

Actualizaciones

Sepsis

Avances en fisiopatología y tratamiento 1993-1994

Carlos Torres

INTRODUCCION

El término sepsis denota una plétora de manifestaciones clínicas sistémicas en respuesta a la agresión por microorganismos de diferente tipo presentes en la sangre. El término proviene del griego denotando putrefacción en oposición a la fermentación o "pepsis" (1).

La magnitud del problema se ha incrementado recientemente debido al aumento del número de pacientes con condiciones crónicas (diabetes, uremia, neumopatías crónicas en niños y adultos) así como a la mayor supervivencia derivada de tratamientos más efectivos para ciertas entidades (enfermedad de membrana hialina en recién nacidos). Igualmente los métodos diagnósticos más invasivos y las modalidades más agresivas de terapia, hacen a los pacientes que los reciben, más propensos a infección por gérmenes oportunistas (2).

No existen cifras confiables de la incidencia de sepsis debido a varios factores. En primer lugar, la condición no es comunicable a menos que se asocie a ciertos gérmenes particulares (e.g. *N. meningitidis*), en segundo término, hasta hace poco no se había llegado a un acuerdo acerca de los criterios diagnósticos de la enfermedad y por lo tanto los datos hasta ahora informados son poco confiables.

A continuación, se revisarán algunos aspectos novedosos de la enfermedad en cuestión, primordialmente aquellos relacionados con la estandarización de las definiciones, el papel de la

endotoxina en la génesis de la enfermedad, el papel de las citoquinas como mediadores del proceso y finalmente algunos de los nuevos enfoques terapéuticos.

DEFINICIONES

En 1991, Bone (3) propuso una serie de definiciones dirigidas a proveer al clínico de un enfoque más práctico que reflejara los fenómenos fisiopatológicos vistos en los pacientes. Con tal fin se emitieron una serie de definiciones que van desde la bacteremia hasta la falla multisistémica y que revisaremos a continuación.

Bacteremia

Se refiere a la presencia de bacterias viables circulantes en sangre periférica. Su reconocimiento temprano evitará la progresión hacia infecciones localizadas o sistémicas en un número importante de pacientes. En lactantes con bacteremias ocultas, por ejemplo, sin foco aparente, entre 9 y 27% pueden desarrollar un foco meníngeo (4).

Septicemia

Se ha utilizado para designar a la enfermedad sistémica causada por la multiplicación de organismos en sangre. Debido a lo confuso de la definición y a su poca relación con el proceso de base, se recomienda no continuar utilizando este término.

Sepsis

Implica la presencia de organismos piógenos o no, o de sus toxinas en sangre circulante, más la evidencia clínica de infección todos de los siguientes: taquicardia: (en adultos más de 90 latidos/min, en niños más de 10 latidos por encima del percentil 95 para la edad); polipnea, más de 20

Dr. Carlos Torres Martínez, MD, MRCP (Lon): Infectólogo Pediatra. Jefe Sección Infectología Pediátrica. Departamento de Pediatría, Fundación Santa Fe de Bogotá.

Solicitud de separatas al Dr. Torres.

respiraciones/minuto en adultos; en niños más de 10 respiraciones por encima del percentil 95 para la edad, y distermia: temperatura central o rectal mayor de 38,4 o menor de 35,6°C (5).

Es aquí donde el criterio clínico adquiere mayor importancia. Por un lado, estos signos clínicos y de laboratorio son inespecíficos y pueden ser causados por otras condiciones incluyendo aquellas comprendidas dentro del llamado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (trauma, injuria térmica, pancreatitis, enfermedades mediadas inmunológicamente). Sin embargo, del reconocimiento temprano del proceso séptico dependerá el pronóstico en términos de morbilidad y mortalidad.

Síndrome de sepsis o séptico

Incluye las condiciones clínicas arriba enumeradas para sepsis más la evidencia de perfusión orgánica alterada como en el sistema nervioso central (SNC) por alteraciones agudas en el estado mental, en el sistema renal por oliguria ($< 0,5$ mL/kg de peso) y por un aumento en el lactato sérico y en el sistema pulmonar por bajos índices de oxigenación ($PaO_2/FiO_2 < 280$) en ausencia de otras enfermedades pulmonares o cardiovasculares.

