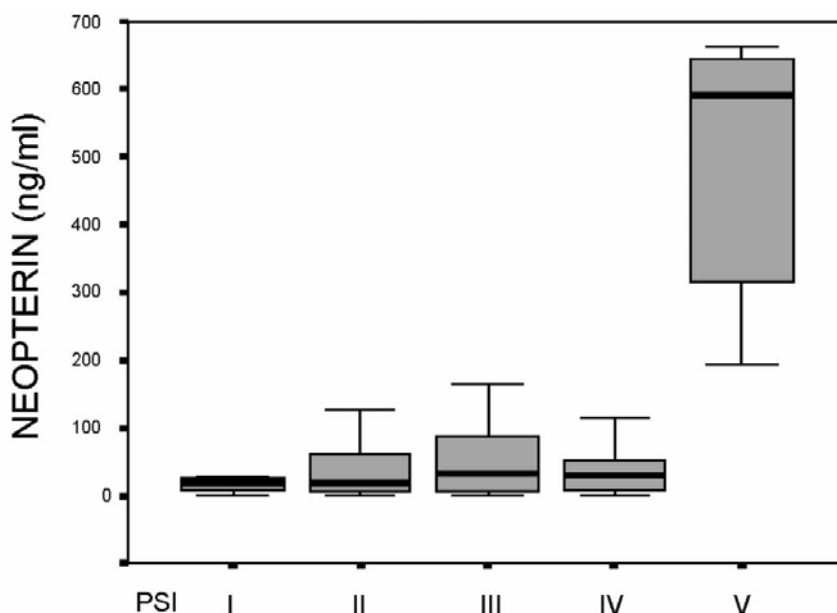


Figure 4 Neopterin serum concentrations (ng/ml) in pneumococcal and *Legionella* depending on pneumonia severity index (PSI).

time without reference to the underlying inflammatory response or to the inciting noxious stimulus. Several studies have demonstrated the association of elevated values of inflammatory mediators and disease severity in patients with sepsis; de Werra et al.³⁷ stated that measurements of procalcitonin and nitric oxide end products as nitrite/nitrate represented the most suitable tests for defining patients with septic shock. In a study of Adamik et al.,³⁸ PCT and neopterin yielded statistically significant differences between survivors and non-survivors in patients with sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. On the other hand, Ruokonen et al.³⁹ presented PCT and neopterin as equally effective, although not very accurate in differentiating between infection and non-infectious inflammation in critically ill patients. Brunkhorst et al.⁴⁰ reported PCT as a good discriminator of infectious and non-infectious causes of early acute respiratory distress syndrome. C-reactive protein has shown limited value for this purpose.^{26,41}

The fact of including in the study only patients with aetiological diagnosis and to not include documented viral aetiology can be a limitation for a representative distribution of cases by PSI classification. Anyway, a finding of our study is that elevated PCT values significantly correlate with high-risk class of pneumonia severity index,

specially in the pneumococcal group. Hedlund et al.²⁷ found that the severity of the disease measured by APACHE II score was strongly associated with admission levels of PCT. On the other hand, Brunkhorst et al.⁴¹ found that PCT showed a slight but limited predictive value for a diagnosis of clinical deterioration in patients with severe pneumonia. The APACHE II score⁴² better reflects the clinical status of the patient and PSI measures the risk of death. However, neither of them is specific for the severity of infection. Several factors that the PSI rule does not take into account may greatly influence the inflammatory response to infection such as host condition and the number of lobes involved. When evaluated in the context of many other factors impacting on outcome, Fine et al. did not find that lobar extent was an independent predictor of outcome but only the presence of a pleural effusion.²⁵ Nevertheless, it makes sense that the more lobes involved the greater the systemic inflammatory response. Elevated PCT values have been shown to correlate with the anatomical extent of the inflamed tissue involved.⁴³ Our study shows a significant association between both elevated PCT and neopterin levels and presence of multilobar radiographic infiltrates in pneumococcal pneumonia. Thus, serial measurements can show a better prognostic value: for example, in our study, a young patient, 25 years

old, with a multilobar pneumococcal pneumonia but an excellent response to treatment showed highly increased PCT values at admission, but they started to decrease after 24 h until reaching normal levels. The same kinetics and elevated initial values although successful outcome were observed in paediatric patients with pneumococcal pneumonia.⁴⁴ Therefore, elevated levels at admission can be more related to aetiology as well as young age (which also shows correlation to PCT when analyzing low-risk class patients) than to the severity. On the other hand, another patient included in the study who presented a fatal outcome, showed a moderately increased PCT value at admission but progressive rise in the following measurements.

We can conclude that procalcitonin and neopterin values vary depending on age, aetiology and severity of the disease. The severity of the disease seems to be the main influencing parameter but the sample size is still low. Nevertheless, the tested inflammatory markers and others can be a complementary tool to be used in those patients who are not able to display clinical signs or who have underlying non-infectious inflammatory conditions. The host inflammatory responses to different pathogens share some common response elements but also exhibit distinct patterns of cytokine appearance.²⁶ The successful use of anti-cytokine or anti-inflammatory therapies to interrupt the development of the sepsis response requires a more thorough understanding of the initiating mediators involved in its induction. In a recent study, PCT guidance substantially reduced antibiotic use in lower respiratory tract infections, by using a more sensitive assay.⁴⁵ Together with clinical and microbiological methods, acute phase markers can help to orientate aetiology as well as to identify patients who might benefit from immunomodulating therapies. The potential treatments that can either halt or reverse the early stages of the inflammatory response need to be more extensively evaluated.

Acknowledgements

This study was supported by grant of 'Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica' (SEPAR).

References

1. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1730-54.

2. Mushatt DM. Advances in antimicrobial therapy for respiratory tract infections. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6:250-3.
3. Canto RG, Robinson II GR, Reynolds H. Defense mechanisms of the respiratory tract. In: Chmehl H, Bendinelli M, Friedman H, editors. *Pulmonary infections and immunity*. New York: Plenum Press; 1974. p. 1-27.
4. Moore TA, Standiford TJ. The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:297-305.
5. Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein A nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:166-72.
6. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, et al. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:710-6.
7. Ortvist A, Hedlund J, Wretling B, Carlstrom A, Kalin M. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1995;27:457-62.
8. Lieberman D, Livnat S, Schallaeffer F, Porath A, Horowitz S, Levy R. IL-1beta and IL-6 in community-acquired pneumonia: bacteremic pneumococcal pneumonia versus *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Infection* 1997;25:90-4.
9. Marik PE. The clinical features of severe community-acquired pneumonia presenting as septic shock. Norasept II Study Investigators. *J Crit Care* 2000;15:85-90.
10. Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, et al. Tumor necrosis factor- α and angiotensin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;166:651-6.
11. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. A role of vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1332-7.
12. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993;341:515-8.
13. Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellman A, Reinhart K. Procalcitonin—a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 1997;6:329-34.
14. Oberhoffer M, Stonnans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999;134:49-55.
15. Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, et al. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res* 2003;35:290-5.
16. Hammerlinck FF. Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999;8:167-76.
17. Weiss G, Murr C, Zoller H, et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol* 1999;116:435-40.
18. Wirleitner B, Reider D, Ebner S, et al. Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. *J Leukoc Biol* 2002;72:1148-53.
19. Hoffman G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiederman F, Schobersberger W. In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med* 2001;29:112-6.
20. Hoffman G, Frede S, Kenn S, et al. Neopterin-induced tumor necrosis factor- α synthesis in vascular smooth muscle cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:240-5.

21. Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B, et al. Neopterin induces nitric oxide-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. *Immunobiology* 1998;199:63-73.
22. Rusconi F, Rancilio L, Assael BM, et al. Counterimmunoelectrophoresis and latex particle agglutination in the etiologic diagnosis of presumed bacterial pneumonia in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:781-5.
23. Coonrod JD, Rytel MW. Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. *J Lab Clin Med* 1973;81:770-7.
24. Domínguez J, Galí N, Blanco S, et al. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaire's disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;41:199-203.
25. Fine M, Auble T, Yealy D, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997;336:243-50.
26. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infection with Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2003;71:5803-13.
27. Hedlund J, Hansson O. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000;28:68-73.
28. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann O. Mechanism of Gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998;188:305-15.
29. Linscheid P, Seboek D, Nylen ES, et al. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology* 2003;144:5578-84.
30. Tateda K, Matsumoto T, Ishii Y, et al. Serum cytokines in patients with *Legionella* pneumonia: relative predominance of Th1-type cytokines. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:401-3.
31. Friedman H, Yamamoto Y, Klein TW. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:273-9.
32. Polzin A, Pletz M, Erbes R, et al. Procalcitonin as a diagnostic tool in lower respiratory tract infections and tuberculosis. *Eur Respir J* 2003;21:939-43.
33. Mohamed KH, Mobasher AA, Yousef AR, et al. BAL neopterin: a novel marker for cell-mediated immunity in patients with pulmonary tuberculosis and lung cancer. *Chest* 2001;119:776-80.
34. Horak E, Gassner I, Solder B, Wachter H, Fuchs D. Neopterin levels and pulmonary tuberculosis in infants. *Lung* 1998;176:337-44.
35. Immanuel C, Swamy R, Kannapiran M, et al. Neopterin as a marker for cell-mediated immunity in patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:175-80.
36. Carstens J, Andersen PL. Changes in serum neopterin and serum beta 2-microglobulin in subjects with lung infections. *Eur Respir J* 1994;7:1233-8.
37. De Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997;25:607-13.
38. Adamik B, Kübler-Kielb J, Golebiowska B, Gamian A, Kübler A. Effect of sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on plasma level of nitric oxide metabolites, neopterin and procalcitonin: correlation with mortality and postoperative complications. *Intensive Care Med* 2000;26:1259-67.
39. 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.
40. Brunkhorst FM, Eberhard OK, Brunkhorst R. Discrimination of infectious and noninfectious causes of early acute respiratory distress syndrome by procalcitonin. *Crit Care Med* 1999;27:2304-5.
41. Brunkhorst FM, Al-Nawas B, Krummenauer F, Forycky ZF, Shah M. Procalcitonin, C-reactive protein and APACHE II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:93-100.
42. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmermann JE. APACHE II. A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-29.
43. Benador N, Siegrist CA, Gendrel D, et al. Procalcitonin is a marker of severity of renal lesions in pyelonephritis. *Pediatrics* 1998;102:1422-5.
44. Prat C, Domínguez J, Rodrigo C, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:963-7.
45. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004;363:600-7.

Serum Concentrations Of Procalcitonin After Cardiac Surgery

C. Prat¹, P.Ricart², X.Ruyra³, J.Dominguez¹, J.Morillas², S.Blanco¹, T.Tomasa², T.Torres², L.Camara³, A.Pallarés¹ and V.Ausina¹

¹ Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Servei de Medicina Intensiva, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, ³ Servei de Cirurgia Cardíaca, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

ABSTRACT. Objectives: To establish the baseline levels of procalcitonin (PCT) after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB), which can lead to a systemic inflammatory response syndrome because of exposure of blood to non-physiological surfaces. To analyze a possible induction of the inflammatory response which might interfere with the diagnosis of infection by PCT.

Patients and methods: Serum samples from one hundred fifty-one patients undergoing coronary artery bypass grafting or valve replacement were collected at admission to Intensive Care Unit after surgery as well as in the first and second postoperative days. Patients were followed for the development of postoperative complications. PCT levels were measured by immunoluminometric assay.

Results: The mean PCT values were significantly higher than in control group in the first postoperative day in all groups of patients, although within reference values of complication-free post-operative patients. No significant differences were found between the different types of surgery. No increased PCT levels were found related to duration of CPB, nor to time of aortic clamping. Only patients who presented complications had significantly increased PCT values immediately after surgery ($p=0.004$), in the first postoperative day ($p<0.0001$) and in the second postoperative day ($p<0.0001$) with respect to those who recovered uneventfully.

Conclusions: A slight and transient increase in PCT levels is observed in the first postoperative day after cardiac surgery. Significant elevation of PCT was not observed when complications were not present. PCT yields an elevated negative predictive value of complication after cardiac surgery.

Keywords: procalcitonin, surgery, cardiopulmonary bypass, infection, inflammatory response

INTRODUCTION

Cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB), although it is a highly sterile type of surgery, can lead to a systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The exposure of blood to non-physiological surfaces as well as myocardial and pulmonary ischemia/reperfusion because of aortic clamping and extracorporeal circulation are reported causes of SIRS (1). The balanced homeostasis of the coagulation and immune systems is altered by the contact with nonendothelialized surfaces. Upon release of the aortic clamp, it has been hypothesized that there is a translocation of endotoxins from gut to the bloodstream (2), as well as activation of complement factors (3). Ischemia and reperfusion trigger cytokine release (4) which activates inflammatory cascades, with strong similarity to those observed in sepsis, and it contributes to postoperative organ dysfunction and coagulation disorders (5). Artificial surfaces are capable of simultaneously activating hemostatic and inflammatory systems, and there are numerous pathways through which these two systems constantly interact, playing a role in the development of complications (6). Complications of CPB include pulmonary and renal dysfunction,

myocardial ischemia, neurological disorders and coagulation abnormalities.

It is not always possible to distinguish a SIRS from a systemic inflammation induced by microorganisms. The routine laboratory parameters do not differentiate specifically enough between patients developing postoperative complications, particularly infection, and those exhibiting an acute phase response following cardiac surgery. The surgery itself might be a cause of induction of markers of inflammation. Differential diagnosis between hemodynamic, respiratory or infectious complications is then difficult by conventional markers. Only a few parameters are available to monitor critically ill patients. C reactive protein (CRP) is a poor marker of postoperative complications, increasing similarly in complicated and non-complicated patients undergoing CPB (7-9). Nitrite/nitrate levels do not show either significant difference in patients with and without postoperative complications (10). Neopterin has been reported to be a better predictor in some studies (10) although less sensitive in others (5).

Procalcitonin (PCT) has been described as an early and specific marker of bacterial infection (11, 12). It is used for the differential diagnosis of bacterial infections complicated by a

systemic inflammatory response (13, 14). A number of stimuli such as several proinflammatory cytokines and endotoxin have been shown to induce PCT (15-18). Kinetics of procalcitonin shows a peak level at approximately 12-16 hours after the initial stimulus and the half-life is approximately 20-24 hours (19). Several studies have reported a moderate increase in PCT levels postoperatively in cardiac patients (7-9) as well as other conditions associated with systemic inflammation as severe trauma (20) and different types of surgery (21). Recognition of raised PCT values following surgery is important for the interpretation of post-operative PCT levels.

Given the hypothesis that PCT levels, unlike other inflammatory markers, do not increase unspecifically after surgery and therefore can still be useful for the diagnosis of infection, the objective of the study was to establish the baseline PCT levels after cardiac surgery with and without CPB.

PATIENTS AND METHODS

One hundred fifty-one patients undergoing cardiac surgery were prospectively enrolled in the study between March and September 2001. The institutional ethics committee approved the study. All patients gave their informed consent prior to their inclusion in the study. The groups of patients included were as follows: group 1: Sixty-nine patients undergoing CPB coronary artery bypass grafting. Group 2: Sixty-nine patients undergoing valvular replacement requiring CPB. Group 3: Thirteen patients undergoing off-pump bypass grafting. In addition, serum samples were also collected from a group of eight patients undergoing surgery of the intestine with bacteremic peritonitis, secondary to cholecystitis, perforated ulcer or pancreatitis. It was considered as a control group of microbiologically documented sepsis originating from abdomen, and analysed separately. In addition, serum samples were collected from a control group of twenty-four healthy subjects.

All cardiac surgery patients underwent general anesthesia and median sternotomy. Cephazolin was used as perioperative antibiotic prophylaxis. In the patients of groups 1 and 2 (CPB coronary artery bypass grafting and CPB valvular replacement), after total body heparinization CPB was established using standard bypass techniques with a biocompatible non-pulsatile membrane oxygenator (Sorin® or Cobe®) on a bypass circuit (Stockert, Cormedica®). CPB was primed with a mixed crystalloid/colloid solution conducted under mild hypothermic conditions (32-34°C). During bypass, the hematocrit was

maintained between 20-25%, pump flow above 2.4 L/min/m² and mean arterial pressures between 50-60 mmHg. Crystalloid cold cardioplegic solution was administered with a flow of around 200-250 ml/min and if ventricular fibrillation occurred. After rewarming patients were weaned from CPB and decannulated. The heart was defibrillated if necessary. The duration of extracorporeal circulation and aortic clamping were registered.

In the patients of group 3 (off-pump coronary artery bypass grafting), stabilization during distal anastomosis was performed using the Octopus stabilizing system. Prolene suture applied proximally and distally to the site selected for the anastomosis and a surgical blower-humidifier were used for visualization of the surgical field. Patients received heparin sodium (1.5-2 mg/kg) before anastomosis and the Celite-activated clotting time was maintained at more than 300 seconds. Heparin was neutralized by continuous intravenous administration of protamine sulfate over a 5-minutes period. In all groups, a minimal dose of catecholamines was used to maintain a cardiac index greater than 2.2L/min/m² and systolic blood pressure greater than 80 mmHg after surgery. Patients' characteristics are shown in table 1.

Sex	Man	92 (57.9%)
	Woman	67 (42.1%)
Age	<i>Mean (SD)</i>	62.43 (11.05)
	Bypass CPB	69 (43.4%)
Type of surgery	Valve replacement	69 (43.4%)
	Off-pump bypass	13 (8.2%)
	Intestinal	8 (5%)
	Infection	Cardiac surgery
	Intestinal surgery	8
Non-infectious complication	Cardiogenic shock	6
	Renal dysfunction	2
	Exitus	3
Aortic clamping Extracorporeal circulation		64.94 (27.71)
	<i>Mean (SD)</i>	98.03 (32.51)

Table 1. Patients' characteristics

Patients were monitored postoperatively in the Intensive Care Unit for the development of infectious and non-infectious complications. Diagnosis of infection was established by clinical, radiographic and microbiological parameters. Non infectious complications were defined by the occurrence of cardiologic, pulmonary, hepatic or renal dysfunction. Serum samples were collected for PCT measurement at the time of admission to Intensive Care Unit (PCT 0) as well as 24 (PCT 1) and 48 hours later (PCT 2), and frozen immediately until the assay was performed. PCT levels were measured by the commercially available immunoluminometric assay LUMitest® PCT (Brahms Diagnostica, Germany) following manufacturer's instructions.

Statistical analysis: Differences between groups were evaluated by the non-parametric Mann-

Whitney U test. Paired data were compared by the Wilcoxon test. Spearman's correlation was used to compare quantitative parameters. Differences were considered statistically significant when the p value was <0.05 . Data are expressed numerically as mean \pm standard deviation and graphically in clustered boxplots representing median, range and 5-95 percentiles. Data were analysed by sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. The optimum cut-off points were determined with a receiver operating characteristics (ROC) curve. The commercial statistical software package used was SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

Among the 151 patients, one hundred thirty-six recovered uneventfully and fifteen developed severe postoperative complications: infectious (seven) and non-infectious (eight). There were not preoperative differences between patients with and without favorable outcome. In the group of non-infectious complications: six patients suffered cardiogenic shock (two of them did not survive the initial 12 hours) and two developed severe renal dysfunction. In the group of patients who developed infection (all of them in the groups of patients who underwent CPB): two patients were clinically diagnosed of lower respiratory tract infection without microbiological confirmation, three patients presented central venous catheter related-bacteremia (the isolated microorganisms were *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Staphylococcus epidermidis*, respectively, growing in both catheter and peripheral blood samplings), and two patients presented echocardiographically confirmed endocarditis: one with subvalvular abscess, and the other with positive blood culture for *Streptococcus sanguis*.

Control group showed a mean PCT value of 0.35ng/ml (standard deviation 0.048). There was no correlation between PCT levels after surgery and duration of CPB, neither to time of aortic clamping, but significant correlation was present for the other two PCT measurements. The p values when analysing by Spearman's correlation were as follows: PCT after surgery: $p=0.104$ for duration of CPB and $p=0.544$ for time of aortic clamping, respectively. PCT in first postoperative day: $p=0.018$ and $p=0.039$, respectively and PCT in second postoperative day, $p=0.004$ and $p=0.032$, respectively.

In the group of patients who recovered uneventfully, the mean PCT level was 0.42 (SD 0.38) after surgery, 0.82 (SD 0.73) at first postoperative day and 0.69 (SD 0.62) at second postoperative day. In fig. 1 are shown the PCT

values (median, range and 5-95 percentiles) for the three days in non-complicated patients according to the type of surgery: group 1 (coronary artery bypass grafting with CPB), group 2 (valvular replacement requiring CPB) and group 3 (off-pump bypass grafting). No significant differences were found between the PCT levels among the patients who underwent CPB (group 1 and group 2) and the patients who did not (group 3) after surgery ($p=0.164$), nor first postoperative day ($p=0.895$) neither second postoperative day ($p=0.099$). No significant differences were found either between patients undergoing coronary artery bypass grafting and patients undergoing valvular replacement: $p=0.740$ after surgery, $p=0.690$ first postoperative day, and $p=0.343$ second postoperative day. PCT values were significantly ($p<0.0001$) higher in first postoperative day (PCT 1) with respect to values after surgery in all groups of patients, although values kept below 1 ng/ml in 131 of the 136 cases and the other five patients presented values still below 2 ng/ml. The patients undergoing surgery of the intestine and sepsis showed a mean PCT value of 68.26 (SD 137.99) after surgery, 56.78 (SD 116.98) in first postoperative day and 50.49 (SD 83.58) in second postoperative day.

The median, range and 5-95 percentiles of PCT in the patients who presented infectious and non-infectious complications are shown in Fig. 2. There were significant differences between the PCT levels in patients who recovered uneventfully with respect to those who presented some kind of complication in the three measurements: $p=0.004$, $p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively. There were not significant differences between the PCT values among patients with infectious and non-infectious complications after surgery ($p=0.867$), nor first postoperative day ($p=0.128$), neither second postoperative day ($p=0.571$). Nevertheless, three of the patients with non-infectious complications died with only one determination.

When comparing PCT values of patients with complications (infectious or non-infectious) versus patients who recovered uneventfully, the area under the ROC curve (complicated vs uncomplicated) was 0.726 (standard error 0.079, $p=0.004$) for PCT after surgery (PCT 0), 0.978 (SE 0.015, $p<0.0001$) for PCT in first postoperative day (PCT 1) and 0.927 (SE 0.066, $p<0.0001$) for PCT in second postoperative day (PCT 2). When comparing infectious complications versus all the other cases (non-infectious complications and uncomplicated) the area under the ROC curve for PCT 0 was 0.764 (SE 0.082, $p=0.019$), 0.983 (SE 0.011,

p<0.0001) for PCT 1 and 0.881 (SE 0.103, p=0.004) for PCT 2. Sensitivity, specificity,

positive and negative predictive values using several cut-off points are shown in table 2.

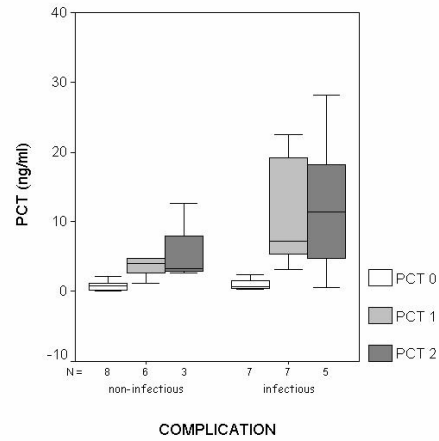
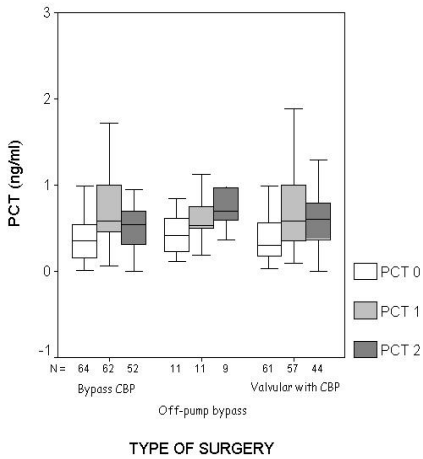


Figure 1. Procalcitonin levels in patients who recovered uneventfully after the different types of cardiac surgery: cardiopulmonary bypass (CPB) coronary artery bypass grafting, off-pump bypass grafting and valvular replacement requiring CPB. PCT values (ng/ml) after surgery (PCT 0), in the first postoperative day (PCT 1) and in the second postoperative day (PCT 2) are displayed as median (bold line), range and 5-95 percentiles.

Figure 2. Procalcitonin levels in patients who presented complications after cardiac surgery, distinguishing infectious and non-infectious. PCT values (ng/ml) after surgery (PCT 0), in the first postoperative day (PCT 1) and in the second postoperative day (PCT 2) are displayed as median (bold line), range and 5-95 percentiles.

