



UNIVERSITÀ DI PISA

**Dipartimento di Patologia Clinica, Medica,
Molecolare e Area Critica**

Corso di laurea specialistica in Medicina e Chirurgia

Tesi di laurea

**RUOLO DELLA PROCALCITONINA
COME BIOMARCATORE
PER LA DIAGNOSI PRECOCE
DELLE INFEZIONI DEL TRATTO URINARIO**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Giunta

Correlatore:

Dott. Francesco Forfori

Candidato:

Elisa Calistri

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Indice

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1 – La Procalcitonina	1
1.1 - La Procalcitonina	1
1.2 - La PCT come indicatore di infezione e di sepsi: una raccolta di dati basata sull'evidenza	7
1.2.1 - Utilizzo della procalcitonina per il monitoraggio della terapia antibiotica	24
CAPITOLO 2 – Generalità sulle infezioni delle vie urinarie	29
2.1 - Definizioni e classificazioni	29
2.2 - Epidemiologia e condizioni predisponenti	31
2.3 - Microorganismi coinvolti nelle infezioni delle vie urinarie e loro meccanismi patogenetici	36
2.4 - Meccanismi di difesa dell'ospite	44
2.5 - Le infezioni delle vie urinarie in Terapia Intensiva	46

CAPITOLO 3 – Studio clinico	54
3.1 - Obiettivi dello studio	54
3.2 - Disegno dello studio	56
CAPITOLO 4 – Popolazione in studio e misurazioni	58
4.1 - Popolazione in studio	58
4.2 – Misurazioni	60
4.2.a – Urinocoltura	60
4.2.b - Esame delle urine standard	65
4.2.c - Determinazione della procalcitonina plasmatica	74
4.2.d - Determinazione della procalcitonina urinaria	79
CAPITOLO 5 – Risultati	80
5.1 - Popolazione composta da volontari sani	80
5.2 - Popolazione composta da pazienti che hanno subito un intervento di chirurgia minore	82
5.3 – Popolazione costituita da pazienti settici	85

CAPITOLO 6 – Discussione dei dati	91
6.1 – Relazione tra aumento dei valori di pro calcitonina plasmatica e diagnosi di sepsi	91
6.2 – Relazione tra procalcitonina plasmatica e pro calcitonina urinaria nella popolazione costituita da pazienti settici.	94
CONCLUSIONI	98
BIBLIOGRAFIA	99

Introduzione

Una precoce diagnosi di sepsi costituisce per la Terapia Intensiva una delle principali sfide quotidiane poiché sono disponibili varie terapie capaci di migliorare la sopravvivenza dei pazienti critici. Dal momento che la sepsi non possiede sintomi e segni specifici e che la coltura microbiologica sebbene sia il gold standard diagnostico presenta importanti inconvenienti è essenziale individuare nuovi strumenti per una sua diagnosi rapida ed accurata al fine di prevenirne le complicanze e di migliorare l'outcome del paziente settico. La procalcitonina è un proormone polipeptidico che in caso d'infezioni batteriche viene prodotto e rilasciato dalla maggior parte dei tessuti dell'organismo determinando un aumento della sua concentrazione ematica proporzionale alla gravità dell'infezione. Obiettivo dello studio è confermare questa relazione di proporzionalità al fine di evidenziare l'utilità della PCT come biomarcatore precoce nella diagnosi di sepsi ed inoltre di verificare l'ipotesi che nei pazienti che presentano urinocoltura positiva il valore di PCT urinaria superi il valore di PCT plasmatica. Alla conferma di questa ipotesi potrebbe conseguire la messa a punto di un nuovo strumento diagnostico capace di evidenziare in meno di 30 minuti un'eventuale infezione del tratto urinario.

CAPITOLO 1: LA PROCALCITONINA

1.1 - LA PROCALCITONINA

La procalcitonina (PCT), peptide costituito da 116 aminoacidi, è un membro della famiglia delle proteine CAPA a cui appartengono la calcitonina ed i suoi precursori, i peptidi correlati al gene della calcitonina (CGRP I e II), l'amilina e l'adrenomedullina (1). La sua sequenza aminoacidica è stata descritta per la prima volta da Le Moullec et al. nel 1984 (2) ed è identica a quella della proteina precursore della calcitonina.

La calcitonina ed i suoi precursori provengono dal gene CALC-I sul cromosoma 11 (11p,15.4) (2,3). CALC-I è un paradigmatico esempio di come un singolo gene a causa del cosiddetto "splicing alternativo" riesce a produrre proteine differenti e con differente funzione (4). Nelle cellule C della Tiroide, deputate alla sintesi di calcitonina, dopo che il gene CALC I viene trascritto e l'RNA processato, si viene a formare l'mRNA che codifica per la preprocalcitonina composta da 141 aminoacidi. La preprocalcitonina è costituita da una sequenza segnale che favorisce il legame tra la proteina ed il reticolo endoplasmatico, dalla regione N-terminale della procalcitonina, dalla calcitonina nella regione centrale e infine dalla catacalcina (regione C-terminale della procalcitonina) (1,5,6). Successivamente al legame avvenuto tra proteina e reticolo endoplasmatico, la

molecola si posiziona all'interno di quest'ultimo e la sua sequenza segnale viene degradata da un'endopeptidasi formando così il proormone procalcitonina. La procalcitonina subisce in seguito uno specifico processo proteolitico intracellulare che porta alla formazione e alla secrezione dell'ormone calcitonina. (Figura 1). Al contrario, le modificazioni che portano da procalcitonina a calcitonina non si verificano in quelle cellule che sintetizzano PCT a seguito di stimoli infiammatori così che tale molecola si ritrova intera nel plasma(1,6,7).

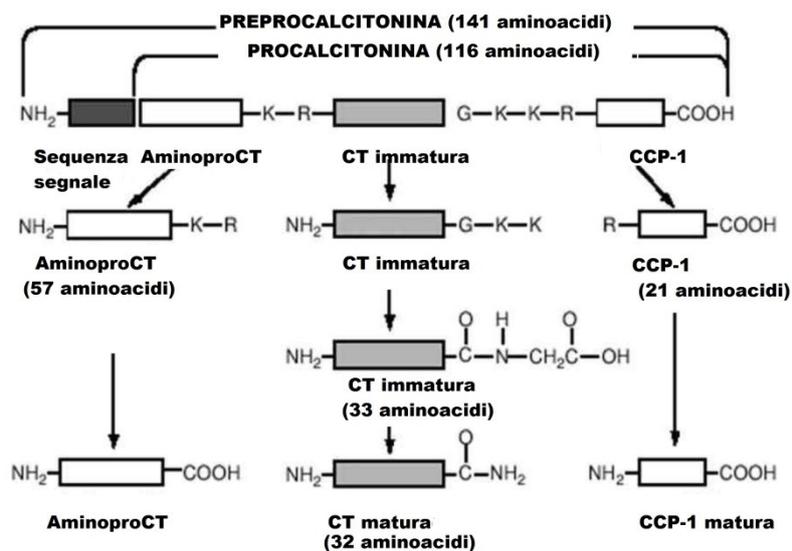


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura della procalcitonina e del suo precursore preprocalcitonina.

Nei soggetti sani la PCT è prodotta dalle cellule C della Tiroide ed, in minima parte, da alcune cellule endocrine polmonari (1,8); le sue concentrazioni plasmatiche risultano quasi al di sotto della soglia di rilevamento analitico in quanto sono inferiori a 0,05 ng/ml (9). In corso d'inflammatione e di sepsi, invece, il prodotto di espressione del gene CALC-I è up-regolato e la PCT viene rilasciata da quasi tutti i tessuti e tipi cellulari dell'organismo aumentando anche di 5.000-10.000 volte, mentre i valori di calcitonina rimangono nel range di riferimento (10).

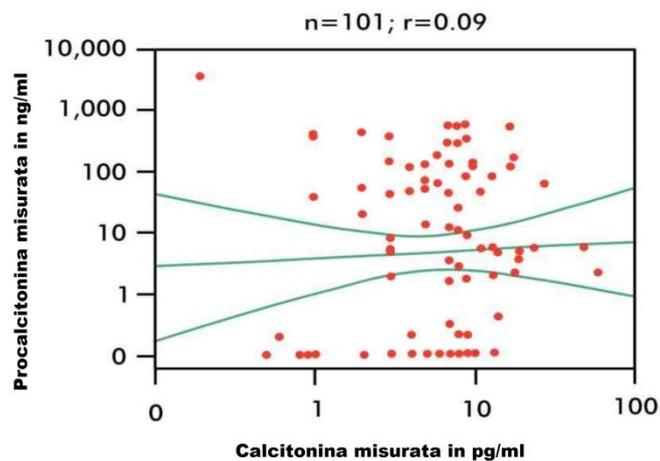


Figura 2: correlazione tra procalcitonina e calcitonina in soggetti sani ed in pazienti settici. Il grafico evidenzia che in condizione di sepsi sebbene la PCT aumenti anche di 5.000-10.000 volte le concentrazioni di calcitonina rimangono negli intervalli di riferimento.

Questo pattern di attivazione che descrive la PCT come una “ormochina” fu descritto per la prima volta da Mueller et al. nel 2001. Somministrando lipopolisaccaride nei criceti al fine d’indurre uno stato di sepsi Mueller ed i suoi collaboratori identificarono l’ mRNA della PCT non solo a livello tiroideo, dove è normalmente espresso, ma anche in vari altri tessuti tra cui milza, fegato, polmone, rene, surrene, testicoli ed inoltre a livello leucocitario e monocito-macrofagico (11). Endotossine batteriche, esotossine, ed alcune citochine come IL-1 β , IL-6 e TNF- α stimolano infatti la produzione di PCT (12).

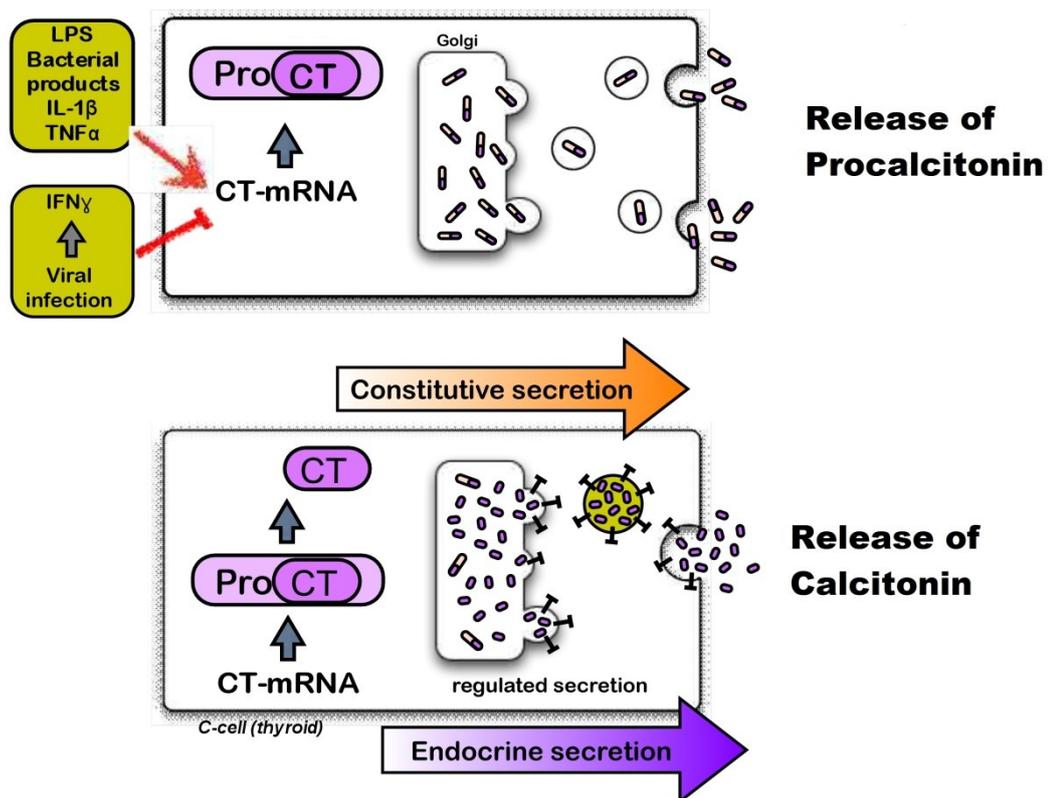


Figura 3: Diagramma di espressione del gene CALC-I nell’adipocita e nella cellula tiroidea.

Uno studio di Dandona et al., evidenzia l'aumento dei valori di PCT in soggetti sani a cui sono state iniettate piccole dosi di endotossine batteriche. In questi soggetti la PCT inizia ad innalzarsi dopo circa 2 o 3 ore dall'iniezione, ne conseguono dopo 6-12 ore un rapido aumento con raggiungimento di un plateau, un mantenimento di 48 ore a valori elevati ed infine un ritorno ai valori basali entro i successivi due giorni (13).

Dagli studi condotti da Mueller et al. 2001 e da Linscheid et al. 2003 emerge che la citochina IL-1 β è uno stimolante particolarmente potente mentre le citochine TNF- α e IL-6 sono apparse più moderate (11,15). Altro interessante aspetto emerso nello studio di Linscheid e collaboratori è che l'induzione della PCT può essere attenuata da citochine, come l'interferone γ , che vengono rilasciate durante le infezioni virali e da ciò ne consegue che i livelli sierici di procalcitonina si rivelano utili nella distinzione tra infezioni batteriche ed infezioni virali (14,15).

La Procalcitonina è un importante modulatore della risposta immunitaria ed i suoi principali effetti biologici sono:

- azione chemochina-simile che favorisce la risposta migratoria delle cellule monocitarie;
- modulazione dell'induzione delle citochine proinfiammatorie;
- modulazione della vasodilatazione e della vasocostrizione tramite stimolazione ed inibizione della NO-sintetasi inducibile;
- inibizione degli effetti di CGRP e agonismo parziale dei recettori CGRP-1 e AMY-1 (16-19).

Inoltre in modelli sperimentali animali sono state dimostrate anche l'influenza della PCT sulla mortalità, sulla circolazione e sulla funzionalità renale (20-23).

In seguito ai numerosi studi sperimentali è stato elaborato un ipotetico modello d'induzione della PCT in risposta ad uno stimolo nocivo (come ad esempio una sepsi, interventi di chirurgia maggiore e traumi tissutali estesi) che si può riassumere come segue: lo stimolo primario, induce l'espressione di molecole di adesione e, in conseguenza di ciò, l'aderenza dei monociti, i quali cominciano a produrre PCT per circa 3-5 ore. La PCT rilasciata agisce come una chemochina attirando ulteriori monociti che penetrano nel tessuto; questa "risposta migratoria" è tempo-dipendente e si disattiva dopo alcune ore dalla presenza della PCT. Gli adipociti (e probabilmente altre cellule parenchimatose) in seguito al contatto diretto con i monociti attivati iniziano anche essi a produrre PCT e la rilasciano in quantità significative. Questo modello, da cui emerge il rilevante ruolo delle interazioni cellula-cellula nella produzione della procalcitonina, motiva perché, durante la sepsi, questa compare in quasi ogni tessuto e spiega inoltre perché la sepsi o l'iniezione di un'endotossina la producono in concentrazioni elevate (4).

1.2 – LA PCT COME INDICATORE DI INFEZIONE E DI SEPSI: UNA RACCOLTA DI DATI BASATA SULL'EVIDENZA

La sepsi rappresenta a livello mondiale un enorme problema di salute associato ad elevata morbilità e mortalità (24,25); si stima che ogni anno nei soli Stati Uniti circa 750.000 pazienti sviluppano sepsi, con tassi di mortalità riferiti al 60% (24,26,27).

Poiché negli anni l'assenza di un'universale terminologia e classificazione aveva reso difficoltoso lo studio della sepsi in quanto non si riuscivano a selezionare popolazioni omogenee per i trial clinici, i membri dell'American College of Chest Physicians (ACCP) e la Society of Critical Care Medicine (SCCM) in occasione della Consensus Conference del 1992 coniarono le definizioni, attualmente adottate in tutto il mondo, dei termini "SIRS", "sepsi", "sepsi grave" e "shock settico".

La SIRS (Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica) è caratterizzata da almeno due dei seguenti criteri:

- temperatura $> 38^{\circ} \text{C}$ o $< 36^{\circ} \text{C}$;
- frequenza cardiaca > 90 battiti/minuto;
- frequenza respiratoria > 20 atti respiratori al minuto o $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg;

- conta leucocitaria $>12000/\text{mm}^3$, $<4000/\text{mm}^3$, o neutrofili immaturi “a bande” $>10\%$.

La sepsi è un’infezione documentata, associata a due o più criteri della SIRS.

Sepsi grave è invece una sepsi associata a disfunzione d’organo, che include ma non si limita ad acidosi lattica, oliguria, ipossiemia, disordini della coagulazione ed alterazioni acute dello stato mentale.

Una sepsi con ipotensione, nonostante adeguata reintegrazione di liquidi, associata alla presenza di alterazioni della perfusione prende il nome di shock settico (28).



Figura 4: Diagramma che descrive la relazione che intercorre tra infezioni, SIRS, Sepsi, Sepsi grave e shock settico.

Tali definizioni, tuttavia, se da una parte sono utili ai fini di una stratificazione generale, sia da un punto di vista clinico che operativo, dall'altra risultano troppo ampie ed aspecifiche per cui non consentono una precisa stratificazione dei pazienti soprattutto in termini prognostici (4). Di conseguenza, nel 2001, 29 esperti si riunirono a Washington nell'International Sepsis Definitions Conference con l'obiettivo di rivedere le definizioni correnti ed aumentare l'accuratezza, la rilevabilità e l'utilità clinica della diagnosi di sepsi. Fu così elaborato un nuovo schema di classificazione per la sepsi, denominato sistema PIRO (Predisposition, Insulte, Response, Organ dysfunction) che stratifica i pazienti in base alle loro condizioni predisponenti per sviluppare la malattia (P), alla natura ed estensione dell'insulto (I), alla natura e alla magnitudo della risposta dell'ospite (R), ed al grado di disfunzione d'organo concomitante(O) (29).

Dal momento che la sepsi manca di sintomi e segni clinici specifici (30-34) e che la coltura microbiologica, anche se rimane il gold standard, presenta altri inconvenienti come ad esempio gli elevati tempi che richiede (35), negli ultimi anni numerosi studi si sono incentrati sull'identificazione di biomarcatori utili nella diagnosi di sepsi, sepsi severa e shock settico (36-38).

Un biomarker è un analita che può essere misurato per valutare un processo biologico normale o patologico oppure la risposta ad un intervento terapeutico farmacologico; per essere clinicamente utile deve avere alta sensibilità e specificità, elevata accuratezza diagnostica ed elevati valori predittivi sia positivi che negativi (39).

Inizialmente, negli anni 1980 e 1990, per la diagnosi di sepsi, sono stati ampiamente utilizzati il tasso di sedimentazione degli eritrociti e la proteina C reattiva ma la successiva scoperta della loro mancanza di specificità ne ha notevolmente ridotto l'uso (40-42).

Attualmente sono stati identificati più di 100 potenziali marcatori per la diagnosi di sepsi, tra cui le proteine di fase acuta PCR e PCT e numerose citochine. Tuttavia, ad eccezione della Procalcitonina la cui affidabilità è stata evidenziata da numerose meta-analisi, la loro utilità effettiva non è stata ancora confermata (39,43).

ALCUNI POSSIBILI MARKERS DI SEPSI
Conta leucocitaria
Proteina C Reattiva (CRP)
Procalcitonina (PCT)
Citochine (IL-1; IL-2; IL-4; IL-6; IL-8; IL-10; TNF; IFN- γ ; PAF)
Antagonisti del recettore di IL-1; Recettore di IL-1
Fattori del complemento
Endotelina-1
ICAM-1; VCAM-1
Fosfolipasi A2
PGE 2

Lattoferrina
Neopterina
Elastasi
Nitrati/Nitriti

Tabella 1: Alcuni dei potenziali marcatori attualmente identificati per la diagnosi di sepsi.

I primi a descrivere la Procalcitonina come proteina associata alla sepsi sono stati, nel 1993, Assicot e collaboratori che notarono un aumento dei livelli di PCT ematica in un gruppo di soggetti affetti da meningite ed altre infezioni batteriche (44) sebbene una precedente pubblicazione risalente a 10 anni prima avesse richiamato l'attenzione su un aumento delle concentrazioni sieriche di questa proteina in pazienti con sindrome da shock tossico dovuto a stafilococco (45).

I livelli di procalcitonina raggiungono valori notevolmente elevati solo dopo che l'infezione batterica ha innescato una risposta infiammatoria e dopo che tale risposta ha raggiunto un certo grado di severità. Pertanto se la PCT risulta marcatamente aumentata bisogna supporre la presenza di una reazione infiammatoria sistemica derivante dall'infezione e questo coincide con la diagnosi di infezione grave o di sepsi; le infezioni batteriche locali semplici, al contrario, inducono spesso valori di PCT difficilmente misurabili.

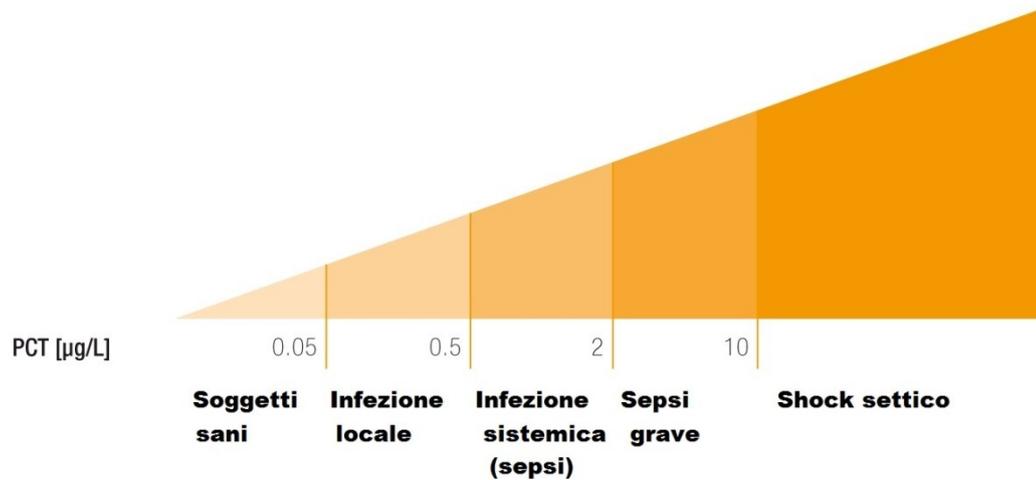


Figura 5: Correlazione tra concentrazione di Procalcitonina e gravità della malattia; l'aumento dei valori rilevati a livello sierico o plasmatico corrisponde ad una maggiore severità.

Sebbene numerose condizioni infiammatorie di origine non batterica siano in grado di indurre rilevanti aumenti, è stato evidenziato che generalmente la Procalcitonina è prodotta più marcatamente in conseguenza di infezioni batteriche piuttosto che di altre reazioni infiammatorie e questo può rendersi molto utile per poter formulare una diagnosi differenziale (4).

