



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



Universitatea  
Lucian Blaga  
Sibiu

### **Investește în oameni!**

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013

Axa prioritară: nr. 1: “Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”

Domeniul major de intervenție: 1.5.: “Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului: “Armonizarea valențelor academice românești cu cele ale Comunității Europene”

Cod contract: POSDRU/CPP107/DM1.5/S/76851

Beneficiar: Universitatea “Lucian Blaga” din Sibiu

# **„MARKERI IMUNOLOGICI AI INFECȚIILOR RESPIRATORII LA SUGARI ALIMENTAȚI NATURAL VERSUS SUGARI CU ALIMENTAȚIE ARTIFICIALĂ” REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător științific:  
Prof univ. dr. Mihai Leonida Neamțu**

**Doctorand: Mirela Hila**

**SIBIU, 2017**

## INTRODUCERE

Infecțiile acute de căi respiratorii (IACR) se situează în topul patologiei pediatrice din țara noastră. Mai mult decât atât, conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), și la nivel mondial această patologie ocupă prima poziție între cauzele de morbiditate și mortalitate la sugar și copilul mic. Dacă pornim de la interpretarea clasică a patogenezei infecțiilor, putem afirma că semnele și simptomele acestora la nivelul organismului uman sunt consecința directă a replicării microbiene și a gradului de citotoxicitate a agenților patogeni. Deși aceste mecanisme sunt importante pentru înțelegerea evoluției ulterioare a infecțiilor respiratorii, o mare parte a cercetărilor științifice actuale s-au focusat pe răspunsurile imunologice la infecții, și rolul acestora în patogeniza bolii. Ca urmare, în medicina modernă se înregistrează o tendință, tot mai mare, de orientare spre evaluarea răspunsului imun, pentru stabilirea diagnosticului bolilor infecțioase. Abordarea diagnosticului imunologic este susținută de preocupările recente ale cercetătorilor, care depun eforturi considerabile pentru găsirea și validarea unor noi markeri biologici, care să reflecte răspunsul imun al organismului uman la contactul cu agenții microbieni. În ultimii ani am asistat la un progres al proceselor de informatizare și tehnologizare, atât în medicina clinică, dar mai ales la nivelul specialităților paraclinice, care au ridicat pe noi paliere posibilitățile diagnosticului medical. Dezvoltarea actuală a noilor tehnologii în domeniile științelor biomedicale a permis revoluționarea diagnosticului de laborator prin obținerea unor rezultate de mare finețe și precizie pentru testele analitice, indiferent de complexitatea lor.

Toate aceste aspecte legate de infecțiile acute respiratorii și complexitatea diagnosticului imunologic s-au împletit cu rezultatele cercetărilor științifice care au relevat existența unor corelații între ”sistemul imun din laptele matern” și statusul imun al sugarului alăptat, pentru a contura premisele lucrării de față. Aceasta își propune să aducă noi argumente la consolidarea bazei științifice care susține ideea ”transferului protecției înalt specifice” de la mamă la sugarul alăptat, prin evaluarea producției de citokine în infecții acute respiratorii, la sugari cu alimentație naturală, versus sugari cu alimentație artificială. Implicarea unor citokine în mecanismele imunopatogenetice ale infecțiilor respiratorii, rolul semnificativ pe care acestea îl joacă în imunomodulare și imunoprotecție, dar și faptul că citokinele din laptele matern rămân active imunologic în organismul sugarului sunt argumente foarte puternice care pledează pentru utilizarea acestora ca markeri biologici pentru evaluarea răspunsului imun al sugarului la infecții respiratorii.

Lucrarea este structurată în 9 capitole, include 217 note bibliografice, și oferă în prima parte o paletă largă de informații de actualitate, și rezultate ale unor studii din literatura de specialitate legate de subiectul ales, iar în a doua parte prezintă rezultatele investigațiilor științifice personale, ilustrate cu ajutorul unei iconografii care cuprinde 82 de tabele, 32 de figuri și 54 de diagrame, care întregesc și susțin textul, și prefigurează concluziile finale.

Mulțumirile mele se îndreaptă în primul rând către domnul Prof. Dr. Mihai Leonida Neamțu, conducătorul științific al tezei de doctorat, pentru sprijinul și sfaturile prețioase acordate, pentru fiecare lecție de profesionalism și rigurozitate în cercetarea științifică, pentru îndrumarea constantă pe parcursul tuturor etapelor acestui demers științific, pentru severitatea cu care m-a impulsionat să mă autodepășesc pentru a putea finaliza această lucrare.

Adresez mulțumiri speciale doamnei doctor Adela Sitar pentru ajutorul acordat în efectuarea analizei statistice și proiectarea reprezentărilor grafice, dar și pentru încurajările și sfaturile clare, atât de binevenite în labirintul statisticii. Mulțumirile mele speciale se îndreaptă și către doamna psiholog, expert lingvist Ștefania Duca, pentru întreaga implicare în partea de traducere a articolelor publicate, pentru promptitudinea cu care mi-a acordat de fiecare dată ajutorul său, dar mai ales pentru prietenia sa. Mulțumesc doamnei doctor Sbîrcea Claudia Adriana, o minunată colaboratoare și prietenă, pentru implicarea sa în culegerea datelor clinice și sprijinul său, precum și domnului inginer chimist Florin Moise, pentru sprijinul și colaborarea sa.

De asemenea, adresez mulțumiri speciale domnului doctor Bogdan Neamțu, coordonatorul echipei de cercetare a Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu, pentru întreaga colaborare și implicare în elaborarea raționamentului științific, pentru sprijinul prețios în publicarea articolelor științifice.

Aș dori să-i mulțumesc din tot sufletul soțului meu pentru sprijinul și încurajările sale permanente, pentru tot ajutorul acordat la ajustarea și finalizarea redactării acestei lucrări, dar mai ales pentru dragostea și răbdarea cu care m-a înconjurat pe tot parcursul elaborării ei.