Table 2. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of procalcitonin (PCT) in distinguishing complication (infectious and non-infectious) versus uneventful recovery after cardiac surgery and in distinguishing infectious complication versus others (non-infectious complication and no complication). PCT 0: PCT value after surgery; PCT 1: PCT value in first postoperative day; PCT 2: PCT value in second postoperative day.

	Cut-off (ng/ml)	Sensitivity (%)			Specificity (%)			Positive predictive value (%)			Negative predictive value (%)		
		PCT0	PCT1	PCT2	PCT0	PCT1	PCT2	PCT0	PCT1	PCT2	PCT0	PCT1	PCT2
Complication versus uneventful recovery	0.5	66.7	100	100	69.1	33.1	39	19.23	13	10.96	94.95	96.08	90.91
	1	33.3	100	87.5	96.3	76.2	85.7	50	29.56	31.82	92.91	98.10	93.75
	2	20	92.3	87.5	99.3	93.8	96	60	60	58.33	91.78	97.71	94.20
	3	0	84.6	75	100	97.7	90	-	73.33	85.71	90.07	97.06	93.71
Infectious complication versus others	0.5	71.4	100	100	67.4	68.4	38	9.61	7	6.85	97.98	100	97.40
	1	28.6	100	80	94.4	72.8	83.3	20	15.91	18.18	96.45	100	97.66
	2	28.6	100	80	98.6	90.4	93.5	40	35	33.33	96.58	100	97.83
	3	0	100	80	100	94.9	97.2	-	46.67	57.14	95.36	100	97.90

DISCUSSION

Cardiac surgery with CPB triggers an inflammatory response involving proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-8 (4) as well as activation of the complement system because of exposure of the blood to artificial surfaces (22). Endotoxin release from the ischemic gut is considered the main inducer of this inflammatory response (2). Increased levels of IL-6, IL-8 and the soluble TNF receptors, as more stable indicator of TNF- α release, have been reported (5, 23). Alterations in hemostasis may also initiate alterations in inflammation at the molecular level.

The objective of the study was to evaluate if cardiac surgery leads to an unspecific (not related to infection) elevation of PCT serum levels, which might interfere with the diagnosis of infection. The endotoxin release as well as the cascade of proinflammatory cytokines would be expected to affect PCT secretion. Experimental models have shown that PCT is released after endotoxin injection (18) and studies with isolated cells have shown induction of PCT mRNA by proinflammatory cytokines (15). Bacterial toxins are considered the most potent stimulator of PCT induction but there are data suggesting that not lipopolysaccharide (LPS) itself, but TNF- α as a proximal cytokine leads to the induction of PCT synthesis (24). Increased intracellular amounts of the PCT components have been found after stimulation with *S.aureus* as TNF- α inducer (16). It has been hypothesized that PCT has a modulatory effect on immunological functions during septic conditions: PCT and Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) have been shown to modulate the LPS-induced TNF- α production as well as CD11b upregulation in human blood cells (25, 26). On the other hand, PCT modulates the TNF- α and IL-6 induced formation of inducible nitric oxide synthase in a dose-dependent manner (27, 28). In this context, immunoneutralization of PCT has been shown to increase survival in animal models of sepsis (29, 30).

The results of our study show a slight increase in PCT values in the first post-operative day (PCT 1). These results are consistent with previous studies that have reported a moderate and transient peak in postoperative day one in adults with and without CPB followed by a rapid return to normal levels (7-9). On the other hand, Boeken et al did not find increase in PCT levels during operation neither post-operatively when patients uneventfully recovered, but samples were not collected in the first post-operative day (31). Studies in children also report a peak level 24 hours after surgery, although within reference

values (32, 33). We consider it is important to confirm previous data in order to assess the interpretation of raised PCT levels following surgery and to establish the optimal cut-off point. Many of the previous studies have been conducted in different types of thoracic surgery or in children. As it occurs with many inflammatory parameters, the results could be different in children than in adults.

Cardiac surgery initiates, therefore, a slight PCT secretion but significantly increased levels are not observed in the absence of post-operative complications. The small number of patients with complicated course/infection is an important limitation of the study, as well as the absence of a baseline PCT measurement before surgery. Nevertheless, the most important finding is the elevated negative predictive value of PCT, which did not yield elevated values in patients who recovered uneventfully. On the other hand, highly increased PCT values were found in the group of patients undergoing intestinal surgery, as a control of microbiologically documented sepsis in a not sterile type of surgery. PCT concentrations were markedly more elevated in abdominal infections compared to those of thoracic origin. Intestinal surgery has been reported to more often increase PCT, although it can be used for diagnostic means when the range of PCT concentrations during normal course is considered (21, 34). Similarly, previous studies have found association of increased postoperative PCT values with mortality, infections and other severe complications after cardiac surgery (7-9, 31, 35, 36). In our study, PCT could not significantly discriminate between infectious and non-infectious complications, as reported before (31), although it can be due to the small percentage of patients with infection. Furthermore, two of the patients with cardiogenic shock died before collecting the sample of the first postoperative day, which appears to be the most sensitive and specific, and also the measurement showing the more elevated negative predictive value as shown in table 2. For prediction of complication after surgery, 2 ng/ml at the first postoperative day (PCT 1) was the best cut-off value. For prediction of infectious complication 3 ng/ml was the best cut-off value.

Other investigators (8) also show that induction of PCT after cardiac surgery, exceeding 2 ng/ml, occurs more frequently in patients who are at high risk of developing various postoperative abnormalities. The usefulness of PCT in distinguishing infectious and non-infectious complications is more controversial. In the study of Aouifi et al (7), serum PCT concentration was significantly higher in patients with septic shock than in those with cardiogenic shock.

Brunckhorst et al (37) showed that cardiogenic shock causes pyrexia of unknown origin in patients surviving for 12 h and that it is associated with a rise in PCT levels. They consider these results to support the hypothesis that patients with cardiogenic shock develop inflammatory activation as a result of endotoxin translocation. Adamik et al (10) showed that the development of post-operative complications (especially when renal and hepatic dysfunction in addition to respiratory and circulatory insufficiency) after cardiac surgery with CPB was correlated with increased postoperative neopterin and PCT levels. Rothenburger et al (38) reported that PCT was useful in discriminating between acute phase response following cardiac surgery with CPB or local problems and systemic infections, and found the additional CRP measurement useful in increasing the specificity.

We can conclude that cardiac surgery slightly increases PCT levels in the first post-operative day, although within reference values. Highly increased levels are not found in absence of post-operative complications and not unspecifically because of surgery itself, duration of CPB or time of aortic clamping. PCT yields an elevated negative predictive value of complications after cardiac surgery.

REFERENCES

- Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS: Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:626-35, 1994.
- Rocke DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG: Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 93:832-7, 1987.
- Tennenberg SD, Clardy CW, Bailey WW, Solomkin JS: Complement activation and lung permeability during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 50:597-601, 1990.
- Wan S, LeClerc JL, Vincent JL: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 112:676-92, 1997.
- Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG: Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 61:1714-20, 1996.
- Smith B, Rinder H, Rinder C: Interaction of blood and artificial surfaces. In: *Thrombosis and Hemorrhage*, Third Edition ed. Ed by J Loscalzo and A Schafer, Lippincott Williams and Wilkins, 2002.
- Aoufi A, Piriou V, Bastien O, Blanc P, Bouvier H, Evans R, Celard M, Vandenesch F, Rousson R, Lehot JJ: Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infection in cardiac surgical patients. *Crit Care Med* 28:3171-6, 2000.
- Meisner M, Rauschmayer C, Schmidt J, Feyrer R, Cesnjevar R, Bredele D, Tschaikowsky K: Early increase of procalcitonin after cardiovascular surgery in patients with postoperative complications. *Intensive Care Med* 28:1094-102, 2002.
- Aoufi A, Piriou V, Blanc P, Bouvier H, Bastien O, Chiari P, Rousson R, Evans R, Lehot JJ: Effect of cardiopulmonary bypass on serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations. *Br J Anaesth* 83:602-7, 1999.
- Adamik B, Kubler-Kielb J, Golebiowska B, Gamian A, Kubler A: Effect of sepsis and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on plasma level of nitric oxide metabolites, neopterin, and procalcitonin: correlation with mortality and postoperative complications. *Intensive Care Med* 26:1259-67, 2000.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 341:515-8, 1993.
- Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J: Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 39:206-17, 2004.
- Karzai W, Oberhoffer M, Meier-Hellmann A, Reinhart K: Procalcitonin--a new indicator of the systemic response to severe infections. *Infection* 25:329-34, 1997.
- Reinhart K, Karzai W, Meisner M: Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 26:1193-200, 2000.
- Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonane E, Vogelsang H, Junker U, Jager L, Reinhart K: Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 134:49-55, 1999.
- Balog A, Ocsosvzki I, Mandi Y: Flow cytometric analysis of procalcitonin expression in human monocytes and granulocytes. *Immunol Lett* 84:199-203, 2002.
- Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C: Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1605-8, 1994.
- Becker KL, Nylén ES, White JC, Müller B, Snider RH, Jr.: Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1512-25, 2004.
- Brunckhorst FM, Heinz U, Forycki ZF: Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med* 24:888-9, 1998.
- Mimos O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K: Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic

- inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 24:185-8, 1998.
21. Meisner M, Tschaikowsky K, Hutzler A, Schick C, Schuttler J: Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med* 24:680-4, 1998.
 22. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86:845-57, 1983.
 23. Struber M, Cremer JT, Gohrbandt B, Hagl C, Jankowski M, Volker B, Ruckoldt H, Martin M, Haverich A: Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 68:1330-5, 1999.
 24. Whang KT, Vath SD, Becker KL, Snider RH, Nylen ES, Muller B, Li Q, Tamarkin L, White JC: Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock* 14:73-8, 2000.
 25. Monneret G, Arpin M, Venet F, Maghni K, Debard AL, Pachot A, Lepape A, Bienvenu J: Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils. *Intensive Care Med* 29:923-8, 2003.
 26. Monneret G, Pachot A, Laroche B, Picollet J, Bienvenu J: Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnf production by human circulating blood cells. *Cytokine* 12:762-4, 2000.
 27. Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, Schobersberger W: Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit Care Med* 30:2091-5, 2002.
 28. Hoffmann G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann FJ, Schobersberger W: In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med* 29:112-6, 2001.
 29. Becker KL, Nylen ES, Snider RH, Muller B, White JC: Immunoneutralization of procalcitonin as therapy of sepsis. *J Endotoxin Res* 9:367-74, 2003.
 30. Wagner KE, Martinez JM, Vath SD, Snider RH, Nylen ES, Becker KL, Muller B, White JC: Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med* 30:2313-21, 2002.
 31. Boeken U, Feindt P, Micek M, Petzold T, Schulte HD, Gams E: Procalcitonin (PCT) in cardiac surgery: diagnostic value in systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis and after heart transplantation (HTX). *Cardiovasc Surg* 8:550-4, 2000.
 32. Arkader R, Troster EJ, Abellan DM, Lopes MR, Junior RR, Carcillo JA, Okay TS: Procalcitonin and C-reactive protein kinetics in postoperative pediatric cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 18:160-5, 2004.
 33. Beghetti M, Rimensberger PC, Kalangos A, Habre W, Gervaix A: Kinetics of procalcitonin, interleukin 6 and C-reactive protein after cardiopulmonary-bypass in children. *Cardiol Young* 13:161-7, 2003.
 34. Reith HB, Mittelkotter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A: Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg* 15:260-5, 1998.
 35. Dorge H, Schondube FA, Dorge P, Seipelt R, Voss M, Messmer BJ: Procalcitonin is a valuable prognostic marker in cardiac surgery but not specific for infection. *Thorac Cardiovasc Surg* 51:322-6, 2003.
 36. Baykut D, Schulte-Herbruggen J, Krian A: The value of procalcitonin as an infection marker in cardiac surgery. *Eur J Med Res* 5:530-6, 2000.
 37. Brunkhorst FM, Clark AL, Forycki ZF, Anker SD: Pyrexia, procalcitonin, immune activation and survival in cardiogenic shock: the potential importance of bacterial translocation. *Int J Cardiol* 72:3-10, 1999.
 38. Rothenburger M, Markewitz A, Lenz T, Kaulbach HG, Marohl K, Kuhlmann WD, Weinhold C: Detection of acute phase response and infection. The role of procalcitonin and C-reactive protein. *Clin Chem Lab Med* 37:275-9, 1999.

Evaluation of procalcitonin, neopterin, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia.

Cristina Prat¹, Juan Manuel Sancho², Josep Domínguez¹, Blanca Xicoy², Montse Giménez¹, Christelle Ferrà², Silvia Blanco¹, Josep Maria Ribera² and Vicenç Ausina¹

¹Servei de Microbiologia, ²Servei d'Hematologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

ABSTRACT

Background: Infectious complications in neutropenic patients are a major cause of morbidity and mortality. Clinical signs of infection in these patients are unspecific, and fever can be attributed not only to infection but also to the underlying disorder or to the administration of drugs or blood products, as well as to acute graft versus host disease in those patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Procalcitonin (PCT) has emerged as a potentially useful marker of bacterial and fungal infection in neutropenic patients.

Objectives: 1. To establish the baseline PCT values in patients with hematological malignancy at the time of diagnosis and in neutropenic individuals without fever. 2. To evaluate the usefulness of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 measurement in patients with neutropenic fever as a diagnostic criterium of bacterial or systemic fungal infection.

Design: Transversal study to establish PCT values in patients with hematological malignancy at diagnosis, at the beginning of neutropenia and serially until 6 days after presenting neutropenic fever.

Patients: Patients with neutropenic episodes due to cytotoxic treatment for hematological malignancy or after HSCT.

Results: PCT levels were not elevated at diagnosis or at the beginning of neutropenia. PCT levels were significantly higher in patients with Gram-negative bacteremia at 24-48 hours after the onset of fever. Patients with probable fungal infection presented elevated PCT values when fever persisted for more than 4-5 days. Neither neopterin, IL-6, nor IL-8 presented significant differences according to the etiology of fever.

Conclusions: PCT measurement may be useful in the diagnosis of neutropenic fever of infectious origin in neutropenic patients.

INTRODUCTION

Morbidity and mortality due to infectious complications following aggressive chemotherapy are a major clinical problem. Neutropenia results in extreme vulnerability of the host to infection. Nevertheless, in neutropenic patients fever can be attributed not only to infection but also to the underlying disorder or to the administration of drugs or blood products, as well as to acute graft versus host disease (GVHD) in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Since the diagnosis of infections during neutropenia is difficult, the administration of broad-spectrum antibiotics is generally indicated¹, although this may increase resistance. A novel approach to estimate the presence of infection is the use of biomarkers together with clinical and microbiological

methods, in order to exclude or indicate the presence of infection in patients with neutropenic fever. These biomarkers should, ideally, precede significant microbiologic findings or justify additional intensive search for a focus of infection even in patients without pyrexia². Early prediction of severe bacteremia would help to target patients who are most likely to benefit from combination therapy and to reduce the unnecessary toxicity of additional treatments when they are not required.

Inflammatory response is a dynamic phenomenon involving multiple cellular activation processes and reflects a highly complex process that is dependent on a series of interactions between a pathogen and the host. The major proinflammatory cytokines are IL-1, IL-6 and TNF- α ³, but multiple mediators play a role in orchestrated inflammatory

response⁴. Some well-established laboratory tests have been widely used for the diagnosis and follow-up of infection in neutropenic patients. Serum concentrations of several acute-phase proteins (C-reactive protein –CRP-, serum amyloid A), proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-6, IL-8), soluble adhesion molecules (soluble E-selectin, vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1) and more recently procalcitonin (PCT) have been investigated to determine whether they contribute to identify infections as the cause of neutropenic fever². C reactive protein values do not differentiate those patients with microbiologically documented infections from those with unexplained fever⁵ and even underlying and acute graft versus host disease⁶. Some studies have shown IL-6 as a more sensitive marker for acute infection in neutropenic fever and may be used as a predictive factor for poor outcome in these patients⁷. Moreover, IL-8 has been recommended for the prediction of early medical complications⁸.

The aim of the present study was, first, to establish baseline PCT values in patients with hematological malignancy at the time of diagnosis and in neutropenic individuals without fever, since early studies showed leukocytes as the site of production of PCT, although with controversial results^{9, 10}, and this could affect these values in patients with hematological malignancy at diagnosis or during neutropenia. The second objective was to study the usefulness of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 measurement as a diagnostic tool of fever of infectious origin in febrile neutropenic patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients with an underlying hematologic malignancy at the time of diagnosis and who received antineoplastic chemotherapy and had developed neutropenia (neutrophils $<500/\text{mm}^3$) and fever (temperature $\geq 38^\circ\text{C}$) were included in the study. A complete clinical evaluation was performed, recording the clinical signs of sepsis and biochemical and radiographic tests. Samples were obtained for microbiological diagnosis during the febrile episode including investigations of bacterial, fungal and viral etiology of the infection. The World Health Organization score was used to diagnose chemotherapy-induced mucositis. Infection was defined on basis of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) definitions of nosocomial infections. Catheter-related

bacteremia was defined as isolation of a microorganism preceded by 2 hours the isolation in the peripheral blood culture and/or the same microorganism isolated from the culture of a catheter tip. Pneumonia was defined as the presence of recently acquired respiratory signs or symptoms and infiltrate on chest radiography. Urinary tract infection was defined as the presence of fever, urgency or dysuria and pyuria or a positive dipstick for leukocyte esterase and/or nitrate and positive urine culture ($\geq 10^5$ CFU/ml with no more than two species of $\leq 10^5$ in a patient treated with an effective antimicrobial agent for a urinary tract infection). On the basis of clinical and microbiological findings, patients were grouped in the following categories: 1. Microbiologically documented infection; 2. Fever without microbiological documentation of infection.

Serum samples were obtained before chemotherapy, the first day of neutropenia, and at 24-hour intervals after presenting fever until completing 6 days. Samples were frozen at -20°C and PCT, IL-6 and IL-8 were measured retrospectively. PCT was measured by immunoluminometric assay (Lumitest PCT, Brahms Diagnostica, Hennigsdorf, Germany) following the manufacturer's instructions. IL-6 and IL-8 were measured by enzyme immunoassay (Endogen Human IL-6 and IL-8 ELISA kit, Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)

Statistical analysis: Comparison between groups was performed using the non parametric Mann Whitney U test. Data are expressed as median, range and 5-95 percentiles. Graphical representation is based on nonparametric box plots. Associations were considered statistically significant with a p value <0.05 . The commercial statistical software package used was SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)

RESULTS

A total of 322 serum samples from 61 patients were studied. Forty-one patients had received an HSCT, 13 received induction chemotherapy and five received consolidation therapy. There were two patients from who samples were obtained only at the moment of diagnosis. The patients' characteristics are shown in table 1. The basal levels of PCT in patients with underlying hematologic malignancy at diagnosis, as well as at the beginning of neutropenia are shown in table 2.

Table 1. Patients' characteristics

Age	Mean	47.15	14.31(SD)
Sex	Male	31	50.8%
	Female	30	49.2%
Disease	AML	21	34.4 %
	ALL	5	8.2
	CML	2	3.3
	CLL	3	4.9
	Hodgkin's disease	5	8.2
	Non-Hodgkin's lymphoma	4	6.6
	Multiple myeloma	15	24.6
	MDS	4	6.6
	Histiocytosis	1	1.6
Breast neoplasia		1	1.6
	Stem Cell Transplantation	41	69.5 %
Treatment	Induction	13	22
	Consolidation	5	8.5
	G-CSF administration	yes	28
	no	33	54.1
Trasplantation	Autologous	31	75.6 %
	Allogeneic	10	24.4

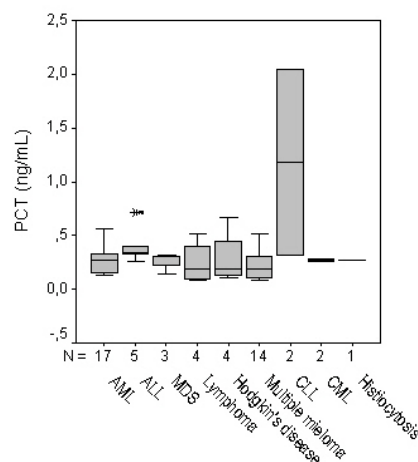
AML: Acute Myeloblastic Leukemia; ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia; CML: Chronic Myeloblastic Leukemia; CLL: Chronic Lymphoblastic Leukemia; MDS: Myelodysplastic Syndrome.

Table 2. Procalcitonin and neopterin levels (ng/mL) at the time of diagnosis and at the beginning of neutropenia.

	Diagnosis			Beginning of neutropenia		
	N	Mean (SD)	Median (5-95 percentiles)	N	Mean (SD)	Median (5-95 percentiles)
PCT (ng/ml)	52	0.311 (0.284)	0.274 (0.092-0.683)	48	0.432 (0.853)	0.270 (0.080-1.584)
Neopterin (ng/ml)	34	12.73 (13.97)	9.05 (0.008-50.28)	30	29.39 (81.49)	8.885 (0.005-252.77)

PCT values when grouping the patients according to the underlying disease are shown in figure 1. The reduced number of cases in each disease did not allow definite conclusion to be drawn.

A total of 57 febrile neutropenic fever episodes were studied to measure PCT, IL-6 and IL-8 at diagnosis of fever of infectious origin. At the beginning of fever, there were not significant differences in the levels of biomarkers between patients treated (n=28) and not treated (n=33) with G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor): p=0.273 for PCT, p=0.869 for neopterin, p=0.582 for IL-6 and p=0.326 for IL-8.

**Figure 1.** Basal levels of PCT at the moment of diagnosis according to underlying disease.

Twenty-six patients presented microbiologically documented infection, and 31 presented fever without microbiologically documented infection. There were not significant differences in PCT ($p=0.968$), neopterin ($p=0.876$), IL-6 ($p=0.169$) or IL-8 ($p=0.150$) between the two groups.

Group 1. Microbiologically documented infection. Twenty-six patients were included in this group. The sources of infection are summarized in table 3. Blood cultures were positive in 19 cases (systemic bacterial infection). The microorganisms isolated were *Escherichia coli* (4), *Klebsiella pneumoniae*, *Fusobacterium mortiferum*, *Lactobacillus sp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (3), other coagulase negative staphylococci (4), *Streptococcus mitis* (2) and *Streptococcus salivarius*. Localized infection was diagnosed in 7 cases: urinary tract infection (3 *E.coli*, 1

K.pneumoniae), catheter-related infection (1 *C.jejkeium*, 1 *S.aureus*) and pneumonia (*Legionella pneumophila*). There were no significant differences in PCT ($p=0.707$), neopterin ($p=0.250$), IL-6 ($p=0.760$) or IL-8 ($p=0.460$) values between systemic and localized bacterial infection. Figure 2 shows median, range and 5, 95 percentiles of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 at the beginning of neutropenic fever according to the clinical source of infection.

Table 3. Sources of infection in the group of microbiologically documented infection.

Primary bacteremia	12	46.2%
Catheter-related bacteremia	7	26.9%
Respiratory tract infection	1	3.8%
Urinary tract infection	6	23.1%

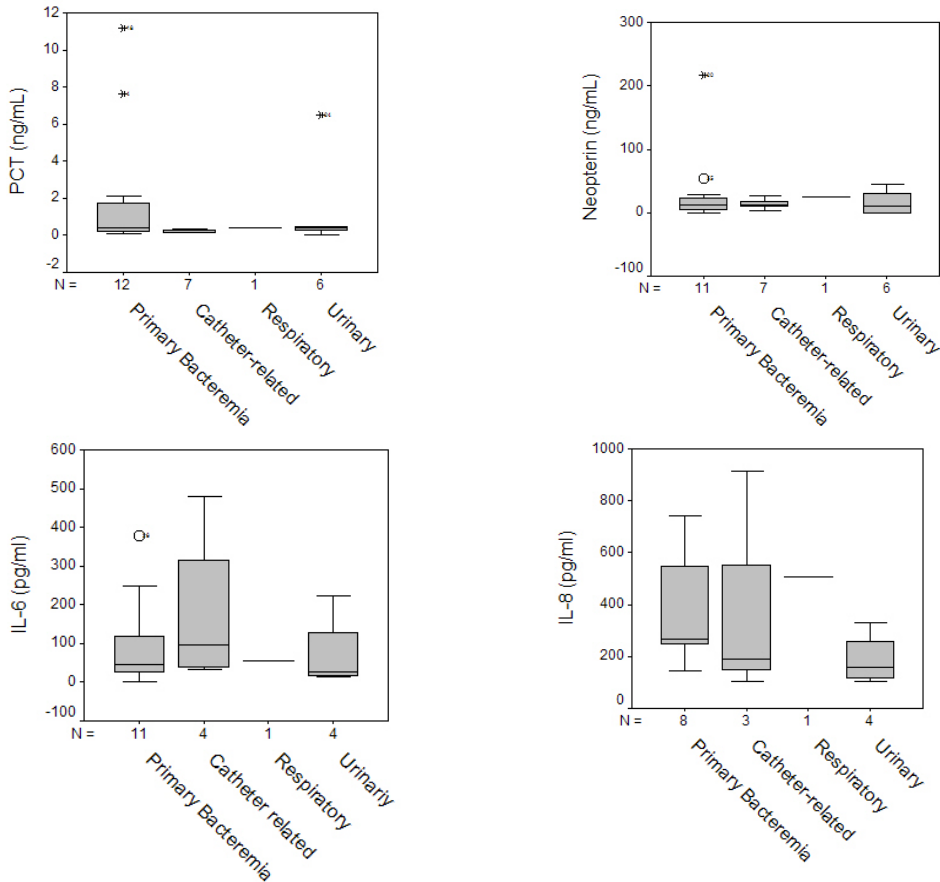


Figure 2. Median, range and 5, 95 percentiles of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 at the beginning of neutropenic fever according to the clinical source of infection.