Tra i marcatori disponibili PCT ha dimostrato di essere il più utile anche grazie al suo favorevole profilo cinetico in quanto i suoi livelli plasmatici iniziano ad aumentare circa 2-3 ore dopo la stimolazione, raggiungono il plateau dopo 6-12 ore, rimangono elevati per circa 48 ore ed infine ritornano ai valori basali entro i

successivi due giorni. In confronto, i valori di proteina C reattiva (CRP) impiegano dalle 12 alle 24 ore per iniziare ad aumentare e rimangono elevati per un periodo che va da 3 a 7 giorni.

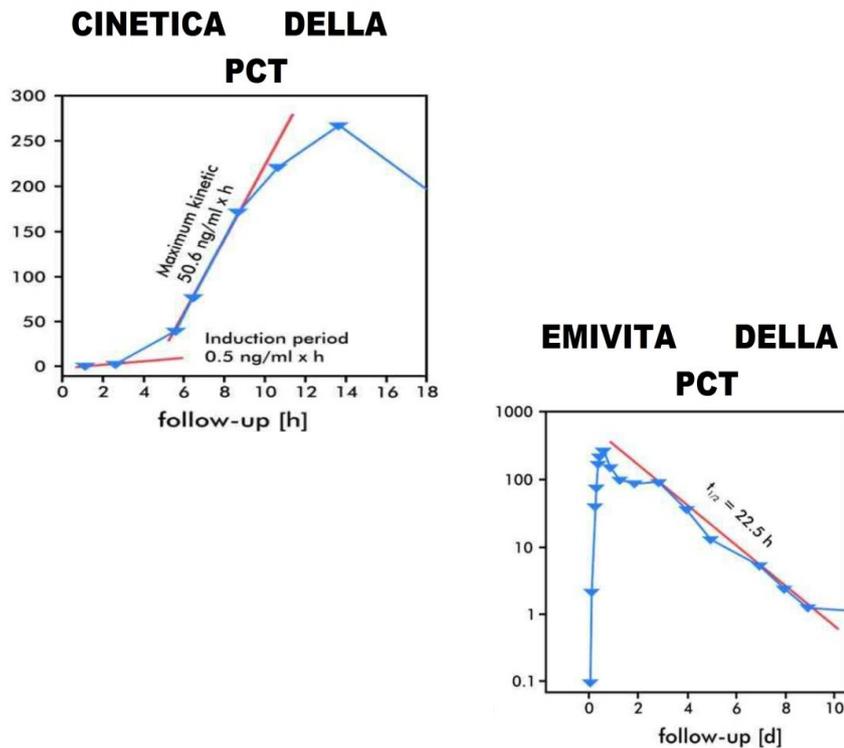


Figura 6: Cinetica ed emivita della Procalcitonina in seguito a stimolazione.

Dal momento che la concentrazione di PCT si normalizza prima di quella di CRP, PCT offre il vantaggio di una diagnosi più precoce e di un migliore monitoraggio della progressione della malattia (4,46-50). La CRP sebbene sia un ottimo marker di infiammazione è inoltre decisamente più aspecifica rispetto alla PCT in quanto raggiunge valori elevati sia in corso di infezione batterica che virale ed in aggiunta

non sembra essere correlata con l'entità della sepsi; la CRP si eleva infatti ai suoi massimi livelli anche nelle sepsi meno gravi, oppure rimane elevata per poco tempo rispetto alla prognosi del paziente (51-53).

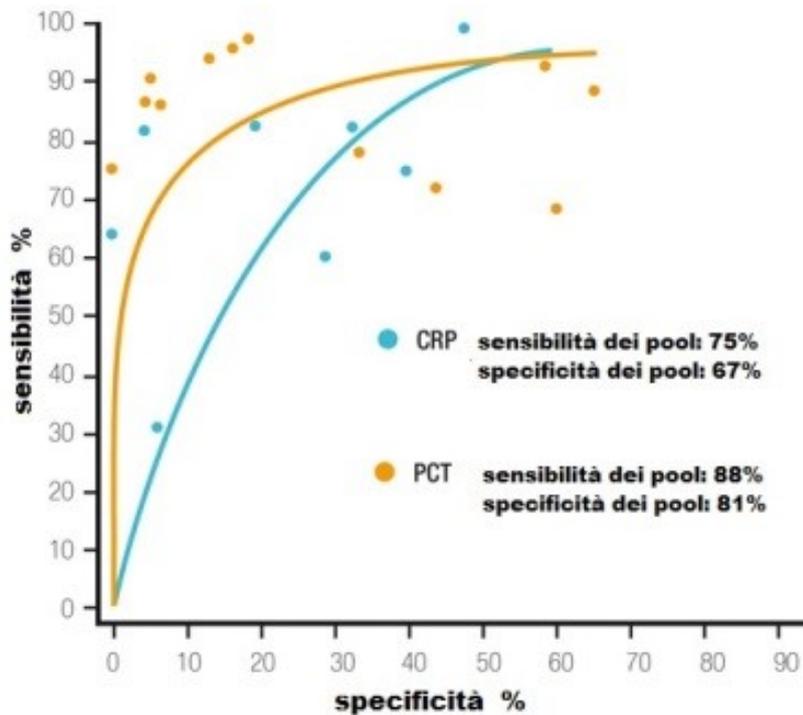


Figura 7: Confronto tra Proteina C reattiva e procalcitonina come marcatori per la diagnosi di sepsi. Il grafico evidenzia la maggiore sensibilità e la maggiore specificità della PCT.

Anche le principali citochine, nonostante la loro capacità di reagire velocemente agli stimoli immunitari sono risultate inadatte nella diagnostica clinica se

confrontate con la PCT in quanto possiedono un'emivita ed una stabilità relativamente basse che accorciano la finestra diagnostica e rendono difficile la validazione dei risultati normali. Inoltre a discapito delle citochine va la loro minore specificità per le infiammazioni di origine batterica: molte di esse infatti possono subire l'influenza di eventi che, sebbene poco significativi per prognosi ed evoluzione della malattia, possono provocarne l'aumento dei valori. Altro aspetto a sfavore delle citochine è il loro essere caratterizzate da una marcata down-regulation a cui invece la PCT si mostra quasi del tutto insensibile (54-58).

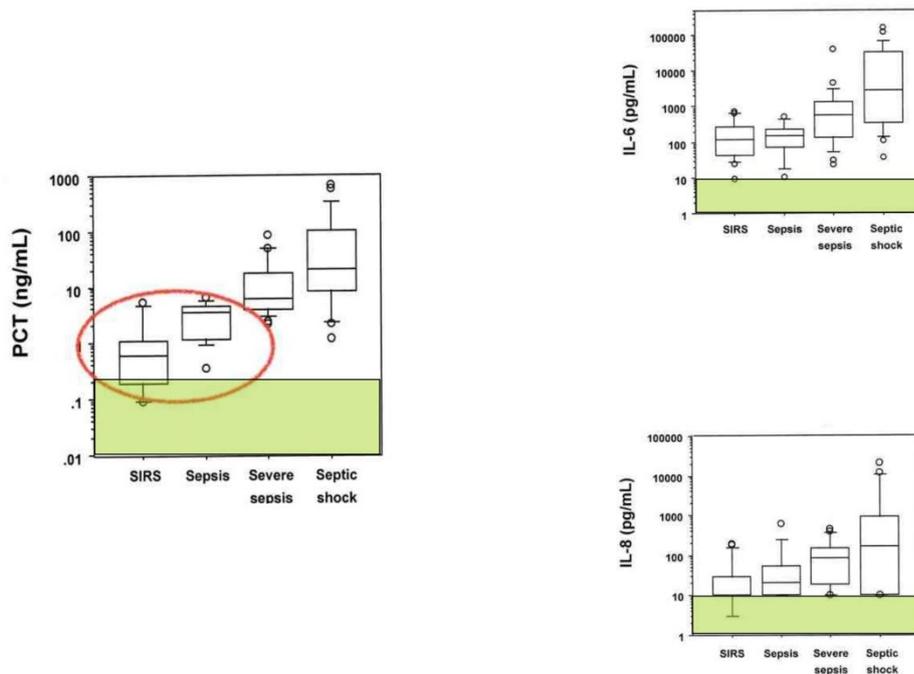


Figura 8: Confronto tra procalcitonina e principali citochine come marcatori per la diagnosi di sepsi. Dai grafici emerge la maggiore specificità della procalcitonina.

Confrontando PCT e neopterinina si nota che le concentrazioni di quest'ultima generalmente ricalcano l'andamento di quelle della PCT, anche se la neopterinina è meno specifica nei confronti delle malattie batteriche. Si nota inoltre che, parimenti alla PCT, la neopterinina è in grado di distinguere tra evoluzione favorevole e sfavorevole in pazienti con sepsi e di permettere la diagnosi differenziale tra SIRS, sepsi severa e shock settico (59).

Ulteriori indicatori dell'attività infiammatoria esaminati sono stati: la conta dei leucociti, la conta differenziale del sangue, la velocità di eritrosedimentazione degli eritrociti e l'aumento della temperatura corporea. Nonostante siano risultati altamente sensibili hanno dimostrato, al contempo, scarsa specificità e impossibilità di riflettere miglioramenti o peggioramenti delle condizioni dei pazienti con sepsi severa o shock settico (60).

Pazienti adulti spesso si presentano con sintomi che possono far pensare ad una Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica; differenziare condizioni infiammatorie senza un'infezione sottostante da pazienti settici può essere molto difficoltoso. In confronto con altri biomarcatori che aumentano durante sepsi come CRP, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , la Procalcitonina ha mostrato maggiore sensibilità (85%) e maggiore specificità (91%) nella diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi (61). Inoltre anche un lavoro di Gram et al., effettuato su 63 pazienti con infezione accompagnata ad infiammazione sistemica, ha confermato la superiorità di questo biomarcatore mostrando che solamente PCT, neopterinina e score APACHE sono significativi nella diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi, al contrario di parametri come CRP, IL-6, IL-8, IL-10, conta dei leucociti ed elastasi

che hanno dimostrato un'accuratezza nettamente inferiore. Vari studi e meta-analisi, tuttavia, evidenziano che l'uso della PCT non sempre permette una distinzione netta tra SIRS e sepsi (62).

Nei numerosi studi effettuati, sono stati riscontrati sia la correlazione tra concentrazione di PCT plasmatica e gravità della malattia sia il suo ritorno ai valori basali in seguito ad un intervento terapeutico di successo (61).

I primi dati sulla correlazione tra PCT e severità della sepsi risalgono al 1994 grazie ad un lavoro di Zeni et al.: in questo studio furono inclusi 145 pazienti ricoverati d'urgenza per sospetta infezione e si vide che i livelli più elevati di Procalcitonina venivano riscontrati nei pazienti in cui la sepsi era più grave. Di conseguenza, assume molta importanza anche il valore predittivo positivo della procalcitonina: concentrazioni sempre più elevate indicano un rischio sempre maggiore della presenza di sepsi severa e di shock settico (63).

La PCT possiede, inoltre, un elevato valore predittivo negativo: da uno studio di Kim et al. è infatti emerso che una concentrazione ematica di PCT di 0,4 ng/ml è in grado di escludere la batteriemia nei pazienti con febbre alta con una precisione maggiore al 95% (64).

Diversi studi dimostrano, infine, l'importanza della Procalcitonina nel dare indicazioni riguardo alla necessità e alla durata del trattamento antibiotico. Questo aspetto verrà ripreso successivamente, ci limitiamo al momento ad introdurre l'argomento affermando che una corretta interpretazione dei valori di PCT oltre ad individuare quali soggetti necessitano di essere trattati con antibiotici, permette di

adattare in modo ottimale inizio, cambiamento o termine della terapia ai bisogni individuali del paziente in esame.

E' pertanto possibile riassumere come segue le principali funzioni espletate dalla misurazione dei livelli di PCT:

- diagnosi dell'infezione batterica e della sepsi;
- valutazione della severità della sepsi;
- valutazione del decorso della sepsi;
- indicazione e follow-up della terapia antibiotica (4).

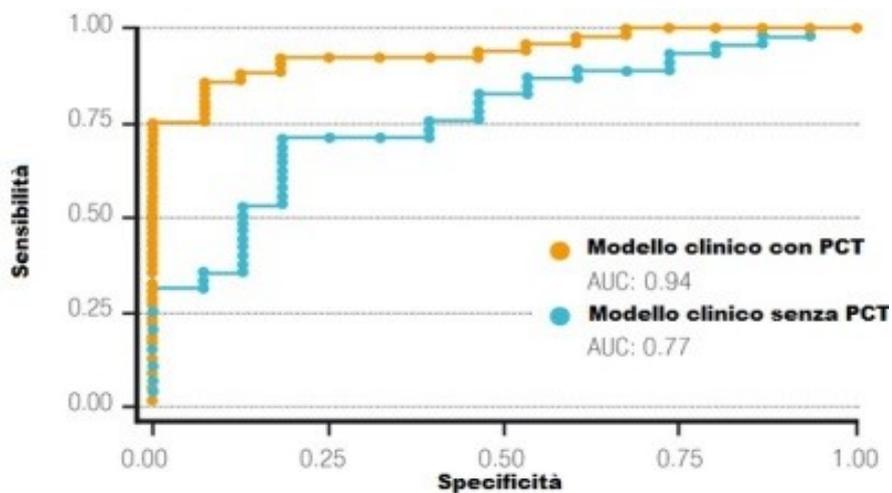


Figura 9: Confronto tra un modello clinico basato sull'utilizzo della PCT ed uno in cui la PCT non è stata utilizzata.

Nei soggetti sani le concentrazioni plasmatiche di PCT risultano quasi al di sotto della soglia di rilevamento analitico attestandosi su valori inferiori a 0,05 ng/ml. Nei pazienti più anziani si rilevano in meno del 10% dei casi livelli lievemente più elevati (anche oltre 0,1 ng/ml, ma di solito sempre inferiori a 0,3 ng/ml).

Concentrazioni superiori a 0,5 ng/ml vengono generalmente interpretate come suggestive di una sindrome settica però è opportuno fare una distinzione tra valori compresi nell'intervallo tra 0,5 e 2 ng/ml e valori superiori ai 2 ng/ml. Mentre i primi rappresentano una "zona grigia" di incertezza per quanto riguarda la diagnosi di sepsi, i secondi sono indicativi di elevata probabilità di sepsi batterica a meno che non siano presenti altre condizioni patologiche, come ad esempio chirurgia maggiore e shock cardiogeno che ne giustificano il marcato aumento. Concentrazioni plasmatiche superiori a 10 ng/ml sono generalmente dirimenti verso la diagnosi di sepsi grave o di shock settico in quanto tali valori si riscontrano quasi esclusivamente in queste condizioni.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

PCT < 0,05 ng/ml (normal values)	
Healthy individuals (age \geq 4 days of life); for neonates aged 0-72 hrs, special reference ranges are used	Normal range for PCT (95% CI). No systemic inflammatory reaction
PCT < 0,05 ng/ml	
Measurable but low PCT response	Low or no significant systemic inflammatory reaction. Local inflammation and local infection are possible
PCT 0,5 to 2,0 ng/ml	
Significant by moderate systemic inflammatory reaction. Infection is possible but there are various conditions also known to induce PCT (severe trauma, major surgery, cardiogenic shock)	Sepsis should be assumed and sepsis-specific treatment should be initiated, as long as there is no exclusion of diagnosis of sepsis or infection. If infection found: positive diagnosis of sepsis. Further PCT measurements recommended (6-24 hrs)
PCT \geq 2-10 ng/ml	
Severe systemic inflammatory reaction, most likely due to infection (sepsis) provided no other causes known	Diagnosis of sepsis, severe sepsis or septic shock most likely. High risk of the development of organ dysfunction. If persistently high levels (>4 days): reconsider treatment of sepsis. Possibly unfavorable prognosis. Daily measuring of PCT recommended
PCT \geq 10 ng/mL	
Marked systemic inflammatory reaction, almost exclusively as a result of severe bacterial sepsis or septic shock	Frequently associated with organ dysfunction. High risk of fatal outcome. Daily measurement of PCT level to monitor treatment success

Tabella 2: Linee guida generali per l'interpretazione dei valori della PCT.

Risulta, però, fondamentale interpretare i valori in funzione del contesto clinico del paziente in questione, in quanto un aumento di PCT può avere luogo anche indipendentemente da processi infettivi batterici, come ad esempio avviene conseguentemente a traumi multipli, ustioni estese oppure interventi di chirurgia maggiore.

Condizioni che determinano incremento della concentrazione della PCT indipendentemente da processi infettivi batterici e rispettivi valori	
Dopo chirurgia maggiore	fino a 7 ng/ml
Politrauma	circa 5 ng/ml
Shock cardiogeno	fino a 10 ng/ml
Neonati nei primi due giorni di vita	fino a 20 ng/ml
Farmaci (OKT3)	fino a 50 ng/ml
Ustioni	intorno a 2 ng/ml
Circolazione extracorporea	2-100 ng/ml
Alcuni tumori	fino a 50 ng/ml
Cirrosi epatica	fino a 4 ng/ml
Emodialisi	circa 1 ng/ml
Sindrome di Goodpasture	circa 34 ng/ml
Alzheimer e Demenza	fino a 0,6 ng/ml

Tabella 3: Alcuni esempi di condizioni che determinano incremento della concentrazione di procalcitonina indipendentemente da processi infettivi batterici e rispettivi valori.

Al contrario, condizioni come infezioni virali, infezioni localizzate, disordini allergici, malattie autoimmuni e reazioni di rigetto dei trapianti non inducono,

solitamente, una risposta significativa della PCT ed i valori riscontrati sono $< 0,5$ ng/ml.

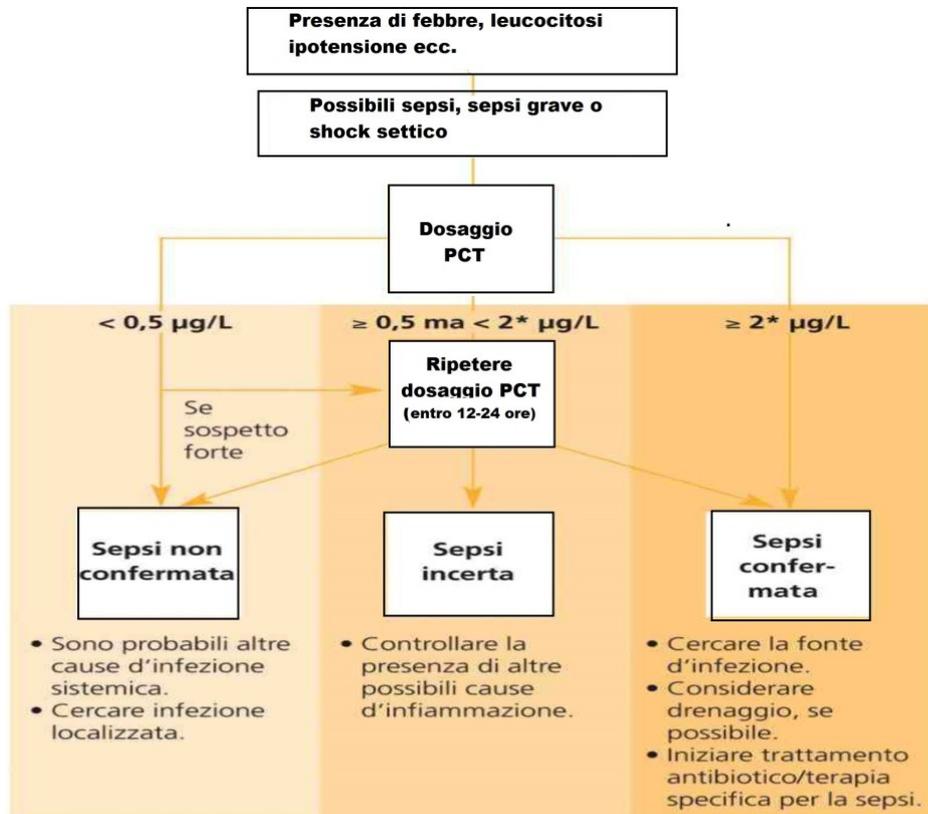


Figura 10: Algoritmo che illustra il percorso per giungere alla diagnosi di sepsi utilizzando i valori di PCT.

Diverso è il discorso nei primi due giorni di vita; in questo periodo infatti, come reazione dei neonati alla nascita, si verifica un'attivazione non specifica del sistema immunitario a cui fa seguito una fisiologica induzione di diversi indicatori

e mediatori dell'inflammazione, compresa la PCT. Valori elevati oltre gli intervalli di riferimento sono fortemente suggestivi di infezione batterica precoce per cui è necessario intraprendere subito un trattamento antibiotico.

Dal terzo giorno di vita in poi i valori di riferimento per i neonati sono del tutto sovrapponibili a quelli degli adulti (4,65).

Età espressa in ore	PCT ng/ml
0-6	2
6-12	8
12-18	15
18-30	21
30-36	15
36-42	8
42-48	2

Tabella 4: Intervalli di riferimento da utilizzare per i neonati nei primi due giorni di vita.

1.2.1 - UTILIZZO DELLA PROCALCITONINA PER IL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA.

La durata del trattamento antibiotico in pazienti infetti, nei pazienti critici e nei settici è stata negli anni una questione molto controversa: mentre regimi terapeutici a lungo decorso aumentano il rischio di superinfezioni e di farmacoresistenza da parte degli agenti patogeni, regimi di durata troppo breve aumentano il rischio di recidiva dell'infezione (66).

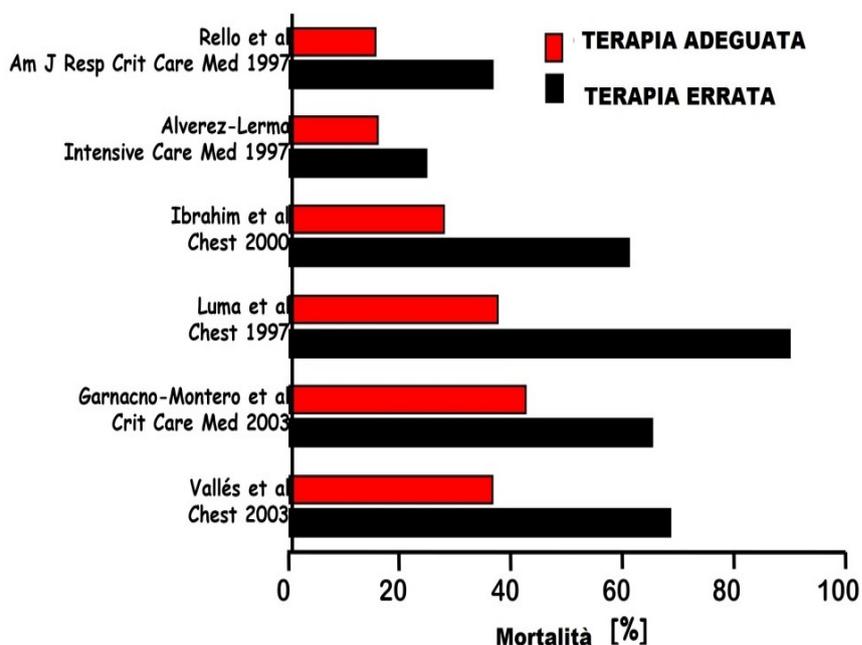


Figura 11: Confronto tra mortalità percentuale in seguito a terapia errata e mortalità percentuale in seguito a terapia adeguata nei diversi studi effettuati . Si nota come la terapia adeguata abbia notevolmente diminuito la mortalità.

