

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
INDIRIZZO : PATOLOGIA INFETTIVA DEL VIAGGIATORE INTERNAZIONALE
ISTITUTO DI MALATTIE INFETTIVE
Direttore : Prof.ssa Maria Stella Mura

PROCALCITONINA E MALARIA

Tesi di Dottorato di Ricerca della
Dott.ssa Maria Laura Pettinato

Tutore : Prof. Sergio Babudieri

XXII CICLO
Anno Accademico 2008-2009

INDICE

Introduzione	pag. 2
-Procalcitonina.....	pag. 2
-Malaria.....	pag.14
-Procalcitonina e Malaria.....	pag.36
Materiali e Metodi	pag.42
Risultati	pag.46
Discussione	pag.52
Bibliografia	pag.55

INTRODUZIONE

PROCALCITONINA (PCT)

Numerosi parametri di laboratorio sono disponibili per la diagnosi di patologie infiammatorie, identificando accuratamente il tipo e l'attività della flogosi in atto, ma pochi di essi permettono di monitorare l'andamento di pazienti in condizioni critiche e l'efficacia della terapia eventualmente instaurata.

Recentemente la procalcitonina (PCT) è stata individuata come possibile marker di risposta infiammatoria sistemica ad un processo infettivo.

La procalcitonina è il proormone della calcitonina e, come tale, è normalmente prodotto dalle cellule C della ghiandola tiroide.

La sua sintesi inizia con la traduzione di un precursore peptidico di 141 aminoacidi, la preprocalcitonina, dal quale, tramite specifiche proteolisi intracellulari vengono liberate prima la procalcitonina (116 aminoacidi) e poi la calcitonina (32 aminoacidi).

Procalcitonina, suoi frammenti e altri precursori peptidici della calcitonina si riscontrano in piccole quantità nel plasma di individui sani (1,2,3).

I livelli plasmatici di procalcitonina si innalzano in corso di gravi infezioni batteriche, sepsi, shock settico e reazioni infiammatorie sistemiche severe, senza che vi sia un corrispondente aumento dei livelli di calcitonina.

Studi attuali indicano che la sintesi e il rilascio della PCT in tali situazioni non avvengano a livello delle cellule C della tiroide, mentre sarebbero coinvolte le cellule del sistema monocito-macrofagico di vari organi, compreso il fegato (4).

Le endotossine e le citochine infiammatorie sepsi-correlate, hanno mostrato avere un elevato effetto stimolatorio sull'espressione dell'mRNA della PCT a livello dei leucociti monomorfonucleati umani (5).

Inoltre si suppone che la proteolisi della procalcitonina nell'apparato del Golgi possa essere soppressa dall'azione di citochine, esotossine ed endotossine, con suo rilascio a livello del plasma (3,6).

In contrasto con la breve emivita della calcitonina (10 minuti), la PCT possiede una lunga emivita di circa 24 ore, che insieme ai meccanismi sopradescritti, contribuirebbe a mantenere la sua concentrazione plasmatica elevata in corso di particolari situazioni patologiche.

Anche se basandosi sui dati attuali le tossine batteriche, e in particolare le endotossine, rimangono i più potenti stimolatori della produzione di PCT, sia studi sperimentali che osservazioni cliniche mostrano che la sua sintesi

possa essere indotta, anche da fattori quali il TNF α e le interleuchine 2 e 6 (7,8,9).

Quest'ultimo dato spiegherebbe perché i livelli plasmatici di PCT possano risultare elevati in corso di stroke cerebrale (10), ustioni (11), in pazienti politraumatizzati (12) o sottoposti a lunghi interventi chirurgici (13) e in neonati (14), anche senza alcuna evidenza, clinica o laboratoristica, di infezioni batteriche in atto.

Elevati livelli di PCT sono descritti anche in pazienti con malaria e in numerosi casi di infezioni fungine sistemiche (15,16,17,18).

La PCT può aumentare leggermente in risposta a infezioni virali e patologie neoplastiche o autoimmuni (19), mentre non inducono un suo incremento nel plasma le infezioni localizzate e le reazioni allergiche.

Anche se non è ancora stata stabilita una via specifica di eliminazione della PCT, probabilmente, così come avviene per le altre proteine plasmatiche, essa è degradata per proteolisi, mentre l'escrezione renale giocherebbe un ruolo minore.

Dati clinici hanno dimostrato che essa non si accumula in caso di grave insufficienza renale, infatti le concentrazioni di PCT riscontrate nel plasma di pazienti con disfunzione renale non sono risultate significativamente

differenti da quelle riscontrate in soggetti con normale funzione renale (20,21).

Rimangono tuttora poco chiari i ruoli immunologici e ormonali della PCT.

Vi sono numerosi elementi che suggeriscono che la PCT possa giocare un ruolo nella risposta immune.

Esiste infatti una correlazione temporale tra l'incremento della PCT nel plasma e l'evento infiammatorio che spesso è conseguente ad una grave infezione batterica.

I dati disponibili sino ad ora derivano da studi condotti su animali di laboratorio.

In particolare, secondo Nylén l'aumento della PCT nel plasma di criceti con shock settico da peritonite da *Escherichia coli*, correlerebbe in maniera significativa con un'elevata mortalità dell'animale, mentre la somministrazione di anticorpi anti-PCT avrebbe un ruolo protettivo.

Inoltre, nello stesso studio sperimentale, la somministrazione di PCT umana in animali sani non provocava nessun effetto tossico, mentre si registrava un significativo aumento della mortalità se tale somministrazione veniva associata anche ad una concomitante induzione di shock settico (22).

Tuttavia, ancora però non esistono dati conclusivi e consistenti, su un effetto immunologico specifico della PCT.

Riguardo gli effetti ormonali della procalcitonina evidenti variazioni dei livelli sierici di calcio e fosforo si sono osservate solo in pochi studi individuali condotti in pazienti con elevate concentrazioni plasmatiche di PCT.

Livelli di calcio lievemente ridotti ed elevati livelli di fosforo sono stati descritti da Nylen in pazienti con polmonite (23).

Secondo studi condotti in pazienti con malaria non vi sarebbe correlazione tra calcio sierico e PCT (16).

In animali di laboratorio con peritonite da *Escherichia coli* è stata dimostrata una significativa riduzione del calcio e un aumento del fosforo a livello sierico con contemporanea elevazione dei livelli plasmatici di PCT e degli altri precursori proteici della calcitonina (24).

Il ruolo della PCT nel determinare tali cambiamenti non è stato ancora chiarito.

In condizioni normali le concentrazioni plasmatiche e sieriche della PCT sono inferiori a 0,5 ng/ml, tutti i valori superiori a questo sono da considerarsi patologici.

Generalmente l'elevazione è considerata lieve tra 0,5 e 2 ng/ml, moderatamente alta tra 2 e 5 ng/ml e molto alta per valori superiori a 5 ng/ml.

I livelli di PCT sono strettamente correlati col tipo e l'estensione del processo infiammatorio, ma soprattutto con le manifestazioni sistemiche causate dalla flogosi in atto.

Valori di PCT moderatamente elevati (tra 0,5 e 2 ng/ml) si osservano in corso di infiammazione sistemica ad etiologia non batterica, quali SIRS, ustioni, grossi traumi e lunghi interventi chirurgici.

Le infezioni batteriche confinate ad un solo organo, o non accompagnate a segni di sepsi, generalmente non presentano livelli di PCT significativamente elevati.

Per esempio, nelle polmoniti si riscontrano quasi sempre valori inferiori a 2 ng/ml.

Anche in corso di infezioni virali e patologie autoimmuni o neoplastiche raramente i livelli di PCT nel plasma superano questo valore.

Concentrazioni plasmatiche di PCT superiori a 2ng/ml sono fortemente indicativi di sepsi ad etiologia batterica.

Vi è una buona correlazione tra valori di PCT nel plasma, attività infiammatoria e severità della sepsi, per cui tale parametro risulta

estremamente utile nel monitorare il decorso e la terapia di questa patologia.

I primi dati relativi alla correlazione tra PCT e severità della sepsi sono stati pubblicati da Zeni nel 1994 (25), su uno studio condotto su 145 pazienti con sospetta infezione, ammessi in un Dipartimento di emergenza e valutati secondo i criteri di Bone di shock settico (26) : valori elevati di PCT venivano registrati nei pazienti con segni di sepsi severa.

Secondo uno studio condotto da Gramm in 63 pazienti con infezione e infiammazione sistemica, solo i valori di APACHE III score, la PCT e la neopterina potrebbero permettere una diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi severa.

La PCT possiede una possibilità superiore al 90% di distinguere tra SIRS e sepsi (12), mentre parametri come PCR, IL-6, IL-8, IL-10 ed elastasi risultano di gran lunga meno accurati (27,28).

Studi condotti successivamente da altri autori hanno convalidato questi risultati e hanno dimostrato come i livelli di PCT decrescano rapidamente in pazienti con sepsi che, sottoposti a terapia, presentino un miglioramento del quadro clinico (29,30,31).

Le complicanze che si verificano in corso di sepsi, con disfunzioni d'organo metaboliche e funzionali, e quindi l'evoluzione verso una sepsi

severa e lo shock settico, sono sempre caratterizzate da un significativo incremento dei livelli di PCT nel plasma.

I tradizionali indici di flogosi e infezione non permettono di distinguere tra i vari stadi di sepsi (12,33,34).

Secondo gli studi condotti da Gramm, riferendoci alle concentrazioni plasmatiche di PCT, il cut-off superato il quale è lecito ipotizzare una sepsi grave o uno shock settico è di 5,5 ng/ml con una sensibilità dell'81% ed una specificità del 94%.

Secondo altri autori, i valori di PCT compresi tra 5 e 10 ng/ml sono indicativi di severa infiammazione sistemica secondaria ad un'infezione (34,35).

Concentrazioni plasmatiche di PCT al di sopra dei 10 ng/ml si riscontrano quasi esclusivamente in pazienti con sepsi severa, shock settico o sindrome da disfunzione multiorgano (MODS) con sottostante infezione (36,37,38).

Pertanto, l'incremento della PCT può essere considerato un marker precoce di evoluzione verso la sindrome da disfunzione multiorgano (MODS), per cui la sua determinazione giornaliera aiuta nel monitoraggio di pazienti critici (29).

Da questi dati risulta evidente come il dosaggio plasmatico della PCT sia un utile parametro per evidenziare infezioni batteriche severe, distinguere

tra infezioni con reazione infiammatoria sistemica e infezioni localizzate, porre un'accurata diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi, identificando precocemente l'evoluzione a quadri sistemici di maggiore gravità e seguire il follow-up di queste condizioni cliniche.

Confronto tra Procalcitonina e altri indici di flogosi.

Gli indici di flogosi disponibili per la diagnosi di patologia infiammatoria sono numerosi. In particolare questi includono le proteine della fase acuta, come la PCR, i mediatori infiammatori, come le citochine e il $TNF\alpha$, o altri parametri come la neopterina, l'elastasi e la fosfolipasi A₂. Ognuno di essi possiede uno specifico profilo di induzione e delle caratteristiche proprie nelle diverse patologie.