Cele mai calde mulțumiri îi revin mamei mele, căreia îi datorez perseverența, determinarea și dorința de a finaliza toate proiectele începute. Îi sunt recunoscătoare pentru toate sacrificiile și eforturile depuse pentru realizarea mea profesională, și pentru susținerea necondiționată pe tot parcursul acestui proiect, până la finalizarea lui.

Cu toată dragostea, dedic această lucrare de doctorat memoriei tatălui meu, Nicolae Popa

**Cuvinte cheie:** infecții respiratorii, sugari, alimentație naturală, alimentație artificială, răspuns imun, markeri imunologici, citokine, interleukina 2, interleukina 8

## PARTEA GENERALĂ

Prima parte a lucrării este alcătuită din patru capitole, în care este redat stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește subiectul ales. Astfel, în **primul capitol** sunt prezentate aspecte actuale privind infecțiile respiratorii la sugari, atât în context mondial, cât și la nivel național. Numeroase studii evidențiază că bolile infecțioase respiratorii la copii se află pe primul loc în ierarhia diagnosticului pediatric, iar dintre infecțiile acute de căi respiratorii (IACR), pneumonia și bronșiolita reprezintă cauze majore de spitalizare la sugarii cu vârsta sub 1 an, cu prevalență crescută în timpul iernii. Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) patologia infecțioasă respiratorie se plasează pe primul loc în topul cauzelor de morbiditate și mortalitate la sugar și copilul mic, mai ales la nivelul țărilor subdezvoltate sau în curs de dezvoltare [1-13]. De asemenea, în primul capitol am dezvoltat câteva considerații etiologice ale infecțiilor acute respiratorii. Acestea au relevat faptul că implicarea agenților virali în etiologia infecțiilor acute de căi respiratorii (IACR) este mai frecventă, că de cele mai multe ori agenții patologici de origine bacteriană sunt responsabili de coinfecții sau suprainfecții, și se asociază preponderent cu o evoluție nefavorabilă a bolii, până la complicații letale, în special la sugari. Mai mult, în tabloul etiologic al infecțiilor acute respiratorii elementul central este reprezentat de virusul respirator sincițial (RSV) [14-25]. Primul capitol cuprinde și aspecte legate de factorii de risc ai infecțiilor acute de căi respiratorii (IACR), despre necesitatea menținerii sub control a factorilor de risc pentru o bună profilaxie a infecțiilor respiratorii. Astfel, alimentația naturală și comportamentul parental adecvat (limitarea expunerii sugarului la poluanți precum fumul de țigară) pot constitui metode obținute prin educație, de combatere a factorilor de risc modificabili [25-45].

Deoarece nucleul acestui studiu este reprezentat de aspectele imunologice ale infecțiilor respiratorii la sugari alimentați natural versus cei alimentați artificial, **al doilea capitol** prezintă mecanismele imunologice implicate în patogeniza infecțiilor respiratorii la sugar. Acest capitol este structurat în două subcapitole. Primul subcapitol este dedicat unor noțiuni generale asupra

imunității (definiție, funcțiile sistemului imun, tipuri de răspuns imun), precum și asupra aspectelor legate de organizarea complexă a sistemului imun pentru crearea unui cadru optim desfășurării mecanismelor imunității, și elaborării răspunsul imun înnăscut, nespecific (RIN), respectiv a răspunsul imun dobândit, specific (RIS), cu cele două componente ale sale, răspunsul imun celular (RIC) și răspunsul imun umoral (RIU) [48-56]. Al doilea subcapitol descrie corelațiile între mecanismele imunologice și patogeniza infecțiilor respiratorii, utilizând modelul infecțiilor cu virusul respirator sincițial (RSV), un model experimental care a servit cercetătorilor pentru studiul efectelor multiple ale acțiunii virale, atât asupra tractului respirator, cât și asupra sistemului imunitar uman. Acest subcapitol este practic o sinteză asupra numeroaselor studii care au adus cele mai elocvente date științifice, pentru o mai bună cunoaștere a răspunsului imun în infecții acute de căi respiratorii (IACR) de etiologie virală, la sugari, care deși sunt protejați de prezența anticorpilor materni specifici anti-RSV, reprezintă, totuși, categoria cea mai imatură imunologic, și ca urmare cea mai susceptibilă de a contacta infecțiile virale. În descrierea răspunsului imun înnăscut sau nespecific (RIN) la sugari, în infecția cu RSV am relevat atât implicarea componentelor celulare, cât și a citokinelor, subliniind intervenția interleukinei 8 (IL-8) în chemotaxie și fagocitoză, procese centrale ale imunității înnăscute. De asemenea, în descrierea răspunsului imun dobândit sau specific (RIS), din infecția cu RSV la sugari, am evidențiat atât implicarea componentelor celulare, cât și a celor umorale, punctând intervenția imunomodulatoare a citokinelor în diferențierea răspunsului Th1/Th2, precum și implicarea interleukinei 2 (L-2) în răspunsul imun de tip Th1 [77-130].

**Capitolul trei** este dedicat citokinelor. Acesta cuprinde în prima parte o caracterizare generală a citokinelor, definirea și clasificarea lor, iar în a doua parte sunt prezentate aspectele funcționale ale interleukinei 2 (IL-2) și interleukinei 8 (IL-8), cele două citokine care au constituit markerii diagnostici aflați în centrul evaluării imunologice a sugarilor luați în studiu [48-77].