Per ovviare questa problematica è risultato molto utile misurare i biomarcatori sierici, come la procalcitonina, che vengono rilasciati in risposta a tossine batteriche ed a mediatori proinfiammatori allo scopo di giungere ad un'antibioticoterapia mirata in funzione di questi valori (67).

Tale approccio offre notevoli vantaggi:

- massima efficacia del trattamento;
- riduzione della farmacoresistenza;
- diagnosi rapida e corretta con conseguente utilizzo degli antibiotici solo quando necessari;
- possibilità di scalare gli antibiotici;
- terapia di durata adeguata (68).

Diverse meta-analisi hanno evidenziato che la PCT, in concomitanza di dati clinici, migliora le indicazioni al trattamento antibiotico, ne ottimizza la durata ed individua i soggetti che ne necessitano; inoltre i dati a disposizione mostrano chiaramente che interpretando i valori di procalcitonina in funzione del contesto clinico è possibile adattare inizio, termine ed eventuale cambiamento della terapia antibiotica in base ai bisogni individuali del paziente in esame.

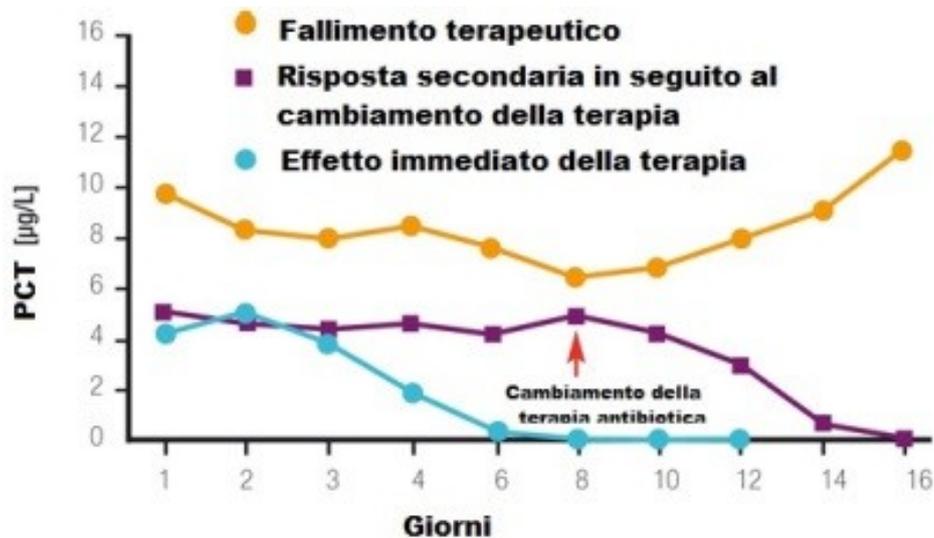


Figura 12: Dinamica della PCT in funzione della risposta alla terapia antibiotica.

Alti valori di PCT riflettono un'alta probabilità di diagnosi di sepsi e pertanto la necessità di un precoce trattamento antibiotico; bassi livelli, al contrario, indicano che la presenza di sepsi o di infezione batterica grave è altamente improbabile e che quindi tale trattamento può essere evitato o, in alcune circostanze, interrotto.

Un rapido decremento dei valori di Procalcitonina è sinonimo di successo terapeutico e di buona prognosi, a maggior ragione se i livelli più bassi persistono per diversi giorni e tendono a normalizzarsi (regola empirica: una diminuzione di più del 30% al giorno per almeno 3 giorni). Al contrario, una diminuzione inconsistente che non volge verso i range di normalità dopo diversi giorni dall'inizio della terapia, o addirittura un aumento della PCT possono indicare in maniera verosimile un trattamento inefficace oppure una prognosi sfavorevole.

Numerosi studi mostrano che un trattamento basato su un algoritmo guidato da PCT riduce la durata dello stesso di almeno due giorni in media e questo si verifica anche nei casi più gravi; analizzando i dati disponibili si può infatti giungere alla conclusione che la durata media del trattamento sia pari a 5-7 giorni (4).

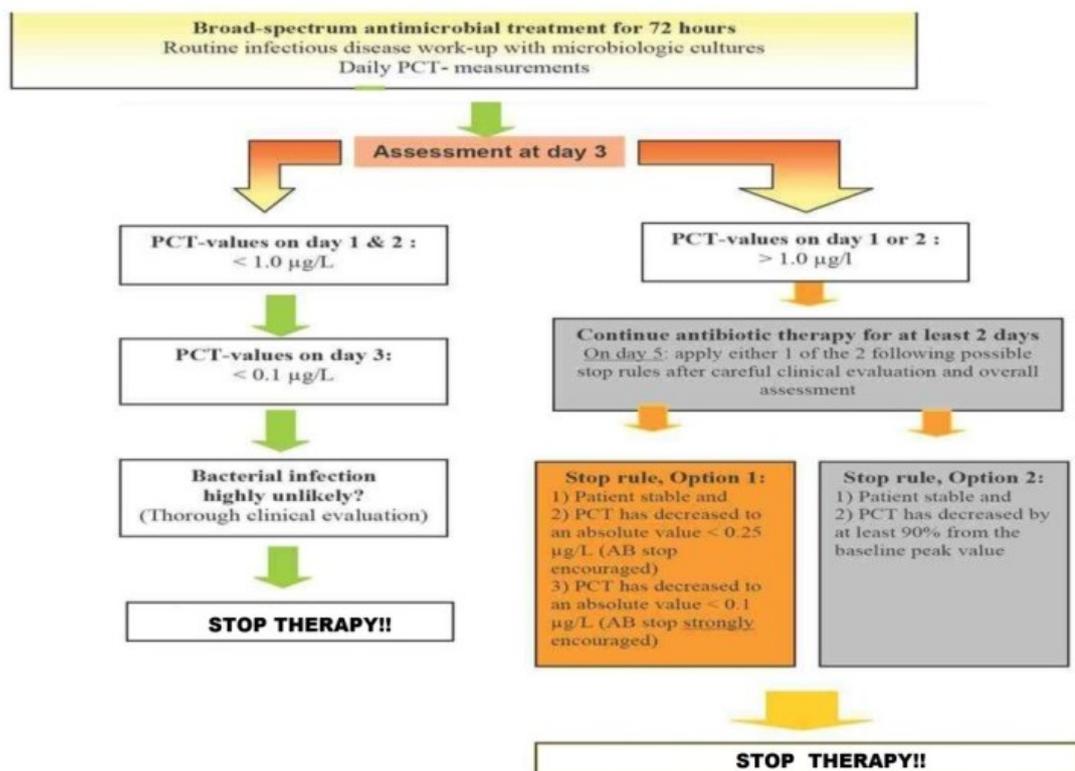


Figura 13: Trattamento basato su un algoritmo guidato dalla PCT

Tale algoritmo, oltre a ridurre la durata della terapia antibiotica senza aumentare gli effetti avversi, riduce la degenza in ICU e la degenza in ospedale (68).

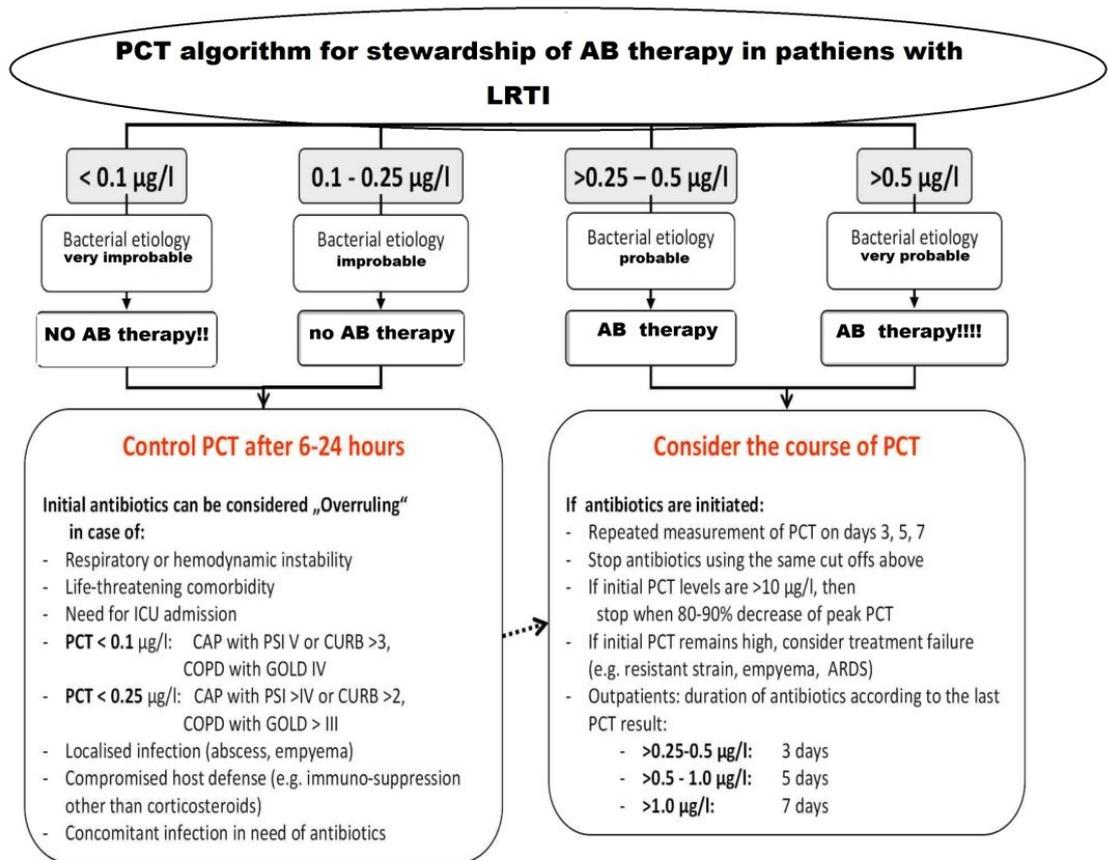


Figura 14: Algoritmo di trattamento basato sui valori di PCT in pazienti con LRTI.

CAPITOLO 2: GENERALITA' SULLE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE (IVU)

2.1 - DEFINIZIONI E CLASSIFICAZIONI

Attualmente, a livello mondiale, la terminologia “infezioni delle vie urinarie” (IVU) non è ancora interpretata in modo del tutto univoco; ciò si verifica soprattutto nella letteratura anglosassone dove questa dizione viene indifferentemente usata sia per indicare la sola presenza di microorganismi nell'apparato urinario che la vera e propria malattia da infezione.

Per ovviare questo problema semantico intendiamo con “batteruria” la semplice presenza di germi nell'apparato urinario, mentre con “infezione” facciamo riferimento ad una batteruria accompagnata da sintomi e segni di malattia infettiva e dalla presenza di leucocituria. La parola “contaminazione” sottende, invece, la presenza di microorganismi nelle urine solo successivamente alla loro emissione, ovvero urine inizialmente sterili che vengono contaminate dall'ambiente esterno.

Nosograficamente questo tipo di infezioni possono essere classificate in rapporto alla sede, alla sintomatologia ed al decorso clinico.

Da un punto di vista topografico possiamo, invece, suddividere le IVU in “alte” (pielonefriti) e “basse” (cistiti, uretriti, prostatiti); una simile classificazione può però manifestare delle incongruenze con la realtà clinica in quanto la sola sintomatologia non costituisce un criterio affidabile per la determinazione della sede d’infezione.

In accordo a quanto proposto dalla European Association of Urology, le IVU vengono inoltre distinte in “complicate” e “non complicate”; mentre le prime sono accompagnate da fattori di rischio, come età avanzata, diabete ed alterazioni anatomico-funzionali, che tendono ad aggravarne il decorso o predispongono alla loro ricorrenza o persistenza, le seconde insorgono in soggetti senza alcuna anomalia anatomica o funzionale a carico dell’apparato in questione.

Il decorso clinico individua, infine, altre due categorie di IVU: “acute” e “croniche”; mentre quelle acute sono caratterizzate da un singolo episodio spesso sintomatico, ma con prognosi sempre favorevole, le infezioni croniche sono determinate da almeno 4 episodi in un anno intervallati da periodi liberi di durata variabile. Tale ricorrenza può essere determinata da una recidiva oppure da una reinfezione.

Le recidive sono infezioni ricorrenti causate dallo stesso germe dell’infezione precedente e sono, solitamente, provocate da una persistenza del microorganismo in questione nel tratto urinario; le reinfezioni sono, invece, dovute o ad un agente patogeno diverso da quello implicato nella precedente infezione oppure allo stesso germe ma di diverso sierotipo (69,70).

2.2 – EPIDEMIOLOGIA E CONDIZIONI PREDISPONENTI

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) si collocano al secondo posto tra le patologie infettive più frequentemente riscontrate in ambito comunitario, precedute solamente dalle infezioni respiratorie. Si stima che negli Stati Uniti, le IVU acquisite in comunità siano responsabili di circa 7 milioni di visite annue, solitamente attribuibili ad infezioni non complicate delle basse vie urinarie (cistiti) (71); i dati a disposizione riportano, inoltre, che circa il 15% degli antibiotici prescritti dai “family doctors” sia riservata proprio al trattamento in ambito comunitario delle IVU non complicate (72). Un ruolo epidemiologico di primo piano lo rivestono anche le infezioni urinarie comunitarie gravi con un numero di ricoveri ospedalieri che si attesta in media intorno ai 100.000 per anno (73).

Le IVU contratte in ambito ospedaliero sono, invece, le patologie infettive più frequentemente osservate rispetto a tutte le altre infezioni nosocomiali presentando un’incidenza del 40% (74). In circa il 25 % dei soggetti ricoverati e cateterizzati per un periodo che supera i 7 giorni si sviluppa una batteriuria e questo comporta un aumento medio del costo dell’ospedalizzazione pari a 5.000-10.000 dollari (75).

Da ricerche epidemiologiche è emerso che la prevalenza delle infezioni delle vie urinarie varia in funzione dell’età, del genere, delle condizioni socioeconomiche e dello stile di vita oltre che in base a fattori predisponenti quali gravidanze, cateterismo uretrale e patologie concomitanti (70,75).

Nell'infanzia (0-12 anni) queste infezioni sono riscontrate nel 2,8% nelle bambine e nello 0,7% dei bambini; tuttavia, nei primi tre mesi di vita sono prevalentemente colpiti i maschi con rapporto 3:1 rispetto alle femmine. Superata l'età infantile, fino ai 55 anni, le IVU si verificano prevalentemente nelle donne. Nelle donne adulte incidenza e prevalenza di batteruria sono correlate all'età ed al grado di attività sessuale. Circa l'1-3 % dei soggetti di sesso femminile tra i 15 ed i 24 anni è infatti affetto da batteruria e la percentuale aumenta dell'1-2% per ogni decade fino ad arrivare al 10-12% intorno ai 70 anni; l'incidenza di queste infezioni presenta, inoltre, tre picchi, due dei quali si rilevano tra i 20 ed i 35 anni, a causa di una vita sessuale più attiva (un tipico esempio è rappresentato dalla "cistite da luna di miele") e della gravidanza; il terzo, che si verifica nei primi 10 anni di vita, è invece legato, nella maggior parte dei casi, al reflusso vescico-ureterale. Le IVU sono rare nell'uomo, eccezion fatta per il periodo neonatale e per gli ultracinquantenni. All'età di 70 anni la presenza di batteruria si attesta intorno al 3,5 % nei maschi apparentemente sani e non ospedalizzati ed al 15% negli ospedalizzati. In concomitanza di patologie croniche debilitanti l'incidenza della batteruria raggiunge il 25-50% in entrambi i sessi (76,77).

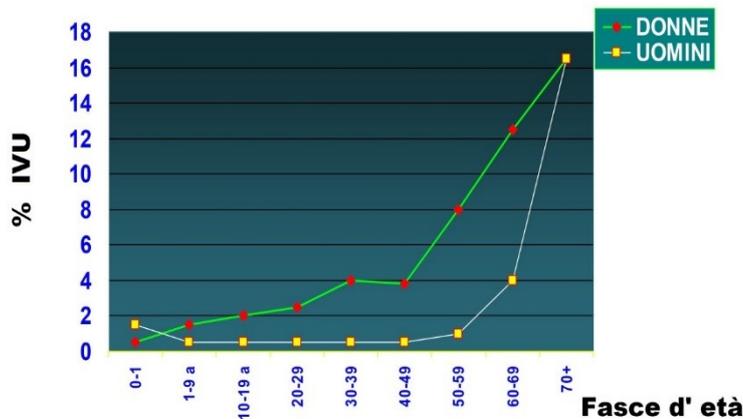


Figura 15: Percentuale d'infezioni delle vie urinarie nelle diverse fasce d'età.

La maggiore incidenza di IVU nel sesso femminile è dovuta alle caratteristiche anatomiche dell'apparato urogenitale della donna: brevità dell'uretra; posizione del meato uretrale esterno situato infatti nella vulva, al davanti della vagina e ricoperto dalle piccole labbra; minore forza di contrazione dello sfintere uretrale interno; e vicinanza dell'orifizio urogenitale con quello anale (che rappresenta un vero e proprio serbatoio naturale di germi) sono tutti fattori che facilitano l'ingresso dei batteri in vescica. L'uomo invece possiede tre importanti fattori protettivi: il secreto prostatico dotato di notevoli proprietà antibatteriche, la maggiore forza di contrazione dello sfintere uretrale interno e la maggiore lunghezza dell'uretra. La correlazione tra aumento dell'età ed incremento delle IVU nel maschio è dovuta al prostatismo tipico dei soggetti oltre i 50 anni, mentre nella femmina trova la sua spiegazione nella carenza ormonale che si verifica

dopo la menopausa e che comporta alterazioni distrofiche vulvovaginali e diminuzione dei fattori di difesa locali (77).

Oltre a donne, anziani e bambini, le categorie maggiormente a rischio sono rappresentate da:

1. Donne in gravidanza; durante la gravidanza, infatti, la presenza di IVU si attesta intorno al 10% con un rischio maggiore tra la nona e la diciassettesima settimana di gestazione (78). Questo costituisce un problema di notevole entità in quanto dagli studi effettuati è stato evidenziato che le infezioni del tratto urinario contratte durante il periodo gestazionale hanno potenziali ripercussioni sul feto provocando un aumento del rischio di ritardo mentale, di paralisi infantili e addirittura di morte fetale (71). Tre sono i motivi che spiegano la maggiore predisposizione della gestante a contrarre IVU: la diminuita attività peristaltica dell'uretere distale a causa dell'ipotonia muscolare indotta dall'aumentata produzione di progesterone; la comparsa di un reflusso vescico-ureterale dovuto alla compressione uterina; la diminuzione del potere antibatterico della preurina in seguito all'aumento delle proteine, degli aminoacidi e dei glucidi nel contenuto del filtrato glomerulare. Il 4-10% delle donne gravide presenta, inoltre, batteruria asintomatica (77);
2. Diabetici; le alterazioni metaboliche che nel diabetico comportano glicosuria e un difetto della funzione fagocitica leucocitaria sono responsabili anche della maggiore insorgenza di IVU che si verifica in questa categoria di pazienti (77). Altro importante aspetto emerso dagli

studi effettuati è la maggiore incidenza di batteruria asintomatica nella popolazione diabetica; in questi soggetti si riscontra infatti un'incidenza di 2-4 volte maggiore rispetto alla popolazione sana (79);

3. Soggetti predisposti a trapianto renale, i quali presentano un'incidenza di IVU che va dal 35% al 79%. Si stima inoltre che circa il 60% di queste infezioni origini nel rene trapiantato. Altro dato interessante è, in aggiunta, che l'insorgenza delle IVU viene favorita anche dalla terapia antirigetto (77);
4. Soggetti con disordini anatomici, con disordini neurologici, oppure con ostruzioni meccaniche acquisite. Queste alterazioni facilitano le IVU per via della stasi urinaria e della diminuzione del potere battericida mucosale (77);
5. Soggetti sottoposti a terapie soppressive e radianti in quanto queste comportano una forte depressione dell'attività immunologica (77);
6. Pazienti ospedalizzati e soprattutto pazienti cateterizzati; in questi ultimi la prevalenza di infezioni urinarie varia in funzione della durata della cateterizzazione stessa (80): si passa da un iniziale 10%-20% ad una prevalenza virtuale del 100% per cateterizzazione a lungo termine. Analizzando i dati a disposizione si stima che ogni anno negli Stati Uniti circa 600.000 pazienti contraggono una IVU associata a catetere e questo comporta sia un prolungamento dei giorni di degenza che un aumento del tasso di mortalità del 1,7% (81) ;

7. Soggetti affetti da varie forme di nefropatie (vascolare, tubulare, glomerulare, da farmaci); queste nefropatie determinano una maggiore insorgenza di pielonefrite in quanto provocano alterazioni parenchimali che rendono più facile la colonizzazione da parte dei batteri (77);
8. Pazienti dializzati; tra questi il rischio di complicanze più gravi è maggiore negli anurici e in coloro che presentano policistosi renale (77).

2.3 - MICROORGANISMI COINVOLTI NELLE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE E LORO MECCANISMI PATOGENETICI

Escherichia coli rappresenta l'uropatogeno più frequentemente implicato nelle infezioni delle vie urinarie, con percentuali che oscillano tra il 75 ed il 90% in funzione dei diversi studi e delle diverse realtà geografiche. Seguono poi altri microorganismi quali Staphylococcus saprophyticus, Klebsiella spp, Proteus spp, Enterobacter spp, Staphylococcus spp, ed Enterococcus. In ambito ospedaliero, oppure nelle infezioni complicate, l'incidenza di infezioni sostenute da Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas, Enterococcus faecalis e da alcune popolazioni fungine subisce un marcato aumento, ridimensionando il ruolo patogeno di E.coli (82).

Negli anziani con IVU, nonostante E.coli continui ad essere il germe di più comune isolamento, altre specie batteriche sono isolate con percentuali maggiori rispetto ad altri gruppi di soggetti. Ad esempio, sono spesso riscontrati altri Enterobatteri, tra cui *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp, *Serratia* spp, *Providencia* spp, e *Morganella morganii*. Stafilococchi coagulasi negativi, Streptococchi di gruppo B, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* ed, occasionalmente *Candida* spp, sono implicati anche essi nella patogenesi di IVU nel soggetto anziano (83).

