
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Impactul funcțional al markerilor biochimici și
genetici în sepsisul neonatal.
Implicații diagnostice.**

Doctorand **Baizat Irina Melinda**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Procopciuc Lucia Maria**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	9
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1.Sepsiul neonatal	13
1.1. Definiții	13
1.2. Factori de risc pentru sepsisul neonatal	16
1.2.1. Sistemul imun deficitar	16
1.2.2. Alți factori de risc pentru sepsisul neonatal	16
1.3. Manifestări clinice în sepsisul neonatal	17
1.4. Clasificarea sepsisului	18
1.4.1.În funcție de severitate	18
1.4.2. În funcție de momentul debutului simptomatologiei	19
1.4.2.1. Sepsis neonatal precoce	19
1.4.2.2. Sepsis neonatal tardiv	20
1.5. Modele predictive în diagnosticarea sepsisului	21
1.5.1. Modele predictive în diagnosticarea sepsisului neonatal precoce	21
1.5.1. Modele predictive în diagnosticarea sepsisului neonatal tardiv	23
1.6. Biomarkerii sepsisului	26
1.6.1. Formula leucocitară	26
1.6.2. Proteina C reactivă	27
1.6.3.Procalcitonina	27
1.6.4. Citokinele	27
1.6.5. Interleukina 6	28
1.6.6. Interleukina 10	29
1.6.7. Antigeni de suprafață celulară CD11β și CD 64	33
1.6.8. Toll like receptorii	33
2. Polimorfismele uninucleotidice	39
2.1. Polimorfismul <i>Arg753Gln</i> din gena TLR2 și polimorfismul <i>Asp299Gly</i> din gena TLR4	39
2.2. Polimorfismul <i>-174G/C</i> din gena interleukinei 6	43
2.3. Polimorfismul <i>-1082G/A</i> din gena interleukinei 10	45

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	50
3. Studiul 1. Posibili predictorii clinici și paraclinici ai sepsisului cu debut precoce și sepsisului cu debut tardiv în cazul nou născuților prematur.	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	56
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	58
3.5. Discuții	74
3.6. Concluzii	77
4. Studiul II: Efectele polimorfismelor uninucleotidice ale genelor TLR-2, TLR-4 în sepsisul precoce la nou născuții prematur.	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
4.3. Material și metodă	81
4.4. Rezultate	85
4.5. Discuții	97
4.6. Concluzii	99
5. Studiul III: Implicații diagnostice ale asocierii polimorfismelor IL6-174G/C și IL 10-1082G/A cu sepsisul neonatal precoce în cazul nou născuților prematur	101
5.1. Introducere	101
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	103
5.3. Material și metodă	103
5.4. Rezultate	107
5.5. Discuții	121
5.6. Concluzii	124
6. Discuții generale	125
7. Concluzii generale	129
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	133
REFERINȚE	135

Cuvinte cheie : Sepsis neonatal, nou născuți prematur, TLR2, TLR4, SNP, IL-6, IL-10, SNP-TLR 2 *Arg753Gln*;TLR4 -*Asp 299 Gly*;SNP IL6- 174 *G/C*;SNP - IL10 -G1082A.

I. INTRODUCERE

Cercetarea de față susține perfectarea metodelor de diagnostic și își dorește să fie un promotor în dezvoltarea unor noi agenți terapeutici imunostimulatori sau imunomodulatori adaptați biochimic și genetic acestei categorii populaționale, astfel încât să ajute nou născutul în lupta cu agenții infecțioși.

Teza se bazează pe nevoia reală, globală a populației de nou născuți prematur de a crește supraviețuirea și a reduce durata spitalizării și a consecințelor multitudinii tratamentelor administrate. Susține perfectarea metodelor de diagnostic a sepsisului prin determinarea modului în care nou născuții răspund, din punct de vedere paraclinic la agresiunea agenților patogeni bacterieni și cercetează predispoziția la dezvoltarea sepsisului la nou născuților prematur.

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Sepsisul reprezintă inflamația sistemică declanșată ca și răspuns la invazia patogenilor bacterieni, micotici, virali sau parazitari.

Sepsisul neonatal precoce- se definește ca și apariția manifestărilor clinice în primele 72 de ore de viață. Își are originea în perioada perinatală.