Este síndrome puede ser causado por bacterias, virus, parásitos u hongos y la distinción clínica entre los diferentes tipos de microorganismos es imposible. Los estudios en el síndrome de sepsis revelan que apenas 45% están asociados con cultivos positivos. La confirmación de bacteremia puede tener importancia pronóstica ya que si existe, 47% de los pacientes desarrollan choque séptico mientras que si está ausente lo hará solamente 29,6% (6). La mortalidad en los pacientes con síndrome de sepsis es de 22% a los 14 días del diagnóstico (7, 8).

Choque séptico

Por definición es el síndrome de sepsis con hipotensión: en adultos presión arterial sistólica < 90 mm Hg o disminución sobre la línea de base de más de 40 mmHg; en niños la presión sistólica por debajo del percentil 5 para la estatura (8). Puede ser temprano cuando hay respuesta al manejo con

líquidos e inotrópicos o refractario cuando no responde. La distinción entre choque caliente y frío debería ser reconsiderada ya que esta progresión es rara aún en fases tardías del choque en donde la resistencia vascular sistémica se disminuye (9).

Cuando la progresión del paciente es hacia el deterioro y aparecen condiciones como la coagulación intravascular diseminada (CID), el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), la insuficiencia renal aguda (IRA), la disfunción hepatobiliar o neurológica, se dice que el paciente ha entrado en falla multisistémica.

FISIOPATOLOGIA BASICA

Las manifestaciones clínicas de sepsis son la evidencia tardía del desencadenamiento de la cascada inflamatoria. El fenómeno biológico inicial en este proceso es la presencia del lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de los Gram negativos (con equivalentes activos en las bacterias Gram positivas, hongos, virus, etc.).

La endotoxina es un potente estimulante de las células presentadoras de antígeno, primordialmente macrófagos, de cuya interacción con el linfocito T se derivarán una serie de fenómenos cruciales para el desarrollo de esta condición (10). Es conocido que el macrófago y otras células van a producir ingentes cantidades de mediadores solubles o citoquinas dentro de las cuales se distinguen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), la interleuquina- 1β (IL- 1β), el factor activador de plaquetas (PAF) y la interleuquina-6 (IL-6). Estas sustancias en general son estimulantes de la expresión de las moléculas de adhesión de las células endoteliales (ICAM-1, ELAM, etc.) (11) que a su vez sirven para promover la adherencia del neutrófilo al endotelio con las consecuencias que se verán luego.

No solamente las citoquinas son responsables del daño endotelial. Otros sistemas homeostáticos orgánicos van a ser alterados por el proceso infeccioso entre los que conviene citar: la activación de la cascada de la coagulación con el consecuente desequilibrio homeostático a nivel del lecho microvascular y la activación del complemento

usualmente por la vía alterna que genera fragmentos que a su vez van a estimular adicionalmente la liberación de citoquinas y la degranulación del neutrófilo. Por acción del macrófago y probablemente de la endotoxina misma, los neutrófilos son activados y debido al proceso de adherencia ya citado, llevan a cabo la agregación, degranulación y liberación de los radicales de oxígeno y proteasas altamente deletéreos a nivel endotelial. Los metabolitos de la degradación del ácido araquidónico incrementados en el proceso séptico, generan un desbalance a favor de la hipercoagulabilidad debido al predominio de las concentraciones del tromboxano (TXA₂) sobre las de prostaciclina (PGI₂). Finalmente la activación plaquetaria aunque de una importancia aparentemente menor tiene un papel contributorio en el daño endotelial eventual (5).