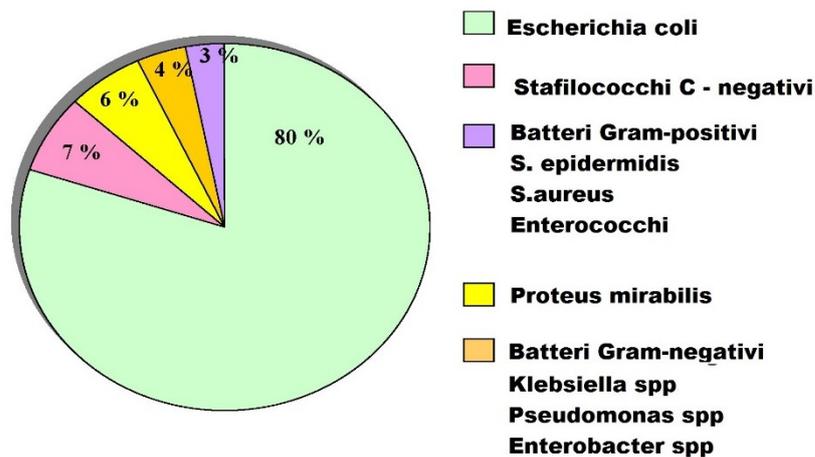


Figura 16: Principali microorganismi implicati nella patogenesi delle IVU riscontrate in ambito comunitario e loro relative percentuali di frequenza.

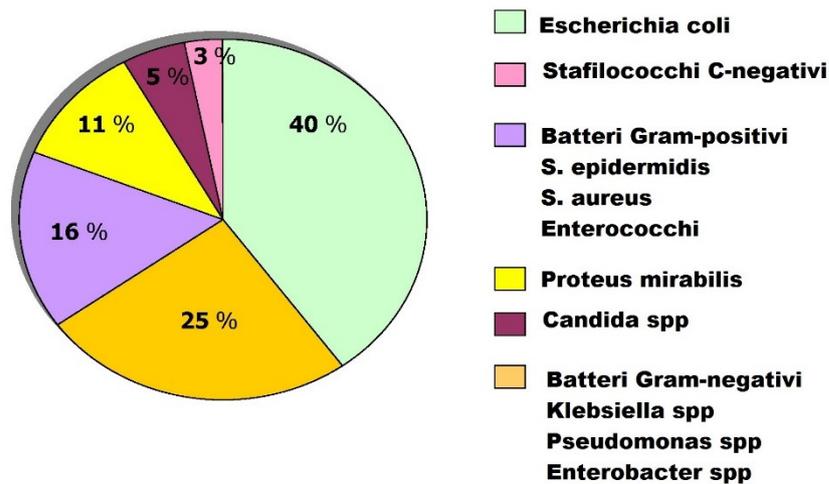


Figura 17: Principali microorganismi implicati nella patogenesi delle IVU riscontrate in ambito ospedaliero e loro relative percentuali di frequenza.

La maggioranza dei ceppi isolati in caso di infezione del tratto urinario deriva dalla flora intestinale dell'organismo ospite, ma pazienti portatori di cateteri intermittenti o a permanenza possono essere soggetti a colonizzazione batterica per trasmissione tramite le mani degli operatori sanitari oppure attraverso la contaminazione delle superfici ambientali (84).

I batteri possono giungere alle vie urinarie utilizzando diverse vie: ascendente, discendente, linfatica, ematogena ed, infine, tramite propagazione per contiguità.

La via ascendente è senza alcun dubbio la più importante in quanto i batteri provenendo direttamente dall'esterno oppure dall'area genitale femminile riescono ad arrivare in vescica risalendo lungo l'uretra. Nell'uomo grazie alla maggiore lunghezza dell'uretra maschile ed alla mancanza di uno stretto rapporto

di contiguità con aree potenzialmente settiche la colonizzazione vescicale per via ascendente si manifesta molto più raramente e quando si verifica è dovuta quasi esclusivamente a manovre strumentali come cateterismo, cistoscopia ecc. Nella donna invece questo tipo di infezione è frequente e talora si presenti una patologia infettiva a livello dell'area genitale (come vaginite, bartolinite, cervicite ecc.) la contaminazione sarà ancora più probabile e marcata.

La via discendente al contrario prevede che i germi provengano dal rene e si portino in vescica scendendo lungo il lume ureterale. Si tratta, però, di un'evenienza estremamente rara eccezion fatta per la forma tubercolare.

Le normali connessioni linfatiche intercorrenti tra intestino ed apparato urinario spiegano il motivo per cui si possono verificare IVU secondarie ad una patologia dell'apparato digerente soprattutto se quest'ultima è accompagnata da una coprostasi che favorisce l'abnorme replicazione dei germi intestinali ed il loro successivo passaggio nell'apparato urinario. Nella donna questo passaggio è dovuto anche alla situazione anatomica che facilita la diretta colonizzazione dei genitali femminili da parte dei batteri intestinali con loro conseguente risalita in vescica mediante l'uretra, soprattutto durante i rapporti sessuali. Nell'uomo l'infezione tramite la via linfatica può verificarsi anche in caso di cistiti secondarie a processi settici prostatici od epididimari. La rete linfatica sottomucosa si rivela, inoltre, la principale via di propagazione dei microorganismi alla vescica in tutti quei casi in cui manovre strumentali provochino lesioni a livello della mucosa permettendo così un accidentale inoculo di agenti patogeni nella sottomucosa.

Staphylococcus aureus rappresenta il microorganismo maggiormente implicato nella pielonefrite acuta da metastatizzazione ematogena. Ciò si verifica soprattutto in corso di una significativa batteriemia per lo più se in concomitanza di fattori predisponenti quali patologie ostruttive delle vie escrettrici e nefropatie sia vascolari che tubulo-interstiziali. Altra frequente evenienza di diffusione ematogena si ha in caso di infezione tubercolare.

Gli agenti infettanti possono inoltre portarsi in vescica in seguito a processi suppurativi che interessano i genitali femminili; inoltre ascessi perivescicali o appendicolari, pericistiti da diverticolite sigmoidea, tumori intestinali, proctiti e coliti possono creare tramiti fistolosi con la vescica ai quali consegue in maniera inevitabile una cistite. Si parla in questi casi di infezioni per contiguità tra le quali annoveriamo anche le pielonefriti acute e croniche originate da patogeni localizzati a livello di organi vicini e le pielonefriti e gli ascessi renali e pararenali formati in seguito a fistolizzazione dovuta a morbo di Chron o a diverticolite.

L'entrata dei batteri nell'apparato urinario non implica necessariamente una futura infezione; questa infatti dipenderà dalla virulenza dell'agente patogeno, dal numero di microorganismi, da quanto sono efficaci i meccanismi di difesa dell'ospite e dall'eventuale presenza di fattori favorenti l'infezione.

Il 95% delle IVU avviene per via ascendente, segue un 3-4% che è causato da una diffusione per via ematogena mentre via discendente, via linfatica e per contiguità si dimostrano raramente coinvolte nella patogenesi.

I microorganismi che più frequentemente comportano una IVU per via ascendente sono *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* ed *Enterococcus faecalis*, mentre *Staphylococcus aureus*, *Salmonelle*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* generalmente si propagano per via ematogena.

Batteri e micoplasmi possiedono una notevole capacità di aderire alle membrane cellulari dell'epitelio vaginale ed uroteliali. Questo fenomeno si manifesta soprattutto nelle Enterobatteriacee dotate di un particolare apparato adesivo chiamato fimbria o pilo ed è proprio la differente capacità di aderire alle cellule bersaglio che rende un ceppo più o meno patogeno.

La presenza di fimbrie non è assolutamente "condicio sine qua non" affinché si verifichi una IVU in quanto vi sono germi capaci di aderire all'urotelio e di generare un'infezione senza possedere fimbrie, bensì adesine glicoproteiche non fimbriali, meccanismi aspecifici costituiti da legami di tipo idrofobico e produzione di proteasi anti-IgA. I legami che si instaurano tra cellule dell'ospite e cellule batteriche costituiscono il primo step del processo di colonizzazione e permettono al batterio di rimanere adeso nonostante il lavaggio meccanico prodotto dal flusso urinario; seguono poi la penetrazione all'interno della mucosa, l'inizio del processo infiammatorio e la comparsa della sintomatologia.

Altri fattori batterici molto importanti nel determinare l'insorgenza di IVU risultano, in aggiunta, il grado di virulenza batterica e la produzione di emolisina.

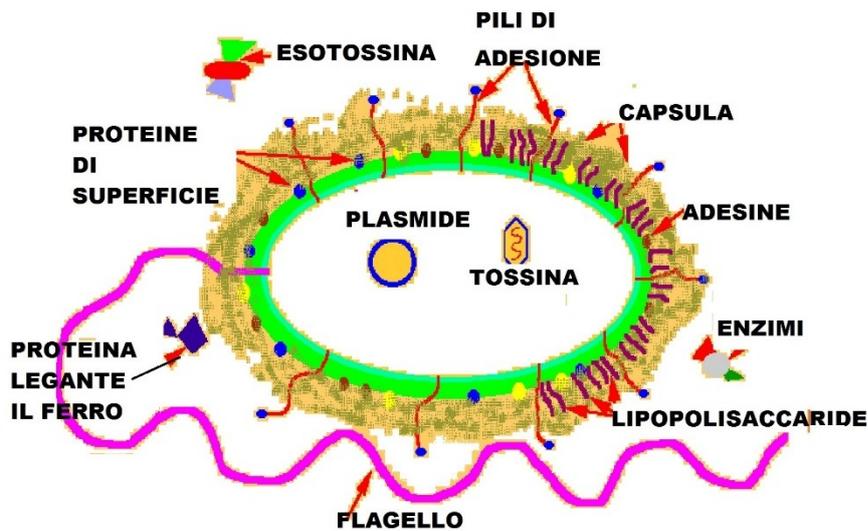


Figura 18: Fattori batterici implicati nella patogenesi delle IVU.

Anche le caratteristiche chimico-fisiche dell'urina sono capaci di favorire od inibire aderenza e proliferazione batterica; alte concentrazioni di creatinina e di urea ed un pH alcalino ad esempio facilitano l'aderenza batterica mentre, al contrario, elevati livelli di potassio, di IgA, di osmolarità e un pH acido la inibiscono.

Una notevole influenza sulla capacità di aderenza batterica è, inoltre, data dallo stato secretorio dell'ospite caratterizzato dalla presenza nel plasma e nelle secrezioni mucose e ghiandolari di sostanze con componente oligosaccaridica simili a quelle riscontrate negli antigeni eritrocitari e cellulari. La presenza sulla superficie cellulare di queste sostanze oppure la loro assenza è condizionata dai geni secretori strettamente affini ai geni che codificano i gruppi sanguigni; questo concetto è supportato dalla stretta correlazione documentata tra soggetti di sesso

femminile con gruppo sanguigno B oppure AB ed infezioni del tratto urinario. Si ipotizza che la causa di questa correlazione risieda nella mancanza di isoemoagglutinine anti-B che definiscono il fenotipo “non secretore”. Le isoemoagglutinine anti-B che si trovano, invece, nel “fenotipo secretore” impediscono l’aderenza e la colonizzazione batterica legandosi ai recettori uroteliali e facendo sì che i siti di legame utilizzati dalle adesine batteriche non risultino più disponibili. Il “fenotipo secretore” è inoltre dotato sia a livello eritrocitario che uroepiteliale di un’attività enzimatica fucosil-transferasica che permette l’espressione sulla superficie cellulare di oligosaccaridi, tra cui anche il fucosio, capaci di ridurre l’aderenza batterica; gli uropatogeni infatti non sono in grado di legarsi al fucosio bensì al mannosio ed ai suoi derivati pertanto la presenza di recettori per il fucosio diminuisce l’accessibilità ai recettori per il mannosio e di conseguenza anche l’adesione batterica.

Altri importanti meccanismi posseduti dal “fenotipo secretore” sono:

- la proteina di Tamm-Horsfall prodotta dall’epitelio tubulare e capace di legare *Escherichia coli* impedendo che esso colonizzi;
- la mucina, sostanza glicoproteica ricca di glicosaminoglicani, che grazie alla sua marcata idrofilia forma un film sull’epitelio vescicale proteggendolo dai batteri;
- le IgA secretorie prodotte dalle plasmacellule presenti a livello della lamina propria della mucosa parietale.

Si può pertanto affermare che i fattori genetici determinando lo stato secretorio dell'organismo ospite sono alla base della regolazione della suscettibilità della mucosa urogenitale ai batteri uropatogeni e che la patogenicità del microorganismo stesso ha in realtà un ruolo di importanza secondaria (77,85).

Le infezioni del tratto urinario si presentano clinicamente con disuria, nicturia, stranguria, pollachiuria, tenesmo vescicale, urgenza minzionale e dolore lombare in sede sovra-pubica mediana. L'urina può essere maleodorante e/o torbida ed in circa il 30% dei casi è visibilmente contaminata da sangue. In caso di pielonefrite dolore lombare, flaccidità del parenchima renale e febbre sono i sintomi classici, spesso accompagnati da nausea e vomito e, talora, da ematuria. In alcuni casi, tuttavia, le pielonefriti possono essere asintomatiche. Diabete, gravidanza ed immunosoppressione tendono a mascherare i sintomi, mentre danni preesistenti alle vie urinarie ed ostruzione del flusso urinario esacerbano sintomi acuti (86-88).

2.4 - MECCANISMI DI DIFESA DELL'OSPITE

L'organismo ospite possiede numerosi meccanismi di difesa, sia di tipo anatomico che funzionale, atti a proteggerlo dalle infezioni del tratto urinario; essi sono:

1. Barriera glomerulo-capillare che sebbene sia molto sottile, costituisce una protezione molto efficace contro la diffusione batterica per via

ematogena;

2. Rivestimento epiteliale di calici, pelvi, ureteri, vescica ed uretra che rappresenta una vera e propria barriera meccanica atta a contrastare la penetrazione batterica;
3. Mucina che riveste l'urotelio composta da anticorpi, frazioni del complemento, opsonine e lisozima e capace d'inibire l'adesività dei microorganismi. Questa proprietà antiadesiva trova spiegazione nella spiccata idrofilia dovuta ai glicosaminoglicani (GAG) in essa contenuti. I glicosaminoglicani infatti si legano alle molecole dell'acqua formando con esse una barriera protettiva idrofila;
4. Immunoglobuline A secretorie prodotte dalle plasmacellule contenute a livello della lamina propria dell'urotelio e dotate di una componente secretoria in grado sia di condizionarne il trasporto trans-epiteliale che di legarsi alla superficie batterica contrastando, in tal modo, la capacità dei germi di aderire alle cellule epiteliali;
5. Uromucoidi di Tamm-Horsfall: glicoproteine prodotte dalle cellule della mucosa uretrale e vescicale ad alto contenuto di radicali mannosio liberi che impediscono la colonizzazione degli uropatogeni captando e, di conseguenza, bloccando le fimbrie di tipo I;
6. Giunzione uretero-vescicale integra e presenza di una papilla renale non refluyente; la prima condizione impedisce il reflusso dell'urina vescicale in direzione del rene mentre la seconda fa sì che l'urina pellica non refluisca nell'interstizio renale;

7. Diluizione delle urine vescicali e svuotamento completo della vescica che determinano un vero e proprio lavaggio periodico dai microorganismi contenuti a livello dell'uretra distale;
8. Azione battericida del secreto prostatico (che contiene infatti il fattore antibatterico prostatico) e delle secrezioni vaginali acide (85).

2.5 - LE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE IN TERAPIA INTENSIVA

Le unità di terapia Intensiva (UTI) costituiscono un importante crocevia tra i pazienti più gravi, sottoposti a regimi terapeutici particolarmente aggressivi, ed i microorganismi patogeni più resistenti, resi tali dal prolungato utilizzo di terapie antibiotiche a largo spettro (89).

Tra i fattori di rischio legati alla colonizzazione delle vie urinarie in terapia intensiva, merita una menzione speciale l'utilizzo di cateteri vescicali (90,91). Sia nel rapporto del NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) che in uno studio pubblicato in Olanda da Van der Kooi et al. emerge che un buon 95% delle infezioni del tratto urinario sono associate proprio a cateterizzazione vescicale (92,93). Se consideriamo inoltre che la stragrande maggioranza dei pazienti ricoverati in UTI è cateterizzata e che circa il 16-28% di questi soggetti

presentano IVU (89,94) siamo in grado di capire quanto questo problema incida sull'aumento di morbidità, mortalità, costi ospedalieri e giorni di degenza.

I Paesi in via di sviluppo presentano, tuttavia, un'incidenza d'infezioni ospedaliere causate da dispositivi medici dalle 3 alle 5 volte maggiore rispetto ai Paesi sviluppati e questo a causa di fattori come ad esempio l'alta percentuale di personale medico-infermieristico con competenze inadeguate, l'impiego di risorse limitate ed obsolete, la mancanza di programmi di controllo delle infezioni, la scarsità di struttura ospedaliere adeguate (95).

Da uno studio condotto da Leone et al., è inoltre emerso che sesso femminile, durata della degenza in UTI, precedente assunzione di antibiotici, score di gravità presentato al momento dell'ammissione in reparto e durata della cateterizzazione sono tutti fattori indipendenti associati con un aumento del rischio di CA-IVU (96).

Gli stessi autori hanno indagato anche la correlazione intercorrente tra incidenza di batteruria e i diversi sistemi di cateterizzazione giungendo alla conclusione che la riduzione della durata di questa pratica clinica rappresenta il principale intervento di prevenzione nei confronti di questo tipo di infezioni (97).

Nei soggetti cateterizzati, gli agenti patogeni possono penetrare all'interno delle tratto urinario tramite due vie:

- via extra-luminale che prevede una colonizzazione batterica al momento dell'inserimento del dispositivo oppure più tardivamente quando i

microorganismi risalgono il film mucoso tra catetere ed uretra;

- via intra-luminale che comporta una colonizzazione causata da un reflusso di microorganismi dalla sacca di raccolta oppure da un'interruzione del sistema di drenaggio chiuso che consente l'ingresso dei germi al suo interno (98).

Una volta penetrati all'interno dell'apparato urinario i microorganismi possono trovare un habitat favorevole alla loro replicazione nelle piccole quantità di urina ristagnanti in vescica per l'impossibilità di defluire dalle aperture sulle punte del catetere (99); altri germi trovano invece un microambiente confortevole a livello delle lesioni uretrali formatesi durante le manovre d'inserimento del dispositivo (100).

Anche le microfratture sulle superfici interne ed esterne dei cateteri, spesso imputabili ai materiali con cui questi dispositivi sono costituiti, rappresentano aree ad alto rischio di colonizzazione batterica in quanto sono possibili zone di adesione e di proliferazione microbica (101).

Il fattore di rischio maggiormente implicato nello sviluppo di IVU nei soggetti portatori di dispositivi vescicali è, tuttavia, rappresentato dalla formazione di un biofilm; un biofilm può essere definito come un accumulo di microorganismi patogeni e dei loro frammenti di acido nucleico all'interno di un mucopolisaccaridico che concorrono insieme a costituire un'unità strutturata sopra una superficie solida inerte o vivente (102).

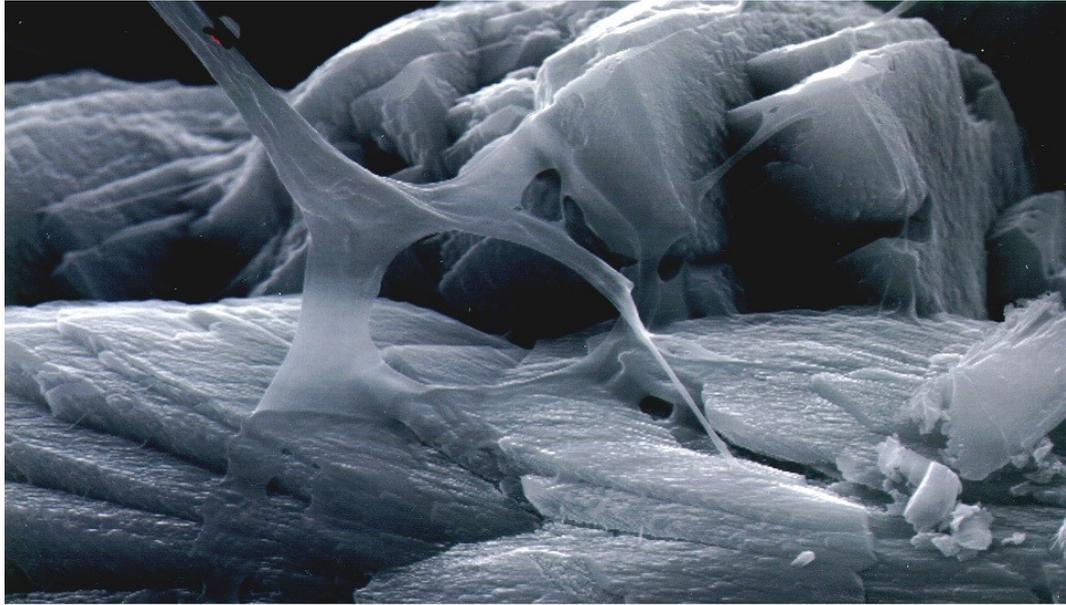


Figura 19: Biofilm batterico

Il processo di formazione di tale struttura avviene in 5 fasi:

1. La cellula planctonica si avvicina alla superficie solida tramite il flusso urinario oppure grazie alla sua motilità. La superficie solida a causa dell'assorbimento di diversi soluti che ne alterano le proprietà è "condizionata" e quindi più incline a favorire un attaccamento reversibile grazie al superamento delle forze repulsive;
2. I batteri producono polimeri extracellulari e/o si formano interazioni tra superficie solida e specifiche adesine situate all'estremità dei pili. Ciò comporta una trasformazione dell'attaccamento che da reversibile diventa irreversibile;
3. Sviluppo precoce della struttura del biofilm;
4. Crescita di microcolonie batteriche nel biofilm maturo. La produzione da parte dei microorganismi di sostanze polimeriche extracellulari continua;

- queste sostanze fungono sia da matrice adesiva che come “trappola” per i nutrienti che si trovano nell’ambiente circostante. I biofilms maturi sono strutture complesse ricche di canali d’acqua e pori, ed al loro interno i germi sono capaci sviluppare specifici modelli di crescita con diversa fisiologia e diverso metabolismo rispetto alla cellula batterica planctonica;
5. Le cellule batterica ritornano allo stato planctonico in seguito alla loro dispersione dal biofilm nell’ambiente circostante (103-106).

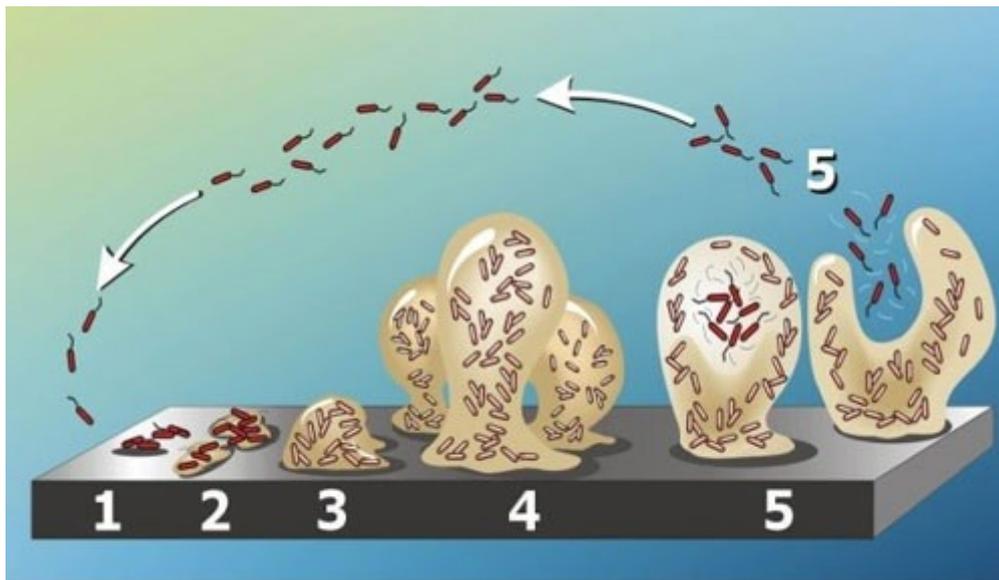


Figura 20: Processo di formazione di un biofilm batterico.