Sepsis neonatal tardiv – sepsisul care se manifestă clinic la mai mult de 72 de ore de viață la nou născuții care necesită spitalizare mai îndelungată fie nou născuții prematur, fie nou născuții la termen care suferă de diverse patologii sau necesită proceduri invazive.

Gold standardul în diagnosticarea sepsisului este reprezentat de către hemocultură. Însă metoda are limite necesitând un interval de timp până la un diagnostic, în funcție de laborator între 24 de ore și 7 zile, precum și cantitatea de sânge pe care o putem preleva pentru analiză, idealul fiind de 6 ml.

Ca și metode adjuvante folosim în evaluare următorii biomarkeri: formula leucocitară completă (CBC), proteina C reactivă (CRP), procalcitonina (PCT) și se fac testări pentru a determina modul de reacție a citokinelor- cum ar fi Interleukina 6 (IL-6), Interleukina 10 (IL-10), factorul de necroză tisulară (TNF- α); antigeni de suprafață celulară CD11 β și CD64 detectați pe bază de flow citometrie; testări de genomică, proteomică și tehnici moleculare bazate pe acid nucleic; Toll like receptori (TLR).

Dintre metodele de determinare a metodelor noi, cercetarea de față a luat în calcul polimorfismele uninucleotidice de tip single nucleotide polymorphism (SNP) pentru polimorfismul *Arg753Gln* din gena TLR 2; polimorfismul *Asp 299 Gly*-din gena TLR4; polimorfismul *174 G/C*-din gena IL6 și polimorfismul -G1082A din gena - IL10.

III. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiectivul general

Cercetarea de față vizează optimizarea managementului diagnosticării sepsisului cu scopul îmbunătățirii metodelor de prevenție, tratament și a calității vieții și creșterea supraviețuirii în categoria nou născuților prematur.

2. Metodologie generală

Cercetarea se va desfășura pe parcursul următoarelor etape:

- Analiza critică a datelor din literatura de specialitate
- Întocmirea lotului de studiu
- Stabilirea criteriilor de includere/excludere a pacienților din studiu
- Întocmirea fișelor de studiu
- Creerea unor baze de date specifice
- Determinările parametrilor studiați
- Prelucrarea statistică a datelor
- Publicarea rezultatelor studiilor în reviste de specialitate.

Elaborarea acestei cercetări implică trei studii care abordează aspecte specifice conform obiectivelor enumerate.

3. Studiul I: Posibili predictorii clinici și paraclinici ai sepsisului cu debut precoce și sepsisului cu debut tardiv în cazul nou născuților prematur.

3.1. Obiective:

În acest studiu am dorit să demonstrăm importanța utilizării markerilor obișnuiți în evaluarea sepsisului neonatal.

3.2. Material și Metodă: A fost un studiu retrospectiv pe perioada a 2 ani în care am evaluat foile de observație a nou născuților cu sepsis atât precoce cât și tardiv. Pacienții au fost organizați în 2 loturi de studiu.

Un lot de studiu format din 113 pacienți nou născuți prematur cu factori de risc pentru sepsis neonatal precoce (SNNP) și sepsis neonatal tardiv (SNNT) și un lot martor de 115 pacienți.

S-a efectuat analiza statistică a datelor folosind software-ul R (versiunea 3.5.1, Viena, Austria).

3.3. Rezultatele obținute confirmă prezența a patru factori de risc independenți ai sepsisului neonatal la prematuri: infecția tractului urinar matern, numărul de zile de spitalizare, insuficiență cardiacă și proteină C reactivă.

4. Studiul II: Efectele polimorfismelor uninucleotidice ale genelor TLR-2, TLR-4 în sepsisul precoce la nou născuții prematur.

4.1. Obiective:

Obiectivele studiului au fost de a compara caracteristicile antropometrice între grupurile cu sepsis neonatal precoce și non- sepsis neonatal precoce; și de a evalua asocierile dintre polimorfismele TLR2- *Arg753Gln* și TLR4-*Asp299Gly* și susceptibilitatea la dezvoltarea sepsis neonatal precoce.

4.2. Material și Metodă:

Stabilirea loturilor de studiu respectiv de control, pe baza criteriilor bine definite.