El endotelio se convierte entonces en el órgano blanco al cual se dirigen todas las sustancias desencadenadas por el proceso infeccioso, las cuales ya en este momento se producen de manera desenfrenada y sin modulación. El daño endotelial genera alteraciones en su función normal como órgano de regulación hormonal y como soporte del mantenimiento de la permeabilidad vascular (12). Se especula que una buena parte del proceso intrínseco deletéreo está mediado por la pérdida de la capa de glucosaminoglicanos o GAG's (heparan, dermatan y condroitínsulfato) que lo recubren y que le confieren carga negativa que rechaza el contacto con otras células y moléculas de la misma carga (13).

Este modelo fisiopatológico demuestra que cuando el paciente está en sepsis clínicamente evidente, ya la cascada inflamatoria general se ha activado y el daño inicial se ha producido. Si el daño tisular persiste al menos en un sitio se alterará su perfusión y entonces se entrará en síndrome de sepsis. Finalmente si el daño se generaliza, persiste y se acompaña de hipotensión, se entrará en choque séptico con o sin falla multisistémica (5).

Endotoxina

Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular característica conformada por una membrana externa, una capa de lipoproteínas, un es-

pacio periplásmico y una delgada capa de petidoglican. Por fuera de la membrana ya citada, se encuentran unas prolongaciones de estructura compleja conocidas como endotoxina o lipopolisacárido (LPS). El LPS puede ser dividido en tres porciones: la cadena O-específica conformada por residuos repetidos de oligosacáridos (de tres a seis), que son variables de acuerdo a la especie de bacteria: el core que a su vez se diferencia en core externo conformado por hexosas (como glucosa o galactosa) y el core interno en el cual los residuos carbohidratados son heptosas y el KDO (o ketodeoxioctanoato). Esta porción es mucho menos variable siendo el KDO común para todas las especies. Finalmente, la porción más interna es el lípido A que es la molécula biológicamente activa del LPS y que químicamente es una glucosamina con un número variable de residuos acílicos (14). Este lípido A es común para todas las especies de Gram negativos y a él están dirigidas las maniobras terapéuticas intentadas hacia el LPS.

Estudios practicados en la década de los ochenta demostraron que la cantidad de endotoxina en sangre es proporcional al número de bacterias circulantes, ya que el LPS es parte integral de la pared bacteriana. Shenep y cols en 1984 (15) demostraron que la aplicación de antibióticos en modelos animales de sepsis por *E. coli* producían una disminución significativa en el número de bacterias circulantes pero un aumento vertical en las concentraciones de LPS, situación confirmada por varios autores posteriormente en animales y humanos. El uso de antibióticos altamente bactericidas produce entonces una liberación masiva de LPS y al menos en teoría una activación más potente y vigorosa de la cascada inflamatoria. El LPS así circulante es ligado en el plasma a una proteína ligadora de LPS (LBP) y este complejo se une eventualmente al receptor CD 14 en la membrana del macrófago. Esta unión desencadena la activación de una proteína quinasa que tiene un papel crucial en la señal de transducción intracelular y en la subsecuente ampliación de la respuesta inflamatoria (16).

Citoquinas

El término describe una serie de mediadores polipeptídicos que funcionan como transmisores de señales entre células que constituyen el lenguaje molecular de la inflamación (17). Múltiples citoquinas han sido descritas y la lista es creciente. Desde el punto de vista didáctico es conveniente diferenciar entre las que son proinflamatorias: TNF, IL-1, IL-8, IL-9, los factores de crecimiento celular (GM-CSF y M-CSF) y las antiinflamatorias: IL-4, IL-6, el factor de crecimiento celular beta y la IL-10 (antagonista de la producción de TNF e IL-1). El conocimiento de las interacciones de estas sustancias con los diferentes tipos celulares, es incompleto y requiere estudios adicionales. En aras de la claridad, solamente se revisará el papel de los dos mediadores más importantes en el establecimiento del proceso séptico: el TNF y la IL-1.

