



*Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana*



*Università di Pisa*

Scuola di specializzazione in anestesia, rianimazione e terapia intensiva

Tesi di specializzazione

## RUOLO DI NUOVI BIOMARCATORI NELLA DIAGNOSI E TRATTAMENTO DI SEPSI E SHOCK SETTICO

Relatori

Chiar.mo Prof. Francesco Giunta

Chiar.mo Prof. Francesco Forfori

Candidato

Dott.ssa Marilù Giacalone

Anno accademico 2014/2015

## Riassunto analitico

La sepsi e lo shock settico hanno al giorno d'oggi un'incidenza crescente e sono una causa importante di morbilità e mortalità, sia nelle terapie intensive sia nei reparti di degenza ordinaria. Le cause di questo aumento dell'incidenza sono da ascrivere ad un invecchiamento della popolazione generale, un maggiore utilizzo di dispositivi invasivi soprattutto vascolari, la presenza di infezioni nosocomiali e la relativa antibioticoresistenza, terapie immunosoppressive prolungate, e – non da ultimo – una migliorata accortezza diagnostica dovuta ad una maggiore consapevolezza medica della problematica, sulla base di linee guida recentemente pubblicate. La sepsi se non trattata evolve naturalmente in shock settico, che è una condizione a rischio di vita con oltre il 40% di mortalità intraospedaliera. I pazienti che sopravvivono possono avere pesanti ricadute sul loro stato generale e sulla qualità di vita una volta dimessi dall'ospedale. Così come un precoce riconoscimento di un infarto miocardico acuto implica una maggiore quota di miocardio risparmiato, un precoce riconoscimento della sepsi significa maggiori probabilità di sopravvivenza e maggior numero di vite salvate. Per questo, è fondamentale iniziare precocemente la terapia, sia di supporto che antibiotica, la quale andrà successivamente variata in modo da risultare mirata al germe infettante e ridurre le probabilità di sviluppo di resistenza. In questo scenario è possibile inserire l'uso di biomarcatori di infezione e di disfunzione d'organo al fine di rendere la diagnosi specifica sempre più precoce e valutare la risposta alla terapia, possibilmente con sensibilità e specificità idonei a prendere fondatamente delle decisioni cliniche. Fra questi, la procalcitonina è un marcatore di infezione batterica ormai presente nella diagnostica routinaria di molte realtà come pronto soccorso, corsie e terapie intensive, usata come traccia diagnostica e di follow up della terapia. L'attività endotossinica (EAA), qualora positiva, rappresenta un biomcatore affidabile di infezione da germi gram negativi i cui livelli, in base alla letteratura disponibile, correlano con la mortalità e con la necessità di terapie ulteriori. Il brain natriuretic peptide (BNP) rappresenta un biomcatore di disfunzione cardiaca, anche questo utile per diagnosi e soprattutto per follow up di scompenso cardiaco, anche in questo caso correlato con la mortalità e la necessità di terapie ulteriori. Tuttavia, il loro ruolo predittivo preciso deve essere contestualizzato al tipo di paziente, alle altre variabili cliniche di uso routinario e soprattutto alla capacità di compenso del paziente. Pertanto è stato condotto uno studio clinico con l'obiettivo di correlare parametri ematici routinari (conta dei globuli bianchi, proteina C reattiva, conta piastrinica) con marcatori di infezione e di performance cardiaca (EAA e BNP), contestualizzare il valore di queste correlazioni nella gestione dei pazienti settici, e valutare la loro influenza sull'outcome. In questo studio osservazionale prospettico sono stati reclutati 15 pazienti critici con segni clinici di sepsi e almeno un dosaggio EAA entro 6 ore dal ricovero in terapia intensiva. Sono state determinate correlazioni tra età, sesso, tipo di infezione, livelli di biomarcatori (BNP, proteina C reattiva, procalcitonina, globuli bianchi e delle piastrine), così come livelli di EAA con misure di outcome (per esempio, la durata della degenza, la necessità di terapie sostitutive renali (CRRT), mortalità intra-ospedaliera e mortalità a 30 giorni). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra il livello EAA e la mortalità a 30 giorni. La mortalità non è risultata significativamente più elevata per le donne (57%)

rispetto agli uomini (50%),  $p = 1$ . L'età avanzata è risultata correlata ad una maggiore necessità di CRRT ( $p = 0,022$ ). I pazienti con livelli di EAA inferiore a 0,6 hanno mostrato valori di BNP più bassi con una correlazione moderata ( $\rho = 0,39$ ). Una correlazione significativa è stata rilevata tra i livelli di BNP e conta leucocitaria ( $p = 0,033$ ), e tra mortalità intra-ospedaliera e conta piastrinica ( $p = 0,029$ ). I pazienti che hanno ricevuto CRRT avevano livelli significativamente più elevati di BNP ( $p = 0,004$ ). La conta leucocitaria ha correlato anche con la necessità di CRRT ( $p = 0,021$ ). Anche se non significativo, è stato rilevato un trend di correlazione tra età e durata della degenza ( $\rho = 0,436$ ), e tra età e conta leucocitaria ( $p = 0,054$ ). In conclusione, si dimostra che il valore diagnostico e prognostico dei dati routinari di terapia intensiva correlati con nuovi biomarcatori, deve essere adattato per ogni paziente settico in base alle loro malattie di base, disabilità e riserva funzionale al fine di giustificare trattamenti intensivi e razionalizzare le risorse disponibili.

### **Parole chiave**

Sepsi, shock settico, disfunzione d'organo, biomarcatore, attività endotossinica, mortalità

## SOMMARIO

<b>Sezione 1: informazioni di base</b>	Pag. 1
1.1 definizioni	Pag. 1
1.2 epidemiologia	Pag. 3
1.3 fisiopatologia	Pag. 5
1.4 caratteristiche cliniche	Pag. 9
1.5 trattamento	Pag. 10
<b>Sezione 2: biomarcatori</b>	Pag. 14
2.1 concetti generali	Pag. 14
2.2 proteina C reattiva	Pag. 14
2.3 procalcitonina	Pag. 15
2.4 attività endotossinica	Pag. 18
2.5 marcatori cardiaci	Pag. 19
<b>Sezione 3: studio clinico</b>	Pag. 21
3.1 introduzione	Pag. 21
3.2 materiali e metodi	Pag. 22
3.3 risultati	Pag. 24
3.4 discussione	Pag. 26
3.5 conclusioni	Pag. 29
<b>Illustrazioni per la sezione 3</b>	Pag. 30
<b>Riferimenti</b>	Pag. 34
<b>Ringraziamenti</b>	Pag. 40

## **1. INFORMAZIONI DI BASE**

### **1.1 Definizioni**

Le definizioni di sepsi e shock settico sono state recentemente aggiornate e riformulate, alla luce di nuove conoscenze fisiopatologiche ed anche al fine di fornire più rapidi strumenti diagnostici. Il documento di riferimento è “The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock” pubblicata recentemente sul Journal of the American Medical Association, e indicante il risultato della discussione di 19 esperti del settore (1). Gli esperti raccomandano di definire la sepsi come: “disfunzione d’organo a rischio di vita causata da una disregolata risposta dell’ospite a un’infezione”. Si può dire in maniera più semplice che la sepsi è una condizione patologica a rischio di vita che scaturisce quando la risposta dell’organismo ad un’infezione danneggia i suoi stessi tessuti e organi. Questa definizione enfatizza l’importanza del concetto di risposta non-omeostatica dell’ospite all’infezione, la potenziale letalità in largo eccesso rispetto all’andamento dell’infezione come tale, e la necessità di un’identificazione urgente. Questo è importante perché, nel sospetto di un’infezione, anche un grado modesto di disfunzione d’organo si associa ad una mortalità intraospedaliera aggiuntiva del 10% nella popolazione generale, che è superiore alla mortalità da infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (8,1%). Anche in questa situazione, le condizioni del paziente possono peggiorare ulteriormente, evidenziandone la gravità e la necessità di un intervento pronto e appropriato. La precedente definizione di sepsi era quella della “Surviving Sepsis Campaign” del 2012 (2), in cui si faceva riferimento ai criteri della SIRS (systemic inflammatory response syndrome) in presenza di un’infezione accertata o sospetta. I criteri SIRS non specifici, come la febbre o la leucocitosi neutrofila, sono sempre d’aiuto nella diagnosi di un’infezione in senso generale. Questi reperti, completano le caratteristiche di infezioni specifiche (per esempio, rash, consolidamento polmonare, disuria, peritonite) che focalizzano l’attenzione sulla probabile fonte anatomica e sull’agente infettante. Tuttavia la SIRS può semplicemente riflettere una risposta dell’ospite appropriata e frequentemente adattativa. Elementi di SIRS sono stati riscontrati in molti pazienti ospedalizzati compresi quelli che non sviluppano mai infezione o outcome negativo. La sepsi invece implica disfunzione d’organo, che indica una fisiopatologia più complessa di un’infezione più una risposta infiammatoria di accompagnamento sganciata dal contesto. L’enfasi della task force sulla disfunzione d’organo a rischio di vita è conforme alla visione per la quale difetti cellulari sono alla base di anomalie fisiologiche e biochimiche entro specifici sistemi d’organo. Sotto questa terminologia, il termine sepsi severa diventa superfluo. Concetti chiave sono: risposta pro- e anti-infiammatoria simultanea e disregolata e disfunzione d’organo anche non associata a morte cellulare. La disfunzione d’organo indotta dalla sepsi può anche essere occulta, la sua presenza deve essere considerata in tutti i pazienti con infezione, e di converso, un’infezione non riconosciuta può essere la causa di una nuova disfunzione d’organo. Il fenotipo clinico e biologico della sepsi può essere modificato da malattie acute preesistenti, comorbidità di lunga data, farmaci e interventi terapeutici. Specifiche infezioni possono risultare in disfunzione d’organo locale senza generare una risposta sistemica

disregolata. Poiché non ci sono attualmente misure cliniche che riflettono il concetto di disregolata risposta dell'ospite, gli esperti hanno identificato nel SOFA (sequential organ failure assessment) score uno strumento semplice per identificare la sepsi, come una modificazione in acuto del SOFA score superiore o uguale a 2 punti in conseguenza di un'infezione. Questa modalità di riconoscimento della sepsi presuppone che il SOFA score di partenza sia 0 in pazienti che non abbiano preesistenti insufficienze d'organo note. Se sono già presenti (in forma acuta o cronica), si partirà dal valore che esprime la gravità della/e insufficienza/e d'organo preesistente/i. In questo contesto, il SOFA score non è da intendersi un mezzo per la gestione del paziente, ma per caratterizzare un paziente settico (Figura 1.1).

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg		Dopamine <5 or dobutamine (any dose) <sup>b</sup>	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 <sup>b</sup>	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 <sup>b</sup>
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score <sup>c</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Figura 1.1 (1).

Alcune componenti del SOFA richiedono test di laboratorio o strumentali e monitoraggi avanzati che possono essere disponibili in ambienti protetti come la terapia intensiva. In altri contesti dove questi mezzi non sono disponibili, per esempio corsie, pronto soccorso o sul territorio, gli esperti raccomandano l'utilizzo di uno score semplificato basato su tre parametri chiamato quickSOFA (qSOFA): alterato stato mentale, pressione sistolica inferiore o uguale a 100 mmHg, frequenza respiratoria superiore o uguale a 22 atti respiratori/min. Questo score identifica pazienti adulti con sospetta infezione con probabile outcome sfavorevole allo stesso modo del SOFA score intero. La task force indica inoltre di utilizzare i criteri qSOFA per indirizzare ulteriori indagini per la disfunzione d'organo, iniziare la terapia e considerare il ricovero in terapia intensiva o aumentare il monitoraggio. L'infezione viene definita sospetta in presenza di somministrazione orale o parenterale di antibiotici e campionamento di fluidi corporei (sangue, urine, liquor, liquido peritoneale).

Lo shock settico è una sottocategoria di sepsi in cui anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche sottostanti sono profondi abbastanza da aumentare la mortalità. Pazienti con shock settico possono essere identificati con un costrutto clinico di sepsi con persistente ipotensione che richiede vasopressori per mantenere la pressione arteriosa media superiore o uguale a 65 mmHg, e che

presenta un livello di lattato superiore a 2 mmol/l nonostante adeguata rianimazione volemica. Con questi criteri la mortalità ospedaliera aumenta del 40%. La task force ha considerato ipotensione e iperlattacidemia in combinazione piuttosto che singolarmente perché nel primo caso vengono riflessi sia la disfunzione cellulare che la compromissione cardiovascolare ed è associato ad un rischio di mortalità significativamente più elevato. Sia nella definizione di sepsi che in quella di shock settico, la task force ha riconosciuto l'impossibilità di ottenere definizioni esaustive che comprendano i complessi meccanismi patobiologici che ne stanno alla base. Le definizioni menzionate sono state il risultato di un pragmatico compromesso che punta alla generalizzabilità e alla prontezza d'uso. Gli esperti sottolineano che, l'assenza di positività dei criteri SOFA e qSOFA non deve portare a ritardi all'esecuzione di indagini o alla terapia o a qualsiasi altro aspetto dell'assistenza quando questi sono ritenuti necessari dai medici. La task force ha discusso anche il ruolo diagnostico dell'iperlattacidemia. Alcuni componenti hanno suggerito che livelli elevati di lattato rappresentano un importante marcatore di "shock criptico" in assenza di ipotensione. Altri hanno indicato che, in questo modo, l'assenza/indisponibilità della misura del lattato preclude la diagnosi di shock settico. Il lattato è un indicatore sensibile ma poco specifico di stress metabolico e non di shock in sé. La combinazione di iperlattacidemia e ipotensione fluido-resistente identifica un gruppo di pazienti a mortalità più elevata ed è da preferirsi al singolo indicatore. In breve, queste definizioni hanno cercato di superare i limiti delle precedenti: eccessiva attenzione all'infiammazione, il modello del continuum da sepsi a sepsi severa e shock e la mancanza di specificità dei criteri SIRS (1). Quest'ultimo punto è stato recentemente criticato da alcuni autori (3) evidenziando come i criteri SIRS possono ancora avere una validità che correla significativamente con la mortalità, e che la definizione di sepsi basata sulla disfunzione d'organo è limitante. Quindi, definire queste entità è una questione che rimane tuttora aperta e in continuo aggiornamento sulla base di nuovi studi.