Table 4 shows the values of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 in Gram-positive and Gram-negative bacterial infections, grouping systemic and localised infections. PCT levels in Gram-negative bacterial infections were significantly higher than in Gram-positive infections ($p=0.016$). There were no significant differences for neopterin ($p=0.824$), IL-6 ($p=0.521$) or IL-8 ($p=0.574$). When analyzing only systemic bacterial infections, PCT levels were also significantly higher for Gram-negative ($p=0.007$).

No differences were found for neopterin ($p=0.143$), IL-6 ($p=0.412$) or IL-8 ($p=0.412$). Results are shown in table 5 and figure 3. Serial measurements in Gram-negative bacteremia showed elevation of PCT levels within the first 24-48 h (PCT3 and PCT4) (figure 4). The sensitivity of PCT to identify Gram-negative bacteremia was 80% and the specificity 95%. The positive and negative predictive values were 70% and 97.9%, respectively.

	Gram-positive			Gram-negative		
	N	Mean (SD)	Median	N	Mean (SD)	Median
PCT	15	0.73 (1.90)	0.26	10	2.31 (3.66)	0.43
Neopterin	15	16.07(13.30)	12.86	10	34.82 (65.75)	12.75
IL-6	12	90.91 (132.83)	42.35	8	131.47 (135.17)	66.07
IL-8	8	298.04 (255.51)	249.39	8	386.59 (238.09)	392.45

Table 4. PCT (ng/mL), neopterin (ng/mL), IL-6 (pg/ml) and IL-8 (pg/ml) values (mean, standard deviation and median) in Gram-positive and Gram-negative bacterial infections when grouping systemic and localised bacterial infection.

	Gram-positive			Gram-negative		
	N	Mean (SD)	Median	N	Mean (SD)	Median
PCT	13	0.80 (2.04)	0.26	5	3.10 (4.58)	1.36
Neopterin	13	16.27 (13.56)	12.86	5	45.65 (95.99)	0.26
IL-6	11	95.25 (138.42)	41.52	4	181.45 (163.07)	163.32
IL-8	7	313.40 (271.97)	259.78	4	492.46 (266.85)	547.84

Table 5. PCT (ng/mL), neopterin (ng/mL), IL-6 (pg/ml) and IL-8 (pg/ml) values (mean, standard deviation and median) in Gram-positive and Gram-negative bacteremia.

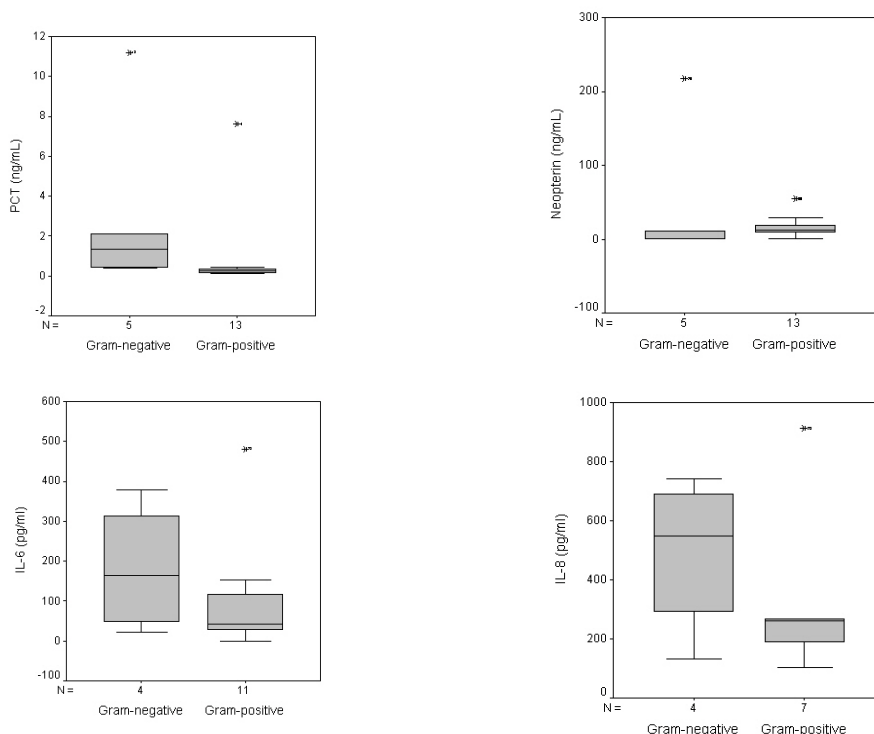


Figure 3. Median, range and 5, 95 percentiles of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 at the beginning of neutropenic fever in patients with Gram-negative and Gram-positive bacteremia.

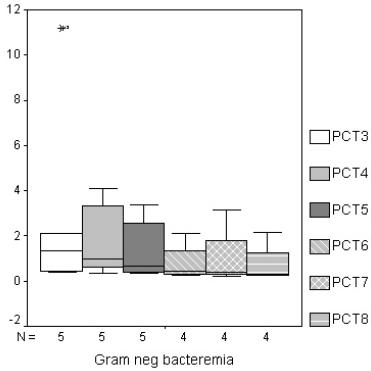


Figure 4. Serial PCT measurements (ng/ml) in patients with Gram-negative bacteremia.

Group 2. Fever without microbiological documentation of infection. A total of 31 patients were included in this group. According to the most likely source of infection, patients were grouped as probable fungal infection (4 patients, 12.9%), mucositis (18 patients, 58.1%) and fever of unknown origin (9 patients, 29%). PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 values are shown in figure 5.

There were no significant differences in the values of PCT ($p=0.414$), neopterin ($p=0.833$), IL-6 ($p=0.905$) or IL-8 ($p=0.286$) at the beginning of fever according to the source of infection. Nevertheless, serial measurements showed elevation of PCT values when the probable etiology was fungal on days 4 and 5 since the beginning of fever (PCT6 and PCT7) (figure 6). The reduced number of cases does not allow significant conclusions to be drawn.

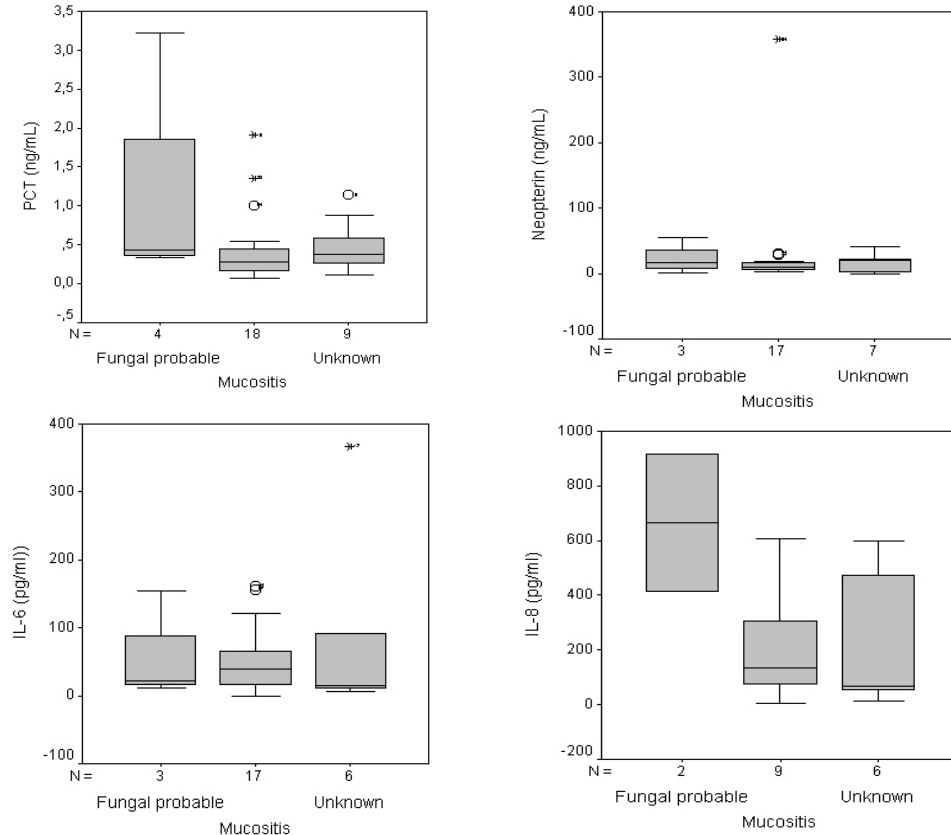


Figure 5. Median, range and 5, 95 percentiles of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 at the beginning of neutropenic fever in patients with fever without microbiological documentation.

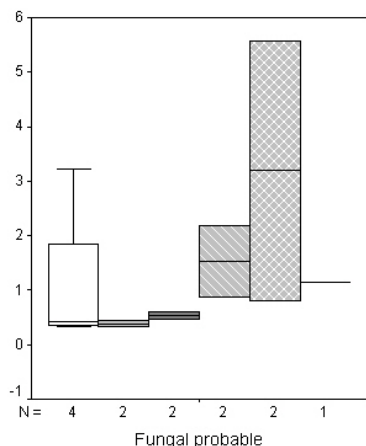


Figure 6. Serial PCT measurements (ng/ml) in patients with probable fungal infection.

DISCUSSION

The first objective of the study was to establish the baseline levels of PCT in patients with malignant hematologic diseases before chemotherapy. Initial studies showed leukocytes as the site of production of PCT, although with controversial results^{9,10}, and this could affect its values in patients with haematological malignancy at the moment of diagnosis, or during neutropenia. Our results show not significant increase of PCT. The current hypothesis is that PCT is produced in multiple organ tissues during infection¹¹.

The second objective was to evaluate the usefulness of PCT, neopterin, IL-6 and IL-8 measurement in patients with neutropenic fever as a diagnostic criterium of bacterial or fungal systemic infection. Although the number of patients is too low to draw definite conclusions, the main finding is that PCT levels are significantly more elevated in cases of gram-negative bacteremia within the first 24-48 hours after the onset of fever, compared to those with gram-positive bacteremia or to those with fever of unknown origin.

The results we present are, in general, in accordance with those of other authors. Serum concentrations of several inflammatory markers have been investigated to determine whether these markers may contribute to identify infections as the cause of neutropenic fever². Engel et al reported that the discriminatory power of PCT was better than that of IL-8 for predicting bacteraemia vs. non-bacteremic infection while IL-8 was better than PCT in the prediction of Gram-negative bacteremia¹². Both IL-6 and IL-8 were more useful than CRP¹³. In a study of Fleischhack et al¹⁴ PCT, CRP, IL-6, IL-

8, the soluble IL-2 receptor and the soluble tumor necrosis factor receptor II serum levels were measured in pediatric cancer patients. The highest levels of all these parameters were observed in Gram-negative bacteremia. However, in localized infections and in fever of unknown origin, low or slightly elevated levels were documented. In this study, PCT was also the most sensitive and specific parameter in diagnosis of Gram-negative bacteremia. Similarly, Giamarellos et al¹⁵ reported that patients with clinically documented as well microbiologically proven infection showed elevated PCT values, concluding that patients with fever of unknown origin and elevated PCT values probably had an underlying bacterial infection. Ruokonen et al found that PCT is a specific but not a sensitive marker of infection in patients with neutropenic fever¹⁶. Its poor sensitivity was related to an absent or delayed response in patients with Gram-positive infections. We also observed low PCT levels in the patients with Gram-positive bacteremia. This could be attributed to the fact that, among Gram-positive bacteria, those isolated in this study are less pyogenic than others. For example, in previous studies we have observed highly elevated PCT levels in patients with pneumococcal bacteremia^{17, 18}. Nevertheless, the host inflammatory responses to different pathogens share some common elements but also exhibit distinct patterns of inflammatory response. We have previously reported that the microorganism causing bacteremia has an effect on the PCT concentration¹⁸.

In our study, it was of note that neopterin, IL-6 and IL-8 were not useful to predict bacteremia. Differences were observed between Gram-negative and Gram-positive bacteremia, although they were not significant. To our knowledge, only one study has evaluated the usefulness of neopterin to predict bacterial infection in patients with neutropenic fever with significant differences between infected and non infected patients¹⁶. Furthermore, as an interferon-gamma mediated pathway, an elevation in neopterin has been reported during treatment with colony-stimulating factors such as G-CSF¹⁹. This effect was not observed in our population. Neopterin has been more often used as a marker of interferon activity following its therapeutic infusion^{20, 21}. On the other hand, several studies have reported IL-6 and IL-8 as useful parameters²² to define a low-risk group of febrile patients as well as higher levels in bacteremia due to Gram-negative organisms or fungal infections than in fever of unknown origin and bacteremia due to Gram-positive organisms²³⁻²⁶. In general, cytokine measurement has some disadvantages because

of the short plasma half-life and presence of blocking factors. Probably the combination of biomarkers would lead to a better sensitivity and specificity to predict bacterial infection.

It is important to find parameters that help in the prognostic assessment and in treatment decisions in neutropenic patients. The prediction of Gram-negative bacteremia is a valuable tool to identify patients who need more aggressive therapy and avoid unnecessary administration in low-risk patients for whom empirical monotherapy is appropriate. In general, some markers primarily indicate severity of inflammation, as IL-6, and others increase during infection but do not indicate the host response, as endotoxin or lipoprotein binding protein²⁷. PCT is a specific marker of infection but is also useful in monitoring the host response to the infection. In our study, serial measurements were useful for monitorization. It has been reported that daily low plasma concentrations of PCT or IL-6 during the first 8 days of fever were found to be a good predictor of lack of subsequent complications in neutropenic patients and therefore could be a helpful tool for limiting anti-microbial therapy.²⁸

Decisions should be also based on the prognostic probability for an adverse outcome. In a recent study, PCT has shown to be a useful marker to predict clinical outcome in febrile neutropenia²⁹.

Regarding the prediction of fungal infections, our results show a trend to PCT elevation during the fourth and the fifth day of fever in patients with probable fungal infection. There were not significant differences in neopterin, IL-6 or in IL-8 levels according to the source and the etiology of infection. However, the value of this finding is very limited because of the reduced number of cases.

Conflicting results are shown in the literature: while some studies report correlation of high PCT levels in patients with possible or proven invasive aspergillosis³⁰, others report the use of a low PCT level combined with the presence of mannan antigens as a good predictor of fungal infection³¹. One study that analyses recent literature, concludes that in the early phase of invasive fungal infection, PCT was elevated in fewer than half of invasive candidiasis episodes and in only one patient with invasive aspergillosis³². Apparently, due to low sensitivity and specificity, PCT adds little to the diagnosis of invasive fungal infections.

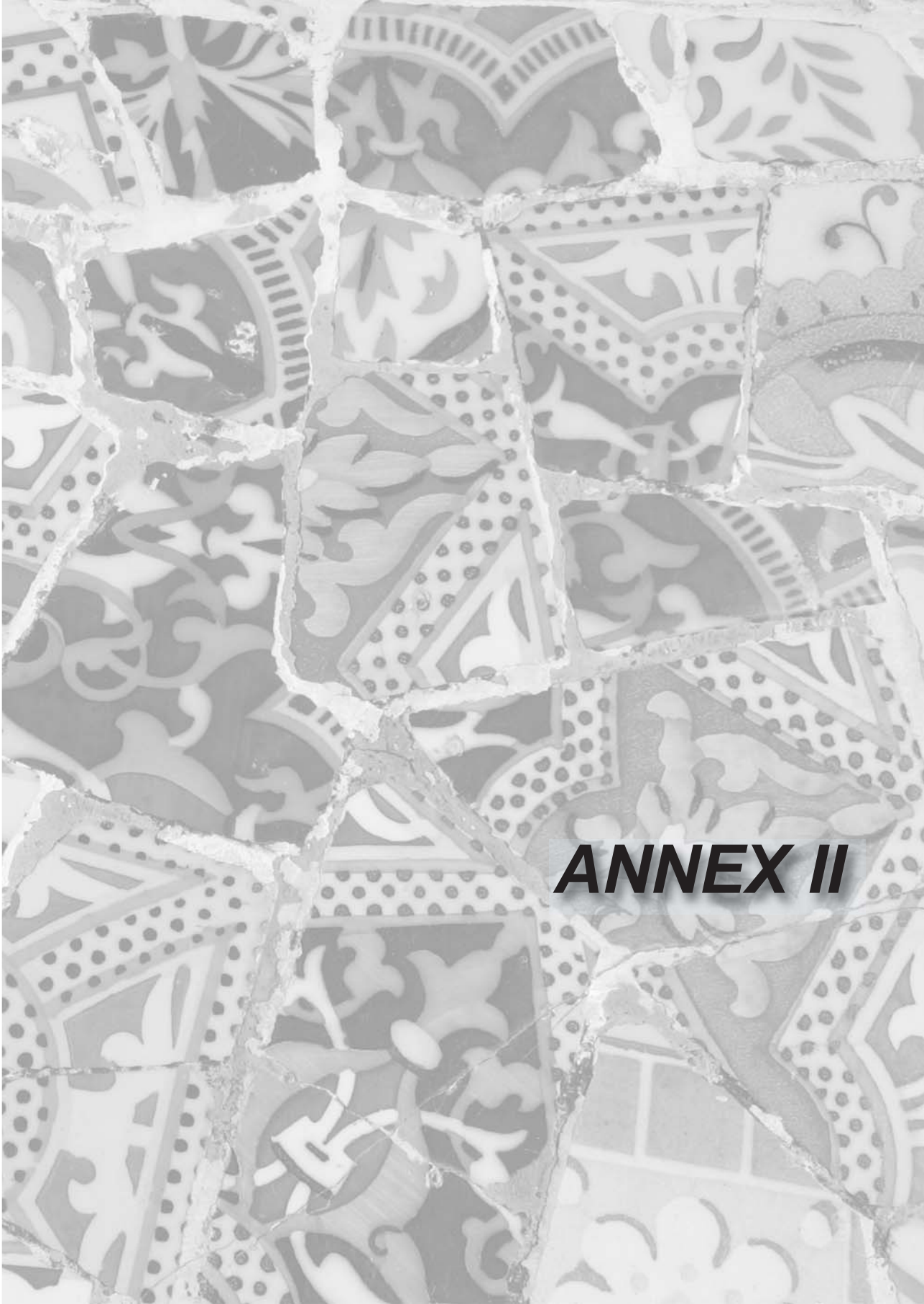
Although larger studies and metanalysis are needed, we can conclude that the use of biomarkers and specially PCT measurement can be a useful tool for the prediction of Gram-

negative bacteremia and the monitorization of febrile episodes in neutropenic patients. Clinical prediction rules that attempt to predict a low risk of severe infection might be improved by including measurement of inflammatory biomarkers³³.

REFERENCES

1. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002;34(6):730-51.
2. Sudhoff T, Giagounidis A, Karthaus M. Serum and plasma parameters in clinical evaluation of neutropenic fever. *Antibiot Chemother* 2000;50:10-9.
3. Bone RC, Grodzins CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997;112(1):235-43.
4. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340(6):448-54.
5. Yonemori K, Kanda Y, Yamamoto R, et al. Clinical value of serial measurement of serum C-reactive protein level in neutropenic patients. *Leuk Lymphoma* 2001;41(5-6):607-14.
6. Arber C, Passweg JR, Fluckiger U, et al. C-reactive protein and fever in neutropenic patients. *Scand J Infect Dis* 2000;32(5):515-20.
7. Erten N, Genc S, Besisik SK, Saka B, Karan MA, Tascioglu C. The predictive and diagnostic values of procalcitonin and C-reactive protein for clinical outcome in febrile neutropenic patients. *J Chin Med Assoc* 2004;67(5):217-21.
8. Engel A, Knoll S, Kern P, Kern WV. Interleukin-8 serum levels at fever onset in patients with neutropenia predict early medical complications. *Infection* 2005;33(5-6):380-2.
9. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* 1999;134(1):49-55.
10. Monneret G, Laroche B, Bienvenu J. Procalcitonin is not produced by circulating blood cells. *Infection* 1999;27(1):34-5.
11. Muller B, White JC, Nysten ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-receptor gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):396-404.
12. Engel A, Steinbach G, Kern P, Kern WV. Diagnostic value of procalcitonin serum levels in neutropenic patients with fever: comparison with interleukin-8. *Scand J Infect Dis* 1999;31(2):185-9.
13. Kilger E, Pichler B, Goetz AE, et al. Procalcitonin as a marker of systemic inflammation after conventional or minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998;46(3):130-3.
14. Fleischhack G, Kambeck I, Cipic D, Hasan C, Bode U. Procalcitonin in paediatric cancer patients: its diagnostic relevance is superior to that of C-reactive protein, interleukin 6,

- interleukin 8, soluble interleukin 2 receptor and soluble tumour necrosis factor receptor II. *Br J Haematol* 2000;111(4):1093-102.
15. Giamarellou H, Giamarellos-Bourboulis EJ, Repoussis P, et al. Potential use of procalcitonin as a diagnostic criterion in febrile neutropenia: experience from a multicentre study. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(7):628-33.
 16. Ruokonen E, Nousiainen T, Pulkki K, Takala J. Procalcitonin concentrations in patients with neutropenic fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(4):283-5.
 17. Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(11):963-8.
 18. Prat C, Dominguez J, Andreo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006;52(3):169-77.
 19. Marth C, Weiss G, Koza A, et al. Increased production of immune activation marker neopterin by colony-stimulating factors in gynecological cancer patients. *Int J Cancer* 1994;58(1):20-3.
 20. Talpaz M, Rakhit A, Rittweger K, et al. Phase I evaluation of a 40-kDa branched-chain long-acting pegylated IFN-alpha-2a with and without cytarabine in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6247-55.
 21. Chiang J, Gloff CA, Yoshizawa CN, Williams GJ. Pharmacokinetics of recombinant human interferon-beta ser in healthy volunteers and its effect on serum neopterin. *Pharm Res* 1993;10(4):567-72.
 22. de Bont ES, Vellenga E, Swaanenburg J, Kamps W. Procalcitonin: a diagnostic marker of bacterial infection in neutropenic cancer patients with fever? *Infection* 2000;28(6):398-400.
 23. Abrahamsson J, Pahlman M, Mellander L. Interleukin 6, but not tumour necrosis factor-alpha, is a good predictor of severe infection in febrile neutropenic and non-neutropenic children with malignancy. *Acta Paediatr* 1997;86(10):1059-64.
 24. Lehrnbecher T, Venzon D, de Haas M, Chanock SJ, Kuhl J. Assessment of measuring circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III, and mannose-binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis* 1999;29(2):414-9.
 25. Engervall P, Andersson B, Bjorkholm M. Clinical significance of serum cytokine patterns during start of fever in patients with neutropenia. *Br J Haematol* 1995;91(4):838-45.
 26. Sabat R, Hoflich C, Docke WD, et al. Massive elevation of procalcitonin plasma levels in the absence of infection in kidney transplant patients treated with pan-T-cell antibodies. *Intensive Care Med* 2001;27(6):987-91.
 27. Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care* 2005;11(5):473-80.
 28. Persson L, Soderquist B, Engervall P, Vikersors T, Hansson LO, Tidfeldt U. Assessment of systemic inflammation markers to differentiate a stable from a deteriorating clinical course in patients with febrile neutropenia. *Eur J Haematol* 2005;74(4):297-303.
 29. von Lilienfeld-Toal M, Schneider A, Orlopp K, Hahn-Ast C, Glasmacher A, Stuber F. Change of procalcitonin predicts clinical outcome of febrile episodes in patients with hematological malignancies. *Support Care Cancer* 2006.
 30. Ortega M, Rovira M, Filella X, et al. Prospective evaluation of procalcitonin in adults with febrile neutropenia after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004;126(3):372-6.
 31. Christofilopoulou S, Charvalos E, Petrikos G. Could procalcitonin be a predictive biological marker in systemic fungal infections?. Study of 14 cases. *Eur J Intern Med* 2002;13(8):493-5.
 32. Dornbusch HJ, Strenger V, Kerbl R, et al. Procalcitonin and C-reactive protein do not discriminate between febrile reaction to anti-T-lymphocyte antibodies and Gram-negative sepsis. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(9):941-5.
 33. Kern WV. Risk assessment and treatment of low-risk patients with febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2006;42(4):533-40.