Sia la formazione del biofilm che il distacco cellulare (singolarmente o in gruppo) possono, grazie ad una serie di “molecole segnale” che vengono inviate da cellula a cellula, essere regolate dall’espressione genica legata alla densità di popolazione; queste molecole segnale sono le AHL (Acylated Homoserine Lactones) per i batteri Gram negativi ed i peptidi specifici per i batteri Gram positivi (107,108).

I biofilms sono piuttosto comuni nel contesto della pratica urologica in quanto possono trovarsi, oltre che a livello uroteliale, sui cateteri, nelle sacche di drenaggio, sulle protesi e su qualsiasi altro corpo estraneo che venga in contatto con l'ospite; inoltre costituiscono una vera e propria barriera che si oppone alla penetrazione degli antibiotici (102).

Anche se questa affermazione deve essere ancora confermata si ipotizza che la formazione dei biofilms rappresenti una “risposta da stress” messa in atto dai batteri per riuscire a sopravvivere in ambienti avversi, ivi incluso il tratto urinario. All'interno dei biofilms i batteri sono riparati dal flusso urinario, dalle difese immunitarie dell'ospite e dagli antibiotici, stabilendo così infezioni organiche persistenti (109).

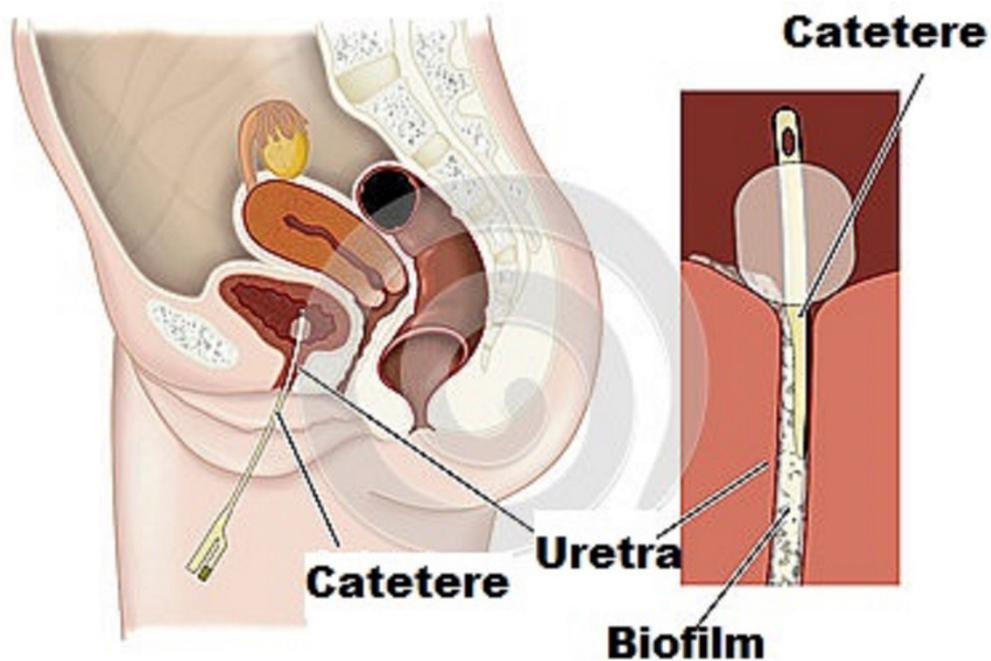


Figura 21: Formazione di un biofilm su catetere urinario

Uno studio condotto da Kumon et al., ha esaminato l'effetto indotto dal materiale di cui è composto il catetere sullo sviluppo del biofilm: utilizzando cateteri in gomma, in lattice, in lattice rivestito da idrogel ed, infine, in silicone ed analizzando tramite microscopia elettronica la superficie interna della porzione vescicale di ciascun catetere Kumon e collaboratori sono riusciti ad identificarne lo score di adesività batterica. Cateteri in gomma e cateteri in lattice hanno evidenziato uno score pari a 3,6 (su un range che va da 0 a 5), mentre per i cateteri in idrogel e per i cateteri in silicone gli scores sono stati notevolmente più bassi attestandosi su valori di 2,3 e 1,3 rispettivamente. Alla luce di questi risultati gli autori dello studio hanno potuto concludere che il silicone è il più refrattario, tra i materiali normalmente impiegati per costituire i cateteri, alla formazione dei biofilms, anche se il microorganismo *Pseudomonas* con la sua facilità di aderirvi rappresenta un'eccezione.

Inoltre lavori precedenti condotti dalla stessa equipe avevano messo in risalto che gli ioni argento riducono drasticamente la bioattività dei biofilms indicando quindi che l'utilizzo di materiali rivestiti o impregnati di argento possiede una potenziale capacità di prevenire le infezioni delle vie urinarie associate a catetere (109,110).

L'argento oltre ad essere dotato di proprietà battericide non presenta alcuna tossicità, inoltre in passato è stato impiegato per prevenire l'instaurarsi d'infezioni anche in altri contesti clinici come ad esempio in caso di ferite da ustione (111).

Come emerge dalla letteratura sono stati effettuate molteplici meta-analisi per comprendere l'utilità ed i potenziali vantaggi offerti dall'utilizzo di cateteri urinari

rivestiti in argento ed è bene raggruppare questi articoli in due distinte categorie: la prima è rappresentata dagli studi svolti su cateteri urinari rivestiti in ossido di argento, attualmente non più in commercio negli Stati Uniti, mentre la seconda categoria riguarda lavori in cui sono stati indagati dispositivi rivestiti d'argento ed altri metalli nobili come oro e palladio (cateteri definiti dalla terminologia anglosassone come “silver coating”).

Per quanto concerne l'impiego di dispositivi rivestiti in ossido di argento sono stati osservati risultati alquanto discordanti: se, infatti, in alcuni lavori è emersa una riduzione della batteruria, in altri le conclusioni hanno dimostrato il contrario (112-116).

Nelle meta-analisi riguardanti cateteri rivestiti in lega d'argento, invece, i risultati depongono indubbiamente a favore dell'efficacia di questi dispositivi nella prevenzione delle infezioni del tratto urinario nel paziente adulto ospedalizzato e cateterizzato a breve termine (117).

CAPITOLO 3 - STUDIO CLINICO

3.1-OBIETTIVI DELLO STUDIO

Una precoce diagnosi di sepsi costituisce per i reparti di terapia intensiva una delle principali sfide quotidiane, in quanto è ad oggi disponibile una vasta gamma di strategie terapeutiche in grado di aumentare la sopravvivenza dei pazienti che ne sono affetti.

Dal momento che la sepsi non possiede sintomi e segni specifici e che la coltura microbiologica, sebbene sia il gold standard diagnostico, presenta alcuni importanti inconvenienti (richiede tempi elevati affinché sia disponibile l'esito dell'esame, può dare talvolta risultati falsamente negativi ed inoltre non riflette né la risposta del paziente ad un'infezione sistemica né la comparsa di disfunzioni d'organo) è essenziale individuare nuovi strumenti per una sua diagnosi rapida ed accurata al fine di prevenire le possibili complicanze e migliorare l'outcome del paziente critico.

La procalcitonina è un proormone polipeptidico che in caso di infezioni batteriche viene prodotto e rilasciato dalla maggior parte dei tessuti dell'organismo; ciò determina un aumento della sua concentrazione ematica che correla in maniera proporzionale alla gravità dell'infezione. In corso d'infezione d'organo, sepsi o

shock settico, la concentrazione della PCT plasmatica risulta più alta rispetto alla concentrazione della PCT urinaria e questo avviene in ragione del fatto che la procalcitonina prodotta nel sito di infezione viene rilasciata nel circolo ematico e che solo il 16-20% della PCT plasmatica viene escreta a livello renale nei soggetti con funzione renale sana. Pazienti con funzione renale compromessa presentano un ulteriore abbassamento della clearance della procalcitonina.

Il primo obiettivo che il nostro studio clinico si prefigge è di confermare la relazione di proporzionalità che intercorre tra aumento dei valori di procalcitonina plasmatica e maggiore gravità dell'infezione batterica al fine di evidenziare l'utilità della PCT come biomarker precoce nella diagnosi di sepsi.

Lo studio si propone inoltre di valutare la relazione esistente tra procalcitonina plasmatica e procalcitonina urinaria, verificando che nei soggetti che presentano urinocoltura positiva il valore della procalcitonina urinaria superi il valore della procalcitonina plasmatica.

Questo secondo obiettivo origina dall'ipotesi che in caso di IVU le cellule immunitarie dell'apparato urinario producano un eccesso di procalcitonina che va a riversarsi nelle urine determinando, di conseguenza, una concentrazione di procalcitonina urinaria più elevata rispetto a quella plasmatica.

Febbre, disuria, pollachiuria, urgenza minzionale, dolore lombare di modesta entità costituiscono i principali sintomi con cui si manifestano questo tipo di infezioni. Tale corredo sintomatologico, tuttavia, non sempre si rivela sufficiente per porre diagnosi di IVU e ciò si verifica soprattutto nelle unità di terapia

intensiva dove le condizioni critiche del paziente spesso gli impediscono di riuscire a comunicare ai medici la sua sintomatologia.

Si rivelano pertanto fondamentali le indagini di laboratorio finalizzate sia ad isolare gli agenti patogeni coinvolti, sia ad individuare terapie specifiche. Il gold standard per la diagnosi di IVU è rappresentato dall'urinocoltura, tuttavia essa richiede dalle 24 alle 48 ore affinché siano disponibili i risultati. Per far fronte a questo ritardo diagnostico viene spesso intrapresa una terapia empirica, basata unicamente sul sospetto clinico, ma questa può risultare del tutto superflua nei pazienti con urinocoltura negativa.

Da ciò si intuisce la necessità di individuare nuove strategie diagnostiche capaci di ovviare questi inconvenienti. Alla conferma di questa ipotesi potrebbe infatti conseguire la messa a punto di un nuovo strumento di diagnosi capace di evidenziare in meno di 30 minuti una eventuale infezione del tratto urinario.

3.2- DISEGNO DELLO STUDIO

Si tratta di uno studio pilota monocentrico effettuato su una popolazione campionaria composta da 45 soggetti divisi in 3 gruppi: volontari sani, pazienti che hanno subito un intervento di chirurgia minore che afferiscono all'unità di

terapia sub-intensiva e pazienti settici ricoverati nell'unità di terapia intensiva. Quest'ultimo gruppo presenta al suo interno un ulteriore sottogruppo costituito da 10 pazienti settici con sospetta infezione delle vie urinarie.

A tutti i soggetti sono stati effettuati i seguenti esami:

- determinazione della procalcitonina plasmatica mediante kit BRAHMS selective KRYPTOR;
- urinocoltura;
- esame delle urine standard (esame Chimico-Fisico e Microbiologico).

Tramite gli esami svolti lo studio vuole confermare la relazione esistente tra concentrazione di procalcitonina plasmatica e gravità dell'infezione batterica.

Nei pazienti settici, in contemporanea alle altre misurazioni, è stato effettuato anche il dosaggio della procalcitonina urinaria mediante kit BRAHMS selective KRYPTOR al fine di verificare con quale significatività soggetti che presentano positività all'urinocoltura mostrino una concentrazione di procalcitonina urinaria superiore alla concentrazione di procalcitonina plasmatica ($PCT_{ur}/PCT_{pl} > 1$).

Queste indagini sono state effettuate sulla popolazione in studio una volta sola senza necessità di ulteriori accertamenti.

CAPITOLO 4 – POPOLAZIONE IN STUDIO E MISURAZIONI

4.1 – POPOLAZIONE IN STUDIO

La popolazione esaminata nel nostro studio è costituita da 45 soggetti suddivisi in 3 categorie:

- 10 volontari sani;
- 15 pazienti che hanno subito un intervento chirurgico minore ricoverati nel reparto di terapia sub-intensiva dell’Ospedale Cisanello di Pisa (U.O. Anestesia e Rianimazione IV-universitaria);
- 20 pazienti settici ricoverati nel reparto di terapia intensiva dell’Ospedale Cisanello di Pisa (U.O. Anestesia e rianimazione IV – universitaria): all’interno di questo gruppo vi è un ulteriore sottogruppo di pazienti costituito da 10 soggetti con sospetta infezione del tratto urinario.

I criteri di inclusione comprendono:

- febbre, febbre d’origine sconosciuta (FUO) oppure ipotermia;
- leucocitosi/leucopenia;
- dolore lombare e/o disuria;

- cateterizzazione;
- altri segni di SIRS non spiegabile;
- IVU recidivanti;
- età > 18 anni;
- nello studio possono essere inclusi soggetti di tutte le etnie e genere;
- nello studio possono essere inclusi soggetti sottoposti a trattamenti farmacologici di altro tipo.

I criteri di esclusione sono rappresentati da:

- grave disfunzione renale;
- oliguria-anuria;
- presenza di ureterosigmoidostomia;
- anomalie renali tali da non consentire un adeguato campionamento urinario;
- età < 18 anni;
- gravidanza;
- allattamento;
- pazienti sottoposti a cistectomia;
- qualsiasi condizione clinica giudicata inadeguata.

4.2 – MISURAZIONI

4.2.a- Urinocoltura

Fondamentale per l'urinocoltura, così come per tutti gli esami colturali, si rivela la fase preanalitica.

Per quanto riguarda i volontari sani i campioni vengono prelevati con la tecnica del mitto intermedio che prevede la raccolta delle urine con la prima minzione del mattino oppure dopo che sono trascorse almeno 3 ore dall'ultima minzione. Tale tecnica deve svolgersi in condizioni di assoluta sterilità pertanto in prima istanza è necessario un accurato lavaggio di mani e genitali esterni con acqua e sapone; si deve poi urinare scartando il primo getto, ovvero i primi 20 mL circa, e raccogliere, senza interruzioni della minzione, il campione nell'apposito contenitore sterile provvisto di tappo a vite. Durante l'operazione è molto importante porre attenzione a non contaminare con il contatto con mani e genitali i bordi e l'interno del contenitore in quanto si rischierebbe, altrimenti, di contaminare le urine raccolte con batteri usualmente presenti sulla pelle come ad esempio *Staphylococcus epidermidis*.

I pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva e di terapia sub-intensiva sono generalmente cateterizzati pertanto la raccolta dei campioni viene effettuata da appositi siti di drenaggio. Le regole fondamentali da seguire per effettuare il prelievo da catetere vescicale in condizioni di assoluta sterilità sono: un accurato

lavaggio delle mani; l'utilizzo di guanti protettivi; la chiusura di almeno 1 ora del tubo della sacca, al di sotto della valvola; la disinfezione esterna della parte gommata della valvola; l'apertura asettica del contenitore di raccolta facendo attenzione in seguito ad appoggiare il tappo sempre con la faccia interna rivolta verso l'alto; l'esecuzione del prelievo mediante siringa dotata di ago sottile sterile.

Dopo il prelievo le urine vengono inviate al laboratorio di Analisi Microbiologiche del presidio ospedaliero di Cisanello.

E' di rilevante importanza che le urine vengano insemenate nel terreno di coltura nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le due ore dal momento del prelievo in quanto la carica batterica all'interno del contenitore si moltiplica in maniera esponenziale, ed a detta di alcuni autori può addirittura raddoppiarsi ogni 30-60 minuti, dando luogo ad un inevitabile aumento di risultati falsamente positivi; questo avviene soprattutto nel periodo estivo a causa dell'elevata temperatura ambientale che si avvicina molto a quella di replicazione batterica ottimale. Talora non sia possibile insemenare subito le urine nell'apposito terreno di coltura è necessario conservare il campione a 4°C senza tuttavia superare le 12-24 ore altrimenti la conta microbica si altera.



Figura 22: Terreno di coltura per insemenzamento delle urine.

A causa del polimorfismo eziologico dei batteri responsabili delle infezioni del tratto urinario, si utilizzano terreni aspecifici; quelli più frequentemente impiegati sono l'agar Mac Conkey (selettivo per batteri Gram negativi), l'agar Columbia (terreno arricchito al 5% con sangue di montone che favorisce la crescita anche dei miceti) e il C.L.E.D. (terreno povero di elettroliti che contrasta lo sciamaggio del Proteus).

La tecnica utilizzata per l'insemenzamento del terreno è quella della “semina a perdere” e viene effettuata con ansa sterile calibrata da un microlitro. Questa tecnica fa sì che nel terreno i singoli germi si trovino materialmente distanziati gli uni dagli altri in modo da ottenere, dopo il necessario tempo d'incubazione, colonie pure ben isolate dello stesso microorganismo se l'infezione è

monomicrobica oppure colonie pure ben isolate di ciascun agente patogeno se l'infezione è invece polimicrobica.

Le piastre delle urinocolture vengono incubate a 35° C per 24 ore; al termine di questo periodo i risultati vanno interpretati attenendosi ai criteri di Krass che considerano significativa di infezione del tratto urinario una batteruria superiore alle 100.000 Unità Formanti Colonie/mL. Ci sono tuttavia particolari condizioni in cui vengono considerate positive anche cariche inferiori alla soglia sopra citata; questo vale in caso di candida spp. in cui viene considerata significativa la soglia di 10000 UFC/mL, in caso di batteri Gram positivi (soprattutto Enterococchi e Stafilococchi coagulasi negativi), ed, infine, in caso di trattamento antimicrobico (118-120).

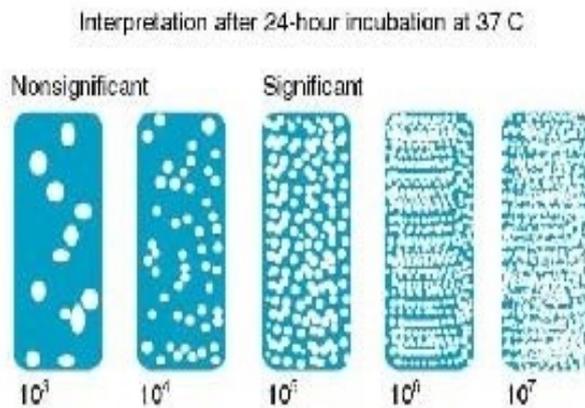


Figura 23: Rappresentazione dell'interpretazione dei risultati dopo incubazione a 37° C per 24 ore delle piastre delle urinocolture.



Figura 24: Interpretazione dei risultati dopo incubazione a 37 C per 24 ore delle piastre delle urinocolture.

4.2.b – Esame delle urine standard

I parametri esaminati dall'esame standard delle urine sono: glucosio, pH urinario, corpi chetonici, albumina, bilirubina, emoglobina, urobilinogeno, nitriti, peso specifico, colore, aspetto, eritrociti, leucociti, cellule epiteliali, cilindri, cristalli, batteri e miceti.

ESAME CHIMICO FISICO e MICROSCOPICO	VALORI DI RIFERIMENTO
Glucosio (mg/dL)	Assente
pH urinario	5,5-7
Corpi chetonici (mg/dL)	Assenti
Albumina (mg/dL)	Fino a 15
Bilirubina (mg/dL)	Assente
Emoglobina (mg/dL)	Assente
Urobilinogeno EU/dL	Fino a 0,2
Nitriti	Assenti
Peso Specifico	1,015-1,025
Colore	Giallo paglierino
Aspetto	Limpido
Eritrociti/ μ L	Fino a 20

Leucociti/ μ L	Fino a 20
Cellule epiteliali/ μ L	Fino a 40
Cilindri/ μ L	Fino a 3
Cristalli/ μ L	Fino a 40
Batteri e miceti	Assenti

Tabella 5: esame Chimico- Fisico e Microscopico e valori di riferimento

I campioni di urine dei volontari sani e dei pazienti ricoverati nelle unità di terapia intensiva e di terapia subintensiva del Presidio Ospedaliero di Cisanello di Pisa (U.O. Anestesia e Rianimazione IV- universitaria) vengono prelevati con le stesse modalità con cui si ottengono i campioni per l'urinocoltura ed una volta raccolti nell'apposita provetta vengono successivamente inviati al laboratorio di Analisi Chimico Cliniche del medesimo presidio Ospedaliero.

Generalmente viene raccolto un campione della prima urina del mattino perché l'urina prodotta durante la notte si forma in un periodo in cui non vengono introdotti liquidi e questo comporta che gli elementi figurati siano più concentrati. L'esame deve essere eseguito al massimo entro due ore dalla sua raccolta per evitare alterazioni che possano inficiare l'indagine microscopica del sedimento, per esempio cristallizzazione o precipitazione di urati o di fosfati, oppure, se il campione non è refrigerato, la crescita di altri batteri che alterano il pH ed altri parametri.

L'esame, chiamato "Chimico-Fisico e Microscopico" si divide, come suggerito dal nome stesso, in due parti: esame Chimico-Fisico ed esame Microscopico. Il primo valuta: pH, urine, glucosio, emoglobina, corpi chetonici, bilirubina, urobilinogeno, colore, aspetto, peso specifico e nitriti, mentre il secondo prende in considerazione elementi corpuscolati quali leucociti, eritrociti, cellule di sfaldamento, batteri, miceti, muco, cilindri e cristalli.

ESAME CHIMICO - FISICO

Fisiologicamente, il pH urinario è acido, con parametri che dovrebbero rientrare nel range tra 5,5 e 7; fattori come dieta iperproteica, esercizio fisico, alcoolismo, febbre e digiuno causano forte acidità, mentre una dieta vegetariana, soprattutto se ricca di agrumi, e le infezioni delle vie urinarie sono responsabili di una forte basicità. Molto importante risulta anche il momento della giornata in cui viene effettuato il prelievo in quanto i valori del pH urinario subiscono forti oscillazioni nell'arco delle 24 ore. La determinazione del pH urinario risulta molto utile anche nella diagnosi di calcoli delle vie urinarie in quanto in questa condizione le urine sono acide e con pH sempre minore di 5.

In condizioni normali il glucosio filtra attraverso i glomeruli, ma in seguito viene totalmente riassorbito a livello dei sottostanti tubuli renali; in alcune patologie, però, questo totale riassorbimento non avviene. Nel Diabete Mellito, ad esempio, eccessive quantità di glucosio giungono a livello dei tubuli renali a causa dell'elevata concentrazione ematica di glucosio; questo comporta che una parte di

esse sfugga al riassorbimento tubulare e venga eliminata nelle urine. Altra patologia che prevede glicosuria è la Sindrome di Fanconi caratterizzata da difetti multipli a livello tubulare renale responsabili di uno scarso riassorbimento di determinate sostanze, tra le quali anche il glucosio.