## **1.2 Epidemiologia**

La sepsi/shock settico sono problematiche clinico-assistenziali molto frequenti, rappresentando la prima cause di morte per cause non cardiache. L'incidenza si attesta sui 300 casi/100.000 abitanti l'anno negli Stati Uniti, rappresentando fra il 2 e il 4,5% di tutti i ricoveri e l'11% dei ricoveri in terapia intensiva. In Italia l'incidenza si aggira su 1-1,5 casi/1000 abitanti l'anno, con un aumento annuo calcolato di circa l'8%. Le ragioni di questo aumento sono da ascrivere a: maggiore sensibilizzazione al problema e quindi maggiore attenzione diagnostica, invecchiamento della popolazione e maggior sopravvivenza a patologie croniche, aumento dell'uso di dispositivi invasivi (in particolare cateteri venosi centrali e cateteri vescicali), maggiori indicazioni alla terapia immunosoppressiva (4). Per quanto riguarda il rapporto incidenza/eziologia, le sepsi "mediche" rappresentano la categoria più frequente (57%), seguite dalle sepsi post-chirurgiche d'urgenza (30%), seguite dalle sepsi post-chirurgiche elettive (8%), seguite dalle sepsi post-traumatologia (6%). Rientrano nella categoria sepsi mediche: le sepsi meningococcica, pneumococcica, la sepsi da polmonite associate al ventilatore, la sepsi correlata al CVC e quella

correlata alle infezioni delle vie urinarie. Le sepsi chirurgiche comprendono tutte le infezioni intraaddominali post-operatorie. I germi più frequentemente implicati sono i Gram negativi (per circa il 43%), seguiti dai Gram positivi (circa 36%), seguiti da infezioni polimicrobiche (14%), funghi (5%) e anaerobi (2%) (Figura 1.2) (4).

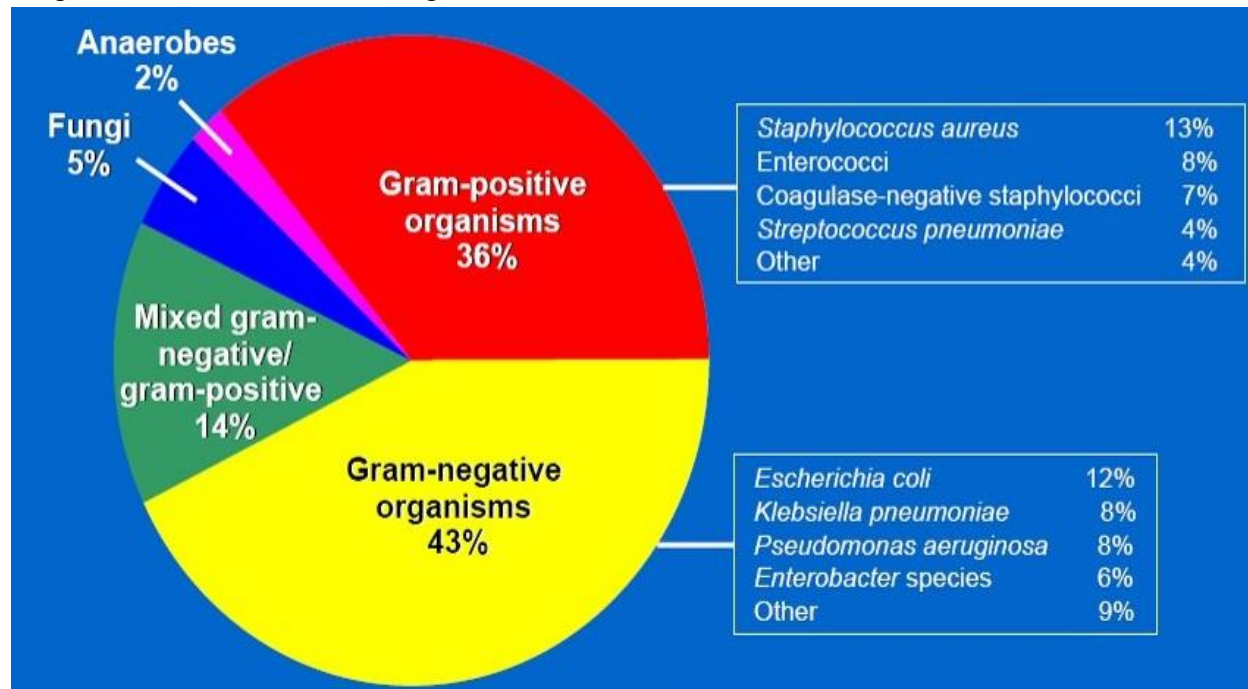


Figura 1.2 (4).

In base ad un recente studio condotto in Spagna (5) – la cui situazione epidemiologica può essere approssimata a quella italiana – si è registrato un graduale aumento nel numero dei pazienti settici ammessi in terapia intensiva. Alcune caratteristiche cliniche di questi pazienti, come l'età media (fra 62 e 65 anni), il genere (predominanza negli uomini), l'APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II score (fra 20 e 22), livelli di procalcitonina (fra 33 e 37 ng/ml), e di lattato nelle prime 6 ore (fra 25 e 31 mg/dl) sono rimaste stabili, senza differenze significative fra i vari anni del range preso in considerazione (2008-2013). Per quanto riguarda la disfunzione d'organo, quelle più frequentemente riscontrate nelle prime 6 ore sono la disfunzione cardiovascolare e quella renale, quelle meno frequentemente riscontrate sono la disfunzione respiratoria e la piastrinopenia, con un riscontro sempre maggiore negli ultimi anni di coagulopatia. Nel primo periodo di osservazione i pazienti ammessi in terapia intensiva per sepsi provenivano più frequentemente dalle corsie, nel secondo periodo c'è stato un significativo aumento delle ammissioni di pazienti provenienti dal pronto soccorso. Per quanto riguarda l'origine dell'infezione, l'origine respiratoria e addominale sono risultate molto frequenti per tutto il periodo di osservazione, seguite dalle infezioni delle vie urinarie, che sono diventate prevalenti dal 2012. La mortalità è risultata significativamente ridotta, passando dal 20% e 26% del 2008 al 14% e 17% del 2013 rispettivamente in terapia intensiva e globalmente nell'ospedale. I sottogruppi di pazienti con mortalità più elevata presentavano età più avanzata, e più elevati livelli di procalcitonina,



lattato e disfunzione d'organo. Si è avuto un riscontro più elevato di mortalità nei pazienti ammessi dalle corsie, con trauma, e sottoposti a chirurgia d'urgenza. I casi di sepsi di origine sconosciuta hanno mostrato la mortalità più elevata, seguiti da infezioni addominali. Le variabili correlate ad una mortalità maggiore (a 6 ore) sono: livello di lattato, presenza di disfunzione respiratoria, ipoglicemia, piastrinopenia, coagulopatia, insufficienza renale, origine della sepsi (5). Un recente studio pubblicato su JAMA ha evidenziato che pazienti settici in terapia intensiva sviluppano nuove infezioni acquisite proprio in terapia intensiva nel 13,5% dei casi. Questi pazienti hanno disfunzione d'organo più grave e una mortalità maggiore rispetto a chi non le sviluppa, indicando l'esistenza di una immunosoppressione correlata alla sepsi all'esordio dell'infezione secondaria (6).

### **1.3 Fisiopatologia**

La fisiopatologia di sepsi e shock settico è un fenomeno complesso. Basti pensare che la sepsi può causare alterazione o insufficienza di qualunque organo o sistema dell'organismo. Questo si può manifestare clinicamente come shock emodinamico, insufficienza respiratoria, alterazioni coagulative (piastrinopenia, coagulazione intravascolare disseminata), alterata tolleranza glucidica, insufficienza renale e surrenale, polimiopatia, insufficienza epatica. A livello cellulare e subcellulare, disfunzioni immunitarie, alterazioni endoteliali, dell'epitelio intestinale e della flora microbica, alterazioni dei fattori della coagulazione, sono tutti fattori che giocano un ruolo nella fisiopatologia della sepsi. Il primo elemento da considerare nella patogenesi di sepsi e shock settico è la risposta dell'ospite (Figura 1.3).

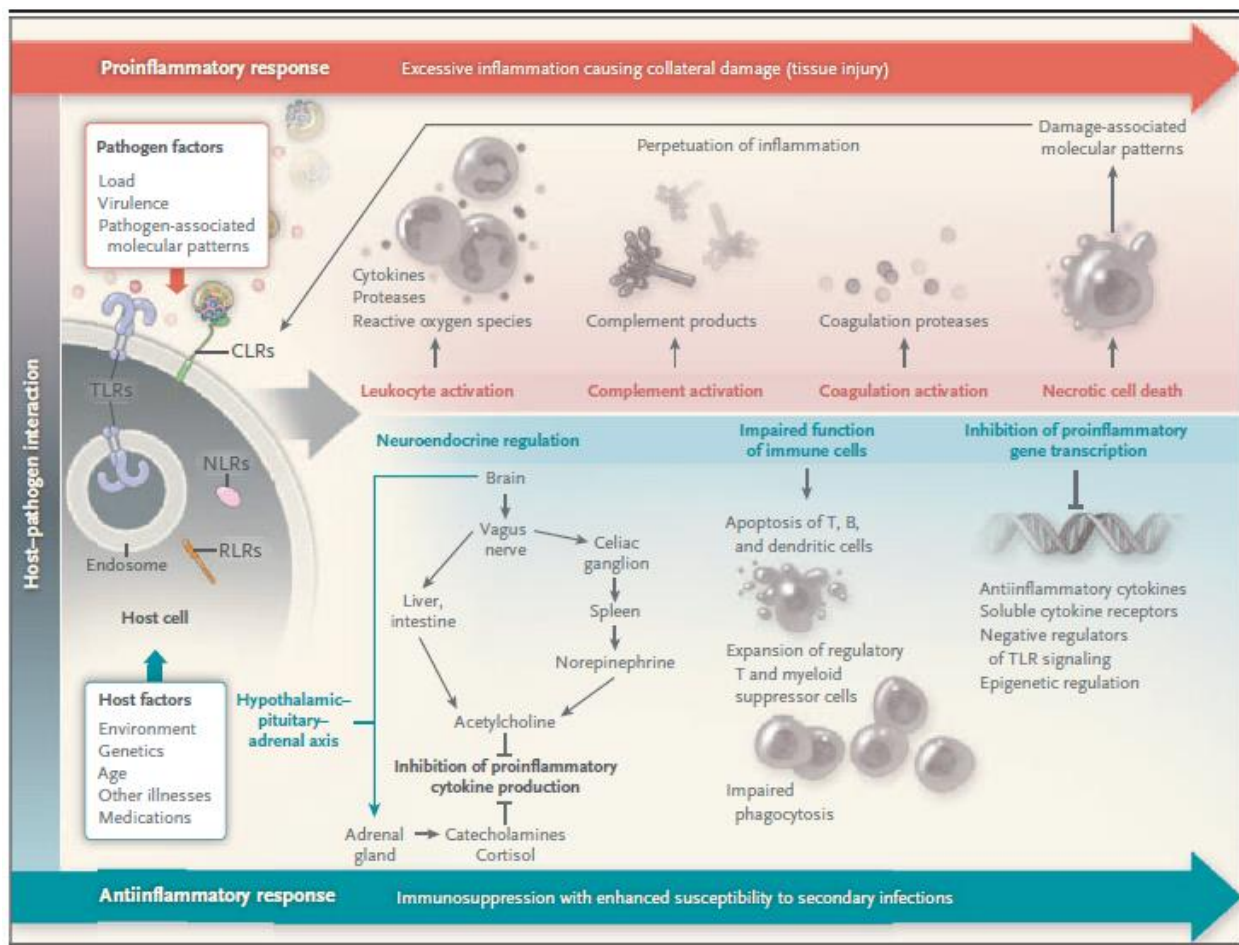


Figura 1.3 (8).

Essa innesca meccanismi pro- e antinfiammatori che da una parte contribuiscono ad eliminare l'infezione e al recupero tissutale, ma dall'altra inducono danno d'organo ed infezioni secondarie. La risposta specifica in ciascun paziente dipende dal patogeno causale (carica infettante e virulenza), e dall'ospite, come assetto genetico e comorbidità, con risposte differenziate a livello locale, regionale sistemico. Il tipo e la direzione di risposta dell'ospite probabilmente variano nel tempo, parallelamente al decorso clinico. In generale, si pensa che la risposta infiammatoria (diretta all'eliminazione dei patogeni causali) sia responsabile del danno tissutale collaterale, mentre la risposta antinfiammatoria (importante per limitare il danno tissutale locale e sistemico) sia implicata nell'aumentata suscettibilità alle infezioni secondarie (8). Per quanto riguarda il ruolo dell'immunità innata, questa per prima avverte la presenza del patogeno e reagisce ai segni iniziali di infezione. Le risposte avvengono tramite attivazione dei TLR (Toll Like Receptors) su neutrofilo, macrofagi, cellule natural killer, che comporta il rilascio di citochine, chemochine e specie reattive dell'ossigeno (ROS) (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , PAF) con un feedback positivo. Questi mediatori attivano sia la risposta proinfiammatoria che quella antinfiammatoria. Alterazioni dei neutrofilo, monociti e macrofagi sono importanti nella patogenesi. Una prolungata risposta dei neutrofilo e una loro ritardata apoptosi è associata ad aumentata disfunzione d'organo, compreso

lo sviluppo di ARDS e ridotta sopravvivenza. È stato dimostrato che i ROS rilasciati dai neutrofili in feedback positivo causano disfunzione endoteliale e mitocondriale che contribuisce allo sviluppo di insufficienza multiorgano. Una ridotta funzione e sopravvivenza dei monociti e dei macrofagi è anch'essa associata ad un' aumentata letalità da sepsi. La sepsi tipicamente aumenta la conta leucocitaria per aumento dei neutrofili circolanti dall'immunità innata. Invece, la popolazione linfocitaria si riduce marcatamente, sia B che T. Il processo inizia precocemente, con riduzione del peso e della conta cellulare del timo entro 3 ore. Questa deplezione linfocitaria rappresenta un possibile motivo dell'immunosoppressione e predisposizione alle infezioni nosocomiali nei pazienti settici, così come il fatto che le cellule restanti sono disfunzionali. Infatti, i linfociti nella sepsi esprimono recettori di inibizione e producono citochine immunosoppressive. Inoltre, vi è un' aumentata attività delle cellule T regolatorie la cui attività è naturalmente immunosoppressiva (7). In modelli animali, la modulazione dell'attività dei linfociti si associa a modificazioni della mortalità compresa quella imputabile a infezioni fungine. È importante il ruolo dei linfociti T helper di cui ne esistono vari sottogruppi: i linfociti  $T_{H17}$  legano l'immunità innata a quella adattativa aumentando la risposta dei neutrofili e sono aumentati in pazienti che sopravvivono alla sepsi, e lo stesso è stato dimostrato per le cellule T regolatorie. Alterazioni di altri 3 sottogruppi di cellule T (NK, MAIT e  $T\gamma\delta$ ) che normalmente intervengono nell'immunità innata sono associate ad una risposta infiammatoria disregolata, con un' aumentata mortalità e predisposizione alle infezioni nosocomiali, così come avviene in presenza di un' alterata risposta di linfociti T CD8+. È stato visto che pazienti settici hanno una riduzione dei linfociti B periferici, che risulta essere un fattore critico in modelli animali in quanto si associa ad una riduzione della capacità di eliminare i batteri e un' aumentata mortalità. Nella patogenesi della sepsi rientra anche il cosiddetto riflesso infiammatorio: mediatori dell'infiammazione o di danno tissutale stimolano fibre afferenti quindi si attivano fibre efferenti del nervo vago che stimolano il rilascio di acetilcolina dalla milza. L'acetilcolina attiva recettori colinergici sui macrofagi che sopprimono il rilascio di citochine proinfiammatorie. La distruzione di questo riflesso tramite vagotomia aumenta l'infiammazione sistemica, mentre la stimolazione sopprime la risposta infiammatoria. Per quanto riguarda il ruolo dell'endotelio: gioca parte attiva nel regolare il tono e la permeabilità vascolare e nel modulare la risposta immunitaria. Le cellule endoteliali esprimono recettori immunitari, compresi i TLR che attivano le vie dell'infiammazione mediate da NF $\kappa$ B e MAP chinasi. Il segnale correlato a TLR altera la permeabilità delle cellule endoteliali e l'espressione delle proteine della coagulazione, contribuendo alla coagulopatia, aumentata permeabilità vascolare e disfunzione d'organo riscontrata nei pazienti settici. Per quanto riguarda il ruolo dell'intestino: è stato dimostrato che la sepsi altera l'integrità intestinale in modi che possono avere impatto sulla progressione della malattia e della mortalità. Attualmente, non c'è forte evidenza che supporti la traslocazione batterica, e un'ipotesi alternativa è l'ipotesi "gut-lymph". In base a questa teoria l'intestino rilascia mediatori tossici che raggiungono i polmoni dove causano danno remoto, passando attraverso i vasi linfatici mesenterici. C'è una significativa evidenza preclinica che supporta l'importanza della teoria gut-lymph nella sepsi. Anche l'integrità dell'epitelio intestinale è compromessa nella sepsi. È stato dimostrato da studi preclinici che la sepsi aumenta l'apoptosi