**Capitolul patru** cuprinde aspecte generale ale diagnosticului de laborator în infecțiile acute respiratorii, subliniază rolul major al proteinelor de fază acută în algoritmul de diagnostic al reacției inflamatorii din infecțiile respiratorii, precum și direcțiile actuale ale evaluării de laborator pentru markerilor imunologici. Dacă markerii inflamatori de tipul proteinei C reactive (PCR), procalcitoninei (PCT), vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH) sau numărului total de

leucocite conturează un context inflamator, fără să aibă specificitate pentru infecțiile acute respiratorii, cercetările științifice actuale au demonstrat creșteri, mai mult sau mai puțin specifice, ale unor markeri imunologici de tipul citokinelor, în infecții acute de căi respiratorii (IACR). Producția de citokine după stimularea prin antigene virale, bacteriene, fungice se poate măsura printr-o varietate de metode: ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay), citometrie în flux (determinarea citokinelor intracelulare), reacția de polimerizare în timp real (real-time PCR) pentru expresia citokinelor prin mRNA, teste de multiplexare de tipul reacției de polimerizare în lanț [131-147].

## **PARTEA DE CERCETĂRI PERSONALE**

**Capitolul cinci** prefațează cercetarea personală propriu-zisă, prin prezentarea elementelor contextului științific actual, care au dus la creionarea motivației cercetării. Acest capitol cuprinde aspecte legate de conceptul de ”sistem imun în laptele matern”, provocări, imperative, și evidențe, de la conturarea ideii acestui concept, până la evoluția lui actuală. Pornind de la conceptul că factorii bioactivi din laptele matern se constituie ca un „adevărat sistem imun”, care suplinește imaturitatea sistemului imun adaptativ al nou-născutului, precum și insuficienta dezvoltare a componentelor sistemului imun înăscut, aceștia au fost clasificați după mai multe criterii: natura chimică, funcțiile lor, mecanismul de acțiune în cadrul răspunsului imun. Rolul factorilor bioactivi din laptele matern asupra sistemului imun al sugarului a fost dovedit prin numeroase studii. O parte dintre acestea au evidențiat rolul semnificativ al citokinelor din laptele matern în imunomodulare și imunoprotecție. Dovezile științifice au consolidat conceptul de ”sistem imun în laptele matern”, și au evidențiat corelațiile acestuia cu statusul imun al sugarului alăptat [151-172, 202].

Primul capitol al cercetării personale prezintă și aspecte legate de beneficiile alăptării asupra dezvoltării sistemului imun și apărării antiinfecțioase la sugar și copilul mic, precum și aspecte cu privire la dinamica naturală a beneficiilor imune ale laptelui matern, în contextul promovării sensibilizării sau toleranței imunologice pentru sugarul alimentat cu lapte matern. Acest capitol cuprinde și schema ”circuitului entero-bronho-mamar”, realizată după datele din literatura de specialitate, conform căroră acest circuit al limfocitelor B IgA secretorii, împreună cu sistemul imun al mucoaselor, reprezintă mijlocul de transfer al protecției înalt specifice de la mamă la

copil, prin intermediul alăptării. Evidențele descrise, consolidate de rezultatele cercetărilor asupra beneficiilor imune ale laptelui matern în apărarea antiinfecțioasă, în dezvoltarea imunologică la sugar și copilul mic, deschid noi perspective în monitorizarea stării de sănătate a sugarului, ducând tendințele actuale de diagnostic spre creșterea utilizării markerilor imunologici [154-183, 202].

**Capitolul șase** prezintă premisele, obiectivele, materialul și metodologia cercetării personale. **Premisele cercetării** reprezintă, de fapt, o sinteză a tuturor aspectelor prezentate în capitolul cinci, care prefațează partea personală a tezei, cu datele științifice actuale, necesare în crearea complexului motivațional al cercetării. Pornind de la premisele cercetării s-au stabilit următoarele **obiective** concrete:

- I) Evaluarea imunologică a sugarilor cu infecții acute de căi respiratorii (IACR), și găsierea unor corelații între concentrațiile serice ale citokinelor IL-2 și IL-8 cu nivelurile serice sau plasmatică ale celorlalți parametri inflamatori și imunologici, în cadrul loturilor studiate;
- II) Compararea statusului imun al sugarilor alimentați natural, cu cel al sugarilor alimentați cu diverse formule de lapte praf, în cadrul grupelor de sex și vârstă;
- III) Corelarea mai exactă a parametrilor imunologici cu tipul de alimentație lactată a sugarului, în cadrul tipurilor mai frecvente de infecții acute de căi respiratorii (IACR);
- IV) Completarea dovezilor științifice care pledează pentru transferul dozărilor citokinice, din compartimentul de cercetare în compartimentul diagnosticului paraclinic;
- V) Obținerea unor argumente în favoarea încadrării dozărilor serice ale citokinelor IL-2 și IL-8, în pachetul markerilor imunologici ai diagnosticului de laborator pentru IACR;
- VI) Contribuție la stabilirea intervalelor valorilor de referință pentru nivelul seric al citokinelor IL-2 și IL-8, prin dozările serice ale acestora la subiecții lotului martor;
- VII) Evidențierea unei corelații între factorii de risc reprezentați de comportamentele nocive ale părinților (fumat în perioada de sarcină și alăptare), și accelerarea proceselor inflamatorii.

**Materialul cercetării:** Pentru atingerea obiectivelor propuse am realizat un studiu prospectiv randomizat, care s-a desfășurat pe o perioadă de 12 luni (ianuarie 2014 – ianuarie 2015) în Clinica de Pediatrie a Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu. Am inclus în studiu sugari cu vârsta cuprinsă între **1-22 luni**, care au respectat criteriile stabilite pentru lotul de cercetat, respectiv

lotul martor. Lotul de studiu a fost constituit dintr-un număr de **86 subiecți** care au fost împărțiți în:

A) **Lotul de cercetat** a inclus **54 de sugari**, care au fost selectați după următoarele criterii:

***Criteriile de includere:***

- Prezența la internare a semnelor și simptomelor pentru infecții acute respiratorii;
- Analize de laborator sugestive pentru un profil inflamator pozitiv;
- Alimentația lactată să constituie alimentația de bază;

***Criteriile de excludere:***

- Semne și simptome sugestive pentru infecții acute cu altă localizare, decât cea respiratorie;
- Prezența unor boli cronice în antecedentele personale patologice ale mamei și sugarului;
- Existența unor malformații ale aparatului respirator și cardio-vascular la sugar;
- Tratamente cu corticosteroizi sau imunosupresoare (mamă, sugar), anterioar internării;
- Probe biologice hemolizate sau lipemice.