Factor de necrosis tumoral

Se trata de una molécula de 157 aminoácidos con un peso molecular de apenas 17 kD que fue identificada, clonada y producida finalmente en 1984 por Beutler y cols luego de varios años de investigación (18). El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y es producida por una variedad de células dentro de las cuales se incluyen los macrófagos, las células de Kupfer, los linfocitos, los astrocitos, las células endoteliales, las células asesinas naturales (NK) y otras. Posee dos receptores que están presentes en la superficie de todas las células con excepción del glóbulo rojo y que también pueden encontrarse circulantes cuando los niveles de TNF están aumentados en sangre (19).

El TNF posee un papel central en la mayoría de las reacciones inmunológicas del organismo como que interviene en la interacción del macrófago con linfocitos T y B, PMN, células endoteliales, del sistema hemopoyético y fibroblastos. En concentraciones bajas es fundamental para la remodelación tisular, la respuesta antiinflamatoria del organismo, la limitación del daño y los procesos de citotoxicidad contra agresores (11). Sin embargo, cuando los niveles son inusualmente elevados y su producción descontrolada se producen alteraciones tisulares locales y sistémicas severas.

En el caso particular de la infección aguda (esto es, sepsis, choque tóxico, malaria cerebral o meningococcemia), se considera que el TNF es responsable en gran parte del fenómeno de choque, fiebre, paro respiratorio, fuga capilar, necrosis hemorrágica, acidosis láctica, liberación de hormonas del estrés, hiperglicemia, adherencia de neutrófilos, liberación de eicosanoides, radicales de oxígeno y PAF solamente para citar los más importantes (11, 19, 20).

En 1986 los estudios en ratas demostraron que la infusión de 1.8 mg/kg de TNF producía a las dos horas una caída súbita en la frecuencia cardíaca, la respiratoria y en la presión sistólica que terminaban en la muerte del animal en un corto lapso. Adicionalmente, se demostró una caída igualmente notable en el pH sanguíneo y en la paO_2 (21). Estas alteraciones fueron posteriormente revertidas con la preaplicación de un anticuerpo monoclonal contra el TNF (19). Las alteraciones observadas en modelos animales son idénticas a las apreciadas luego de la aplicación del LPS y a las apreciadas en humanos en sepsis.

¿Cómo estimula el LPS la producción de TNF? Se ha demostrado recientemente que la unión del complejo LPS-LBP con el receptor CD 14, produce una activación de 10 a 100 veces en la tasa de transcripción del gene del TNF, de 1.000 veces en el número de transcritos de su correspondiente RNA y un aumento de 10.000 veces en la traducción del mismo que resulta en la síntesis de monómeros de pre-TNF (16). Cabe anotar que otros estimulantes diferentes del LPS como los complejos ácido teicoico-peptidoglicano de los Gram positivos, el factor cuerda del *M. tuberculosis*, el fragmento C5a, diversos antígenos fúngicos y virales y la toxina del choque tóxico estafilocócico pueden estimular la producción del TNF (18, 19). Adicionalmente otras líneas de evidencia soportan el papel del TNF como mediador central en el proceso de sepsis: sus niveles en sangre se han encontrado elevados en pacientes con sepsis (aunque no en todos) y se han relacionado con la tasa de mortalidad (22-24). Se ha demostrado en animales que los niveles de TNF son directamente proporcionales a los niveles de

LPS y finalmente la aplicación de anticuerpo monoclonal contra el TNF protege a animales del reto con LPS (completándose así los postulados de Koch) (25-27).

Sin embargo, debe anotarse que algunos pacientes en sepsis pueden tener niveles normales de TNF y que con otros mediadores como IL-1 y PAF se puedan reproducir también (aunque parcialmente) los signos clínicos. La acción además debe ser considerada inicialmente como puramente local y solamente si se presenta diseminación sistémica incontrolada se producirán los efectos deletéreos ya enunciados.

