

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**Departament de Genètica i Microbiologia**  
**Facultat de Biociències**



**UTILITAT DE LA DETERMINACIÓ SISTÈMICA DE  
NOUS BIOMARCADORS EN EL MANEIG DE LES  
INFECCIONS RESPIRATÒRIES**



**Alicia Lacoma de la Torre**

**2011**



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**Departament de Genètica i Microbiologia**  
**Facultat de Biociències**

Memòria presentada per  
Alicia Lacoma de la Torre per optar  
al grau de Doctor amb Menció Europea\*  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Vist i plau dels directors de la Tesi



Dra. Cristina Prat i Aymerich



Dr. José Antonio Domínguez Benítez

Badalona, 2011

\* En compliment amb la normativa vigent de Menció de Doctor Europeu, els apartats de la Tesi Summary i Conclusions estan escrits en anglès.



Als meus pares

A l'Oriol



À celui qui consacre sa vie à la science,  
rien ne peut apporter plus de joie que  
d'augmenter le nombre des découvertes,  
mais il est au comble du bonheur quand  
les résultats de ses études ont  
une application pratique immédiate.

Louis Pasteur

La ciencia más útil es aquella  
cuyo fruto es más comunicable.

Leonardo Da Vinci





# ÍNDEX

SUMMARY .....	13
ABREVIATURES.....	19
ARTICLES GENERATS PER AQUESTA TESI .....	21
ARTICLES COMPLEMENTARIS QUE NO FORMEN PART D'AQUESTA TESI .....	23
1. INTRODUCCIÓ .....	27
1.1. Importància i característiques generals de les infeccions respiratòries .....	27
1.2. Freqüència i severitat de les infeccions del tracte respiratori inferior.....	28
1.3. Mecanismes de defensa del tracte respiratori .....	28
1.3.1. Defenses estructurals .....	31
1.3.2. Resposta immunitària .....	31
1.3.2.1. Immunitat innata .....	32
1.3.2.2. Immunitat adaptativa.....	34
1.4. Pneumònia.....	35
1.4.1. Classificació de les pneumònies.....	36
1.4.1.1. Health Care Associated Pneumonia (HCAP) .....	36
1.4.1.2. Pneumònia d'origen nosocomial.....	37
1.4.1.2.1. Pneumònia no associada a ventilació mecànica .....	37
1.4.1.2.2. Pneumònia associada a ventilació mecànica .....	38
1.4.2. Pneumònia adquirida a la comunitat .....	39
1.4.2.1. Epidemiologia.....	39
1.4.2.2. Etiologia i patogènia de les pneumònies .....	40
1.4.2.2.1. Polimorfismes genètics .....	40
1.4.2.2.2. Patogènia .....	40
1.4.2.2.3. Etiologia .....	41
1.4.2.3. Diagnòstic clínic i radiològic.....	42
1.4.2.4. Diagnòstic microbiològic .....	43
1.4.2.4.1. Tipus de mostres .....	44
1.4.2.4.1.1. Hemocultiu .....	45
1.4.2.4.1.2. Líquid pleural.....	45
1.4.2.4.1.3. Esput .....	45
1.4.2.4.1.4. Orina .....	47
1.4.2.4.1.5. Serologia .....	47
1.4.2.4.1.6. Mostres obtingudes mitjançant tècniques invasives .....	48
1.4.2.4.1.7. Tècniques de biologia molecular .....	48
1.4.2.5. Escales pronòstiques.....	49
1.4.2.5.1. Pneumonia Severity Index (PSI).....	50
1.4.2.5.2. CURB i CURB-65.....	51
1.4.2.5.3. SCAP i SMART-COP.....	52

1.4.2.6.	Orientació terapèutica.....	55
1.4.2.7.	Fracàs terapèutic.....	57
1.5.	Malaltia pulmonar obstructiva crònica.....	58
1.5.1.	Freqüència i impacte socio-econòmic.....	58
1.5.2.	Factors de risc.....	59
1.5.3.	Història natural.....	60
1.5.4.	Classificació de la MPOC.....	60
1.5.5.	Exacerbació de la MPOC.....	61
1.5.5.1.	Etiopatogènia.....	61
1.5.5.1.1.	Paper dels bacteris.....	63
1.5.5.1.2.	Paper dels virus.....	64
1.5.5.1.3.	Paper de la pol·lució.....	65
1.5.5.1.4.	Aspectes sistèmics.....	65
1.5.5.2.	Diagnòstic clínic de les exacerbacions.....	66
1.5.5.3.	Diagnòstic microbiològic de les exacerbacions.....	67
1.5.5.4.	Bases del tractament de les exacerbacions.....	67
1.5.6.	Pronòstic.....	68
1.6.	Biomarcadors.....	69
1.6.1.	Definició.....	69
1.6.2.	Descripció dels biomarcadors.....	69
1.6.2.1.	Citocines.....	70
1.6.2.2.	Proteïna C- reactiva (PCR).....	70
1.6.2.3.	Neopterina.....	71
1.6.2.4.	Lypopolysaccharide binding protein (LBP).....	71
1.6.2.5.	Amiloide A del sèrum (SAA).....	72
1.6.2.6.	Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM).....	72
1.6.2.7.	Procalcitonina (PCT).....	72
1.6.2.8.	Pèptids natriurètics.....	74
1.6.2.9.	Adrenomedulina (ADM).....	76
1.6.2.10.	Arginina vasopressina (AVP).....	77
1.6.2.11.	Endotelina-1 (ET-1).....	77
1.6.3.	Tècniques de determinació dels marcadors d'inflamació.....	78
2.	JUSTIFICACIÓ.....	85
3.	OBJECTIUS.....	89
4.	RESULTATS.....	93
4.1.	Article 1.....	93
4.2.	Article 2.....	103
4.3.	Article 3.....	119
4.4.	Article 4.....	135
4.5.	Article 5.....	151

4.6. Article 6 .....	159
4.7. Article 7 .....	171
5. DISCUSSIÓ.....	183
5.1. Factors intrínsecs i extrínsecs que potencialment influeixen els nivells de biomarcadors .....	183
5.2. Utilitat dels biomarcadors en el maneig de la pneumònia i les exacerbacions de la MPOC.....	186
5.2.1. Diferències en funció de l'agent etiològic .....	187
5.2.1.1. Influència en la pneumònia .....	187
5.2.1.2. Influència en l'exacerbació de la MPOC .....	189
5.2.2. Diferències en funció de la severitat.....	191
5.2.2.1. Influència en la pneumònia .....	191
5.2.2.2. Influència en la exacerbació de la MPOC.....	197
5.3. Biomarcadors en el pacient MPOC amb pneumònia.....	199
5.4. Impacte dels avenços metodològics en les tècniques de determinació de biomarcadors .....	201
6. CONCLUSIONS .....	207
7. BIBLIOGRAFIA .....	211
ANNEX I .....	229
ANNEX II .....	237
ANNEX III .....	251
AGRAÏMENTS.....	259



## SUMMARY

Lung infections cause a greater burden than any other infectious disease, because of its prevalence and high morbidity and mortality rates. Specifically upper respiratory tract infections are frequently of viral etiology and mild, while lower respiratory tract infections (LRTI) are more related to bacterial etiology and tend to be more severe. Among clinical syndromes frequently associated to hospitalization and morbimortality in adult patients, community acquired pneumonia (CAP) and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) play an important role.

In CAP management, an early diagnosis and severity assessment are of major importance, because both together guide therapeutical decisions about appropriate treatment, as well as need of hospital admission. Several score risk have been described and validated, but most of them do not estimate the degree of disease severity, but the risk of death that is greatly influenced by age and the presence of coexisting illnesses. These scores are useful tools for assessing mortality risk and need of hospitalization at admission but are not able to predict prognosis once treatment has been initiated, either can assess the need of interventions or therapy changes. On the other hand, in some cases it is difficult to distinguish CAP from other clinical entities such as exacerbation of COPD or bronchial infection because clinical signs are unspecific and X-ray may be already pathological, especially in the elderly and in patients with chronic respiratory diseases.

Regarding COPD, it is the respiratory disease of higher prevalence and socioeconomic impact, representing in our setting the fourth cause of death. COPD has a chronic and progressive course, alternating clinical stability periods and acute exacerbation episodes. Exacerbation diagnosis is mainly clinical, and is based on the presence of specific symptoms, such as dyspnea, sputum volume and sputum purulence. Although microbiological sputum studies with Gram staining and bacteriological culture are especially indicated for patients with severe COPD or patients that have suffered earlier treatment failures, the isolation of potential pathogens in sputum samples during exacerbations, presents controversy, being the possible contamination with oropharyngeal flora, one of the aspects more discussed.

Exacerbations are important episodes for the natural history of COPD, affecting its progression and prognosis. Several clinical characteristics have been widely accepted

as prognostic factors of exacerbation morbidity and mortality. But, in spite of its epidemiological interest, the predictive value of these clinical parameters differs between studies and most of them do not allow an individual risk assessment.

In the last years, several biomarkers have emerged as tools for the management of infectious diseases. A biomarker is defined as a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacologic responses to therapeutic intervention. Systemic biomarkers such as C-reactive protein (CRP), neopterin and more recently some hormonal and peptide precursors with metabolic and cardiovascular functions have been evaluated for the diagnosis and prognosis assessment of certain infectious diseases, being complementary to clinical and microbiological parameters. Among this last group of biomarkers, it is worth pointing out procalcitonin (PCT), mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) and mid regional pro-adrenomedullin (MR-proADM), which are precursors of molecules with different biological functions. PCT is the precursor of calcitonin, and its levels have been related to bacterial systemic infections. MR-proANP is a fragment of atrial natriuretic peptide precursor that is a marker of cardiovascular dysfunction. And finally MR-proADM is the precursor of adrenomedullin and has vasodilating, antibacterial, immune modulating and metabolic functions.

In order to detect and quantify biomarkers of interest in biological fluids, different immunoassays based on the reaction antigen-antibody have been developed. These assays have to be easy to perform, robust and limits of detection, as well as sensitivity and specificity values have to be in accordance with the clinical syndrome considered. In the specific case of PCT a new immunochromatographic assay more sensitive, that has to enable an easy and faster detection of PCT in whole blood is being developed. This fact has special importance, because during respiratory infections, PCT levels although being elevated, they remain in a narrower range of concentrations in comparison to levels observed during bacterial systemic infections.

To have at one's disposal biomarkers easy to detect in serum and plasma that would guide the identification of the possible etiology, and somehow reflect the host response to an infection, would allow a more judicious antibiotic use and a closer treatment monitoring. The successful use of new immunomodulatory therapies aimed to modulate the dysregulated inflammatory response also depends on a thorough understanding of the mediators. The response to anti-inflammatory therapies may differ

depending on the etiology, but also on the host factors. Since no gold standard exists for determining both the etiology and the immune status, demonstrable abnormalities in immunological or biochemical pathways may permit to detect organ dysfunction at earlier stages, before it becomes irreversible. In addition, given that biomarkers are mediators of physiological processes, its levels could also be used as prognostic factors.

The main objectives of this Thesis are to assess the usefulness of systemic biomarkers in the management of CAP and COPD exacerbation. Specifically to determine whether biomarkers correlate with the etiology and severity of these conditions. And secondly to study the importance of immunoassays characteristics for an optimal biomarkers use. It is important to identify those patients with symptoms of LRTI that are more likely to have a systemic bacterial infection, because treatment options and need of hospitalization might be different.

In our experience we found that PCT and MR-proADM levels were significantly higher in patients with a final diagnosis of pneumonia in comparison to patients undergoing a COPD exacerbation or a bronchial infection. In fact, these two biomarkers also showed significantly higher levels in cases of definite bacterial diagnosis in comparison to probable bacterial or unknown origin cases. These results show enough evidence to state that during pneumonia PCT and MR-proADM have a close relationship with bacterial etiology. Regarding microorganism implicated, PCT levels are also significantly increased in pneumococcal pneumonia in comparison to the other etiologies. When considering COPD patients exacerbated, the identification of etiology by means of systemic biomarkers is more difficult, although Anthonisen criteria and the presence of specific symptoms can suggest bacterial origin. However, the main inconvenient is the absence of a microbiological gold standard and the possible colonization of patient's tracheobronchial tree that limits sputum culture value. Interestingly, we found that neopterin levels were significantly lower in exacerbations with isolation of pathogenic bacteria in comparison to exacerbations with normal flora or negative culture result, suggesting that maybe the latter ones were of viral origin, in comparison to PCT and CRP that did not show significant differences. The identification of pneumonia or exacerbation etiology by means of MR-proANP is not clinically reliable. In fact, MR-proANP is involved in physiopatological process, so elevated levels might reflect dysfunction rather than etiology.

In patients with pneumonia, it is essential to assess the degree of severity, in order to guide treatment and site of care decisions. For that, several scoring systems are available. The most commonly used risk scores are the Pneumonia Severity Index (PSI) and CURB-65. Both scores are accurate and validated predictors of mortality risk. In our experience, levels of PCT, MR-proANP and MR-proADM correlated significantly with PSI, with higher levels in high risk classes in comparison to patients classified as low risk. However, as PCT levels are increased in pneumococcal pneumonia, specially when bacteremic, if used as a prognostic marker it can have some limitations since it is influenced by etiology. In case of MR-proANP and MR-proADM, its levels also increased with CURB-65 score. An important finding regarding MR-proANP is that, although its levels are increased in the presence of cardiac coexisting illnesses, this fact did not interfere with the association of MR-proANP with PSI. MR-proANP, MR-proADM and PCT levels are significantly higher in patients developing pneumonia related complications, including admission to ICU and dying. In the last years, new rules have also been developed such as severe CAP (SCAP) score and SMART-COP. In our experience, we found that levels of PCT, neopterin, MR-proANP and MR-proADM were higher in patients with SCAP criteria, and in patients classified as high risk in comparison to low risk. Regarding SMART-COP, only neopterin levels showed higher levels in patients classified as high risk of intensive respiratory or vasopressor support (IRVS). SMRT-CO is the modified version of SMART-COP, and for that index PCT, CRP and MR-proADM showed increased levels in patients with high risk of needing IRVS in comparison to low risk.

These severity scores are not designed to be re-assessed during clinical evolution, so they cannot identify patients with higher risk of treatment failure neither can assess the need of further interventions. It is in this context that serial measurement of systemic biomarkers appear like an alternative. Our results have shown that serial measurements of PCT and MR-proANP might be useful for the management of patients with pneumonia. In fact, for MR-proANP values remained significantly higher along time in patients developing complications, and in patients classified as high PSI and CURB-65. For patients with no complications, a significant decrease of PCT from day 1 to day 3 was observed.

COPD has been described as a disease with important systemic manifestations, such as an increase of systemic biomarkers in peripheral blood. Exacerbation episodes are events that influence the disease prognosis. Severity assessment is based on clinical parameters, that can be complemented with the use of systemic biomarkers. The main



findings of our studies is that PCT, CRP and MR-proANP levels decrease one month after an exacerbation, and that all biomarkers showed higher levels in exacerbated patients dying in the first month of the exacerbation, decreasing as long as the moment of death occurred later on.

In order to detect biomarkers in biological samples, such as plasma and serum, quick, sensitive, and easy to use immunoassays are necessary. Specifically in the field of respiratory infections, PCT levels are in a lower range in comparison to levels reached during sepsis. Recently a new quantitative immunochromatographic point of care test apt for both family physicians and hospital specialists is being developed for the detection of PCT in whole blood, with promising results.