B) **Lotul martor** a cuprins un număr de **32 de sugari**, selectați după următoarele criterii:

***Criteriile de includere:***

- Absența la internare a semnelor și simptomelor pentru IACR, sau cu altă localizare;
- Profil inflamator negativ, susținut prin analizele de laborator;
- Alimentația lactată să constituie alimentația de bază;

***Criteriile de excludere:***

- Prezența semnelor și simptomelor sugestive pentru IACR, sau cu altă localizare;
- Analize de laborator sugestive pentru un profil inflamator pozitiv
- Prezența unor boli cronice în antecedentele personale patologice ale mamei și sugarului;
- Existența unor malformații ale aparatului respirator și cardio-vascular la sugar;
- Tratamente cu corticosteroizi sau imunosupresoare (mamă, sugar), anterioar internării;
- Probe biologice hemolizate sau lipemice.

Atât lotul de cercetat, cât și lotul martor au fost subîmpărțite în câte 2 loturi, în funcție de tipul alimentației lactate, respectiv cu alimentație naturală (**LM / MLM**) și artificială (**LP / MLP**):



- **Lotul de Cercetat:** 28 sugari alimentați natural (**LM**) și 26 sugari alimentați artificial (**LP**);
- **Lotul Martor:** 16 sugari alimentați natural (**MLM**) și 16 sugari alimentați artificial (**MLP**).

**Metodologia cercetării** a vizat realizarea unei analize comparative a statusului imun al sugariilor alimentați natural versus sugari alimentați artificial incluzând:

- Datele anamnestice și clinice de diagnostic consemnate în foile de observație ale pacienților care au întrunit criteriile de includere în studiu;
- Investigațiile de laborator uzuale: Hemograma, Proteina C reactivă, Sideremia, Proteinemia, Electroforeza proteinelor serice, Imunograma serică, Frațiunea C<sub>3</sub> a complementului.
- Investigații de laborator speciale: dozările nivelului seric al interleukinelor IL-2 și IL-8, pentru care s-au utilizat kituri de cercetare ELISA, care nu au fost prevăzute cu recomandări pentru intervalele valorilor de referință. De aceea, în urma analizei rezultatelor studiilor care au făcut dozări de citokine pe subiecți sănătoși, în mare parte realizate pe subiecți adulți, am considerat ca valori crescute pentru **interleukina 2 (IL-2)**, toate valorile obținute > 15 pg/ml, iar pentru **interleukina 8 (IL-8)**, toate valorile obținute > 35 pg/ml.

**Aspectele etice ale cercetării:** Pentru realizarea acestei cercetări au fost respectate aspectele etice ale Declarației de la Helsinki. Pentru fiecare din pacienții incluși în studiu, s-a obținut acordul informat al părinților, deoarece subiecții s-au încadrat în intervalul de vârstă 1-22 luni. La internarea în spital, consimțământul părinților a fost documentat prin semnătură pe formularul de acceptare, formular aprobat de Comisia de etică a Spitalului Clinic de Pediatrie Sibiu. S-au respectat procedurile pentru minimizarea riscurilor recoltării de sânge, inclusiv interogatoriul în legătură cu prezența bolilor cronice sau transmisibile în antecedentele patologice personale sau familiale ale subiecților. De asemenea, a fost respectată confidențialitatea subiecților.

**Analiza statistică a datelor:** Pentru prelucrarea statistică a datelor s-a utilizat baza de date Excel 2010, care a permis aplicarea programului statistic SPSS, versiunea 21. S-au aplicat metode ale statisticii inferențiale, atât de tipul testelor parametrice, care dau rezultate valide și se bazează pe media variabilei, cât și teste non-parametrice, bazate pe mediană. S-au folosit următoarele teste: t-Student (T-TEST), test Chi pătrat (CHI-TEST), ANOVA, Kolmogorov-Smirnov, testul Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, regresie multiplă (utilizând metoda stepwise). A fost considerată ca diferență semnificativă statistic o valoare a  $p < 0,05$ .

**Capitolul șapte** este cea mai extinsă parte a tezei și prezintă **rezultatele cercetării personale**, iar **capitolul opt** este dedicat **discuțiilor** referitoare la rezultatele cercetării, analiza complexă a datelor obținute, în comparație cu datele din literatura de specialitate. În cele ce urmează sunt prezentate aspectele mai importante ale rezultatelor și discuțiilor cercetării personale.

În ceea ce privește rezultatele analizei efectuate pentru caracterizarea generală, demografică și clinică, a loturilor luate în studiu, acestea au arătat:

- distribuția neomogenă a subiecților în cadrul loturilor: 63% lotul de cercetat, 37% lotul martor;
- diferențe semnificative statistic ( $p=0.05$ ) între vârsta medie a subiecților din lotul de cercetat (10.8 luni) și vârsta medie a subiecților din lotul martor (7.4 luni);
- repartitia relativ omogenă pe sexe, atât în lotul de cercetat (44% sex masculin / 56% sex feminin), cât și în lotul martor (56% sex masculin / 44% sex feminin);
- în lotul de cercetat, care a fost împărțit în trei grupe, în funcție de diagnosticul de boală respiratorie, cel mai frecvent diagnostic a fost cel de pneumonie (54%), urmat de diagnosticul de IACRS (28%), iar cel mai rar a fost diagnosticul de bronșiolită (18%);
- din punctul de vedere al prezenței antecedentelor personale patologice respiratorii (APPR), repartitia între cele două loturi a fost uniformă (peste 50% din subiecții lotului de cercetat, respectiv din lotul martor au prezentat APPR);
- după separarea loturilor studiate (lotul de cercetat și lotul martor) în 4 grupuri diferite în funcție de expunerea la fumatul intrafamiliar (mama fumătoare, tata fumător, ambii părinți fumători, fără expunere) analiza distribuției subiecților a relevat faptul că, în lotul de cercetat cel mai mare număr de sugari au fost expuși la fumatul intrafamiliar (35% cu tata fumător, 17% cu mama fumătoare, 22% cu ambii părinți fumători), iar în lotul martor subiecții fără expunere la fumatul intrafamiliar au reprezentat mai mult de jumătate (56%), din numărul total de subiecți.