e riduce la proliferazione dell'epitelio intestinale, riduce la lunghezza dei villi e aumenta la permeabilità intestinale. La prevenzione dell'apoptosi dell'epitelio intestinale aumenta la sopravvivenza in modelli murini. Negli ultimi anni è stata prestata maggiore attenzione al ruolo del microbioma intestinale nella patogenesi della sepsi. I batteri sono presenti nell'intestino umano in numero estremamente elevato. C'è evidenza crescente che i batteri residenti dell'intestino siano in rapporto neutrale con l'ospite, cioè "né buoni né cattivi", piuttosto, variano la relazione con l'ospite in base al suo stato di salute. Specificamente, i batteri intestinali sono in grado di avvertire uno stress dell'ospite e variare la loro virulenza come risposta all'alterato ambiente dell'ospite. Quindi il trattamento antibiotico senza attenzione alla virulenza microbica può non essere sufficiente per i pazienti settici e l'alterazione della microflora da parte degli antibiotici può essere paradossalmente dannosa (7). Fra i meccanismi che generano disfunzione d'organo nella sepsi (Figura 1.4), l'alterata ossigenazione tissutale gioca un ruolo chiave.

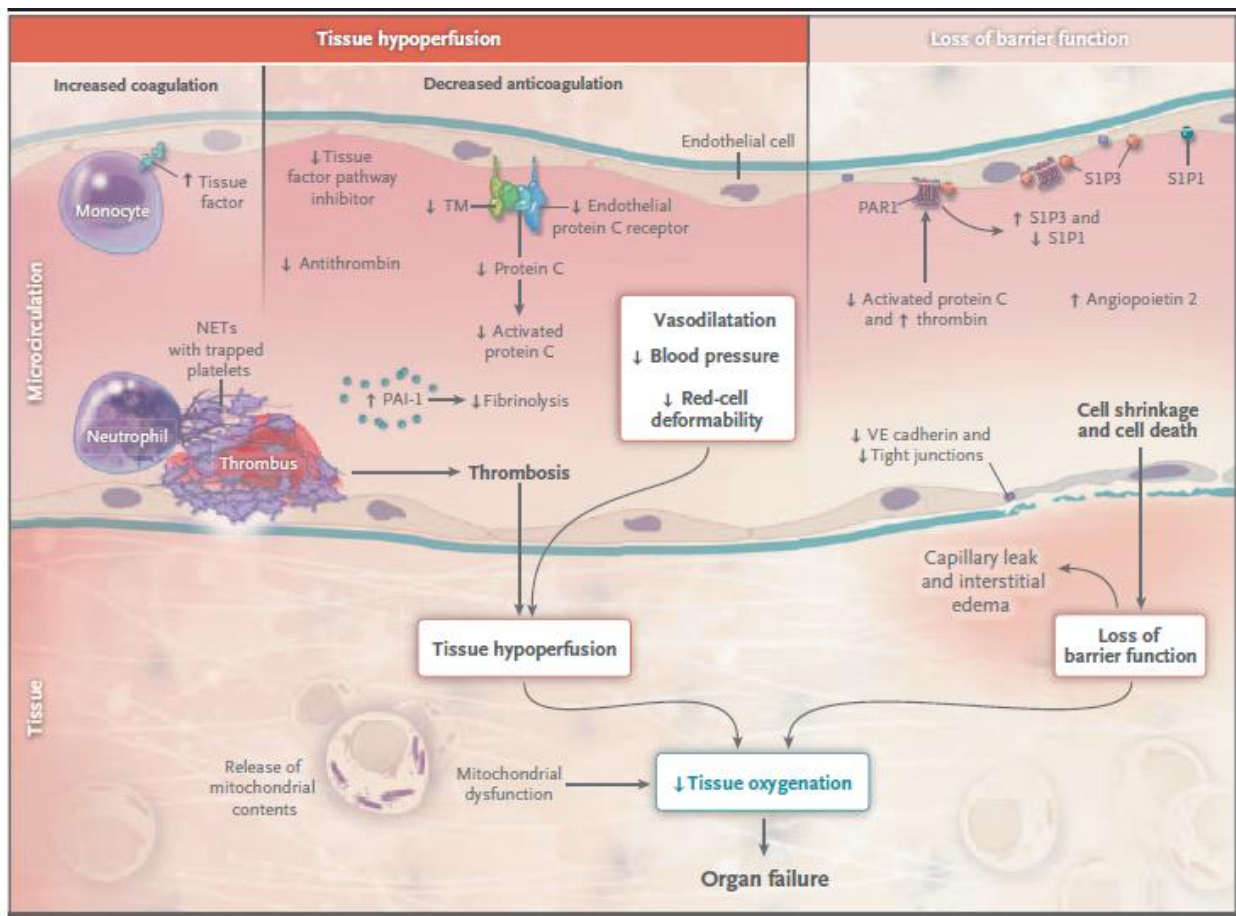


Figura 1.4 (8).

Vari fattori, fra cui ipotensione, ridotta deformabilità dei globuli rossi, e trombosi microvascolare, contribuiscono al ridotto trasporto dell'ossigeno nello shock settico. L'infiammazione può causare disfunzione dell'endotelio vascolare, accompagnata da morte cellulare e perdita dell'integrità di barriera, dando luogo ad edema sottocutaneo e delle cavità corporee. Il danno mitocondriale

causato dallo stress ossidativo e altri meccanismi altera l'utilizzazione cellulare dell'ossigeno. Inoltre, i mitocondri danneggiati rilasciano mediatori chiamati allarmine nell'ambiente extracellulare, compresi DNA mitocondriale e formilpeptidi, che attivano i neutrofilii e causano ulteriore danno tissutale (8).

### 1.4 Caratteristiche cliniche

La diagnosi di sepsi e shock settico è basata fondamentalmente sulle definizioni fornite nel paragrafo sulle definizioni, facenti riferimento alle "Third International Consensus Definitions" pubblicate recentemente su JAMA. Viene posta particolare enfasi al rilevamento della disfunzione d'organo tramite il SOFA score, e il quickSOFA per il territorio (1) (Figura 1.5).

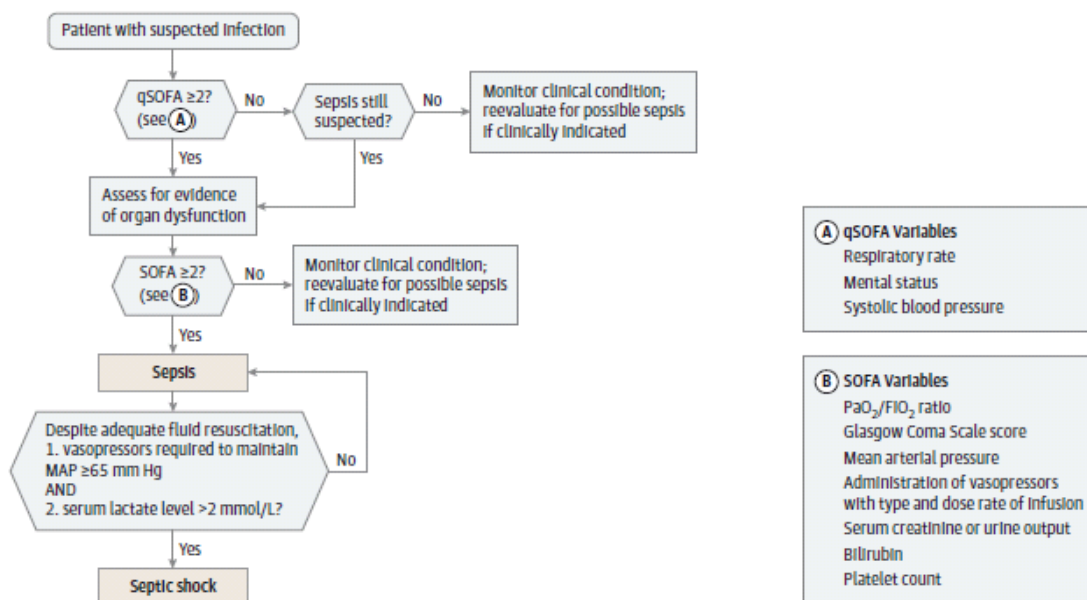


Figura 1.5 (1).

Tuttavia, tenere in considerazione una serie di caratteristiche cliniche facilmente individuabili di sepsi e shock settico non può che essere utile. Le manifestazioni cliniche della sepsi sono altamente variabili, dipendenti dal sito iniziale di infezione, dal microorganismo causale, l'andamento della disfunzione d'organo acuta, lo stato di salute preesistente del paziente e l'intervallo prima dell'inizio della terapia. I segni di infezione e disfunzione d'organo possono essere subdoli, quindi bisogna prestare attenzione ai segni e sintomi della sepsi. La disfunzione d'organo acuta influenza più comunemente i sistemi respiratorio e cardiovascolare. La compromissione respiratoria si manifesta classicamente come ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), che è definita come ipossiemia con infiltrati polmonari bilaterali di origine non cardiaca. La compromissione cardiovascolare si manifesta primariamente come ipotensione o un elevato livello di lattato sierico. Dopo adeguata espansione volemica l'ipotensione frequentemente persiste richiedendo l'uso di vasopressori, e può anche manifestarsi disfunzione miocardica. Anche cervello e rene sono spesso

colpiti. La disfunzione del sistema nervoso centrale tipicamente si manifesta come obnubilamento o delirio. Generalmente gli studi di immagine non dimostrano lesioni focali e i reperti all'elettroencefalogramma solitamente depongono per encefalopatia non focale. Anche la polineuropatia da malattia critica e la miopatia sono comuni, specialmente in pazienti con degenza in terapia intensiva prolungata. L'insufficienza renale acuta si manifesta come ridotta diuresi e aumento della creatinina sierica; frequentemente richiede terapie sostitutive renali. Ileo paralitico, elevato livello di transaminasi, alterato controllo glicemico, piastrinopenia e coagulazione intravascolare disseminata, disfunzione surrenalica e "euthyroid sick syndrome", sono tutti reperti comuni nella sepsi e shock settico (8).

## **1.5 Trattamento**

La gestione della sepsi e dello shock settico è basata fondamentalmente su quanto enunciato nelle linee guida della "Surviving Sepsis Campaign" facendo riferimento alle ultime, pubblicate nel 2012 (2). Si raccomandano una rianimazione protocollizzata e quantitativa di pazienti con ipoperfusione tissutale indotta dalla sepsi (definita come ipotensione che persiste dopo carico fluidico iniziale o concentrazione di lattato superiore o uguale a 4 mmol/L). Questo protocollo dovrebbe essere iniziato non appena si riconosce l'ipoperfusione e non dovrebbe ritardare l'ammissione in terapia intensiva. Durante le prime 6 ore di trattamento, gli obiettivi della rianimazione iniziale dell'ipoperfusione indotta dalla sepsi dovrebbero includere tutti i seguenti, come parte di un protocollo di trattamento: pressione venosa centrale 8-12 mmHg, pressione arteriosa media superiore o uguale a 65 mmHg, diuresi superiore o uguale a 0,5 ml/Kg/ora, saturazione venosa centrale superiore al 70% o saturazione venosa mista superiore al 65%. È raccomandato di orientare la rianimazione alla normalizzazione del livello di lattato, in pazienti con aumento del lattato come marcatore di ipoperfusione (2). Prima di iniziare la terapia antibiotica, le linee guida raccomandano di prelevare campioni per emocolture, se questo non causa significativo ritardo nella somministrazione degli antibiotici. Si raccomanda il prelievo di almeno due gruppi di emocolture, aerobio e anaerobio, con un gruppo ottenuto da prelievo percutaneo e un gruppo ottenuto da ogni catetere vascolare presente sul paziente, a meno che il dispositivo sia stato recentemente posizionato (meno di 48 ore). Colture da altri siti, come urine, liquor, tamponi di ferite, secrezioni respiratorie ed altri fluidi corporei che possono essere fonte di infezione, dovrebbero essere ottenuti prima dell'inizio della terapia antibiotica se questo non la ritarda. Quando si sospetta una candidosi invasiva le linee guida raccomandano il test della ricerca degli antigeni della candida. Fattori di rischio per candidemia sono: presenza di cateteri venosi centrali, nutrizione parenterale totale, terapia antibiotica ad ampio spettro, elevato score APACHE, insufficienza renale acuta, pregresso intervento chirurgico (addominale in particolare), perforazione gastrointestinale e deiscenza di anastomosi. Anche pazienti immunocompromessi come quelli con malattie ematologiche maligne, riceventi di trapianto di organo solido o midollo osseo, e pazienti con chemioterapia sono a rischio aumentato di candidemia (9). Per quanto riguarda i provvedimenti terapeutici, le linee guida raccomandano l'applicazione del "sepsi



bundle”, cioè una serie di provvedimenti e misure da applicare secondo un timing ben preciso (Figura 1.6).

**SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN CARE BUNDLES**

**TO BE COMPLETED WITHIN 3 HOURS:**

- 1) Measure lactate level
- 2) Obtain blood cultures prior to administration of antibiotics
- 3) Administer broad spectrum antibiotics
- 4) Administer 30 mL/kg crystalloid for hypotension or lactate  $\geq 4$  mmol/L

**TO BE COMPLETED WITHIN 6 HOURS:**

- 5) Apply vasopressors (for hypotension that does not respond to initial fluid resuscitation) to maintain a mean arterial pressure (MAP)  $\geq 65$  mm Hg
- 6) In the event of persistent arterial hypotension despite volume resuscitation (septic shock) or initial lactate  $\geq 4$  mmol/L (36 mg/dL):
  - Measure central venous pressure (CVP)\*
  - Measure central venous oxygen saturation (ScvO<sub>2</sub>)\*
- 7) Remeasure lactate if initial lactate was elevated\*

\*Targets for quantitative resuscitation included in the guidelines are CVP of  $\geq 8$  mm Hg, ScvO<sub>2</sub> of  $\geq 70\%$ , and normalization of lactate.

Figura 1.6 (2).

Provvedimenti da attuare entro 3 ore: misurare il livello di lattato, ottenere emocolture, somministrare antibiotici ad ampio spettro, somministrare 30 ml/Kg di cristalloidi in caso di ipotensione o livello di lattato superiore a 4 mmol/L. Provvedimenti da attuare entro 6 ore: somministrare vasopressori (per ipotensione che non risponde all’iniziale rianimazione volemica) al fine di mantenere la pressione arteriosa media superiore o uguale a 65 mmHg, nel caso di ipotensione persistente dopo rianimazione volemica (shock settico) o livello iniziale di lattato superiore o uguale a 4 mmol/L misurare la pressione venosa centrale e portarla ad un valore superiore o uguale a 8 mmHg, e misurare la saturazione venosa centrale portandola a valori superiori al 70%, rimisurare il lattato se il livello iniziale di lattato era elevato. Le linee guida raccomandano di somministrare cristalloidi come primo fluido di scelta nella rianimazione volemica di sepsi e shock settico, l’uso di amidi è invece non raccomandato. È indicata l’albumina quando i pazienti richiedono significative quantità di cristalloidi per la rianimazione. La tecnica del carico fluidico è raccomandata finché la somministrazione di fluidi viene continuata e si ha miglioramento emodinamico. La terapia con vasopressori è raccomandata per mantenere la pressione arteriosa media ad almeno 65 mmHg. Il vasopressore di prima scelta è la noradrenalina. Si raccomanda l’adrenalina quando si ha necessità di un secondo agente per mantenere la pressione. La vasopressina (fino a 0,03 U/min) può essere aggiunta alla noradrenalina con l’obiettivo di aumentare la pressione o ridurre il dosaggio della noradrenalina. In presenza di disfunzione miocardica intesa come elevate pressioni di riempimento e bassa portata, o segni di

ipoperfusione nonostante adeguato volume intravascolare e pressione arteriosa, le linee guida raccomandano un trial con dobutamina, fino al dosaggio di 20 µg/Kg/minuto, in aggiunta al vasopressore in uso (2). La somministrazione di cortisonici è controversa poiché gli studi non hanno portato ad evidenze conclusive. Gli steroidi possono essere indicati in presenza di una storia clinica di terapia steroidea o disfunzione surrenalica. Negli altri casi, non sono raccomandati nella sepsi, possono essere somministrati nello shock settico in presenza di terapia con vasopressori, quando questi non sono più necessari la terapia steroidea deve essere ridotta. Questa viene raccomandata come infusione continua a basso dosaggio piuttosto che boli ripetuti. La somministrazione di una terapia antimicrobica per via endovenosa entro la prima ora dal riconoscimento dello shock settico dovrebbe essere uno degli obiettivi fondamentali della terapia. Le linee guida raccomandano che la terapia antimicrobica empirica includa uno o più farmaci che abbiano attività contro tutti i patogeni probabili (batteri e/o funghi) e che penetrino in concentrazione adeguata nei tessuti che si presume siano la fonte della sepsi. La terapia antibiotica empirica viene definita come terapia somministrata prima dell'identificazione del microrganismo specifico che causa l'infezione. È inappropriata quando non copre la specifica classe di germi sospettati o i germi sono resistenti. La terapia empirica in molti casi è basata su antibiotici ad ampio spettro, che implica un'attività contro *Pseudomonas aeruginosa*. La terapia antimicrobica ad ampio spettro invece si riferisce ad una combinazione di antibiotici con attività anti *Pseudomonas* e Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) (10). La terapia antibiotica, una volta impostata, dovrebbe essere rivalutata ogni giorno per una possibile riduzione o modifica al fine di prevenire lo sviluppo di resistenze, ridurre la tossicità e ridurre i costi. Le linee guida raccomandano inoltre di valutare un basso livello di procalcitonina o altri biomarcatori come criterio per guidare il medico nella decisione di interrompere la terapia antibiotica empirica in pazienti settici ma che non hanno evidenza di infezione. La terapia empirica in combinazione non dovrebbe essere somministrata per più di 3-5 giorni in pazienti settici. La modifica della terapia antibiotica finalizzata alla monoterapia più appropriata dovrebbe essere eseguita non appena il profilo di suscettibilità del germe è disponibile. Le linee guida indicano una durata della terapia tipicamente di 7-10 giorni su indicazione clinica, un decorso più lungo può essere appropriato in pazienti con una risposta clinica lenta, focolai di infezione non drenabili, batteriemia da *Staphylococcus Aureus*, alcune infezioni fungine e virali, o deficienze immunologiche compresa la neutropenia. Le linee guida raccomandano una specifica diagnosi anatomica di infezione che richiede la ricerca urgente della fonte di infezione (per esempio: infezione necrotizzante dei tessuti molli, peritonite, colangite, infarto intestinale), e che siano presi provvedimenti per il controllo della fonte entro 12 ore dalla diagnosi. Nel controllo della fonte dell'infezione dovrebbero essere preferite le tecniche meno traumatizzanti (per esempio, drenaggio di un ascesso per via percutanea piuttosto che chirurgica). Sono state studiate terapie immunostimolanti per la sepsi, come intereferone gamma, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) e granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), gli studi non hanno dimostrato benefici in termini di sopravvivenza nella sepsi. Anche il ruolo dei beta bloccanti risulta controverso (11). Presidi altamente raccomandati nella gestione dello shock settico sono la misura invasiva della pressione



arteriosa tramite catetere arterioso e il catetere venoso centrale che è preferibile per la somministrazione di vasopressori. Importanti sono anche l'ecocardiografia per valutare velocemente le dimensioni dei ventricoli, lo stato di riempimento e la contrattilità globale, nonché la presenza di versamento pericardico, e la misura della portata per valutare la tendenza dei valori nel tempo e rivalutare l'apporto fluidico e il dosaggio dei vasopressori (12). Esiste poi una serie di trattamenti avanzati, in uso in alcuni centri specializzati. Uno di questi è il Pentaglobin<sup>®</sup>: è un concentrato di proteine plasmatiche umane contenente al 95% immunoglobuline, di cui in larga prevalenza IgG, poi IgM e IgA. Viene somministrato al dosaggio di 3-5 ml/Kg per 3 giorni consecutivi, ripetibile settimanalmente (13). Altro trattamento è il TorayMyxin<sup>®</sup>: è un trattamento extracorporeo basato sull'emoperfusione su una cartuccia di policarbonato e polistirene a cui è legata con legame covalente la polimixina B. Tale sostanza è un antibiotico che si lega selettivamente al lipide A dell'endotossina dei batteri Gram negativi, bloccandone la tossicità. Lo studio Euphas ha dimostrato un aumento della pressione arteriosa, minore necessità di vasoattivi e migliore recupero della funzione renale e polmonare nei pazienti trattati. Il trattamento risulta indicato negli shock settici da Gram negativi nei casi in cui la fonte dell'infezione sia stata già trattata, da somministrare entro 24 ore dalla diagnosi, da ripetere eventualmente dopo 24 ore (14). Altro trattamento avanzato è la CPFA<sup>®</sup> (coupled plasma filtration adsorption): è un trattamento extracorporeo in cui si ha una rimozione non selettiva di mediatori solubili dell'infiammazione e tossine batteriche, i quali vengono adsorbiti su una cartuccia di una resina sintetica. Il plasma così purificato viene poi sottoposto a trattamento renale sostitutivo (15). Viene applicata ad un dosaggio di 30 ml di plasma/Kg/ora per circa 10 ore, da ripetere giornalmente (in genere un massimo di 5 cicli) fino all'effetto desiderato. Risulta indicata negli shock settici di qualunque eziologia, in cui concomita insufficienza renale che necessita di ultrafiltrazione. È stato dimostrato che migliora le condizioni emodinamiche e la sopravvivenza a 28 giorni (15).

## **2. BIOMARCATORI**

### **2.1 Concetti generali**

In generale, un biomarcatore può essere definito come la misura quantificabile dell'omeostasi biologica che definisce che cosa è normale, fornendo un quadro di riferimento per predire o individuare ciò che è anomalo, oppure, un indicatore di normali processi biologici e patologici, o di risposta farmacologica a un intervento terapeutico. Inoltre, un biomarcatore dovrebbe fornire tempestivamente informazioni aggiuntive rispetto a quello che è prontamente disponibile dai parametri di routine. Per definizione, i biomarcatori della sepsi dovrebbero rifletterne la biologia, come evidenziato dalle modificazioni biochimiche caratterizzate come la risposta dell'ospite all'infezione a livello cellulare e subcellulare. La ricerca di biomarcatori della sepsi è focalizzata principalmente sulle modificazioni biochimiche a livello plasmatico (sistema del complemento, coagulazione e chinina-callicreina) e gli indicatori di attivazione degli elementi cellulari (neutrofili, monociti/macrofagi e cellule endoteliali), che può condurre al rilascio di un certo numero di mediatori e molecole (citochine, chemochine e proteine di fase acuta). La risposta dell'ospite alla sepsi coinvolge centinaia di mediatori e singole molecole, molte delle quali sono state proposte come biomarcatori di sepsi. È improbabile che sarà possibile identificare un singolo biomarcatore capace di soddisfare tutte le necessità e le aspettative esistenti nell'identificazione e gestione della sepsi. In assenza di un oggettivo gold standard per la sepsi, i biomarcatori attualmente devono essere definiti e valutati in riferimento alla decisione clinica per la quale un dato marcatore potrebbe fornire informazioni non disponibili utilizzando parametri clinici e di laboratorio convenzionali. Un importante requisito per i biomarcatori della sepsi è il beneficio temporale che dovrebbero offrire per individuare una risposta infiammatoria sistemica a un'infezione prima che i segni clinici e il danno d'organo diventino manifesti. Da ultimo, tali biomarcatori potrebbero facilitare la precoce istituzione di terapie di supporto e ridurre il tasso di mortalità (16). Nei prossimi paragrafi analizzeremo quattro marcatori entrati nell'uso comune (proteina C reattiva, procalcitonina e BNP) e un marcatore innovativo, l'attività endotossinica.

### **2.2 Proteina C reattiva**

La proteina C reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta rilasciata dal fegato dopo l'inizio di un processo infiammatorio o danno tissutale. Durante le infezioni la CRP ha effetti sia proinfiammatori che antinfiammatori. La CRP può riconoscere e aderire ai patogeni e alle cellule danneggiate e mediare la loro eliminazione attraverso interazioni con cellule infiammatorie e mediatori. Tuttavia, la CRP previene l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali, inibisce la produzione di superossido e aumenta la produzione di antagonisti del recettore IL-1. La sua produzione è stimolata da varie citochine, ma soprattutto dall'IL-6. La CRP è un marcatore clinico frequentemente utilizzato per valutare la presenza di infezione e sepsi, e spesso è utilizzato come confronto per gli studi diagnostici. Studi in pazienti oncologici supportano il ruolo della CRP come marcatore di infezione o di sepsi. È stato dimostrato che il decorso della CRP non è influenzato dalla presenza o assenza di neutropenia in pazienti neoplastici. Studi su pazienti critici hanno

dimostrato che elevate concentrazioni plasmatiche di CRP sono correlate con un aumentato rischio di insufficienza d'organo e/o morte. Tuttavia, il suo ruolo nel predire la mortalità nelle sepsi post-chirurgiche è meno chiaro, considerato che in alcuni studi non sono state rilevate significative differenze fra i pazienti sopravvissuti e quelli deceduti. Dopo chirurgia resettiva pancreatica, si è registrato un livello massimo di CRP al terzo giorno postoperatorio, che gradualmente si è ridotto nei giorni successivi nei casi non complicati, mentre è rimasto elevato nei casi in cui si sono avute complicanze postoperatorie. In pazienti sottoposti ad esofagectomia ammessi in terapia intensiva, i livelli di PCR sono stati significativamente più elevati in seconda e terza giornata postoperatoria in pazienti che hanno sviluppato complicanze. In pazienti con sepsi acquisita in comunità, il decorso dei livelli di CRP è associato con la risoluzione della polmonite. Esistono dati contrastanti sul fatto che le concentrazioni assolute di CRP alla dimissione dalla terapia intensiva rappresentino un predittore indipendente di mortalità intraospedaliera dopo la dimissione dalla terapia intensiva. Nel contesto della terapia intensiva, la CRP potrebbe discriminare solo fra pazienti con sepsi severa da quelli con sepsi e senza sepsi nei primi due giorni dopo l'ammissione ma non durante il successivo decorso in terapia intensiva. Una ragione di questa tendenza potrebbe essere che i livelli plasmatici di CRP aumentano con un ritardo fino 24 ore in confronto alle citochine o alla procalcitonina. Le concentrazioni plasmatiche di CRP possono aumentare in caso di infezioni minori e non riflettono adeguatamente la gravità dell'infezione. I livelli plasmatici restano elevati per vari giorni, anche quando l'infezione è eliminata. Inoltre, il livello di CRP è elevato anche durante stati infiammatori di eziologia non infettiva, per esempio, malattie autoimmuni e disturbi reumatici, infarto miocardico, tumori maligni o dopo chirurgia (16).