Interleuquina-1

Sustancia conocida desde la década de los cuarenta como el pirógeno endógeno, es un mediador de respuestas sistémicas a la injuria que genera fiebre, neutrofilia y una respuesta metabólica generalizada de estrés. Existen dos tipos, alfa y beta que comparten una homología de aminoácidos de 25% pero con propiedades biológicas similares (comparten el mismo receptor). El gene para su codificación se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 2 y se produce por las mismas células que secretan el TNF. Se han observado un sinnúmero de respuestas *in vitro* (biológicas e inmunológicas) e *in vivo* en animales y humanos (28). Fundamentalmente su acción es menos específica que la del TNF pero comparte con él su capacidad para expresar moléculas de adhesión endotelial y el estímulo de la producción de otras citoquinas inflamatorias. Una característica notable de la IL-1 es la presencia de un receptor circulante en sangre que ha sido el foco de estudio para antagonizarlo y así disminuir los efectos deletéreos.

ENFOQUES TERAPEUTICOS NOVEDOSOS

A pesar de los progresos conseguidos en el campo de los antibióticos, en el reconocimiento más precoz de la sepsis y en el manejo agresivo de cuidado intensivo, la mortalidad en el paciente críticamente enfermo en particular en choque permanece en niveles altos (30% a 70%) (5).

Dados los avances en el entendimiento de la fisiopatogenia ya enunciados, resulta tentador explorar nuevas estrategias dirigidas a modificar cada uno de los pasos necesarios para el establecimiento del daño endotelial ya enunciado.

Los sitios más susceptibles de manipulación podrían ser: la inhibición de algunas de las sustancias implicadas en el establecimiento de la injuria (LPS, TNF, IL-1); el uso de bloqueadores de receptores de estas sustancias (el antagonista del receptor de IL-1 o IL1a.); los antagonistas fisiológicos (PgI2); los inhibidores de proteasa (alfal-antitripsina); antioxidantes (superóxido dismutasa); drogas con actividad en el polimorfonuclear (pentoxifilina); inhibidores de procesos de transcripción y translación (corticosteroides) y sustancias de actividad protectora endotelial (13). Solamente se revisarán aquellas que estén más avanzadas en pruebas clínicas, notablemente, la inhibición de LPS y TNF.

Inhibición de la endotoxina: constituye un paso racional si se quiere detener el proceso inflamatorio desde su inicio. A comienzos de la década de los ochenta se comenzó a trabajar en la producción de antisueros de origen humano desarrollados luego de la exposición a mutantes de enterobacterias en voluntarios. Se escogió de la mutante rugosa J5 *E. coli*.

El primer estudio con este producto fue publicado por Ziegler y col en 1982 el cual fue controlado, aleatorio y ciego e incluyó 304 pacientes adultos con sepsis clínica de los cuales 212 tenían bacteremia por Gram negativos comprobada y 80 se encontraban en choque profundo (29). El punto final del estudio fue la eventualidad de muerte. El 22% de los pacientes con bacteremia por Gram negativos que recibió el antisero falleció, comparado con 39% de los que recibieron placebo ($p=0.011$). Esta diferencia fue aún más significativa en los pacientes en choque profundo (77% vs. 44% respectivamente, $p=0.03$).

Los resultados fueron suficientemente buenos para generar otros estudios clínicos, como uno en meningococcemia en niños (22) y otros que buscaron su utilidad como profiláctico de infección en pacientes quirúrgicos y en pacientes neu-

tropénicos (30). Ninguno de estos estudios mostró un efecto benéfico de la droga sobre el placebo.

Posteriormente se evaluó la utilidad de una inmunoglobulina hiperinmune contra la misma *E. coli* J5. En uno de los estudios se comparó con inmunoglobulina intravenosa estándar sin evidenciar mejoría en la supervivencia. De la misma manera un estudio de tres secciones en el cual se analizó esta preparación contra IgG IV y contra albúmina como manejo preventivo del desarrollo de sepsis en pacientes sometidos a cirugías abdominales grandes, mostró mejores resultados con Ig IV (30, 31).