La preurina contiene abbondanti quantità di proteine a basso peso molecolare che verranno in seguito riassorbite a livello del tratto prossimale dell'apparato tubulare; il limite fisiologico della proteinuria è infatti 10 mg/dl. Un aumento della proteinuria totale generalmente identifica la presenza di un danno a carico del tratto urinario anche se è bene precisare che tale aumento può essere dovuto anche a situazioni meno preoccupanti quali sforzi fisici, malattie febbrili e colpi di calore. Una proteinuria significativa può, però, sottendere anche un'anemia, vari avvelenamenti, cistiti, glomerulonefriti, pielonefriti ed altre patologie a base infettiva e non infettiva.

L'emoglobina normalmente è assente nelle urine; una sua presenza può riflettere un infarto renale, trasfusioni ematiche di gruppo incompatibile, ustioni estese, anemia emolitica autoimmune, setticemia da *Bacillus perfringens* o da *Escherichia coli*, coagulazione intravasale disseminata oppure può essere causata da alcuni farmaci. L'emoglobina è facilmente identificabile dalle strisce reattive anche ad occhio nudo in quanto la pseudoperossidasi emoglobinica catalizza la reazione tra il perossido d'idrogeno ed il cromogeno o-talidina che vira al blu.

La presenza di corpi chetonici nelle urine è, invece, generalmente sinonimo di un malfunzionamento nel metabolismo dei lipidi o dei carboidrati in quanto essi

derivano dal catabolismo degli acidi grassi quando l'organismo è carente di zuccheri, tuttavia questa condizione può essere dovuta anche ad altre condizioni patologiche e non come, ad esempio, epatiti croniche, gravidanza, iponutrizione, freddo, stress, sforzi fisici prolungati e stati febbrili tossici.

La bilirubina, prodotto di degradazione dell'emoglobina e principale pigmento della bile, in condizioni normali non è presente nelle urine; la sua presenza ne determina il caratteristico color marsala e può essere causata da patologie come anemia emolitica, anemia perniziosa, carcinoma del pancreas, cirrosi epatica, ittero, epatite acuta virale, malaria, sepsi e talassemia.

L'urobilinogeno, prodotto di trasformazione della bilirubina per mezzo della flora batterica intestinale, partecipa insieme alla bilirubina a costituire i cosiddetti pigmenti biliari e normalmente non dovrebbe trovarsi nelle urine, se non in quantità molto esigue (fino a 0,2). Un incremento della sua concentrazione potrebbe essere dettato da una anemia emolitica oppure da una ostruzione delle vie biliari. Urine con sovraccarico di urobilinogeno mostrano un colore giallo-marrone e non formano schiuma.

Tutti gli esami chimici sopra riportati vengono effettuati per mezzo di strisce reattive.

Colore ed aspetto fisico sono due parametri fisici di notevole rilievo in quanto capaci di fornire importanti informazioni. In condizioni normali, le urine fresche si presentano limpide e solo dopo un certo periodo dall'emissione si intorbidiscono a causa della precipitazione dei sali (fosfati ed urati) in esse

contenuti. L'aspetto torbido delle urine fresche segnala invece un sottostante stato patologico in quanto indica la presenza di muco, leucociti, pus, sangue, cellule di sfaldamento o grassi.

Le urine generalmente possiedono un caratteristico colore giallo paglierino sebbene in particolari condizioni possono assumere una vasta gamma di colori (rosso, arancione, verde, marrone, blu, nero, ecc.). Urine rosse indicano ad esempio una presenza di sangue dovuta a diverse condizioni tra cui contaminazioni durante il flusso mestruale, emoglobinuria, danni renali, oppure assunzione di alcuni farmaci o di alimenti come le barbabietole. Una pigmentazione arancione può derivare dall'escrezione di urobilinogeno che anche se di per sé è incolore viene trasformato dalla luce e dal pH in urobilina di tipico colore arancio. Urine verde-marrone con schiuma giallastra e grandi quantità di bilirubina possono essere indicative di itteri ostruttivi. Un colore marrone scuro è dovuto alla presenza di melanina, come accade in alcuni melanomi maligni, ma anche alla presenza di emoglobina che sebbene di per sé sia incolore si scurisce a riposo a causa della sua trasformazione in metaemoglobina. Infine urine blu possono, ad esempio, essere provocate da alcuni farmaci.

Il peso specifico delle urine, misurato con un densitometro, rappresenta la capacità del rene di mantenere l'omeostasi dei liquidi e degli elettroliti si attesta tra 1,015 e 1,025 g/L, anche se è bene precisare che anche nei soggetti sani i valori non sono sempre costanti in quanto aumentano durante una dieta asciutta e diminuiscono conseguentemente all'introduzione di liquidi. Tali oscillazioni, tuttavia,

avvengono entro intervalli molto modesti. Al contrario, variazioni sensibili del peso specifico urinario sono quasi sempre la spia di un'alterata funzione renale.

Infine, la presenza di nitriti nelle urine è significativa di infezione delle vie urinarie. Il test si basa sulla capacità dei batteri di convertire i nitrati a nitriti; mentre la positività è indice di batteruria (Escherichia coli, Proteus, Klebsiella, Pseudomonas, Stafilococchi, Enterococchi), la negatività non esclude l'infezione da parte di germi che non riducono i nitrati a nitriti.

ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico si effettua osservando a fresco una goccia del sedimento ottenuta centrifugando una parte del campione di urine.

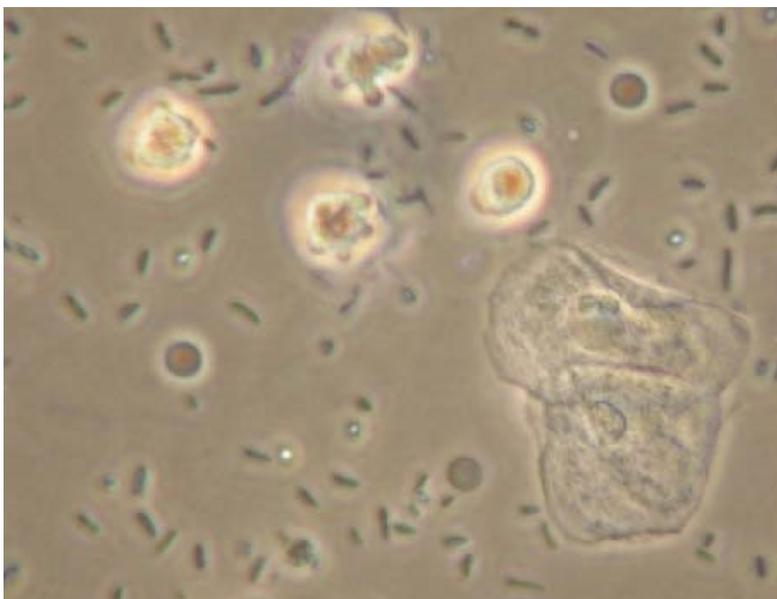


Figura 25: Sedimento urinario.

La presenza di leucociti nelle urine serve a valutare la presenza di nefropatie ed è segno aspecifico d'infezione del tratto urinario. Un marcato aumento leucocitario è di solito sinonimo d'infezione acuta, tuttavia se ripetute urinocolture mostrano sempre esito negativo può essere implicata una forma tubulare oppure una nefropatia lupica.

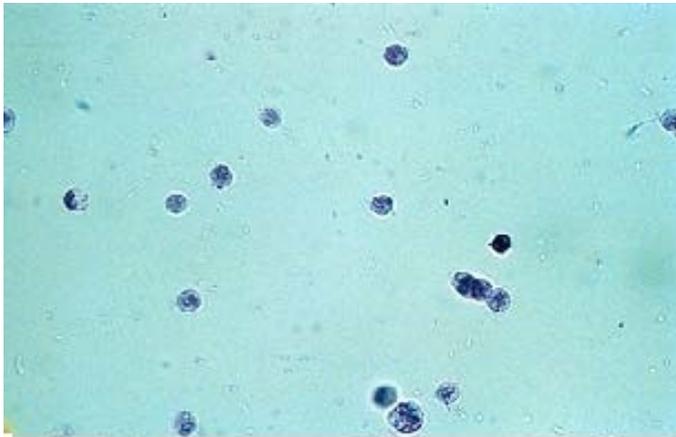


Figura 26: Leucociti nel sedimento urinario

Fisiologicamente gli eritrociti non dovrebbero essere riscontrati nelle urine in quanto la loro presenza rivela un'ematuria; condizioni che più frequentemente provocano ematuria sono: disturbi della coagulazione, calcoli, neoplasie, tubercolosi renali, glomerulonefriti ecc.

Cellule epiteliali nelle urine rappresentano il normale ricambio cellulare dell'epitelio delle vie urinarie; in condizioni normali vengono rilevate poche cellule per campo microscopico.

Una batteruria, soprattutto se associata a leucocituria è un indice altamente significativo di IVU.

I miceti sono spesso rilevati nei soggetti defedati, negli immunodepressi, nei diabetici e nei soggetti sottoposti ad antibioticoteraia. Candida albicans rappresenta il micete più comunemente riscontrato.

Per quanto riguarda la presenza di muco è necessario fare una distinzione tra uomini e donne, infatti mentre nelle donne riscontrare muco non è preoccupante per la quasi sicura origine vaginale, nell'uomo la sua presenza può sottendere stati patologici a carico delle vie urinarie, ed in particolar modo può essere una spia di IVU.

I cristalli sono spesso rilevati nelle urine di soggetti sani; quelli più comunemente presenti sono: fosfati amorfi (fina precipitazioni), fosfato di calcio (di forma prismatica), fosfati tripli, carbonato di calcio (di forma sferica), acido urico (di colore giallastro con forma e dimensioni variabili), urati amorfi (che assumono l'aspetto di piccolissimi granuli giallastri), ossalato di calcio (che può assumere varie forme come quella a busta di lettere, a clessidra, a manubrio).

I cilindri sono agglomerati di piastrine e di altri elementi formati nei tubuli renali. In condizioni normali sono assenti nel sedimento urinario; la loro presenza indica pertanto sofferenza renale e a seconda della loro composizione indicano

disfunzioni renali diverse. Esistono appunto cilindri ialini, cerei batterici, eritrocitari, leucocitari, granulosi, pigmentati, epiteliali e cilindroidi (121,122).

4.2.c – Determinazione della procalcitonina plasmatica

Attualmente si trovano in commercio diversi metodi per la determinazione della PCT sierica e plasmatica: PCT sensitive KRYPTOR, ADVIA Centaur BRAHMS PCT, PCT ELECSYS, PCT VIDAS, PCT LIAISON, PCT LIA USA, PCT LIA, PCT-Q (rapid).

L'U.O. Analisi Chimico Cliniche del Presidio Ospedaliero di Cisanello, a cui vengono inviati i campioni di sangue prelevati dai pazienti esaminati nel nostro studio, dispone per il dosaggio della procalcitonina plasmatica del test PCT sensitive KRYPTOR.

La Procalcitonina ha una notevole stabilità nei campioni di sangue prelevati; le sue concentrazioni plasmatiche in vitro diminuiscono di circa il 12% se i campioni sono mantenuti a temperatura ambiente e del 6% se vengono conservati ad una temperatura di 4° C nelle 24 ore successive al prelievo. Tali campioni non richiedono particolari condizioni di mantenimento, pertanto possono essere raccolti assieme agli altri campioni prelevati nel corso delle analisi di routine; il tipo di anticoagulante scelto, inoltre, non influenza i risultati. Le provette possono essere conservati negli appositi frigoriferi se l'analisi verrà effettuata entro 24 ore

dalla raccolta, mentre è consigliabile il congelamento fino al momento dell'analisi se sono previsti tempi di conservazione o di trasporto più lunghi.

PCT sensitive KRYPTOR



Figura 27: Kit PCT sensitive Kryptor e sue componenti:

- 1) Unità di pipettaggio;**
- 2) Sistema di liquido;**
- 3) Carosello;**
- 4) Moduli di lettura;**

- 5) **Lettori di codici a barre;**
- 6) **Interfaccia utente**

[Immagine concessa dalla ditta Thermo Scientific]

Il test PCT sensitive KRYPTOR è un apposito kit per effettuare in campioni sierici o plasmatici di procalcitonina umana (EDTA, eparina) dosaggi in immunofluorescenza automatizzati.

INFORMAZIONI GENERALI:

- **Volume del campione:** 50 μ L
- **Tempo di incubazione:** 19 minuti
- **Unità di misura con cui sono espressi i risultati:** ng/mL
- **Fattore di conversione:** non applicabile
- **Intervallo di misurazione diretta:** 0,02-50 ng/mL
- **Intervallo di misurazione con diluizione automatica:** 0,02-1000ng/mL
- **Campioni utilizzati:** siero, plasma (EDTA, eparina)
- **Principio del dosaggio:** sandwich

Si tratta di un procedimento quantitativo che utilizza un anticorpo policlonale di pecora anticalcitonina coniugato con un tracciante fluorescente, il criptato di

europio ed altre sostanze come tampone tra le quali albumina bovina, immunoglobuline murine non immunizzate e fluoruro di potassio; un anticorpo monoclonale murino anticatacalcina coniugato anch'esso con un tracciante fluorescente l'XL665 e con tampone, albumina bovina, immunoglobuline murine, fluoruro di potassio; e per finire infine, già preparato per l'utilizzo, un diluente costituito da siero umano, Kathon, EDTA.

La determinazione del valore della PCT con questo test si basa sulla tecnologia TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) che misura il segnale emesso da un immunocomplesso a tempo ritardato offrendo:

- una misurazione estremamente precisa;
- un'eccellente riproducibilità;
- un breve periodo d'incubazione;
- una precoce stima del risultato finale che consente di risparmiare tempo.

Nel corso del test avviene un trasferimento di energia non radioattiva da un donatore (il criptato) ad un accettore (XL 665). La vicinanza tra donatore ed accettore, quando formano un immunocomplesso, e la sovrapposizione tra lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di assorbimento dell'accettore potenziano il segnale di fluorescenza del criptato ed al contempo allungano la durata del segnale dell'accettore, consentendo la misurazione della fluorescenza a tempo ritardato.

Il campione viene eccitato mediante un laser di azoto a 337 nm ed il criptato emette un segnale di fluorescenza prolungato nel range dei millisecondi a 620 nm, mentre l'XL 665 genera un segnale breve nel range dei nanosecondi a 665 nm.

Nel caso in cui venga a formarsi un immunocomplesso, sia l'amplificazione del segnale che il prolungamento della durata del segnale dell'accettore avvengono a 665 nm, con possibilità di misurare il segnale in μ -secondi.

Le molecole di PCT si situano a sandwich tra i due anticorpi e per mezzo della misurazione della durata del segnale si ottiene il valore della PCT che risulta direttamente proporzionale al tempo di emissione del segnale.

Il valore limite di rilevamento, calcolato con il profilo di imprecisione, è 0,02 ng/mL con una probabilità del 95%.

La sensibilità del dosaggio funzionale, misurata con una precisione inter-assay di CV 20%, è risultata pari a 0,06 ng/mL. Per quanto concerne la specificità, gli anticorpi utilizzati in questo dosaggio non mostrano alcuna cross reattività con la calcitonina umana (fino a 3,9 ng/mL), la calcitonina umana (fino a 22,5 ng/mL), l' α -CGRP e la β -CGRP umana (fino a 30 ng/mL). Da segnalare che la diluizione di campioni altamente concentrati ha mostrato tassi di recupero compresi tra l'80% ed il 120%.

E' necessario specificare che nei metodi immunometrici possono esserci dei casi in cui valori particolarmente elevati dell'analita nel campione risultano falsamente negativi; si parla in tal caso del famoso "effetto gancio ad alte dosi" o hook effect, che per questo test non è stato rilevato fino a 5000 ng/mL.

Alcuni analiti a diverse concentrazioni possono rappresentare dei fattori di disturbo anche se non si rileva alcun effetto significativo per l'emoglobina fino a valori di 500 mg/dL, per la bilirubina fino a 40 mg/dL e per i trigliceridi fino a 22,5 mg/mL (123).

4.2.d – Determinazione della procalcitonina urinaria

I campioni per la misurazione della concentrazione di procalcitonina urinaria vengono prelevati dai pazienti cateterizzati con le stesse modalità con cui dagli stessi pazienti sono prelevati i campioni per l'urinocoltura e per l'esame standard delle urine.

Nelle apposite provette si raccolgono circa 4 mL di urina che verranno in seguito inviati all'U.O. Analisi Chimico Cliniche del Presidio Ospedaliero di Cisanello.

La misurazione della PCT urinaria è una metodica sperimentale pertanto per la sua determinazione viene impiegato lo stesso macchinario (BRAHMS PCT sensitive KRYPTOR) utilizzato per il dosaggio della PCT plasmatica ed inoltre vengono seguite le stesse tecniche di preparazione del campione.

Il valore dosato di procalcitonina urinaria viene in seguito messo in relazione con il valore di procalcitonina plasmatica del medesimo paziente al fine di valutare il rapporto tra le due concentrazioni, oggetto del nostro Studio.

CAPITOLO 5: RISULTATI

5.1 POPOLAZIONE COMPOSTA DA VOLONTARI SANI

Il dosaggio della procalcitonina plasmatica mediante kit BRAHMS selective KRYPTOR, l'urinocoltura e l'esame standard delle urine eseguiti sulla popolazione composta da 10 volontari sani hanno mostrato i seguenti risultati:

- **PROCALCITONINA PLASMATICA:** valori compresi tra 0,02 ng/mL e 0,04 ng/mL con media 0,032 ng/mL (v.n. fino a 0,5 ng/ml);
- **URINOCOLTURA:** negativa in 10 soggetti su 10;
- **ESAME STANDARD DELLE URINE:**
 - Glucosio assente in 10 soggetti su 10 (v.n. assente);
 - pH urinario con range tra 5,5 e 7,0 e valore medio di 6,00 (v.n. 5,5-7);
 - Chetoni assenti in tutti i soggetti (v.n. assenti);
 - Albumina assente in tutta la popolazione campionaria (v.n. fino a 15mg/dL);
 - Bilirubina assente in tutti i soggetti (v.n. assente);
 - Emoglobina assente in tutti i soggetti (v.n. assente);
 - Urobilinogeno presente in quantità esigua in 4 soggetti su 10 ma sempre entro il limite del valore massimo di riferimento (tutti e 4 con valore 0,2

- EU/dL; v.n. fino a 0,2 EU/dL);
- Nitriti assenti in tutti i soggetti (v.n. assenti);
 - Peso specifico fuori dall'intervallo di riferimento in 2 soggetti su 10 (1 con valore 1,026 ed 1 con valore 1,012). Valore medio 1,020 (v.n. 1,015-1,025);
 - Normale colore giallo paglierino in tutti e 10 i soggetti;
 - Normale aspetto limpido in tutti e 10 i soggetti;
 - Eritrociti presenti in minima quantità in 3 soggetti su 10, ma sempre al di sotto del limite massimo di riferimento (2 soggetti con 5 eritrociti/ μ L ed 1 con 3 eritrociti/ μ L; v.n. fino a 20/ μ L);
 - Presenza di un'esigua quantità di leucociti in 2 soggetti su 10, ma sempre inferiore al limite massimo di riferimento (1 con 5 leucociti/ μ L e l'altro con 9/ μ L; v.n. fino a 20/ μ L);
 - Cellule epiteliali (v.n. fino a 40/ μ L), cilindri (v.n. fino a 3/ μ L) e cristalli (v.n. fino a 40/ μ L) assenti in tutti e 10 i soggetti.

A tutta la popolazione campionaria è stato eseguito anche l'esame emocromocitometrico al fine di escludere la presenza di un'infezione batterica. I risultati hanno evidenziato leucociti e percentuale di neutrofili nei range di normalità in tutti i soggetti; leucociti tra 4.530/ μ L e 8.900/ μ L con media 7.170/ μ L (v.n. 4.500-10.000/ μ L) e percentuale di neutrofili tra 55,5 e 69,9 con media 58,8 (v.n. 40,0-75,0 %).

In ultima analisi è stato effettuato il dosaggio della creatinina plasmatica per il monitoraggio della funzione renale in quanto la compromissione renale

rappresenta criterio di esclusione dallo studio. I dati hanno riscontrato creatininemia entro i normali parametri di riferimento in tutta la popolazione campionaria; valori compresi tra 0,61mg/dL e 0,87 mg/dL con media 0,72 mg/dL (v.n. 0,50-0,90 mg/dL).

5.2 – POPOLAZIONE COSTITUITA DA PAZIENTI CHE HANNO SUBITO UN INTERVENTO DI CHIRURGIA MINORE

I dosaggi effettuati sui 15 pazienti sottoposti ad un intervento di chirurgia minore ricoverati nell'unità di Terapia Sub-Intensiva hanno riportato i seguenti risultati:

- **PROCALCITONINA PLASMATICA:** valori compresi tra un minimo di 0,04 ng/mL ed un massimo di 0,10 ng/mL con media di 0,074 ng/mL (v.n. fino a 0,5 ng/mL);
- **URINOCOLTURA:** negativa in tutti e 15 i soggetti;
- **ESAME URINE STANDARD:**
 - glucosio assente in tutta la popolazione campionaria (v.n. assente);
 - pH: compreso tra 5,5 e 7,0 (quindi sempre all'interno del range di normalità) con media di 6,4 (v.n. 5,5-7,0);
 - chetoni assenti in tutti i pazienti (v.n. assenti);

- albumina assente in tutti i pazienti (v.n. fino a 15 mg/dL);
- bilirubina assente in tutti i pazienti (v.n. assente);
- presenza di emoglobinuria in 9 soggetti su 15 con valori che variavano da un minimo di 0,06 mg/dL ad un massimo di 0,50 mg/dL con media di 0,25 mg/dL (v.n. assente);
- lieve presenza di urobilinogeno in tutti e 15 i casi ma valori sempre all'interno dell'intervallo di normalità (tutti i soggetti riportavano urobilinogeno 0,2 EU/dL; v.n. fino a 0,2 EU/dL);
- nitriti assenti in tutta la popolazione campionaria (v.n. assenti);
- peso specifico leggermente inferiore ai valori di riferimento in 9 casi su 15: range totale compreso tra 1,009 e 1,019 con media 1,014 (v.n. 1,015-1,025);
- normale colore paglierino in 12 soggetti ed urine incolore nei 3 rimanenti;
- normale aspetto limpido in tutta la popolazione campionaria;
- eritrociti superiori ai valori di riferimento in 9 casi su 15: range variabile tra 3/ μ L e 180/ μ L con media 81/ μ L (v.n. fino a 20/ μ L);
- lieve presenza di leucociti in 12 pazienti ma sempre all'interno del range di normalità (v.n. fino a 20/ μ L);

-assenza di cellule epiteliali (v.n. fino a 40/ μ L), cilindri (v.n. fino a 3/ μ L) e cristalli (v.n. fino a 40/ μ L) in tutta la popolazione post-chirurgica minore.

L'emocromo, esame compreso tra le analisi di routine eseguite durante il ricovero in Terapia Sub-intensiva, mostrava leucociti al di sopra dei normali parametri di riferimento (v.n. 4.500/ μ L-10.000/ μ L) in 10 soggetti su 15: l'intervallo variava tra un minimo di 5.780/ μ L ed un massimo di 11.970/ μ L con valore medio attestatosi sui 10.054/ μ L; la percentuale di neutrofili, superiore ai parametri normali in 12 casi su 15 andava, invece, da 58,7 a 89,9 con una media del 79,2% (v.n. 40,0%-75,0%).