Treizeci și șase de nou-născuți prematur internați cu suspiciune clinică de sepsis în primele 72 de ore de viață au fost selectați pentru acest studiu prin eșantionare de conveniență. Au fost recoltate probe de sânge de doi mililitri de la pacienții diagnosticați cu sepsis neonatal precoce în vacutainere care conțineau EDTA ca anticoagulant.

Genotipizarea polimorfismului TLR2, TLR4 a fost efectuată utilizând reacția de polimerizare în lanț (PCR) și analiza polimorfismului cu lungimea fragmentului de restricție (RFLP).

Comparațiile caracteristicilor studiate între grupurile SNNP și non-SNNP au fost efectuate folosind testul Chi pătrat (χ^2), testul exact Fish-er, testul t Student cu varianțe egale, testul t Welch cu două eșantioane sau Testul Mann-Whitney. Comparațiile în cadrul grupului cu privire la parametrii biochimici au fost evaluate folosind teste t pereche sau testul Wilcoxon cu rang semnat.

Asocierile dintre polimorfismele genelor studiate și susceptibilitatea la SNNP au fost testate utilizând regresia logistică binomială, iar mărimea efectului fiecărei asocieri testate a fost evaluată folosind raportul de cote (OR) și un interval de încredere de 95% (IC 95%).

Abaterea de la echilibrul Hardy-Weinberg (HWE) pentru SNP-urile studiate a fost efectuată pe grupul non-SNNP utilizând testul potrivirii chi-pătrat, dar când frecvența genotipului a fost mai mică (<5), a fost folosit un test exact.

Nivelul de semnificație (α) al tuturor testelor statistice bilaterale a fost setat la 0,05.

Toate analizele statistice au fost efectuate cu software-ul R, versiunea 4.2.2

4.3. Rezultatele:

Din studiul de față reies diferențe între cele două grupuri: cel cu sepsis precoce și control în ceea ce privește caracteristicile antropometrice observându-se că nou născuții afectați de sepsisul neonatal precoce au vârstă gestațională, greutate, lungime, perimetru cranian și scoruri Apgar mai mici față de nou născuții din grupul de martori.

În studiul de față, nu a fost găsită o diferență semnificativă în frecvența distribuției polimorfismului genei TLR4-*Asp299Gly* între grupurile de nou-născuți prematur SNNP și non-SNNP. În ceea ce privește polimorfismul TLR2-*Arg753Gln*, frecvența alelei minore Gln753 a fost mai mare în grupul SNNP decât în grupul non-SNNP (32,69% față de 25,00%). Chiar dacă riscul de dezvoltare SNNP a crescut în prezența acestei alele în proba studiată, rezultatele nu au fost semnificative statistic.

5. Studiul III: Implicații diagnostice ale asocierii IL6-174G/C și IL 10-1082G/A cu sepsisul neonatal precoce în cazul nou născuților prematur.

5.1. Obiective:

Obiectivele studiului au fost de a compara caracteristicile antropometrice între grupurile cu sepsis neonatal precoce și non-sepsis neonatal precoce; și de a evalua asocierile dintre polimorfismele IL6-174G/C și IL-1082G/A și susceptibilitatea la dezvoltarea sepsis neonatal precoce.

5.2. Material și Metodă:

Au fost recoltate probe de sânge de doi mililitri de la pacienții diagnosticați cu sepsis neonatal precoce în vacutainere care conțineau EDTA ca anticoagulant. Genotipizarea polimorfismului IL6 și IL10 a fost efectuată utilizând reacția de polimerizare în lanț (PCR) și analiza polimorfismului cu lungimea fragmentului de restricție (RFLP).

Treizeci și șase de nou-născuți prematur internați cu suspiciune clinică de sepsis în primele 72 de ore de viață au fost selectați pentru acest studiu prin eșantionare de conveniență.

Pe baza rezultatelor de laborator și a examinărilor clinice, toți nou-născuții prematur au fost împărțiți în două grupuri: un grup SNNP și un grup non-SNNP.

Variabilele antropometrice și biochimice ale nou-născuților prematur studiați au fost rezumate prin medie aritmetică (deviația standard (SD)), mediana (interval interquartil (IQR) = [primul quartil Q1; al treilea quartil Q3]) sau frecvențe relative (%).