ANNEX II

A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like1 (FPRL1)

Cristina Prat,^{*,†} Jovanka Bestebroer,^{*} Carla J.C. de Haas,^{*} Jos A.G. van Strijp,^{*} and Kok P.M. van Kessel^{*}

^{*}Eijkman-Winkler Institute, University Medical Center Utrecht (UMCU), G04.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht, The Netherlands. [†]Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

ABSTRACT. Bacteria have developed mechanisms to escape the first line of host defense, which is constituted by the recruitment of phagocytes to the sites of bacterial invasion. We previously described Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* (CHIPS), a protein that blocks the activation of neutrophils via the formyl peptide receptor (FPR) and C5a receptor (C5aR). We now describe a new protein from *S. aureus* that impaired the neutrophil responses to formyl peptide receptor-like1 (FPRL1) agonists. FPRL1 inhibitory protein (FLIPr) inhibited the calcium mobilization in neutrophils stimulated with MMK-1, WKYMVM, prion-protein fragment PrP₁₀₆₋₁₂₆ and amyloid beta₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂). Stimulation with low concentrations of fMLP was partly inhibited. Directed migration was also completely prevented towards MMK-1 and partly towards fMLP. Fluorescence-labeled FLIPr efficiently bound to neutrophils, monocytes, B-cells and NK-cells. HEK293 cells transfected with human C5aR, FPR, FPRL1 and FPRL2 clearly showed that FLIPr directly bound to FPRL1 and, at higher concentrations, also to FPR but not to C5aR and FPRL2.

FLIPr can reveal unknown inflammatory ligands crucial during *Staphylococcus aureus* infections. As a novel described FPRL1 antagonist, it might lead to the development of therapeutic agents in FPRL1-mediated inflammatory components of diseases such as systemic amyloidosis, Alzheimer and prion disease.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus remains a normal commensal of the human skin and can potentially cause life threatening infections involving any organ system (1). The ability of *S.aureus* to cause such a wide range of infections is the result of its extensive arsenal of virulence factors. Both bacterial surface components and secreted extra cellular proteins have been described to contribute to the pathogenesis of infection. In addition, *S.aureus* uses efficient strategies to evade recognition by the innate immune system (1,2).

Mobilization of phagocytes in response to chemo-attractants constitutes the first line of defense against *S.aureus* infection. Chemo-attractants are grouped in the super family of chemokines and the “classical” chemo-attractants, which include the formylated peptides (side products of bacterial translation), activated complement component 5 (C5a) and C3 (C3a), leukotriene B4 (LTB4), and platelet-activating factor (PAF). Both classical chemo-attractants and chemokines activate seven-transmembrane G protein-coupled receptors (GPCRs) expressed on cells of hematopoietic origin but also on many other cell types (3,4).

We recently described Chemotaxis Inhibitory protein of *S.aureus* (CHIPS) (5), an excreted protein that impairs the response of neutrophils and monocytes to C5a and formylated peptides such as N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). CHIPS binds directly to the C5a receptor (C5aR) and formyl peptide receptor (FPR) preventing the natural ligands from activating these receptors (6).

FPR is the high affinity receptor for fMLP that is activated by picomolar to nanomolar concentrations of fMLP and is expressed on phagocytes but also on cell types as diverse as hepatocytes, dendritic cells, astrocytes, and microglia cells (7-9). Two other homologues of the FPR have been identified, formyl peptide receptor-like1 (FPRL1), and formyl peptide receptor-like2 (FPRL2). Human phagocytes are known to differentially express these receptors. Neutrophils express the formyl-peptide receptors FPR and FPRL1, whereas monocytes and basophils express all three members FPR, FPRL1 and FPRL2 (10-13). Mature dendritic cells express FPRL2, low levels of FPR but no FPRL1 (12). FPRL1 is considered a low-affinity fMLP receptor and is expressed in an even greater variety of cell types. In the last years, a wide variety of agonists for this receptor has been identified, including components from microorganisms and host-derived peptide and lipid agonists (11,14). It is remarkable that the FPRL1 is used by at least three amyloidogenic ligands, serum amyloid A (SAA) (15), the 42 amino acid form of β amyloid ($A\beta_{1-42}$) (16) and the prion protein fragment PrP₁₀₆₋₁₂₆ (17). These ligands have been shown to attract phagocytes with important implications in pathological states such as systemic amyloidosis, Alzheimer's disease (18) and prion disease, respectively. Several small synthetic peptides such as MMK-1 (19), WKYMVm (20) and WKYMVM (10,21) were selected from random peptide libraries and have been identified as

agonists for the formyl peptide receptors and are widely used for research purposes. Recently F2L, an acetylated peptide derived from the human heme-binding protein, was identified as a new natural chemo-attractant agonist specific for FPRL2 (22).

The importance of CHIPS as a potential virulence factor led us to investigate homologous excreted proteins in the genome of *S.aureus*. A gene was found that showed 49% homology with the gene for CHIPS (*chp*) and contained a leader peptide and a peptidase cleavage site (amino acid sequence AXA). The gene encodes for a cleaved 105 amino acid protein with 28% homology with CHIPS. Initial functional assays with the recombinant protein demonstrated a weaker but consistent inhibition of fMLP-induced activation of neutrophils. Further analysis demonstrated that this new protein impairs the neutrophil and monocyte responses to FPRL-1 agonists.

Here we describe a new protein from *S.aureus* with anti-inflammatory properties: FPRL1 Inhibitory Protein (FLIPr). We show that FLIPr inhibits the leukocyte response to FPRL1 agonists and we demonstrate binding of FLIPr to HEK293 cells expressing the FPRL1.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. MMK-1 (LESIFRSLLFRVM) was synthesized by Sigma-Genosys (Cambridge, UK). fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), recombinant C5a, anti-FLAG mAb, propidium iodide and L- α -lysophosphatidylcholine were from Sigma-Aldrich. WKYMVm was synthesized by Dr. John AW Kruijtzter (Department of Medicinal Chemistry, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht, The Netherlands). WKYMVM, PrP₁₀₆₋₁₂₆ and amyloid beta peptide $A\beta_{1-42}$ were obtained from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland).

IL-8 and GRO- α were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). Platelet activating factor (PAF-16) was from Calbiochem (La Jolla, CA). Leukotriene B4 (LTB4) was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Lipoxin A4 was from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Fluo-3-AM (acetoxymethyl ester), Calcein-AM, Fura-red-AM, Fura-2-AM, and Alexa Fluo 488 Phalloidin were obtained from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). Anti-HA mAb (clone 12CA5) was from Roche Applied Science (Penzberg, Germany). Allophycocyanin (APC)-labeled goat anti-mouse Ig was from BD Pharmingen (San Jose, CA). Phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies CD4-PE (Leu-3a), CD8-PE (Leu-2a), CD19-PE (Leu-12), CD56-PE, CD16-PE and CD14-PE (Leu-M3) were obtained from Becton Dickinson (San Jose, CA); CD3-RPE-Cy5 (clone UCHT1) was from Dako (Glostrup, Denmark).

DNA sequence. The program tblastn with the nonredundant DNA database and the *S.aureus* genome database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> was used to check for sequence similarities with the *chp* gene. A gene was found with a 49% homology with *chp*. The DNA sequence of the gene encoded a protein of 105 amino acids (in bold), preceded by a signal peptide and a signal-peptidase site (underlined):

MKKNITKTIIASTVIAAGLLTQTNDAKAFFS
YEWKGLEIAKNLADQAKKDDERIDKLMK
ESDKNLTPYKAETVNDLYLIVKKLSQGDV
KKAVVRIKDGGPRDYTFDLTRPLEENR
KNIKVVKNGEIDSIYWD

Primers were designed according to the published sequence of the gene (hypothetical protein SAV1156, *Staphylococcus aureus subsp.aureus* Mu50; GeneID 1121132) for the cloning of the protein into pRSET vector (Invitrogen) and were manufactured by Invitrogen life technologies.

Prevalence in clinical *S.aureus* isolates.

Prevalence of the gene for FLIPr (*flr*) was checked in 91 clinical and laboratory *S.aureus* isolates. Genomic DNA was isolated from cultures of *S.aureus* using the High pure PCR template preparation kit (Roche). PCR amplification was conducted using Supertaq polymerase (Enzyme Technologies Ltd, UK) and 5'-TTCTTTAGTTATGAATGGAA-3' as the forward primer and 5'-TTAATCCCAATAAATCGAGTCG-3' as the reverse primer. PCR products were detected by electrophoresis through agarose gel and ethidium bromide staining.

Cloning and expression of the protein.

The *flr* gene, without the signal sequence, was cloned into the pRSET vector directly downstream of the enterokinase cleavage site and in frame of the EcoRI restriction site by overlap extension PCR (23). The plasmid pRSET was used as template for amplification of DNA fragments having overlapping ends using the sense primer 5'-GCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTAAGAAGGAG-3' containing XbaI restriction site (underlined nucleotides) and the antisense primer 5'-TCTAAACCTTCCATTCATAACTAAAGAACTTGTCGTCA TCGTCGTACAG-3'. The gene was then amplified by PCR on chromosomal DNA of *S. aureus* Newman using the sense primer 5'-TTCTTTAGTTATGAATGGAA-3' and the antisense primer 5'-CGTCCTGAATTCTTAATCCAATAAATCGAGTCG-3', containing the EcoRI restriction site (underlined nucleotides). The obtained DNA fragments were mixed, denatured and reannealed in a subsequent PCR reaction, using the primers corresponding to the 5' and 3' end sequences, in order to obtain the full-length PCR product. The amplification reactions were performed using *PfuTurbo* DNA polymerase (Stratagene, Cedar Creek, TX). The final PCR product was purified using PCR Purification Kit (Qiaquick,

Qiagen), cloned into the EcoRI and XbaI site of the pRSET vector and propagated in TOP10F' *E. coli* following manufacturer's instructions (Invitrogen). After verification of the correct sequence by using ABI Prism 377 (Applied Biosystems), the recombinant protein was expressed in Rosetta-Gami *E. coli* (De3)pLysS (Novagen, MERCK Biosciences) by induction with 1 mM IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, Invitrogen).

Purification and FITC-labeling of the protein.

Bacteria were lysed with CellLytic B Bacterial Cell lysis/Extraction Reagent (Sigma) and lysozyme according to the manufacturer's description. The histidine-tagged protein was purified using a nickel column (HiTrap™ Chelating HP, 5 ml, Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions and cleaved afterwards with enterokinase (Invitrogen). Samples were checked for purity and presence of protein by means of 15% SDS-PAGE (Mini Protean® III System, Bio-Rad) and Coomassie Brilliant Blue (Merck) staining.

A portion of the protein was labeled with FITC (Sigma) for binding experiments. Therefore, 500 μ g/ml FLIPr was incubated with 50 μ g/ml FITC in carbonate buffer pH 9.0 for 1 h at 37°C under constant agitation. FLIPr-FITC was separated from unbound FITC using a desalting column (HiTrap™ desalting, Amersham Biosciences). The fractions were collected and tested for the presence of FLIPr (OD_{280}) and FITC (OD_{495}) in a spectrophotometer, to calculate the concentration: FLIPr-FITC (mg/ml) = [$OD_{280} - (0.35 \times OD_{495})$] / 1.547. Recombinant CHIPS was isolated, purified and FITC-labeled as described (5) using essentially the same procedures as for FLIPr.

Leukocyte isolation. Venous blood was collected from healthy volunteers into tubes containing sodium heparin.

Blood was diluted with an equal volume of phosphate buffer saline (PBS) and layered onto a gradient of 12 ml Histopaque (density 1.117; Sigma Diagnostics) and 10 ml Ficoll (Amersham Biosciences) and centrifuged for 20 min at 380g and 21°C. PBMC and PMN were collected separately from Ficoll and Histopaque interphases, respectively. Cells were then washed with cold RPMI-1640 (containing 25mM Hepes and L-glutamine; Biowhittaker) with 0.05% human serum albumin (RPMI-HSA). For elimination of erythrocytes, the PMN pellet was subjected to a hypotonic shock by adding ice-cold H₂O for 30 seconds and subsequently ten-times concentrated PBS to reconstitute isotonicity. Cells were finally resuspended to a concentration of 1×10^7 cells/ml in RPMI-HAS and used promptly.

HEK293 cells. Human embryonic kidney cells were transiently transfected with plasmids containing the DNA encoding a FLAG-tagged version of the human membrane receptors FPR, FPRL1 and C5aR or a 3xHA-tagged FPRL2. The DNA sequence of the receptors was amplified by PCR by using the following primer pairs: for FPR sense primer 5'-CCG**GAATTCAT** GGACTACAAGGACGACGACGACAAGA TGATGGAGACAAATTCCTCTCTC-3' and antisense primer 5'-GCT**CTAGATCACTTT** GCCTGTAACGCCAC-3'; for FPRL1 sense primer 5'-CCG**GAATTCAT** GGACTACAA GGACGACGACGACAAGATGGAAACC AACTTCTCCACTCCTC-3' and antisense primer 5'-GCT**CTAGATCACATTGCCTGTA** ACTCAG-3'; for C5aR sense primer 5'-CCG **GAATTCAT** GGACTACAAGGACGACGAC GACAAGATGAACTCCTTCAATTATACC-3' and antisense primer 5'-GCT**CTAGACTAC** ACTGCCTGGGTCTTCT-3'.

Primers contained EcoRI and XbaI restriction sites (in bold nucleotides). An N-terminal FLAG-tag (DYKDDDDK, included in the sense primers, underlined nucleotides) was placed after the first

methionine for detection by the anti-FLAG M2 mAb. An extra methionine (ATG) was included directly after the FLAG-tag to keep the N-terminal sequence intact. The amplification reaction was performed on human bone marrow QUICK-Clone cDNA (BD Biosciences Clontech) using *PfuTurbo* DNA polymerase. The PCR product was digested with EcoRI and XbaI, ligated in the expressing plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen) and transfected into HEK293 cells as described before (24). The 3xHA-tagged FPRL2 DNA was obtained from UMR cDNA Resource Center (University of Missouri-Rolla, Rolla, MO) and was also transfected into HEK293 cells. HEK293 cells were grown in a 6-well plate (Costar, Corning, NY) at 0.5×10^5 cells/ml and maintained in EMEM (Minimal Essential Medium Eagle, BioWhittaker) supplemented with 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin and 10% fetal calf serum. After 3-4 days culture, cells were transfected with the respective plasmids by using LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), according to manufacturer' instructions. After two to three days from transfection, cells were used for binding assays.

Calcium mobilization. The activation of neutrophils by chemo-attractants initiates a rapid and transient increase in the free intracellular calcium concentration. Calcium mobilization with isolated human neutrophils and monocytes was measured as previously described (25). Briefly, the PMN fraction (5×10^6 cells/ml) was loaded with 2 μM Fluo-3-AM or Fura-red-AM for 20 min at room temperature, protected from light and under constant agitation. Cells were washed, resuspended in RPMI-HSA and incubated with buffer or protein (FLIPr or CHIPS) for 20 min. The cells (1×10^6 cells/ml) were then monitored for calcium mobilization over time, first for 10 seconds to determine the basal fluorescence level, and then for 40 s after addition of the concentrated stimulus.

Fluorescence was measured at 530 nm (for Fluo-3-AM) or 560 nm (for Fura-red-AM) using a flow cytometer (FACSCalibur or FACScan, Becton Dickinson). For calcium mobilization in PBMC, a PE-conjugated anti-CD14 was included during labeling with Fluo-2-AM. PBMC were adjusted to 5×10^6 cells/ml and monocyte calcium mobilization was monitored by gating on side scatter and anti-CD14 staining. Alternatively, neutrophils were labeled with 2 μM Fura-2-AM for 45 min at room temperature, washed and resuspended in HBSS (BioWhittaker) containing 1% HSA at 7.5×10^6 cells/ml. Cells were transferred into black clear bottom microtiterplates (50 μl) and preincubated for 5 min with 25 μl of inhibitory protein (FLIPr or CHIPS) or HBSS-HSA buffer control and subsequently loaded into a FlexStation fluorescent plate reader (Molecular Devices). Fluorescence was measured every 1.5 seconds at dual emission wavelengths of 530 and 590 with 340 excitation. Stimuli (25 μl) were automatically added after a 1 min baseline reading and measurement continued for an additional 5 min. The ratio of 530 to 590 was calculated for every reading and plotted versus time.

Changes in forward scatter. Activation of neutrophils by fMLP results in a shape change that can be measured as change in forward scatter in a flow cytometer (26). Neutrophils (90 μl of a 2×10^6 /ml suspension) were incubated for 10 min at 37°C in a shaking water bath together with 10 μl RPMI-HSA or inhibitory protein (FLIPr or CHIPS). Subsequently, different concentrations of ten-times concentrated stimulus were added, and the cells were incubated for another 15 min at 37°C. The cells were finally fixed with an equal volume of 2.5% glutaraldehyde (Merck) in saline, and kept on ice for at least 90 minutes before measurement in a flow cytometer. After appropriate gating to exclude cell

debris, the forward scatter values were determined.

Chemotaxis assays. Chemotaxis of human neutrophils towards several chemo-attractants was measured in a 96-multiwell trans membrane system (ChemoTX, Neuro Probe, Gaithersburg, MD) using an 8 μm pore size polycarbonate membrane. Cells ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were labeled with 2 μM Calcein-AM for 20 minutes at room temperature protected from light. Subsequently, cells were washed with HBSS containing 1% HSA, resuspended to 2.5×10^6 cells/ml in the same buffer, and incubated with FLIPr. Dilutions of the different chemo-attractants were prepared in HBSS-HSA, and 29 μl were placed into each well of the lower compartment of the chamber in triplicate. Wells with control medium were included to measure the spontaneous cell migration. For total cell fluorescence, wells were filled with 25 μl of labeled cells plus 4 μl buffer. The membrane holder was assembled, and 25 μl of labeled cells were added as a droplet to each upper well except for the total fluorescence wells. The plate was incubated for 30 min at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The membrane was washed extensively with PBS and fluorescence of the wells was measured in a FlexStation fluorescent plate reader (Molecular Devices) with excitation at 485 nm and emission at 530 nm. Percentage of chemotaxis was calculated relative to the fluorescence value of cells added directly to the lower well: (fluorescence sample/fluorescence total counts)*100.

Actin polymerization. In order to measure the polymerization state of actin in neutrophils after proper stimulation, a flow cytometric assay was performed using fluorescent phalloidin as probe, which binds specifically to F-actin, the active state of actin. A set of tubes was prepared with 25 μl of fixation/permeabilization buffer (6% formaldehyde in PBS with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L- α -ly

sophosphatidylcholine). Neutrophils (5×10^6 cells/ml) with or without inhibitor were stimulated at room temperature with LTB₄. The first sample (25 μl) was immediately added to a tube with fixation buffer, and consecutive samples at different time points. After keeping the samples for at least 15 min for fixation and permeabilization, 2 μl of the fluorescent probe (Alexa Fluor 488 Phalloidin, 100 U/ml in methanol) was added. Samples were then kept at 4°C for 1 h and subsequently the fluorescence was measured on a flow cytometer.

Binding assay with leukocytes. To determine the binding of FLIPr to different leukocytes, isolated fractions of PMN and PBMC suspension were mixed again (4:6 ratio) and diluted to 5×10^6 cells/ml with RPMI-HSA 1%. Cells were incubated with buffer or a concentration range of FITC-labeled protein during 30 min. Cells were then washed and resuspended in RPMI-HSA and binding of FLIPr was measured by flow cytometry. For binding in whole blood, 50 μl of EDTA anti-coagulated blood was incubated with 5 μl of different concentrations of FITC-labeled protein for 30 min at 4°C . Subsequently, samples were treated with FACS™ Lysing solution, washed once, and the cells were resuspended in 200 μL RPMI-HSA and measured in the flow cytometer. The same protocol was also used for isolated PBMC adding the appropriate monoclonal antibodies against different subsets of leukocytes, labeled with fluorochromes distinct from FITC: CD3-Cy5 plus CD4-PE or CD8-PE for T lymphocytes; CD19-PE for B-lymphocytes; CD14-PE for monocytes; CD3-Cy5 plus CD56-PE and CD16-PE for natural killer cells.

Binding assay with HEK293. Cells transfected with each FLAG-tagged C5aR, FPR and FPRL1 or 3xHA-tagged FPRL2 were incubated with mouse anti-FLAG or anti-HA mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 45 min at 4°C . Cells were then washed and incubated

with APC-labeled goat anti-mouse antibody together with FITC-labeled FLIPr or CHIPS for 45 min at 4°C. Finally the cells were washed and resuspended in 200 µl of RPMI-HSA containing 5 µg/ml propidium iodide. Association of FITC-protein (FL1) was determined to propidium iodide negative living cells (scatters plus FL2) expressing the APC-positive tagged receptor (FL4) in a flow cytometer (24). For background signals, cells transfected with an empty pcDNA3.1 vector were used.

RESULTS

Prevalence in *S.aureus* isolates

In order to investigate the prevalence of the gene for FLIPr (designated *flr*) in clinical isolates, 91 *S.aureus* strains isolated from bloodstream infections were screened by PCR. The gene encoding for FLIPr was found in 59% of the isolates and encodes for an excreted protein that includes a signal peptide and AXA motive. The presence of FLIPr in the supernate of growing *S.aureus* could not be directly determined due to the lack of specific antibodies. Healthy blood bank donors possess natural occurring IgG antibodies reacting with the recombinant FLIPr indicating that FLIPr is produced in vivo (data not shown).

FLIPr inhibits FPR-family related activation of neutrophils.

We first examined the capacity of FLIPr to inhibit cell responses to peptides reactive with members of the FPR-family as measured by intracellular calcium mobilization. FLIPr itself, used as stimulus up to 100 µg/ml, did not induce a calcium response. Neutrophils were tested for activation with and without preincubation with 3 µg/ml FLIPr or CHIPS. Incubation of human neutrophils with FLIPr resulted in the inhibition of fMLP-induced calcium mobilization (Fig. 1A). Compared

to CHIPS, the inhibition of fMLP-induced responses was weaker. The maximum inhibition of neutrophil activation by FLIPr was observed at a concentration of 3×10^{-9} M fMLP, while CHIPS inhibited up to 10^{-6} M fMLP. Because FLIPr partly inhibited the fMLP-induced activation of neutrophils, its activity was also tested on the low-affinity receptor FPRL1. Several synthetic peptides derived from a random peptide library, which have been reported as agonists of FPRL1 (10,19-21,27), were tested. A very strong inhibition of the FPRL1-specific MMK-1 peptide-induced activation of FLIPr-treated neutrophils was observed (Fig. 1C). FLIPr also inhibited WKYMVm- (FPR and FPRL1 agonist) and WKYMVM- (FPRL1 and FPRL2 agonist) induced responses in neutrophils (Fig. 1B and 1D). The inhibition was stronger for WKYMVM. While FLIPr inhibited the response to concentrations of 10^{-8} M WKYMVm, it is able to inhibit up to 3×10^{-7} M when using WKYMVM. CHIPS did not show any inhibitory activity in the response to FPRL1 agonists, as reported before (5). Unlike CHIPS, FLIPr did not block C5a-induced activation of neutrophils. In addition, FLIPr did not affect the response to other chemo-attractant receptors present on neutrophils: LTB₄, PAF, IL-8, and GRO-α (data not shown).

FLIPr inhibits synthetic FPRL1 agonist-induced activation of monocytes.