Tra le analisi di routine è compreso anche il dosaggio della creatinina plasmatica; i risultati ottenuti sono stati i seguenti: valori compresi nell'intervallo tra 0,67 mg/dL e 0,82 mg/dL con media 0,77 mg/dL (v.n. 0,50-0,90 mg/dL).

I punteggi SOFA (Sequential Organ Failure Assesment), calcolati al fine di monitorare il funzionamento o il danno d'organo dei pazienti ricoverati nelle unità di Terapia Intensiva e di Terapia Sub-Intensiva, andavano da 0 a 2 con media 1,6, mentre i punteggi SAPS (Simplified Acute Physiology Score) II, progettati per misurare la gravità della malattia nei medesimi pazienti, variavano in un intervallo compreso tra 13 e 21 con media 16.

5.3 - POPOLAZIONE COSTITUITA DA PAZIENTI SETTICI

Le analisi effettuate sulla popolazione costituita da 20 pazienti settici (di cui 10 con sospetta infezione delle vie urinarie) hanno mostrato:

- **URINOCOLTURA:** negativa in 10 pazienti e positiva nei rimanenti 10; per quanto riguarda i 10 soggetti positivi la diagnosi è stata: 3 casi di IVU dovuti a *Escherichia coli*, 3 a *Pseudomonas aeruginosa*, 2 ad Enterococchi (1 ad *Enterococcus faecalis* ed 1 ad *Enterococcus faecium*), 1 a *Citrobacter koseri* ed infine 1 dovuto a co-infezione da *Escherichia coli* ed *Enterococcus faecalis*.

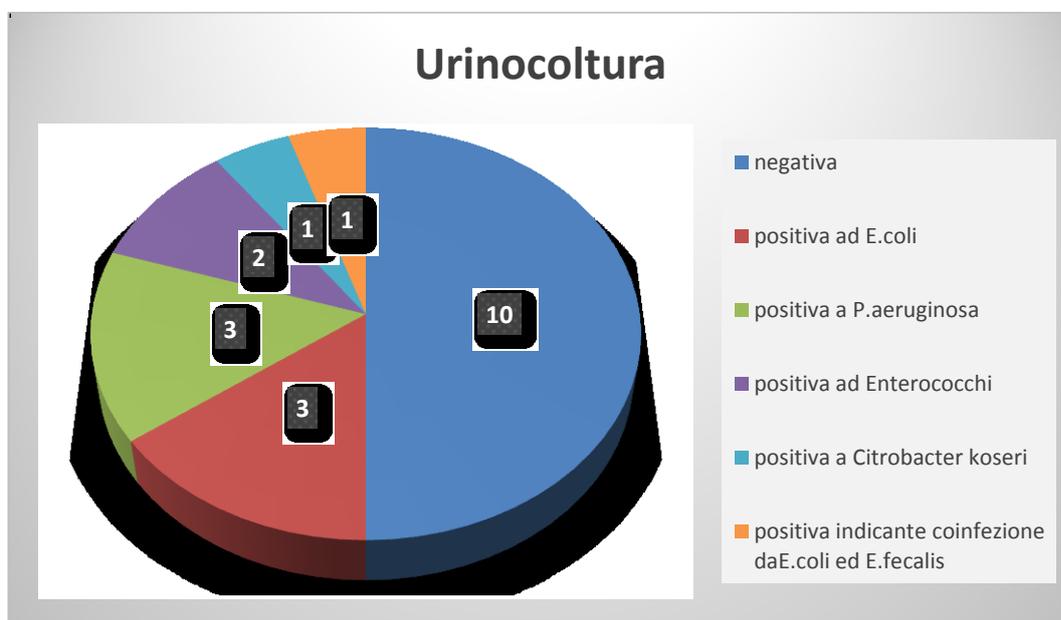


Figura 28: Rappresentazione schematica della suddivisione della popolazione costituita da pazienti settici in base ai risultati dell'urinocoltura.

- **PROCALCITONINA PLASMATICA:** i valori della PCT plasmatica variavano da un minimo di 0,06 ng/mL ad un massimo di 25,72 ng/mL con media di 4,4 ng/mL. Nei soggetti con urinocoltura negativa il range andava da un minimo di 1,32 ng/mL ad un massimo di 25,72 ng/mL con valore medio di 8,23 ng/mL mentre nei pazienti con urinocoltura positiva l'intervallo era compreso tra 0,06 ng/mL e 1,31 ng/mL con media di 0,52 ng/mL.
- **ESAME STANDARD DELLE URINE:** i pazienti con urinocoltura negativa presentavano:
 - glicosuria assente in tutti e 10 i soggetti;
 - pH urinario compreso tra 4,5 e 7 con media 5,3;
 - assenza di chetoni in tutti e 10 i casi;
 - albuminuria osservata in 4 casi su 10;
 - assenza di bilirubina in tutti e 10 i pazienti;
 - lieve emoglobinuria in tutti i soggetti con media di 0,3 mg/dL;
 - urobilinogeno presente in 2 pazienti con valore medio di 0,46 mg/dL;
 - assenza di nitriti in 10 soggetti su 10;

- peso specifico variabile tra 1,007 e 1,044 con media di 1,017;
- urina color giallo paglierino in 8 pazienti, colore giallo scuro in 1 e assenza di colorazione nel soggetto rimanente;
- limpidezza in 7 soggetti ed aspetto velato in 3;
- presenza di eritrociti in 10 pazienti su 10 con media di 365,1/ μ L (range variabile da un minimo di 5/ μ L ad un massimo di 3.197/ μ L);
- leucociti presenti in tutta la popolazione con urino coltura negativa con media di 70,9/ μ L (intervallo compreso tra 5/ μ L e 327/ μ L);
- assenza di cellule epiteliali, cilindri e cristalli in tutti i soggetti.

Nei pazienti con urinocoltura positiva si rilevava invece:

- glicosuria in 2 soggetti su 10;
- pH urinario compreso tra 5 e 7,5 con valore medio 6,25;
- assenza di chetoni in 10 casi su 10;
- lieve presenza di albumina in 5 soggetti;
- presenza di bilirubina in un paziente;
- urobilinogeno presente in 4 casi su 10 con valore medio di 1,22 mg/dL;
- nitriti in 3 soggetti su 10;
- peso specifico variabile tra 1,009 e 1,021 con media 1,014;

-normale colorazione giallo paglierino in 7 casi e assenza di colore nei 3 rimanenti;

-normale aspetto limpido in 3 pazienti, velato in altri 3 e torbido nei 4 soggetti rimanenti;

-eritrociti in tutta la popolazione con urinocoltura positiva con intervallo compreso tra 17/ μ L e 303/ μ L e valore medio 87,6/ μ L;

-leucocituria anche essa presente in tutta la popolazione con urinocoltura positiva con valori variabili tra 5/ μ L e 673/ μ L e media di 164,1/ μ L;

-assenza di cellule epiteliali, cilindri e cristalli in tutti i pazienti ma presenza di batteruria in 2 casi su 10.

- **PCT URINARIA:** Nei 20 pazienti settici in contemporanea alle analisi precedentemente elencate è stata effettuata anche la misurazione della procalcitonina urinaria al fine di verificare con quale significatività i soggetti con urinocoltura positiva mostrino una concentrazione di procalcitonina urinaria superiore alla concentrazione di procalcitonina plasmatica.

I dosaggi eseguiti hanno riportato valori di procalcitonina urinaria variabili tra un minimo di 0,13 ng/mL ed un massimo di 2,54 ng/mL con

media di 1,07 ng/mL. Nei pazienti con urinocoltura positiva le concentrazioni di PCT urinaria variavano in un intervallo compreso tra 0,36 ng/mL e 2,54 ng/mL con media 1,69 ng/mL mentre nei pazienti con urinocoltura negativa il range era compreso tra 0,13 ng/mL e 0,96 ng/mL con media 0,45 ng/mL.

In tutti e 10 i soggetti con urinocoltura positiva la PCT urinaria si è mostrata più elevata della corrispondente PCT plasmatica al contrario di quanto si è verificato nei pazienti con urinocoltura negativa in cui i valori di PCT urinaria sono risultati minori dei corrispondenti valori di PCT plasmatica in 10 casi su 10. Nella prima categoria il rapporto PCTur/PCTplasm variava tra 1,64 e 25,33 con valore medio di 7,32 mentre nella seconda popolazione il rapporto PCTur/PCTplasm andava da un minimo di 0,01 ad un massimo di 0,34 con valore medio di 0,12.

L'esame emocromocitometrico facente parte delle indagini di routine eseguite nei pazienti settici evidenziava leucociti e percentuale di neutrofilii significativamente al di sopra dei parametri di riferimento in tutta la popolazione campionaria. Il range della concentrazione leucocitaria variava tra 12.290/ μ L e 22.100/ μ L con media 15.524/ μ L, mentre la percentuale di neutrofilii si attestava tra 71,5 e 93,6 con valore medio di 85,4%.

Tra gli esami di routine effettuati durante la degenza è compreso anche il dosaggio della creatinina plasmatica che ha riportato valori di creatininemia compresi nei normali intervalli di riferimento (v.n. 0,50-0,90 mg/dL) in tutta la popolazione

campionaria costituita da pazienti settici: i parametri riscontrati variavano tra 0,54 mg/dL e 0,79 mg/dL con media 0,63 mg/dL.

La temperatura corporea media dei soggetti era 38,9°C con range compreso tra 38,2° C e 39,6° C.

I punteggi SOFA andavano da 5 a 13 con media di 11 mentre i punteggi SAPS II variavano in un intervallo compreso tra 37 e 74 con media 67.

CAPITOLO 6: DISCUSSIONE DEI DATI

6.1 – RELAZIONE TRA AUMENTO DEI VALORI DI PROCALCITONINA PLASMATICA E DIAGNOSI DI SEPSI

Il primo obiettivo che il nostro studio clinico si propone è verificare la relazione di proporzionalità esistente tra aumento delle concentrazioni di procalcitonina plasmatica e maggiore gravità dell'infezione batterica al fine di evidenziare l'utilità della PCT come biomarker precoce nella diagnosi di sepsi.

L'analisi dei dati riguardanti la popolazione campionaria composta da 10 volontari sani evidenzia che soggetti con esame emocromocitometrico indicativo di assenza di infezione batterica, urinocoltura negativa ed esame delle urine standard nella norma mostrano valori di Procalcitonina plasmatica al di sotto della soglia di rilevamento analitico ($<0,05$ ng/mL) in 10 casi su 10 (valore medio riscontrato 0,03 ng/mL).

Pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia minore ricoverati nel reparto di Terapia Sub-Intensiva mostrano valori di PCT plasmatica leggermente più elevati con media attestata su un valore di 0,07 ng/mL. Tale valore sebbene sia al di sopra della soglia di rilevamento analitico si colloca ampiamente al di sotto del cut-off per la diagnosi di sepsi (0,5 ng/ml). L'esame delle urine standard mostra in

alcuni casi presenza di eritrociti e di emoglobinuria; sebbene entrambe queste condizioni possano porre il sospetto di IVU, la presenza di infezioni del tratto urinario è esclusa dall'urinocoltura risultata negativa in tutti i pazienti. L'esame emocromocitometrico evidenzia un lieve aumento della concentrazione leucocitaria e della percentuale di neutrofili in tutta la popolazione campionaria ma questo non implica una diagnosi di infezione batterica in quanto è compatibile con la condizione di stress provocata dall'intervento chirurgico che comporta, appunto, aumento dei leucociti e della percentuale di neutrofili. Questi pazienti hanno inoltre punteggi SOFA e SAPS II molto bassi e ciò mette in risalto le loro buone condizioni di salute. Il lieve aumento dei livelli di procalcitonina è pertanto dovuto allo stress fisico causato dalla chirurgia.

Completamente diversa è la situazione nei 20 pazienti ricoverati nell'unità di Terapia Intensiva dove le concentrazioni di procalcitonina plasmatica raggiungono valori molto alti con media di 4,38 ng/mL. Poiché l'esame emocromocitometrico riflette in tutti i soggetti concentrazioni leucocitarie molto elevate (range tra 12.290/ μ L e 22.100/ μ L con media 15.524/ μ L) ed un'altissima percentuale di granulociti neutrofili (media 85,4%) in concomitanza di temperature corporee sempre al di sopra dei 38° C (range compreso tra 38,2° C e 39,6° C) i criteri per porre diagnosi di sepsi sono soddisfatti e la relazione esistente tra aumento dei valori di procalcitonina plasmatica e gravità dell'infezione batterica risulta confermata. Urinocoltura ed esame delle urine standard evidenziano inoltre che 10 di questi pazienti sono affetti da IVU. In questo gruppo di pazienti, a differenza dei soggetti sottoposti ad interventi di

chirurgia minore, i punteggi SOFA e SAPS II risultano molto alti e questo sta a significare che la PCT oltre ad essere un importante indicatore della gravità dell'infezione batterica è anche un ottimo indicatore del rischio di mortalità.

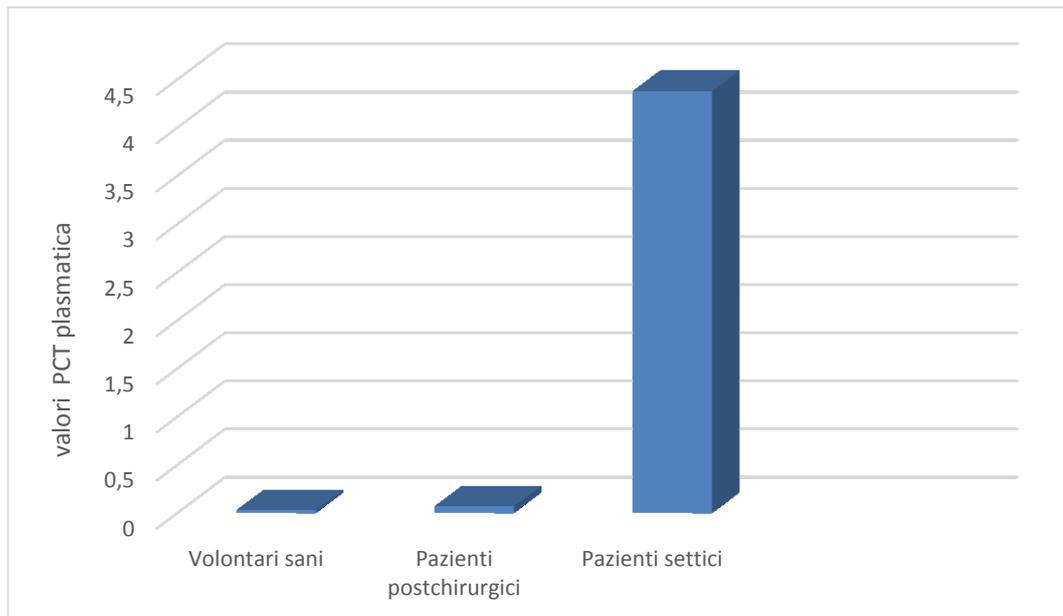


Figura 29: Relazione tra aumento dei valori di procalcitonina plasmatica e diagnosi di sepsi.

6.2 – RELAZIONE TRA PROCALCITONINA PLASMATICA E PROCALCITONINA URINARIA NELLA POPOLAZIONE COSTITUITA DA PAZIENTI SETTICI

In base all'ipotesi che in presenza di IVU le cellule immunitarie dell'apparato urinario producano un eccesso di procalcitonina che va a riversarsi nelle urine provocando, di conseguenza, una concentrazione di PCT urinaria più elevata rispetto a quella plasmatica, lo studio si propone, inoltre, di valutare la relazione esistente tra procalcitonina plasmatica e procalcitonina urinaria al fine di dimostrare che nei soggetti settici con urinocoltura positiva il valore della procalcitonina urinaria superi il valore della procalcitonina plasmatica, contrariamente a quanto accade nella popolazione settica risultata negativa all'urinocoltura.

A conferma di quanto atteso, i risultati ottenuti nella popolazione con urinocoltura positiva hanno mostrato concentrazioni di PCT urinaria più elevate rispetto alle corrispondenti concentrazioni di PCT plasmatica in tutti e 10 i soggetti, mentre, al contrario, i dosaggi effettuati nei 10 pazienti con urinocoltura negativa hanno riportato valori di procalcitonina urinaria inferiori ai corrispondenti valori di procalcitonina plasmatica in 10 casi su 10.

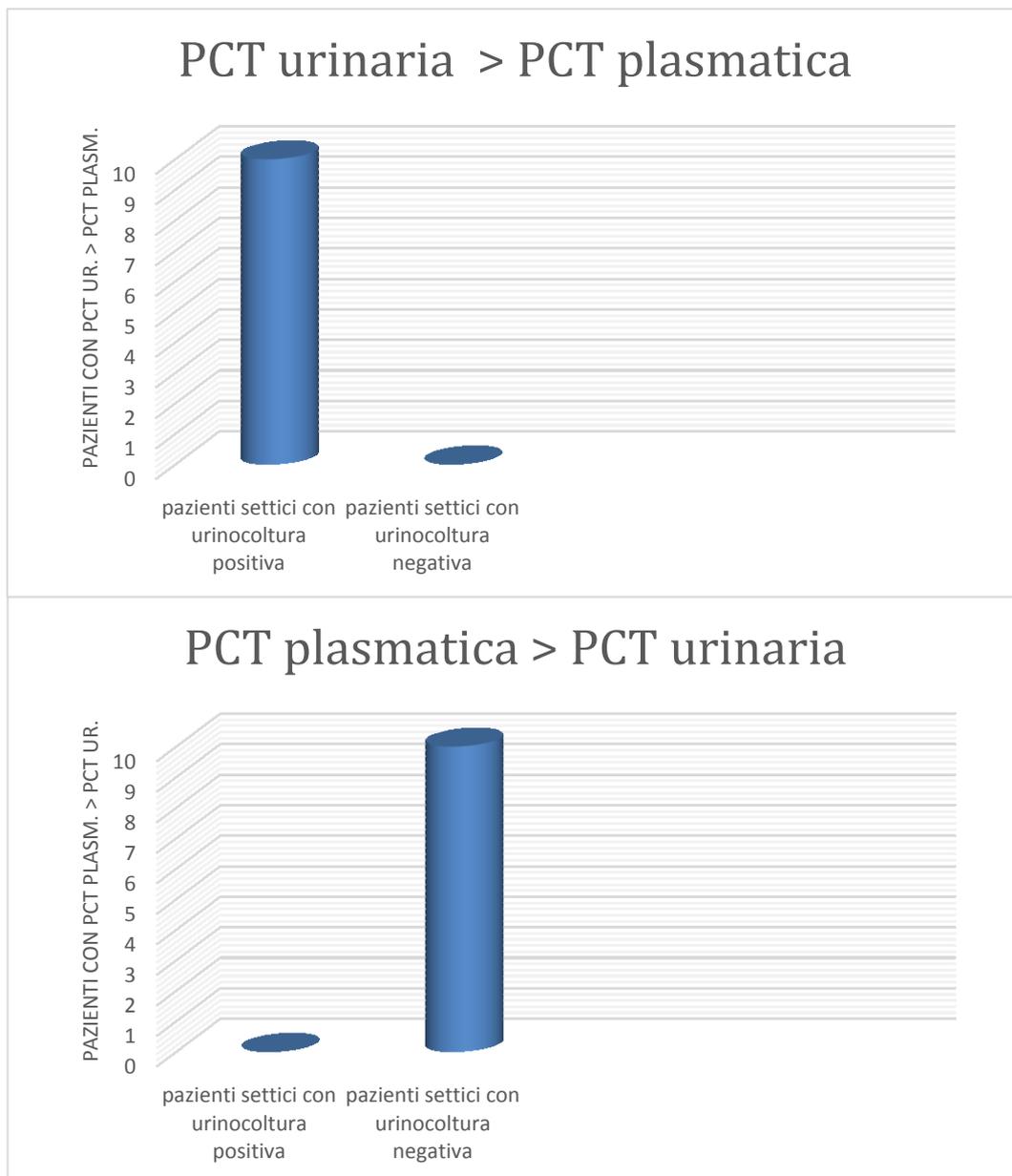


Figura 30: Relazione tra procalcitonina plasmatica e procalcitonina urinaria nella popolazione costituita da pazienti settici.

Nella prima categoria, infatti, la media del rapporto PCT urinaria/ PCT plasmatica si attestava su un valore di 7,32 con un range variabile tra 1,64 e 25,33 mentre nel

secondo gruppo di pazienti tale rapporto appariva significativamente inferiore ad 1 attestandosi su un valore medio di 0,12 con range variabile tra 0,01 e 0,34.

In base ai dati ottenuti abbiamo intrapreso un'analisi statistica al fine di identificare con quale sensibilità e con quale specificità il rapporto PCTur./PCTplasm. >1 costituisca un test in grado di diagnosticare un'infezione delle vie urinarie.

	Pz. con urinocoltura positiva	Pz. con urinocoltura negativa	Totale
PCTur.>PCTplasm.	A	B	A+B
PCTur.<PCTplasm.	C	D	C+D
Totale	A+C	B+D	

	Pz. con urinocoltura positiva	Pz. con urinocoltura negativa	Totale
PCTur.>PCTplasm.	10	0	10
PCTur.<PCTplasm.	0	10	10
Totale	10	10	

Tabelle 6 e 7: Analisi statistica

La sensibilità, ovvero la probabilità che un paziente con urinocoltura positiva abbia rapporto PCT urinaria/PCT plasmatica > 1 , è definita dal rapporto $A/A+C$ pertanto nel nostro caso abbiamo:

$$\text{Sensibilità} = 10 / (10+0) = 1 \text{ ossia il } 100\%$$

La specificità, ovvero la probabilità che un soggetto con urinocoltura negativa abbia rapporto PCT urinaria/PCT plasmatica < 1 , è invece definita dal rapporto $D/B+D$ pertanto nel nostro caso abbiamo:

$$\text{Specificità} = 10 / (0+10) = 1 \text{ ossia il } 100\%.$$

Si può pertanto concludere che il dosaggio della PCT urinaria rappresenta uno strumento diagnostico estremamente sensibile e specifico capace d'identificare in modo rapido ed accurato la presenza di infezioni del tratto urinario e di migliorare l'outcome dei pazienti che ne sono affetti.

CONCLUSIONI

La procalcitonina plasmatica si conferma ancora una volta, come ampiamente descritto in letteratura, un marcatore sensibile, specifico, altamente accurato e con elevato valore predittivo sia positivo che negativo per la diagnosi di sepsi; oltre a queste caratteristiche il suo dosaggio costituisce un esame estremamente rapido e ciò è fondamentale in reparti come la Terapia Intensiva dove la diagnosi urgente rappresenta la massima priorità al fine di poter definire in maniera altrettanto veloce l'urgenza del trattamento.