El desarrollo de tecnología para la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales (AcMo) ha permitido la aparición de dos tipos dirigidos contra el LPS, que han sido sometidos a estudios clínicos en humanos: el HA-1A y el anticuerpo E5. Hubo gran entusiasmo luego de la publicación de la utilidad del HA-1A, un anticuerpo IgM de origen humano contra LPS (32). Se demostró una protección (disminución de la mortalidad) en el grupo de pacientes que recibieron el anticuerpo comparado con los que recibieron albúmina como placebo en los pacientes con bacteremia por Gram negativos (47% vs 30%), pero muy especialmente en aquellos que ingresaron en choque (56% vs 33%). Esta diferencia era apreciable incluso desde el segundo día de hospitalización. Sin embargo, se apreciaban diferencias e imbalances (sesgos) en los factores de riesgo a favor del grupo con el anticuerpo. Adicionalmente, la mayoría de los pacientes con evolución favorable provenían de un solo centro. El entusiasmo inicial disminuyó por la demostración que en alguna forma no se cumplieron todos los requisitos que la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos exige para los trabajos doble ciego, motivo por el cual esta agencia demandó la elaboración de otro estudio que fue terminado prematuramente debido a resultados poco satisfactorios.

En el mismo año, apareció otro estudio con el anticuerpo E5 (IgM murina contra *E. coli* J5) que involucró a 468 pacientes y que al contrario del estudio anterior mostró mejores resultados en pa-

cientes sin choque (26% vs 56% en mortalidad). En los pacientes en choque no se demostró diferencia alguna en supervivencia (33).

Inhibición del TNE. Estudios iniciales en animales, en especial los de Opal y col (27) revelaron una menor supervivencia en animales neutropénicos tratados con AcMo contra TNF que en los que recibieron placebo luego de infección por *P. aeruginosa*. A nivel clínico, Fisher y col informaron recientemente los resultados de un estudio fase II y abierto que incluyó 80 pacientes quienes recibieron dosis escalonadas de un AcMo a TNF y en los cuales la mortalidad no se vio afectada por la droga (34). Esta fue, sin embargo, bien tolerada y se evidenció una tendencia hacia mejores resultados en aquellos pacientes con cuadro clínico más severo y con niveles más altos de TNF en suero. Actualmente se lleva a cabo un estudio multicéntrico con aproximadamente 800 pacientes cuyos resultados preliminares fueron presentados recientemente (35) revelando mayor efectividad en pacientes con choque séptico.

Otros productos: ya se han terminado estudios de fase III con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1a.). Los resultados publicados en forma de resumen sobre 893 pacientes provenientes de 63 centros, no demostraron mejoría en la supervivencia total cuando se comparó placebo con dos dosis diferentes del producto administradas por infusión continua. Sin embargo, en los pacientes con mayor riesgo al ingreso de mortalidad hubo un menor riesgo de mortalidad (44% vs 35%) (36).

En conclusión: la terapia con AcMo está aún en fase investigativa; protege a diferentes grupos de pacientes según el estudio y el producto utilizado; su mecanismo de acción es desconocido casi en su totalidad, existiendo además grandes variaciones en los resultados de los estudios animales. Los costos constituyen una barrera casi infranqueable para la gran mayoría de pacientes en nuestros países y aún en los países desarrollados teniendo en cuenta que el tratamiento tiene un valor del orden de los US\$4.000. Sin embargo, si se demuestra en el futuro una utilidad indiscutible es probable que el costo-beneficio sea favorable para su utilización.

Finalmente, los resultados desalentadores con terapias tan sofisticadas demuestran aún más que el manejo de este tipo de pacientes debe ser multifactorial y que probablemente la inhibición de una sola fase o paso del proceso inflamatorio es insuficiente para lograr un resultado clínico favorable.

ABSTRACT

Sepsis is a term used to define a group of clinical manifestations caused by the response to the presence of microorganisms, of different types, in the blood stream. This paper reviews in a minute fashion recent knowledge regarding the role of endotoxin in the pathogenesis of the disease as well as that of cytokines as mediators of the process, and finally some of the new therapeutic approaches.