In summary, biomarkers can be a useful and a complementary tool together with clinical and microbiological parameters for the management of patients with pneumonia and COPD exacerbations. For their optimal use, it is important to take into account biomarkers limitations, such as influence of comorbidities or previous treatment. In the future, to have at one's disposal a panel of biomarkers, ones reflecting etiology and others being more related to severity might be useful for the management of LRTI, as well as for the assessment of immunomodulating therapies. Punctual and serial measurements complement clinical assessment, and they allow the monitoring of clinical evolution. From a technical point of view, automated assays are sensitive enough. However, a quicker test easier to implement would be also an interesting alternative.



**ABREVIATURES**

ADM	Adrenomedulina
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
AVP	<i>Arginine vasopressin</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
BODE	<i>Body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, exercise capacity</i>
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CGRP	<i>Calcitonin-gene related peptide</i>
CPA	Cèl·lula presentadora d'antigen
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CURB	<i>Confusion, urea, respiratory rate, blood pressure</i>
ET	Endotelina
FEV <sub>1</sub>	Volum espirat màxim en el primer segon de la espiració forçada
FVC	Capacitat vital forçada
GOLD	<i>Global initiative for chronic obstructive pulmonary disease</i>
HCAP	<i>Health care associated pneumonia</i>
ICT	Immunocromatogràfic
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleucina
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolisacàrid
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
PAC	Pneumònia adquirida a la comunitat
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PCT	Procalcitonina
PCR	Proteïna C-reactiva
PMN	Leucòcit polimorfonuclear o granulòcit
PSI	<i>Pneumonia severity index</i>
RBA	Rentat broncoalveolar
SAA	<i>Serum amyloid A</i>
SAP	<i>Serum amyloid protein</i>
SCAP	<i>Severe community acquired pneumonia</i>
sTREM-1	<i>Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UCI	Unitat de cures intensives



## ARTICLES GENERATS PER AQUESTA TESI

### Article 1

Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia.  
Prat C, **Lacoma A**, Dominguez J, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Andreo F, Tudela P, Ruiz-Manzano J, Ausina V.  
Journal of Infection 2007; 55: 400-407.

### Article 2

Usefulness of consecutive biomarkers measurement in the management of community acquired pneumonia.  
**Lacoma A**, Rodríguez R, Prat C, Ruiz-Manzano J, Andreo F, Ramírez A, Bas A, Pérez M, Ausina V, Dominguez J.  
Respiratory Medicine 2011. *Submitted*.

### Article 3

Inflammatory and cardiovascular biomarkers to assess the etiology and the severity of lower respiratory tract infections. Correlation with new pneumonia severity scores.  
**Lacoma A**, Bas A, Tudela P, Giménez M, Mòdol JM, Pérez M, Ausina V, Dominguez J, Prat C.  
Annals of Emergency Medicine 2011. *Submitted*.

### Article 4

Value of procalcitonin, C-reactive protein and neopterin in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.  
**Lacoma A**, Prat C, Andreo F, Lores L, Latorre I, Pérez M, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Domínguez J.  
International Journal of COPD 2011; 6: 157-169.

### Article 5

Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.  
**Lacoma A**, Prat C, Andreo F, Lores L, Latorre, Pérez M, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Domínguez J.  
Clinica Chimica Acta 2011; 412: 470-475.

**Article 6**

Biomarkers in the management of COPD.

**Lacoma A**, Prat C, Andreo F, Domínguez J.

European Respiratory Review 2009; 18: 96-104.

**Article 7**

Development, standardization and clinical evaluation of a new immunochromatographic assay for the detection and quantification of procalcitonin in whole blood.

**Lacoma A**, Schröder M, Thomas B.

Scientific technical report. 2008.

## ARTICLES COMPLEMENTARIS QUE NO FORMEN PART D'AQUESTA TESI

### **Anex I**

Predicción de bacteriemia en los pacientes con sospecha de infección en urgencias.

Tudela P, **Lacoma A**, Prat C, Mòdol JM, Giménez M, Barallat J, Tor J.

Medicina Clínica 2010; 135 (15): 685-690.

### **Annex II**

Biomarkers for the prediction of bacterial infection, bacteremia and severity in the emergency department.

Tudela P, Prat C, **Lacoma A**, Mòdol JM, Domínguez J, Giménez M, Barallat J, Tor J.

American Journal of Emergency Medicine 2011. *Submitted*.

### **Annex III**

Relevancia de los marcadores de inflamación en el diagnóstico, pronóstico y nuevas formas de tratamiento de las enfermedades infecciosas.

**Lacoma A**, Prat C, Ausina V.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2010; 28: 263-265.







## **INTRODUCCIÓ**



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. Importància i característiques generals de les infeccions respiratòries

Tot i l'increment progressiu, durant la segona meitat del segle passat, de l'ús massiu d'antibiòtics i l'aparició d'antimicrobians cada cop més potents i eficaços, les malalties infeccioses encara representen un dels majors reptes de la Salut Pública a nivell mundial. Segons la Organització Mundial de la Salut, les malalties infeccioses del tracte respiratori són responsables d'aproximadament un 7% del total de morts anuals (4,2 milions) [1].

L'aparell respiratori és una de les principals vies per la qual els agents patògens penetren a l'organisme [2]. De fet, s'ha calculat que diàriament arriben als pulmons més de 10.000 microorganismes viables. A més, la mucosa nasofaríngia està colonitzada per una gran quantitat i varietat de microorganismes que poden ser aspirats cap a les vies aèries baixes; encara que la disseminació des d'altres territoris orgànics o la inhalació de microorganismes exògens també pot donar lloc a una infecció pulmonar.

Les infeccions de vies respiratòries són, junt amb les gastroenteritis, les infeccions més freqüents a l'home. Es distingeixen les infeccions de vies respiratòries altes, que engloben fonamentalment rinitis, sinusitis, otitis i traqueïtis, i les infeccions de vies respiratòries baixes, que inclouen les bronquiolitis en els nens i les traqueobronquitis agudes en els adults, les exacerbacions de la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), així com les infeccions del parènquima pulmonar, que inclouen les pneumònies i les seves complicacions a empiema i abscess pulmonar.

Les infeccions del tracte respiratori superior són més freqüents, i en absència de malalties de base solen cursar de forma benigna. Tot i així, són responsables d'una enorme quantitat de dies d'absentisme escolar i laboral, que es tradueix en pèrdues econòmiques per a la comunitat. A més a més, aquestes infeccions són causa d'una utilització inapropiada i excessiva d'antibiòtics. El diagnòstic etiològic de les infeccions del tracte respiratori superior es realitza en escasses ocasions i, en general, el seu tractament s'instaura de forma empírica. L'elecció del tractament es basa en el tractament simptomàtic i en aquells casos en que és procedent, en la cobertura dels agents etiològics més probables i en el seu patró de sensibilitat als antibiòtics.

En aquesta Tesi ens centrarem en les infeccions respiratòries de vies baixes en adults, concretament la pneumònia adquirida a la comunitat (PAC), i les exacerbacions de la MPOC.

## **1.2. Freqüència i severitat de les infeccions del tracte respiratori inferior**

Les infeccions del tracte respiratori inferior són de les més freqüents en el conjunt de les infeccions, tant entre les adquirides a la comunitat com a l'àmbit nosocomial. Diferents estudis i aproximacions a nivell europeu indiquen que la incidència anual de la PAC oscila entre els 5-11 casos/ 1000 habitants/ any [3,4]. El percentatge de pacients amb PAC que ingressen és molt variable i oscila entre 1.1 i 4 per cada 1000 habitants [5]. Les pneumònies, en concret representen aproximadament un 15% de les infeccions nosocomials i són la primera causa d'infecció en les unitats de cures intensives (UCI) amb una mortalitat associada a aquests casos de fins al 50% [5,6]. Per aquells pacients ambulatoris i hospitalitzats, la mortalitat es troba entre 1-5% i un 5.7-15% respectivament [5]. La PAC representa una de les deu causes principals de mort a tot el món i és la primera causa de mortalitat entre les malalties infeccioses, particularment en individus de més de 65 anys [1].

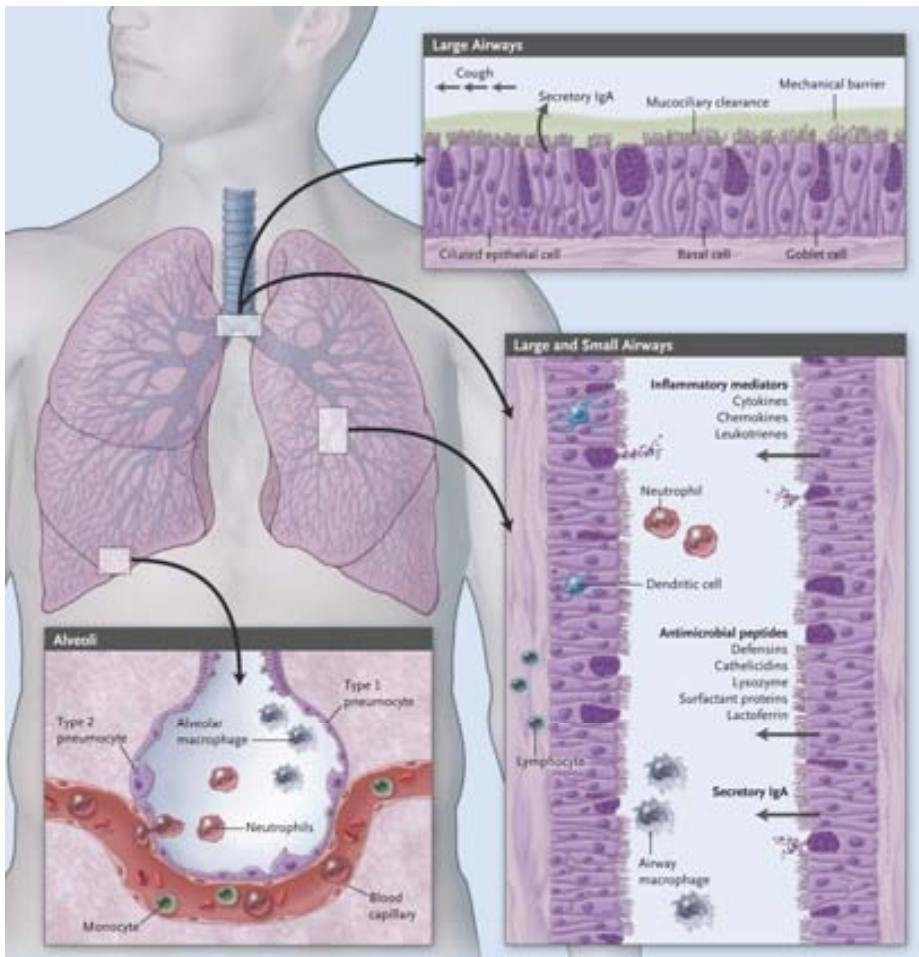
Tot i els avenços en el desenvolupament de vacunes i l'aparició de nous antibiòtics, la incidència de la pneumònia continua augmentant com a conseqüència del progressiu envelliment de la població, l'ús massiu de tècniques instrumentals invasives (principalment intubació traqueal) i de l'increment del número de malalts amb dèficits immunològics. A Europa, diversos estudis poblacionals han documentat una freqüència entre 1.2 i 11.6 casos per 1000 habitants/ any [3,4]. Aquestes circumstàncies han determinat canvis substancials en l'espectre de les pneumònies tant en el que fa referència a l'hoste, com als patògens implicats i a les opcions terapèutiques.

## **1.3. Mecanismes de defensa del tracte respiratori**

En els pulmons sans, el torrent sanguini dels capil·lars pulmonars està separat de l'espai alveolar per una superfície de menys d'1 nanòmetre. Constitueix la interfase més prima entre la sang i el medi extern, i és necessària per al correcte intercanvi gasós. Donades les característiques biofísiques d'aquests capil·lars, en ells s'hi

produeix un atrapament de macròfags i neutròfils que fan que la seva concentració en aquesta zona sigui 50 vegades major que en la resta de torrent circulatori [7].

L'aparell respiratori disposa d'un complex i eficient sistema defensiu que permet mantenir les vies respiratòries asèptiques. La primera línia de defensa dels pulmons és el sistema immunitari innat, que inclou defenses estructurals, molècules antimicrobianes, macròfags alveolars, neutròfils, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules *natural killer* (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema general dels mecanismes de defensa de la immunitat innata al tracte respiratori. De: Sethi et al. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2008; 359: 2355-2365.

Si la resposta innata no és eficaç a l'hora d'eliminar els patògens, la resposta adaptativa esdevé l'encarregada de continuar amb el control de la infecció. Aquesta resposta adaptativa és més lenta donat que necessita del processament previ d'antígens i la seva posterior presentació a les cèl·lules immunitàries específiques. També es caracteritza per la diferenciació de cèl·lules B en cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos.

Els pulmons disposen d'uns sofisticats mecanismes de defensa que es poden classificar en: estructurals, mecànics, secretors, humoral i cel·lulars [8,9]. L'alteració o disfunció de qualsevol d'aquests mecanismes o l'arribada al teixit pulmonar d'un microorganisme particularment virulent poden ser factors determinants per al posterior desenvolupament d'una infecció pulmonar.

Els esdeveniments que tenen lloc per a l'eliminació dels microorganismes es resumeixen a continuació. Un cop els microorganismes han estat inhalats o aspirats a través de les vies superiors, aquests són conduïts pel flux aeri turbulent i poden impactar sobre l'epiteli respiratori. En condicions normals, el sistema mucociliar aconsegueix eliminar la major part dels microorganismes, i altres partícules que puguin penetrar pel tracte respiratori. No obstant això, quan el sistema és defectiu o inefectiu, els microorganismes poden adherir-se i arribar a la submucosa o, a través del teixit limfoide, iniciar una resposta immune específica. Si tot i el potent mecanisme de defensa mucociliar, els microorganismes aconsegueixen arribar a l'espai alveolar, els mecanismes de defensa de la immunitat innata del territori pulmonar (opsonines, surfactant, immunoglobulines [Ig] G, complement i macròfags) comencen a actuar. Els macròfags formen la primera línia defensiva; l'activitat microbicida dels oxidants, enzims i de l'òxid nítric pot veure's incrementada per les citocines alliberades pels limfòcits T. Aquests limfòcits poden produir i secretar factors quimiotàctics (citocines i eicosanoids) que conjuntament amb els productes derivats dels microorganismes atrauen als leucòcits polimorfonuclears (PMN). En comparació amb els macròfags, aquests últims, tenen una major capacitat de resposta microbicida i degradativa. La persistència de la infecció condueix a una resposta immune exagerada que afavoreix la destrucció del teixit pulmonar.

Paral·lelament al ràpid desenvolupament d'aquesta resposta immune innata, també es genera una resposta immune específica deguda al contacte entre els patògens i les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) situades al llarg de tot el tracte respiratori i amb el teixit limfoide del territori bronquial. En el desenvolupament d'aquesta resposta

immune, després del processament dels antígens per part de les CPAs i de la transferència de la informació a les cèl·lules T, es generen anticossos específics, cèl·lules T citotòxiques, així com cèl·lules T memòria.