### **2.3 Procalcitonina**

L'uso della procalcitonina (PCT) come potenziale biomarcatore di sepsi e infezione è stato descritto per la prima volta nel 1993. La PCT è il proormone della calcitonina, ma l'induzione del proormone durante sepsi e infezione è regolata in maniera diversa rispetto all'attività ormonale dell'ormone maturo. Il ruolo biologico della PCT coinvolge la modulazione dell'enzima ossido nitrico sintasi e l'induzione di citochine; inoltre, la proteina interferisce con il legame recettoriale di altri ormoni peptidici che hanno un ruolo nella modulazione dei fluidi intravascolari e del tono vascolare. La PCT è prodotta in maniera ubiquitaria, soprattutto nei tessuti neuroendocrini, in risposta all'endotossina o al rilascio di mediatori in risposta a infezioni batteriche (IL-1 $\beta$ -IL-6, TNF- $\alpha$ ), e correla fortemente con la misura e la gravità delle infezioni batteriche. Ad oggi, la PCT è uno dei marcatori più ampiamente utilizzati nella gestione di infezioni e sepsi in Europa, ed sta diventando sempre più disponibile in nel resto del mondo. La PCT dimostra un profilo cinetico molto più favorevole rispetto alla CRP e alle citochine: diventa individuabile da 2 a 4 ore dopo l'evento infettivo scatenante, ha un picco dopo 12-24 ore, e i livelli di PCT circolanti si dimezzano giornalmente quando l'infezione è controllata dal sistema immunitario dell'ospite e dalla terapia antibiotica. Se i livelli non scendono, devono essere rivalutati il controllo del focolaio infettivo e la terapia antibiotica. In confronto ad altri marcatori di sepsi attualmente disponibili, la PCT sembra avere potenziale nel discriminare l'eziologia infettiva o non infettiva dell'infiammazione

sistemica, anche in pazienti non acuti. I livelli di PCT correlano con la gravità dell'infezione batterica e la carica batterica. In pazienti con polmonite acquisita in comunità o infezioni delle vie urinarie, un cut-off di PCT di 0,1 µg/L ha una sensibilità molto elevata nell'escludere una batteriemia. Di conseguenza, il decorso della procalcitonina può avere implicazioni prognostiche. La PCT sembra avere potenziale anche nel differenziare infezioni batteriche e virali, e potrebbe indicare la presenza di sovrainfezione batterica in pazienti con malattie virali. In base a una metanalisi di 24 studi, la PCT ha una sensibilità e specificità di 0,8 e 0,9% rispettivamente nella previsione di necrosi infetta in pazienti con pancreatite. Alcune metanalisi hanno trovato la PCT utile per la diagnosi di infezione documentata clinicamente o microbiologicamente, mentre una sola metanalisi ha identificato solo un beneficio moderato nel rilevamento della batteriemia. La PCT è utile anche nel rilevamento di infezioni nosocomiali in pazienti critici, in particolare, della VAP (polmonite associata al ventilatore) (17). Le linee guida rilasciate dalla società americana di malattie infettive e dal collegio americano di medicina critica raccomandano di usare la PCT come un biomarcatore aggiuntivo per differenziare la sepsi dalla risposta infiammatoria sistemica di origine non infettiva. La Figura 2.1 evidenzia le condizioni cliniche in cui la PCT ha utilità come marcatore diagnostico.

Evidence-based criterion	Observational studies	Randomized-controlled interventional studies
Strong evidence in favor of PCT		Upper respiratory tract infection COPD exacerbation Pneumonia Severe sepsis/septic shock
Good evidence in favor of PCT	Bloodstream infections/bacteremia Pyelonephritis/urinary tract infections	Ventilator-associated pneumonia Postoperative infections
Moderate evidence in favor of PCT	Postoperative fever Arthritis Neutropenia Endocarditis	Meningitis
Use of PCT still undefined; weak/questionable evidence for/or against PCT	Abdominal infections Pancreatitis	

Figura 2.1 (18).

Un recente studio dimostra che la PCT sierica in sé e per sé non è un significativo fattore prognostico di sopravvivenza, invece un parametro derivato, la PCTc (clearance della procalcitonina), che riflette le variazioni temporali dinamiche della PCT, determinata dopo l'ammissione in terapia intensiva, può rappresentare un predittore di sopravvivenza in pazienti settici critici (19). Quindi è importante, ed ha valore prognostico la cinetica di questo marcatore piuttosto che il singolo valore. Esistono delle condizioni di natura infettiva che esordiscono con PCT negativa, e si positivizzerà solo in fase di shock settico. Come regola generale, tutte le infezioni compartimentalizzate possono esordire con PCT negativa, per esempio, ascessi cerebrali e ventricolite, raccolte toraciche profonde infette (per esempio: post-esofagectomia, post-sanguinamento polmonare), flemmoni profondi. Esiste inoltre un gruppo di Streptococchi, detti

Streptococchi del gruppo Milleri che provocano infezioni purulente profonde (ascessi polmonari profondi, ascessi cranici e rachidei) difficilmente individuabili, che danno negatività della PCT alla diagnosi. Condizioni analoghe sono: polmoniti atipiche (per esempio: da legionella o micoplasma) e le endocarditi (documentazione personale).

Ruolo della PCT nella gestione della terapia antibiotica. La resistenza antimicrobica è emersa come un fattore importante nell'influenzare l'outcome del paziente e l'impiego delle risorse. Questo impone un controllo più rigido della terapia al fine di ridurre un uso eccessivo di antibiotici. Il potenziale della PCT per assistere nella decisione dell'inizio e/o durata della terapia antibiotica è stato valutato in 13 studi per un totale di circa 4.400 pazienti. In base al contesto, l'uso della PCT ha comportato una riduzione della prescrizione di antibiotici fra il 74% e l'11%, e una riduzione dei giorni di terapia antibiotica fra il 13% e il 55%. Per pazienti a rischio moderato con infezioni respiratorie al pronto soccorso, gli algoritmi raccomandano l'inizio e l'interruzione della terapia antibiotica in base a 4 diversi cut-off. Per pazienti ad alto rischio nel contesto della terapia intensiva gli algoritmi consigliano di interrompere la terapia antibiotica se il paziente dimostra recupero clinico, e i livelli di PCT si riducono a livelli normali o si riducono dell'80-90% (Figura 2.2).

Guidelines for starting antibiotics <sup>a</sup>			
If the blood sample taken for procalcitonin level was taken at the early stage of the episode, obtain a second procalcitonin level at 6-12 h			
<sup>a</sup> Excludes situations requiring immediate antibiotic treatment (e.g. septic shock, purulent meningitis)			
Concentration <0.25 µg/L	Concentration ≥0.25 to <0.5 µg/L	Concentration ≥0.5 to <1 µg/L	Concentration ≥1 µg/L
⇓	⇓	⇓	⇓
Antibiotics strongly discouraged	Antibiotics discouraged	Antibiotics encouraged	Antibiotics strongly encouraged
Guidelines for continuing or stopping of antibiotics			
Concentration <0.25 µg/L	Concentration decrease by ≥80% from peak OR ≥0.25 to <0.5 µg/L	Concentration decrease by <80% from peak AND ≥0.5 µg/L	Concentration increase compared with peak AND ≥0.5 µg/L
⇓	⇓	⇓	⇓
Stopping of antibiotics strongly encouraged	Stopping of antibiotics encouraged	Continuing antibiotics encouraged	Changing antibiotics strongly encouraged

Figura 2.2 (17).

Bisogna tuttavia notare, come limitazioni del significato della PCT, che si può trovare aumentata anche in assenza di infezione batterica in situazioni di stress massivo, come dopo trauma grave e chirurgia, o in pazienti con shock cardiogeno. Questa è la ragione per cui il potere della PCT nel

discriminare sepsi e infiammazione sterile è migliore per i pazienti medici piuttosto che per i chirurgici. Esiste una serie di condizioni in cui si può avere aumento della PCT con infiammazione sistemica non batterica: distress alla nascita, colpo di calore, graft-versus-host disease, così come vari tipi di immunoterapia, come la trasfusione di granulociti, la somministrazione di globulina antilinfocitaria, o terapia con citochine o con anticorpi anticitochine. Malattie autoimmuni (malattia di Kawasaki o vasculiti) e sindromi paraneoplastiche possono dare aumento della PCT. Il valore diagnostico della PCT da sola per le sepsi fungine è scarso (16). Recentemente ne è stato proposto l'utilizzo insieme al Candida Score al fine di aumentarne l'accuratezza diagnostica e avere dei criteri più precisi in base ai quali impostare la terapia antifungina (documentazione personale).

## **2.4 Attività endotossinica**

Il rilevamento dell'endotossina nei pazienti settici è stato difficile, in parte per il fatto che la parte bioattiva della molecola, il lipide A, è un epitopo relativamente piccolo, soggetto a legame da parte di un singolo ligando alla volta, ma in grado di stimolare in sistema immunitario anche con un basso livello (pg/ml). L'endotossina è la componente della parete cellulare dei batteri Gram negativi in grado di indurre lo shock settico. Per questo, è possibile ipotizzare terapie dirette selettivamente all'endotossina. Al fine di applicarle con beneficio, cioè laddove sia presente endotossinemia sistemica, è necessario identificare i pazienti con questo requisito, anche se, fare delle assunzioni sulla mortalità non è facile a causa dell'eterogeneità delle condizioni che presentano endotossinemia sistemica. Lo studio EUPHAS ha dimostrato una ridotta mortalità in pazienti con shock settico postchirurgico d'urgenza addominale trattati con adsorbimento antiendotossina, rispetto a pazienti trattati con terapia convenzionale. Quindi identificare questi pazienti diventa mandatorio per poter beneficiare di tali terapie. Anche l'esposizione cronica all'endotossina ha degli effetti deleteri. Pazienti con insufficienza renale cronica in trattamento dialitico hanno livelli di endotossina cronicamente elevati e una riprogrammata attività leucocitaria in risposta all'endotossina con cronico aumento di citochine proinfiammatorie come TNF- $\alpha$ . I pazienti dializzati hanno una mortalità annua del 30%, e il rilascio cronico di endotossina può essere dovuto a uno spostamento di fluidi che influenza la permeabilità intestinale. I livelli di endotossinemia hanno correlato significativamente con lo stunning miocardico, i livelli di troponina I e una caduta della pressione arteriosa sistolica e diastolica, indicando che modificazioni della permeabilità intestinale o ipoperfusione potrebbero essere responsabili della traslocazione dell'endotossina. Il rilevamento dell'endotossina nei liquidi biologici si basa oggi su un test chiamato Endotoxin Activity Assay (EAA<sup>®</sup>), che ha superato i precedenti. L'endotossina eventualmente presente nel sangue intero del paziente forma degli immunocomplessi con anticorpi monoclonali antiendotossina IgM che vengono opsonizzati da proteine del complemento, formando dei complessi che attivano il burst respiratorio nei neutrofili. Tale attivazione è proporzionale al logaritmo della concentrazione di endotossina nel campione, ed è rilevata con tecnica chemiluminescente (Figura 2.3).

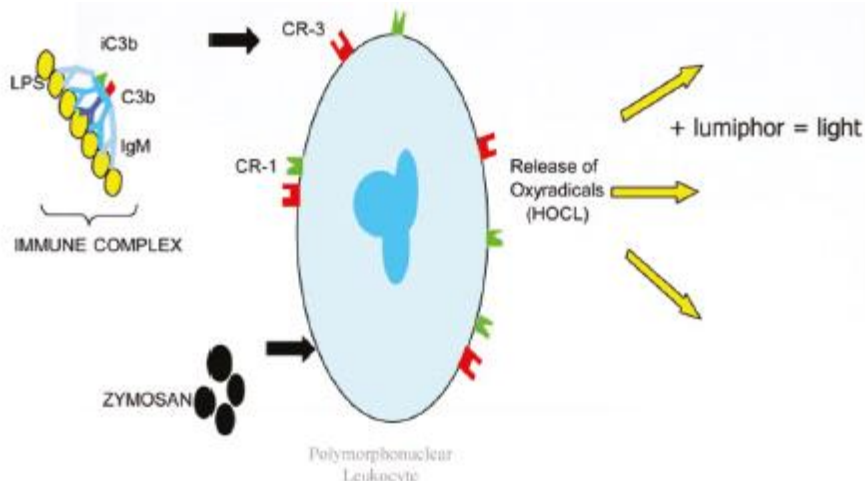


Figura 2.3 (20).

Il risultato del test è semiquantitativo ed è pronto in circa 30 minuti. Questo consente una migliore selezione dei pazienti candidati a trattamenti antiendotossina. Il livello di endotossina viene quantificato in una scala da 0 a 1, che va interpretata come: da 0 a < 0,4 negativa, da  $\geq 0,4$  a < 0,6 intermedia,  $\geq 0,6$  positiva. Bisogna specificare che livelli di endotossina bassi e intermedi possono associarsi in qualche caso ad infezione da Gram positivi. Il MEDIC trial, che ha coinvolto più di 800 pazienti in terapia intensiva con infiammazione sistemica da sospetta infezione, ha dimostrato correlazioni significative fra livello elevato di endotossina all'ammissione e il rischio di sviluppo di sepsi nelle 24 ore successive, la gravità della malattia, il rischio di un'infezione da Gram negativi e di aumentata mortalità (20). Secondo un recente studio condotto su una coorte di 48 pazienti gravemente politraumatizzati, l'endotossinemia è assente all'ammissione in terapia intensiva e si sviluppa nel 75% dei pazienti in tempi successivi, anche in assenza di infezioni da germi Gram negativi. I pazienti sopravvissuti hanno avuto endotossinemia più bassa rispetto ai non sopravvissuti. Shock e intervento chirurgico predicono lo sviluppo di endotossinemia, che risultano associati a disfunzione cardiovascolare. Le infezioni da Gram negativi sono poco frequenti in questa popolazione, indicando l'intestino come fonte principale dell'endotossina (21). Il valore prognostico dell'EAA è stato testato anche in una popolazione di pazienti post-cardiochirurgici con sepsi sospetta o accertata, può essere utile nel riconoscere i pazienti a maggiore rischio di mortalità (22).

## 2.5 Marcatori cardiaci

Il più usato è il BNP (brain natriuretic peptide): sono stati descritti livelli aumentati di BNP come marcatore di disfunzione miocardica e indicatore prognostico in pazienti settici. È stato visto che pazienti con shock settico hanno livelli marcatamente aumentati di BNP che correlano con la frazione di eiezione del ventricolo destro e sinistro all'analisi univariata. La gravità della malattia definita dallo score APACHE e dal punteggio SOFA massimo è stata associata ai livelli di BNP, e il livello di BNP al primo giorno è un predittore indipendente di mortalità a 28 giorni. In base a

questo lavoro, è la gravità della malattia piuttosto che la disfunzione cardiaca che spiega l'aumento del BNP in pazienti con sepsi e shock settico. La mancata riduzione dei livelli di BNP nei primi giorni è associata ad un'aumentata mortalità. L'osservazione dei livelli del BNP può essere utile nel valutare la risposta alla terapia e la prognosi (23). Tutto questo è confermato da un recente studio, di La Camera et al, (24) in cui in 27 pazienti ricoverati in terapia intensiva, sono stati determinati il BNP e la NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) come marcatori diagnostici e prognostici entro 24 ore dall'ammissione, al secondo e al quinto giorno di degenza. Nei pazienti sopravvissuti si è registrato un calo del BNP significativamente maggiore rispetto ai deceduti. I pazienti deceduti hanno mostrato livelli di BNP al secondo giorno più elevati, invece i sopravvissuti hanno mostrato livelli nella norma o comunque senza tendenza all'aumento, e simile è stato l'andamento della NGAL. In pazienti con NGAL > 300 ng/ml e BNP > 300 pg/ml la mortalità è stata significativamente più elevata (Figura 2.2). Oggi è sempre più chiaro il legame fra patologia cardiaca e renale, e si parla infatti di sindrome cardio-renale. La sindrome cardiorenale è una patologia combinata renale e cardiaca in cui una disfunzione acuta o cronica di un organo causa disfunzione acuta o cronica dell'altro. Ne esistono 5 tipi, il tipo più frequentemente riscontrato in terapia intensiva è il tipo I, in cui un danno cardiaco acuto causa danno renale; colpisce dal 19% al 45% di tutti i pazienti ricoverati (24).