Monocytes also bear the receptors of the FPR-family including the FPR, FPRL1 and FPRL2 that is not present on neutrophils (11,13). The same set of agonists was used to stimulate the monocyte intracellular calcium mobilization in the presence of FLIPr or CHIPS. Specific monocyte response in the PBMC preparation was established by gating on side scatter and anti-CD14 staining. As shown in Fig. 2, FLIPr efficiently inhibited the response induced by MMK-1 (Fig. 2C, specific for FPRL-1), both WKYMVm (Fig. 2B), and WKYMVM (Fig.

figure 1

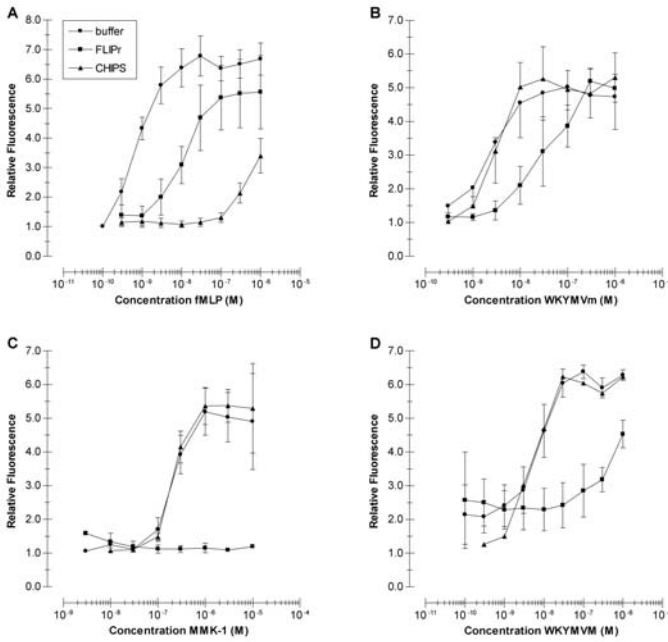


Figure 1. FLIPr inhibits FPR and FPRL1 agonist-induced calcium mobilization in neutrophils. Fluo-3-loaded neutrophils were incubated with buffer (●), 3 µg/ml FLIPr (■) or CHIPS (▲) for 20 minutes at room temperature. For calcium mobilization cells each sample was first measured for about 10 seconds to determine the basal fluorescence and subsequently stimulus was added and rapidly placed back in the sample holder to continue the measurement. Cells were analyzed in a flow cytometer and activation was expressed as the ratio of the fluorescence value before (cells acquired between T = 5 till 7 seconds) / after addition of stimulus (cells acquired at T = 12 till 14 seconds after stimulation). Neutrophils were stimulated with the synthetic agonists fMLP (A), WKYMVm (B), MMK-1 (C) and WKYMVm (D). Data are mean ± SEM of three independent experiments.

figure 2

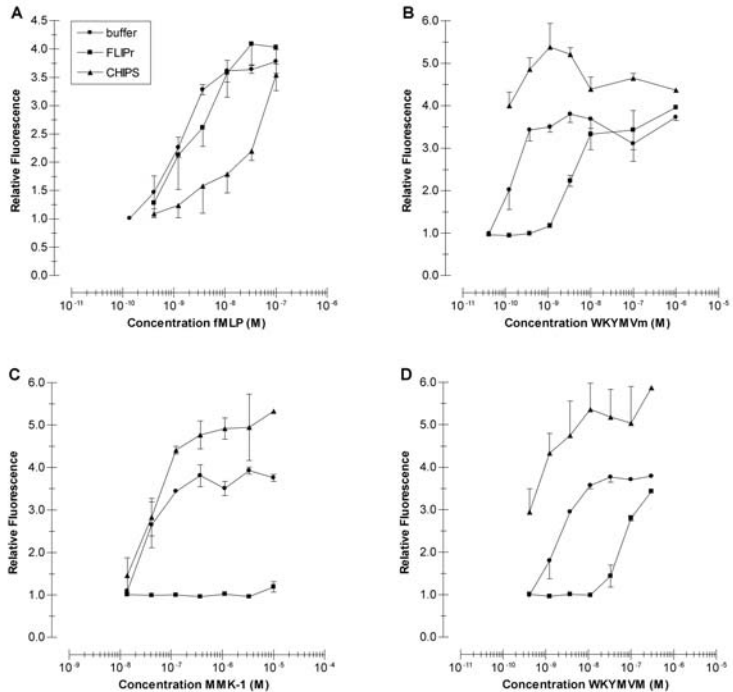


Figure 2. FLIPr inhibits FPR and FPRL1 agonist-induced calcium mobilization in monocytes. The activity of FLIPr was tested in calcium mobilization assays with monocytes in response to the synthetic agonists fMLP (A), WKYMVm (B), MMK-1 (C) and WKYMVm (D). Fluo-3-loaded PBMC were incubated with buffer (●), 3 µg/ml FLIPr (■) or CHIPS (▲) for 20 minutes and specific monocyte response determined by gating on anti-CD14-PE staining and scatter parameters. Data are mean ± SEM of three independent experiments.

Figure 3

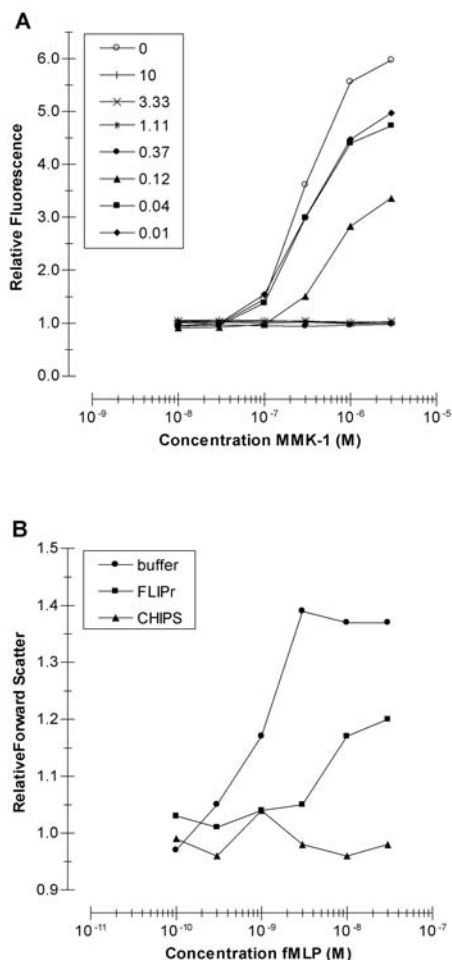


Figure 3. Potency of FLIPr to inhibit the MMK-1-induced calcium mobilization and fMLP-induced change in forward scatter of neutrophils. (A) The activity of different concentrations FLIPr (0.01 to 10 µg/ml for 20 min) was tested in calcium mobilization assay with neutrophils in response to synthetic peptide FPRL1 agonist MMK-1 (concentration of 0 represents buffer treated cells). A representative experiment is shown. (B) Neutrophils were incubated with buffer (●), 3 µg/ml FLIPr (■) or CHIPS (▲) for 20 minutes at room temperature. Cells were challenged with different concentrations fMLP for 15 min at 37°C, fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed for the relative change in forward scatter value as compared to control cells incubated in buffer only. A representative experiment is shown.

2D). CHIPS did not affect these responses. Monocytes showed a smaller range of fMLP concentrations that induced activation

as compared to the response induced in neutrophils (Fig 1A). Only CHIPS and not FLIPr inhibited the fMLP-induced calcium mobilization in monocytes.

Potency of FLIPr.

To further investigate the potency of FLIPr, an experiment was performed with a dose response of both FLIPr and MMK-1. The effect was dose-dependent and FLIPr inhibited the response to MMK-1 in the nanomolar to micromolar range (Fig. 3A). To further strengthen the specific inhibition of the fMLP-induced neutrophil activation, the change in forward scatter was monitored as an alternative parameter (26). CHIPS and FLIPr inhibited the fMLP-induced increase in forward scatter (Fig. 3B) in a manner similar to the inhibition of intracellular calcium mobilization (Fig. 1A). To support the effect of FLIPr on FPRL1 signaling, we examined its effect on neutrophil degranulation induced by MMK-1. Stimulation of cytochalasin-B treated cells for 30 min with 10⁻⁶ M MMK-1 resulted in the release of elastase (68% of total cell content) and MPO (11% of total cell content) as determined with chromogenic substrates (28). Pretreatment with 3 µg/ml FLIPr blocked the elastase release for 74% and the MPO release for 100%. CHIPS was unable to prevent the MMK-1 induced elastase and MPO release.

FLIPr inhibits chemotaxis to FPRL1 agonists.

In order to assess if FLIPr could also inhibit the chemotactic response, neutrophil migration in response to the chemo-attractants C5a, fMLP, and MMK-1 was determined in a multiwell chemotaxis assays. In accordance with the calcium mobilization assays, FLIPr did not show any effect on C5a. However, FLIPr partly

Figure 4

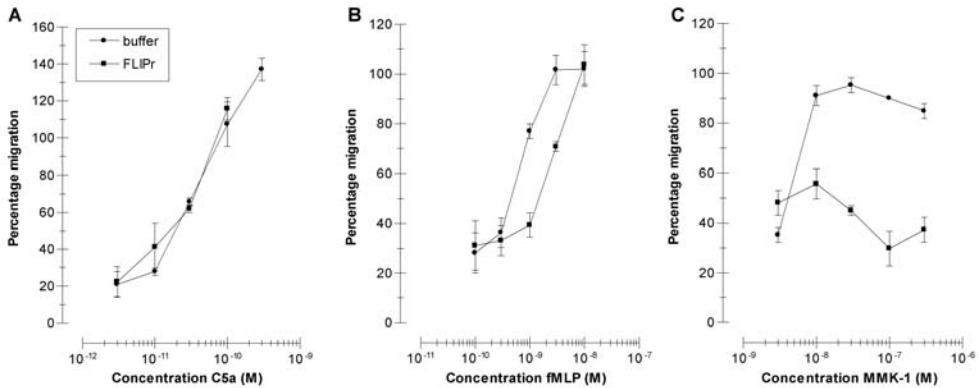


Figure 4. FLIPr inhibits chemotaxis of neutrophils to fMLP and MMK-1 and not to C5a. Chemotaxis of human neutrophils towards several chemoattractants was measured in a multiwell trans-membrane system. Cells were loaded with Calcein and incubated with buffer (●) or 3 μ g/ml of FLIPr (■). Dilutions of the chemoattractants C5a (A), fMLP (B) and MMK-1(C) were placed to each well in triplicate and, after assembling the membrane holder, labeled cells were added to each upper well. The plate was incubated for 30 minutes at 37°C+ 5% CO₂, and after washing the membrane holder, fluorescence was measured. Results are expressed as percentage of chemotaxis, and data are mean \pm SEM of triplicates from one representative experiment out of three. Spontaneous migration towards buffer loaded wells was 29%.

inhibited the chemotactic response to fMLP and showed a complete inhibitory activity towards MMK-1 (Fig. 4).

FLIPr inhibits A β ₁₋₄₂- and PrP₁₀₆₋₁₂₆-induced activation of neutrophils.

The activation of monocyte-derived cells is thought to play a key role in the inflammatory process leading to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases (29). Although the potential involvement of other cell surface receptors should not be excluded, FPRL1 has been proposed to mediate the migration and activation of monocytes and microglia induced both by A β ₁₋₄₂ (16) and by a 20-amino acid fragment of the human prion protein PrP₁₀₆₋₁₂₆ (17). Neutrophils are also activated by both A β ₁₋₄₂ (30,31) and PrP₁₀₆₋₁₂₆ (32) leading to changes in intracellular calcium, generation of superoxide and induction of chemotaxis. Therefore we examined the capacity of FLIPr to inhibit the calcium mobilization in response to 10 μ M A β ₁₋₄₂ and 50 μ M of PrP₁₀₆₋₁₂₆ (Fig. 5A). For comparison, the potent inhibition

of MMK-1- and fMLP-induced calcium mobilization by FLIPr was performed in parallel. With A β ₁₋₄₂ a specific migration was induced that was partly inhibited by FLIPr (Fig. 5B). Because the A β ₁₋₄₂-induced calcium response as determined by Fluo-3 and flow cytometry were relatively weak, the experiment was repeated with Fura-2 labeled cells and ratiometry in a fluorescent plate reader (FlexStation). This enabled a more clear view on the A β ₁₋₄₂-induced calcium response that was completely inhibited by FLIPr (Fig. 5C). To demonstrate specificity of the response, the same cells were rechallenge after 5 min with PAF. This elicited a calcium mobilization in all cells, both treated with buffer and FLIPr.

FLIPr does not interfere with lipoxin A4 activity on LTB4.

Lipoxin A4 is an endogenous lipid-derived mediator generated at sites of inflammation that has been reported to bind FPRL1/LXA4R with high affinity (33). Unlike peptide chemotactic agonists, lipoxin A4

induces an anti-inflammatory signaling cascade that inhibits neutrophils migration (34) and suppresses calcium mobilization upon challenge with other agonists (35). Lipoxin A4 was also tested as a direct FPRL1-agonist in the calcium mobilization assay. However, we were unable to elicit a calcium response in neutrophils or monocytes in response to fresh lipoxin A4; neither when assayed with Fluo-3 and flow cytometry nor with Fura-2 and ratiometry in a fluorescent plate reader. To investigate a possible antagonistic effect of FLIPr for lipoxin A4, inhibition of LTB₄-induced actin polymerization was measured. Cells incubated with 10⁻⁶ M lipoxin A4 showed a decreased actin polymerization in response to LTB₄. Pre-incubation with FLIPr at different concentrations could not revert this effect. FLIPr itself did not inhibit the actin polymerization in response to LTB₄, in accordance with the results obtained with calcium mobilization (Fig. 6).

FLIPr binds to human neutrophils, monocytes and a subpopulation of lymphocytes.

To show association of FLIPr with the appropriate blood leukocytes that bear FPRL1, fluorescent-labeled FLIPr was used. With neutrophils and monocytes a strong association of FLIPr-FITC was observed, while lymphocytes showed a weak binding (Fig. 7). With increasing concentrations of FLIPr-FITC, an increase in binding was observed, both when cells were incubated at 37°C (Fig. 7A) and on ice (Fig. 7B). To test if binding was influenced by plasma component, the experiment was also performed using whole blood *ex vivo*. The results were not different from binding to isolated leukocytes (data not shown). Monoclonal antibodies against different PBMC subtypes were used together with FLIPr-FITC to determine the binding profile of FLIPr to different cell populations (Fig. 8). Binding was

Figure 5

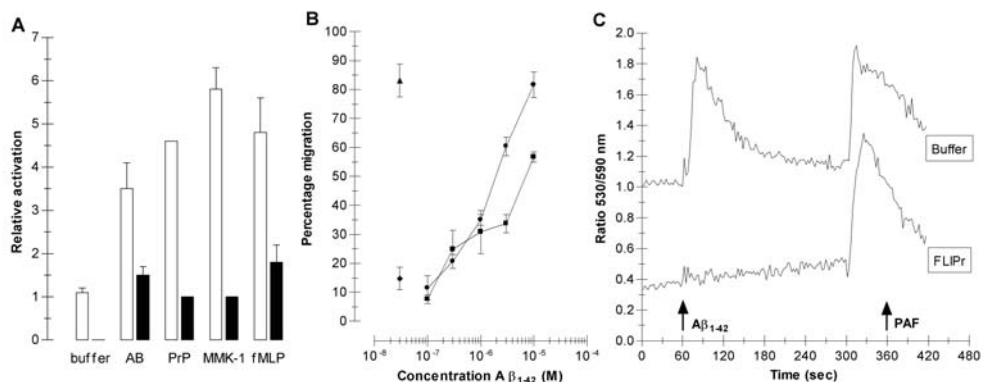


Figure 5. FLIPr inhibits chemotaxis and calcium flux in response to the endogenous peptide agonist Aβ₁₋₄₂ and PrP₁₀₆₋₁₂₆. The activity of FLIPr to inhibit the neutrophil response to FPRL1-endogenous agonists Aβ₁₋₄₂ and PrP₁₀₆₋₁₂₆ was tested by chemotaxis and calcium mobilization. (A) The calcium flux induced by 10 μM Aβ₁₋₄₂ (AB) and 50 μM PrP₁₀₆₋₁₂₆ (PrP) was inhibited by 3 μg/ml FLIPr. In the same experiment the peptide agonists MMK-1 (1x10⁻⁷M) and fMLP (1x10⁻⁹M) were included. Open bars represent the response of buffer control cells and solid bars the response in the presence of FLIPr. (B) Chemotaxis results towards different concentrations Aβ₁₋₄₂ of control cells (●) and cells incubated with 3 μg/ml FLIPr (■). Data are expressed as percentage migration and are mean ± SEM of triplicates of one representative experiment. Controls are included of chemotaxis in response to 3x10⁻⁷M MMK-1 in control cells (▲) and in cells incubated with FLIPr (□). Spontaneous migration towards buffer was 21.8%. (C) Representative experiments showing Aβ₁₋₄₂ (10⁻⁵M at 60 seconds) induced calcium mobilization in Fura-2 loaded neutrophils treated with buffer, or 3 μg/ml FLIPr. The same cells were rechallenge at 300 seconds with 10⁻⁹M PAF. Results are depicted as the ratio of the fluorescence at 530/590 nm and shifted to show the individual curves.

Figure 6

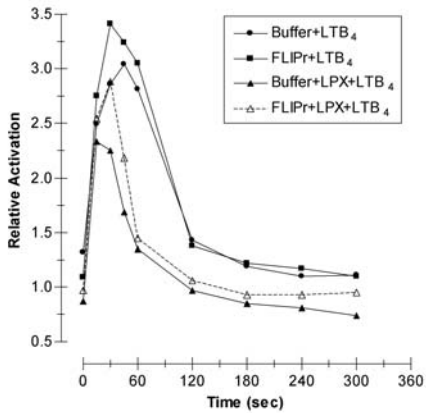


Figure 6. FLIPr does not interfere with lipoxin A₄-mediated FPRL1 activation.

The leukotriene B₄-induced (LTB₄; 10⁻⁶M) actin polymerization is partly prevented by the incubation of neutrophils with 10⁻⁶M Lipoxin A₄. Preincubation of neutrophils with 3 µg/ml FLIPr did not interfere with the LTB₄-induced response nor the lipoxin-A₄ response. Actin polymerization was determined at 15 second intervals with Alexa-labeled Phalloidin and flow cytometry for cells plus LTB₄ (●), FLIPr and LTB₄ (▲), Lipoxin-A₄ and LTB₄ (■), and FLIPr + lipoxin-A₄ and LTB₄ (dashed line, △). Results are expressed as the relative increase in fluorescence compared to non-stimulated cells (mean of two representative experiments).

observed to monocytes (CD14⁺, gated on scatters), B-cells (CD19⁺ lymphocytes), a subpopulation of CD8⁺ lymphocytes and natural killer cells (CD3⁺/CD56⁺/CD16⁺ lymphocytes). The CD8⁺ subpopulation that bound FLIPr was identified as natural killer cells (CD56⁺,CD8⁺). No binding was found to T-cells (CD3⁺ lymphocytes), or the CD4⁺ subset and the majority of CD8⁺ subset. The FITC-labeled FLIPr was also functional in calcium mobilization assay (using Fura-red instead of Fluo-3-AM) inhibiting fMLP-, WKYMVm- and MMK-1-induced activation of neutrophils (data not shown).

FLIPr binds to HEK293 cells transfected with FPRL1.

To assess whether FLIPr binds directly to the human receptor FPR and/or FPRL1, HEK293 cells transiently transfected with

Figure 7

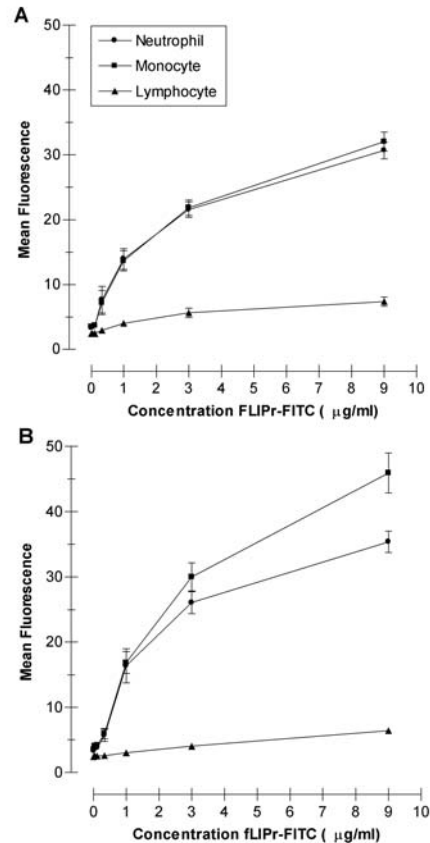


Figure 7. FLIPr binds to neutrophils, monocytes and a proportion of lymphocytes.

Isolated PMN and PBMC were incubated with a range of concentrations of FLIPr-FITC (0.03 to 9 µg/ml) for 30 minutes on ice (A) or at 37°C (B) under constant shaking. Cells were then washed and resuspended in RPMI-HSA and fluorescence was measured in a flow cytometer. Cells were identified based on scatter parameters and anti-CD14 staining; neutrophils (●), monocytes (■) and lymphocytes (▲) are displayed. Data are mean± SEM of three independent experiments.

FLAG-tagged FPR and FPRL1 were tested for FLIPr-FITC binding. As positive controls, CHIPS-FITC binding and C5aR-transfected HEK293 were included. Cells were analyzed by gating on forward and sideward scatters as well as viability (cells staining negative for propidium iodide) to exclude dead cells. Indirect APC-labeled mAb against the FLAG or 3xHA tag detected the population of transfectants expressing the respective receptors. Fig. 9A shows representative

Figure 8

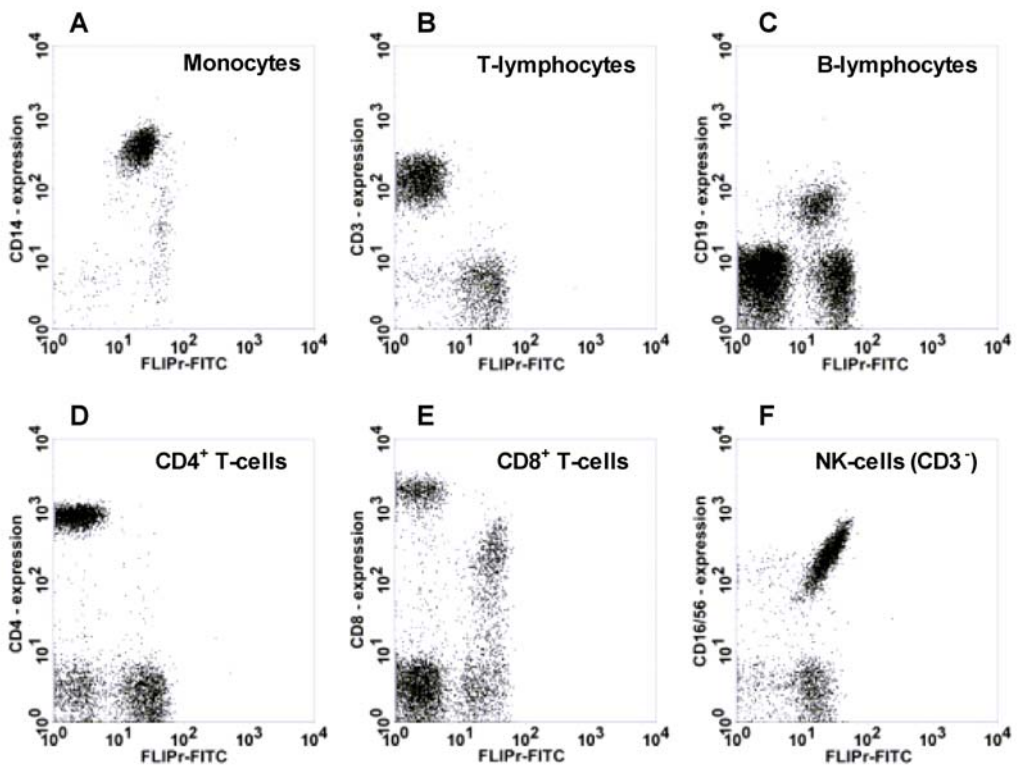


Figure 8. FLIPr binds to different subsets of leukocytes. Monoclonal antibodies for different subsets of mononuclear cells were used to check the binding profile of FLIPr-FITC by flow cytometry. FLIPr binds to CD14⁺ monocytes (A); not to CD3⁺ lymphocytes (T-cells) (B); binds to CD19⁺ lymphocytes (B-cells) (C); not to CD4⁺ T-cells (D); binds to a subpopulation of CD8⁺ T-cells (E), and to CD3⁺/CD56⁺/CD16⁺ lymphocytes (NK-cells) (F).

histograms of the binding of FLIPr-FITC and CHIPS-FITC to the transfectants. As expected, CHIPS-FITC (3 $\mu\text{g/ml}$) bound to HEK293 transfected with FPR as well as those transfected with C5aR and did not bind to cells transfected with FPRL1. FLIPr-FITC (3 $\mu\text{g/ml}$) bound to HEK293 transfected with FPRL1, did not bind to HEK293 transfected with C5aR or FPRL2 and showed a weak binding to cells transfected with FPR. Binding to vector-control transfectants gave a mean fluorescence of 8.6 ± 1.1 (Fig. 9B).