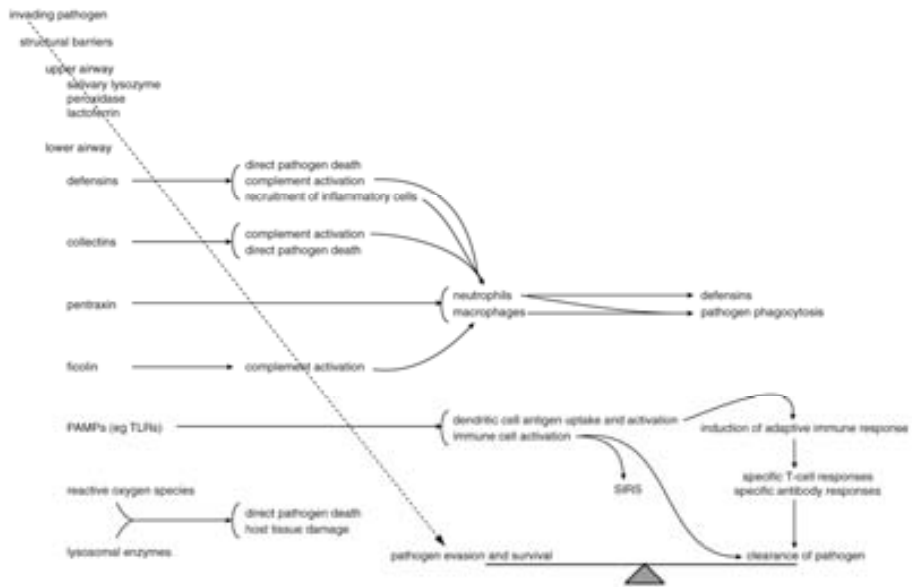
### **1.3.1. Defenses estructurals**

Les defenses estructurals inclouen les barreres anatòmiques, que prevenen de la inhalació de patògens o de la invasió dels teixits per part dels patògens [10]. Aquesta primera defensa ve donada pel disseny i estructuració de les vies aèries superiors. La direcció del flux aeri a través del nas, fa que les partícules més grans ( $>5 \mu\text{m}$ ) impactin a la mucosa nasal, evitant l'accés a les vies inferiors. Un altre component del sistema de defensa és l'aclariment mucociliar. Es tracta d'una capa de mucus que recobreix els cilis de l'epiteli respiratori i s'encarrega d'atrapar els agents infecciosos, així com partícules estranyes. Aquest sistema es basa en atrapar i impulsar els agents nocius inhalats des del nas (batre dels cilis cap a baix) o bé dels pulmons (batre dels cilis cap a dalt) cap a la boca. La tos i els esternuts també col·laboren en l'eliminació del material dipositat. La disposició anatòmica de les vies respiratòries superiors afavoreix el dipòsit de microorganismes sobre la barrera mucociliar, des d'on són expulsats mitjançant els esternuts o la deglució.

El tracte respiratori consta, a part del sistema mucociliar, de barreres mecàniques com la glotis que en tancar-se impedeix l'entrada de material aspirat, i del mecanisme de la tos. A la orofaringe, existeix a més flora aeròbia i anaeròbia que inhibeix de forma competitiva la presència d'altres patògens, components humorals (IgG e IgA) i les secrecions salivars, que contribueixen activament en la defensa de la infecció.

### **1.3.2. Resposta immunitària**

L'arribada d'un microorganisme a l'espai alveolar activa una resposta inflamatòria complexa, en la qual intervenen diversos mecanismes de defensa que desencadenen la síntesi i la secreció de diferents mitjancers inflamatoris i proteïnes de fase aguda com a mecanisme de defensa enfront la infecció (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismes de defensa de l'aparell respiratori. De: Tsai et al. Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:260–265.

### 1.3.2.1. Immunitat innata

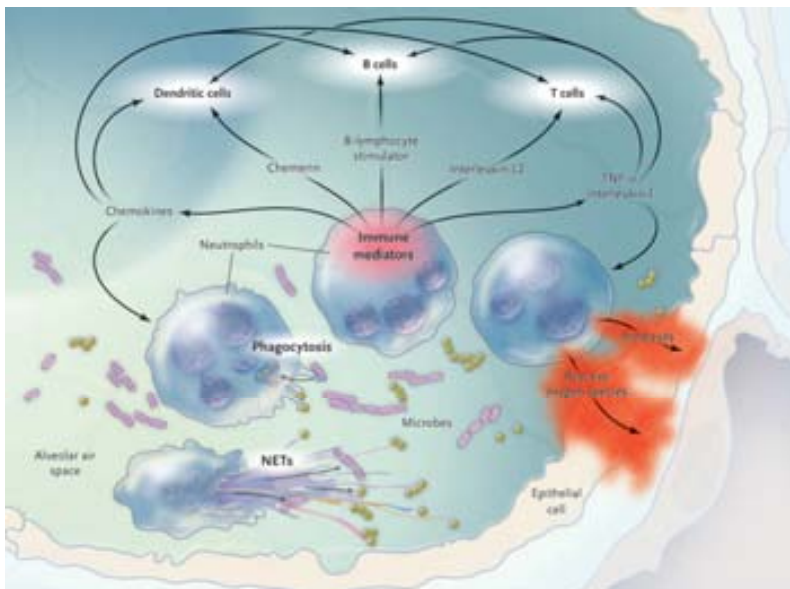
La resposta inflamatòria que es produeix en les primeres etapes de la infecció pulmonar causa petites alteracions a nivell del teixit pulmonar, degut a l'activació parcial dels PMNs. Els fagòcits es poden mantenir a nivells homeostàtics o bé desencadenar una resposta desproporcionada. Si l'inòcul microbià és petit o de baixa virulència, el macròfag alveolar pot eliminar els microorganismes sense reclutar PMNs a l'espai aeri. Però si l'inòcul és major o d'especial virulència es requereix la participació dels PMNs. L'activació completa d'aquestes cèl·lules pot ocasionar una destrucció més àmplia del teixit pulmonar.

La resposta immunitària innata es caracteritza per actuar enfront qualsevol agent infecció, sense dependre d'un contacte previ amb aquest, per la seva ràpida inducció o bé presència constant, i per l'absència de memòria immunològica. No es tracta d'una resposta inespecífica, donat que és capaç de reconèixer un seguit de components microbians mitjançant l'expressió de receptors codificats al genoma. Aquests components són els anomenats patrons moleculars associats al patògen [*PAMPs (pathogen associated molecular patterns)*]. Són estructures conservades en l'evolució i



presentes únicament en els microorganismes i no en el propi organisme. En destaquen les molècules estructurals com el lipopolisacàrid (LPS), el peptidoglicà, la flagelina, els lipopèptids, els manans, els glicans i el RNA víric. El sistema immunitari innat utilitza gran varietat de receptors de patrons moleculars, que poden expressar-se a la superfície cel·lular, en compartiments intracel·lulars o secretar-se al torrent circulatori o altres fluids orgànics, de manera que només es necessita un nombre limitat de receptors per reconèixer una gran varietat de microorganismes.

En un primer moment, aquesta arribada d'un microorganisme o cos estrany a la via respiratòria inferior, fa que els macròfags, neutròfils i cèl·lules fagocitàries migrin fora dels vasos sanguinis i se situïn als espais alveolars. Un cop realitzada la fagocitosis, gràcies al reconeixement dels diferents receptors expressats a la superfície dels microorganismes, aquestes cèl·lules defensives eliminen els microorganismes a través de diversos mecanismes i proteïnes: degradació per part d'enzims degradatius, com seria l'elastasa, la presència de pèptids antimicrobians, com serien la lactoferrina i el lisozim, i molècules reactives d'oxigen. A més, també s'inicia un complex procés que implica la participació de diversos mitjancers immunitaris (Figura 3).



**Figura 3.** Acció dels macròfags alevolars i dels neutròfils durant les infeccions pulmonars.  
De: Mizgerd, J.P. Acute lower respiratory tract infection. N Engl J Med 2008; 358: 716-727.

Una de les funcions principals d'aquests mitjancers és reclutar noves cèl·lules fagocítiques, principalment neutròfils, macròfags, cèl·lules B i T al lloc d'infecció per tal de confinar i limitar la infecció. Aquests mitjancers es coneixen amb el nom de factors quimiotàctics, i es poden dividir en dos grans grups: les quimiocines i els anomenats factors quimiotàctics "clàssics" que inclouen els pèptids formilats derivats de bacteris, els fragments de complement C5a i C3a i molècules lipídiques com leucotriè B<sub>4</sub> o *Platelet activating factor*.

L'altre gran grup de mitjancers de la resposta inflamatòria correspon al de les citocines. Es tracta de glucoproteïnes de baix pes molecular que actuen com a transmissores d'informació entre les cèl·lules. La majoria són secretades per més d'un tipus cel·lular, i la majoria de cèl·lules productores secreten més d'un tipus de citocina. El terme citocina fa referència al seu origen cel·lular sense especificar el tipus de cèl·lula productora. El terme interleucina s'aplicaria a aquelles molècules que serveixen com a senyals de comunicació entre diversos tipus de leucòcits [11]. Les citocines secretades i alliberades a nivell pulmonar serien la interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, el factor de necrosi tumoral (TNF)- $\alpha$  i els factors estimulants de colònies de granulòcits (G-CSF) o de macròfags (M-CSF).

Aquesta resposta inflamatòria és un procés complex, que implica l'expressió coordinada d'un seguit de citocines amb activitat pro i anti-inflamatòria. L'equilibri que s'estableix entre aquestes citocines té com a objectiu confinar la resposta a l'òrgan on s'ha originat, en aquest cas el pulmó, on les citocines i quimiocines tenen un efecte autocrí o paracrí, però si passen a la circulació exerceixen un efecte endocrí, donant lloc a una resposta inflamatòria sistèmica.

### **1.3.2.2. Immunitat adaptativa**

La immunitat adquirida o adaptativa es genera en el cas que les defenses anatòmiques i la resposta innata sigui sobrepassada i fracassin en l'eliminació de l'agent infecciosos. Implica la participació de mecanismes cel·lulars i humorals que actuen específicament contra els agents infecciosos generant una memòria immunitària. Consisteix en l'expansió clonal de poblacions de cèl·lules B i T, capaces d'interaccionar específicament amb microorganismes concrets.

El desenvolupament d'una resposta immune específica comporta el processament d'antígens i la seva posterior presentació a les cèl·lules T específiques per aquests antígens, per part de les CPA, essent les cèl·lules dendrítiques les més eficients. El primer pas és l'activació dels limfòcits T als teixits limfàtics; les CPA processen els antígens i els presenten units a la molècula del complex major d'histocompatibilitat. La interacció entre la CPA i el limfòcit T es fa a través del reconeixement per part dels receptors del limfòcit T, de l'antigen i la molècula HLA classe II. Aleshores, els limfòcits T *naïve* proliferen i esdevenen limfòcits T activats que segregaran diverses citocines, com l'interferó. Aquestes citocines són importants perquè promouran la diferenciació de cèl·lules B en cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos. La immunitat adquirida està doncs constituïda bàsicament pels anticossos produïts per les cèl·lules plasmàtiques derivades dels limfòcits B i pels limfòcits T específics.

#### **1.4. Pneumònia**

La infecció del parènquima pulmonar o pneumònia és una inflamació aguda del teixit distal dels bronquis terminals, produïda per un agent infecciós i que condiciona exsudació i condensació de l'espai aeri, pel que sol tenir una traducció radiològica. S'exclouen doncs, d'aquesta definició les infeccions cròniques (tuberculosi i infeccions fúngiques en l'hostatger no immunodeprimit) i les inflamacions d'etiologia no infecciosa [5,12,13]. Les complicacions més freqüents de les pneumònies són l'empiema, l'abscess pulmonar i la bacterièmia, sent important descartar-les donades les seves implicacions terapèutiques particulars. D'altra banda, és inhabitual el desenvolupament de focus sèptics a distància. La insuficiència respiratòria i el xoc són les principals causes de decés dels pacients amb pneumònia.

La pneumònia està considerada, en les seves diverses formes de presentació, com una de les infeccions més freqüents. En determinats pacients té una gravetat considerable i s'associa a una important mortalitat. Ambdues raons justifiquen l'interès d'aquesta síndrome infecciosa en tots els àmbits de la pràctica clínica. La incidència, forma de presentació clínica, etiologia, pronòstic, actituds diagnòstiques i tractament de les pneumònies poden variar en relació amb el pacient considerat. Així, diferents microorganismes (virus, bacteris, fongs i paràsits) poden produir pneumònies amb quadres clínics molt similars i, al mateix temps, un determinat microorganisme pot donar lloc a quadres clínics molt diferents.

Segons les condicions de l'hostatger, la pneumònia es pot deure virtualment a qualsevol tipus d'agent etiològic. Per aquesta raó, l'antic interès de classificar aquests processos en relació a la seva etiologia s'ha modificat considerablement en els darrers anys i es tendeix actualment, com veurem més endavant, a fer una classificació més funcional basada en les característiques de la població sobre la qual incideixen.

#### **1.4.1. Classificació de les pneumònies**

Tradicionalment les pneumònies s'han classificat en funció del seu origen, ja sigui comunitari o hospitalari, també anomenat nosocomial, sent aquesta classificació útil per a la posterior presa de decisions diagnòstiques i terapèutiques. Malgrat això, cada cop són més freqüents les situacions en què els pacients de forma ambulatoria i extrahospitalària tenen un contacte estret amb els centres socio-sanitaris [14].

##### **1.4.1.1. Health Care Associated Pneumonia (HCAP)**

Dins d'aquest grup de pacients destacarien els ancians que viuen de forma temporal o permanent en residències, pacients en hemodiàlisi, pacients que reben de forma extrahospitalària quimioteràpia i pacients amb una hospitalització prèvia de més de 2 dies en els últims 90 dies abans de la pneumònia [15].

La presentació clínica de HCAP és freqüentment inusual ja que no segueix cap patró clàssic [16]. Això es deu a la presència de diversos factors condicionants, com serien l'edat avançada, la presència de desordres neurològics i la coexistència de múltiples comorbiditats cròniques. En concret, els signes clàssics de pneumònia com serien la tos, l'expectoració, la disnea i el dolor pleurític tenen una presentació més lleu, i són menys freqüents que en pacients joves. En canvi, les manifestacions extra-pulmonars són més freqüents i predominen sobre els símptomes respiratoris. En concret, en aquells pacients amb diverses malalties cròniques coexistents (per exemple: MPOC, insuficiència cardíaca, insuficiència renal), la presentació clínica de la pneumònia pot confondre's amb una exacerbació de la mateixa comorbiditat [17,18]. A més, la febre és més inusual en pacients ancians donat que la capacitat termoreguladora per respondre a pirògens externs es troba alterada. Una proporció de pacients amb HCAP també presenten desordres neurològics i cerebrovasculars que s'acompanyen d'alteracions

en la deglució i els reflexes de la tos, fets que expliquen l'elevada incidència de broncoaspiració.

Els pacients amb HCAP procedents de residències presenten una predisposició a presentar colonitzacions del tracte respiratori superior per enterobacteris i *Staphylococcus aureus*, incloent les soques resistents a meticil·lina, i aquest fet pot dificultar la identificació de l'agent etiològic responsable i la presa de decisions quant al tractament antibiòtic. També es poden observar brots d'infeccions respiratòries pel virus respiratori sincitial o tuberculosi. Freqüentment, HCAP es presenta amb una pitjor evolució, estada hospitalària més llarga, i una taxa de mortalitat similar a la observada en aquelles pneumònies d'origen nosocomial [19].