Gli studi che hanno messo a confronto tali parametri con la PCT sono numerosi.

Per quanto riguarda la PCR, la sua sintesi a livello epatico è stimolata da stati infiammatori più lievi rispetto a quelli in cui si eleva la PCT.

Come la PCT, anche la PCR è indotta dalle infezioni e in particolare da quelle batteriche, ma nella diagnosi di infezioni severe e sepsi, presenta una minore specificità rispetto alla PCT.

Infatti la sintesi della PCR viene indotta anche da infezioni virali, rigetti acuti post-trapianto e stimoli non specifici come i grossi traumi e gli interventi chirurgici (30,39).

La secrezione della PCT inizia entro 4 ore dallo stimolo, con un picco all'ottava ora e i suoi valori si normalizzano quando l'insulto è sotto controllo e lo stato infiammatorio si è risolto (21).

Inoltre la PCT è stabile nei campioni, il suo dosaggio è relativamente facile, a costi moderati, con disponibilità del risultato entro 2 ore (40).

La secrezione della PCR inizia entro 4-6 ore dallo stimolo, con un picco solo dopo 36 ore. La sua determinazione nel plasma è facile, spesso automatizzata, con costi inferiori rispetto alla PCT (40).

Se paragonata alle citochine, la PCT presenta una stabilità ed un'emivita plasmatiche decisamente maggiori, con la possibilità di avere una finestra diagnostica più ampia.

Altro vantaggio è quello di una sua maggior specificità per processi infiammatori conseguenti ad infezioni batteriche o stati settici.

In particolare l'IL-6 si eleva in corso di rigetto post-trapianto, dopo interventi chirurgici, nelle malattie autoimmuni e nelle infezioni virali, mentre, a differenza della PCT, la sua produzione è soppressa dall'utilizzo di terapia steroidea (41).

Studi condotti da Reith hanno evidenziato che in corso di peritonite la PCT era di gran lunga superiore rispetto all'IL-6 nel distinguere tra un decorso favorevole ed un esito fatale (42).

La PCT e l'IL-6 si equivalgono se considerate markers di danno tissutale nelle ustioni (11).

Relativamente al $TNF\alpha$, diversi studi hanno dimostrato che i suoi livelli risultano elevati in meno del 50% dei pazienti con sepsi, con una sensibilità e specificità sempre inferiori rispetto a quelle della PCT nella diagnosi di tale patologia (43,44).

Inoltre questa citochina ha un'emivita molto breve, per cui risulta molto più difficile rilevarne il picco plasmatico.

La fosfolipasi A_2 è un enzima chiave nell'attivazione infiammatoria, responsabile del rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana; esso si eleva soprattutto nelle infezioni batteriche, ma talvolta anche in quelle virali. Non esistono studi di confronto tra questo parametro e la PCT, ma sicuramente, così come l'elastasi dei granulociti neutrofili, neanche questo parametro permette di distinguere tra SIRS e sepsi (45).

Attualmente la neopterinina è il più sensibile indicatore di attivazione di linfociti e monociti. Un suo incremento si verifica in corso di sepsi con possibilità di distinguere in maniera accurata tra SIRS, sepsi e sepsi severa,

ma rispetto alla PCT possiede una minor specificità verso le infezioni batteriche, in quanto una sua elevazione si ha anche in corso di infezioni virali e patologie neoplastiche (41).

Inoltre, contrariamente alla PCT, i suoi livelli plasmatici dipendono dalla funzionalità renale, per cui il suo utilizzo non è indicato in pazienti con sindrome da disfunzione multiorgano (MODS) (46).

MALARIA

La malaria, o paludismo, è una parassitosi provocata da sporozoit del genere *Plasmodium* e trasmessa all'uomo da zanzare femmine del genere *Anopheles*.

L'infezione ha diffusione endemica in numerose regioni tropicali e subtropicali al di sotto dei 2000-2500 metri di altitudine.

La sua maggiore o minore frequenza è condizionata dall'habitat del vettore (zanzare del genere *Anopheles*), dalle condizioni climatiche e dalla concentrazione di soggetti portatori di gametociti nel sangue periferico, che fungono da réservoir dell'infezione.

Un'idea dell'importanza sanitaria e dell'impatto socio-economico della malaria può essere facilmente desunta dai seguenti dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS):

- fanno parte delle aree considerate a rischio per malaria 90 Paesi, dove vivono circa 2 miliardi di persone (pari al 42% circa della popolazione mondiale);
- ogni anno nel mondo si verificano da 300 a 500 milioni di casi di malaria sintomatica (il 90% dei quali nell'Africa tropicale);

- ogni anno, muoiono per malaria da 1 a 3,5 milioni di individui (la maggior parte nel continente africano, dove i casi di morte tra i bambini di età inferiore a 5 anni sono circa 1 milione per anno).

Sono quattro le specie di plasmodio responsabili dell'infezione nell'uomo:

Plasmodium falciparum per la febbre terzana maligna,

Plasmodium vivax e *Plasmodium ovale* per la febbre terzana benigna,

Plasmodium malariae per la febbre quartana.

Dal punto di vista della distribuzione geografica, esistono notevoli differenze nella ripartizione delle quattro specie di plasmodi. *P.falciparum* ha maggiore diffusione nell'Africa intertropicale e in Asia, mentre in America centromeridionale è assai più frequente *P.vivax*. *P.malariae* è presente pressochè esclusivamente in Africa e *P.ovale* soltanto in limitate aree dell'Africa intertropicale.

Nei Paesi industrializzati la malaria è stata da tempo eradicata, ma per diversi motivi (recrudescenza dell'infezione nelle aree endemiche, incremento dei viaggi internazionali e dei fenomeni migratori, diffusione della chemioresistenza a taluni farmaci antimalarici) è andato manifestandosi durante gli ultimi anni un costante incremento dei casi di malaria di importazione.

Ciclo biologico.

Il ciclo biologico, illustrato in Figura 1, comprende una fase schizogonica (asessuata) nell'uomo, ospite intermedio, e una fase sporogonica (sessuata) nella zanzara, ospite definitivo.

Il ciclo asessuato inizia con l'inoculazione all'uomo del parassita sotto forma di sporozoiti, che in circa 30 minuti scompaiono dal circolo periferico e penetrano nelle cellule epatiche, per le quali possiedono un elevato tropismo.

Negli epatociti inizia un processo di differenziazione e moltiplicazione che dà origine alla formazione di grossi schizonti, ognuno dei quali, una volta maturo, si divide in migliaia di merozoiti mononucleati che, dopo 5-11 giorni dall'infezione, abbandonano l'epatocita e invadono i globuli rossi.

Inizia così la fase ematica dell'infezione, che è messa in evidenza dalla comparsa dei parassiti nel sangue periferico dopo 7-15 giorni dall'inoculazione.

Nel caso delle infezioni da *P.vivax* e *P.ovale*, all'atto dell'iniziale invasione del fegato da parte degli sporozoiti alcuni elementi seguono un'evoluzione diversa, trasformandosi in forme quiescenti, dette ipnozoiti, in grado di dar luogo allo stesso ciclo evolutivo, già descritto per gli altri sporozoiti, a mesi o anni di distanza, determinando altri attacchi malarici.

I merozoiti, penetrati nei globuli rossi, si trasformano in trofozoiti che si accrescono sino a dare origine ad uno schizonte maturo che, anche in questo caso, si suddivide in numerosi merozoiti, i quali, in seguito a lisi dell'eritrocita parassitato, si liberano nel torrente ematico insieme ai cataboliti del parassita e all'emozoina, pigmento di derivazione emoglobinica.

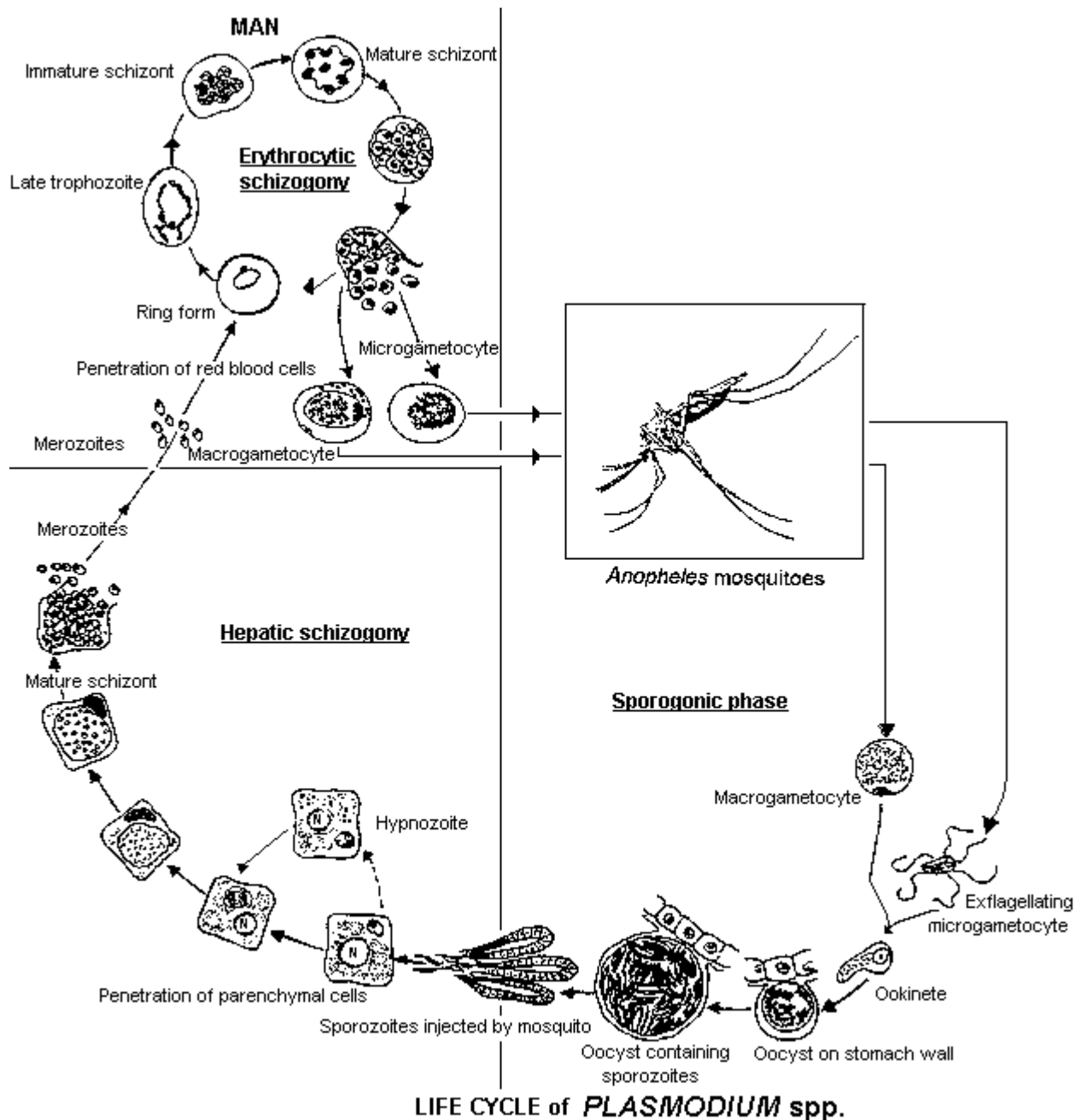
Il pigmento viene captato dalle cellule del sistema monocito-macrofagico e si deposita soprattutto nella milza e nel fegato, i merozoiti invece penetrano in altri eritrociti e riprende la moltiplicazione schizogonica.