DISCUSSION

Leukocyte migration to the site of inflammation is a key event in the innate immune response to invading microorganisms. We describe FLIPr as a secreted staphylococcal protein that exerts anti-inflammatory activity by inhibiting calcium mobilization and cell migration towards chemo-attractants. The experiments performed conclusively indicate that FLIPr uses FPRL1 as a functional receptor. FLIPr binds directly to HEK293 cells transfected with FPRL1 and at higher concentrations also to FPR that

Figure 9

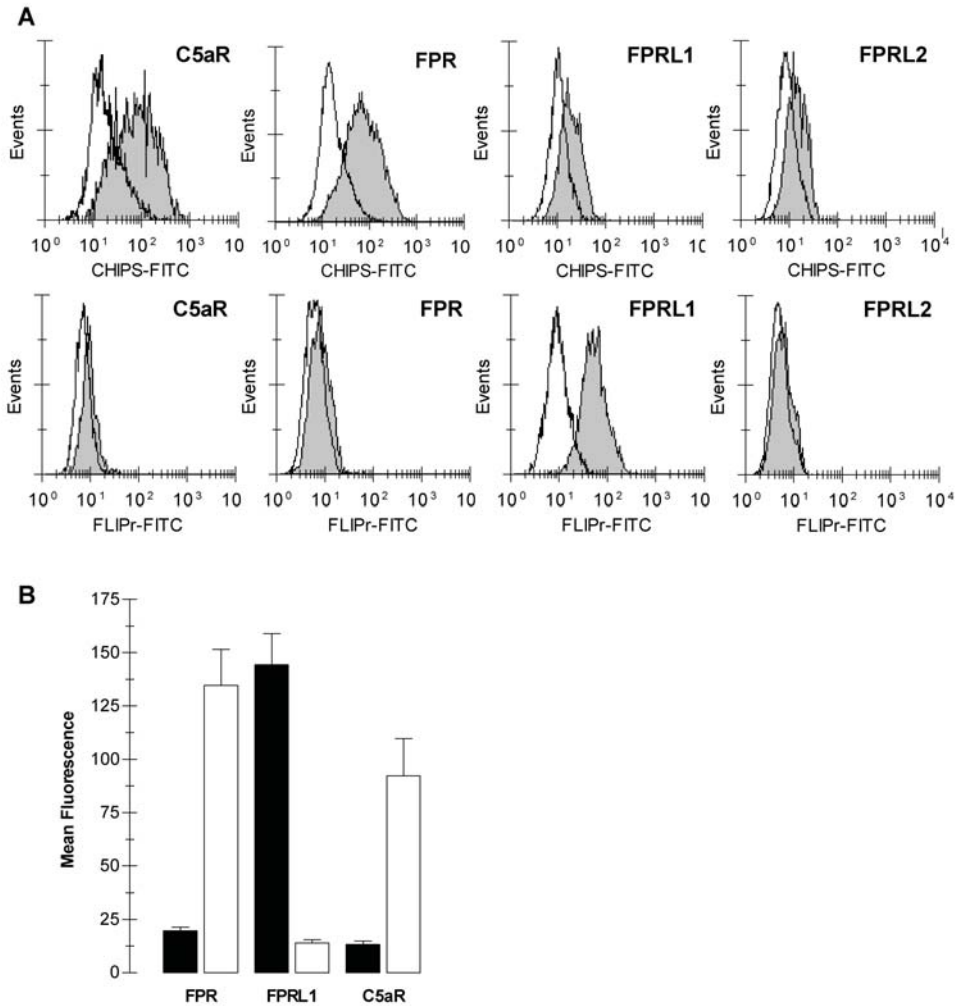


Figure 9. FLIPr binds to HEK293 cells transfected with the FPRL1. HEK293 cells were transiently transfected with the vector containing FLAG-tagged human FPR, FPRL1 and C5aR or 3xHA-tagged FPRL2. As control, an empty vector was used. To identify positive transfectants, cells were labeled with anti-FLAG mAb (or anti-HA mAb for FPRL2) and APC-labeled goat anti-mouse IgG antibody. Simultaneously, FITC-labeled FLIPr or CHIPS was added at 3 μ g/ml. Cells were resuspended in buffer with propidium iodide and analyzed for binding of FITC-labeled protein to viable, receptor-positive transfectants. Therefore cells were gated on basis of scatters and viability (propidium iodide negative) and analyzed for expression of the receptor on the cell surface (APC-positive) and binding of FITC-labeled protein. Figure A shows representative histograms of the binding of CHIPS-FITC to C5aR, FPR, and FPRL1 (left column) and FLIPr-FITC to C5aR, FPR, FPRL1, and FPRL2 (right column). Background staining to vector control cells is depicted as gray overlays. Figure B shows the mean fluorescence \pm SEM of three independent experiments; black bars represent FLIPr-FITC and open bars CHIPS-FITC binding. Mean fluorescence value for binding to vector control HEK293 cells was 8.6 ± 1 .

possesses a 69% identity at the amino acid level (36). The predominant use of FPRL1 as a receptor may explain the weaker inhibition of fMLP-induced responses compared to CHIPS, which binds only to FPR. fMLP is a high-affinity agonist for FPR and only at high concentrations induces calcium mobilization through FPRL1. Nevertheless, FLIPr partly blocks low concentrations fMLP-induced calcium responses in neutrophils and monocytes, probably due to a lower affinity for the FPR. The inhibition of synthetic FPRL1 agonists-induced activation of phagocytes gives additional evidence for FLIPr as a specific FPRL1 antagonist. FLIPr inhibits very strongly the response to MMK-1, a potent and very specific FPRL1 agonist (19). The hexapeptides WKYMVM and the D-methionine containing WKYVMm activate phagocytes differentially through the formyl-peptide receptor family expressed on neutrophils and monocytes (11). WKYMVM activates neutrophils through the FPRL1 without any cross talk with FPR and is completely inhibited by FLIPr. Also with monocytes FLIPr efficiently inhibited the mobilization of intracellular calcium. This peptide is also a low-affinity agonist for FPRL2 expressed on monocytes and may explain why higher concentrations WKYMVM still induced a response in the presence of FLIPr. Direct binding of FLIPr to HEK293 cells transfected with FPRL2 was not found. The inhibition of responses to WKYVMm, which uses both FPR and FPRL1 as receptors expressed on both neutrophils and monocytes, is weaker and comparable with fMLP. Although WKYMVM has a certain degree of preference for FPRL1, these experiments can be explained by both a low affinity of FLIPr for FPR combined with the concentration dependent activation by WKYVMm of FPR or FPRL1. It should be noted that relatively high concentrations (3 µg/ml) FLIPr are needed to inhibit fMLP-induced activation. However, the specific FPRL1 agonist MMK-1 is still blocked with 10-fold lower

concentration (0.37 µg/ml). We have also reported that FLIPr blocked FPRL1-induced release of lysosomal granule content from neutrophils. Finally, FLIPr inhibits the leukocyte responses to the reported host-derived FPRL1-agonists Aβ₁₋₄₂ and PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶. Taken together, these findings show that this newly described Staphylococcal protein FLIPr blocks FPRL1 signaling probably by direct binding to the receptor.

The role of FLIPr, as an FPRL1 inhibitor, in the pathogenesis of staphylococcal disease is difficult to assess, but several data make the protein likely to play a role in host-pathogen interactions. The gene encoding for FLIPr was found to be located in a genetic cluster which contains genes encoding several virulence factors: extracellular fibrinogen-binding protein (*efb*), extracellular fibrinogen-binding protein-like (*efb-L*), haemotoxin protein A (better known as α-toxine, *hla*), and enterotoxin-like proteins as well as an insertional sequence (*tnp* IS1181). Furthermore, the gene is present in 59% of clinical isolates. The gene for FLIPr encodes for a protein containing a leader and an AXA motive as previously described for CHIPS (5).

The role of C5a and fMLP in host defense is clear, since they have been implicated not only in leukocyte recruitment but also on the hepatic synthesis of acute phase proteins (8), as well as activation of NF-kappaB and production of inflammatory cytokines by phagocytes (37). Furthermore, targeted gene disruption of FPR in mice impaired the antibacterial response (38).

Less is known about FPRL1, but there is increasing evidence of a critical role in the regulation of immune responses against infections. Not only fMLP but several microbial components as well as host molecules implicated in innate defense are able to activate FPRL1. Activation by several agonists has shown its ability to

mediate chemotaxis as well as superoxide generation by phagocytes (13). Activation of FPRL1 by domains of the HIV envelope proteins has been reported to desensitize chemokine receptors CCR5 and CXCR4 that act as co-receptors for HIV infection (39,40). Also a cecropin-like *Helicobacter pylori* peptide, Hp₂₋₂₀, attracts and activates monocytes through FPRL1 and FPRL2 (13,41).

On the other hand, LL-37, an enzymatic cleavage fragment of the neutrophil granule-derived cathelicidin, an endogenous antimicrobial peptide, utilizes FPRL1 as a receptor to activate human neutrophils, monocytes and T cells (42). In addition, LL-37 also prolongs the lifespan of neutrophils by suppression of apoptosis mediated via activation of FPRL1 (43). LL-37 is an important effector molecule of the innate immune system which possesses considerable anti-staphylococcal activity and may contribute to protection of the skin and mucosal surfaces against colonization by gram-positive pathogens (44). The production of aureolysin, a metalloproteinase that cleaves and inactivates LL-37, by *S.aureus* contributes to the resistance against bactericidal peptides (45). Several other mechanisms are used in protection against cationic antimicrobial molecules such as defensins (46). A truncated form of a β -chemokine has also been reported as a high-affinity FPRL1 agonist (47). FPRL1 also interacts with the lipid metabolite lipoxin A4, which plays an anti-inflammatory role. Lipoxin A4 has been reported to induce calcium mobilization in neutrophils and monocytes in some studies (48,49), while in others it could not induce any direct cellular response (21,47). In our experience, lipoxin A4 did not elicit a calcium mobilization but did inhibit actin polymerization in response to LTB₄, which could not be reverted by FLIPr. It is hypothesized that lipoxin A4 and peptide agonists might use divergent domains on FPRL1 and differential cellular

signaling (48). FPRL1 recognizes a vast array of ligands that have no homology; different functional domains in the receptor are probably used for diverse agonists, as it has been demonstrated for MMK-1 and A β ₁₋₄₂ (50). Thus, FLIPr is not able to block the response to every FPRL1 agonist.

A better understanding of the virulence strategies of *S.aureus* might lead to development of more specific therapeutically approaches. Some virulence factors have been associated with specific clinical features, such as the staphylococcal syndromes associated with toxin production (1). On the other hand, while some factors are present in strains causing disease by direct invasion and tissue destruction, others are associated with secondary invasive infections as infective endocarditis. Whether an infection is contained or spreads depends on a complex interplay between *S.aureus* virulence determinants and host defense mechanisms (1,2). The blocking of receptors for chemo-attractants exerted by the staphylococcal proteins CHIPS and FLIPr may have a role in preventing the early detection of the microorganism by the innate immune mechanisms, allowing its spread.

Leukocyte migration is critical in maintaining the host defense, aiming at the clearance of noxious agents. Uncontrolled cellular infiltration into tissues can lead to chronic inflammation and toxic release of substances such as superoxide anions. FPRL1 may constitute an important molecular target for the development of new therapeutic agents to combat excessive inflammatory responses. The activation of FPRL1 by A β ₁₋₄₂ or PrP₁₀₆₋₁₂₆ may be responsible for accumulation and activation of mononuclear phagocytes (monocytes and microglia) as well as fibrillar formation that is associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease and prion diseases, respectively (18). FPRL1 has been shown to participate in the process of

endocytosis and subsequent aggregation of A β ₁₋₄₂ in mononuclear phagocytes (51). It has also been described that the endogenous peptide humanin would exert its neuroprotective effects by competitively inhibiting the access of A β ₁₋₄₂ to FPRL1 (52). Nevertheless, not only FPRL1 but also a number of other putative surface receptors have been described to interact with A β ₁₋₄₂ (53). The Alzheimer patient will benefit from a combination of different drugs and the development of FPRL1-specific antagonists may have promising therapeutic potential in retarding the progression of the disease.

The leukocyte binding profile of FLIPr is also intriguing. In our experiments, FLIPr-FITC binding was observed to monocytes, neutrophils, B-cells, a subpopulation of CD8⁺ lymphocytes (most likely the NKT-cells), and also very clearly to natural killer cells. Monocytes express more FPRL1 than neutrophils, but less is reported for lymphocytes. Human CD3⁺ T-lymphocytes showed a weak migration in response to high concentrations of T21/DP107, which could be mediated by the presence of FPRL1 (54). Natural killer cells express receptors for several chemo-attractants. They migrate toward concentration gradients of C5a and fMLP, and chemokines also appear to play an important role in afferent and efferent NK cell responses to both infected and neoplastic cells (55). The expression of receptors for CXC chemokines, CC chemokines and CX3C chemokines has been described (56). Presence of FPRL1 on natural killer cells has not been described, although the effect of the FPRL1 agonist Lipoxin A4 on NK cells has been reported (57). On the other hand, just as CHIPS was found to bind and functionally inhibit two different GPCRs (5), it is not unlikely that FLIPr also binds to a receptor other than FPRL1.

REFERENCES

1. Lowy, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. *N.Engl.J.Med.* 339:520-532.
2. Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat.Rev.Microbiol.* 3:948-958.
3. Charo, I. F. and R. M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N.Engl.J.Med.* 354:610-621.
4. Ji, T. H., M. Grossmann, and I. Ji. 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J.Biol.Chem.* 273:17299-17302.
5. de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2004. Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus, a Bacterial Antiinflammatory Agent. *J.Exp.Med.* 199:687-695.
6. Postma, B., M. J. Poppelier, J. C. van Galen, E. R. Prossnitz, J. A. van Strijp, C. J. de Haas, and K. P. van Kessel. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J.Immunol.* 172:6994-7001.
7. Lacy, M., J. Jones, S. R. Whittemore, D. L. Haviland, R. A. Wetsel, and S. R. Barnum. 1995. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J.Neuroimmunol.* 61:71-78.
8. McCoy, R., D. L. Haviland, E. P. Molmenti, T. Ziambaras, R. A. Wetsel, and D. H. Perlmutter. 1995. N-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. *J.Exp.Med.* 182:207-217.
9. Sozzani, S., F. Sallusto, W. Luini, D. Zhou, L. Piemonti, P. Allavena, J. Van Damme, S. Valitutti, A. Lanzavecchia, and A. Mantovani. 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J.Immunol.* 155:3292-3295.
10. Christophe, T., A. Karlsson, C. Dugave, M. J. Rabiet, F. Boulay, and C. Dahlgren. 2001. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH2 specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J.Biol.Chem.* 276:21585-21593.
11. Le, Y., P. M. Murphy, and J. M. Wang. 2002. Formylpeptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 23: 541-548.
12. Yang, D., Q. Chen, Y. Le, J. M. Wang, and J. J. Oppenheim. 2001. Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *J.Immunol.* 166:4092-4098.
13. Le, Y., J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 2001. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:91-105.

14. Fu, H., J. Karlsson, J. Bylund, C. Movitz, A. Karlsson, and C. Dahlgren. 2006. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 79:247-256.
15. Su, S. B., W. Gong, J. L. Gao, W. Shen, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 1999. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J.Exp.Med.* 189:395-402.
16. Le, Y., W. Gong, H. L. Tiffany, A. Tumanov, S. Nedospasov, W. Shen, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 2001. Amyloid {beta}42 Activates a G-Protein-Coupled Chemoattractant Receptor, FPR-Like-1. *J.Neurosci.* 21:RC123.
17. Le, Y., H. Yazawa, W. Gong, Z. Yu, V. J. Ferrans, P. M. Murphy, and J. M. Wang. 2001. The neurotoxic prion peptide fragment PrP(106-126) is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J.Immunol.* 166:1448-1451.
18. Cui, Y., Y. Le, H. Yazawa, W. Gong, and J. M. Wang. 2002. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J.Leukoc.Biol.* 72:628-635.
19. Hu, J. Y., Y. Le, W. Gong, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, and J. M. Wang. 2001. Synthetic peptide MMK-1 is a highly specific chemotactic agonist for leukocyte FPRL1. *J.Leukoc.Biol.* 70:155-161.
20. Le, Y., W. Gong, B. Li, N. M. Dunlop, W. Shen, S. B. Su, R. D. Ye, and J. M. Wang. 1999. Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation. *J.Immunol.* 163:6777-6784.
21. Christophe, T., A. Karlsson, M. J. Rabiet, F. Boulay, and C. Dahlgren. 2002. Phagocyte activation by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met, acting through FPRL1/LXA4R, is not affected by lipoxin A4. *Scand.J.Immunol.* 56:470-476.
22. Migeotte, I., E. Riboldi, J. D. Franssen, F. Gregoire, C. Loison, V. Wittamer, M. Dethoux, P. Robberecht, S. Costagliola, G. Vassart, S. Sozzani, M. Parmentier, and D. Communi. 2005. Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *J.Exp.Med.* 201:83-93.
23. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
24. Postma, B., W. Kleibeuker, M. J. Poppelier, M. Boonstra, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and C. J. de Haas. 2005. Residues 10-18 within the C5a receptor N terminus compose a binding domain for chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus. *J.Biol.Chem.* 280:2020-2027.
25. Veldkamp, K. E., K. P. van Kessel, J. Verhoef, and J. A. van Strijp. 1997. Staphylococcal culture supernates stimulate human phagocytes. *Inflammation* 21:541-551.
26. Keller, H. U., A. Fedier, and R. Rohner. 1995. Relationship between light scattering in flow cytometry and changes in shape, volume, and actin polymerization in human polymorphonuclear leukocytes. *J.Leukoc.Biol.* 58:519-525.
27. Bae, Y. S., Y. Kim, Y. Kim, J. H. Kim, P. G. Suh, and S. H. Ryu. 1999. Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met is a chemoattractant for human phagocytic cells. *J.Leukoc.Biol.* 66:915-922.
28. van Kessel, K. P., J. A. van Strijp, and J. Verhoef. 1991. Inactivation of recombinant human tumor necrosis factor-alpha by proteolytic enzymes released from stimulated human neutrophils. *J.Immunol.* 147:3862-3868.
29. McGeer, E. G. and P. L. McGeer. 2003. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27:741-749.
30. Bae, Y. S., H. Y. Lee, E. J. Jo, J. I. Kim, H. K. Kang, R. D. Ye, J. Y. Kwak, and S. H. Ryu. 2004. Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling. *J.Immunol.* 173:607-614.
31. Tiffany, H. L., M. C. Lavigne, Y. H. Cui, J. M. Wang, T. L. Leto, J. L. Gao, and P. M. Murphy. 2001. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J.Biol.Chem.* 276:23645-23652.
32. Diomedede, L., S. Sozzani, W. Luini, M. Algeri, L. De Gioia, R. Chiesa, P. M. Lievens, O. Bugiani, G. Forloni, F. Tagliavini, and M. Salmona. 1996. Activation effects of a prion protein fragment [PrP-(106-126)] on human leucocytes. *Biochem.J.* 320 (Pt 2):563-570.
33. Fiore, S., J. F. Maddox, H. D. Perez, and C. N. Serhan. 1994. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J.Exp.Med.* 180:253-260.
34. Colgan, S. P., C. N. Serhan, C. A. Parkos, C. Delp-Archer, and J. L. Madara. 1993. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J.Clin.Invest* 92:75-82.
35. Lee, T. H., C. E. Horton, U. Kyan-Aung, D. Haskard, A. E. Crea, and B. W. Spur. 1989. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin.Sci.(Lond)* 77:195-203.
36. Murphy, P. M., T. Ozcelik, R. T. Kenney, H. L. Tiffany, D. McDermott, and U. Francke. 1992. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome

- mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J.Biol.Chem.* 267:7637-7643.
37. Browning, D. D., Z. K. Pan, E. R. Prossnitz, and R. D. Ye. 1997. Cell type- and developmental stage-specific activation of NF-kappaB by fMet-Leu-Phe in myeloid cells. *J.Biol.Chem.* 272:7995-8001.
 38. Gao, J. L., E. J. Lee, and P. M. Murphy. 1999. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N- formylpeptide receptor. *J.Exp.Med.* 189: 657-662.
 39. Deng, X., H. Ueda, S. B. Su, W. Gong, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, and J. M. Wang. 1999. A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* 94: 1165-1173.
 40. Li, B. Q., M. A. Wetzel, J. A. Mikovits, E. E. Henderson, T. J. Rogers, W. Gong, Y. Le, F. W. Ruscetti, and J. M. Wang. 2001. The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood* 97:2941-2947.
 41. Betten, A., J. Bylund, T. Cristophe, F. Boulay, A. Romero, K. Hellstrand, and C. Dahlgren. 2001. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J.Clin.Invest* 108:1221-1228.
 42. De, Y., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J.Exp.Med.* 192:1069-1074.
 43. Nagaoka, I., H. Tamura, and M. Hirata. 2006. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *J.Immunol.* 176:3044-3052.
 44. Boman, H. G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J.Intern.Med.* 254: 197-215.
 45. Sieprawska-Lupa, M., P. Mydel, K. Krawczyk, K. Wojcik, M. Puklo, B. Lupa, P. Suder, J. Silberring, M. Reed, J. Pohl, W. Shafer, F. McAleese, T. Foster, J. Travis, and J. Potempa. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48:4673-4679.
 46. Fedtke, I., F. Gotz, and A. Peschel. 2004. Bacterial evasion of innate host defenses--the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int.J.Med.Microbiol.* 294:189-194.
 47. Elagoz, A., D. Henderson, P. S. Babu, S. Salter, C. Grahames, L. Bowers, M. O. Roy, P. Laplante, E. Grazzini, S. Ahmad, and P. M. Lembo. 2004. A truncated form of CKbeta8-1 is a potent agonist for human formyl peptide-receptor-like 1 receptor. *Br.J.Pharmacol.* 141:37-46.
 48. Bae, Y. S., J. C. Park, R. He, R. D. Ye, J. Y. Kwak, P. G. Suh, and R. S. Ho. 2003. Differential signaling of formyl peptide receptor-like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH2 or lipoxin A4 in human neutrophils. *Mol.Pharmacol.* 64:721-730.
 49. Maddox, J. F., M. Hachicha, T. Takano, N. A. Petasis, V. V. Fokin, and C. N. Serhan. 1997. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J.Biol.Chem.* 272:6972-6978.
 50. Le, Y., R. D. Ye, W. Gong, J. Li, P. Iribarren, and J. M. Wang. 2005. Identification of functional domains in the formyl peptide receptor-like 1 for agonist-induced cell chemotaxis. *FEBS J.* 272: 769-778.
 51. Yazawa, H., Z. X. Yu, Takeda, Y. Le, W. Gong, V. J. Ferrans, J. J. Oppenheim, C. C. Li, and J. M. Wang. 2001. Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB J.* 15:2454-2462.
 52. Ying, G., P. Iribarren, Y. Zhou, W. Gong, N. Zhang, Z. X. Yu, Y. Le, Y. Cui, and J. M. Wang. 2004. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J.Immunol.* 172:7078-7085.
 53. Verdier, Y. and B. Penke. 2004. Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr.Protein Pept.Sci.* 5:19-31.
 54. Su, S. B., Gao Ji, Gong Wh, N. M. Dunlop, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 1999. T21/DP107, A synthetic leucine zipper-like domain of the HIV-1 envelope gp41, attracts and activates human phagocytes by using G- protein- coupled formyl peptide receptors. *J.Immunol.* 162:5924-5930.
 55. Robertson, M. J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J.Leukoc.Biol.* 71: 173-183.
 56. Maghazachi, A. A. 2003. G protein-coupled receptors in natural killer cells. *J.Leukoc.Biol.* 74: 16-24.
 57. Serhan, C. N. 1991. Lipoxins: eicosanoids carrying intra- and intercellular messages. *J.Bioenerg.Biomembr.* 23:105-122.

1. This work was supported by the grants “Fondo de Investigacion Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (expediente 01/F062)” and “Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)”, both to C. Prat, and by the European Union (LSHM-CT-2004-512093) and the Netherlands Genomics Initiative (050-71-249).
2. **Abbreviations used:** A β , amyloid beta; CHIPS, Chemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococcus aureus; C5aR, C5a Receptor; FPR, formyl peptide receptor; FPRL1, FPR-like receptor; GPCR, G protein-coupled receptor; LTB₄, leukotriene B₄; PAF, platelet activating factor; PrP, prion protein.

Characterization of the Molecular Properties of Staphylococcal Formyl-Peptide Receptor-Like Antagonists

Cristina Prat,^{1,2} Jovanka Bestebroer,¹ Carla J.C. de Haas,¹ Jos A.G. van Strijp,¹ and Kok P.M. van Kessel¹

¹Eijkman-Winkler Institute, University Medical Center Utrecht (UMCU), G04.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht, The Netherlands. ²Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Universitat Autònoma de Barcelona.

ABSTRACT. *Staphylococcus aureus* produces a large array of excreted proteins that are able to evade several steps of the innate immune system. We recently described Formyl Peptide Receptor-like 1 Inhibitory Protein (FLIPr), a new staphylococcal anti-inflammatory protein which acts as a potent inhibitor of neutrophil and monocyte chemotaxis toward FPRL1 specific ligands. Here we describe the molecular properties of FLIPr-like, a protein with a high homology with FLIPr that impairs the phagocyte response to FPR and FPRL1 agonists. We show that the N-terminus of FLIPr-like plays an important role in the activity towards FPR and FPRL1. To narrow the active site of these new anti-inflammatory molecules is of crucial importance because of its potential therapeutic implications, both in staphylococcal infection and neurodegenerative diseases, and in order to reduce its immunogenicity.