L'enfocament terapèutic de la pneumònia en aquests pacients haurà de ser actiu envers aquests microorganismes, a més de la flora endògena primària associada a les pneumònies comunitàries. Es donarà preferència als antibiòtics que es puguin administrar per via oral i s'evitarà, en el màxim possible el trasllat a un centre hospitalari per la pobre adaptació d'aquesta població als canvis. En les formes greus, les decisions de limitacions terapèutiques en front a mesures artificials de suport vital dependran més de la qualitat de vida del pacient que de l'edat.

#### **1.4.1.2. Pneumònia d'origen nosocomial**

##### **1.4.1.2.1. Pneumònia no associada a ventilació mecànica**

Es defineix com a pneumònia nosocomial, aquella que es presenta a partir de les 48-72 hores de l'ingrés hospitalari i que no estava present o en període d'incubació durant el moment de l'ingrés [15].

La majoria de les pneumònies nosocomials en pacients no intubats estan causades per bacteris, i estan associades a taxes elevades de morbiditat i mortalitat. La causa més freqüent és *Streptococcus pneumoniae*. Donat que sovint s'associa a broncoaspiració, també destacarien les enterobactèries i els anaerobis. En qualsevol cas, la distribució etiològica és específica de cada hospital, depenent del tipus de pacients ingressats i de les característiques epidemiològiques del mateix. El tractament antibiòtic de la pneumònia nosocomial s'ha d'adaptar al patró epidemiològic

recent de cada hospital, ja que la sensibilitat als antibiòtics presenta un patró variable en el temps.

#### **1.4.1.2.2. Pneumònia associada a ventilació mecànica**

La presència d'una via aèria artificial és el principal factor de risc en les pneumònies nosocomials, per això la major incidència es dona en els Serveis de Medicina Intensiva, on representa la primera causa d'infecció nosocomial [15,20]. En pacients ventilats, s'observa una freqüència a desenvolupar pneumònia molt superior a la observada per la resta de pacients. El risc d'adquirir una pneumònia en pacients ventilats, s'incrementa entre 6 i 21 vegades respecte als no ventilats i augmenta entre l'1% i el 3% per cada dia de ventilació mecànica [21].

En els pacients intubats, els bacteris poden invadir les vies del tracte respiratori inferior per diferents vies: microaspiracions de l'exsudat orofaringi, inhalacions d'aerosols que contenen bacteris, i menys freqüentment per disseminació hematògena d'un focus infecciós distant als pulmons [21]. En aquest grup de pacients, les defenses de les vies altes estan abolides (glotis, reflex de la tos, mecanisme mucociliar), i els macròfags alveolars seràn els encarregats d'organitzar la resposta inflamatòria.

La via d'infecció més freqüent és endògena i té lloc a través de la superfície externa del tub traqueal. S'han descrit diversos reservoris endògens, que poden actuar com a font de patògens pulmonars: orofaringe, tràquea, cavitat gàstrica i sinus paranasals. La colonització de la orofaringe i tràquea per bacils Gram negatius nosocomials està ben documentada i s'han descrit diferents factors que expliquen la major adherència d'aquests patògens a les cèl·lules epitelials de l'hostatger en situacions de major severitat, malnutrició o estats post-operatoris. Una altra via d'infecció és l'exògena i consisteix en una colonització directa de les vies respiratòries baixes, per l'interior de la llum del tub traqueal, des d'un medi exterior al pacient, a partir de reservoris externs (respiradors, aerosols), manipulacions (aspiració de secrecions) i tècniques invasives. Aquesta via ha disminuït la seva importància en les darreres dècades, gràcies a un millor ús dels procediments d'esterilització i desinfecció dels aparells emprats i a una millor aplicació de les tècniques emprades per a les cures de la via aèria. Finalment, també s'ha descrit el fenomen de translocació bacteriana, com a possible via de colonització. En aquest cas, els patògens travessarien la mucosa intestinal (mecanisme facilitat per processos tals com l'isquèmia i els traumatismes) i donarien

lloc a un procés de bacterièmia, amb possible arribada dels microorganismes als pulmons. Aquesta via s'ha proposat principalment per a pacients immunodeprimits, oncològics i grans cremats, encara que no existeixen prous estudis per poder-la demostrar.

Els microorganismes implicats depenen de la durada de la intubació, de l'existència de patologies subjacents (coma, MPOC entre d'altres), de l'ús previ d'antibiòtics i de la situació epidemiològica de cada hospital. Els episodis que es presenten durant els primers dies d'intubació són deguts a la flora endògena primària, principalment *S.aureus* sensible a la meticil·lina, pneumococ i *Haemophilus influenzae* no tipable. A partir de la primera setmana d'intubació, predominen els episodis causats per *Pseudomonas aeruginosa*, seguits dels enterobacteris [22]. En aquells pacients portadors d'una malaltia pulmonar prèvia o que hagin pres antibiòtics d'ampli espectre aquests microorganismes es poden observar durant els primers dies. Depenent de la situació epidemiològica de l'hospital s'ha de considerar també la presència d'*Acinetobacter baumannii* o de *S. aureus* resistent a la meticil·lina, responsables d'importants brots epidèmics associats amb una elevada mortalitat. En la majoria de sèries, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *A. baumannii* intercanvien l'ordre, sempre entre les tres primeres posicions [23]. La pneumònia del ventilat presenta la dificultat de diagnòstic diferencial amb altres entitats com el *distress* respiratori, el tromboembolisme pulmonar o la traqueobronquitis, amb tractaments diferents.

## **1.4.2. Pneumònia adquirida a la comunitat**

### **1.4.2.1. Epidemiologia**

Els estudis poblacionals prospectius situen una incidència anual de PAC entre el 5 i l'11% de la població adulta [3]. És ben conegut que la malaltia és més freqüent en el sexe masculí, en les edats extremes de la vida, durant l'hivern i en presència de diversos factors de risc, entre ells, consum d'alcohol i tabac, malnutrició, urèmia o MPOC [24,25]. En els diferents països, el nombre d'ingressos per PAC oscil·la entre 1.2 i 11.6 per 1.000 pacients. Entre d'altres, aquesta variabilitat podria estar en funció de les diferències en l'atenció dels pacients en els serveis d'atenció primària o atenció especialitzada. Tanmateix, el número d'ingressos augmenta amb l'edat (1.29 per 1.000 en pacients de 18 a 39 anys en front al 13.21 per 1.000 en aquells de més de 55) . Per

altra banda, entre un 1.2 i un 10% de pacients hospitalitzats per PAC precisen ingrés en un servei de medicina intensiva [5].

#### **1.4.2.2. Patogènia i etiologia**

La variabilitat quant a tipus de resposta clínica a les PAC ve determinada per diversos paràmetres, que es poden agrupar en: microorganisme (tipus, virulència, inòcul), hostatger (edat, sexe, presència de comorbiditat, polimorfismes genètics) i tractament antibiòtic (inapropiat, retard).

##### **1.4.2.2.1. Polimorfismes genètics**

La capacitat que té un individu per respondre a una determinada infecció és variable i existeixen cada cop més evidències de que el risc de mort per infecció es heretable [26]. La freqüència de la pneumònia suggereix que la variant genètica que està associada a infecció és relativament freqüent (un polimorfisme), més que una mutació rara. D'altra banda el risc genètic d'aquesta malaltia és indubtablement poligènic. El nombre de loci polimòrfics, que han estat estudiats com a possibles factors de risc per desenvolupar infeccions pulmonars o sèpsia és considerable, i no deixa d'augmentar. Els gens més estudiats estan implicats en el reconeixement d'antigen, les vies d'activació de la inflamació i la resposta pro-inflamatòria i anti-inflamatòria [27,28]. Aquests polimorfismes, en funció del gens implicats es poden associar a una major susceptibilitat o a una major severitat a patir una determinada infecció.

##### **1.4.2.2.2. Patogènia**

Els microorganismes, de la pròpia flora endògena o de procedència exògena, poden arribar al parènquima pulmonar per diferents vies: 1) extensió directa a partir d'un focus infecció contigu, 2) propagació hematògena a partir d'un focus distant, 3) penetració a través de las vies aèries mitjançant la inhalació d'aerosols contaminats o 4) per l'aspiració de secrecions orofaríngies. Els dos darrers mecanismes són els més freqüents.



La presència i posterior inhalació d'aerosols contaminats és la responsable de les pneumònies causades per microorganismes atípics, micobacteris, fongs i virus. Aquests, són expulsats pels pacients mitjançant la tos o els esternuts. Els bacteris "típics", amb dimensions entre 0.5-2 µm, no són transportats per aquest mecanisme, a diferència dels microorganismes atípics que són de 5 a 100 vegades més petits.

L'aspiració de secrecions orofaríngees és un fenomen molt freqüent i la càrrega bacteriana és molt superior a la que s'estableix per inhalació. Un 45% dels individus sans, ho fan durant el son, especialment si és profund i en un 70% en cas de presentar alteracions de consciència [29]. Tot i la freqüència, la integritat dels sistemes defensius permet controlar l'agressió. Quan aquests es debiliten, i/o quan per circumstàncies que condicionen una penetració excessiva de microorganismes, es pot desencadenar una pneumònia.

Les característiques de les PAC han canviat al llarg dels anys, presentant una major diversitat en la població afectada, amb un augment de l'edat i del nombre de pacients amb malalties de base (diabetis, MPOC, bronquiectasies) o immunodepressió (infecció per VIH, trasplantats). A més també ha canviat l'espectre dels microorganismes potencialment implicats. A continuació es detallen els principals agents bacterians més freqüents. Tot i això, cal tenir present que en aproximadament el 10% dels casos la etiologia de la PAC pot ser mixta i que en gaire bé el 40% dels casos l'agent causal es desconeix.

#### 1.4.2.2.3. Etiologia

Les troballes etiològiques depenen de la població i la zona geogràfica considerada, de l'aparició de possibles epidèmies, de l'ús de determinades tècniques diagnòstiques i de la seva qualitat i sensibilitat, així com de l'administració prèvia o no d'antibiòtics. En la majoria d'estudis epidemiològics només és pot demostrar una etiologia específica en aproximadament un 50% dels casos, tot i el caràcter prospectiu de la majoria d'estudis i de l'ús extensiu de diversos mètodes diagnòstics. L'etiologia de les PAC és per tant molt variable en les diferents sèries publicades. Més d'un centenar de microorganismes poden causar una PAC, encara que només un nombre reduït està implicat en la majoria dels casos. En la Taula 1 es mostren les etiologies més freqüents en la PAC segons els grups de risc. En el nostre entorn, *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila* i *Chlamydia pneumoniae* serien els tres microorganismes

implicats amb major freqüència en les PAC d'origen bacterià. *Mycoplasma pneumoniae* i els virus respiratoris incidirien especialment en nens i joves.

**Taula 1.** Descripció dels microorganismes més freqüentment aïllats en les PAC en funció de l'edat i la presència de comorbilitats.

Edat <60 anys i sense malaltia de base	Edat >60 anys i/o amb malaltia de base	Infecció pel VIH
<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	
<i>Coxiella burnetti</i>	Enterobactèries	
Virus	<i>S. aureus</i>	
	Virus	

#### 1.4.2.3. Diagnòstic clínic i radiològic

La simptomatologia de la PAC és inespecífica i el seu diagnòstic es basa en un conjunt de signes i símptomes relacionats amb infecció de vies respiratòries baixes i afectació de l'estat general, incloent febre (>38°C), tos, expectoració, dolor pleurític, disnea o taquipnea, i signes d'ocupació de l'espai alveolar (crepitants, roncus, buf tubàric). En ancians, és freqüent l'absència de febre, l'aparició de confusió i l'empitjorament de malalties coexistents. Clàssicament és distingeix la pneumònia "típica", generalment causada per *S. pneumoniae*, que es presenta amb febre, tos, expectoració, dolor pleurític i crepitants a l'auscultació, i la pneumònia "atípica" causada per *Legionella*, *Mycoplasma* o *Chlamydophila*, que es presenta com a febre sense símptomes respiratoris, de vegades auscultació normal, i una dissociació clínic-radiològica. En general, si més no, no existeix cap signe clínic, o combinació d'aquests, que permeti identificar una determinada etiologia o diferenciar la PAC d'altres infeccions de vies aèries baixes amb suficient fiabilitat.

La prova diagnòstica més important és la radiologia toràcica, perquè resulta essencial per a confirmar la sospita diagnòstica. La presència d'un infiltrat en la radiografia de tòrax en un pacient amb manifestacions clíniques compatibles amb PAC és el *gold standard* per al diagnòstic d'aquesta malaltia. Donat que les manifestacions clíniques de la PAC són inespecífiques, la radiografia de tòrax és indispensable per tal d'establir

el seu diagnòstic, localització, extensió, possibles complicacions (empiema), existència d'altres malalties pulmonars associades, altres possibles diagnòstics alternatius (per exemple: neoplàsia pulmó, tromboembolisme pulmonar) i també per confirmar la seva evolució cap a progressió o curació. L'afectació bilateral, o de dos o més lòbuls i l'existència d'empiema són indicadors de gravetat. No existeixen signes radiològics característics que permetin determinar el microorganisme causal. La curació clínica precedeix a la resolució radiològica i aquesta és més lenta en els pacients d'edat avançada. Es pot observar un empitjorament radiològic després de l'ingrés hospitalari, essent aquest fet més freqüent en pacients amb infecció per *Legionella* spp., pneumònia pneumocòccica bacterièmica i en ancians. En pacients immunodeprimits, la radiologia pot tenir un valor limitat, donat que en alguns malalts no s'observa condensació.

#### **1.4.2.4. Diagnòstic microbiològic**

Un diagnòstic microbiològic precoç, ràpid i fiable és essencial per tal d'instaurar un tractament antimicrobià inicial adequat, indispensable per disminuir l'elevada taxa de mortalitat de la PAC. Tot i això, amb l'aplicació de les tècniques diagnòstiques adequades, el diagnòstic etiològic només s'obté al voltant del 50% dels casos [12]. A més en un nombre variable de casos, l'etiologia de la PAC pot ser mixta [30]. Algunes dades clíniques, epidemiològiques i radiològiques poden suggerir determinades etiologies, però no existeix cap patró suficientment específic. D'aquesta manera, el diagnòstic etiològic és necessari en cas de gravetat o quan el seu coneixement pot donar lloc a la modificació en el maneig terapèutic, podent-lo obviar en formes més lleus. És a dir, quan més compromès està un pacient, més ampli ha de ser l'estudi microbiològic, i també quan existeixin factors de risc i epidemiològics que suggereixin etiologies infreqüents [12,31]. En cas de lenta resolució o manca de resposta al tractament, la reavaluació serà més complexa si els estudis microbiològics no s'han realitzat a l'inici. Per altra banda, en el cas de la pneumònia per *S.pneumoniae*, l'agent causal més freqüent en totes les sèries, la variació geogràfica en el percentatge de resistència, així com la possibilitat d'al·lèrgia als beta-lactàmics, fa convenient l'aïllament en cultiu i estudi de sensibilitat. A més, des del punt de vista epidemiològic, es necessària la determinació dels serotips més freqüents en cada àrea per al disseny de vacunes.