REFERENCIAS

- Majno G. The ancient riddle of sepsis. *J Infect Dis* 1991; **163**: 937-945.
- Increase in national Hospital Discharge survey rate for septicemia-United States 1979-1987. *MMWR* **39**: 31-34.
- Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definidos (editorial). *Ann Intern Med* 1991; **114**: 332-333.
- Korones DN, Marshall GS, Shapiro ED. Outcome of children with occult bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Infect Dis J* 1992; **11**: 516-520.
- Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; **115**: 457-469.
- Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TJ, et al. Sepsis syndrome: A valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989; **17**: 389.
- Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TJ, et al. Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1987; **92**: 1032.
- Bone RC. Let's agree on terminology: Definitions of sepsis. *Crit Care Med* 1991; **19**: 973-976.
- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; **113**: 227-232.
- Wolff SM. Biological effects of bacterial endotoxin in man. *J Infect Dis* 1973; **128**(suppl): 259-264.
- Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1989; **1**: 122-126.
- Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; **323**: 27-36.
- Levin M. The inflammatory response to infections. In De Louvois J, Harvey D, eds. *Infection in the newborn*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd 1990: 1-12.
- Rietschel ET, Seydel U, Zähringer U. Bacterial endotoxin: Molecular relationships between structure and activity. *Infect Dis Clin North Am* 1999; **5**: 753-779.
- Shenep JL, Mogan KA. Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for experimental Gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 1984; **150**: 380-388.
- Giroir BP. Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med* 1993; **21**: 780-789.
- Dinarello CA. The proinflammatory cytokines Interleukin-1 and Tumour Necrosis Factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; **163**: 1177-1184.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; **161**: 984-995.
- Tracey KJ, Cerami A. Tumour necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993; **21**(suppl): S415-S422.
- Beutler B, Brau GE. Tumour necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 1993; **21**(suppl): S423-S435.
- Tracey KJ, Beutler B, Lory SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; **234**: 470-474.
- Girardin E, Grau GE, Daver JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. Tumour necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Eng J Med* 1988; **319**: 397-400.
- De Groote MA, Martin MA, Densen P, Pfaller MA, Wenzel PP. Plasma Tumour necrosis factor levels in patients with presumed sepsis. *JAMA* 1989; **262**: 249-257.
- Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumour necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1989; **17**: 975-978.
- Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Passive immunization against cachectin/tumour necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; **229**: 869-871.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kou GC, et al. Anticachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; **330**: 662-664.
- Opal SM, Cross AS, Kelly NM, Sadoff JC, Bodmer MW, Palardy JE, et al. Efficacy of a monoclonal antibody directed against tumour necrosis factor in protecting neutropenic rats from lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1990; **161**: 1148-1152.
- Dinarello CA. The biology of interleukin-1 and comparison to tumour necrosis factor. In: Root RK, Warren KS, McCleod Griffiss J, Sande MA, eds. *Immunization*. New York: Churchill Livingstone, 1989: 187-196.
- Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Gluser MP, Sadoff JC, et al. Treatment of Gram negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Eng J Med* 1982; **307**: 1225-1230.
- Baumgartner JD. Immunotherapy with antibodies to core lipopolysaccharide: a critical appraisal. *Infect Dis Clin North Amer* 1991; **5**: 915-927.
- Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, et al. Treatment of Gram negative septic shock with human IgG antibody to *Escherichia coli* J5: a prospective, double-blind, randomized study. *J Infect Dis* 1988; **158**: 312.
- Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, et al. Treatment of Gram negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin: A randomized, double blind, placebo-controlled trial. *N Eng J Med* 1991; **324**: 429-436.
- Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, Wenzel RP, Macintyre NR. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA* 1991; **266**: 1097-1102.
- Fisher CJ, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL. Influence of an anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993; **21**: 318-327.
- Wherry J, Wenzel R, Wunderink R, Silverman H, Perl T. Monoclonal antibody to human tumour necrosis factor. Multicenter efficacy and safety study in patients with the sepsis syndrome (abstract 696) 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, New Orleans, 1993.
- Opal SM, Sadoff JC, Fisher CJ, Dhainaut JF, Pribble JP. Initial findings of the Interleukin-1 receptor antagonist phase III trial in patients with severe sepsis (abstract 020). 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, New Orleans, 1993.