Analiza statistică la nivelul celor patru loturi rezultate (LM, LP, MLM, MLP), după subîmpărțirea lotului de cercetat, și respectiv a lotului martor, în funcție de alimentația lactată diferită a sugarilor a relevat:

- ❖ Diferențe semnificative statistic ( $p=0.005$ ) între vârsta medie a sugarilor din lotul de cercetat al sugarilor alimentați natural (LM) și lotul martor al sugarilor alăptați (MLM);

- ❖ Nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două sexe, din punct de vedere al vârstei medii, în nici unul din cele patru loturi (LM, LP, MLM, MLP);
- ❖ În ceea ce privește distribuția subiecților în cadrul celor 4 grupuri diferite din punct de vedere al expunerii la fumat, adică non-expuși și cele trei categorii de expuși (mama fumătoare, tata fumător, ambii părinți fumători), au fost înregistrate diferențe semnificative statistic ( $p=0.04$ ) între loturile examinate (LM, LP, MLM, MLP);
- ❖ Între cele două loturi de cercetat (LM și LP) nu au existat diferențe semnificative statistice în ceea ce privește prezența afecțiunilor respiratorii, deși în ambele loturi au fost mai frecvente pneumoniile (60.71% în lotul LM și respectiv 46.15% în lotul LP), iar numărul bronșiolitelor a fost vizibil mai scăzut în rândul sugarilor alăptați (10.71%).
- ❖ Distribuția în funcție de prezența / absența APPR a înregistrat diferențe semnificative statistic ( $p=0.004$ ) între loturile studiate, cu o prezență categoric mai mare a APPR la sugarii alimentați cu diverse formule de lapte praf (LP, MLP), în comparație cu sugarii alimentați cu lapte matern (LM, MLM), atât între loturile de cercetat (39.29% pentru LM și 69.23% pentru LP), cât și între loturile martor (31.25% pentru MLM și 81.25% pentru MLP);
- ❖ La analiza statistică a parametrilor biologici uzuali luați în studiu în cadrul loturilor studiate am înregistrat următoarele rezultate:
  - Analiza comparativă a variabilelor ce cuantifică proteina C reactivă (PCR) a demonstrat diferențe semnificative statistic ( $p<0.0001$ ) per global, între cele patru loturi, iar în funcție de sexul pacienților a relevat diferențe semnificative statistic doar pentru sexul masculin ( $p=0.021$ ), la care a fost obținută și cea mai mare valoare medie a PCR, în lotul LM (băieții alăptați la sân au avut o reacție de fază acută mai exprimată);
  - În ceea ce privește diferențele înregistrate pentru variabilele care cuantifică hemoglobina plasmatică, per global și pentru sexul feminin nu au existat diferențe semnificative statistic, dar la sexul masculin au existat diferențe ( $p=0.04$ ) între lotul de cercetat al sugarilor alimentați artificial (LP) și ambele loturi martor: MLM și MLP;
  - Analiza statistică a valorilor medii ale sideremiei a evidențiat diferențe semnificative între loturile de cercetat (LM, LP) și loturile martor (MLM, MLP), atât per global, cât și la fiecare din cele două sexe, iar valorile medii ale sideremiei au fost semnificativ

- mai mari la sugarii de sex masculin alimentați cu lapte matern, , atât în lotul de cercetat (LM), cât și în lotul martor (MLM);
- Analiza statistică a variabilelor care cuantifică numărul total de leucocite a evidențiat diferențe semnificative ( $p < 0.001$ ), între cele patru loturi, atât per global, cât și pe sexe.
  - Analiza statistică pentru proteinele serice totale nu a înregistrat diferențe semnificative între loturi, per global, sau pe sexe; Dintre fracțiunile electroforetice ale proteinelor, fracțiunea alfa ( $\alpha_2$ ), deși a prezentat valori medii în limitele intervalului de referință, diferențele au fost semnificative per global, la sexul masculin, și la sexul feminin, între loturile LM versus MLM, LM versus MLP, LP versus MLM, și LP versus MLP;
  - La analiza statistică a imunoglobulinelor serice s-au evidențiat diferențe semnificative între loturi, per global pentru IgA ( $p = 0.005$ ), IgM ( $p = 0.003$ ), IgG ( $p = 0.014$ ), la sexul feminin pentru IgA ( $p = 0.046$ ), IgG ( $p = 0.05$ ), la sexul masculin pentru IgM ( $p = 0.001$ ).
  - Analiza statistică pentru fracțiunea C3 a complementului nu a evidențiat diferențe semnificative între cele patru loturi, nici per global, nici pe sexe, dar în cadrul lotului martor al sugarilor alimentați artificial (MLP) s-au înregistrat diferențe cu semnificație statistică ( $p = 0.011$ ) între sexe, prin valori mai mari pentru sexul feminin.
- ❖ Evaluarea imunologică a sugarilor din loturile studiate utilizând parametrii de laborator deja validați a fost completată de dozarea interleukinelor IL-2 și IL-8; Analiza statistică și studiul corelațiilor dintre interleukine și alte variabile analizate au evidențiat următoarele aspecte:
- Pentru ambele interleukine s-au evidențiat diferențe semnificative statistic între loturile de cercetat și loturile martor (LM versus MLM, și LM versus MLP, dar și LP versus MLM, LP versus MLP), atât per global, cât și pe sexe ( $p < 0.0001$ ); Valorile medii atât ale IL-2, cât și ale IL-8 au fost mult mai mari în lotul LM, decât în lotul LP;
  - La studiul factorilor independenți de predicție, per global, pentru diferitele variabile prin regresie multiplă (metoda stepwise), rezultatele noastre au relevat că, infecțiile acute respiratorii reprezintă factori de predicție independenți pentru valorile ambelor interleukine IL-2 și IL-8 ( $p < 0.0001$ ), precum și pentru proteina C reactivă ( $p = 0.0014$ );