El diagnòstic microbiològic de les infeccions del tracte respiratori inferior, en general presenta importants limitacions degut a la seva baixa rendibilitat i a la dificultat per obtenir mostres respiratòries de qualitat adequada, ja que la interpretació del valor de microorganismes aïllats en mostres inadequades pot fins i tot induir a diagnòstics i tractaments erronis. En el cas de patògens que poden formar part de la flora comensal, com *S. pneumoniae*, el diagnòstic etiològic de seguretat requerirà del seu aïllament en mostres no contaminades com sang, líquid pleural, teixit pulmonar o bé la detecció d'antígen en orina. En cas d'aïllament i/o detecció d'antígen en mostres respiratòries per tècniques no invasives es considerarà diagnòstic etiològic de probabilitat. Les noves eines de laboratori, com serien les tècniques de detecció d'antígens bacterians o d'amplificació d'àcids nucleics permeten la detecció de l'agent causal de forma més ràpida i sensible, especialment per aquells patògens difícils de cultivar.

#### 1.4.2.4.1. Tipus de mostres

Davant de cada situació clínica i depenen de la major o menor gravetat de l'episodi, hi ha diversos recursos tècnics per obtenir mostres destinades al estudi microbiològic. A la Taula 2 es mostren el tipus de mostres disponibles, classificades en no invasives i invasives.

**Taula 2.** Tipus de mostres disponibles per al diagnòstic microbiològic

##### **Mostres obtingudes mitjançant tècniques no invasives**

Sang (hemocultiu)  
Líquid pleural  
Espit espontani o induït  
Sèrum  
Orina

##### **Mostres obtingudes mitjançant tècniques invasives**

Broncofibroscopia  
Broncoaspirat  
Catèter telescopat amb raspall protegit  
Rentat broncoalveolar (RBA)  
Biòpsia transbronquial  
Punció transtoràcica aspirativa amb agulla ultrafina  
Biòpsia pulmonar

---

#### 1.4.2.4.1.1. Hemocultiu

La pràctica dels hemocultius és necessària per al diagnòstic de la pneumònia greu. Els objectius principals serien realitzar un diagnòstic de seguretat de la pneumònia pneumocòccica bacterièmica o de la pneumònia per *H. influenzae* així com per poder realitzar els estudis de sensibilitat *in vitro* corresponents. L'hemocultiu es realitza mitjançant venopunció asèptica en dues extraccions diferents, cultivant-los en medi aerobi i anaerobi. Donat que no és infreqüent la lisi del pneumococ, en aquest cas és més fàcilment aïllable en condicions anaeròbies, així com en els casos de pneumònia aspirativa. Els hemocultius són positius en menys d'un 20% dels casos [32] i la seva utilitat es limitada en pacients immunocompetents [33]. S'observa una incidència més elevada en pacients amb infecció per VIH, i pacients amb malalties cròniques com en ancians, motiu pel qual és especialment important la seva pràctica en aquests grups. La PAC és la causa de la majoria de bacterièmies pneumocòcciques en població adulta. Els pacients amb pneumònia severa tenen també major probabilitat d'estar infectats, a més de per *S. pneumoniae*, per altres patògens tals com *S. aureus* o bacils Gram negatius. Els hemocultius també s'han de cursar en cas de fracàs terapèutic o progressió de la pneumònia, especialment en pacients amb factors de risc.

#### 1.4.2.4.1.2. Líquid pleural

Quan existeix vessament pleural s'aconsella la toracocentesi i cultiu aerobi i anaerobi del líquid obtingut, ja que el desenvolupament d'empíema és un dels principals factors associats a mala evolució [34]. *S. pneumoniae* és el microorganisme més freqüentment aïllat, especialment quan la infecció està causada per determinats serotips com l'1 [35], seguit de *H. influenzae* i bacteris piògens com *Streptococcus pyogenes* o *S. aureus*. També està indicada la detecció d'antigen a partir d'aquest tipus de mostra, per exemple si el pacient ja porta tractament antibiòtic, amb una sensibilitat del voltant del 80% i especificitat superior al 90% [36], o fins i tot la detecció d'àcids nucleics, amb valors similars [37].

#### 1.4.2.4.1.3. Esput

L'esput és la mostra respiratòria més freqüentment obtinguda, però també la més problemàtica en la seva interpretació: presenta una sensibilitat baixa degut a la pèrdua

de bacteris per retard en el processament, presència d'agents etiològics difícils de cultivar i, sobre tot, per la seva contaminació amb flora orofaríngia. A més, la interpretació després de l'inici del tractament antibiòtic ha de ser molt cautelosa. Es necessari establir mitjançant microscopia òptica la qualitat de la mostra mitjançant criteris cel·lulars, per tal de seleccionar com a esput de bona qualitat aquells amb menys de 10 cèl·lules epitelials i més de 25 leucòcits/camp de 100x [38]. Quan la qualitat de l'esput és adequada, i aquest és processat ràpidament, la visualització en la tinció de Gram d'una morfologia bacteriana predominant, per exemple de diplococs Gram positius, suggereix un diagnòstic probable de pneumònia pneumocòccica. L'aïllament en cultiu d'esput es considera diagnòstic de probabilitat ja que la colonització de la orofaringe per pneumococ és molt freqüent en infants menors de 2 anys i en pacients amb malalties pulmonars cròniques, població que presenta una major predisposició a desenvolupar una pneumònia [39,40]. Altres microorganismes que es poden observar de forma predominant en la tinció de Gram, i es poden aïllar en cultiu són *H. influenzae* i *M. catarrhalis*, donant lloc a un diagnòstic també presumptiu, donat que també són microorganismes que poden colonitzar les vies respiratòries, especialment en aquells pacients amb malalties cròniques. Per altra banda, l'aïllament de patògens primaris com *Legionella* o *M. tuberculosis* es considera diagnòstic de seguretat, inclòs en esputs de mala qualitat. L'aïllament de *Legionella* requereix de medis específics, és poc sensible i lent, però segueix estant indicat quan sigui possible donat que la detecció d'antigen en orina permet identificar amb major sensibilitat el serogrup 1 de *L. pneumophila* (tot i que fa reacció creuada amb altres serogrupos) i sobretot per motius epidemiològics, pel que fa a tipatge de soques clíniques i ambientals per la cerca de les fonts d'infecció. El cultiu de *M. pneumoniae* i *Chlamydomphila* requereix de medis especials, és poc sensible, difícil i lent, pel que es recomanen tècniques alternatives. Les pneumònies per enterobacteris (com *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) i per *Pseudomonas* i altres bacils Gram negatius no fermentadors són més freqüentment nosocomials, però poden ser causa de PAC en determinats grups de pacients, com aquells amb immunodepressió i malalties cròniques com la diabetis i la MPOC, així com aquells pacients amb hospitalització prèvia, per als quals el seu aïllament predominant en mostra d'esput de bona qualitat pot tenir valor clínic.

Cal tenir especial atenció a l'emergència de pneumònia necrotitzant greu per *S. aureus* resistents a meticil·lina, que ha tingut lloc especialment en el continent americà i amb menys freqüència a Europa [41,42]. Per altra banda, en un 10-15% dels casos, la PAC és secundària a aspiració, en pacients amb factors de risc (alteració de la consciència,

de la deglució i boca sèptica). En aquest cas no és necessari el cultiu ja que els agents causals són els membres habituals de la flora orofaríngea i les seves sensibilitats són predictibles.

#### 1.4.2.4.1.4. Orina

En el cas d'infecció per *S. pneumoniae* i *L. pneumophila*, les tècniques de detecció d'antigen en orina permeten detectar l'excreció renal d'antígens microbians. En el cas de l'antigen pneumocòccic, es pot testar per diferents mètodes: la contraimmunolectroforesi (CIE) que detecta antigen polisacàrid capsular, i la immunocromatografia (ICT), que detecta antigen polisacàrid C, amb una sensibilitat del 80% [43]. En pacients amb colonització bronquial com succeeix en la MPOC i en infants menors de 2 anys, es pot detectar polisacàrid C en orina, sense que el pneumococ sigui l'agent causal de la infecció respiratòria, per això es recomana realitzar la CIE en aquest grup de pacients [40,44]. A més, s'ha de considerar la persistència de l'excreció de l'antigen urinari associada a episodis anteriors de pneumònia o exacerbació de la MPOC [45]. L'antigenúria de *Legionella* s'ha convertit en el mètode diagnòstic de referència, essent fonamental el tractament tèrmic de l'orina i la concentració per incrementar la seva sensibilitat fins a valors del 80%, amb una especificitat del 100% [46,47]. Es recomana la seva realització quan el context epidemiològic suggereixi aquest diagnòstic, en les pneumònies greus i aquelles que no responguin al tractament inicial amb beta-lactàmics.

#### 1.4.2.4.1.5. Serologia

La serologia està indicada per al diagnòstic de la pneumònia per *M. pneumoniae* i per *C. pneumoniae* especialment en pacients joves [48-50]. Els principals inconvenients serien que els adults poden no presentar elevació de IgM després de reinfeccions repetides i que existeix una alta prevalença d'anticossos front *C. pneumoniae* en la població general. La serologia és també la tècnica d'elecció quan, pel context epidemiològic es sospiti infecció per *C. burnetti* (febre Q) o *Francisella tularensis* (tularèmia) i quan no s'hagi pogut establir el diagnòstic de *L. pneumophila* per altres tècniques [51].

#### 1.4.2.4.1.6. Mostres obtingudes mitjançant tècniques invasives

L'obtenció per fibrobroncoscopia de mostres representatives del tracte respiratori inferior, corresponents a la via aèria o al segment pulmonar radiològicament afectat, sense contaminació amb flora de l'orofaringe està indicada especialment en el diagnòstic de la pneumònia nosocomial i el pacient immunodeprimit. En la PAC estaria indicat en cas de gravetat o de fracàs terapèutic. El tipus de mostra més adequat varia segons la sospita diagnòstica i el nivell pulmonar de la lesió. El cultiu es realitza de forma quantitativa (dilucions seriades o sembra amb nansa calibrada), donat que es basa en la premissa que en la pneumònia la concentració de bacteries és de com a mínim  $10^5$  ufc/mL en vies inferiors, mentre que les bacteries colonitzadores estan presents en menor quantitat. En el cas del raspall bronquial, donat que es recull entre 0.01 i 0.001mL de secrecions, l'aïllament de més de  $10^3$  ufc/mL en la mostra dipositada en 1mL de sèrum fisiològic representa aquesta quantitat. En el RBA es consideraran significatius creixements superiors a  $10^4$  ufc/mL, ja que el punt de partida són secrecions alveolars diluïdes en 10 a 100 mL de sèrum fisiològic. Els punts de tall s'han d'interpretar amb precaució, sobre tot si el pacient ja està prenent tractament antibiòtic, i seria una excepció l'aïllament de patògens primaris. Els microorganismes aïllats que puguin formar part de la flora comensal o colonització es consideraran diagnòstic de presumpció però es considerarà evidència alta en presència de pneumònia. El RBA és també la mostra d'elecció per la recerca de *P. jirovecii* i de citomegalovirus en malalts immunodeprimits. En casos seleccionats es pot realitzar biòpsia transbronquial mitjançant el broncoscopi, evitant així tècniques més invasives com la punció aspiració amb agulla fina transtoràcica, reservades per als quadres més greus en els que no s'ha pogut obtenir un diagnòstic etiològic.

#### 1.4.2.4.1.7. Tècniques de biologia molecular

Les tècniques de biologia molecular també poden jugar un paper en el diagnòstic de les PAC. Estan indicades en aquelles pneumònies greus en les que no s'ha aconseguit un diagnòstic etiològic pels mitjans habituals i en centres amb la infraestructura i l'experiència tècnica necessària. La detecció de DNA pneumocòccic per tècnica de PCR (reacció en cadena de la polimerasa) es pot utilitzar en mostres de sang però amb baixa sensibilitat i és d'utilitat en mostres de líquid pleural [52,53]. Les tècniques comercialitzades de PCR a temps real per a la detecció de *M. pneumoniae* i *C. pneumoniae* en mostres d'aspirat nasofaríngi presenten una important superioritat



diagnòstica enfront el cultiu però no sempre enfront la serologia. En determinats períodes epidèmics, la detecció de virus respiratoris com el virus de la grip, preferentment en aspirat nasofaringi, està indicada. En aquest cas, les tècniques ràpides d'immunofluorescència i d'immunocromatografia poden tenir una elevada especificitat (90-95%), el que permet instaurar el tractament de forma precoç, mentre que la sensibilitat és variable (20-65%), estant afectada per la qualitat de la mostra i la càrrega vírica [54]. La sensibilitat millora substancialment amb una adequada selecció dels pacients a estudiar, així com ho fa durant els períodes de més elevada prevalença, sense oblidar la importància de la qualitat de la mostra [55]. Les tècniques de biologia molecular tenen una major sensibilitat, a més de permetre la identificació del subtip, per exemple Influenza A H1N12009, tot i que el *gold standard* segueix sent el cultiu viral.

#### **1.4.2.5. Escales pronòstiques**

L'avaluació de la gravetat del pacient amb diagnòstic de PAC és fonamental i ha de ser el punt de partida per establir decisions sobre el tractament i la necessitat d'ingrés. Si s'ha optat per l'hospitalització, cal identificar aquells pacients més greus i també aquells que pugin empitjorar més ràpidament per tal d'ubicar-los precoçment i adequadament a la UCI. D'aquesta manera, els pacients podrien beneficiar-se del nivell de cures, propi de cada emplaçament i d'aquesta manera, millorar potencialment els resultats. Un retard en la identificació de la gravetat del cas i conseqüentment, un tractament i unes cures subòptimes en el període que transcorre entre l'arribada a l'hospital i el trasllat a UCI s'associa a un augment de la mortalitat [56].

L'avaluació de la gravetat de la malaltia utilitzant el criteri clínic depèn de l'experiència del metge responsable i tendeix en ocasions a infravalorar o sobreestimar la gravetat de la PAC. Per solucionar aquest problema s'han desenvolupat en els darrers anys escales pronòstiques de gravetat que estratifiquen els pacients en grups de risc en funció de la probabilitat de mortalitat als 30 dies o en funció de la probabilitat de necessitar un tractament més agressiu, com pot ser el suport ventilatori o el tractament hemodinàmic amb vasopressors.

**1.4.2.5.1. Pneumonia Severity Index (PSI)**

El PSI es va desenvolupar als EUA per Fine et al [57] i és un sistema de classificació validat i àmpliament acceptat. Es basa en una sèrie de paràmetres associats a un sistema de puntuació, que permet classificar els pacients en funció del risc de mortalitat associada a PAC en els 30 primers dies després del diagnòstic. Les variables independentment associades a la mortalitat es classifiquen en: dades demogràfiques (sexe, edat, ingrés previ en un centre socio-sanitari); presència de comorbilitats (neoplàsia, hepatopatia, malaltia cardíaca, malaltia cerebrovascular o malaltia renal crònica); paràmetres de l'exploració física i proves complementàries (proves bioquímiques i radiografia de tòrax).