Comparațiile caracteristicilor studiate între grupurile SNNP și non-SNNP au fost efectuate folosind testul Chi pătrat (χ^2), testul exact Fish-er, testul t Student cu varianțe egale, testul t Welch cu două eșantioane sau Testul Mann-Whitney. Comparațiile în cadrul grupului cu privire la parametrii biochimici au fost evaluate folosind teste t pereche sau testul Wilcoxon cu rang semnat.

5.3. Rezultate

Nu am descoperit o asociere semnificativă a IL6-174G cu SNNP la nou-născuții prematur. În schimb demonstrează că purtătorii alelei IL10-1082A au avut un risc de 2,91 ori mai mare de a dezvolta sepsis neonatal precoce ($p = 0,055$).

Rezultatele analizei de regresie logistică univariată au arătat că polimorfismul IL10-1082G/A a crescut șansele de SNNP în modelul dominant ($p = 0,032$). După controlul grupului de vârstă gestațională, polimorfismul genei IL10-1082G/A a rămas un factor de risc pentru sepsisul neonatal precoce, cu tendință spre semnificație statistică.

6. Discuții generale

Atât în studiul retrospectiv cât și în cele prospective din caracteristicile loturilor studiate a reieșit faptul că, predispoziția la dezvoltarea unei forme de sepsis neonatal precoce sau tardiv nu este influențată de sex. Se pot considera factori predispozanți pentru sepsisul neonatal precoce vârsta gestațională, greutatea la naștere, Apgarul la 1 minut ≤ 7 , infecția tractului urinar matern, administrarea de surfactant, insuficiența cardiacă și nivelul crescut al CRP-ului.

Polimorfismele uninucleotidice localizate în genele TLR2 și TLR4, respectiv *Arg753Gln* și *Asp299Gly*, care în literatură au fost asociate cu debutul mai rapid al sepsisului sever la pacienții adulți internați în unitățile de terapie intensivă, nu au prezentat semnificație statistică în studiul nostru.

Studiul nostru arată că polimorfismul *IL6-174G/C* nu este un factor de risc pentru sepsis la nou-născuții prematur. Rezultatele sunt în discordanță cu datele din literatură care studiază acest polimorfism și îl identifică ca factor de risc pentru sepsis la adulți sau nou-născuți la termen.

Concordanța rezultatelor obținute pe populația de nou-născuți prematur cu cele obținute în grupuri de subiecți adulți cu sepsis, în ceea ce privește supraexprimarea genei *IL10* ne face să considerăm că prezența polimorfismului *IL10-1082G/A* este condiționată nu numai de vârsta cronologică sau gestațională cât și de factorii de mediu, fără a exclude distribuția geografică a populației generale.

7. Concluzii generale

Dintre mulții factori de risc pentru sepsisul neonatal la prematuri, patru au fost cu semnificație statistică, dintre aceștia factorul antenatal cel mai prezent a fost infecția tractului urinar matern, apoi proteina C reactivă, insuficiența cardiacă și numărul de zile de spitalizare.

Ca și predictor al sepsisului pot fi considerați vârsta gestațională mică, nevoia de resuscitare implicit scorul Apgar mai mic, nevoia de suport respirator. Din cercetarea prezentă reiese și faptul că majoritatea nou-născuților cu sepsis neonatal au avut nevoie de tratament cu 3 sau mai multe antibiotice pe perioada internării.

Paraclinic CRP-ul, leucocitoza asociată cu anemia pot fi considerați biomarkeri ai sepsisului, chiar în lipsa hemoculturii pozitive.

Studiile *in vivo* constată supraexpresia TLR în cursul episoadelor de sepsis la prematuri. Dacă factorul bacterian singur nu determină diferențe de expresie între 24 și 41 de săptămâni de gestație ar fi interesant de aflat care este mecanismul și factorii care conduc la cascada inflamatorie mult exacerbată cu puternic impact clinic în cazul nou-născuților prematur.

Din punct de vedere imunologic expresia TLR 2 și 4 în cursul sepsisului pare să fie similară între nou-născuții la termen și adulți, supraexprimată în cazul prematurilor.