Lo sviluppo dei parassiti è generalmente sincrono, la rottura dei globuli rossi parassitati è simultanea e provoca il parossismo malarico. Esso si ripete periodicamente dopo tempi corrispondenti alla velocità del ciclo schizogonico nelle varie specie, cioè ogni 72 ore nell'infezione da *P.malariae* e ogni 48 ore in quelle da *P.vivax*, *P.ovale* e *P.falciparum*.

Dopo diversi cicli schizogonici, alcuni merozoiti si trasformano in elementi sessuati, i gametociti, che sono le uniche forme infettanti la zanzara. Se una femmina di *Anopheles* succhia il sangue di una persona infetta può assumere le forme sessuate del plasmodio che, una volta raggiunto l'ospite definitivo, compiono il loro ciclo sessuato dando origine a migliaia di

nuovi sporozoiiti, i quali, albergando sotto forma di oocisti nelle ghiandole salivari della zanzara, possono infettare anche una ventina di persone.

Figura 1.



C

Adapted and redrawn from NCDC

Le manifestazioni cliniche della malaria sono influenzate dalla possibilità da parte dell'uomo di acquisire nel tempo una tolleranza e infine un'immunità specifica nei confronti del parassita, limitandone così l'azione patogena.

Nei Paesi ad intensa trasmissione malarica, i casi di malaria severa si verificano soprattutto nei soggetti compresi tra i 6 mesi e i 5 anni di età.

La protezione nei confronti della malaria grave nei primi 3-6 mesi di vita sembrava essere dovuta alla presenza di anticorpi materni della classe IgG passati attraverso la placenta, ma attualmente si ritiene che le difese fornite dagli anticorpi siano, se presenti, di scarsa importanza. Una protezione nei confronti della malaria severa è data dalla presenza dell'emoglobina fetale.

Dopo i primi anni di vita, nei soggetti residenti in zone ad alta endemia, si sviluppano progressivamente due tipi di meccanismi di protezione multifattoriale, che si generano in seguito a ripetute infezioni malariche, detti immunità antitossica e immunità antiparassitaria.

Per immunità antitossica si intende la diminuzione sia del rilascio sia delle risposte alle citochine indotte dalla malattia. In pratica, in seguito ad alcuni anni di residenza in area endemica, e quindi di ripetute infezioni malariche, si sviluppa nel tempo una sorta di tolleranza alla presenza di parassiti

circolanti. In tali zone vi è quindi una certa percentuale di soggetti con parassitemia periferica che non risulta clinicamente affetta da malaria.

Successivamente, con il proseguire dell'esposizione all'infezione, inizia a rendersi misurabile una vera e propria attività inibitrice nei confronti dei parassiti circolanti che porta ad un calo dei soggetti parassitemici nella popolazione adulta delle aree endemiche e che viene definita immunità antiparassitaria.

Tale processo difensivo, che si realizza in due tappe, ha dei limiti di specificità e durata, in quanto è operante soprattutto per i ceppi di plasmodio presenti nell'area ove il soggetto è stato esposto per lungo tempo, e si riduce, anche se non del tutto, una volta che il soggetto lascia l'area endemica ed interrompe la propria esposizione all'infezione malarica. Per tale motivo si parla di immunità concomitante, in quanto strettamente dipendente da un continuo rinnovo dello stimolo antigenico.

L'andamento clinico della malaria è complesso per presentazione, decorso, gravità dei sintomi, complicanze ed evoluzione.

In virtù dei meccanismi di risposta immunitaria specifica, descritti precedentemente, si osserva che nelle aree ad elevata endemia le manifestazioni di malaria complicata, rappresentate soprattutto da anemia grave e, in quota minore, da malaria cerebrale, si verificano quasi

esclusivamente nei bambini da 1 a 5 anni, mentre gli adulti ne sono praticamente del tutto esenti. In aree con trasmissione instabile, tali complicazioni, con preminenza di malaria cerebrale, si osservano fino all'età adolescenziale. Infine, nelle aree ipoendemiche, i quadri di malaria complicata, in particolare malaria cerebrale, insufficienza renale e anemia severa, si manifestano a qualunque età della vita (Figura 2).

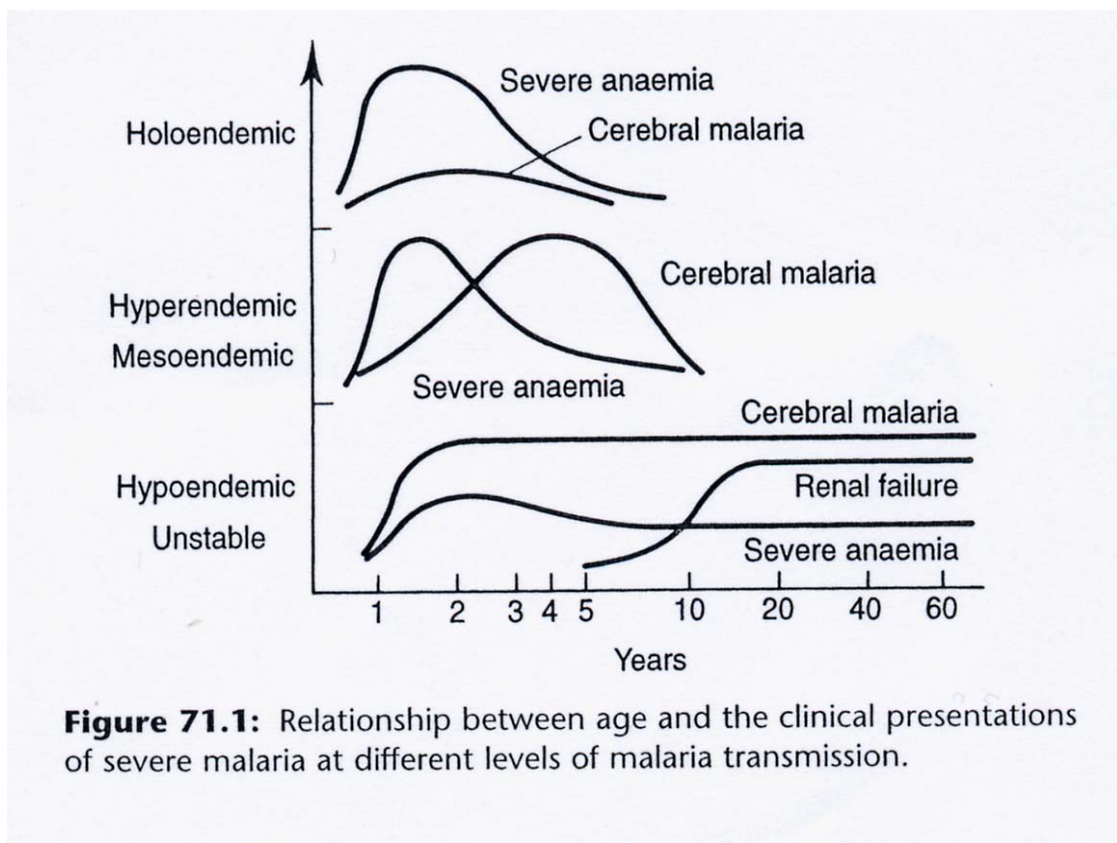


Figura 2. Tratta da Manson's Tropical Diseases, WB Saunders Company Ltd, XXI Edition, 2003

Il periodo di incubazione è in media di 10-20 giorni, anche se nelle infezioni da *P.falciparum* possono comparire disturbi già dopo 6-7 giorni, mentre nelle forme da *P.vivax* a volte la malattia esordisce diversi mesi dopo il termine dell'esposizione.

L'espressività clinica della malaria è innanzitutto caratterizzata dalla presenza di febbre, la cui periodicità è un fenomeno che spesso si realizza dopo 7-10 giorni di malattia e che, soprattutto in età pediatrica, può essere osservato raramente.

La febbre sembra essere mediata da citochine dell'ospite liberate in risposta alla liberazione di tossine e pirogeni durante la rottura dei globuli rossi parassitati.

Si manifesta con due aspetti caratteristici essenziali, rappresentati dal brivido e dall'importante sudorazione successiva all'acme febbrile. In età pediatrica la febbre si accompagna spesso ad alterazioni del sensorio, quali apatia, irritabilità, sonnolenza e letargia. In associazione sono spesso osservabili nausea, vomito e diarrea. Le alterazioni descritte possono aversi indipendentemente dalla specie di plasmodio in causa, ma mostrano un'espressività più spiccata nel caso di malaria da *P.falciparum*, in associazione ai livelli più alti di parassitemia.

Nelle aree ad alta endemia, la malaria si accompagna spesso ad uno stato di anemia di variabile gravità. Alla base dell'anemizzazione vi è principalmente la lisi diretta degli eritrociti parassitati, ma tuttavia anche le emazie non parassitate possono andare incontro a rottura intravascolare. Infine l'ipersplenismo, che si associa alla splenomegalia, contribuisce alla distruzione dei globuli rossi, che di per sé hanno una ridotta elasticità di membrana. Anemie di grado elevato ($Hb < 5g/dl$) si osservano con alta frequenza nei soggetti sottoposti a ripetute infezioni malariche e sono considerate forme di malaria complicata. In queste circostanze l'anemia rappresenta la somma algebrica di numerose infezioni, separate da intervalli di tempo troppo brevi per permettere al midollo osseo di esercitare un efficace effetto compensatorio. In questi casi lo stato anemico, anche se grave, è generalmente ben tollerato, ma una rapida anemizzazione può verificarsi anche in seguito ad un singolo attacco di malaria e complicarsi per la presenza di insufficienza respiratoria. Va inoltre ricordato come spesso, nei Paesi in via di sviluppo, alla comparsa di anemia possano concorrere anche fattori come la malnutrizione, le parassitosi intestinali e altre patologie caratteristiche della fascia tropicale. In circa il 20% dei casi è presente l'ittero, associato ad una modesta alterazione degli indici di funzionalità epatica.

L'epatosplenomegalia si sviluppa in funzione della frequenza degli attacchi malarici subiti dal soggetto, per cui si osserva raramente nei primi 2-3 episodi, mentre è frequente in quelli successivi, specie se separati da un intervallo di tempo limitato.

Le alterazioni fin qui descritte rientrano nel quadro clinico della malaria non complicata.

La quasi totalità del più di un milione di morti per malaria, stimati ogni anno in tutto il mondo, sono attribuibili a forme severe di infezione da *P.falciparum*.

La particolare gravità con la quale può decorrere la fase di prima invasione dell'infezione da *P.falciparum* è dovuta, prima di tutto, all'alta parassitemia che mediamente è di 100.000 parassiti per μL , ma che può superare anche i 2 milioni di parassiti per μL . Nelle altre forme la parassitemia media varia da 1.000 a 30.000 parassiti per μL , ma non supera mai il valore di 100.000.