**Taula 3.** Sistema de punts per calcular el PSI.

<b>Característiques</b>	<b>Punts assignats</b>
<b>Factors demogràfics</b>	
Edat	
Home	Edat en anys
Dona	Edat en anys-10
Centre socio-sanitari	10
<b>Antecedents patològics</b>	
Neoplasia	30
Hepatopatia	20
ICC	10
AVC	10
IR	10
<b>Exploració física</b>	
Confusió	20
Taquipnea $\geq 30/\text{min}$	20
Pressió arterial sistòlica $< 90 \text{ mm Hg}$	20
Temperatura $< 35^\circ\text{C}$ o $\geq 40^\circ\text{C}$	15
Freqüència cardíaca $\geq 125/\text{min}$	10
<b>Analítica i Radiologia</b>	
pH arterial $< 7.35$	30
BUN $\geq 30 \text{ mg/dL}$	20
Glucosa $\geq 250 \text{ mg/dL}$	20
Na $< 130 \text{ mmol/L}$	10
Hematòcrit $< 30\%$	10
PO <sub>2</sub> $< 60 \text{ mm Hg}$	10
Vessament pleural	10

ICC: Insuficiència cardíaca crònica; AVC: accident vascular cerebral; IR: insuficiència renal; BUN: *blood urea nitrogen*. Taula modificada de: Fine et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med 1997; 336: 243-250.

La presència de cadascuna de les variables s'assigna amb una puntuació determinada (Taula 3). Segons la puntuació total, els pacients són classificats en 5 categories o classes (I-V) depenent del menor o major risc de morir en els 30 dies posteriors al diagnòstic de la pneumònia. Les classes I-III són lleus (mortalitat, 0.1-2.8%), la classe IV és de risc intermedi (mortalitat, 8.2-9.3%) i la classe V és d'alt risc (mortalitat, 27-31%). Amb l'ajut del diagrama de flux (Figura 4) es classifiquen els malalts en els diferents grups. Un pacient menor de 50 anys, sense comorbiditat i amb normalitat a l'exploració física i a les proves complementàries és assignat directament al Grup I. Aplicant el sistema de punts referits anteriorment s'estableixen els grups de risc restants : Grup II ( $\leq 70$ ), Grup III (71-90), Grup IV (91-130) i Grup V ( $>130$ ).



**Figura 4.** Diagrama per a la classificació dels pacients segons el PSI. De: Fine et al.

A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia.

N Engl J Med 1997; 336: 243-250.

#### 1.4.2.5.2. CURB i CURB-65

Una alternativa al PSI per valorar la gravetat de la pneumònia en el moment de l'ingrés, és la proposada inicialment per la *British Thoracic Society*, i posteriorment modificada per Neill et al [58], que destaca la importància de quatre factors que poden

determinar-se fàcilment: la freqüència respiratòria, la pressió arterial diastòlica ó sistòlica i la concentració del nitrogen ureic en sang [*Blood Urea Nitrogen*, (BUN)]. Es va desenvolupar principalment per identificar aquells pacients amb PAC severa i alt risc de mortalitat. Es coneix com CURB, que és l'acrònim de *Confusion, Urea, Respiratory rate* i BUN. La presència de cadascun dels següents paràmetres s'assigna amb un punt: confusió mental, freqüència respiratòria superior o igual a 30/min, pressió arterial diastòlica inferior o igual a 60mmHg o pressió arterial sistòlica inferior a 90mmHg i BUN superior a 7mmol/L.

Posteriorment Lim et al [59] el van redissenyar incorporant l'edat i modificant lleugerament l'acrònim inicial substituint-lo per CURB-65. CURB-65 es basa en els mateixos paràmetres que el CURB, però a més inclou la variable de l'edat. El càlcul de la puntuació final es realitza sumant un punt per cada variable present amb un rang entre 0 i 5 punts. Amb aquesta escala s'estratifiquen els pacients en tres grups o classes de risc: Grup 1 (0-1 punt) de baix risc, amb una mortalitat del 1.5%; Grup 2 (2 punts) de risc intermedi, amb una mortalitat del 9.2%; i Grup 3 (3-5 punts) d'alt risc, amb una mortalitat del 22%. Es recomana l'ingrés quan la puntuació és superior a 1, sobre tot si existeixen altres factors de gravetat com la hipoxèmia o l'afectació multilobar en la radiografia de tòrax. Una versió més simple d'aquest índex és el CRB-65.

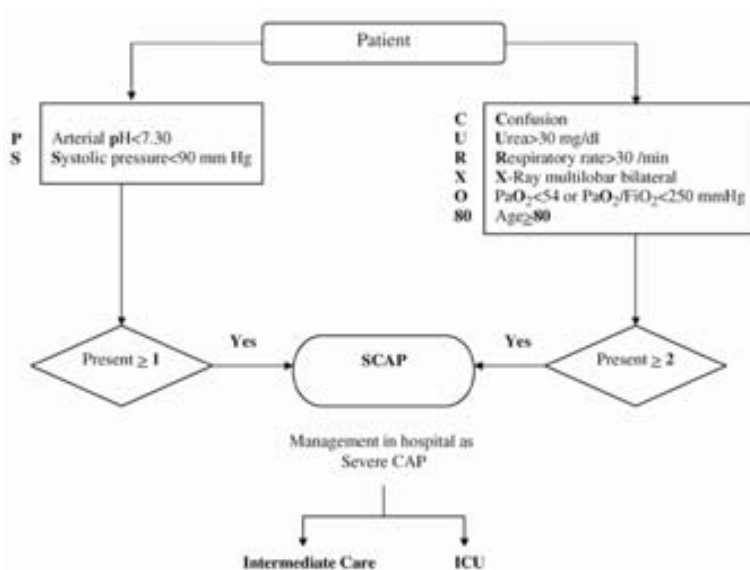
#### **1.4.2.5.3. SCAP i SMART-COP**

Un cop decidit l'ingrés hospitalari, cal identificar aquells pacients que necessitin ingressar a UCI i aquells que requereixin hospitalització convencional. És difícil homogeneïtzar criteris per derivar pacients a les unitats de crítics. De fet, s'observa una gran variació en el percentatge de pacients amb PAC ingressats a la UCI entre diferents hospitals (4-17%) [60]. Aquesta variabilitat respon en part a que la decisió d'admetre un pacient a la UCI depèn del judici clínic del metge responsable i està molt condicionat per les pràctiques locals.

En un esforç per predir millor el perfil dels pacients que requereixen ingrés a la UCI, la *American Thoracic Society* i *Infectious Diseases Society of America* (ATS/IDSA) [12] han proposat una nova escala de gravetat, anomenada IDSA/ATS *severity criteria*. Aquesta escala inclou 2 criteris majors (ventilació mecànica invasiva i xoc sèptic amb necessitat de vasopressors) i 8 criteris menors (freqüència respiratòria >30

respiracions/minut;  $PaO_2/FiO_2 < 250$  mmHg; infiltrat multilobar; confusió; urèmia  $> 20$  mg/dL; leucopènia ( $< 4000$  leucòcits/mm<sup>3</sup>); trombopènia ( $< 100000$  plaquetes/mm<sup>3</sup>); hipotèrmia ( $< 36^\circ C$ ); hipotensió requerint fluïdoteràpia agressiva. La presència d'un criteri major o al menys tres criteris menors requerirà ingrès a la UCI o en unitats d'alt nivell de monitorització. La seva capacitat predictiva per identificar les pneumònies greus i les d'ingrés a la UCI ha estat validada, encara que la obvietat dels criteris majors limita la seva utilitat i operativitat [61].

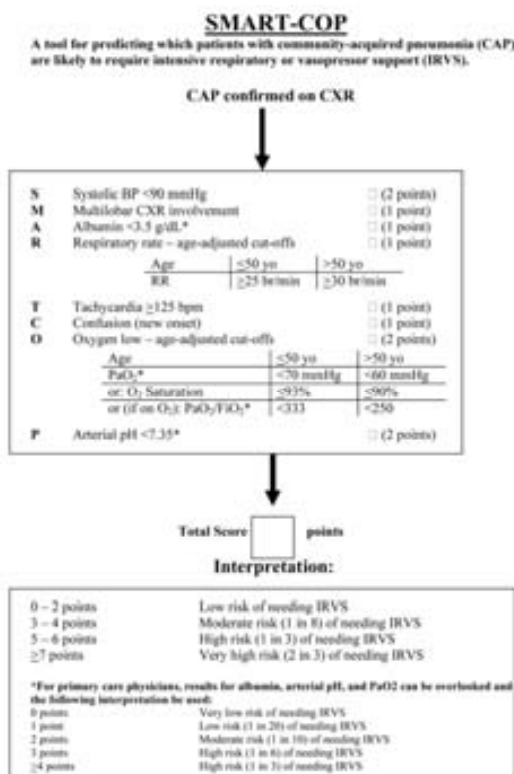
Recentment també s'ha elaborat una altra escala de gravetat, l'anomenada *Severe Community Acquired Pneumonia* (SCAP) [62], per predir la mortalitat intrahospitalària i/o la necessitat de ventilació mecànica i/o l'aparició de xoc sèptic. El diagnòstic de SCAP s'aplica quan el pacient presenti al menys un criteri major, o bé dos criteris menors. Els dos criteris majors són: pH arterial  $< 7.3$  (13 punts); pressió sistòlica  $< 90$  mmHg (11 punts); mentre que els criteris menors inclouen: confusió o estat mental alterat (5 punts); freqüència respiratòria  $> 30$  respiracions/minut (9 punts); BUN  $> 30$  mg/dL (5 punts);  $PO_2$  arterial  $< 54$  mmHg o  $PO_2/FiO_2 < 250$  mmHg (6 punts); edat  $> 80$  anys (5 punts); afectació multilobar bilateral (5 punts) (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama de les variables incloses en l'índex SCAP. De: España et al. Development and validation of a clinical prediction rule for severe community-acquired pneumonia.

Segons la puntuació total els pacients s'estratifiquen en 5 grups: baix risc (0 punts), risc intermedi (1 a 9 punts); risc alt (10 a 19 punts) i risc molt alt (20 a 29 i >30 punts).

En un nou intent de minimitzar la variabilitat dels criteris d'ingrés a la UCI per pacients amb PAC, recentment Charles et al [63] han desenvolupat una nova escala de gravetat centrada únicament en la predicció de necessitat de suport ventilatori o vasopressor intensiu. Aquesta escala es denomina SMART-COP per les inicials en anglès de les variables que inclou. Concretament, reflexa 8 variables clíniques i de laboratori amb diferents punts de tall en funció de l'edat. Les variables i les puntuacions corresponents són: pressió sistòlica baixa, 2 punts; afectació multilobar, 1 punt; nivells albúmina baixos, 1 punt; freqüència respiratòria alta, 2 punts; taquicàrdia, 1 punt; confusió, 1 punt; oxigenació baixa, 2 punts; pH baix, 2 punts (Figura 6).



**Figura 6.** Variables incloses i puntuacions del SMART-COP. De: Charles et al. SMART-COP : a tool for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2008; 47: 375-384.

A cadascuna de les 8 variables se l'hi assigna una puntuació i a partir de la puntuació total obtinguda, els pacients s'estratifiquen en 4 grups de risc en funció de la necessitat de suport intensiu: de 0 a 2 punts, baix risc; de 3 a 4 punts, risc moderat; de 5 a 6 punts, alt risc; superior a 6 punts, risc molt alt. També existeix una versió modificada d'aquest índex, anomenat SMRT-CO, per aquells casos en que els resultats d'albumina, oxigenació i pH no són disponibles. En aquest cas s'establirien 5 grups de risc.

Aquests dos últims models desenvolupats (SMART-COP i SCAP) que prediuen la necessitat d'ingrés a UCI o el posterior desenvolupament d'esdeveniments adversos greus (necessitat de ventilació mecànica, xoc i/o decés) que podrien justificar el tractament a la UCI, necessiten ser validats en diferents cohorts i en diferents àmbits geogràfics.

Per últim, també s'ha descrit un nou índex de gravetat, anomenat CAP-PIRO (*predisposition, insult, deleterious response and organ failure*) que permet de forma fàcil classificar els pacients amb PAC severa en 4 categories, i identificar ràpidament els pacients que podrien beneficiar-se de teràpia adjuvant [64,65].

#### **1.4.2.6. Orientació terapèutica**

El tractament per a la pneumònia inclou a més del suport hemodinàmic i ventilatori, el tractament antibiòtic. El concepte de tractament antibiòtic òptim inclou els següents conceptes: cobertura antibiòtica apropiada, dosi i via d'administració correctes i inici ràpid de tractament. En general, el tractament inicial de les PAC és empíric per la majoria dels pacients i es basa fonamentalment en els microorganismes i en els patrons locals de susceptibilitat i resistència antibiòtica. Els antibiòtics són els fàrmacs fonamentals per al tractament de les infeccions respiratòries, gràcies a la seva capacitat per matar els bacteris (efecte bactericida) o impedir el creixement bacterià (efecte bacteriostàtic). Per al correcte tractament de les pneumònies, les recomanacions terapèutiques de l'ATS i la IDSA així com les elaborades per la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica inclouen varis antibiòtics entre els que hi trobem els beta-lactàmics, les quinolones, els macròlids i els aminoglicòsids [5,12]. L'elecció final sobre el tipus de tractament antibiòtic dependrà del tipus de pneumònia, del microorganisme implicat i dels factors de risc del pacient, així com de les característiques epidemiològiques de l'àrea geogràfica [13,66].

Cada cop és més clara la necessitat d'una combinació terapèutica, intervenint en les diferents branques del procés fisiopatològic, tenint en compte la necessitat d'intervenir sobre l'agent infeccions mitjançant l'ús d'antibiòtics, però també sobre la resposta inflamatòria desencadenada per l'hostatger [67]. Durant les infeccions respiratòries severes, es produeix una resposta inflamatòria a nivell pulmonar (producció compartimentalitzada) i sistèmic, que es tradueix en un augment de diversos mediadors pro i anti-inflamatoris que es poden mesurar en sèrum, plasma i RBA. Existeix evidència científica que corrobora el fet que una resposta inflamatòria excessiva és la major causa de desenllaç desfavorable en pacients amb PAC, especialment en els primers dies.

L'ús dels tractaments immunomoduladors ha anat adquirint progressiva importància, en el disseny de noves teràpies antiinfeccioses. En les darreres dècades, l'interès s'ha centrat en incrementar la supervivència tot dissenyant estratègies que permetin prevenir la cascada de resposta als productes bacterians. En l'àmbit de les PAC, recentment s'ha demostrat un efecte immunomodulador, antioxidant i anticoagulant beneficiós de les estatines [68,69]. Donada la importància de la resposta inflamatòria en l'evolució i pronòstic de la pneumònia, diferents tractaments anti-inflamatoris s'han avaluat en pacients amb sèpsia i pneumònia severa [70-72]. Els glucocorticoides exerceixen els seus efectes anti-inflamatoris per diversos mecanismes, tant genòmics com no genòmics, destacant la inhibició de la transcripció dels gens de citocines, en part via interacció amb NF-kappa B [73,74]. També són capaços d'inhibir la quimiotaxi dels neutròfils cap al pulmó i disminuir la capacitat destructiva dels macròfags alveolars i dels neutròfils. Els resultats obtinguts en els estudis amb glucocorticoides han generat una controvèrsia considerable [75,76]. El seu ús en el tractament de la sèpsia ha tingut resultats variables i no es pot recomanar el seu ús generalitzat [77], tot i que han mostrat especialment bons resultats en cas d'insuficiència suprarenal [78]. L'èxit o fracàs dels estudis publicats depèn del tipus d'agent glucocorticoide i la dosi utilitzada. En general sembla més recomanable l'ús de dosis baixes (200-300 mg) d'hidrocortisona en períodes de 5-11 dies i no pas dosis altes de dexametasona. S'estan duent a terme diversos estudis al respecte, destacant l'estudi *Corticosteroid Therapy of Septic Shock* (CORTICUS) [78]. També s'ha descrit que els macròlids, a part de tenir activitat antimicrobiana poden exercir efectes immunomoduladors, obrint una nova via per al tractament de les infeccions respiratòries [79-81].