Cu toate acestea modificările de tip SNP ale TLR 2, TLR 4 și IL 6 respectiv *TLR2-Arg753Gln*, *TLR4-Asp299Gly*, și *IL6-174G* constatate în timpul episoadelor de sepsis sau infecție bacteriană localizată în cazul populației adulte nu prezintă semnificație statistică în cazul nou-născuților prematur.

Polimorfismul *IL10-A1082G/A* a crescut șansele de sepsis cu debut precoce la nou-născuții prematur. Chiar dacă a existat o tendință către semnificația statistică în ceea ce privește asocierea polimorfismelor genei *IL10-A1082G/A* cu șansele de SNNP în modelul alelic, studiile viitoare ar trebui să confirme impactul alelelor individuale asupra sepsisului cu debut precoce la nou-născuții prematur.

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza poate fi considerată o cercetare pilot care determină polimorfismele genetice în grupul de nou născuți prematur, studiile din literatură care determină prezența SNP-urilor fiind efectuate pe populația adultă. Până în momentul actual sunt puține studii în literatura de specialitate care determină prezența TLR-urilor la nou născut în cursul episoadelor de sepsis sau infecție localizată însă nu determină polimorfismele genetice.

Identificarea variațiilor genetice ale genelor implicate în răspunsul bactericid celular și cele implicate în patogeniza sepsisului pot ajuta la clarificarea fiziopatologiei acestuia ceea ce ar putea avea consecințe pozitive în metodele diagnostice și terapeutice precum și în prognosticul pe termen lung a nou născutului.

Teza a coroborat datele din literatură cercetând datele și markerii utilizați în mod curent pentru diagnosticarea sepsisului. Faptul că rezultatele studiului nu sunt concordante cu cele pe populația adultă și polimorfismele TLR2 și TLR 4 cele mai des regăsite în cursul episoadelor de sepsis cu bacterii Gramm pozitive respectiv Gramm negative poate fi un promotor pentru cercetări ulterioare care să studieze mecanismele implicate în dezvoltarea sepsisului la această categorie populațională.

Totodată întărește ideea că nou născutul prematur nu este numai un pacient mai mic ci o entitate care se comportă diferit din punct de vedere clinic și paraclinic, necesitând dezvoltarea unor metode diagnostice specifice și a unor terapii adaptate.

Asocierea dintre polimorfismul *IL10-A1082G/A* și sepsisul neonatal poate fi un punct de plecare în determinarea caracteristicilor imunologice ale grupei populaționale de nou născuți prematur.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

**Functional impact of biochemical and genetic
markers in neonatal sepsis.
Diagnostic implications.**

PhD. Student **Baizat Irina Melinda**

PhD. Supervisor **Prof. Dr. Procopciuc Lucia Maria**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	9
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. NEONATAL SEPSIS	13
1.1. Definition of neonatal sepsis	13
1.2. Risk factors in neonatal sepsis	16
1.2.1. Deficient immune system	16
1.2.2. Other risk factors in neonatal sepsis	16
1.3. Clinical manifestations	17
1.4. Classification of sepsis	18
1.4.1. Depending on the severity	18
1.4.2. Depending on the time of onset of symptoms	19
1.4.2.1. Early-onset neonatal sepsis (EOS)	19
1.4.2.2. Late neonatal sepsis (LOS)	20
1.5. Predictive patterns in sepsis diagnosis	21
1.5.1. Predictive patterns in EOS diagnosis	21
1.5.1. Predictive patterns in LOS diagnosis	23
1.6. Sepsis biomarkers	26
1.6.1. Complete blood leukocyte count (CBC)	26
1.6.2. C-reactive protein (CRP)	27
1.6.3. Procalcitonin (PCT)	27
1.6.4. Cytokines	27
1.6.5. Interleukin 6	28
1.6.6. Interleukin 10	29
1.6.7. CD11 β and CD64 cell surface antigens	33
1.6.8. Toll like receptors	33
2. Single nucleotide polymorphisms (snp)	39
2.1 TLR 2 polymorphism Arg753Gln and TLR4 polymorphism Asp 299 Gly	39
2.2. Polymorphism -174G/C from the interleukin 6 gene	43
2.3. Polymorphism -1082G/A from the interleukin 10 gene	45