Inoltre l'interessamento di organi quali, encefalo, rene e polmone, che si osserva nei casi di malaria severa da *P.falciparum*, è legato a fenomeni di citoaderenza degli eritrociti parassitati, i quali presentano in superficie antigeni parassitari che fungono da ligandi per recettori specifici dell'endotelio microvascolare splancnico. Questi ultimi sono stati

identificati in almeno quattro glicoproteine dell'ospite : la trombospondina e l'antigene di differenziazione cellulare CD 36, a livello dell'endotelio, la molecola di adesione intercellulare ICAM-1, a livello dei capillari cerebrali e il condroitinsolfato A, a livello placentare. Come risultato del processo di citoaderenza si ha rallentamento della microcircolazione, edema e ipossia tissutale negli organi vitali.

Nei Paesi in cui la malaria da *P.falciparum* è endemica sono a rischio di malaria severa soprattutto i bambini di età compresa tra pochi mesi di vita e i 5 anni e le donne in gravidanza, mentre nelle zone a bassa endemicità, la malaria severa si riscontra sia negli adulti che nei bambini. Inoltre sono sempre a rischio di malaria severa i viaggiatori non immuni e gli emigrati per lavoro.

In un paziente con riscontro di parassitemia da *P.falciparum* e senza un'altra evidente causa della sua sintomatologia, è indicativa di malaria severa, o complicata, la presenza di uno o più dei seguenti elementi clinici o laboratoristici :

- prostrazione
- alterazione dello stato di coscienza
- distress respiratorio (respiro acidotico)
- convulsioni

- collasso circolatorio
- edema polmonare (diagnosi radiologica)
- sanguinamento
- ittero
- emoglobinuria
- anemia severa
- ipoglicemia

Oltre il 90% di tutti i casi di malaria severa con pericolo di vita si verifica nei bambini africani. In età pediatrica, soprattutto in molte strutture sanitarie dei Paesi in via di sviluppo, alcuni dei suddetti parametri sono di difficile individuazione e valutazione, per cui l'OMS propone un'altra classificazione secondo la quale rientra nella definizione di malaria severa un bambino con almeno una delle seguenti caratteristiche:

Gruppo 1

Bambini ad elevato rischio di morte che richiedono somministrazione parenterale di farmaci antimalarici e terapia di supporto:

- a). Bambino prostrato (incapace di star seduto, se capace precedentemente di farlo, o di bere, nel caso di lattanti non ancora capaci di stare seduti)

Possono essere individuati tre sottogruppi in base alla severità:

- I. Prostrato, ma completamente cosciente
 - II. Prostrato con parziale perdita di coscienza
 - III. Coma (valutabile secondo la Blantyre coma scale)
- b). Bambino con distress respiratorio (respiro acidotico)

Gruppo 2

Bambini che, anche se trattabili con terapia orale, richiedono un attento monitoraggio in quanto a rischio di peggioramento clinico, ma che non presentano nessuno degli elementi del gruppo 1:

- a). Bambino con $Hb < 5 \text{ g/dl}$ o $HCT < 15\%$
- b). Bambino con due o più convulsioni nelle ultime 24 ore

Gruppo 3

Bambini che, pur non presentando elementi clinici o di laboratorio dei gruppi 1 e 2, necessitano di terapia parenterale per vomito persistente

-

Per la valutazione dello stato di coscienza in età pediatrica l’OMS suggerisce l’impiego della **Blantyre Coma Scale** (Tabella 1), modificata dalla Glasgow Coma Scale usata per gli adulti.

Risposta motoria	Punteggio
<i>Localizza lo stimolo doloroso</i>	2
<i>Retrae l’arto stimolato</i>	1
<i>Risposta non specifica o assente</i>	0
Risposta verbale	
<i>Pianto appropriato</i>	2
<i>Lamento o pianto inappropriato</i>	1
<i>Nessuna</i>	0
Movimenti oculari	
<i>Direzionato (segue il volto materno)</i>	1
<i>Non direzionato</i>	0

Tabella 1.

Il punteggio totale varia da 0 a 5. Indica lo stato di coma un punteggio inferiore o uguale a 3 punti se il bambino ha meno di 15 mesi o a 2 se di età maggiore.

Le più frequenti complicazioni in corso di infezione da *P.falciparum* sono: malaria cerebrale, ipoglicemia, anemia, acidosi, emoglobinuria, edema cerebrale e collasso cardiocircolatorio.

La malaria cerebrale è definita come uno stato di coma non risvegliabile, in un soggetto con infezione da *P.falciparum*, che non può essere attribuito a convulsioni, farmaci ad azione sedativa, ipoglicemia o altre cause non legate alla malaria. Da un punto di vista neurologico è caratterizzata da alterazioni dei riflessi corneale e oculocefalico, anomalie retiniche, del tono muscolare e della postura.

Più della metà dei bambini affetti da malaria cerebrale presenta convulsioni, mentre sono rari meningismo e fotofobia. La mortalità per malaria cerebrale può raggiungere il 20%, la maggior parte dei decessi avviene nelle prime 24 ore e nel 7% dei casi si hanno sequele neurologiche. L'ipoglicemia (glucosio plasmatico < 40mg/dl) complica il 7% dei casi di malaria e si osserva più frequentemente nei bambini. E' dovuta ad aumentato metabolismo cellulare a causa dell'infezione, al consumo di glucosio da parte dei parassiti, al vomito, al digiuno e, in corso di

trattamento, all'iperinsulinemia indotta da chinino. Se protratta determina il passaggio verso vie metaboliche di glicolisi anaerobie, contribuendo, insieme all'anossia tissutale, all'induzione di acidosi lattica.

L'anemia è dovuta all'emolisi periferica, alla soppressione midollare e alla ridotta emivita degli eritrociti anche se non parassitati.

Il distress respiratorio si manifesta col respiro acidotico di Kussmaul, caratterizzato da alitamento delle pinne nasali, aumentata ampiezza dei movimenti respiratori, impegno dei muscoli respiratori accessori e rientramenti sottocostali.

L'acidosi metabolica, dovuta all'aumentata produzione di acido lattico, in corso di glicolisi anaerobia, è definita come una concentrazione di bicarbonati $<15\text{mmol/l}$ o un $\text{pH} < 7,35$ e si manifesta col respiro di Kussmaul.

L'emoglobinuria malarica o blackwater fever, colpisce generalmente individui non immuni, ha patogenesi probabilmente immunoallergica, esordio brusco, con rialzo termico a 40°C , brivido intenso e dolore lombare. Le urine, molto scarse, appaiono color vino di Porto e si registrano severa anemia, iperbilirubinemia diretta, emoglobinuria e iperazotemia. Ove non si intervenga con il trattamento si giunge all'exitus in oltre il 30% dei casi.

L'edema polmonare e il collasso cardiocircolatorio sono evenienze rare in età pediatrica.

Varie complicanze della malaria sono associate ad un elevato rischio di morte.

I fattori prognostici negativi in corso di malaria da *P.falciparum* sono:

- Disturbi della coscienza (gravità della prognosi direttamente proporzionale al grado di coma)
- Crisi comiziali (>3/24h)
- Insufficienza respiratoria
- Emorragie
- Insufficienza renale (creatininemia>3mg/dl ; azotemia>60mg/dl)
- Acidosi (bicarbonati plasmatici<15mmol/L)
- Iperlattacidemia (>45mg/dl)
- Ipoglicemia (<40mg/dl)
- Incremento delle transaminasi (>3volte i valori normali)
- Riduzione dell'antitrombina III
- Iponatriemia, ipofosfemia e ipocalcemia
- Aumento dei lattati nel liquor e ipoglicorrachia
- Leucocitosi (>12.000 g.b./ μ L)

- Piastrinopenia ($<20.000/\mu\text{L}$)
- Anemia ($\text{Hb}<7\text{g/dl}$)
- Parassitemia > 500.000 plasmodi/ μL
- Presenza di schizonti nel sangue periferico
- Presenza di neutrofili contenenti pigmento malarico

Se si considera l'età pediatrica sono considerati indici prognostici negativi :

- Acidosi o aumento dei lattati nel plasma
- Aumento della concentrazione dei lattati nel liquor
- Ipoglicemia
- Papilledema e/o edema retinico
- Parassitemia $>20\%$ con riscontro di pigmento malarico nello striscio di sangue periferico
- Convulsioni, profondità del coma, età <3 anni e parassitemia >1 milione/ μL
- Aumentata concentrazione plasmatica di $\text{TNF}\alpha$
- Più del 5% dei neutrofili del sangue periferico contenente pigmento malarico

La tabella 2 mostra il differente impatto delle manifestazioni di malaria severa nell'adulto e nel bambino.

		MANIFESTAZIONI CLINICHE E/O ALTERAZIONI DI LABORATORIO	FREQUENZE	
Bambino	Adulto		Bambino	Adulto
+	?	Prostrazione	+++	+++
+++	++	Perdita di coscienza	+++	++
+++	+++	Distress respiratorio	+++	+
+	++	Convulsioni multiple	+++	+
+++	+++	Collasso circolatorio	+	+
+++	+++	Edema polmonare(Rx)	+/-	+
+++	++	Facilità al sanguinamento	+/-	+
++	+	Ittero	+	+++
+	+	Emoglobinuria	+/-	+
+	+	Severa anemia	+++	+

Tabella 2.

Diagnosi.

La diagnosi di certezza della malaria si basa sulla lettura dell'emoscopia, che si fonda sull'allestimento di un preparato di sangue periferico in goccia spessa, colorata con soluzione di Giemsa, oppure in striscio sottile, colorato secondo May Grunwald-Giemsa. Le due tecniche sono complementari, in quanto la prima costituisce un metodo più rapido e sensibile, poichè nello stesso campo microscopico (obiettivo 100x in immersione) vengono osservati più strati sovrapposti di globuli rossi lisati, mentre il preparato in striscio sottile, consente di differenziare i caratteri morfologici delle varie specie di plasmodi.

Il sangue per allestire i preparati dovrebbe essere prelevato all'inizio di un attacco febbrile e, vista la possibilità di falsi negativi nei pazienti con bassa parassitemia, in caso di esito negativo, l'esame dovrebbe essere ripetuto, qualora permanga il sospetto diagnostico.

Oltre all'esame emoscopico tradizionale, esistono dei metodi di accertamento diretto, che mostrano la presenza di antigeni malarici su una goccia di sangue periferico, permettendo anche una differenziazione di specie, senza la necessaria presenza di personale specializzato per la lettura microscopica.

Un importante indice, valutabile solamente tramite l'emoscopia, è rappresentato dalla parassitemia, definita come la percentuale di globuli rossi parassitati su striscio sottile, o come numero di forme asessuate per microlitro.

Nel secondo caso, la parassitemia si calcola su un vetrino di goccia spessa : per ogni campo (100x) si calcola il rapporto globuli bianchi e forme asessuate di plasmodio. Il rapporto risultante viene messo in relazione con il numero di globuli bianchi per microlitro, che può essere dedotto dall'esame emocromocitometrico o qualora quest'ultimo non sia disponibile, si può assumere, per convenzione, come corrispondente al valore di 8.000 globuli bianchi/ μ L.