#### 1.4.2.7. Fracàs terapèutic

El fracàs terapèutic es defineix com a una resposta inadequada al tractament antimicrobià i depèn de diversos factors interrelacionats: la gravetat inicial de la pneumònia, el microorganisme causal i les característiques de l'hostatger. Entre un 10-15% dels pacients hospitalitzats i fins a un 21% en pacients ambulatoris presenten una evolució insatisfactòria [34,82]. Es classifica atenent als símptomes, bé per l'empitjorament o absència de millora, així com al temps d'evolució de l'episodi. Es tendeix a classificar en dos grups: quan s'observa en les primeres 72 hores i, quan ocorre en les 72 hores posteriors, anomenat fracàs tardà [83].

En pacients tractats de forma ambulatòria, la necessitat d'hospitalització o canvi en el tractament antibiòtic es pot considerar falta de resposta o fracàs terapèutic [12]. En pacients amb PAC hospitalitzats s'han descrit dos patrons de pneumònia que no respon al tractament. El primer és el de pneumònia progressiva, quan hi ha un empitjorament clínic amb insuficiència respiratòria greu, necessitat de ventilació mecànica i/o aparició de xoc sèptic, que és més freqüent en les primeres 72 hores [34,82]. El segon patró es caracteritza per presència d'inestabilitat clínica, considerant en aquest cas el temps transcorregut fins assolir l'estabilitat clínica [84]. Habitualment la resposta al tractament antimicrobià es produeix durant les primeres 72 hores, en forma de disminució de la febre, disminució de les secrecions purulentes i remissió dels signes locals o generals d'infecció. La resolució dels infiltrats pulmonars triga més temps. A més, en pacients ancians, la normalització radiològica es pot demorar fins a dos mesos. Quant a l'etiologia de la PAC que no respon, en un 40% dels casos és d'origen infeccions, en un 15% d'origen no infeccions i indeterminat en la resta [85].

En un estudi amb 1424 pacients amb PAC hospitalitzats, 215 van presentar una evolució insatisfactòria i els microorganismes més freqüentment aïllats van ser *S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *L. pneumophila*, *M. tuberculosis*, *C. burnettii*, *P. aeruginosa* i enterobacteris [86]. En un altre estudi, en aquest cas en ancians residents en centres socio-sanitaris, els microorganismes aïllats de forma predominant van ser *S. aureus* resistent a metilina, bacils Gram negatius entèrics i *P. aeruginosa* [87].

Quan un pacient presenta una resposta inadequada al tractament antimicrobià, en un primer moment, s'ha de procedir a una reavaluació completa per tal de confirmar o reconsiderar el diagnòstic de PAC per així poder descartar altres causes no

infeccioses i confirmar un diagnòstic alternatiu. I en segon lloc, s'han de repetir les exploracions microbiològiques amb tècniques invasives i no invasives, per tal de buscar microorganismes oportunistes no sospitats inicialment i descartar altres infeccions.

Finalment, també s'ha de considerar la possibilitat de que el microorganisme implicat sigui resistent a l'antibiòtic administrat. D'altra banda pot ser que hi hagi una pobre penetració alveolar de l'antibiòtic que faci que les concentracions assolides siguin insuficients tot i presentar nivells plasmàtics acceptables i tenir un patró de sensibilitat *in vitro* sensible. Aquest fet és particularment freqüent amb determinades famílies d'antibiòtics, com els aminoglicòsids i glicopèptids.

## **1.5. Malaltia pulmonar obstructiva crònica**

La MPOC es defineix com una malaltia caracteritzada per una limitació al flux aeri que no és completament reversible, habitualment progressiva i associada a una resposta inflamatòria pulmonar en front de partícules nocives i gasos, sobre tot al fum del tabac [88,89].

### **1.5.1. Freqüència i impacte socio-econòmic**

La prevalença mundial de la MPOC es situa entre el 5-10%, i ha augmentat en les darreres dècades. La malaltia és més freqüent en el sexe masculí, donat que la prevalença de tabaquisme és més alta entre els homes. No obstant això, en els últims anys el tabaquisme ha augmentat entre les dones, de manera que s'espera un augment de la prevalença també per al sexe femení. A Espanya s'han realitzat diversos estudis epidemiològics de base poblacional, entre els que destacarien el IBERPOC i el EPISCAN [90] .

L'anàlisi de la mortalitat en la MPOC és complicat per les limitacions en la validesa de les causes de mort en els certificats de defunció. A l'àmbit mundial, s'ha predit que la mortalitat de MPOC ascendirà en la classificació de les causes de mort, passant de la sisena posició l'any 1990 a la tercera l'any 2020 [91]. A Espanya, la MPOC representa la cinquena causa de mortalitat en els homes (taxa anual de 61 morts per 100.000 habitants) i la setena en les dones (20 per 100000 habitants) en l'any 2005 [92]. De

forma general, la morbiditat, que inclou entre d'altres, consultes al metge, visites a urgències i hospitalitzacions; és elevada, augmenta amb l'edat i és superior en el sexe masculí. A Espanya l'any 1999, la MPOC va suposar la sisena causa d'hospitalització en els homes i la divuitena en dones, amb una taxa de 4.4 i 1.9 per 1000 habitants, respectivament [93].

La MPOC implica un gran cost per la societat, tant pels costos directes (diagnòstic, hospitalitzacions perllongades i tractament farmacològic), com pels indirectes (pensions, pèrdues de productivitat i mortalitat prematura). Existeix una associació clara entre el grau de severitat de la malaltia i la despesa en recursos sanitaris que se'n desprèn. Diversos estudis sobre el cost associat, estimen que les persones amb MPOC gasten en recursos sanitaris fins a 3 vegades més que les persones sense MPOC. Els costos continuaran augmentant degut a l'alta prevalença, al cost dels tractaments actuals i a l'envelliment de la població [92].

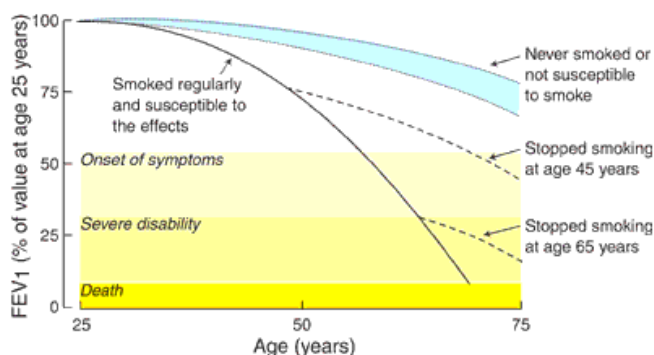
### **1.5.2. Factors de risc**

El tabac representa la causa més important de MPOC, donat que accelera la disminució natural de la funció pulmonar. Les dades clíniques i epidemiològiques disponibles indiquen una associació sòlida i consistent entre el consum de tabac i MPOC. En les darreres dècades s'han realitzat diversos estudis que demostren que el tabac provoca hipersecreció i obstrucció de les vies aèries en fumadors. També s'ha demostrat que el fet de deixar de fumar, permet la recuperació de la disminució gradual del volum espirat màxim en el primer segon de la espiració forçada ( $FEV_1$ ), encara que no fins a valors basals. No obstant, el tabac no és "causa suficient" de MPOC, donat que només el 10-20% dels fumadors desenvolupen la malaltia, i tampoc és causa necessària, perquè alguns malalts no han estat mai fumadors. Hi ha per tant, altres factors de risc que intervenen en l'aparició de la malaltia [94].

L'única causa genètica que s'ha relacionat amb fermesa amb la MPOC és el dèficit de l'enzim inhibidor de la proteasa  $\alpha_1$ -antitripsina, present en un percentatge molt petit de la població, de manera que només se l'hi atribueix una proporció molt reduïda (1%) dels casos amb MPOC [95]. Diversos estudis longitudinals, han demostrat una major disminució del  $FEV_1$  en treballadors exposats a pols minerals i substàncies químiques (vapors, irritants, fums). Igual que el que succeeix pel tabac, s'ha trobat una relació entre la intensitat de l'exposició i el desenvolupament de la malaltia.

### 1.5.3. Història natural

L'evolució de la MPOC es caracteritza per una disminució excessiva de la funció pulmonar al llarg dels anys. La mesura que millor reflexa la limitació al flux aeri és el FEV<sub>1</sub>. En condicions normals, la funció ventilatòria augmenta amb l'edat fins arribar a un màxim entre els 20 i 25 anys, moment a partir del qual comença un lent però constant descens dels valors funcionals (Figura 7) [96].



**Figura 7.** Variacions en els valors de FEV<sub>1</sub> en funció de l'edat i del consum de tabac.

Adaptat de Fletcher et al. The natural history of chronic airflow obstruction.

Br Med J 1977; 1: 1645-1648.

En alguns fumadors aquest descens és major que l'esperat. El fet de deixar de fumar, tot i que no fa recuperar el volum perdut alenteix la velocitat de caiguda fins a velocitats normals. Múltiples estudis han demostrat que tant els valors basals de FEV<sub>1</sub>, com la caiguda anual de la funció pulmonar són predictors de mortalitat i morbiditat. Un altre aspecte important en l'evolució de la malaltia és l'aparició de les aguditzacions, també anomenades exacerbacions. Són episodis aguts d'empitjorament dels símptomes habituals, que es presenten amb una mitjana d'1 a 3 vegades per any [97]. La freqüència amb la que es presenten aquestes exacerbacions, està associada a un major descens en els valors de FEV<sub>1</sub>, empitjorament de la qualitat de vida i a un augment de la mortalitat [98-100].

### 1.5.4. Classificació de la MPOC

La gravetat de la MPOC es classifica a partir del valor de FEV<sub>1</sub> postbroncodilatació, sent aquest l'indicador òptim d'obstrucció al flux aeri (Taula 4). Aquesta classificació és

la que també es proposa des de *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD)* [101].

**Taula 4.** Classificació de la MPOC.

Grau de severitat	FEV <sub>1</sub> postbroncodilatació (%)
Lleu	≥80
Moderada	≥50 i <80
Greu	≥30 i <50
Molt greu	<30 o <50 amb IRC <sup>b</sup>

IRC:insuficiència respiratòria crònica. Taula modificada de: Peces-Barba et al.

Arch Bronconeumol 2008; 44: 271-81.

### 1.5.5. Exacerbació de la MPOC

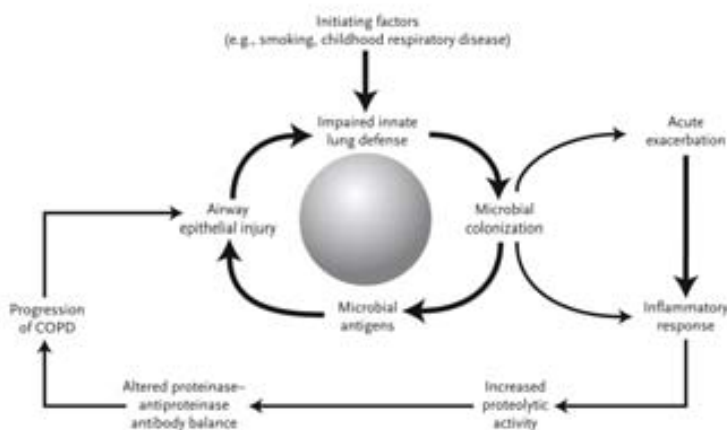
Les exacerbacions de la MPOC són un problema de Salut Pública, amb una considerable morbiditat i impacte sobre la qualitat de vida dels pacients. Les exacerbacions es defineixen generalment en funció dels seus símptomes, com un canvi agut en la situació clínica basal del pacient, que va més enllà de la variabilitat diària. Cursa amb augment de la dispnea, de l'expectoració, i de l'expectoració purulenta o qualsevol combinació d'aquests tres símptomes i requereix d'un canvi terapèutic [102,103].

S'ha considerat que les exacerbacions són la causa de l'interacció de diversos factors com les condicions de l'hostatger i la intervenció d'agents infecciosos i ambientals que portaria a un augment significatiu de la inflamació pulmonar. La dificultat és la de discernir el pes específic de cadascun dels elements.

#### 1.5.5.1. Etiopatogènia

Tal i com es reconeix a la normativa GOLD, les causes més comunes de les exacerbacions de la MPOC són les infeccions de l'arbre traqueobronquial, ja siguin bacterianes o víriques i la pol·lució, però en una tercera part dels casos la causa és desconeguda [101]. Per explicar el mecanisme d'aparició s'ha proposat l'efecte local del fum del tabac, com a factor debilitador de l'epiteli respiratori i causant de la disfunció mucociliar, augmentant així la viscositat.

Sethi et al [104,105] van proposar l'anomenada hipòtesi del cercle viciós per tal d'explicar com la colonització microbiana en vies baixes de pacients amb MPOC perpetua la inflamació i contribueix a la progressió de la malaltia (Figura 8). Els factors iniciadors actuarien com a factors debilitadors de l'epiteli respiratori, causant disfunció cilial, augment de la mucositat i disminució de l'aclariment mucociliar, afavorint la colonització bacteriana. El punt central de la hipòtesi és el moment en què els bacteris arriben i s'instal·len a les vies baixes. En pacients fumadors, es produeix una disfunció de l'aclariment mucociliar (deguda al fum del tabac) que permet la persistència dels bacteris dificultant encara més l'eliminació del moc. Els mecanismes que dificulten l'eliminació de moc són una sobreproducció d'aquest mucus, la disrupció de l'activitat mucociliar i el dany en l'epiteli aeri.



**Figura 8.** Hipòtesi del cercle viciós. De: Sethi et al. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2008; 359: 2355-2365.

S'ha demostrat que hi ha determinats productes bacterians que poden causar aquests efectes *in-vitro*. De fet hi ha algunes soques de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *P. aeruginosa* que produeixen glicoproteïnes, com les mucines. L'alteració d'aquesta activitat sembla ser important per explicar l'establiment d'una colonització crònica. La infecció bacteriana promou l'arribada de neutròfils a les vies aèries amb la posterior degranulació de diversos enzims, com l'elastasa que juntament amb els productes bacterians inhibeix l'activitat cilial i danya l'epiteli respiratori. Els bacteris i els seus productes tenen efectes potencialment perjudicials per a les cèl·lules epitelials del tracte respiratori. Aquest dany en les vies aèries principals de major diàmetre contribueix a la persistència bacteriana mentre que el dany en vies secundàries de menor diàmetre contribueix a la progressiva obstrucció. Els productes bacterians

alteren l'equilibri elastasa-antielastasa a nivell de pulmó, i contribueixen així a la destrucció de teixit pulmonar. A més, durant un procés de colonització, els bacteris estan en continu "turn-over", alliberant un seguit de proteïnes, lipooligosacàrids i peptidoglicans que facilita l'establiment d'una resposta inflamatòria crònica a les vies aèries.