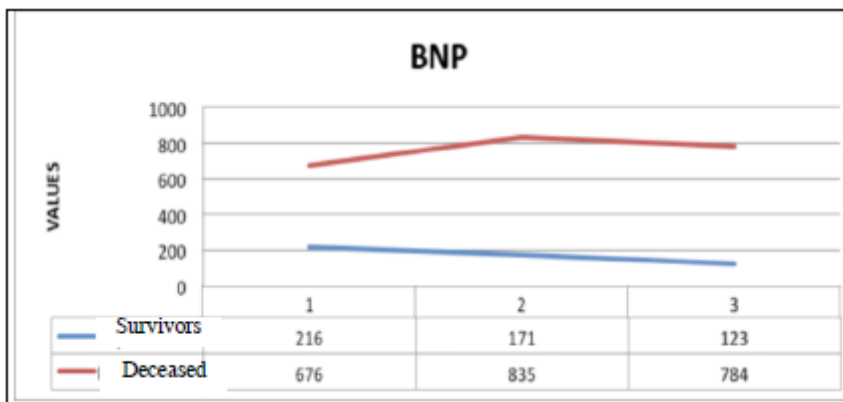


Figura 2.2 (24).



### 3. STUDIO CLINICO

#### 3.1 Introduzione

Abbiamo già sottolineato nelle sezioni precedenti l'importanza di sepsi e shock settico come problematiche di grande impatto nella salute pubblica, con conseguenze in gran parte evitabili se gestiti in modi e tempi corretti. In questi pazienti, predittori precoci di qualsiasi natura di disfunzione d'organo possono conferire benefici per una diagnosi precoce. I marcatori ematici come tali (per esempio, conta leucocitaria e piastrinica, CRP) garantiscono scarsa sensibilità e specificità per predire l'outcome. Punteggi clinici complessi come APACHE II (25), SAPS II (26), PIRO (27) e MEDS (28), potrebbero non essere adeguati ad ogni contesto clinico né soddisfare i requisiti dei medici, e richiedere molto tempo per completare il risultato. Come le stesse linee guida implicano, l'uso di nuovi biomarcatori può caratterizzare la risposta dell'ospite all'infezione, in termini di identificazione della disfunzione d'organo e interazione con il patogeno. Prenderemo in considerazione alcuni di essi. Abbiamo già evidenziato come l'endotossina, nota anche come lipopolisaccaride (LPS), sia un normale componente della parete cellulare dei batteri Gram negativi e ha un ruolo noto nella patogenesi della sepsi in quanto potente induttore dell'immunità innata. Un test innovativo, l'EAA, ha come obiettivo quello di stratificare il rischio di progressione della sepsi. L'EAA correla il livello dell'endotossina e il rischio di insorgenza di shock settico; 0,4 indica bassi livelli (25-50 pg/mL) e rischio limitato di sepsi, da 0,4 a 0,59 indica un livello medio e corrisponde ad un'aumentato rischio di sepsi e shock settico; sopra 0,6 si hanno un livello e un rischio elevato (100-200 pg/mL) (29-30). La misura dell'EAA correla con lo score APACHE II e con l'outcome del paziente, con livelli sopra 0,6 che corrispondono ad un aumento di mortalità del 50% (31). Inoltre, il test EAA può essere usato per stimare l'efficacia del trattamento. Il BNP è un forte indicatore prognostico di morte ed eventi cardiaci in pazienti sia senza (32-33) che con insufficienza cardiaca (34). La misura del BNP può fornire un segnale d'allerta molto precoce per eventi cardiovascolari futuri in pazienti con e senza sintomi (35-36). Questo può essere favorevole per una diagnosi precoce di disfunzione cardiaca correlata alla sepsi. Abbiamo cercato di definire la prevalenza di endotossiemia in un gruppo di pazienti critici, al fine di determinarne l'associazione con infezioni invasive e valutarne la correlazione con la sepsi e l'outcome del paziente in terapia intensiva all'ammissione. L'obiettivo di questo studio è stato di valutare e correlare diversi parametri, come la conta leucocitaria e piastrinica e CRP con marcatori di infezione e performance d'organo (EAA e BNP), valutare la loro influenza sull'outcome e contestualizzare il valore di queste correlazioni nella gestione generale dei pazienti settici. Abbiamo ipotizzato che l'uso combinato di questi marcatori, insieme a parametri convenzionali, consenta un precoce riconoscimento di infezione e disfunzione d'organo, e questo può aiutare nel riconoscere i pazienti settici durante le ore critiche e applicare i trattamenti appropriati. Il risultato atteso è l'interpretazione dei risultati in modo tale da riconoscere un profilo che può differenziare il rischio di mortalità, giustificando trattamenti intensivi più o meno aggressivi.

### 3.2 Materiali e metodi

Dopo approvazione da parte del comitato etico locale, è stato intrapreso questo studio prospettico osservazionale su una coorte di pazienti critici affetti da sepsi o shock settico, ammessi in terapia intensiva (Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine) da settembre 2012 a marzo 2013.

Popolazione dello studio. Sono stati selezionati quindici pazienti in base a: presenza di segni di sepsi, almeno un dosaggio dell'attività endotossinica (EAA™, Spectral Medical, Toronto, Canada), e un dosaggio del BNP, entro 6 ore dall'ammissione in terapia intensiva come criteri d'ammissione. La sepsi e lo shock settico sono stati diagnosticati tramite dati microbiologici, laboratoristici, radiologici ed emodinamici, applicando i criteri definiti da Levy et al, nella International Sepsis Definitions Conference del 2012 (2). Criteri d'esclusione sono stati: malattia di von Willebrand's, trattamento con plasmateresi e trasfusioni di globuli rossi durante le 6 ore precedenti (al fine di evitare interferenze con l'EAA). Tutti i pazienti reclutati o i loro rappresentanti hanno firmato un appropriato modulo di consenso.

Protocollo dello studio. I pazienti idonei sono stati sottoposti a misurazioni dell'EAA e del BNP ogni 24 ore. Tutti i pazienti hanno ricevuto un monitoraggio invasivo della pressione arteriosa tramite cannula nell'arteria radiale o brachiale. È stata eseguita rianimazione volêmica standard con colloidali e cristalloidi per l'ipotensione, e nei casi refrattari al trattamento fluidico sono stati somministrati inotropi e/o vasoattivi al fine di mantenere la pressione arteriosa media (MAP) su valori superiori a 65 mmHg. I pazienti hanno ricevuto anche antibiotici per via endovenosa in base ai risultati delle emocolture e delle sensibilità anti-microbiche. I pazienti hanno iniziato terapia sostitutiva renale continua (CRRT) in presenza di una o più delle seguenti condizioni: presenza di oliguria o anuria, elevata concentrazione sierica urea, elevata concentrazione sierica di creatinina (maggiore di 2 mg/dl), alterate concentrazioni di sodio e potassio, sovraccarico fluidico con o senza edema polmonare non responsivo ai diuretici, acidosi metabolica scompensata, temperatura corporea maggiore di 40 °C, e complicanze uremiche. La CRRT è stata controindicata in presenza di pressione arteriosa sistolica minore di 85 mmHg con o senza infusione di vasopressori, e segni e sintomi di shock cardiogeno. Quando veniva posta stata indicazione a CRRT, veniva posizionato un catetere venoso centrale a due lumi così da iniziare il trattamento. Veniva eseguita l'emofiltrazione veno-venosa continua (CVVH) utilizzando un filtro di polietilensulfone (HF19 Edwards Lifesciences S.A., 1162 St. Prex, Switzerland), con un flusso ematico da 120 a 250 ml/minuto, e un'infusione di fluido sostitutivo che variava da 2000 a 3000 ml/ora. Veniva somministrata eparina a basso dosaggio al fine di mantenere l'ACT (activated clotting time) nel circuito extracorporeo da 1,5 a 2 volte superiore al valore normale. Il volume di ultrafiltrazione netto giornaliero veniva determinato da nefrologi consulenti.

Raccolta dei dati. I dati sono stati raccolti in maniera prospettica dalla cartella dei pazienti che soddisfavano i criteri d'inclusione. I parametri comprendevano le informazioni demografiche, le comorbidità, la diagnosi all'ammissione in terapia intensiva, l'endotossinemia, il tipo di patogeno isolato, BNP, RCP e livello di procalcitonina, conta leucocitaria e piastrinica, sviluppo di

insufficienze d'organo, necessità di CRRT e vasopressori, durata della degenza, sopravvivenza durante la degenza in terapia intensiva e mortalità a 30 giorni.

Analisi statistica. I dati con distribuzione normale sono stati presentati come media  $\pm$  deviazione standard. Sono stati eseguiti vari test statistici: il test t di Student per confrontare variabili quantitative normalmente distribuite e dicotomiche, il test di Fisher per le variabili dicotomiche, il test dei ranghi di Wilcoxon per le variabili quantitative e dicotomiche, e il test di correlazione di Spearman per le variabili quantitative. È stata assunta una significatività statistica per valori di P minori di 0,05. È stato utilizzato un modello di regressione logistica multivariata per stimare l'associazione fra endotossitemia e gravità della sepsi, con correzioni per covariate (età, sesso, presenza di SIRS, durata della degenza, CRP, PCT, conta leucocitaria e piastrinica, e necessità di CRRT).

### 3.3 Risultati

È stato reclutato nello studio un numero totale di 20 pazienti. Cinque pazienti sono stati esclusi perché i risultati dell'EAA non erano valutabili. Il nostro campione ha dimostrato una distribuzione normale, con un'età media di  $61 \pm 14$  anni. La Tabella 3.1 riassume i dati demografici e clinici dei pazienti in studio. Complessivamente, una percentuale di pazienti del 46.7% era di sesso maschile e la durata media della degenza è stata di  $17.8 \pm 16.7$ . I livelli medi di EAA sono stati  $0.69 \pm 0.28$  e quelli di BNP di  $944.4 \pm 942.5$  pg/ml. I valori medi di RCP sono risultati  $205.2 \pm 138.3$  mg/dl, quelli di PCT  $54.9 \pm 81.9$  mg/dl, la conta leucocitaria media  $12.2 \pm 6.7 \cdot 10^3$ /ml, e la conta piastrinica media  $86.3 \pm 76.9 \cdot 10^3$ /ml. Il 53.3% dei pazienti ha avuto necessità di CRRT durante la degenza in terapia intensiva.

Un'emocoltura positiva con isolamento di un microorganismo Gram negativo è risultata presente in 9 pazienti (60%) all'ammissione in terapia intensiva, mentre un'infezione da Gram positivi è stata diagnosticata in un paziente (6,7%). Le emocolture degli altri pazienti sono risultate negative per infezioni batteriche (33%). I livelli di EAA sono risultati minori di 0,4 in 3 pazienti (20% della popolazione), fra 0,4 e 0,6 in 3 pazienti (20%), e maggiori di 0,6 in 9 pazienti (60%). Fra i pazienti con EAA maggiore di 0,6, è stata osservata una batteriemia da Gram negativi in 8 pazienti (89%), mentre solo uno dei 6 pazienti con EAA minore di 0,6 ha avuto batteriemia causata da germi Gram positivi. Complessivamente, le infezioni da Gram negativi sono state significativamente più frequenti in pazienti con endotossinemia ( $p = 0,01$ ). Livelli di EAA sotto 0,4 sono stati associati a minore probabilità di infezione batterica in confronto a livelli elevati ( $p = 0,01$ ). Il tasso di mortalità grezzo in terapia intensiva è stato del 53,3%. Il tasso di mortalità non è stato influenzato dalla presenza o assenza di batteriemia all'ammissione in terapia intensiva (44% versus 66%,  $p = 0.6$ ). Non è stata influenzata neanche dal livello di EAA, come dimostrato dalla mancanza di associazione fra EAA inferiore a 0,4 unità e minore mortalità, e EAA maggiore di 0,6 e maggiore mortalità ( $p = 1$ ). Nonostante questo, pazienti con EAA sopra 0,6 all'ammissione in terapia intensiva erano più compromessi, come dimostrato da indici di gravità più elevati; questi pazienti hanno manifestato anche un livello maggiore di disfunzione multiorgano. La conta leucocitaria non è risultata più frequentemente alterata in pazienti con endotossinemia (77% versus 66%,  $p = 0.2$ ). Poiché l'endotossinemia è stata rilevata molto più frequentemente della batteriemia da Gram negativi, abbiamo valutato anche l'associazione fra livelli di endotossina e variabili di natura non infettiva, come l'età, livelli di BNP, necessità di CRRT e durata della degenza. Non è stata rilevata una relazione statisticamente significativa fra mortalità e genere: 50% versus 57% rilevata rispettivamente negli uomini e nelle donne ( $p = 1$ ), nonostante sia evidente che metà dei decessi in pazienti donna sia avvenuta dopo la dimissione dalla terapia intensiva. La Figura 3.1 dimostra la relazione fra età e necessità di CRRT: più avanzata è l'età, maggiore è la probabilità di essere sottoposti a CRRT ( $52.1 \pm 13.2$  e  $68.4 \pm 9.6$  anni, rispettivamente). È stata rilevata una correlazione fra età e durata della degenza ( $p = 0.436$ ), nonostante non sia significativa ( $p = 0.1042$ ). Nonostante questo, dall'esecuzione del test a una coda è risultata una tendenza alla significatività, supportando l'ipotesi che pazienti più anziani hanno il rischio di una degenza più prolungata in terapia intensiva.