La valutazione di tale parametro è importante, sia perché rappresenta un indice prognostico, in quanto parassitemie > 100.000 parassiti per μ L correlano con un' aumentata mortalità, sia perché la sua misurazione nel tempo permette, insieme ai dati clinici, di seguire l'evoluzione della malattia e valutare l'efficacia terapeutica.

Infatti, a questo fine, nella gestione del paziente affetto da malaria, è importante determinare il *parasite reduction ratio* (PRR) dato dal rapporto tra parassitemia all'inizio del trattamento e dopo 48 ore, che fornisce un semplice, ma utile, indice predittivo.

PROCALCITONINA E MALARIA

Nonostante la PCT sia considerata soprattutto un importante marker di sepsi batterica nel paziente critico, il suo valore come fattore prognostico è stato indagato anche in corso di malaria.

Le prime osservazioni, riguardo ad un eventuale incremento della procalcitonina nel plasma di pazienti con malaria, sono state effettuate da Davis nel 1994 (16) e confermate successivamente da Al-Nawas e Shah nel 1997 (15).

Tali autori hanno riscontrato incrementi di PCT nel plasma, sia in corso di malaria non complicata che complicata, ma i valori più elevati sono stati registrati nelle forme più severe. In risposta al trattamento le concentrazioni sieriche diminuivano rapidamente nell'arco di pochi giorni e nel 90% dei casi si raggiungeva la normalizzazione del parametro in settima giornata di terapia.

In uno studio condotto su 38 pazienti con sospetta malaria, nei 17 casi in cui era confermata la diagnosi veniva calcolato un valore medio di PCT plasmatica di 5,3 ng/ml, mentre negli altri 21, in cui non era confermata l'infezione da Plasmodio, il valore medio era di 0,43 ng/ml.

Gli autori hanno calcolato che ponendo il cut-off a 2 ng/ml, il dosaggio della PCT nel plasma possiede una sensibilità del 52% ed una specificità dell'86% nella diagnosi di malaria (15).

Hollenstein ha valutato i livelli di PCT in 27 pazienti adulti thailandesi con malaria complicata da *P.falciparum*.

All'ammissione, prima di iniziare il trattamento, tutti i pazienti tranne uno presentavano elevati livelli di PCT, con un valore medio di 40 ng/ml; l'unico paziente con valore di PCT normale presentava una parassitemia bassa (533p/μl), nonostante una temperatura corporea >39°C. Vi era quindi una significativa correlazione tra la parassitemia iniziale ed i livelli di PCT prima del trattamento.

In settima giornata in tutti i pazienti la parassitemia era negativa ed i livelli di PCT si erano ridotti, con un valore medio di 1,3 ng/ml; ai controlli successivi 26/27 pazienti presentavano valori di PCT all'interno del range di normalità.

Inoltre in tutti i pazienti sono stati valutati i livelli di ossido nitrico (NO) nel sangue, riscontrando un suo aumento nella totalità del campione, che all'ammissione correlava significativamente con l'aumento della PCT. A differenza della PCT, che si riduceva rapidamente con il miglioramento clinico del paziente, i livelli di NO rimanevano elevati per almeno 21

giorni, permettendo una valutazione dell'infezione anche nelle fasi più tardive (17).

Altri autori hanno successivamente sottolineato il valore della PCT come fattore prognostico di severità e di morte in corso di malaria, in soggetti non immuni o semi-immuni, confrontando un gruppo di 36 pazienti affetti da malaria non complicata con un gruppo di 25 pazienti affetti da malaria severa. I livelli plasmatici di PCT, valutati prima del trattamento, erano compresi tra 0,5 e 5,6 ng/ml, in corso di malaria non complicata, con un valore medio di 1,52 ng/ml, mentre erano compresi tra 2,61 e 132,1 ng/ml, in corso di malaria complicata, con un valore medio di 10,67 ng/ml.

Inoltre, in corso di malaria complicata valori superiori a 25 ng/ml indicavano un elevato rischio di mortalità; infatti 6 pazienti su 7 con tali valori e nei quali non si era assistito alla riduzione della PCT dopo il 2° giorno di trattamento, come nella restante parte della casistica, sono andati incontro a decesso. Infine, secondo le evidenze di questo studio, alte concentrazioni di PCT sembrerebbero associate all'assenza di semi-immunità, in quanto in pazienti non immuni la PCT è risultata l'unico parametro correlato significativamente con la parassitemia, in corso di malaria non complicata (47).

Un'osservazione condotta su 34 bambini gabonesi, ha rilevato elevati livelli di PCT in soggetti con malaria rispetto ai controlli, riscontrando i valori più alti nei 3 casi con malaria cerebrale. In questi ultimi era presente anche un'elevazione dell'IL-6, ma in seguito al trattamento, le concentrazioni sieriche di PCT si riducevano molto più rapidamente rispetto a quelle dell'IL-6, permettendo quindi di valutare più accuratamente la risposta alla terapia (48).

Il riscontro di correlazione tra PCT, bilirubinemia e livelli sierici di aspartato transaminasi sembrerebbe indicativa di danno a livello epatico (49).

Secondo uno studio condotto da Braun su bambini ghanesi, i livelli sierici di PCT risultavano elevati sia in corso di malaria non complicata che in corso di malaria severa, per cui tale parametro non permetterebbe di discriminare tra queste due forme (50).

A differenza degli studi sin qui descritti, che si riferiscono all'infezione da *P.falciparum*, Manegold e coll. hanno valutato i livelli plasmatici di PCT in pazienti con infezione da *P.vivax* o *P.ovale*, riscontrando valori marcatamente elevati solo in un terzo del campione esaminato, senza nessuna correlazione con la severità della malattia (51).

Come si può notare dalla disamina degli articoli pubblicati, la maggior parte degli studi ha riguardato casistiche di pazienti adulti affetti da malaria e ha messo in evidenza la correlazione tra valori di PCT e i livelli di parassitemia e la severità del quadro clinico. Abbiamo pertanto ritenuto opportuno raccogliere ulteriori dati riguardanti pazienti pediatrici, considerando casi di malaria non complicata e complicata secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

La Tabella 3 riassume i principali articoli, scritti finora su procalcitonina e malaria.

<u>AUTORI e RIVISTA</u>	<u>LUOGO dello STUDIO</u>	<u>TIPO di INFEZIONE</u>	<u>PAZIENTI</u>	<u>RISULTATI</u>
Davis T.M.E. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1994	Vietnam Cina	<i>P.falcipar</i> <i>um</i>	N°totale=34 adulti -controlli N°=17 -m.non complicata N°=8 -m.complicata N°=9	Controlli: PCT<0,1ng/ml Tutti i casi di malaria (n=17): PCT>0,1ng/ml per più di 2sett. dall'inizio del trattamento M.complicata 2/9 : PCT>380ng/ml
Al-Nawas B. Eur. J. Med. Res. 1997	Francoforte (Germania)	<i>P.falcipar</i> <i>um</i> <i>P.vivax</i>	N°totale=38 adulti con sopetta malaria acuta	Malaria confermata: PCT<5,3ng/ml Malaria non confermata: PCT=0,43ng/ml (GMC)
Richard-Lenoble D. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1997	Gabon	<i>P.falcipar</i> <i>um</i>	N°totale=34 bambini -controlli N°=5 -m.acuta N°=26 -m.cerebrale N°=3	Controlli: PCT=1,00+/-0,05ng/ml M.acuta: PCT=25,20+/-1,50ng/ml M.cerebrale: PCT=77,40+/-3,90ng/ml
Hollenstein U. Am.J. Trop.Med. Hyg. 1998	Bangkok (Thailandia)	<i>P.falcipar</i> <i>um</i>	N°totale=27 adulti, tutti con malaria complicata	26pz PCT elevata (GMC=40ng/ml) 1 pz,con bassa parassitemia., PCT normale (V.N. PCT<0,5ng/ml)
Chiwakata C.B. The journal of Infectious diseases 2001	Amburgo (Germania)	<i>P.falcipar</i> <i>um</i>	N°totale=66 adulti -m.complicata N°=36 -m.non complic. N°=30	M.complicata: PCT(GMC)=10,67ng/ml M non complicata: PCT(GMC)=1,52ng/ml (V.N. PCT<0,5ng/ml)
Braun N. Trop. Med. Int. Health. 2003	Ghana	<i>P.falcipar</i> <i>um</i>	Bambini con m.complicata e non	PCT elevata sia in caso di m.complicata che non complicata (parametro non discriminante)
Manegold C. Malaria Journal 2003	Amburgo (Germania)	<i>P.vivax</i> <i>P.ovale</i>	N°totale=37 adulti	25pz PCT normale o <2,1ng/ml 12pz PCT >4,8ng/ml (GMC=14,4ng/ml) Nessuna correlazione tra PCT e severità della malattia

Tabella 3.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso l'Ospedale di Kiremba, situato nella provincia di Ngozi, nel Nord del Burundi, in collaborazione con il personale medico e infermieristico in servizio presso tale struttura.

L'Ospedale di Kiremba, è localizzato in un'area rurale ed è una struttura privata, convenzionata con il Ministero della Salute Burundese, di proprietà della diocesi di Ngozi, una cittadina a circa 30 chilometri di distanza; dispone di 140 posti letto e serve una popolazione di utenza di circa 200.000 persone. E' dotato di reparti di ginecologia e ostetricia, chirurgia, medicina interna, pediatria e dispone di un servizio di diagnostica radiologica ed ecografica e di un laboratorio di analisi. Sono inoltre presenti un centro per i malnutriti e i prematuri, un centro trasfusionale e un dispensario per una prima valutazione.

L'Ospedale si trova a circa 1.550 metri di altezza sul livello del mare.

In Burundi la malaria è presente in tutto il Paese, ma con una distribuzione disomogenea: è endemica nelle zone a bassa altitudine, mentre è più rara nelle zone ad alta altitudine. Inoltre nelle zone a bassa altitudine, il livello di endemia varia da una regione all'altra; la regione di Nyanza è quella in

cui si registrano i più alti tassi di infezione, seguono le regioni di Gihofi, Cibitoke, Rumonge e Nyaburare.

Il *P.falciparum* rappresenta l'80-90% delle specie isolate. Fenomeni di resistenza alla cloroquina sono stati segnalati dal 1981, ma il fenomeno si è accentuato a partire dal 1983, sino a quando nel 1988, l'80% dei casi isolati sono risultati resistenti alla cloroquina. La sensibilità al chinino, resta invece ancora soddisfacente.

In base alla classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il Burundi figura tra i Paesi del III gruppo, per la presenza di elevata resistenza alla cloroquina e polichemio-resistenza.

Secondo i dati dell'OMS a partire dal 1999, in tutto lo stato del Burundi si è verificato un cospicuo aumento dei casi di malaria.

Nell'Ospedale di Kirembe, secondo i dati resi disponibili dagli uffici amministrativi, nel 2007 sono stati diagnosticati 13.690 casi di malaria, in pazienti di tutte le età, rivoltisi al dispensario, e per il 10,2% di questi si è reso necessario il ricovero.