- În grupul sugarilor alimentați natural (LM, MLM), doar infecțiile acute respiratorii s-au dovedit a fi factori de predicție independenți pentru valoarea PCR ( $p=0.018$ ), și a interleukinelor IL2 ( $p=0.0013$ ), IL8 ( $p=0.002$ );
- În grupul sugarilor alimentați artificial (LP, MLP) s-au evidențiat: un factor de predicție pentru mai multe variabile, și mai mulți factori de predicție pentru o variabilă :
  - Factorul de predicție IACR pentru variabilele PCR ( $p=0.03$ ) și IL-8 ( $p=0.01$ );
  - Fumatul intrafamiliar ( $p=0.0083$ ) și IgA ( $p=0.0005$ ) au fost factori de predicție pentru variabila IL-2
  - Frațiunea C3 a complementului a avut cei mai mulți factori de predicție: vârsta ( $p=0.0011$ ), expunerea la fumat ( $p=0.018$ ), imunoglobulinele IgM ( $p=0.0033$ ), și IgG ( $p=0.012$ );
- Aprecierea calității și valorii diagnostice a parametrilor analizați, prin prisma criteriilor de performanță reprezentate de sensibilitate și specificitate (calcularea AUROC) a relevat că, per global:
  - pentru valori ale IL-2  $\geq 17.2$  pg/ml, capacitatea acestei variabile de a identifica pacienții cu IACR se caracterizează printr-o sensibilitate și o specificitate de 100%;
  - pentru valori ale IL-8  $\geq 9.9$  pg/ml, criteriile de performanță pentru capacitatea de predicție a IACR, au fost o sensibilitate de 100% și o specificitate de 96.87%;
  - pentru valori PCR  $\geq 7$  mg/dl, sensibilitatea a fost 66.67%, iar specificitatea 100%;
- La nivelul loturilor studiate au existat corelații pozitive semnificative ( $p<0.0001$ ) între cele două interleukine IL-2 și IL-8, dar și între acestea și parametrii cantitativi analizați, cu diferite valori ale coeficientului de corelație: PCR, imunoglobulinele IgA, IgM, IgG numărul total de leucocite, numărul de neutrofile și limfocite, fracțiunea electroforetică proteică alfa; deși au existat corelații semnificative statistice între PCR și cele două interleukine IL-2 și IL-8, rezultatele noastre au evidențiat între aceste variabile un grad redus de asociere pozitivă (repartiția grafică neomogenă a punctelor de corelație);

- ❖ Rezultatele cercetării au arătat o corelare pozitivă între expunerea la fumatul intrafamiliar și variabilele care cuantifică IL-2 ( $p=0.0006$ ), și IL-8 ( $p=0.047$ ); Cele mai mari valori pentru variabilele ce cuantifică IL-8 și IL-2 s-au înregistrat la sugarii cei mai expuși, cu ambii părinți fumători, rezultate similare cu cele ale unor studii recente care au demonstrat că ”tutunul determină accelerarea proceselor inflamatorii prin creșterea expresiei mediatorilor inflamației, și o augmentare a markerilor serici inflamatori”; În ceea ce privește influența intricată a factorului benefic, reprezentat de laptele matern, cu factorul distructiv, reprezentat de tutun, trebuie menționat faptul că, rezultatele pentru variabilele care cuantifică IL-2 și IL-8, au fost mai mari în lotul de cercetat al sugarilor alimentați natural (LM), în comparație cu lotul de cercetat al sugarilor alimentați artificial (LP), în cadrul tuturor grupelor de sugari, cu expunere la fumatul intrafamiliar;
- ❖ În lotul de cercetat LM, rezultatele analizei răspunsului imun specific (RIS) din IACR, prin cuantificarea valorilor IL-2 au evidențiat valori de aproximativ 10 ori mai mari în cazul infecției respiratorii mai severe (pneumonia); În ceea ce privește cuantificarea răspunsului imun nespecific (RIN) din IACR, prin rezultatele obținute la dozarea IL-8, în ambele loturi de cercetat (LM, LP), per global, între valorile variabilelor care cuantifică IL-8, în funcție de tipul infecțiilor respiratorii s-au înregistrat diferențe ne semnificative statistic; Trebuie menționat faptul că, în lotul de cercetat al sugarilor alimentați natural (LM), între valorile IL-8 și severitatea infecțiilor respiratorii s-a găsit un grad mai ridicat de corelație pozitivă, comparativ cu nivelul acesteia din lotul de cercetat al sugarilor alimentați cu diverse formule de lapte (LP);
- ❖ Antecedentele personale patologice respiratorii (APPR) reprezintă un factor de predicție slab, pentru interpretarea răspunsului imun specific celular (RIC), prin intermediul IL-2, și a răspunsului imun nespecific (RIN) cuantificat prin IL-8;
- ❖ Deoarece prevalența Hiper IL-2 (toate valorile care au depășit 15 pg/ml) în cadrul ambelor loturi de cercetat (LM, LP) a fost de 100%, pentru toate grupele de vârstă, se poate spune că, pentru loturile de cercetat (LM, LP), răspunsul imun specific (RIS) la infecțiile respiratorii, cuantificat prin interleukina 2 (IL-2) a fost independent de alimentația lactată a sugarilor; Dar în lotul martor al sugarilor alimentați artificial (MLP), s-au înregistrat diferențe între grupurile de vârstă pentru prevalența HIPER IL-2 Aceste rezultate susțin ideea, conform căreia la sugarii sănătoși (în absența diagnosticului de infecție respiratorie sau de altă

localizare), concentrația serică a IL-2 poate varia în funcție de alimentația lactată, și că în cazul alimentației cu diverse formule de lapte praf, ar putea exista o stimulare antigenică non-infecțioasă, care ar putea influența răspunsul imun, mai ales că ”în timpul copilăriei există un echilibru fin între toleranță și sensibilizare imunologică” [158, 173-176, 202];