Pazienti con infezioni del tratto urinario presentano valori di PCT urinaria maggiori dei corrispondenti valori di PCT plasmatica e questo molto probabilmente è dovuto al fatto che in caso di IVU le cellule dell'apparato urinario producono un eccesso di procalcitonina che va a riversarsi nelle urine determinando, di conseguenza, una concentrazione più elevata rispetto a quella plasmatica. A questa scoperta può pertanto conseguire la messa a punto di un nuovo strumento diagnostico capace di evidenziare in meno di 30 minuti un'eventuale infezione del tratto urinario.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Meisner M.: "Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin". *Clin Chim Acta* 2002; 323: 17-29
- 2) Le Moullec J.M., Julienne A, Ghenais J., Lasmoles F. Guliana J.M., Milhaud G., Moukhtar M.S.: "The complete sequence of human procalcitonin" *FEBS Lett* 1984; 167: 93-97
- 3) Broad P.M., Symes A.J., Thakker R.V., Craig R.K.: "Structure and methylation of the human calcitonin alpha-CGRP gene" *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6999-7051
- 4) Meisner M.: "Procalcitonin-Biochemistry and clinical diagnosis" *Uni-Med* 2010.
- 5) Meisner M.: "La Procalcitonina nella diagnostica e nel monitoraggio delle infezioni gravi. Aspetti biochimici e clinici" *Brahms diagnostica* 2001, 3° edizione
- 6) Rostwurm S., Wiedermold M., Oberhoffer M., Stonans I., Zipfel P.F. et al.: "Molecular aspects and natural source of procalcitonin". *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 789-797.
- 7) Bergmann A., Bonuon C.; "Decrease of serum dipeptylpeptidase activity in severe sepsis patients: relationship to procalcitonin", *Clin Chim Acta* 2002; 321: 123-126.
- 8) Silomon M., Bach F., Ecker D., Graeter T., Grundmann U., Larsen R.: "Procalcitonin after Extracorporeal circulation. Synthesis in the hepatosplanchnic region" *Anaesthesist* 1999; 48: 395-398.
- 9) Neupert K.: "Bestimmung der Konzentrationen von Procalcitonin (PCT) im ultrasensitiven Bereich bei ambulanten und fruhstationaren patienten dissertation, Universitat Jena , Germany 2009.
- 10) Muller B., Becker K.L., Schalhinger H., Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli VI. et al.: "Calcitonin precursor are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit". *Crit Care Med* 2000; 28: 977-983.
- 11) Muller B., White J.C., Nylén E.S., Snider R.H., Becker K.L., Habener J.F.: "Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis". *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 396-404.
- 12) Oberhoffer M., Stonans I., Russwurm S., Stonane E., Vogelsang H., Junker U., Jager L., Reinhart K: "Procalcitonin Expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro". *J Lab Clin Med* 1999; 134 (1): 49-55.
- 13) Dandona P., Nix D., Wilson MF., Alijada A., Loue J. et al. : "Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects". *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 88: 670-671.
- 14) Linscheid P., Seboek D., Nylén E.S., Langer I., Schatter M., Becker K.L. "In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymall cells: a novel product of human adipose tissue". *Endocrinology* 2003; 144 (12): 5578-5584.

- 15) Moulin F., Raymond J., Lorrot M., Marc E., Cosse J., Iniquez J.L., Kalifa G., Bohuon C., Gendres D.: "Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneumonia". *Arch Dis Child* 2001; 84: 332-336.
- 16) Wiedermann F.J., Kaneider N., Egger P., Tiefenthaler W., Wiedermann C., Lindner K.N. et al.: "Migration of human monocytes in response to procalcitonin". *Crit Care Med* 2002; 30: 1112-1117.
- 17) Hoffmann G., Totzke G., Seibel M., Smolny M., Wiedermann F.J., Schobersberger W.: "In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin". *Crit Care Med* 2001; 29: 112-116.
- 18) Hoffmann G., Czechowski M., Schloesser M., Schobersberger W. : "Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells". *Crit Care Med* 2002; 30: 2091-2095.
- 19) Sexton P.M., Christopoulos G., Christopoulos A., Nylen E.S., Snider R.H., Becker K.L.: "Procalcitonin has bioactivity at calcitonin receptor family complexes. Potential mediator implication in sepsis". *Crit Care Med* 2008; 36: 1637-1640.
- 20) Nylen E.S., Whang K.T., Snider R.H., Steinwald P.M., White J.C., Becker K.L.: "Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis". *Crit Care Med* 1998; 26(6): 1001-1006.
- 21) Steinwald P.M., Whang K.T., Becker K.L., Snider R.H., Nylen E.S., White J.C.: "Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis". *Crit Care* 1999; 35: 11-16.
- 22) Becker K.L., Nylen E.S., Snider R.H., Muller B., White J.C.: "Immunoneutralisation of procalcitonin as therapy of sepsis". *J Endotoxin Research* 2003; 9(6): 367-374.
- 23) Martinez J.M., Wagner K.E., Snider R.H., Nylen E.S., Muller B., Sarani B., et al. "Late immunoneutralization of procalcitonin arrests the progression of lethal porcine sepsis" *Surgical infection* 2001; 2(3): 193.
- 24) Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R.: "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence outcome, and associated costs of care". *Crit Care Med* 2001; 29:1303-1310.
- 25) Engel C., Brunkhorst F.M., Bone H.G., Brunkhorst R., Gerlach h., Grond et al: "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study". *Intensive Care Med* 2007; 33: 606-618.
- 26) Diekema D.J., Beekmann S.E., Chapin K.C., Morel K.A., Munson E., Doern G.V.: "Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream-infection". *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3655-3660.
- 27) Wang P., Yang Z.T., He Y.g., Shu C.M.: "Pitfalls in the rapid diagnostic of positive blood culture". *Rev Med Microbiol* 2010; 21(3): 39-43.

- 28) Bone R.C., Sibbald W.J. Sprung C.L.: "The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure". *Chest* 1992; 101(6): 1481-1483.
- 29) Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G.: "2001 SSCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference" *Crit Care Med* 2003; 31(4): 1250-1256.
- 30) Bates D.W., Sands K., Miller E., Lancken P.N., Hibberd P.L., Graman P.s. et al "Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome". *J infect dis* 1997; 176: 1538-1551.
- 31) Bennett I.L., Beeson R.B.: "Bacteremia a consideration of some experimental and clinical aspects". *Yale J Biol Med* 1954; 262: 241-262.
- 32) Jaimes F., Arango C., Ruiz G., Cuervo J., Botero J., Velez G. et al "Predicting Bacteremia at the bedside". *Clin Infect Dis* 2004; 38: 357-62.
- 33) Mackowiack P.A.: "Concepts of fever". *Arch Int Med* 1998; 158: 1870-1881.
- 34) Riedel S., Bourbeau P., Schwartz B., Brecher S., Carrol K.C., Stamper P.D. et al: "Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia". *J Clin Microbiol* 2008; 46(4): 1381-1385.
- 35) Magadia R.R., Weinstein M.P., "Laboratory diagnostic of bacteremia and fungemia". *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1009-1024.
- 36) Bossink A.W., Groeneweld A.B., Hack C.E., Thijs L.G.: "The clinical host response to microbial infection in medical patients with fever". *Chest* 1999; 116: 380-390.
- 37) Gaietto-Lacour A., Zamora S.A., Gervais A.: "Bedside procalcitonin and C-reactive protein tests in children with fever without localizing signs of infection seen in a referral center". *Pediatrics* 2003; 112: 1054-1060.
- 38) Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M.: "The epidemiology of sepsis in the United States from 1970 through 2000" *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554.
- 39) Marshall J.C., Vincent J.L., Mitchell P.F., Cook D.J., Rubinfeld G., Foster D., et al: "Measure, markers, and mediator: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the fifth Toronto sepsis roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000". *Crit Care Med* 2003; 31 (5): 1560-1567.
- 40) Ho K.M., Lipman J.: "An update on C-reactive protein for intensivists". *Anaesth Intensive Care* 2009; 37: 234-241.

- 41) Limper M., de Kruif M.D., Duits A.J., Brandjes D.P.M., Van Gorp E.C.M.: "The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infection at the emergency department". *J Am Geriatr Soc* 2010 b; 58(3): 518-522.
- 42) Kim K.E., Han J.Y.: "Evaluation of the clinical performance of an automated procalcitonin assay for the quantitative detection of bloodstream infection". *Korean J Lab Med* 2010; 30(2): 153-159.
- 43) Vincent J.L., Habib A.M., Verdant C., Brauhn A.: "Sepsis diagnosis and management: work in progress". *Minerva Anesthesiol* 2006 Mar; 72(3): 87-96.
- 44) Assicot M., Gendrel D., Carsin H., Raymond J., Guilbaud J., Bohuon C.: "High serum procalcitonin concentrations in patient with sepsis and infection". *Lancet* 1993; 341: 515-518.
- 45) Chesney R.W., McCarron D.M., Haddad J.G., Hawker C.D., Di Bella F.P., Chesney P., Davis J.P.: "Pathogenic mechanism of the hypocalcemia of the staphylococcal toxin-shock syndrome". *J Lab Clin Med* 1983; 101: 576-585.
- 46) Heisner M., Lohs T., Huettemann E., Schmidt J., Hueller M., Reinhart K.: "The plasma elimination rate and urinary secretion of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function". *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 79-87.
- 47) Becker K.L., Snider R., Nysten E.S.: "Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations". *Crit Care Med* 2008; 36: 941-952.
- 48) Meisner M., Schmidt J., Huettner H., Tschalkowsky K.: "The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function". *Intensive Care Med* 1999; 26(suppl): 212-216.
- 49) Harbart S., Holeckova K., Froidevaux C., Pittet D., Ricou B., Grau G.E., Vadas L., Pugin J.: "Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis". *Am J Respir Crit Care Med Geneva Sepsis Network* 2001; 164(3): 396-402.
- 50) Schneider H.G., Lam Q.T.: "Procalcitonin for the clinical laboratory A review". *Pathology* 2007; 39: 383-390.
- 51) Weglohner W., Struck J., Fischer-Schulz C., Morgenthaler N.G., Otto A., Bohuon C., Bergmann A.: "Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis". *Peptides* 2001; 22(12): 2099-2103.
- 52) Tschalkowsky K., Hedwig-Geissing M., Schiele A., Bremer F., Schywalsky M., Schutter J.: "Coincidence of pro- and anti-inflammatory response in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in

- T-cells subsets in septic and postoperative patients". *Crit Care Med* 2002; 30(5): 1015-1023.
- 53) Simon L., Gauvin F., Amre D.K., Saint-Louis P., Lacroix J.: "Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis". *Clin Infect Dis* 2004; 39(2): 206-217.
 - 54) Van Dissel J.T.: "Procalcitonin and other markers of infection. What should be their role in clinical practice?". *Clin Microb Infect Dis* 2002; 8: 70-73.
 - 55) Brunk Horst F.M., Eberhard O.K., Brunkhorst R.: "Early identification of biliary pancreatitis with PCT". *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1191-1192.
 - 56) Brunkhorst F.M., Forycki Z.F., Beiber W., Wagner J.: "Early identification of biliary pancreatitis with PCT. A new inflammatory parameter". *Gut* 1995; 37 (suppl.2). 111.
 - 57) Brunkhorst F.M., Forycki Z.F., Wagner J.: "Discrimination of infectious and non infectious of the adult respiratory distress syndrome (ARDS) with procalcitonin immunoreactivity". *Clin Intens Care* 1995; 6: 3.
 - 58) Rau B., Steinbach G., Gansauge F., Mayer J.M., Grunert A. et al.: "The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected in acute pancreatitis". *Gut* 1997; 41: 832-840.
 - 59) Fuchs D., Watcher H.: "Neopterin. Clinical laboratory diagnostics use and assessment of clinical laboratory results". Lothar Thomas (ed), Ast edition, TH-Books 1998: 707-710.
 - 60) Gramm H.J., Dollinger P., Beier W.: "Procalcitonin-a new marker of host inflammatory response. Longitudinal studies in patients with sepsis and peritonitis". *Chir Gastroenterol* 1995; 11(suppl.2): 51-54.
 - 61) Foushee J.A., Hope N.H., Grace E.E.: "Applying biomarkers to clinical practice: a guide for utilizing procalcitonin assays". *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2560-2569.
 - 62) Gramm H.J., Hannemann L.: "Activity markers for the inflammatory host response and early criteria for sepsis". *Clin Intens Care* 1996; 7(suppl.1): 1-3
 - 63) Zeni F., Viallon A., Assicot M., Tardy B., Vindimian M. et al. "Procalcitonin serum concentration and severity of sepsis". *Clin Intens Care* 1994; 5(suppl.2): 89-88.
 - 64) Matwiyoff G.N., Prah J.D., Miller R.J., Carmichael J., Amundson D.E., Seda G., Danesnia M.: "Immune regulation of procalcitonin: a biomarker and mediator of infection". *Inflamm Res* 2012; 61: 401-409.

- 65) Pugin J., Meisner M., Leon A., Gendrel D., Fernandez Lopez A., "Guida all'uso clinico della procalcitonina (PCT)". Thermo Scientific 2001; 7° Edizione: 5-18.
- 66) Matthaiou D. K., Dimopoulos G. : "An ESICM systematic review and meta-analysis of procalcitonin-guided antibiotic therapy algorithms in adult critically ill patients". Intensive Care Med 2012; 38 (6): 940-949.
- 67) Sandifer J.P., Jones A.E.: "Can procalcitonin levels guide antibiotic therapy in bacterial infections and reduce antibiotic overconsumptions without having a negative effect on clinical outcomes?" Ann Emerg Med 2012; 60 (3) :370-371.
- 68) Nobre V., Harbarth S., Graf J.D., Rohner P., Pugin J. : "Use of procalcitonin to shorten antibiotic treatment duration in septic patients: a randomized trial". Am J Respir Care Med. 2008; 177 (5): 498-505.
- 69) Albertazzi A., Porena M. : "Trattato di Medicina Interna" .Piccin Nuova Libreria S.P.A., Padova 2003 vol.7:425-435.
- 70) Naber K.G. (Chairman), Bishop M.C., Bjerkelund-Johansen T.E., Botto H., Çek M., Grabe M., Lobel B., Palou J., Tenke P. : "European Association of Urology. Guidelines on: The management of urinary and male genital tract infections". 2006.
- 71) Foxman B. : "Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs". Am F med. 2002: 113; 55-135.
- 72) Mazzulli T. : "Resistance trends in urinary tract pathogens and impact on management". J Urol 2002; 168: 1720-1722.
- 73) Haley R. W., Culver D.H., White J. W., Morgan W.M., Emori T. G. : "The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics". Am J Epidemiol 1985; 121: 159-167.
- 74) Lai K.K., Fontecchio S.A.: "Use of silver-hydrogel urinary catheters on the incidence of catheter-associated urinary tract infections in hospitalized patients". Am J Infect Control 2002, 30 (4): 221-225.
- 75) Patton J.P., Nash D.B., Abrutyn E.: "Urinary tract infection: economic considerations". Med Clin North Am 1991; 75. 495-513.
- 76) De Stefano A., Benedicti D.: "Infezione delle vie urinary in ambito ospedaliero ed ambulatoriale: eziologia e diagnosi di laboratorio". Minerva Urol Nefrol 1992; 239-244.
- 77) Schena F.P., Selvaggi F.P.: "Malattie dei reni e delle vie urinarie". Mc Graw-Hill 2003; 441-458.

- 78) Delzell J.E.: "Urinary tract infection during pregnancy". *N Engl. J Med* 2001; 345 (14): 1055-1057.
- 79) Nicolle L.E.: "Hospitalization for acute pyelonephritis in Manitoba, Canada during the period from 1898 to 1992: impact of diabetes, pregnancy and aboriginal origin". *Clin Infect Dis* 1996; 22 (6): 1051-1056.
- 80) Warren J.W.: "Catheter-associated urinary tract infection". *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17 (4): 299-303.
- 81) Merle V.: "Nosocomial urinary tract infection in urologic patients: assessment of a prospective surveillance program including 10.000 patients". *Eur Urol* 2002; 41 (5): 483-489.
- 82) Kahlmeter G.: "ECO. SENS. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS project". *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (1): 69-76.
- 83) Nicolle L.E.: "Resistant pathogens in urinary tract infections". *J Am Geriatr Soc* 2001; 50 (7 suppl), S230-S235.
- 84) Esposito S., Noviello S., Leone S.: "Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology and prevention". *Le infezioni in medicina* 2008; 3: 130-143.
- 85) Fegiz, Marrano, Ruberti: "Manuale di chirurgia generale". Piccin Nuova Libreria S.P.A. 1996; 2: 2801-2804.
- 86) Nicolle L.E.: "Uncomplicated UTI in adults including uncomplicated pyelonephritis". *Urolog Clin North Am.* 2008; 35: 1-12
- 87) Sobel D., Kaye D.: "Urinary tract infections". In: GL Mandell 1B. Raphael Dolin, ed. *Principles and practice of infectious diseases.* 2005: 875-901.
- 88) Chenoweth C.E., Saint S.: "Urinary tract infections". *Infect Dis Clin N Am* 2011; 25:103-115.
- 89) Rosser C.J., Bare R.L., Meredith J.W.: "Urinary tract infections in the critical ill patient with a urinary catheter". *Am J Surg* 1999; 177: 287-290.
- 90) Bagshaw S.M., Laupland K.B.: "Epidemiology of intensive care unit-acquired urinary tract infections". *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19: 67-71.
- 91) Garibaldi R.A., Mooney B.R., Epstein B.J., Britt M.R.: "An Evaluation of daily bacteriologic monitoring to identify preventable episodes of catheter-associated urinary tract infection". *Infect Control* 1982; 3: 466-470.

- 92) Wagenlehner F.M., Loibl E., Vogel H., Naber K.G.: "Incidence of nosocomial urinary tract infections on a surgical intensive care unit and implications for management". *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28 Suppl. T.: S86-90.
- 93) Van Der Kooi T.I., De Boer A.S., Mannien J., Wille J.C., Beaumont M.T., Mooi B.W., et al. : "Incidence and risks factors of device-associated infections and associated mortality at the infective care in the dutch surveillance system". *Infective Care Med.* 2007; 33: 271-8.
- 94) Mojtahedzadeh M., Panahi Y., Fazeli M.R., Najafi A., Pazouki M., Navehsi B.M., et al.: "Intensive care unit-acquired urinary tract infections in patients admitted with sepsis: etiology, risk factors, and patterns of antimicrobial resistance". *Int J Infect Dis* 2008; 12: 312-8.
- 95) Rosental V.D., Maki D.G., Mehta A., Alvarez-Moreno C., Leblebiciogw H., Higuera F., et al. : "International nosocomial infection control consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008". *Am J Infect Control* 2008; 36: 627-637.
- 96) Leone M., Albanese J., Garnier F., et al.: "Risk factors of nosocomial catheter-associated urinary tract infection in a polyvalent intensive care unit". *Intensive Care Med* 2003; 29: 1077-1080.
- 97) Leone M., Garnier F., Avidan M., Martin C.: "Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units". *Microbes Infect* 2004; 6 (11): 1026-1032.
- 98) Tambyah P.A.: "Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis". *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24 (suppl.1): S44-48.
- 99) Nicolle L.E.: "The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents". *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22 (5): 316-321.
- 100) Bishop M.C., Lemberger R.J.: "Urethral and soprapubic catheters". In: Pryor J.P. et al.(Ed) *Urologic prosthesis, appliances and catheters*. London: Springer; 1992. (Clinical practice in urology); 10: 73-108.
- 101) Donelli G., Francolini I., Di Carlo V., Di Rosa R., Mastrilli F., Antonelli M., Fadda G.: "Protocollo per la prevenzione, diagnosi e terapia delle infezioni associate a cateteri venosi centrali". Roma: Istituto Superiore di sanità 2002 (rapporti ISTISAN 02/34).
- 102) Costerton J.W.: "Introduction to biofilm". *Int. J Antimicrob Agents* 1999; 11: 217-221.
- 103) Davey M.E., O'Toole G.A.: "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics". *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:847-867.

- 104) Donlan R.M.: Biofilms: "Microbial life on surfaces". *Emerg Inf Dis* 2002; 8: 881-890.
- 105) Dunne M.W.: "Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately?". *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 155-166.
- 106) Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W.: "Biofilms as complex differentiated communities". *Ann Rev Microbiol* 2003; 56: 187-209.
- 107) Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. : "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm". *Science* 1998; 280: 295-298.
- 108) Yarwood J.M. , Bartels D.J., Volper E.M., Greenberg E.P. : "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms". *J Bacteriol* 2004,186:1838-1850.
- 109) Kumon I. : "Pathogenesis and management of bacterial biofilms in the urinary tract. *J Infect Chemother* 1996" ;2:18-28.
- 110) Liedberg H., Lundberg T.: "Silver coating of urinary catheters prevents adherence and growth of *Pseudomonas aeruginosa*". *Urol Res* 1989; 17:357-358.
- 111) Bologna R.A., Tu L.M., Polansky M., Fraimow H.D., Gordon D.A., Whitmore K.E.: "Hydrogel silver ion coated urinary catheter reduces nosocomial urinary tract infection rates in intensive care unit patients: a multicenter study". *Urology* 1999; 54: 982-987 .
- 112) Schaeffer A.J., Story K.O., Johnson S.M.: "Effect of silver oxide/trichloroisocyanuric acid antimicrobial urinary drainage system on catheter-associated bacteruria". *J Urol* 1988; 139, 69-73.
- 113) Akiyama H., Okamoto S: "Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection. Clinical experience with a modified Foley catheter and drainage system". *J Urol* 1979;121:40-42
- 114) Lundberg T.: "Prevention of catheter- associated urinary tract infections by use of silver-impregnated catheters". *Lancet* 2 1986;1031.
- 115) Johnson J.R., Roberts P.L., Olsen R.J., Moyer K.A., Stamm W.E.: "Prevention of catheter –associated urinary tract infections with a silver oxide-coated urinary catheter :clinical and microbiological correlates". *J Infect Dis* 1990;162:1145-1150
- 116) Takeuchi H., Hida S., Yoshida O., Ueda T. : "Clinical study on efficacy of a Foley catheter coated with silver protein in prevention of urinary tract infections". *Hinyokika Kyo* 1993;39(3) 293-298

- 117) Rupp m.E., Fitzgerald T, Marion N., et al. Effect of silver-coated urinary catheters :
“Efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance”. Am J Infect Control
2004;32(8), 445-450
- 118) Balows A., Hausler K., Iseberg H., Shadomy H.: “Manual of clinical
Microbiology” . American Society of Clinical Microbiology Washington DC 1991.
5th edition.
- 119) National Committee for Clinical Laboratory Standards. :“Urinalysis and
collection, transportation and preservation of urine specimen: approved guidelines”.
NCCLS Document GP 16-A. Villanova PA: NCCLS 1995: 51-69.
- 120) Pezio M., Wetkowsky M, Peterson E. :“ Detection of bacteruria and pyuria within
two minutes” J Clin Microb 1985; 21: 578-581
- 121) Federici G., Bernardini S., Bertoli A., Cipriani P., Cortese C., Fusco A., Ialongo P.,
Milani C. : “Medicina di Laboratorio”. Mc Graw -Hill 2003: 176-177:
- 122) Gaw A., Murphy M.J., Cowan R.A., O’ Reilly D.S.J. , Stewart M.J., Shepherd J.:
“Biochimica clinica”. Elsevier Masson 2007:30-31
- 123) “Manuale d’uso B.R.A:H:M:S KRYPTOR/KRYPTOR compact”