Il protocollo dello studio da noi effettuato è stato concordato con il personale medico dell'Ospedale e successivamente approvato dal Ministero della Salute burundese.

Sono stati valutati pazienti di età inferiore ai 10 anni, ricoverati per malaria da *P.falciparum* presso il reparto di Pediatria dell'Ospedale di Kiremba.

Sono stati inclusi i casi con parassitemia ≥ 5.000 p/ μ L e che non avevano assunto farmaci antimalarici nei 15 giorni precedenti il ricovero.

Per escludere la concomitante presenza di infezioni batteriche, fattore che, indipendentemente dall'episodio malarico, poteva determinare un aumento dei valori di procalcitonina nel plasma, sono stati esclusi tutti i pazienti con segni o sintomi di infezione batterica, con valore dei globuli bianchi $\geq 10.000/\mu$ L e/o che avessero assunto terapia antibiotica nei 15 giorni precedenti il ricovero.

La diagnosi di malaria è stata effettuata tramite emoscopia, stabilendo la positività del campione e la parassitemia attraverso la goccia spessa, e la diagnosi di specie attraverso lo striscio sottile.

Per ciascun paziente al momento dell'arruolamento (1° giorno di ricovero), oltre ai dati di identificazione (nome, cognome, età e provenienza), è stata raccolta tramite intervista della madre, un'anamnesi riguardo modalità e tempo di esordio della sintomatologia e presenza di sintomi quali vomito, diarrea, tosse, prostrazione, incapacità ad alimentarsi e convulsioni.

Ogni paziente è stato quindi sottoposto ad esame obiettivo con particolare attenzione alla temperatura corporea, all'eventuale presenza di ittero,

epatosplenomegalia, pallore congiuntivale e di parametri indicativi, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, di malaria complicata.

Oltre alla parassitemia, sono stati inoltre valutati i seguenti parametri di laboratorio : emocromo, VES, transaminasi, bilirubina, creatinina, glicemia.

Per ogni paziente è stato inoltre raccolto un campione di siero, che è stato quindi conservato a -80°C e successivamente trasportato in Italia per effettuare il dosaggio della procalcitonina, utilizzando il test di chemiluminescenza della Brahms Diagnostica (LUMItest-PCT).

Nei giorni successivi le condizioni dei bambini sono state monitorate e in particolare, dopo 24-48 ore e dopo 7 giorni dall'arruolamento, e quindi dall'inizio del trattamento, sono stati rivalutati l'esame obiettivo, con particolare attenzione alla temperatura corporea, all'eventuale presenza di parametri indicativi di malaria complicata (OMS), e all'insorgenza di segni e/o sintomi di infezione batterica, l'emocromo, la VES e la parassitemia; agli stessi tempi sono stati ripetuti i prelievi di siero per il dosaggio della PCT.

RISULTATI

Sono stati studiati 62 pazienti (38 maschi e 24 femmine) di età compresa tra i 3 mesi e i 10 anni di vita (età media 36,2 mesi).

All'esordio tutti i pazienti presentavano febbre, che era accompagnata da vomito in 44 casi (70,97%), da prostrazione in 22 (35,48%), da tosse in 16 (25,81%), da convulsioni in 6 (9,68%) e da diarrea in 4 (6,45%).

Al momento della prima osservazione la temperatura corporea variava da un valore minimo di 37,2°C ad un valore massimo di 40,5°C, con un valore medio di 38,56, mentre il valore dei globuli bianchi/ μ l era compreso tra 3.600 e 9.580, con un valore medio di 6.906, e i livelli di emoglobina erano compresi tra 3,5 e 15,6 g/dl, con un valore medio di 7,99.

Al momento della prima osservazione (T_0) la parassitemia risultava compresa tra 7.000 e 715.000 parassiti/ μ l, con un valore medio di 99.840 e una mediana di 56.675.

Al controllo emoscopico effettuato dopo 48 ore di trattamento la parassitemia variava da 10 a 40.000 parassiti/ μ l, con una media di 2.820 e una mediana di 515, mentre al 7° giorno di terapia risultava negativa in 48

pazienti su 62, con un valore massimo di 1.234 parassiti/ μ l, un valore medio di 58,2.

Nella totalità del campione esaminato i livelli di parassitemia misurati a 48 ore dall'inizio del trattamento risultavano diminuiti rispetto a quelli registrati al momento della prima valutazione, con valori di Parasite Reduction Ratio (PRR) compresi tra 5 e 6.266,6.

Considerando normali i valori di PCT $<0,5$ ng/ μ l, all'ingresso 58 pazienti su 62 presentavano un'elevazione di tale parametro, con un range compreso tra 0,1 e 126,4 ng/ μ l, un valore medio di 34,38 e una mediana di 21,2.

Alla 48° ora di trattamento il range della PCT plasmatica variava da 0,1 a 95 ng/ μ l, con un valore medio di 24,61, ed una mediana di 13,3. Se paragonati a quelli riscontrati all'ingresso, tali valori risultavano ridotti in 46 pazienti ed aumentati nei restanti 14.

In settima giornata di terapia, tutti i pazienti presentavano concentrazioni plasmatiche di PCT ridotte rispetto alle due precedenti determinazioni, con un range compreso tra 0 e 34 ng/ μ l, un valore medio di 2,14, ed una mediana di 0,7 ; in particolare tale parametro si era normalizzato in 40 pazienti su 62.

L'andamento delle concentrazioni plasmatiche di PCT ai diversi tempi di determinazione è rappresentato nel Grafico 1.

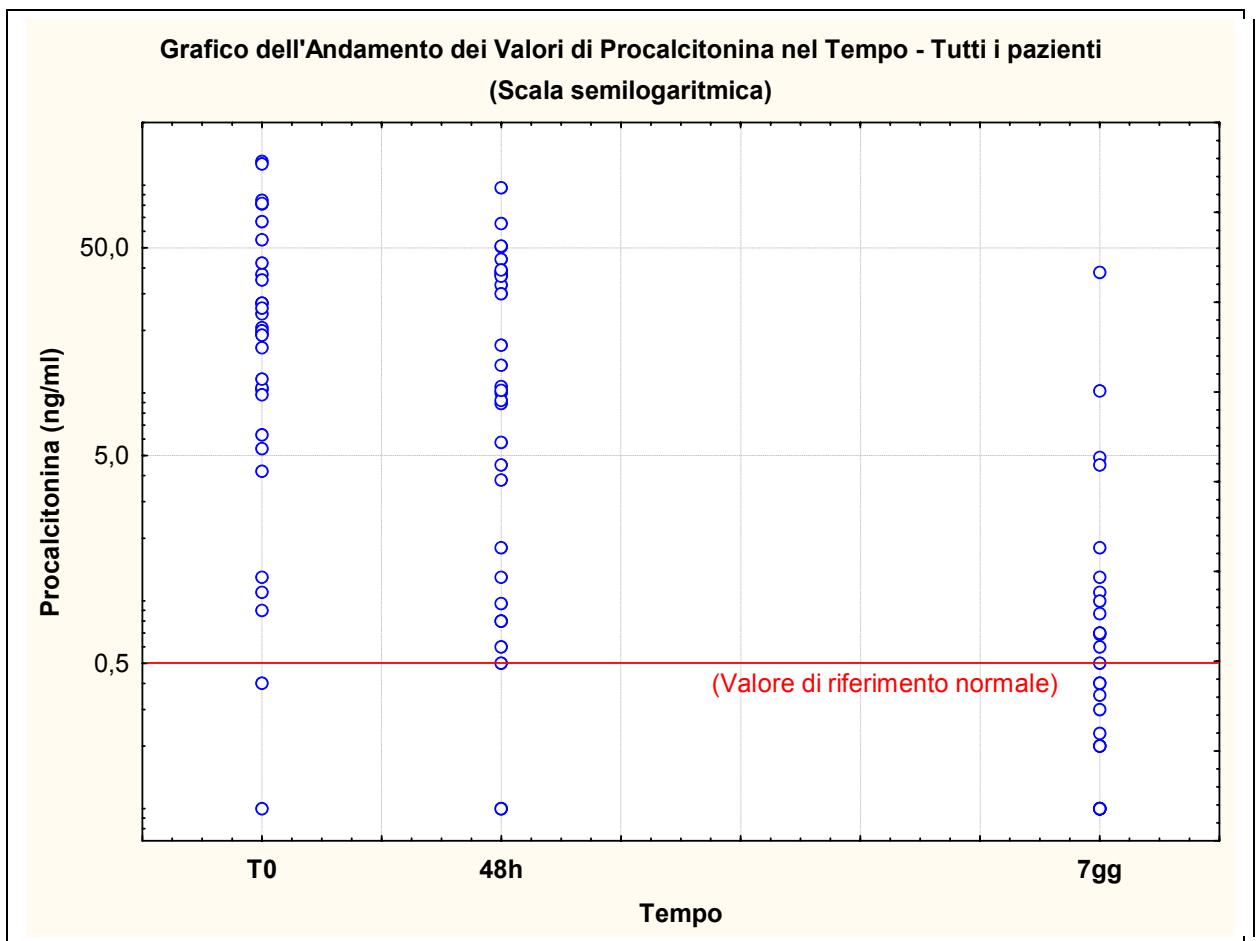
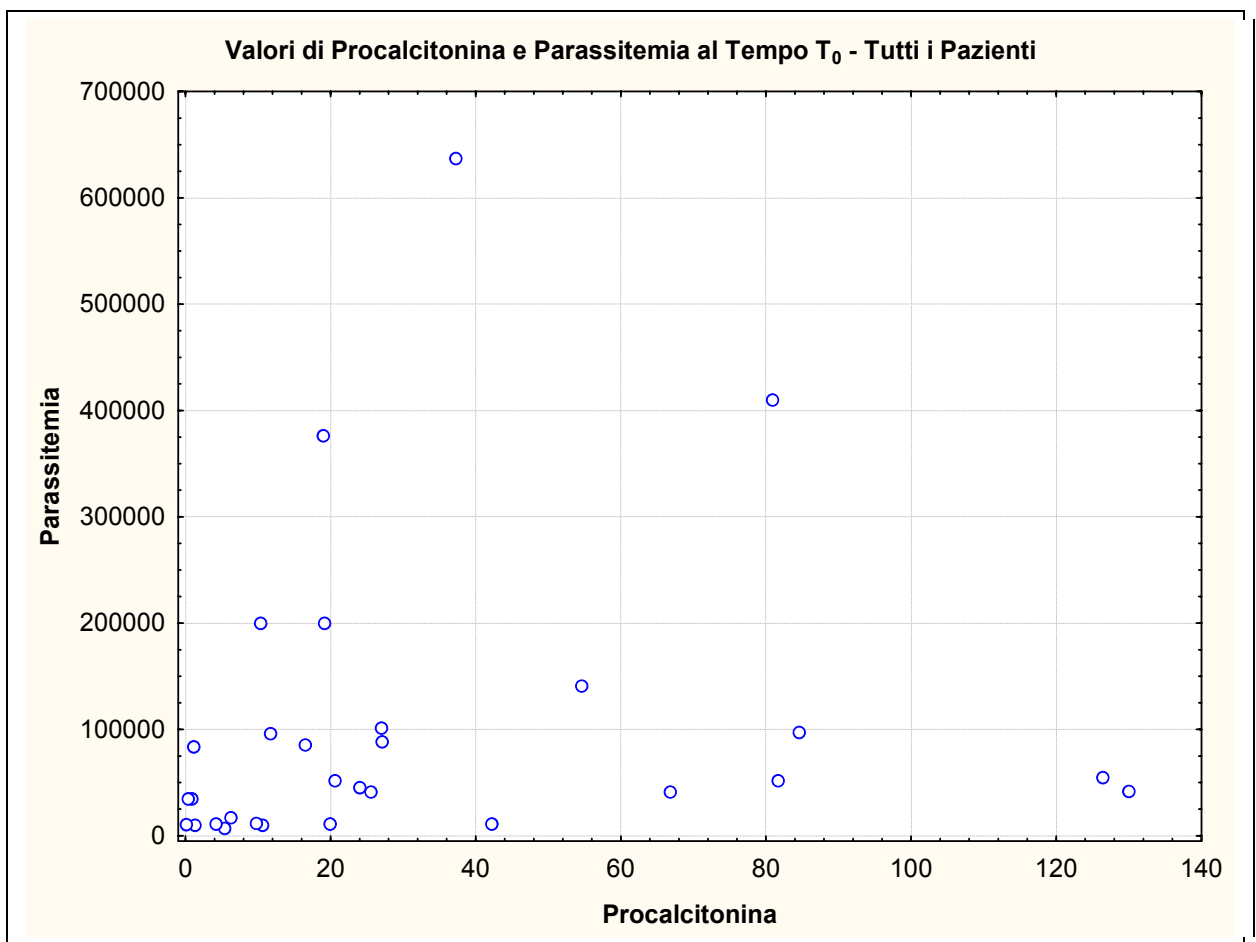