- ❖ Prevalența Hiper IL-2 în cadrul loturilor de cercetat (LM, LP) a fost de 100%, pentru toate categoriile de infecții acute respiratorii studiate (IACRS, bronșiolită, pneumonie), ceea ce ar îndreptăți considerarea IL-2 ca fiind un posibil marker imunologic în diagnosticul direct al infecțiilor acute respiratorii, dar fără importanță în diagnosticul diferențial al IACR;
- ❖ Prevalența Hiper IL-8 (toate valorile care au depășit 35 pg/ml) în cadrul loturilor de cercetat (LM, LP), și pe grupe de vârstă, a variat între un minim de 62.5%, în lotul LP, la grupa de vârstă 6-11 luni, și un maxim de 100%, în lotul LM, la grupa de vârstă peste 18 luni. Conform acestor rezultate, se poate afirma că răspunsul imun nespecific (RIN) în infecțiile respiratorii, cuantificat prin IL-8 este dependent de vârstă și de alimentația lactată a sugariilor;
- ❖ Prevalența crescută a Hiper IL-8 în infecțiile acute de căi respiratorii (IACR) la sugari este o dovadă în favoarea utilizării acestei chemokine, ca marker pentru diagnosticul pozitiv, dar gradul slab de corelare a Hiper IL-8 cu gradul de severitate al infecțiilor respiratorii nu a permis conturarea argumentelor necesare utilizării IL-8 ca marker de diagnostic diferențial în infecțiile acute respiratorii. Este posibil ca lipsa acestor argumente să se datoreze pe de o parte numărului moderat de cazuri analizate și timpului de înjumătățire ( $T_{1/2}$ ) foarte scurt pentru IL-8, a cărei concentrație serică are o creștere rapidă în infecțiile acute, și caracteristicilor socio-demografice personale ale subiecților incluși în studiu, pe de altă parte [68, 69, 73, 76];
- ❖ Rezultatele analizei comparative între prevalența valorilor crescute a celor două interleukine studiate (IL-2 și IL-8), în funcție de sex și tipul de infecție acută respiratorie au evidențiat diferențe semnificative doar pentru IL-8.

**Capitolul nouă** prezintă **concluziile finale** ale cercetării, desprinse după analiza loturilor și a tuturor corelațiilor stabilite între acestea, în funcție de variabilele alese:

1. Sugarii alimentați natural în lotul de cercetat au avut vârsta medie semnificativ statistic diferită față de cei din lotul martor.

2. În ambele loturi, cele mai frecvente au fost pneumoniile dar numărul bronșiolitelor a fost vizibil mai scăzut în rândul sugariilor alăptați.
3. Atât în cazul loturilor de cercetat (LM, LP) cât și în cazul loturilor martor (MLM, MLP) au fost înregistrate diferențe semnificative statistic pe seama unei prezențe categoric mai mari a antecedentelor personale patologice respiratorii la sugarii alimentați cu diverse formule de lapte praf în comparație cu sugarii alimentați cu lapte matern.
4. Între cele patru loturi examinate (LM, LP, MLM, MLP) s-au evidențiat diferențe semnificative statistic din punctul de vedere al expunerii la fumatul intrafamiliar în funcție de distribuția sugariilor în cadrul grupelor corespunzătoare celor patru categorii.
5. Concentrația serică a proteinei C reactive (PCR) a fost semnificativ statistic diferită între loturile de cercetat (LM, LP) și loturile martor (MLM, MLP), per global, iar pe sexe doar la sexul masculin.
6. Valorile medii ale numărului total de leucocite au fost semnificativ mai mari la sugarii cu IACR, din loturile de cercetat (LM, LP), comparativ cu valorile înregistrate la decât la componenții loturilor martor (MLM, MLP).
7. La nivelul loturilor de cercetat (LM, LP) s-a înregistrat o ușoară creștere a valorii medii a ponderii neutrofilelor, mai pregnantă la subiecții cu alimentație artificială (LP) și o valoare medie a leucocitelor mai mare la sugarii din lotul cu alimentație naturală (LM).
8. La nivelul întregului lot de studiu, valoarea medie obținută pentru ponderea limfocitelor, din totalul leucocitelor, s-a încadrat în limitele intervalului de referință pentru vârstă însă au existat diferențe semnificative statistic între loturile de cercetat (LM, LP) și loturile martor (MLM și MLP), la nivel global și la sexul feminin.
9. Analiza statistică pentru valorile medii ale sideremiei a evidențiat diferențe semnificative între loturile de cercetat (LM, LP) și loturile martor (MLM, MLP), atât per global, cât și la fiecare din cele două sexe. Valorile scăzute ale sideremiei, în ambele loturi de cercetat (LM, LP), exprimă probabilitatea instalării anemiei feriprive în context infecțios.
10. Analiza statistică pentru proteinele serice totale nu a relevat diferențe semnificative între loturi, nici per global, nici pe sexe. Pentru *fracțiunea  $\alpha_2$* , diferențele au fost semnificative statistic între loturile de cercetat și loturile martor, la ambele sexe, sugerând o valoare diagnostică mai mare în infecțiile respiratorii la sugari.