Keywords. *Staphylococcus aureus*, chemotaxis, formyl peptide receptors

Introduction

S *Staphylococcus aureus* produces numerous surface and secreted extracellular proteins that contribute to the pathogenesis of infection, by causing direct cellular damage and/or by interacting with host defense factors (1). *S. aureus* also excretes a variety of immunomodulatory proteins that compromise both humoral and cell-mediated immunity in order to delay detection of the microorganism by the host immune system (2). We have previously reported the molecular properties of secreted staphylococcal proteins that contribute in evading host defense mechanisms. The newly described proteins are able to interfere with several pathways of the complex cascade of events of the innate immune response, such as chemoattractant-mediated phagocytic activation and migration (3, 4) and complement activation (5).

We recently described Formyl Peptide Receptor-like 1 Inhibitory Protein (FLIPr), a new staphylococcal anti-inflammatory protein. FLIPr is a potent inhibitor of neutrophil and monocyte chemotaxis toward FPRL1 specific ligands such as the synthetic peptides MMK-1 (6) and WKYMVM (7), and endogenous proteins such as amyloid beta 1-42 and PrP₁₀₆₋₁₂₆ (4). The earlier experiments suggested that FLIPr might bind directly to the G-protein coupled receptor FPRL1. FPRL1 not only plays a role in innate immune mechanisms (8) but there is also increasing evidence for its implication in the pathogenesis of amyloidogenic diseases (9-11). FPRL1 has been reported to mediate the migration and activation of monocytes and microglia induced by A β 42 (11), participating in A β 42 uptake and the resultant fibrillar formation. Persistent exposure of macrophages to A β 42 resulted in retention of A β 42/FPRL1 complexes in the

cytoplasmic compartment and the formation of Congo red positive fibrils (12). The pathologic isoform of the prion protein has also been proposed as a chemotactic agonist for the FPRL1 (9). Agents that are able to disrupt the interaction of these components with its receptor may have promising therapeutic potential for FPRL1-mediated diseases. The importance of FLIPr as a candidate for the development of potential anti-inflammatory agents gave enough rationale for seeking for homologous proteins in the *S. aureus* genome, as well as its cloning and expression. Simultaneously, recombinant deletion and substitution mutants of FLIPr were constructed in order to try to elucidate the active site within the molecule, in order to identify small molecular anti-inflammatory compounds that keep activity but reduce immunogenicity.

The program *blastp* and the *S. aureus* genome database at www.ncbi.nlm.nih.gov were used to check for sequence similarities with FLIPr (without the signal peptide). A protein was found showing 73% homology with FLIPr, and was present in two of the six strains screened: hypothetical protein MW1038 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MW2) and hypothetical protein SAS1089 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MSSA476). The protein, which was named FLIPr-like, contains 104 aminoacids (in bold), preceded by a signal peptide and a signal-peptidase site (underlined).

**MKKNITKTIIASTVIAAGLLTQTNDAKAFFSYE
WKGLEIAKNLADQAKKDDERADKLIKEADE
KNEHYKGTVEDLYVIAKKMGKNTIAVVKI
KDGKNGYYTFDITRPLEEHRKNIPVVKNGE
IDSITWY.** The sequence alignment between FLIPr and FLIPr-like is shown in figure 1.

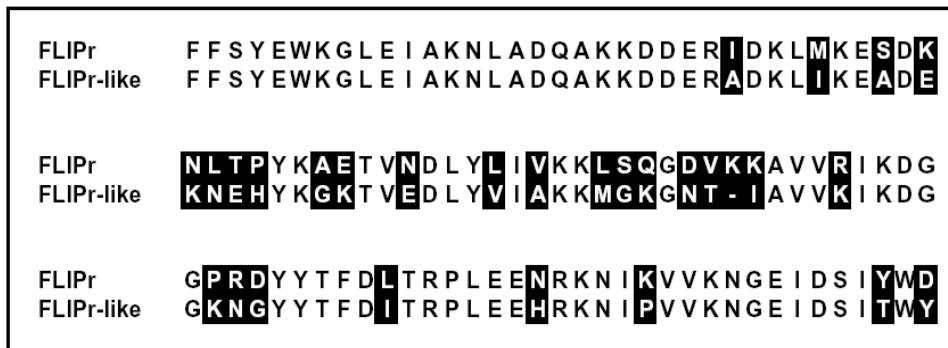


Figure 1. Sequence alignment (using the Clustal W sequence alignment program) showing similarities between FLIPr and FLIPr-like amino acid sequence. The shaded boxes mark mismatched residues.

We show here that FLIPr-like has the same action than FLIPr and also binds to FPRL1 and blockades FPRL1-mediated responses, but it is more potent in inhibiting fMLP-induced responses. We also illustrate the one of the potential active sites within the molecule, showing that the N-terminus plays an important role in the activity towards both the FPR and FPRL1.

Methods

Reagents. MMK-1 or L-peptide (LESIFRSLFRVM) was synthesized by Sigma-Genosys. fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). Recombinant C5a, anti-FLAG mAb and propidium iodide were from Sigma-Aldrich. WKYMVm was synthesized by John AW Kruijter (Department of Medicinal Chemistry, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht, The Netherlands). WKYMVm was obtained from Bachem. Fluo-3-AM (acetoxymethyl ester), and Fura-red-AM were obtained from Molecular Probes. APC-labelled goat anti-mouse Ig was from BD Biosciences Pharmingen.

Cloning and expression of FLIPr-like.

Primers were designed according to the published sequence of the gene, for the cloning of FLIPr-like into pRSET vector (Invitrogen) and were manufactured by Invitrogen™ life technologies. A collection of *S.aureus* strains was screened for the presence of the gene by polymerase chain reaction (PCR) using the set of primers 5'-TTCTTTAGTTAT-3' as sense primer and 5'-GCCGAATTCTTAATACCAAGTAATCGAA-3' as reverse primer. One of the positive strains was used as target DNA for cloning of the protein. Recombinant protein was generated by PCR and cloned into the EcoRI and XbaI site of the pRSET vector by overlap extension PCR (13) as described earlier (14). The amplification reactions were performed using

PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene, Cedar Creek, TX). The recombinant protein was propagated in TOP10 *E.coli* (Novagen). After verification of the correct sequence, the protein was expressed in Rosetta Gami (DE3)pLysS *E.coli* (Novagen) by induction with 1mM IPTG (Invitrogen). Expression of the protein was checked by SDS-PAGE (Mini Protean® 3 System, Bio-Rad) and Coomassie blue staining. Protein was present in the insoluble fraction, so the denaturing protocol was followed for purification. Bacteria were lysed with guanidine lysis buffer. Urea was used for denaturing, and the histidine-tagged protein was purified using a nickel column (HiTrap Chelating HP, 5 ml, Amersham biosciences) following manufacturer's instructions, and cleaved afterwards with enterokinase (Invitrogen).

Initially the protein was bound to the column and could be eluted with EDTA buffer. SDS PAGE of the samples with higher O.D showed digested protein, so it was considered an unspecific binding to the column. The sample was dialyzed again on phosphate buffer, and flowed through the column the next day. Phosphate buffers with lower pH (pH 7.8, pH 6, pH 5.3) were successively flowed through and samples were collected every time. A SDS-PAGE gel was runned with the samples with the higher O.D. and two different bands of purified protein could be observed, corresponding to 12 Kd and 11 Kd respectively, and separated by means of the pH. The corresponding fractions were pooled and dialyzed separately in PBS. The next day, O.D. was measured at 280 nm and concentration of the protein was calculated according to molar extinction coefficient. The N-terminus of the two fractions of the protein were excised and sequenced by the Sequence Center Utrecht. The results obtained showed the 12 Kd band as being the total protein (FLIPr-like, first 5 Aas: FFSYE) and the 11 Kd

band as being a cleavage product without the first seven aminoacids, FLIPr-like 1-104 (underlined, first 5 Aas: GLEIA).

FFSYEWKGLEIAKNLADQAKKDDERADKLIK
EADKNEHYKGTVEDLYVIAKKMGKGNITIA
VVKIKDGGKNGYYTFDITRPLEEHRKNIPVVK
NGEIDSITWY

The protein (the fraction of the total protein) was labelled with FITC (fluorescein isothiocyanate, Sigma) for binding experiments, as described before (4).

Construction of FLIPr mutants and chimeras. Site-directed mutagenesis was performed on the FLIPr N-terminus by deletion of the first (FLIPr $_{\Delta F1}$) or the first two (FLIPr $_{\Delta F1F2}$) amino acids, both phenylalanines, and cloning in pRSET vector by overlap extension PCR as described above. Using the same methodology, two chimeras were constructed: CH1-6-FLIPr, in which amino acids 1-6 were substituted for amino acids 1-6 from CHIPS, and FL1-6-CHIPS, in which amino acids 1-6 were from FLIPr and the rest of the molecule (7-121) was from CHIPS. The following 5' primers were used to amplify CH1-6-FLIPr, FL1-6-CHIPS, FLIPr $_{\Delta F1}$ and FLIPr $_{\Delta F1F2}$ respectively:

5'-

GTTTACTTTTGAACCGTTTAAAGGTTTAGAA
ATCGCAA-3', 5'-TTCCTTAGTTATGAATG

GCCTACAAATGAAGAAATAGA-3', 5'-
GTTTAGTTATGAATGGAAGGTTTAG-3' and
5'-GAGTTATGAATGGAAGGTTTAG-3'. The
following primers containing the EcoRI
digestion site (underlined) were used as
reverse primers: 5'-
GTCCTGAAATCTTAATCCCAATAAATCG

AGTCG-3' for CH1-6-FLIPr, FLIPr $_{\Delta F1}$ and
FLIPr $_{\Delta F1F2}$ and 5'-
GCTACTAGCTGAAATCTTAGTATGCATATT
CATTAG-3' for FL1-6-CHIPS.

The competent cells BL21(DE3) *E. coli* (Novagen) were used to express the mutants and chimeras. After verification of the correct sequence, all proteins were expressed and purified using a nickel column (ProBond Resin, Invitrogen) following manufacturer's instructions.

Synthetic peptides. Peptides with amino acids 1-6 from FLIPr and amino acids 1-6 from CHIPS were synthesized (Dr. R. van der Zee, Institute of Infectious Diseases and Immunology, Utrecht University, The Netherlands) as described before (14)

Leukocyte isolation. Venous blood was collected from healthy volunteers into tubes containing sodium heparin. Once diluted with an equal volume of phosphate buffer saline (PBS), it was layered onto a gradient of 12ml Histopaque (Sigma Diagnostics) and 10ml Ficoll (Amersham Biosciences) and centrifuged for 20 min at 397g at 21°C. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and polymorphonuclear neutrophils (PMN) were collected separately from Ficoll and Histopaque interfases, respectively. Cells were then washed with cold RPMI-1640 (containing 25mM Hepes and L-glutamine, Biowhittaker) with 0.05% human serum albumine (RPMI-HSA). For elimination of erythrocytes, PMN pellet was subjected to a hypotonic shock by adding distilled H₂O for 30 seconds and subsequently adding ten-times concentrated PBS to end the process, and washed afterwards. Cells (both PMN and PBMC) were then resuspended to a concentration of 1.10^7 cells/ml in RPMI-HSA.

Calcium mobilization. The activation of neutrophils by chemoattractants binding to G-protein coupled receptors initiates a rapid and transient increase in the free intracellular calcium concentration (15). Calcium mobilization with isolated human neutrophils and monocytes was measured as previously described (16). In brief, the PMN fraction (5.10^6 cells/ml) was loaded with 2µM Fluo-3-AM or Fura-red-AM for 20 min at room temperature, protected from light and under constant shaking. The cells were then washed and resuspended in RPMI-HSA. Equal parts of cell suspension were incubated with buffer or a range of concentrations of protein (FLIPr or CHIPS) for 20 min. The cells were then monitored for calcium mobilization over time, first for about 10 seconds, to determine the basal fluorescence level, and then for 50 seconds after adding the concentrated stimulus. Fluorescence was measured at 530nm (when Fluo-3-AM) or 560nm (when Fura-red-AM) using a flow cytometer (FACSCalibur or FACScan, Becton Dickinson). Functional assays were also performed with monocytes, after labelling PBMC with anti-CD14 monoclonal antibody.

HEK293 cells. Human embryonic kidney cells were transfected with plasmids containing the DNA encoding a FLAG-tagged version of the membrane receptors FPR, FPRL1 and C5aR as described before (4, 17)

Binding assays. To determine the binding of FLIPr-like to different cell types, fractions of PMN and PBMC suspension were mixed and diluted to 5×10^6 cells/ml with 1 ml RPMI-HSA

1%. Cells were incubated at 4°C or 37°C for 10 min. Subsequently, the cells were incubated with buffer or FITC-labelled protein in a range of concentrations during 30 min. Cells were then washed and resuspended in RPMI-HSA. The FL1 of 17500 cells was measured by flow cytometry.

Binding assays using HEK293. Cells transfected with each of the receptors were incubated with mouse anti-FLAG mAb in a final concentration of 10µg/ml for 45 minutes at 4°C. Cells were then washed by spinning 10 min at 1200 rpm, and resuspended in RPMI-HSA. Afterwards, APC-labelled goat anti-mouse antibody was added in a final concentration of and also different concentrations of FITC-labelled protein. Cells were incubated 45 min at 4°C, and then 200µl

of RPMI-HSA with propidium iodide 5µg/ml were added. FL1 (FITC), FL2 (propidium iodide) and FL4 (APC) were measured in a flow cytometer. As a control, an empty pcDNA3.1 was used, and binding of CHIPS-FITC was also measured.

RESULTS

FLIPr-like binds to neutrophils, monocytes and a proportion of lymphocytes

Neutrophils, monocytes and lymphocytes were gated based on forward and sideward scatters and the fluorescence intensity of FLIPr-like-FITC binding was quantified. Binding of FLIPr-like-FITC could be observed to neutrophils, monocytes and a proportion of lymphocytes in a similar way to that observed with FLIPr-FITC (Fig. 2)

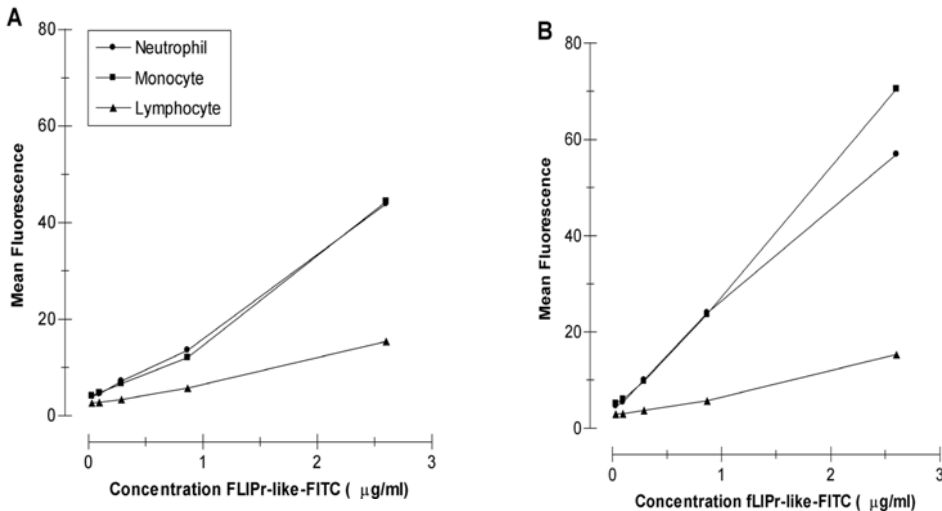


Figure 2. FLIPr-like binds to neutrophils, monocytes and a proportion of lymphocytes. Isolated PMN and mononuclear cells were incubated with a range of concentrations of FLIPr-like-FITC (0.03 to 2.6 µg/ml) for 30 min on ice (A) or at 37°C (B) under constant shaking. Cells were then washed and resuspended in RPMI-HAS and fluorescence was measured in a flow cytometer. Cells were identified based on scatter parameters and anti-CD14 staining; neutrophils (●), monocytes (■) and lymphocytes (▲). A representative experiment is shown.

FLIPr-like inhibits fMLP, MMK-1 and WKYMVM induced activation of neutrophils.

We examined whether FLIPr-like could block the activation of FPR and FPRL1 by specific ligands such as fMLP and the synthetic peptides MMK-1 and WKYMVM. We tested

the calcium mobilization in neutrophils, with and without preincubation with FLIPr-like, and using CHIPS as control (Fig. 3). Calcium mobilization assays were performed also with the FITC-labelled protein and using fura-red-AM as a calcium probe, and its function was kept. (data not shown).

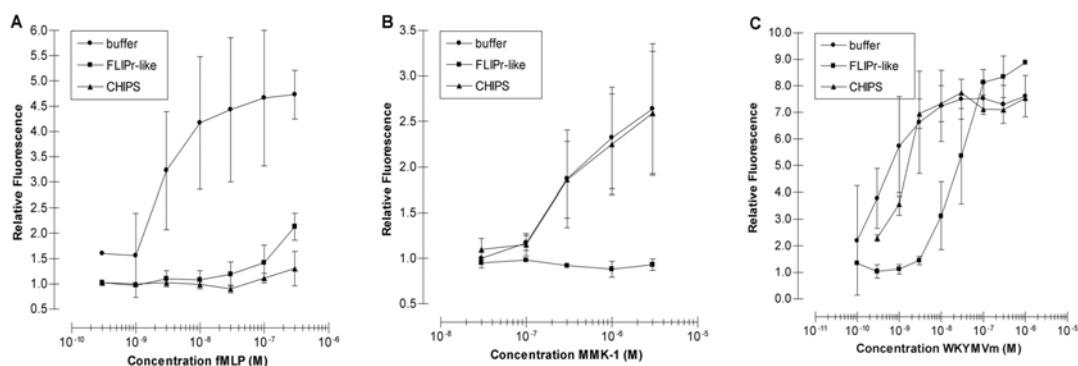


Figure 3. FLIPr-like inhibits fMLP, MMK-1 and WKYMVm-induced activation of neutrophils. Neutrophils were incubated with buffer (●), 3 $\mu\text{g/ml}$ FLIPr-like (■) or CHIPS (▲) for 20 minutes at room temperature. For calcium mobilization cells were preloaded with Fluo-3. Each sample was first measured for about 10 seconds to determine the basal fluorescence and subsequently increasing concentrations of fMLP (A), MMK-1 (B) or WKYMVm (C) were added and rapidly placed back in the sample holder to continue the measurement. Cells were analyzed in a flow cytometer and activation was expressed as the ratio of the fluorescence value before (cells acquired between $T = 5$ till 7 seconds) / after addition of stimulus (cells acquired at $T = 12$ till 14 seconds after stimulation). Data are mean \pm SEM of three independent experiments.

FLIPr-like inhibits fMLP-induced activation of neutrophils more potently than FLIPr.

Incubation of neutrophils with FLIPr-like resulted in the inhibition of fMLP-induced calcium mobilization. The inhibition of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was dose-dependent, and lower concentrations of FLIPr-like were effective. Furthermore, while FLIPr inhibits $3 \times 10^{-9} \text{M}$

fMLP, FLIPr-like was able to inhibit up to 10^{-7}M fMLP. The inhibition of MMK-1-induced calcium mobilization was the same for FLIPr and FLIPr-like (Fig. 4). Because the results mimicked the activity of CHIPS on fMLP, the ability of FLIPr-like to block the C5a-mediated calcium mobilization was also tested. FLIPr-like did not show any activity on C5aR (data not shown).

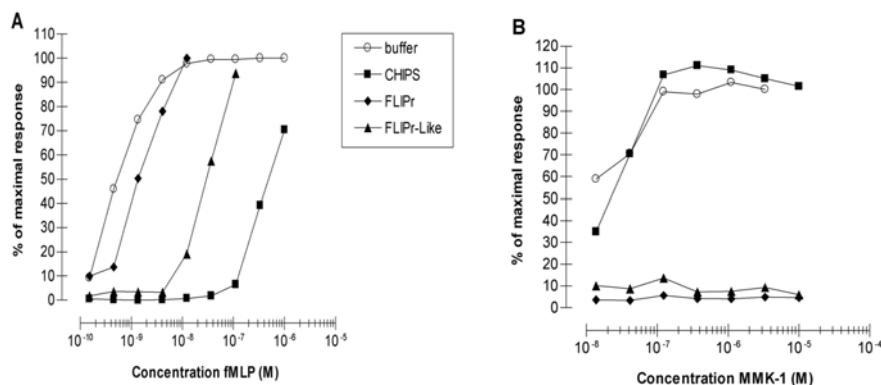


Figure 4. FLIPr-like inhibits fMLP-induced activation of neutrophils more potently than FLIPr but has the same activity than FLIPr in inhibition of MMK-1-induced activation of neutrophils. Neutrophils were incubated with buffer (○), 3 $\mu\text{g/ml}$ FLIPr-like (▲), FLIPr (◆) or CHIPS (■) for 20 minutes at room temperature. For calcium mobilization cells were preloaded with Fluo-3. Each sample was first measured for about 10 seconds to determine the basal fluorescence and subsequently increasing concentrations of fMLP (A) or MMK-1 (B) were added and rapidly placed back in the sample holder to continue the measurement. Cells were analyzed in a flow cytometer. Results are expressed as % of maximal response (relative to the maximal activation by the optimal stimulus concentration).

FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ inhibits MMK-1 induced responses and does not inhibit fMLP-induced activation of neutrophils.

To investigate the importance of the N-terminus in FLIPr-like activity, the protein lacking the residues 1-7 (FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴) (Fig. 5) was also tested in their ability to block to fMLP and MMK-1-mediated calcium mobilization in neutrophils. While the MMK-1 blocking activity was completely intact, FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ did not show any blocking activity on fMLP-induced activation. These results suggested a possible active site in the N-terminus for fMLP-mediated responses. The same experiments were performed with the his-tagged version of the proteins (before enterokinase cleavage), both FLIPr and FLIPr-

like, and both kept its activity on MMK-1 but lost it on fMLP, confirming the implication of the N-terminus (Fig. 6 and 7).

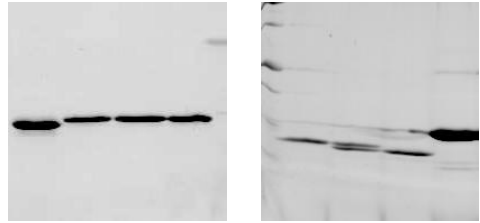


Figure 5. SDS-PAGE gel with Coomassie Blue staining showing purified FLIPr-like protein (12 Kd) and FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ (11Kd).

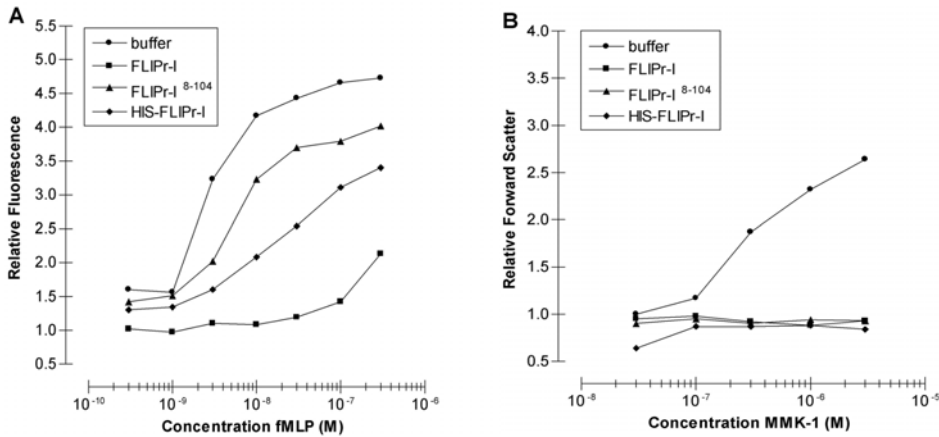


Figure 6. FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ inhibits MMK-1 induced responses and does not inhibit fMLP-induced activation of neutrophils. Neutrophils were incubated with buffer (●), 3 μg/ml FLIPr-like (■), FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ (▲) or His-FLIPr-like (◆) for 20 minutes at room temperature. Cells were preloaded with Fluo-3 for calcium mobilization. Each sample was first measured for about 10 seconds to determine the basal fluorescence and subsequently increasing concentrations of fMLP (A) or MMK-1 (B) were added and rapidly placed back in the sample holder to continue the measurement. Cells were analyzed in a flow cytometer.

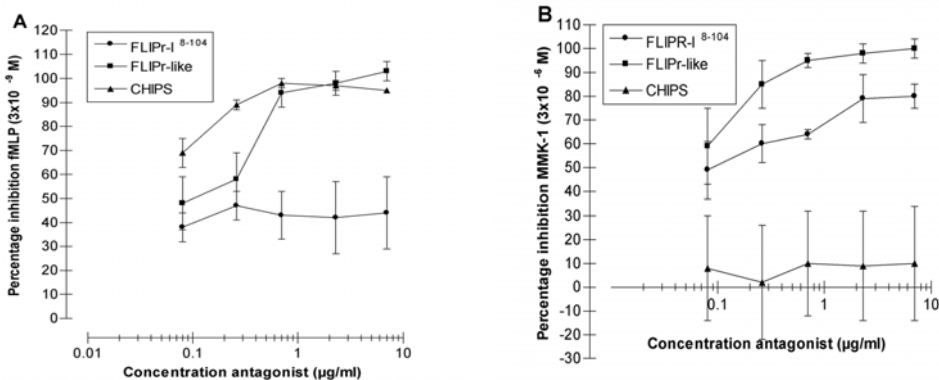


Figure 7. FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ has similar potency to FLIPr-like on MMK-1 but not on fMLP-induced activation of neutrophils. The activity of different concentrations of CHIPS, FLIPr-like and FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴ was tested in calcium mobilization assays with neutrophils in response to fMLP and MMK-1. Data are mean ± SEM of three independent experiments.