Grafico 1.

Applicando il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman è stata valutata la correlazione tra i valori di parassitemia e i momenti di PCT al T_0 . Tale correlazione, rappresentata nel Grafico 2, è risultata positiva e significativa ($p=0,01$; $R=0,46$).



Applicando il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman è stata valutata anche la correlazione tra il Parasite Reduction Ratio (PRR; parassitemia T0/parassitemia T48) e il rapporto tra la PCT al T₀ e la PCT dopo 48 ore, al fine di valutare se ad una diminuzione della parassitemia, per effetto della terapia, corrispondesse una proporzionale riduzione dei livelli di PCT. Tale correlazione (Grafico 3) non è risultata significativa dal punto di vista statistico (P=0,86 ; R=0,03).

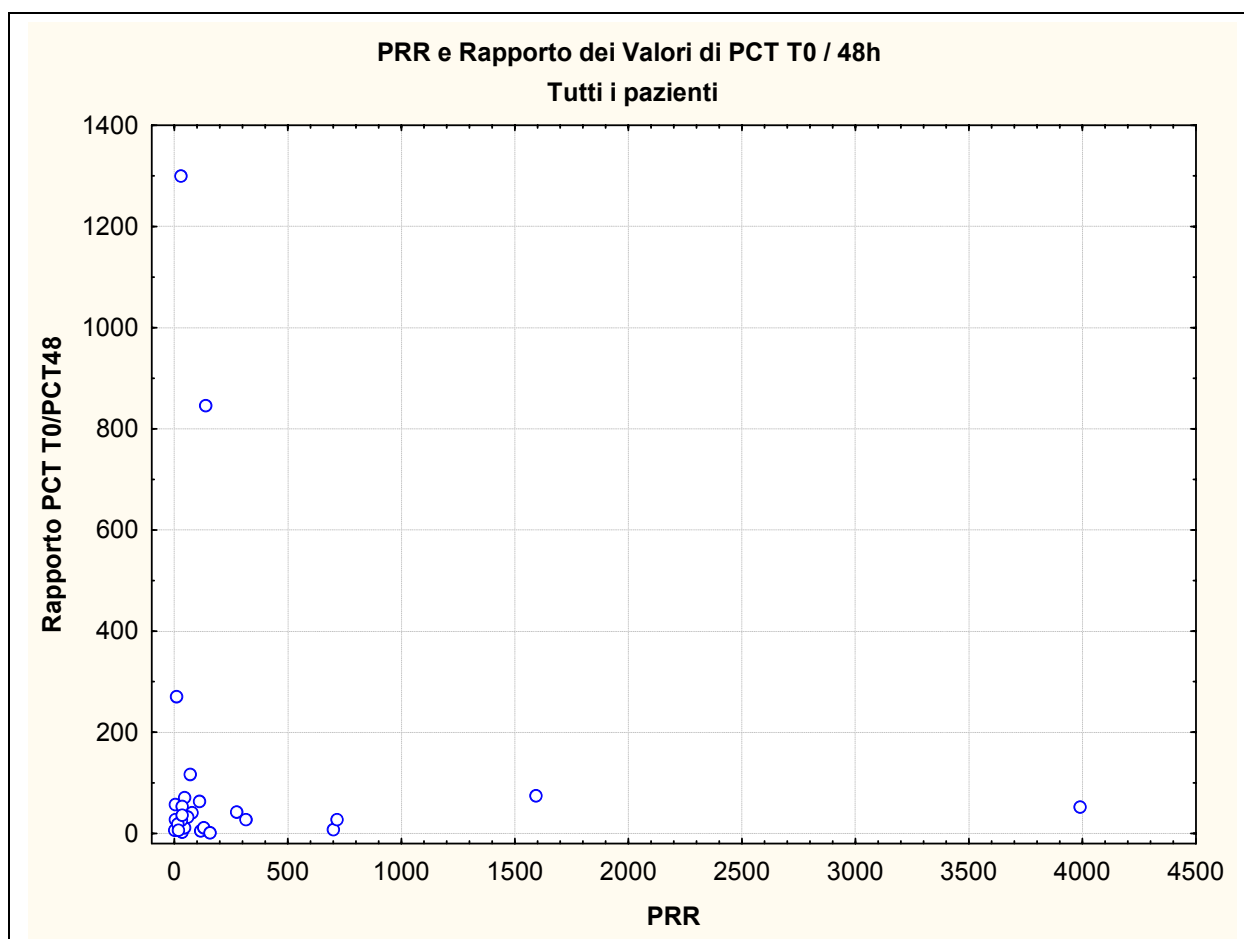


Grafico 3.

Da un punto di vista clinico, è risultato che, su 62 pazienti, 14 erano affetti da malaria severa, dovuta in 10 casi ad un grave stato di anemia ($Hb < 5g/dl$) ed in 4 ad ipoglicemia ($< 40mg/dl$), mentre nessuno presentava malaria cerebrale.

Il livello di parassitemia calcolato al T_0 nei pazienti con malaria complicata variava da 12.135 e 108.000 parassiti/ μl , con un valore medio di 47.000, mentre nei pazienti con malaria non complicata il range era compreso tra 7.200 e 650.000 parassiti/ μl , con un valore medio di 115.412 (DS=155.320) ($p=NS$).

Sempre confrontando i due gruppi è risultato che, nei pazienti con malaria complicata la concentrazione plasmatica di PCT al T_0 era compresa tra 0,4 e 82,5ng/ μl , con un valore medio di 23,32 e dopo 48 ore di trattamento era compresa tra 0,6 e 64,3ng/ μl con un valore medio di 16,53, mentre tra i pazienti con malaria non complicata al T_0 il range variava da 0,1 a 132ng/ μl , con un valore medio di 38,12 e dopo 48 ore variava tra 0,1 e 94 ng/ μl , con un valore medio di 25,3.

Non vi sono differenze statisticamente significative tra questi valori riscontrati nei due gruppi.

DISCUSSIONE

La nostra indagine conferma il dato, già presente in letteratura, che i livelli plasmatici di procalcitonina aumentano in corso di infezione malarica.

Poiché è noto che l'aumento plasmatico di tale parametro è indicativo di sepsi batterica, dalla nostra casistica sono stati rigorosamente esclusi i pazienti con presenza di leucocitosi e/o segni o sintomi ascrivibili a infezione batterica, per cui il dato sembrerebbe puramente riferito all'infezione malarica.

Dal nostro studio è emerso che al momento della diagnosi, in fase di pre-trattamento, i valori di PCT erano aumentati in più del 93% del campione, ed erano direttamente correlati con i livelli di parassitemia valutati allo stesso momento.

Inoltre, così come altri autori, anche noi, dopo 48 ore di trattamento, abbiamo registrato una riduzione della parassitemia nella totalità del campione, associata ad una contemporanea riduzione dei livelli di PCT nel 74% dei pazienti, mentre dopo 7 giorni la parassitemia risultava negativa in 48/62 pazienti (77%) e i livelli di PCT si erano normalizzati in 40/62 pazienti (65%). Tuttavia, studiando la correlazione tra l'entità della riduzione della parassitemia dopo 48 ore dall'inizio del trattamento,

rappresentata dal PRR, e quella della PCT, il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman non ha dato risultati statisticamente significativi.

I nostri dati confermerebbero quindi, l'ipotesi che la PCT sia un indice che si modifica gradualmente in relazione alla risposta infiammatoria dell'organismo all'infezione e di conseguenza in risposta ad una terapia specifica.

A tale proposito, per poter descrivere più accuratamente tale fenomeno, sarebbe utile disporre di determinazioni giornaliere del parametro, anche se nell'indagine da noi condotta, ciò non è stato possibile sia a causa delle difficoltà del prelievo di sangue in pazienti pediatrici, sia di alcune limitazioni organizzative della realtà sanitaria in cui lo studio è stato svolto.

Considerando che la nostra casistica comprende per la maggior parte casi di malaria non complicata e nessun caso di malaria cerebrale, i nostri risultati, indirettamente non sembrerebbero confermare la correlazione riscontrata da alcuni autori (Richard-Lenoble e Davis) tra i livelli plasmatici di PCT e la severità del quadro clinico, mentre risulterebbero in accordo con altri studi, dai quali è emerso che tale parametro non sarebbe discriminante tra malaria severa e malaria non complicata (Braun e Manegold). Tuttavia, è importante sottolineare che i nostri pazienti, sebbene non presentassero per lo più criteri clinici di malaria complicata, all'ingresso presentavano livelli

di parassitemia elevati, in assenza di una differenza significativa tra il gruppo con malaria complicata e quello con malaria non complicata. Tale osservazione sarebbe quindi in accordo con precedenti rilevazioni di una stretta correlazione tra elevati livelli di parassitemia e di PCT alla diagnosi. Vista l'esiguità del numero di casi di malaria complicata e visto che nessuno di essi presentava un interessamento cerebrale, sarebbe interessante ampliare la casistica di quest'ultimo gruppo, al fine di poter ottenere una valutazione scientificamente più valida.

Da questo punto di vista si sono incontrate notevoli difficoltà, a causa dei rigorosi criteri di esclusione imposti dallo studio, ma necessari per eliminare i casi con infezioni batteriche certe o sospette.