11. În grupul sugarilor alimentați artificial, cu diverse formule de lapte praf, răspunsul imun umoral (RIU) a fost mai puternic exprimat la sexul feminin, atât pentru lotul de cercetat (LP) cât și pentru lotul martor MLP. Componenta C3 a complementului seric, a evidențiat un răspuns imun nespecific (RIN) mai intens, pentru sugarii de sex feminin, alimentați artificial, din lotul martor (MLP).
12. Determinarea concentrației serice a IL-2 și IL-8 are o notă de originalitate în condițiile în care acești markeri imunologici nu au încă metode validate de determinare în laborator.
13. Evaluarea imunității specifice, dobândite, prin analiza statistică a rezultatelor obținute la dozarea IL-2 subliniază faptul că în infecții acute respiratorii, în cazul sexului feminin, pare să existe răspuns imun celular (RIC) mai bine exprimat decât la sexul masculin.
14. Evaluarea imunității nespecifice, înăscute prin analiza statistică a rezultatelor obținute la dozarea IL-8, permite postularea următoarelor aspecte:
  - Sugarii alimentați natural dezvoltă un răspuns imun nespecific, înăscut mai amplu.
  - La sexul feminin răspunsul imun nespecific (RIN) este mai bine exprimat.
  - În loturile LM, MLM, doar IACR au fost factori de predicție pentru PCR, IL2, IL8.
15. În grupul sugarilor alimentați artificial (LP, MLP) s-au evidențiat mai mulți factori de predicție independenți pentru valoarea unei variabile; variabilele PCR și IL-8 au avut ca factori de predicție independenți doar IACR, IL-2 a avut ca factori de predicție fumatul intrafamiliar și IgA iar fracțiunea C3 a complementului a avut cei mai mulți factori de predicție și anume vârsta, expunerea la fumat, valorile imunoglobulinelor M și G.
16. Pentru întreg lotul de studiu, analiza statistică a variabilelor cantitative, a relevat corelații pozitive, pentru aproape toate variabilele studiate și respectiv corelații negative între ponderea limfocitelor și PCR, IL-2, IL-8. Am constatat lipsa corelațiilor semnificative între ponderea monocitelor și variabilele studiate.
17. Pentru capacitatea de a identifica pacienții cu IACR, PCR are un indicativ bun ca marker diagnostic pentru IACR la sugari, cu o sensibilitate de 70% și specificitate de 100% și cu o performanță mai bună la nivelul loturilor formate din sugari alimentați cu lapte matern (LM și MLM), comparativ cu cea înregistrată în loturile sugarilor alimentați cu diverse formule de lapte praf (LP și MLP);
18. IL-2 și IL-8 au arătat o performanță maximă de a identifica pacienții cu infecții IACR (sensibilitate de 100% și specificitate de cel puțin 97%), cu o capacitate mai ridicată de

predicție decât PCR; sensibilitatea și specificitatea testelor de dozare a IL-2 și IL-8, acestea nu au înregistrat diferențe în funcție de alimentația lactată a sugarilor, performanța fiind maximă în toate cele patru loturi (LP, LM, MLM, MLP)

19. Expunerea intrafamilială la fumul de țigară corelează pozitiv cu nivelul seric al IL-2 și IL-8, mai ales în cazul ambilor părinți fumători.
20. În lotul de cercetat al sugarilor alimentați natural (LM) am înregistrat un răspuns imun specific celular cuantificat prin valorile IL-2 de 10 ori mai intens în cazul IACR severe (pneumonia).
21. În ambele loturi de cercetat (LM, LP), per global, s-au înregistrat diferențe ne semnificative statistic, între valorile variabilelor care cuantifică IL-8 în funcție de tipul infecțiilor respiratorii.
22. În lotul de cercetat al sugarilor alimentați natural (LM), între valorile IL-8 și severitatea infecțiilor respiratorii am găsit un grad mai ridicat de corelație pozitivă, comparativ cu lotul sugarilor alimentați cu lapte praf (LP).
23. Antecedentele personale patologice respiratorii reprezintă un factor de predicție slab, în interpretarea răspunsului imun specific celular cuantificat prin IL-2 și a răspunsului imun nespecific cuantificat prin IL-8.
24. Pentru loturile de cercetat (LM, LP), răspunsul imun specific (RIS) la infecțiile respiratorii, cuantificat prin IL-2 a fost independent de alimentația lactată a sugarilor.
25. IL-2 poate fi considerat un posibil marker imunologic în diagnosticul direct al infecțiilor acute respiratorii, dar fără importanță în diagnosticul diferențial al IACR.
26. Răspunsul imun nespecific (RIN) în IACR, cuantificat prin IL-8, este dependent de vârstă și de alimentația lactată a sugarilor.
27. Gradul slab de corelare a nivelelor crescute de IL-8 cu gradul de severitate al infecțiilor respiratorii nu a permis conturarea argumentelor necesare utilizării IL-8 ca marker de diagnostic diferențial în infecțiile acute respiratorii.
28. Prevalența nivelelor crescute de IL-2 în funcție de sex și tipul de IACR a fost independentă de acești factori, în timp ce prevalența nivelelor crescute de IL-8 a fost influențată și de sex, și de tipul IACR.

**Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei sunt:**

- Dozarea IL-2 și IL-8 în paralel la sugari alimentați natural versus sugari alimentați artificial, în contextul diagnosticului de infecții acute respiratorii.
- Trusele utilizate la determinarea concentrațiilor serice pentru citokine au fost concepute pentru determinări în domeniul cercetării, fără recomandări pentru intervalele de referință, astfel că după analiza rezultatelor studiilor din literatura de specialitate am stabilit propriile valori pentru analizele comparative, contribuind la stabilirea unor valori de referință, și la utilizarea acestora în conturarea profilului imunologic în infecții respiratorii acute la copii.
- Deschiderea unor multiple direcții de cercetare viitoare, cum ar fi studiul citokinelor în dinamică, corelarea cu diagnosticul etiologic cert de infecție virală sau bacteriană.