FLIPr-like binds to HEK293 cells transfected with FPRL1

The FITC-labelled protein was used in binding experiments with HEK293 cells transfected with FLAG-tagged versions of FPR, FPRL1 and C5aR. The C5aR and an empty pDisplay vector were used as controls. HEK293 cells were gated based on forward and sideward scatter parameters as well as viability, and only cells within these regions were analyzed for expression of the receptor. Finally, the cells expressing the different receptors were analyzed for binding of the FITC-labelled proteins. FLIPr-FITC and CHIPS-FITC were used as controls. FLIPr-like-FITC bound to HEK293 transfected with FPRL1 (Fig. 8). Competition between CHIPS, FLIPr and FLIPr-like for the binding of leukocytes was also performed. Pre-incubation with CHIPS partially inhibited the binding of FLIPr-FITC and FLIPr-like-FITC to both neutrophils and monocytes, suggesting the binding to FPR and not only to FPRL1 (Fig. 9).

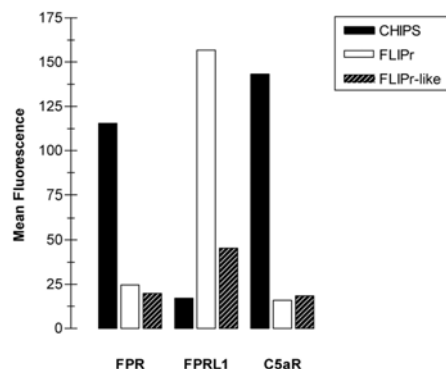
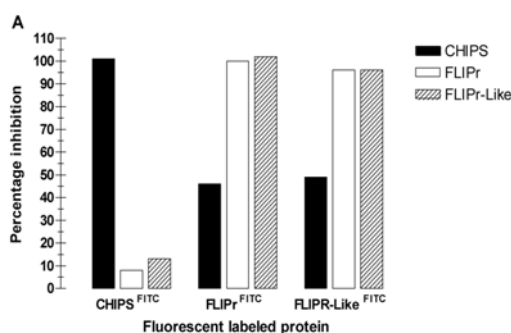


Figure 8 FLIPr-like binds to HEK293 cells transfected with the FPRL1. HEK293 cells were transiently transfected with the vector containing FLAG-tagged human FPR, FPRL1 and C5aR. As control, an empty vector was used. To identify positive transfectants, cells were labeled with anti-FLAG mAb and APC-labeled goat anti-mouse IgG antibody. Simultaneously, FITC-labeled FLIPr-like, FLIPr or CHIPS was added at 3 µg/ml. Cells were resuspended in buffer with propidium iodide and analyzed for binding of FITC-labeled protein to viable, receptor-positive transfectants. Figure shows the mean fluorescence indicating the binding of CHIPS-FITC, FLIPr-FITC and FLIPr-like-FITC to C5aR, FPR, and FPRL1.

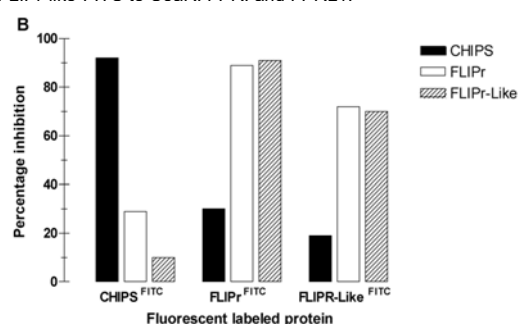


Figure 9. Competition between CHIPS, FLIPr and FLIPr-like for binding to leukocytes.

Isolated neutrophils (A) or monocytes (B) were pre-incubated with CHIPS, FLIPr or FLIPr-like and afterwards with the FITC-labelled proteins. Pre-incubation with CHIPS partially inhibited the binding of FLIPr-FITC and FLIPr-like-FITC to both neutrophils and monocytes. Pre-incubation with FLIPr inhibited the binding of FLIPr-like-FITC to both neutrophils and monocytes, and partially the binding of CHIPS to monocytes. Pre-incubation with FLIPr-like prevented the binding of FLIPr-FITC, but not the binding of CHIPS-FITC.

Constructs and chimeras

To further investigate which parts of the sequence are important in the activity of FLIPr, calcium mobilization assays were performed with the mutants and the peptides. The mutant of FLIPr lacking the first N-terminal amino acid (FLIPr_{ΔF1}) presented similar activity than FLIPr on both fMLP and MMK-1, suggesting that the first Phe is not important for its function. The mutant lacking the first two N-terminal amino acids (FLIPr_{ΔF1F2}) lost its activity on both fMLP and MMK-1-induced responses. The peptide

FLIPr1-6 kept its activity on fMLP but lost the action on MMK-1 (data not shown). Interestingly, the chimera CH1-6-FLIPr had no activity on both fMLP and MMK-1, and the chimera FL1-6-CHIPS kept the activity on fMLP but lost it on MMK-1. These results are consistent with the hypothesis of the N-terminus as the active site of both FLIPr and FLIPr-like on fMLP-mediated responses. Nevertheless, some part of the N-terminus seems to be important for the activity on MMK-1 (Fig. 10).

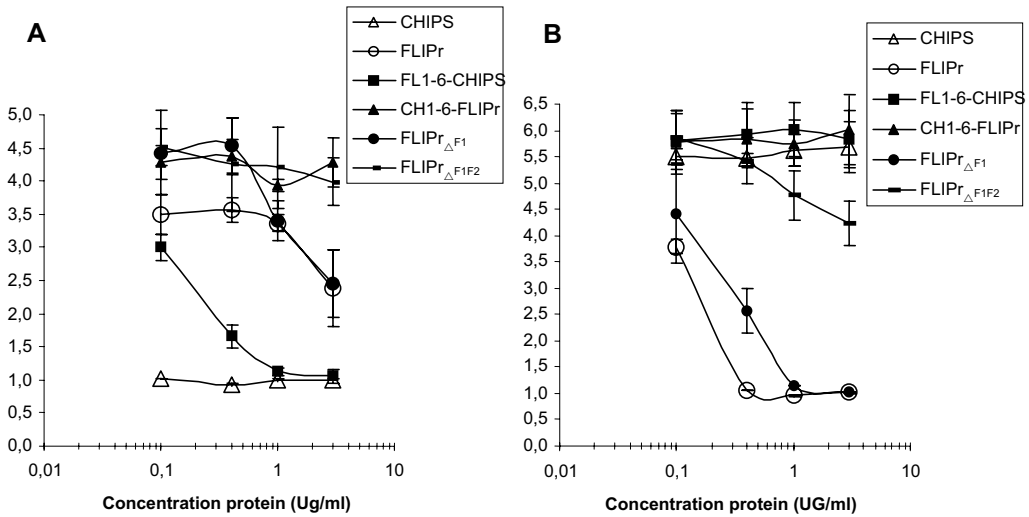


Figure 10. Activity of constructs and chimeras on fMLP and MMK-1.

The activity of different concentrations of CHIPS (Δ), FLIPr (○), FLIPr_{ΔF1} (●), FLIPr_{ΔF1F2} (◐), CH1-6-FLIPr (▲) or FL1-6-CHIPS (■) was tested in calcium mobilization assays with neutrophils in response to fMLP (A) and MMK-1 (B). Data are mean ± SEM of three independent experiments.

DISCUSSION

Although there are very important interindividual differences in the immune, inflammatory and coagulation responses to infection (18), the immune evasion mechanisms expressed by the microorganisms can strongly influence in these responses. In the last years, a growing group of excreted proteins have been described to counteract the antibacterial effects of innate immunity. In *Staphylococcus aureus* these proteins act on specific cellular receptors, on antimicrobial peptides and also on the complement system (19).

Here we describe the molecular properties of staphylococcal proteins that interact with formyl peptide receptors. The activation and migration of phagocytes to the sites of inflammation is a key event in host defense against invading microorganisms and in the pathogenesis of several inflammatory diseases (20). Formylated peptides as fMLP, derived from bacterial and mitochondrial protein synthesis, are some of the most potent chemoattractants for human leukocytes, resulting in directed motility, phagocytosis and superoxide anion generation (20, 21). FPR is the high affinity receptor of fMLP, but two other homologs have been identified, FPRL1 and the monocyte expressed FPRL2 (8). Formyl peptide receptors mediate immune responses to infection, but the identification of novel agonists in the recent years, including host

and microbial products, indicates its complex role in biological processes and broads the spectrum for potential therapeutical approaches. The activation of monocyte-derived cells is thought to play a key role in the inflammatory process leading to the pathogenesis of many neurodegenerative diseases.

We previously reported the interaction of FLIPr-like with the G-protein coupled seven transmembrane receptor FPRL1 (4). FLIPr-like, a newly described protein, presents a binding pattern and a function very similar to FLIPr. FLIPr-like shares with FLIPr the signal peptide and the first twenty-five aminoacids, so a similar function could be expected. Furthermore, in the screened *S.aureus* isolates, the gene encoding FLIPr-like was present in strains that did not contain the gene encoding FLIPr.

The cleavage product of FLIPr-like lacking amino acids 1-7 (FLIPr-like⁸⁻¹⁰⁴) conserved the blocking activity on MMK-1 mediated activation of neutrophils, but lost its activity on fMLP. This indicates that different active sites within the protein are responsible for inhibiting fMLP and MMK-1 induced responses, respectively. The experiments with the peptides, mutants and constructs, were compatible with the hypothesis that the N-terminus plays an important role in both FPR and FPRL1 response. The peptide FLIPr1-6 and also the construct FL1-6-CHIPS kept their activity on

fMLP but lost the action on MMK-1. On the other hand, while the first phenylalanine of CHIPS showed to be the most crucial for its FPR-blocking activity (14), the experiments with the mutant lacking the first phenylalanine of FLIPr showed not decrease in activity. Furthermore, although sharing the first aminoacids, FLIPr-like inhibits fMLP-induced activation of neutrophils more potently than FLIPr. In the case of CHIPS, the C-terminus showed to be also important for its activity (14) so further experiments are needed to explore structural and functional differences between FLIPr and FLIPr-like that can conditionate its mechanism of action. Different ligands act differently on the same receptors, so different structural binding sites are involved in FPR and FPRL1 activation (22).

Another important issue is to explain the fact that *S.aureus* produces several proteins that all act on formyl peptide receptors, indicating a role of these molecules in the pathogenesis of *S.aureus* infections. It is well known that innate immunity recognition of invading microorganisms is mediated by a set of soluble and membrane receptors that recognize pathogen associated molecular patterns (23). Staphylococcal infections can involve any organ system and can range from limited suppurative inflammation to virulent forms of septicemia (1). The expression of proteins that are able to delay the recognition of the microorganism by the host could lead to more severe infections, although it should be explored whether the strains carrying these proteins are associated with more invasive diseases such as osteomyelitis, endocarditis or septic shock. Elucidating the functional role of these factors is expected to enhance our understanding of the pathogenesis of staphylococcal infections, and to increase the therapeutic possibilities. To narrow the active site of these new anti-inflammatory molecules is of crucial importance because of its potential therapeutic implications, both in staphylococcal infection and neurodegenerative diseases, and in order to reduce its immunogenicity.

References

1. Lowy, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 339:520-532.
2. Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 3:948-958.
3. de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. Van Kessel, and J. A. van Strijp. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 199:687-695.
4. Prat, C., J. Bestebroer, C. de Haas, J. van Strijp, and K. van Kessel. 2006. A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1). *Journal of Immunology* Submitted.
5. Rooijakkers, S. H., M. Ruyken, A. Roos, M. R. Daha, J. S. Presanis, R. B. Sim, W. J. van Wamel, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6:920-927.
6. Hu, J. Y., Y. Le, W. Gong, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, and J. M. Wang. 2001. Synthetic peptide MMK-1 is a highly specific chemotactic agonist for leukocyte FPRL1. *J Leukoc Biol* 70:155-161.
7. Christophe, T., A. Karlsson, C. Dugave, M. J. Rabiet, F. Boulay, and C. Dahlgren. 2001. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH2 specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* 276:21585-21593.
8. Le, Y., J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 2001. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:91-105.
9. Le, Y., H. Yazawa, W. Gong, Z. Yu, V. J. Ferrans, P. M. Murphy, and J. M. Wang. 2001. The neurotoxic prion peptide fragment PrP(106-126) is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol* 166:1448-1451.
10. He, R., H. Sang, and R. D. Ye. 2003. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* 101:1572-1581.
11. Le, Y., W. Gong, H. L. Tiffany, A. Tumanov, S. Nedospasov, W. Shen, N. M. Dunlop, J. L. Gao, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 2001. Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci* 21:RC123.
12. Yazawa, H., Z. X. Yu, Takeda, Y. Le, W. Gong, V. J. Ferrans, J. J. Oppenheim, C. C. Li, and J. M. Wang. 2001. Beta amyloid peptide (Aβ42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *Faseb J* 15:2454-2462.
13. Lee, T. H., C. E. Horton, U. Kyan-Aung, D. Haskard, A. E. Crea, and B. W. Spur. 1989. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin Sci (Lond)* 77:195-203.
14. Haas, P. J., C. J. de Haas, W. Kleibeuker, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, J. A. Kruijtzter, R. M. Liskamp, and J. A. van Strijp. 2004. N-terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. *J Immunol* 173:5704-5711.
15. Kim-Park, W. K., M. A. Moore, Z. W. Hakki, and M. J. Kowolik. 1997. Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and

- extracellular calcium. *Ann N Y Acad Sci* 832:394-404.
16. Veldkamp, K. E., K. P. Van Kessel, J. Verhoef, and J. A. Van Strijp. 1997. Staphylococcal culture supernates stimulate human phagocytes. *Inflammation* 21:541-551.
 17. Postma, B., W. Kleibeuker, M. J. Poppelier, M. Boonstra, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and C. J. de Haas. 2004. Residues 10-18 within the C5a receptor N-terminus compose a binding domain for chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*.
 18. Sutherland, A. M., and J. A. Russell. 2005. Issues with polymorphism analysis in sepsis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7:S396-402.
 19. Rooijackers, S. H., K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 13:596-601.
 20. Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95:3032-3043.
 21. Prossnitz, E. R., and R. D. Ye. 1997. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 74:73-102.
 22. Fu, H., J. Karlsson, J. Bylund, C. Movitz, A. Karlsson, and C. Dahlgren. 2006. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol* 79:247-256.
 23. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.



AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

En intentar escriure els agraïments se t'acumulen els noms, sobretot quan tot plegat ha estat un procés més llarg del que t'havies imaginat. Podria limitar-me a anomenar a tots aquells que han format part del procés d'elaboració d'aquesta Tesi, però seria insuficient. Tot plegat esdevé d'alguna manera el final d'una etapa, i són moltes les persones que han format part de tot aquest camí, de manera que es fa difícil d'anomenar-les totes. Caldrà intentar-ho.

Agraeixo al Dr Vicenç Ausina, el meu “jefe” i el director d'aquesta Tesi, l'haver confiat en les meves possibilitats des del principi, de vegades crec que fins i tot massa. L'haver sabut confiar-me gradualment les eines per progressar professionalment, cada cosa al seu moment. Per la seva admirable capacitat de treball, que de vegades costa de seguir, fins i tot als que ens considerem prou treballadors. Per la seva sorprenent intuïció científica, el saber veure què és “el que ve” en cada moment i haver triat el que seria el tema de la meua Tesi abans que la majoria n'hagués sentit parlar.

Al Josep Domínguez, que ha estat fonamental per a que aquesta Tesi arribés a port. Per totes les estones compartides, d'amistat i de disquisició científica, incloent les discussions tipus “Roper”. Per moltes hores de feina, i els divendres fins les tantes amb la base de dades de PCT. Per haver-me ensenyat a escriure el meu primer article, i el meu primer projecte de recerca. Perquè fem un bon equip en el “virreinat” de la secció de Respiratori i Micobactèries, malgrat les dificultats de compatibilitzar l'assistència i la recerca. Agraïr-los a ell i a la Cris Vilaplana l'haver dut la voràgine de la secció mentre vaig ser a Holanda. A la Silvia Blanco i la Núria Galí, per tota la feina del principi, amb el maneig dels sèrums, els ELISA i les bases de dades, .. i pel suport de sempre. A l'Orlando, pels temps en què encara no sabíem fer anar el SPSS. A tots ells per ser amics a més de companys de feina. A tots el companys de la secció, la Lucía, el Miguel, la Sònia i el Miguel Àngel, per fer la feina de cada dia molt més fàcil i agradable. A la Irene i l'Àlicia, per fer recerca amb il·lusió, i col·laborar amb tot el que cal i més, l'Àlicia fins i tot llegir tota la Tesi cercant errors tipogràfics. Entre tots ho fem tot, i tot no és pas poc!.

El meu agraïment a tots els pacients que han cedit mostres de sèrum, i a tots els infermers i infermeres que n'han fet la extracció, començant pels controls sans a càrrec de la Carmen Ramil. A tots els companys dels altres serveis: Pediatria, Cures Intensives, Urgències, Pneumologia i Hematologia, molt especialment als residents de Pediatria dels darrers anys, per la recollida exhaustiva de mostres, en un moment en què encara no se'n podien utilitzar els resultats. A tots els tècnics, d'Anàlisi i de Micro, que van anar centrifugant i congelant les mostres, el Fede n'ostenta el rècord.

A la Montse Giménez, el Carlos Rodrigo i el Joan Ruiz-Manzano, per les seves aportacions de grans professionals en l'anàlisi i interpretació conceptual dels resultats. Per ajudar-me a resoldre els dubtes de la inexperiència, tant en la feina assistencial com en la de recerca.

Al Kok van Kessel, un recercaire de debò, de forma discreta i pacient. Per donar-me la llibertat de provar, d'equivocar-me i d'encertar-la, i sempre aprendre, durant la meua incursió a la recerca bàsica a l'Eijkman Winkler Institute d'Utrecht. Per ser-hi sempre en els moments que la recerca és desesperant i tota la feina se'n va a l'aigüera, i si més no

saber-hi trobar alguna cosa per aprendre i “observar”. Al Jos van Strijp pel seu entusiasme i encoratjament constant, per dirigir el grup d’Inflamació amb excel·lent professionalitat, i sempre de bon humor. Al Prof Jan Verhoef, per haver-me permès realitzar l’estada a l’UMC i escriure’m aquella carta d’autorització abans de veure’m la cara perquè pogués demanar la beca. A tots els companys, l’Erik, la Mirjam, la Maartje, la Suzan, la Jovanka, el Frank, el Pieter Jan, la Ilse i el Jos III. Per totes les bones estones compartides, dins i fora del laboratori, i per tota la paciència ensenyant-me tècniques que m’eren del tot alienes, com si tornés a ser estudiant. Bedankt voor alles.

A tots els bons professionals amb qui vaig tenir ocasió d’aprendre l’“ofici” treballant-hi de ben a prop en els meus anys d’estudiant, a l’Arnau de Vilanova de Lleida. Un record molt especial, des d’abans de començar la carrera, pel Dr Macià que, essent el metge del meu pare, em va fer despertar l’entusiasme per la medicina, en aquell moment molt més des de la vessant humanista que des de la científica, però que més endavant no em va decebre. Hi hauria moltes persones per anomenar, però un record pels que ja no hi són, pel saber fer del Dr Montoliu i la seva implicació amb els estudiants, i la genialitat del Dr Argüero.

Al Joan Prat i el seu equip amb qui vaig descobrir per primer cop l’encant de fer recerca, una mica com un joc, quan tot just cursava segon de Medicina, i que vaig abandonar quan vaig començar a ensumar la màgia de la pràctica clínica, però que he anat retrobant per la curiositat que et desvetlla l’intentar esbrinar el per què de tot plegat, i sovint recordo aquella primera època.

Els meus companys del dia a dia de tots aquests anys, i aquells amb qui ja no treballem junts, quan els residents de Micro eren tots “nens” menys jo, el Pere Joan, l’Eduardo i el Xavi i a tots els que han anat venint després, sobretot els que encara vam compartir residència, l’Andrés, la M Dolores i l’Ángeles. Els sempre bons temps dels inicis, amb l’Eduardo, la Núria, l’Orlando, el Josep i l’Elisa, quan érem “JASP” i alternàvem la fúria científica amb les “peasso anécdotas” i, en els moments de més neguit, dissenyàvem el pup *Tsukamurella*.

Els meus anys de resident, intentant conciliar els punts de vista des del laboratori i des de la clínica, no sempre el suficientment propers, i intentant trobar el meu lloc en la interfase. De vegades s’enyora, però com diu el poeta “certes maneres de fer no es perden mai, i és bo sentir-se content dins de la pell, fent el paper que s’ha escollit, d’una manera digna”. Els meus companys del grup de guàrdia, la Montse, la Maria José, el Vicente i el Jordi, tantes estones de riure i també de patir, sempre intenses, que han fet que es convertissin en uns dels meus millors amics.

Als adjunts del Servei, d’ara i d’altres moments, la Lurdes, la Montse, el Joxe Mari, el Joan, la Belén al seu moment i la Goretti durant un temps, que m’han anat ensenyant aquest altre “ofici” i que ho segueixen fent sempre que cal. Agraeixo a la Lurdes la seva complicitat de sempre, i sobretot perquè pogués fer rotacions “estranyes”. Als companys d’aquells altres serveis, Pediatria, Dermatologia, i també Infeccioses de Vall d’Hebron i Microbiologia de l’Hospital de Calella. Al Pere Tudela, per haver confiat en mi (o almenys fer-m’ho creure) en el repte inicial de millorar l’atenció al nivell I d’Urgències, i per tenir sempre un moment per resoldre els meus dubtes i neguits.

A tots els tècnics i auxiliars del Servei, especialment l'Esther, que em va ensenyar les primeres tècniques de Micro. Als becaris, els d'abans i els d'ara, que fan una feina imprescindible i sovint poc reconeguda. A tots els companys d'ara, especialment la Sònia i la Gema, per tota la feina que tirem endavant entre tots i sempre amb bona entesa, perquè són "currantes" de debò, però sobretot bona gent.

A les "secres" del Servei, per la bona disponibilitat de sempre, i especialment a la Criss Marcos, per tota la col·laboració en l'elaboració del document. A l'Oriol Arnal per haver fet del meu inexpert disseny de la portada un disseny de debò i per haver convertit la Tesi en llibre amb una professionalitat inusual a la seva edat. Però sobretot per estar disposat en tot moment i amb tota la il·lusió.

Són molts noms, però són molts anys.. i si més no segur que m'oblido d'algú.

Al meu pare, que ja fa gairebé 16 anys que no hi és però que sempre m'acompanya. La seva forma de ser, senzilla i noble, d'home bo, i la seva forma de veure la vida molt més oberta que la de molta gent molt més "viatjada", seguirà marcant sempre allò que considero important. A la meva mare, que sempre ens vetlla, encara que ens separin distàncies més o menys llargues, i segueix de prop tots els neguits, els bons i els mals moments, patint per nosaltres més que per ella mateixa, sense esperar-ne res a canvi. De tots dos he après el valor de la feina ben feta sense esperar-ne compensació, de la discreció i de l'honradesa. Espero conservar sempre l'esperit de la nena de pagès i de poble (Bell-lloc d'Urgell, per cert) que vaig ser. Als meus germans, la Maite i el Salva, perquè sempre hem fet pinya, i per haver fet possible que jo seguís estudiant quan el pare va faltar, tot just un mes després de començar la carrera. A la resta de la meva família, que cada cop és més gran, per tot el suport de sempre.

Als meus amics, els que es dediquen a la sanitat i els que no hi tenen res a veure. Perquè són imprescindibles, perquè em recorden que hi han moltes més coses que m'importen i perquè som capaços de veure'ns poc i, tot i així, seguir-nos la vida.

Al Remco, per haver estat al meu costat i posar la dosi de paciència necessària en aquests últims mesos de neguits, per haver fet del meu *stage* a Holanda una experiència fascinant... Perquè hem sabut mantenir viu el nostre amor malgrat tots els inconvenients de la distància.. perquè al final és ell qui ha deixat el seu país i per fi estem junts. Per haver fet la foto del trencadís del Park Güell. M'ha costat enllaçar la feina d'aquí i d'allà, però en realitat, més o menys harmònicament, tot està connectat a tot... i l'estrany és que tot funcioni.