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis/objectives	49
2. General methodology	50
3. Study I: Study I: Possible clinical and paraclinical predictors of early-onset sepsis and late-onset sepsis in preterm neonates.	55
3.1. Introduction	55
3.2. Working hypothesis	56
3.3. Material and method	56
3.4. Results	58
3.5. Discussions	74
3.6. Conclusions	77
4. Study II: Effects of single nucleotide polymorphisms of TLR-2, TLR-4 genes in early onset sepsis in preterm neonates.	79
4.1. Introduction	79
4.2. Working hypothesis	81
4.3. Material and method	81
4.4. Results	85
4.5. Discussions	97
4.6. Conclusions	99
5. Study III: Diagnostic implications of the association of IL6-174G/C and IL 10-1082G/A with early onset sepsis in preterm neonates	101
5.1. Introduction	101
5.2. Working hypothesis	103
5.3. Material and method	103
5.4. Results	107
5.5. Discussions	121
5.6. Conclusions	124
6. General discussions	125
7. General conclusions	129
8. Originality and innovative contributions of the thesis	133
REFERENCES	135

Keywords: Neonatal sepsis, preterm infants, TLR2, TLR4, SNP, IL-6, IL-10, SNP- TLR 2 *Arg753Gln*; TLR4 - *Asp 299 Gly*; SNP IL6- *174 G/C*; SNP - IL10 -G1082A.

I. INTRODUCTION

This research supports the refinement of diagnosis methods and aims to be a promoter in the development of new immunostimulatory or immunomodulatory therapeutic agents, biochemically and genetically adapted to this population category, in order to help the newborn fight with infectious agents.

This thesis is based on the real, global need of the preterm newborn population to increase survival rate and reduce the duration of hospitalisation and the consequences of the multitude of treatments administered. It supports the refinement of diagnosis methods for sepsis by determining how newborns paraclinically respond to bacterial pathogen aggression and investigates the predisposition of preterm infants to develop sepsis.

II. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Sepsis is a systemic inflammation triggered in response to the invasion of bacterial, fungal, viral or parasitic pathogens.

Early-onset neonatal sepsis (EOS) is defined as the onset of clinical manifestations within the first 72 hours of life. It originates in the perinatal period.

Late neonatal sepsis (LOS) – sepsis that manifests clinically at more than 72 hours of life in newborns who require longer hospitalisation, either preterm infants or on-term newborns suffering from various pathologies or requiring invasive procedures.

The gold standard for sepsis diagnosis is blood culture. But the method is limited, requiring a time delay to diagnosis, depending on the laboratory, between 24 hours and 7 days, and the amount of blood that can be taken for analysis, ideally 6 ml.

As adjuvant methods we use the following biomarkers in the evaluation: complete blood leukocyte count (CBC), C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT) and tests to determine how cytokines - such as Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), tissue necrosis factor (TNF- α) - respond; CD11 β and CD64 cell surface antigens detected by flow cytometry; genomics, proteomics and nucleic acid-based molecular techniques; Toll-like receptors (TLR).

Among the new determination methods, the present research considered the single-nucleotide polymorphism (SNP) for TLR 2 polymorphism *Arg753Gln*, TLR4 polymorphism *Asp 299 Gly*, IL6 polymorphism - *174 G/C* and IL10 polymorphism - *1082G/A*.

III. PERSONAL CONTRIBUTION

1. The general objective

The general objective of the research is to optimise the management of sepsis diagnosis with the aim of improving methods of prevention, treatment and quality of life and increasing survival in preterm infants.

2. General methodology.

The research will be carried out in the following stages:

- Critical analysis of the available data in specialised literature
- Preparing the study batch
- Settling the inclusion/exclusion criteria for patients in the study
- Preparing the study sheets
- Creating specific databases
- Detection of studied parameters
- Statistical processing of data
- Publishing the results of studies in specialised journals.

The development of this research involves three studies that address specific issues according to the objectives listed.

3. Study I:

Possible clinical and paraclinical predictors of early-onset sepsis and late-onset sepsis in preterm neonates.