Non è stata trovata correlazione fra età e EAA, livelli di RCP e PCT e conta piastrinica. Inoltre, il tasso di sopravvivenza non sembra che sia stato influenzato dal livello di EAA. Non è stata trovata correlazione fra età e livelli medi di endotossina, sia nei pazienti sopravvissuti che in quelli deceduti. La Figura 3.2 dimostra la relazione fra età e durata della degenza, e dimostra che pazienti con meno di 51 anni avevano una durata media del ricovero di 10 giorni, mentre pazienti più anziani sono rimasti in terapia intensiva per un tempo maggiore (26 giorni in media). La durata media della degenza è stata significativamente maggiore nelle donne rispetto agli uomini (in giorni, 20 versus 8,  $p = 0.042$ ) (Figura 3.3). Non c'è stata differenza significativa nella distribuzione dei livelli di BNP in soggetti con livelli di EAA normali o elevati ( $p = 0,28$ ). Eseguendo il test a una coda, in supporto dell'ipotesi alternativa secondo la quale i pazienti che hanno normali livelli di EAA hanno una minore distribuzione dei valori di BNP, abbiamo osservato una tendenza alla significatività. Diversamente, abbiamo trovato una differenza significativa fra la distribuzione di BNP e conta leucocitaria, con un valore di  $p$  di 0,033 e uno di  $\rho$  di 0,64. Pazienti sottoposti a trattamento CVVH hanno dimostrato valori di BNP più elevati ( $p = 0,04$ ) (Figura 3.4) ma non mortalità più elevata ( $p = 0.44$ ). Tutti i pazienti sottoposti a CVVH hanno avuto valori di BNP elevati, mentre il 60% dei pazienti non sottoposti a CVVH hanno avuto valori di BNP elevati. Abbiamo correlato anche il tasso di mortalità in terapia intensiva con la conta piastrinica: abbiamo trovato una correlazione fra una bassa conta piastrinica e un'aumentata mortalità ( $p = 0,029$ ) (Figura 3.5).

### 3.4 Discussione

Questo studio ha analizzato la relazione fra parametri di infezione (conta leucocitaria, RCP, PCT), età e genere, con la mortalità in pazienti settici, e ha combinato questi risultati con i livelli di BNP e di EAA al fine di individuare caratteristiche dei pazienti utili a prendere decisioni appropriate nelle ore più critiche. La necessità di CRRT è associata ad una prognosi peggiore (18-19). Inoltre, si sa che l'EAA è un mezzo potente nel riconoscimento precoce di pazienti ad alto rischio di sviluppo di sepsi e shock settico (31, 37-38). Abbiamo preso in considerazione la correlazione di EAA con diverse variabili cliniche al fine di dimostrare il valore clinico della loro combinazione. I pazienti settici ad alto rischio dovrebbero essere identificati precocemente poichè è probabile che progrediscono rapidamente da sepsi a shock settico. Lo sviluppo di mezzi per la stratificazione del rischio e prognosi nei pazienti settici sono essenziali. Per questo obiettivo, sono stati proposti i punteggi PIRO e MEDS. Sono relativamente facili da utilizzare ma la loro capacità predittiva all'ammissione in terapia intensiva è scarsa (27). Anche le condizioni croniche dei pazienti sono importanti, poichè aumentano il rischio stesso di sepsi e riducono la riserva funzionale necessaria ad affrontare la disfunzione multiorgano correlata alla sepsi (39).

Sono stati ottenuti degli isolati microbiologici nel 60% dei nostri pazienti settici, dati confrontabili con il 60 -70% riportato in altri studi (40). Gli esami colturali hanno dimostrato una frequenza più elevata di germi Gram negativi (60%), e il 20% delle infezioni sono risultate polimicrobiche. I nostri risultati sono conformi a quelli riportati in letteratura dove germi Gram negativi sono implicati nel 50 – 60% delle sepsi, germi Gram positivi sono coinvolti in un ulteriore 35 – 40%, e la restante percentuale è dovuta a funghi, virus e protozoi. La sede più comune di infezione è stata il polmone, similmente ad altri lavori recenti (41-45). Dalla letteratura viene riportato che il polmone contribuisce al 40 – 60% delle infezioni, e l'addome rappresenta il 10 – 15% come fonte d'infezione (46). Tuttavia, non è stato riscontrato che la presenza o assenza di batteriemia all'ammissione in terapia intensiva abbia influenza sulla mortalità. Possono essere ipotizzati diversi motivi, anche se è stata somministrata terapia antibiotica adatta per i germi isolati agli esami colturali. L'instabilità emodinamica e la mancanza di concentrazioni effettive di antibiotici potrebbero aver impedito di raggiungere efficacemente il sito di infezione. Precedenti terapie antibiotiche empiriche (per esempio, in corsia) potrebbero aver selezionato batteri multiresistenti o indurre risultati negativi agli esami colturali. Diverse eziologie della sepsi (virus, funghi) amplificano il fenomeno della negatività colturale. L'adeguatezza della terapia antibiotica in termini di copertura antimicrobica e concentrazione ha importanza e impatto sulla mortalità (47), e può spiegare i nostri dati sulla mortalità. Può anche essere intuitivo che la mancanza di una risposta immunitaria efficace per una particolare fragilità dei pazienti condiziona criticamente le possibilità dei pazienti di sopravvivere.

Monti et al, ha pubblicato dei dati sulla relazione fra EAA e outcome in pazienti critici affetti da shock settico (48). In base a questo studio, tutti i pazienti con bassa endotossinemia ( $< 0.4$ ) sono sopravvissuti. Pazienti con livello di EAA intermedio (fra 0,4 e 0,6) ed elevato ( $\geq 0.6$ ) hanno avuto una mortalità del 17% e del 37%, rispettivamente (48). Yaroustovsky et al (22) ha dimostrato che

livelli di attività endotossinica che eccedono 0,65 indicano un'aumentata mortalità a 28 giorni in presenza di altri segni clinici di infezione grave. Non è stata trovata un'associazione fra batteriemia da Gram negativi e livello di EAA. Nel nostro studio è stata rilevata un'associazione significativa fra batteriemia da Gram negativi e positività all'EAA, indicando che l'endotossinemia è comune nelle malattie critiche, e la sua assenza può supportare la conclusione clinica che è molto improbabile che un paziente critico sia infetto da batteri Gram negativi. Tuttavia, diversamente dagli studi precedentemente menzionati, non abbiamo rilevato alcuna correlazione significativa fra livello di EAA e mortalità, né livello di PCT e RCP, conta piastrinica, livello di BNP e anomalie dei globuli bianchi. La nostra popolazione ha dimostrato livelli medi di PCT molto elevati, indicando uno stato avanzato dell'infezione alla diagnosi, verosimilmente già batteriemia e – come affermato – alcune di loro precedentemente trattate con terapie antibiotiche in pazienti con multiple comorbidità, fattori che potrebbero aver alterato la risposta al trattamento. Inoltre, i nostri pazienti hanno mostrato già alla diagnosi disfunzione multiorgano e un'importante condizione di fragilità, dimostrata per esempio, da una bassa conta piastrinica media, che ha un valore prognostico negativo intrinseco, indipendentemente dalla singola infezione (49). Essendo la sepsi una condizione eterogenea alla diagnosi, può essere ragionevole che misure di outcome di sepsi possano essere corrette per precedenti condizioni croniche e valutate come beneficio centrato sul paziente, possibilmente senza basarsi su un singolo marcatore (50).

Come dimostrato da Lentini et al (51), c'è una correlazione significativa fra attività endotossinica e livelli di BNP in pazienti settici, e i livelli di BNP sono significativamente più elevati fra pazienti settici in confronto ai pazienti non settici. Fra i pazienti settici, soggetti che hanno sviluppato insufficienza renale acuta hanno dimostrato i livelli di BNP più elevati, concordemente ai nostri dati sui pazienti sottoposti a CVVH che hanno mostrato valori di BNP più elevati. Tuttavia, i nostri dati non hanno confermato la correlazione fra attività endotossinica e livelli di BNP, i quali invece hanno correlato con alterazioni leucocitarie. Alterazioni immunitarie e limitata ampiezza del campione possono spiegare questa differenza. Nel nostro studio non è stato dimostrato che la necessità di CRRT influenzi la mortalità; possono essere implicate queste motivazioni insieme a una funzione renale gravemente alterata.

Secondariamente, abbiamo analizzato la relazione fra genere, durata della degenza ed età nella sepsi. Vari studi (52-55) hanno pubblicato dati coerenti che dimostrano che il genere femminile ha mortalità attribuibile più elevata. Wullur et al, (56) e Adrie et al, (57), hanno dimostrato un rischio più alto di mortalità per sepsi in pazienti maschi. Noi non abbiamo trovato alcuna associazione fra mortalità e genere, ma durata della degenza significativamente maggiore nelle donne. La risposta agli ormoni sessuali può avere un ruolo (58), insieme all'influenza dell'età, dello stato menopausale, del sito dell'infezione primaria, comorbidità croniche e necessità di procedure invasive. La popolazione di ciascuno di questi studi potrebbe essere stata eterogenea e non adeguatamente combinata in termini di numero di pazienti maschi e femmine. Il nostro studio ha dimostrato che pazienti più anziani potrebbero essere a rischio più elevato di prolungata degenza in terapia intensiva, nonostante la mancanza di significatività statistica. Pazienti settici anziani

sono più fragili e soggetti ad un rischio aumentato di complicanze, che possono spiegare l'aumentata durata della degenza. Nonostante questo, quando consideriamo la mortalità, non c'è evidenza univoca nella correlazione fra età e mortalità per sepsi (59, 60).

Complessivamente, i risultati dello studio possono essere inquadrati alla luce della fragilità. Le Maguet et al (61) ha preso in considerazione il ruolo della fragilità dei pazienti (una condizione caratterizzata dalla perdita di riserva funzionale e conseguente incapacità di mantenere l'omeostasi nel decorso di una malattia o di un danno) indicando che è un'evenienza frequente e indipendentemente associata ad aumentata mortalità in terapia intensiva e mortalità a 6 mesi. La fragilità implica un'insufficienza dell'aumento del trasporto dell'ossigeno in risposta ad eventi stressanti con conseguente alterazione metabolica (62). L'evidenza indica che fattori diversi dall'età cronologica, in particolare il precedente stato di salute, hanno un ruolo chiave nell'outcome (63), anche se i medici dovrebbero considerare la fragilità come uno dei fattori predittivi di mortalità, provando ad identificare i pazienti che potrebbero o meno trarre beneficio da trattamenti intensivi (64). La presenza di fragilità può peggiorare l'outcome indipendentemente dalla tendenza dei biomarcatori.

Questo studio ha delle limitazioni. È stato uno studio di un singolo centro con ampiezza campionaria limitata. Il campione di pazienti relativamente piccolo da un solo centro e con una sola coorte potrebbe non aver permesso di ottenere la significatività statistica per alcune correlazioni. L'assenza di un'analisi dei sottogruppi potrebbe aver impedito di identificare i fattori che influenzano specificamente la mortalità, e ottenere correlazioni più specifiche. Inoltre, differenze dovute alla varietà dei casi potrebbero aver avuto influenza sui risultati finali.



### **3.5 Conclusioni**

Poiché il numero di ammissioni in terapia intensiva di pazienti anziani e fragili continua ad aumentare, i medici devono identificare i fattori che giustificano i trattamenti intensivi e la razionalizzazione delle risorse. Nella maggior parte dei casi, è identificabile un profilo di rischio aggiuntivo in pazienti con un elevato numero di comorbidità gravi, disabilità e perdita di riserva funzionale, correlate alla fragilità. La presenza di questo elemento può peggiorare l'outcome dei pazienti settici indipendentemente dal valore dei dati routinari come età, genere, e test di laboratorio come conta leucocitaria e piastrinica, valori di RCP e PCT, EAA e durata della degenza, con i quali non sempre è possibile stabilire una correlazione precisa o facilmente individuabile. Sono necessari ulteriori studi per chiarificare il ruolo della fragilità nella manifestazione ed evoluzione della sepsi, così come la sua correlazione con i biomarcatori di utilizzo routinario.

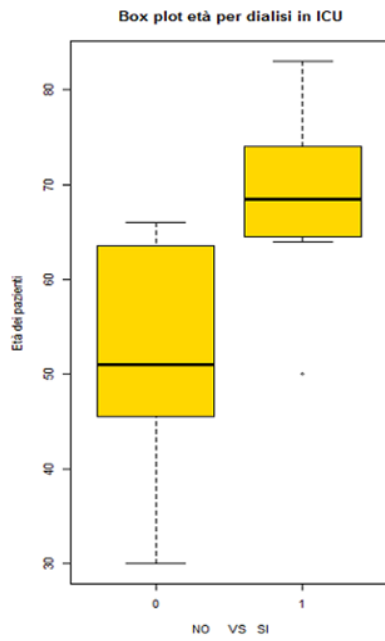
### Illustrazioni la sezione 3

**Tabella 3.1**

Paziente	Genere	Età anni	Degenza giorni	EAA	BNP <i>pg/ml</i>	CRP <i>mg/dL</i>	PCT <i>mg/dL</i>	WBC <i>X10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></i>	PLT <i>10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></i>	CRRT	Esito †UTI
1	F	68	61	1,24	1650	214	Nd	18,7	258	si	Vivo
2	F	48	20	0,39	109	9	24,8	9,5	8	no	†
3	F	64	6	0,94	Nd	413	38	22,5	14	si	†
4	M	73	14	0,37	Nd	135	59,42	23,9	50	si	Vivo
5	M	50	4	0,85	1541	258	46,36	11,02	28	si	†
6	M	75	14	0,86	1137	96	4,44	18,06	62	si	†
7	M	66	7	0,68	122	264	4,09	15,08	190	no	Vivo
8	M	66	4	1,07	52	166	0,57	7,62	120	no	Vivo
9	F	51	15	0,62	301	293	Nd	0,6	9	no	‡
10	F	83	41	0,29	1305	144	6,53	11,5	138	si	‡
11	M	65	8	0,91	3037	24	Nd	15,88	19	si	†
12	M	43	2	0,51	Nd	187	80,43	11,04	41	no	Vivo
13	F	30	9	0,58	Nd	58	Nd	3,74	177	no	Vivo
14	M	61	25	0,41	13	330	50	7,08	115	no	†
15	F	69	37	0,67	1121	487	289	7,08	66	si	Vivo

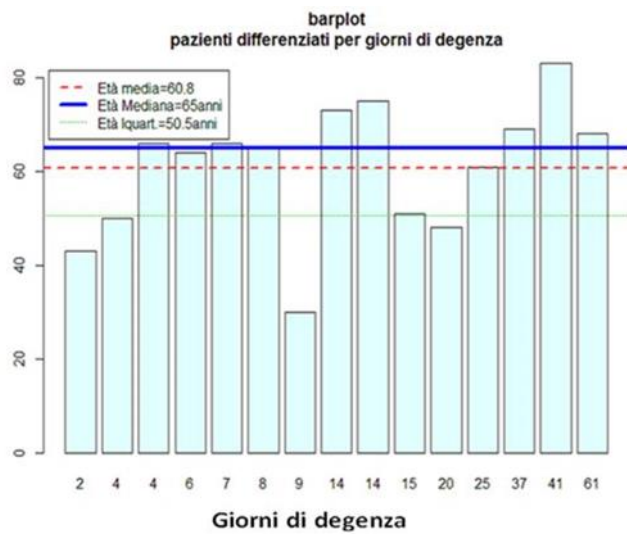
Dati clinici e di laboratorio dei pazienti in studio. UTI: unità di terapia intensiva