Infine dal punto di vista dei possibili ulteriori sviluppi di questo settore di ricerca, si potrebbe valutare anche l'andamento dei valori di procalcitonina in corso di malaria causata da *P.vivax*, *ovale* e *malariae*, dato che il nostro e la maggior parte degli studi finora effettuati, si riferiscono solo all'infezione da *P.falciparum*. La eventuale rilevazione di un aumento della PCT all'ingresso di questi pazienti confermerebbe che tale parametro non può essere considerato un indice di gravità poiché, come è noto, queste tre specie di plasmodio non sono causa di malaria complicata.

BIBLIOGRAFIA

1. Becker KL, Nysten ES, Snider R. La procalcitonine circule chez les sujets normaux. *Annales Endocrinologie* 1996; suppl. 1:59.
2. Snider RH, Nysten ES, Becker KL. Procalcitonin and its components peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *J Investig Med* 1997; 45:552-560.
3. Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nysten ES, Snider RH, Simon GL, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3296-3301.
4. Bracq S, Machason M. Calcitonin gene expression in normal human liver. *FEBS* 1993; 331:14-18.
5. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis related cytokines *in vitro*. *J Lab Clin Med* 1999; 134:49-55.
6. Becker KL, Nysten E, Thompson K. Preferential hypersecretion of procalcitonin and its precursors in pneumonitis: a cytokine-induced phenomenon? *Endotoxemia and Sepsis Congress* 1995; (Abstract) Philadelphia, USA.

7. Bensousan TA, Vincent F, Assicot M, Morin JF, Leclercq B, Escudier B, et al. Monokines, procalcitonin (ProCT) and opioid peptides course during a model of SIRS. *Shock* 1997; 8, suppl.47-48.
8. Petitjean S, Assicot M. Etude de l'immunoreactivite calcitonine-like au cours des processus infectieux. Diplome d'etudes approfondies de biotechnologie, 1993; Université Paris V:1-29.
9. Whang KT, Vath SD, Nylen ES, Muller B, Qichang Li, Tamarkin L, White JC. Procalcitonin and proinflammatory cytokine interactions in sepsis. *Shock* 1999; 12(4):265-273.
10. Becker KL, Nylen ES, Arifi AA, Thompson KA, Snider RH, Alzeer A. Effekt of classic heatstroke on serum procalcitonin. *Crit Care Med* 1997; 25:1362-1365.
11. Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H, et al. Evolution and significance of circulating procalcitonins levels compared with IL-6, TNF α and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23:218-224.
12. Hergert M, Lestin HG, Scherkus M, Brinker K, Klett I, Stranz G, et al. Procalcitonin in patients with sepsis and polytrauma. *Clin Lab* 1998; 44:659-670.

13. Kuse ER, Langefeld I, Jaeger K, Külpmann WR. Procalcitonin a new diagnostic tool in complications following liver transplantation. *Intens Care Med* 2000; suppl. 2:187-192.
14. Chiesa C, Panero A, Rossi N, Stegagno M, De Giusti M, Osborn JF, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26:664-672.
15. Al-Nawas B, Shah PM. Procalcitonin in acute malaria. *Eur J Med Res* 1997; 2:206-208.
16. Davis TME, Assicot M, Bohuon C, St. John A, Li GQ, Ahn TK. Serum Procalcitonin concentrations in acute malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:670-671.
17. Hollenstein U, Looareesuwan S, Aichelburg A, Thalhammer F, Stoiser B, Amradee S, et al. Serum procalcitonin levels in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:860-863.
18. Gerard Y, Hober D, Petitjean S, Assicot M, Bohuon C, Mouton Y, et al. High serum procalcitonin level in a 4-year old liver transplant recipient with disseminated candidiasis. *Infection (letter)* 1995; 23:310-311.
19. Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, Kliem V, Koch KM, Brunkhorst R. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus

- erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1250-1256.
20. Meisner M, Schmidt J, Huettner H, Tschaikowsky K. The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Intens Care Med* 2000; 26, suppl. 2:212-216.
21. Meisner M, Lohs T, Hüttemann E, Schmidt J, Reinhart K. The plasma elimination rate and urinary secretion of PCT in patients with normal and impaired renal function. *Anesthesiology* 1999; 91 Suppl. 3A:A236.
22. Nylen ES, Whang KT, Snider RH, Steinwald PM, White JC, Becker KL. Mortality is increased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26(6):1001-1006.
23. Nylen E, Snider R, Thompson KA, Rohatgi P, Becker KL. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *Am J Med Sci* 1996; 312:12-18.
24. Steinwald PM, Becker KL, Nylen ES, Snider RH, White JC. Hyperprocalcitonemia of E.coli sepsis in hamster model: association with hypocalcemia and hyperphosphatemia. Abstract on the 10th International Congress of Endocrinology, June 1996, San Francisco, CA 1998.

25. Zeni F, Viallon A, Assicot M, Tardy B, Vindimian M, Page Y, et al. Procalcitonin serum concentrations and severity of sepsis. *Clin Intens Care suppl 2* 1994; 5:89-98.
26. Bone RC. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992; 19:973-976.
27. Gramm HJ, Beier W, Zimmermann J, Oedra N, Hannemann L, Boese-Landgraf J. Procalcitonin (ProCT) – A biological marker of the inflammatory response with prognostic properties. *Clin Intens Care* 1995; 6 suppl. 2:71.
28. Gramm HJ, Hannemann L. Activity markers for the inflammatory host response and early criteria of sepsis. *Clin Intens Care* 1996; 7, suppl.1:1-3.
29. Giamarellos-Bourboulis EJ, Mega A, Grecka P, Scarpa N, Koratzanis G, Thomopoulos G, Giamarellou H. Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient? *Intensive Care Med* 2002; 28:1351-1356.
30. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum Procalcitonin and C-Reactive Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39:206-17.

31. Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, Gil H, Khayat N, Estavoyer J-M, May T, Hoen B. Low Serum Procalcitonin Level Accurately Predicts the Absence of Bacteriemia in Adult Patients with Acute Fever. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35:156-61.
32. Oberhoffer M, Bitterlich A, Hentschel T, Meier-Hellmann A, Vogelsang H, Reinhart K. Procalcitonin (ProCT) correlates better with the ACCP/SCCM consensus conference definitions than other specific markers of the inflammatory response. *Clin Intens Care* 1996; 7, suppl.1:46.
33. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999. 37(3):363-368.
34. Gendrel D, Raymond J, Assicot M, Moulin F, Iniguez JL, Lebon P, et al. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial and viral meningitis. *Clin Infect Dis* 1997; 24:1240-1242.
35. Hatherill M, Jones G, Lim E, Tibby M, Murdoch IA. Procalcitonin aids diagnosis of adrenocortical failure. *Lancet* 1997; 350:1749-1750.
36. Hammer S, Meisner F, Dirschedl P et al. Procalcitonin: a new marker for diagnosis of acute rejection and bacterial infection in patients after heart and lung transplantation. *Transpl Immunol* 1998; 6:235-241.

37. Aouifi A, Piriou V, Bastien L et al. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of infection in cardiac surgical patients. *Crit Care Med* 2000; 28:3171-6.
38. Reinhart K, Meisner M, Hartog C. Diagnosis of Sepsis: Novel and Conventional Parameters. *Advances in Sepsis* 2001; 1(2):42-51.
39. Carroll ED et al. Procalcitonin Better Marker for Meningococcal Disease Than C-Reactive Protein. *Arch Dis Child* 2002; 86:282-285.
40. Enguix A, Rey C, Concha A, Medina A, Coto D, Dieguez MA. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensive Care Med* 2001; 27:211-5.
41. Staehler M, Überfuhr P, Reichart B, Hammer C. Differentialdiagnostik der Abstossungsreaktion und Infektion bei herztransplantierten Patienten: neue Wege mit Zytokinen und Procalcitonin als Marker. *Transplantationsmedizin* 1997; 9:44-50.
42. Reith HB, Lehmkuhl P, Beier W, Högby B. Procalcitonin – ein prognostischer Infektionsparameter bei der Peritonitis. *Chir Gastroenterol* 1995; 11 suppl 2 :47-50.
43. De Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chiolerio R, Yersin B, Gallati H, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and

- procalcitonin concentrations: Comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997; 25:607-613.
44. Rinalta EM, Nevalainen TJ. Group II phospholipases A₂ in sera of febrile patients with microbiologically or clinically documented infections. *Clin Infect Dis* 1993; 27:864-870.
45. Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H, et al. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg* 1992; 127:460-467.
46. Pacher R, Redl H, Fraas M, Petzl DH, Schuster E, Woloszczuk W. Relationship between neopterin and granulocyte elastase plasma levels and severity of multiple organ failure. *Crit Care Med* 1989; 17:221-226.
47. Chiwakata CB, Manegold C, Bönicke L, Waase I, Jülch C, Dietrich M. Procalcitonin as a Parameter of Disease Severity and Risk of Mortality in Patients with *Plasmodium falciparum* Malaria. *The journal of Infectious Diseases* 2001; 183:1161-4.
48. Richard-Lenoble D, Duong TH, Ferrer A, Lacombe C, Assicot M, Gendrel D, Bohuon C, Kombila M. Changes in procalcitonin and interleukin 6 levels among treated African patients with different clinical forms of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:305-6.

49. Davis TME, Assicot M, Bohuon C, St. John A, Li GQ, Anh TK. Serum procalcitonin concentrations in acute malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1994; 88:670-1.
50. Braun N, Marfo Y, Von Gartner C, Burchard GD, Zipfel PF, Browne NE, Fleischer B, Broker BM. CTLA-4 positive T cells in contrast to procalcitonin plasma levels discriminate between severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. Trop Med Int Health 2003; 8(11):1018-24.
51. Manegold C, Schmiedel S, Chiwakata CB, Dietrich M. Procalcitonin serum levels in tertian malaria. Malaria Journal 2003; 2:34.

Procalcitonin and malaria

Dott.ssa Maria Laura Pettinato

Istituto di Malattie Infettive-Università degli Studi di Sassari

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche-XXII ciclo

Indirizzo Patologie Infettive nel viaggiatore internazionale.

Abstract:

Procalcitonin (PCT), the prohormone of calcitonin, is suitable for detecting complications of infection characterized by systemic inflammatory reactions.

High plasma levels are observed in severe sepsis, septic shock, serious bacterial infections and systemic inflammatory reactions.

Increased PCT concentrations have been reported in both uncomplicated and severe forms of malaria.

The highest values are measured in the more severe forms of the disease; in response to therapy serum concentrations quickly fall within a few days.

In our study we observed pediatric patients with uncomplicated and severe forms of malaria by *Plasmodium falciparum*.

We studied 62 patients, with age between 3 months and 10 years, hospitalized for malaria, in a rural hospital of Burundi.

Our investigation confirmed data that PCT plasma levels increase during malarial infection and reduce after specific therapy such as the plasma parasite density.

We reported correlation of elevated PCT values with high plasma parasite density, but we didn't find a significant correlation between the highest plasma PCT levels and severe forms of the disease.

We think it could be useful and interesting to diffuse the PCT determination in our hospitals for the therapy follow-up in imported malaria cases.