3.1. Objectives:

This study aims to demonstrate the importance of using common markers in the assessment of neonatal sepsis.

It was a retrospective study over 2 years in which we evaluated the observation sheets of newborns with both early-onset and late sepsis.

3.2. Material and method:

Patients were organized into 2 study groups. One study group consisting of 113 preterm infant patients with risk factors for EOS and LOS and another control group of 115 patients.

Statistical analysis of the data was performed using the R software (version 3.5.1, Vienna, Austria).

3.3. The results

Confirm the presence of four independent risk factors for neonatal sepsis in preterm infants: maternal urinary tract infection, number of hospitalisation days, heart failure and C-reactive protein.

4. Study II:

Effects of single nucleotide polymorphisms of TLR-2, TLR-4 genes in early onset sepsis in preterm neonates.

4.1. Objectives of the study:

The objectives of the study were to compare anthropometric characteristics between EOS and non-EOS groups; and to evaluate the associations between TLR2- Arg753Gln and TLR4- Asp299Gly polymorphisms and the susceptibility to develop EOS.

4.2. Material and method:

Two-milliliter blood samples were collected from patients diagnosed with early-onset neonatal sepsis in vacutainers containing EDTA as an anticoagulant. Genotyping of TLR2 and TLR4 polymorphism was performed using the polymerase chain reaction (PCR) and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

Thirty-six preterm infants admitted with clinical suspicion of sepsis within the first 72 hours of life were selected for this study by convenience sampling.

Based on laboratory results and clinical examinations, all preterm neonates were divided into two groups: an EOS group and a non-EOS group.

Comparisons of the characteristics studied between the EOS and non-EOS groups were performed using the Chi-square (χ^2) test, Fisher's exact test, Student's t-test with equal variances, Welch's two-sample t-test or Mann-Whitney test. Within-group comparisons on biochemical parameters were assessed using paired t-tests or Wilcoxon signed-rank test.

4.3. The results:

The present study shows differences between the two groups with early sepsis and control in terms of anthropometric characteristics, noting that newborns affected by early neonatal sepsis have lower gestational age, weight, length, cranial perimeter and Apgar scores compared to newborns in the control group who have these parameters at a higher level.

In the present study, no significant difference was found in the frequency distribution of the TLR4-Asp299Gly gene polymorphism between EOS and non-EOS preterm neonate groups. Regarding the TLR2-Arg753Gln polymorphism, the frequency of the Gln753 minor allele was higher in the EOS group than in the non-EOS group (32.69% vs. 25.00%). Even if the risk of developing SNNP increased in the presence of this allele in the studied sample, the results were not statistically significant.

5. Study III:

Diagnostic implications of the association of IL6-174G/C and IL 10-1082G/A with early onset sepsis in preterm neonates.

5.1. Working hypothesis:

The objectives of the study were to compare laboratory parameters between EOS and non-EOS groups and to assess associations between polymorphisms of the studied genes and susceptibility to develop EOS.

5.2. Material and method:

Two-milliliter blood samples were collected from patients diagnosed with early-onset neonatal sepsis in vacutainers containing EDTA as an anticoagulant. Genotyping of IL6 and IL10 polymorphism was performed using the polymerase chain reaction (PCR) and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

Thirty-six preterm infants admitted with clinical suspicion of sepsis within the first 72 hours of life were selected for this study by convenience sampling.

Based on laboratory results and clinical examinations, all preterm neonates were divided into two groups: an EOS group and a non-EOS group.

Comparisons of the characteristics studied between the EOS and non-EOS groups were performed using the Chi-square (χ^2) test, Fisher's exact test, Student's t-test with equal variances, Welch's two-sample t-test or Mann-Whitney test. Within-group comparisons on biochemical parameters were assessed using paired t-tests or Wilcoxon signed-rank test.

5.3. The results

We found no statistical evidence for a significant association of IL6-174G gene polymorphisms with EOS in preterm infants. Instead, it demonstrates that IL10-1082A allele carriers had a 2.91-fold increased risk of developing EOS, with marginal significance ($p=0.055$). Results of univariate logistic regression analysis showed that IL10-1082G/A polymorphism increased the odds of EOS in the dominant model ($p=0.032$). After controlling the gestational age group, IL10-1082G/A gene polymorphism remained a risk factor for EOS, with a trend towards statistical significance.