**Figura 3.1**



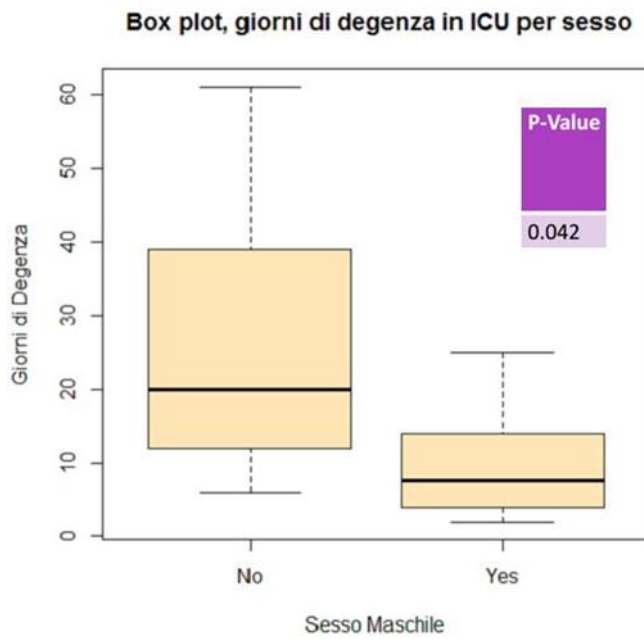
Boxplot età versus necessità di CRRT

**Figura 3.2**



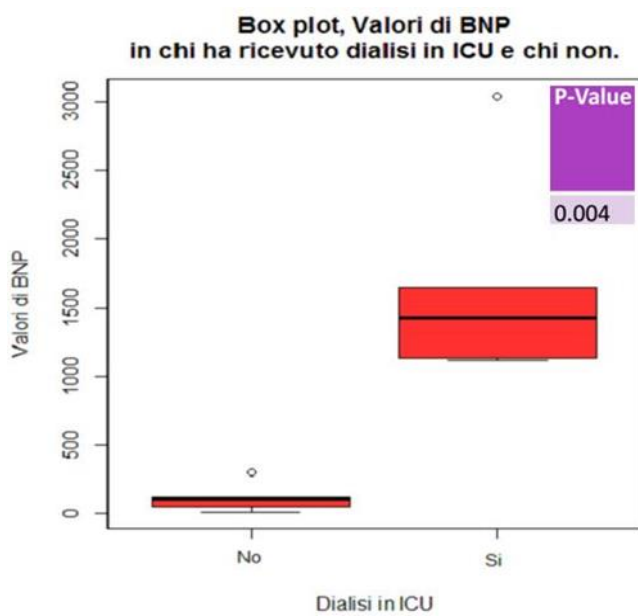
Boxplot età versus durata della degenza

**Figura 3.3**



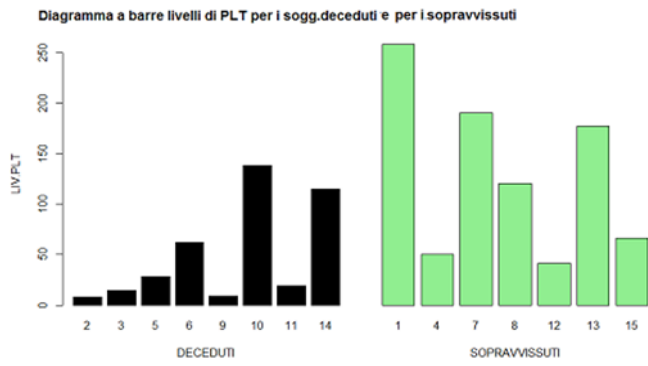
Boxplot genere versus durata della degenza in terapia intensiva

**Figura 3.4**



Boxplot valori di BNP versus necessità di CRRT

**Figura 3.5**



Barplot conta piastrinica versus mortalità

## RIFERIMENTI

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer D, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, GD Rubinfeld, Tomvan der Poll S, Vincent JL, Angus DJ. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock. *JAMA*, 2016;315(8):801-810
2. The Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock. *Intensive Care Med* 2013, 39:165–228
3. Rodriguez A, Martín-Loeches I, Yébenes JC. New definition of sepsis and septic shock: What does it give us? *Med Intensiva*, 2016
4. [www.ausl.pc.it/offerte...sepsi/Epidemiologia\\_della\\_sepsi%20\\_DR\\_MAGRI.ppt](http://www.ausl.pc.it/offerte...sepsi/Epidemiologia_della_sepsi%20_DR_MAGRI.ppt). Accesso il 18/06/2016
5. Azkárate I, Choperena G, Salas E, Sebastián R, Lara G, Elósegui I, Barrutia L, Eguibar I, Salaberria R. Epidemiology and prognostic factors in severe sepsis/septic shock. Evolution over six years. *Med Intensiva*. 2016;40(1):18-25
6. Van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Pharm D, PhD; Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, Schultz MJ, Nürnberg P, Bonten MJ, Cremer OJ, Der Poll T, for the MARS Consortium. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA*, 2016;315(14):1469-1479
7. McConnel KW, Coopersmith CM. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. *Presse Med*. 2016; 45: e93–e98
8. Angus DC, Van Der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51
9. Boodoosingh D, Cruz C, Egozcue M, Fernandez M, Salinas V, Valentin S. Update in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *Understanding a Serious Killer*, Dr Ricardo Fernandez (Ed.), ISBN: 978-953-307-950-9, InTech, disponibile da: <http://www.intechopen.com/books/severe-sepsis-and-septic-shock-understanding-a-serious-killer/update-inthe-treatment-of-severe-sepsis-and-septic-shock>
10. Pastene B, Duclos G, Martin C, Leone M. Antimicrobial therapy in patients with septic shock. *Presse Med*. 2016; 45: e111–e117
11. Annane D. Adjunctive treatment in septic shock: What’s next? *Presse Med*. 2016; 45: e105–e109

12. Vincent JL, Orbegozo Cortés D, Acheampong A. Current haemodynamic management of septic shock. *Presse Med.* 2016; 45: e105–e109
13. Pentaglobin. [www.torrinomedica.it/farmaci/schedatecnica/Pentaglobin.asp](http://www.torrinomedica.it/farmaci/schedatecnica/Pentaglobin.asp). Accesso il 03/07/2016
14. TorayMyxin. <http://www.estor.it/it/prodotto/27>. Accesso il 03/07/2016
15. Franchi M, Giacalone M, Traupe I, Rago R, Baldi G, Giunta F, Forfori F. Coupled plasma filtration adsorption improves hemodynamics in septic shock. *Journal of Critical Care* 33 (2016) 100–105
16. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartoga CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012, 25: 609-634
17. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66 Suppl 2: ii33–ii40
18. Riedel S. Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagnostic Microbiol Infectious Dis* 2012 73, 221–227
19. Huang MY, Chen CY, Chien JH, Wu KH, Chang JY, Wu KH, Wu HP. Serum Procalcitonin and Procalcitonin Clearance as a prognostic biomarker in patients with severe sepsis and septic shock. *BioMed Research International*, 2016, Article ID 1758501
20. Romaschin AD, Klein DJ, Marshall JC. Bench-to-bedside review: Clinical experience with the endotoxin activity assay. *Critical Care* 2012, 16:248
21. Charbonney E , Tsang JY, Li Y, Klein D, Duque P, Romaschin A, Marshall JC. Endotoxemia following multiple trauma: risk factors and prognostic implications. *Crit Care Med.* 2016, 44(2):33541
22. Yaroustovsky M, Plyushch M, Popov D, Samsonova N, Abramyan M, Popok Z, Krotenko N. Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J Inflammation* 2013, 10:8
23. Fenton KE, Parker MM. Cardiac function and dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med* 2016, 37, 289-298
24. La Camera G, Cantarella G, Reina R, La Rosa V, Mineri M, Carnemolla V, Grasso DC, Di Marco P. BNP and NGAL as early biomarkers in cardio-renal syndrome in the critical patient. *Acta Med Mediterranea* 2016, 32: 51-56
25. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical Care Medicine* (1985). 13 (10): 818–29

26. Jean-Roger Le Gall, Stanley Lemeshow, Fabienne Saulnier. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA*. 1993; 270: 2957-2963
27. Granja C, Póvoa P, Lobo C, Teixeira-Pinto A, Carneiro A, Costa-Pereira A. The predisposition, infection, response and organ failure (Piro) sepsis classification system: results of hospital mortality using a novel concept and methodological approach.: *PLoS One* 2013,8:e53885
28. Shapiro NI, Wolfe RE, Moore RB, Smith E, Burdick E, Bates DW. Mortality in Emergency Department Sepsis (MEDS) score: a prospectively derived and validated clinical prediction rule. *Crit Care Med* 2003,31:670–675
29. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J, Romaschin AD, Derzko AN: Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 2002, 6(4):342–382
30. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, Cook DJ, Cohen J, Dellinger RP, Opal S, Abraham E, Brett SJ, Smith T, Mehta S, Derzko A, Romaschin A: MEDIC study. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004, 190(3):527–534
31. Klein D: Clinical assessment does not predict endotoxemia in septic shock [abstract 469]. Miami (FL): Programs and abstracts of the Society of Critical Care Medicine 2010. January 9–13
32. Ryding AD, Kumar S, Worthington AM, et al. Prognostic value of brain natriuretic peptide in noncardiac surgery: a meta-analysis. *Anesthesiology* 2009; 111:311–19
33. Shimizu Y, Nishinaga M, Takata J, et al. B-type natriuretic peptide is predictive of hospitalization in community-dwelling elderly without heart diseases. *Geriatr Gerontol Int* 2009; 9:148–54
34. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004; 350:655–63
35. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, et al. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* 2005;330:625
36. Mark DB, Felker GM. B-type natriuretic peptide—a biomarker for all seasons? *N Engl J Med* 2004; 350:718–20
37. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, Cook DJ, Cohen J, Dellinger RP, Opal S, Abraham E, Brett SJ, Smith T, Mehta S, Derzko A, Romaschin A: MEDIC study. Diagnostic and



prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004, 190(3):527–534

38. Klein DJ, Derzko A, Foster D, Seely AJ, Brunet F, Romaschin AD, Marshall JC: Daily variation in endotoxin levels is associated with increased organ failure in critically ill patients. *Shock* 2007, 28(5):524–529
39. Yende S, Iwashyna TJ, Angus DC. Interplay between sepsis and chronic health. *Trends Mol Med* 2014; 20(4): 234–238
40. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303–1310
41. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28:108–121
42. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, et al: Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003; 31:2332–2338
43. Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, et al: Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31:2316–2323
44. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, et al: EPISEPSIS: A reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:580–588
45. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, et al: Adult population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:589–596
46. Vincent JL, Bihari D, Suter PM, et al: The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe—the results of the EPIC study. *JAMA* 1995; 274:639–644
47. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU Setting. *Chest* 2000; 118:146–155
48. Monti G, Colombo S, Mininni M, Terzi V, Ortisi GM, Vesconi S, Casella G: Why measure endotoxin in septic shock patients? *Crit Care* 2008, 12 (Suppl 2):P190
49. Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, Afessa B. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome. *J Int Care* 2013; 9

50. Marshall JC, Vincent JL, Guyatt G, Angus DC, Abraham E, Bernard G, Bombardier C, Calandra T, Jørgensen HS, Sylvester R, Boers M. Outcome measures for clinical research in sepsis: A report of the second Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. *Crit Care Med* 2005, (8):33
51. Lentini P, de Cal M, Clementi A, D'Angelo A, Ronco C. Sepsis and AKI in ICU Patients: The Role of Plasma Biomarkers. *Crit Care Res Pract*. 2012. Epub 2012 Feb 14
52. Nachtigall et al. Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study. *Critical Care* 2011,15: R151
53. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006,34:344-353
54. Combes A, Luyt CE, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J: Gender impact on the outcomes of critically ill patients with nosocomial infections. *Crit Care Med* 2009, 37:2506-2511
55. Sakr Y, Elia C, Mascia L, Barberis B, Cardellino S, Livigni S, Fiore G, Filippini C, Ranieri VM. The influence of gender on the epidemiology of and outcome from severe sepsis. *Critical Care* 201317:R50
56. Wullur C, Wiraatmaja I, Oktaliansah E, Maskoen M. Gender influence on mortality and outcome of severe sepsis patients in intensive care unit. *Intensive Care Med Exp* 20153(Suppl 1):A965
57. Adrie C, Azoulay, E, Francais A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, Nakache N, Jamali S, Goldgran-Toledano D, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF, for the OutcomeRea Study Group. Influence of gender on the outcome of severe sepsis. *Chest* 2007; 132:1786–1793
58. Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, et al. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133:1200–1205
59. Chen CM, Cheng KC, Chan KS, Yu WL. Age may not influence the outcome of patients with severe sepsis in intensive care units. *Int J Gerontol* 2014 (8)22e26
60. Greg M, Mannino D, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Critical Care Med* 2006; 34(1):15-21
61. Le Maguet P, Malledant Y. Prevalence and impact of frailty on mortality in elderly ICU patients: a prospective, multicenter, observational study. *Intensive Care Med* (2014) 40:674–682

62. Hayes M, Timmins A, Yau E, Palazzo M, Watson D, Hinds C. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. *Critical Care Med* 1997 (6)25, 926-936
63. Bagshaw SM, Stelfox HT, McDermid RC, Rolfson DB, Tsuyuki RT, PharmD, Baig N, Artiuch B, Ibrahim Q, Stollery DE, Rokosh E, Majumdar SR. Association between frailty and short- and long-term outcomes among critically ill patients: a multicentre prospective cohort study. *Can Med Ass J* 2014, 2:95-102
64. McDermid R, Robert C McDermid, Stelfox HT, Bagshaw SM. Frailty in the critically ill: a novel concept. *Critical Care* 2011, 15:301

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio i due relatori di questa tesi, i professori Francesco Giunta e Francesco Forfori, per le opportunità di formazione clinica e di ricerca che mi hanno fornito nel corso degli anni con fiducia ed entusiasmo. Ringrazio il dottor Luigi Vetrugno per la generosità con cui mi ha condotto ai dati di questa tesi e per il supporto professionale degli ultimi mesi. Ringrazio vivamente tutti coloro che ho incontrato nel mio lungo percorso sia in Italia che all'estero, sia medici che infermieri che altro personale, che abbiano voluto contribuire ognuno a modo suo, alla mia formazione professionale e umana. Credo che il contribuire alla formazione dei medici sia al giorno d'oggi - per quanto talvolta non facile - un atto di sensibilità, generosità e rispetto nei confronti dell'intera società in quanto il beneficio di avere nelle nostre strutture di cura personale qualificato e competente rappresenta un vantaggio per chiunque abbia necessità, noi compresi. Un ringraziamento particolare va alla famiglia e a tutte le persone che sono state in grado di starmi vicine nei momenti di difficoltà facendone per me ragione di crescita.

*Guarda alle pietre d'inciampo come a gradini verso le stelle*  
(Denis Waitley)