6. General discussions

In both retrospective and prospective studies, the characteristics of the groups studied revealed that the predisposition to develop early or late neonatal sepsis is not influenced by sex. Gestational age, birth weight, Apgar at 1 minute ≤ 7 , maternal urinary tract infection, surfactant administration, heart failure and elevated CRP levels can be considered predisposing factors for early neonatal sepsis.

Single nucleotide polymorphisms located in TLR2 and TLR4 genes, respectively Arg753Gln and Asp299Gly, which in the literature have been associated with more rapid onset of severe sepsis in adult ICU patients, were not statistically significant in our study.

Our study shows that IL6-174G/C polymorphism is not a risk factor for sepsis in preterm infants. The results are in discordance with literature data studying this polymorphism and identifying it as a risk factor for sepsis in adults or preterm newborns.

The concordance of the results obtained in the preterm newborn population with those obtained in groups of adult subjects with sepsis in terms of overexpression of the IL10 gene leads us to consider that the presence of the 1082G/A polymorphism is conditioned not only by chronological or gestational age, but also by environmental factors, without excluding the geographical distribution of the general population.

7. General conclusions

Of the multiple risk factors for neonatal sepsis in preterm infants, four were statistically significant, of which the most prevalent antenatal factor was maternal urinary tract infection, followed by C-reactive protein, heart failure and the number of hospitalization days.

As a predictor of sepsis can be considered low gestational age, need for resuscitation implicitly lower Apgar score, need for respiratory support. The present research also shows that the majority of neonates with neonatal sepsis required treatment with 3 or more antibiotics during hospitalization.

Paraclinically, CRP, leukocytosis associated with anaemia can be considered biomarkers of sepsis, even in the absence of positive blood culture.

If the bacterial factor alone does not trigger differences in expression between 24 and 41 weeks of gestation, it would be interesting to know the mechanism and factors leading to the greatly exacerbated inflammatory cascade with strong clinical impact in preterm infants.

Immunologically, TLR 2 and 4 expression during sepsis appears to be similar between on-term newborns and adults, over-expressed in preterm infants.

However, SNP changes in TLR 2, TLR 4 and IL 6 respectively TLR4-*Asp299Gly*, TLR2-*Arg753Gln* and IL6-*174G* found during episodes of sepsis or localized bacterial infection in the adult population are not statistically significant in preterm neonates.

The IL10-*A1082G/A* polymorphism increased the odds of early-onset sepsis in preterm infants. Although there was a trend towards statistical significance in the association of IL10-*A1082G/A* gene polymorphisms with the odds of EOS in the allelic model, future studies should confirm the impact of individual alleles on early-onset sepsis in preterm infants.

8. Originality and innovative contributions of the thesis

The thesis can be considered a pilot research, determining gene polymorphisms in the group of preterm neonates, as studies in the literature which determine the presence of SNPs have been conducted on adult population. So far, few studies have been found in the literature that determined the presence of TLRs in neonates during episodes of sepsis or localized infection but do not determine genetic polymorphisms.

The identification of genetic variations in genes involved in the cellular bactericidal response and those involved in the pathogenesis of sepsis may help to clarify its pathophysiology which could have positive consequences in diagnostic and therapeutic methods, as well as on the long-term prognosis of the neonates.

The thesis has corroborated data in literature by investigating information and markers commonly used for diagnosis of sepsis, by correlating existing data confirming the presence of leukocytosis, elevated CRP, risk factors with data in literature reported in the adult population and sought to identify genetic variations predisposing to the development of neonatal sepsis in the preterm newborn population.

The fact that the results of the study are not consistent with those in the adult population and TLR2 and TLR 4 polymorphisms most often found during episodes of sepsis with GP bacteria respectively GN may be a promoter for further research, which would focus on study of the mechanisms involved in the development of sepsis in this population. It also reinforces the idea that the preterm neonate is not only a smaller patient, but an entity that behaves differently clinically and paraclinically, requiring the development of specific diagnostic methods and adapted therapies.

The association between the IL10-A1082G/A polymorphism and neonatal sepsis may be a starting point in determining the characteristics of the preterm newborn population group.