#### 1.5.5.1.1. Paper dels bacteris

Aquest és un dels punts que està sent més àmpliament revisat ja que, tot i que s'accepta que tenen un rol principal en alguns processos, en d'altres es comportarien com a simples espectadors. Fins a un terç dels pacients MPOC en estat estable es troben colonitzats pels mateixos microorganismes que són aïllats durant les aguditzacions, en freqüències molt similars entre ambdues situacions [104,106].

Les accions dels microorganismes, fins i tot quan actuen com a colonitzadors, és que són capaços d'incrementar les secrecions mucoses i disminuir la freqüència del moviment ciliar, fet pel qual la neteja del moc es dificulta. A més, alguns microorganismes com *H. influenzae* són capaços de causar dany tissular directe o provocar amb la seva endotoxina un increment en l'expressió de citocines pro-inflamatòries com la IL-6, la IL-8 i el TNF- $\alpha$ , com a possible mecanisme de *upregulation* de la resposta inflamatòria. En alguns casos també s'ha pogut demostrar la producció d'anticossos específics contra els microorganismes aïllats durant una exacerbació, el que portaria al raonament que la resposta immune està dirigida contra aquest microorganisme i que per tant n'ha estat l'iniciador. El segon fet és que gràcies a mètodes de tipatge molecular s'ha pogut comprovar que les poblacions colonitzants pateixen *turnovers* periòdics sent la causa una reinfecció i és aquí on es creu que les bacteries podrien desencadenar la resposta inflamatòria que conduiria a una exacerbació, ja que cada nova població bacteriana presentaria un nou joc d'antígens de membrana als que el sistema immune reaccionaria per a lluitar-hi [107]. Tampoc s'han d'oblidar els possibles efectes pro-inflamatoris que les restes de membrana cel·lular de les bacteries lliades, com per exemple el LPS o compostos amb capacitat immunogènica, que poden augmentar així el nivell basal d'inflamació de l'epiteli pulmonar.

Des del punt de vista microbiològic s'estima que fins en un 50% dels casos d'exacerbacions s'aïlla algun microorganisme potencialment causal de la exacerbació,

sent els més freqüents *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* i amb menys freqüència en els pacients amb MPOC lleu, però si en major proporció en els més greus, bacils Gram negatius de tipus enterobactèria i *P. aeruginosa*. Aquesta modificació en la flora no se sap si és per la gravetat de la malaltia o pel seguit de tractaments antibiòtics que han rebut aquests pacients.

Els microorganismes anomenats “atípics” com *M. pneumoniae* i *C. pneumoniae* poden induir una resposta inflamatòria similar a la observada durant una infecció vírica i es va suggerir que podrien jugar un paper en les exacerbacions de la MPOC [108]. En el cas de *M. pneumoniae*, el seu possible paper en les exacerbacions és difícil de determinar donat que la seroprevalença en la població normal és del 75%. Això fa que l'estudi serològic no aporti molta informació i resti el dubte sobre si aquests microorganismes participen en l'exacerbació o són un simple observador [109].

#### **1.5.5.1.2. Paper dels virus**

El cultiu o la realització d'altres tècniques diagnòstiques d'infecció vírica (immunofluorescència, immunocromatografia, tècniques de biologia molecular) en aquest tipus de pacients no és una praxi àmpliament extesa en els laboratoris de microbiologia clínica per raons de cost-benefici. Clínicament un alt percentatge de pacients amb exacerbació presenta simptomatologia de vies altes, el que fa pensar en un paper important dels virus com a causa de les exacerbacions, si més no com a iniciadors [110,111]. La majoria d'exacerbacions es concentren a l'hivern, que és el període de major prevalença d'infeccions víriques al conjunt de la població, tot i que la vacunació antigripal disminueix el nombre d'exacerbacions.

Una infecció vírica cursa amb dany epitelial, disminuint la motilitat ciliar i promovent l'augment de la permeabilitat capil·lar, el que condueix a una hipersecreció de moc i a una disminució de la llum de la via aèria. Aquesta situació generada, també actua afavorint les infeccions bacterianes secundàries. Gràcies a tècniques de biologia molecular, s'ha pogut determinar en diversos estudis la presència de virus en aproximadament un 25% de les exacerbacions. Segurament el paper de les infeccions víriques seria el d'incrementar la resposta inflamatòria i afavorir infeccions secundàries oportunistes.



### **1.5.5.1.3. Paper de la pol·lució**

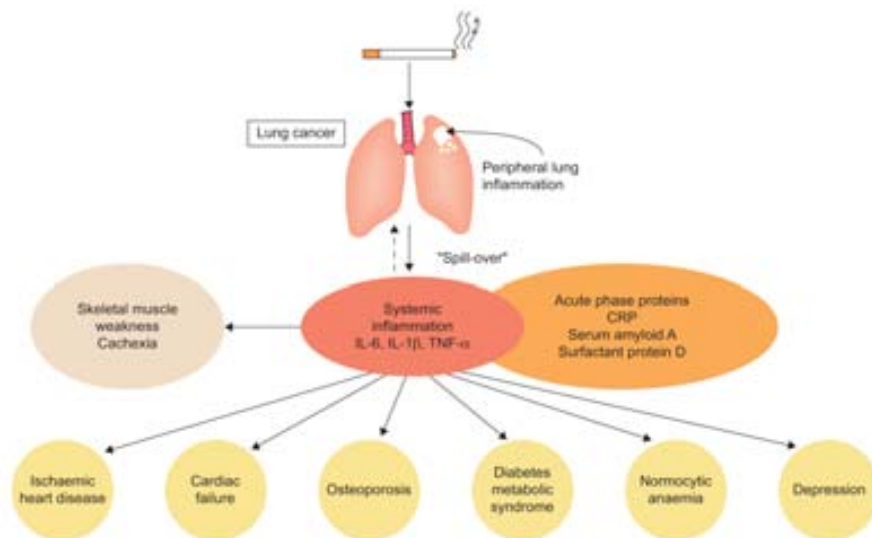
Aquest és un punt difícil de discernir degut a l'alta varietat de compostos contaminants i la diferència en els graus d'exposició [94]. En canvi, s'ha descrit que aquesta amalgama de compostos estimula factors de diferenciació de macròfags i granulòcits, així com la producció d'IL-8 que actuaria com a factor quimiotàctic per als neutròfils. De forma global la pol·lució ambiental genera una resposta de tipus al·lèrgic per increment de la inflamació sistèmica, el que comporta un major risc d'hospitalització per agudització.

### **1.5.5.1.4. Aspectes sistèmics**

Fins al moment hi ha dues teories que explicarien l'origen de l'estat basal de inflamació present en pacients amb MPOC: 1) alteració de l'equilibri dany/reparació del teixit pulmonar i 2) vessament de mediadors inflamatoris i productes de l'estrès oxidatiu des de la via aèria, el parènquima i la circulació pulmonar fins a circulació sistèmica. Més recentment també s'ha formulat la hipòtesi de que la presència d'una resposta adaptativa immunològica a epítops alterats és essencial en el procés patològic. El fum del tabac i la colonització bacteriana són font d'epítops i antígens que causarien la proliferació de cèl·lules B i T amb la conseqüent producció d'anticossos que mantindrien la inflamació i el procés autoinmunitari [112].

Existeix evidència que els pacients amb MPOC, especialment quan la malaltia és severa i durant les exacerbacions, presenten un augment de la inflamació sistèmica, mesurada com a increment de citocines circulants, quimiocines i proteïnes de fase aguda, així com presència d'anormalitats en les cèl·lules circulants [113]. Aquesta inflamació s'ha relacionat amb una major disminució de la funció pulmonar i amb un augment de mitjancers durant les exacerbacions [114-118].

Múltiples estudis evidencien la presència d'una disfunció multiorgànica, que comporta una gran comorbiditat i té una gran influència pronòstica més enllà de la pròpia afectació pulmonar [119] (Figura 9). També s'ha descrit afectació dels músculs perifèrics, anormalitats nutricionals, alteracions del sistema osteomuscular i presència d'anèmia i depressió.



**Figura 9.** Manifestacions sistèmiques i comorbilitats a MPOC.

De: Barnes et al. Eur Respir J 2009; 33: 1165-1185.

#### 1.5.5.2. Diagnòstic clínic de les exacerbacions

Degut a que la simptomatologia que es pot presentar durant les exacerbacions és variada i que cadascun dels símptomes presenta un pes específic, Anthonisen et al van definir uns criteris, segons els quals es distingeixen tres tipus d'exacerbació en funció de la simptomatologia [102]. Els criteris, anomenats d'Anthonisen són de gran utilitat diagnòstica, i també permeten classificar les exacerbacions. Es defineixen com a tipus 1: quan es presenten els tres símptomes majors, és a dir augment de la dispnea habitual, augment del volum d'esput i increment en la purulència; tipus 2: quan es presenta qualsevol combinació de 2 dels símptomes majors i tipus 3: quan es presenta un dels símptomes majors i algun dels símptomes menors propis d'infecció de les vies altes, com la tos i la rinorrea. No obstant, existeix una gran variabilitat quant a la percepció d'aquests canvis, fins i tot en l'estat de salut d'aquests malalts d'un dia per l'altre. Per intentar solucionar aquest problema, una comissió d'experts americans i europeus van proposar una definició de consens, que defineix les exacerbacions de la MPOC com un deteriorament sostingut de l'estat clínic del pacient que va més enllà de les variacions diàries habituals, que apareixen de forma aguda i precisen un canvi en la medicació del pacient [103].

### 1.5.5.3. Diagnòstic microbiològic de les exacerbacions

Els cultius d'esput poden ser en principi d'utilitat en els pacients amb esput purulent persistent en fase estable, per tal de caracteritzar la flora colonitzant. Durant l'exacerbació és necessària la recollida d'una mostra d'esput abans d'iniciar el tractament antibiòtic en aquells pacients en què es consideri la possibilitat de causa infecciosa, clàssicament *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis*, així com la possibilitat d'infecció per *P. aeruginosa* (exacerbacions freqüents o amb MPOC amb insuficiència respiratòria). No obstant, l'aïllament en l'esput d'un microorganisme potencialment patògen durant una exacerbació no es pot considerar la prova definitiva del seu paper etiològic, donat que s'ha demostrat que entre un 25-50% dels pacients amb MPOC estables poden estar colonitzats per bacteris potencialment patògens [104,106,120].

### 1.5.5.4. Bases del tractament de les exacerbacions

El tractament de les exacerbacions té tres eines principals: els broncodilatadors, els glucocorticoides i els antibiòtics. Els principals fàrmacs broncodilatadors són els  $\beta_2$ -agonistes de curta durada i els anticolinèrgics. Els corticoides inhalats són els principals agents anti-inflamatoris, tot i que la seva eficàcia és modesta i es reserven per a pacients greus amb exacerbacions freqüents. També s'aconsella l'administració dels corticoides orals en les exacerbacions de la MPOC greu i en els casos de MPOC lleu o moderada amb una evolució inicial desfavorable [121]. El tractament antibiòtic durant un episodi d'exacerbació, tot i que discutit, té com a principal objectiu, disminuir la càrrega bacteriana de les secrecions bronquials. De forma que, davant d'una exacerbació que cursa amb empitjorament de la clínica basal (tos, volum d'expectoració o dispnea) l'indicació de tractament antibiòtic està supeditada a la presència de purulència en l'esput o bé aparició de canvis en les característiques organolèptiques (color, viscositat, adherència) que tendeixen a estar associades a un augment de la purulència [122].

### 1.5.6. Pronòstic

Donat que actualment la MPOC es considera una malaltia multidimensional, diversos estudis han demostrat que existeixen altres factors, diferents del FEV<sub>1</sub>, que ajuden a entendre millor l'evolució dels pacients amb MPOC.

Juntament amb el curs natural que presenta la MPOC, en un elevat percentatge, apareixen malalties directament associades com serien la hipertensió pulmonar i el cor pulmonale [119,123]. Pel que fa a l'evolució i el pronòstic d'aquests pacients existeix un conjunt de factors que porten a un pitjor pronòstic a llarg termini com serien la insuficiència respiratòria crònica, amb hipoxèmia i hipercàpnia que sovint requereixen de oxigenoteràpia crònica domiciliària. La qualitat de vida d'aquests pacients pateix un constant deteriorament que pot arribar a una impossibilitat per a les tasques quotidianes, produint-se a més un empitjorament de la simptomatologia i de la gasometria, amb una disminució de la PO<sub>2</sub> i un augment de PCO<sub>2</sub> requerint hospitalitzacions freqüents en un elevat nombre de casos. La incidència de carcinoma bronquial és també més elevada.

Diverses variables han estat àmpliament validades com a factors pronòstics de morbiditat i mortalitat durant les exacerbacions de la MPOC [98,124,125]. Tot i l'interès epidemiològic, el valor predictiu dels paràmetres clínics varien segons l'estudi considerat, i la majoria no permeten una individualització del risc. L'índex BODE (índex de massa corporal [B], grau d'obstrucció mesurat mitjançant funció pulmonar [O], disnea [D] i capacitat d'exercici mesurada amb el test dels 6 minuts [E]) ha estat erigit en els últims anys com una eina útil per a la valoració del pronòstic a llarg termini dels pacients amb MPOC [126]. Tot i això, la determinació d'aquest índex és laboriosa, ja que requereix el test dels 6 min en moment d'estabilitat clínica i no és apte per realitzar-lo durant les exacerbacions. És per aquest motiu que hi ha un interès creixent en avaluar altres paràmetres, que inclourien els biomarcadors pulmonars i sistèmics [44,127,128].

## 1.6. Biomarcadors

### 1.6.1. Definició

Un biomarcador es defineix com un paràmetre que es mesura de forma objectiva, i actua com un indicador d'un procés biològic normal, un procés patològic o com a resposta farmacològica a una intervenció terapèutica [129]. En aquest sentit, en els darrers anys l'interès per determinar el comportament i funcions de determinats biomarcadors durant les infeccions, i més concretament aquelles d'origen respiratori ha augmentat [130-133]. Idealment un biomarcador hauria d'informar sobre l'evolució d'una malaltia i el seu pronòstic, així com diferenciar entre pacients amb malaltia activa i individus sans. També hauria de normalitzar-se amb el tractament correcte i predir de forma reproducible l'evolució. D'altra banda, la seva determinació en la pràctica diària ha de ser fiable i reproducible, amb poques variacions en les concentracions diàries, i la tècnica de determinació ha de resultar fàcil. Malauradament, cap dels biomarcadors analitzats en el camp de les infeccions respiratòries fins al moment compleix tots els requisits alhora. Tot i això existeixen nombrosos estudis avaluant la funció de diversos biomarcadors per al diagnòstic diferencial, definició de pronòstic, identificació de l'etiologia així com de la durada del tractament òptim i de la teràpia antibiòtica.

### 1.6.2. Descripció dels biomarcadors

A continuació es descriuen els biomarcadors més avaluats i utilitzats en l'àmbit de les infeccions respiratòries de vies baixes. Alguns d'ells estan associats a resposta inflamatòria enfront les infeccions i d'altres a mecanismes de regulació metabòlica i cardíaca. Recentment, s'ha introduït un nou terme anomenat "*hormokine*", que inclou aquells mitjançers que són produïts com a hormones de forma teixit-específica en individus no infectats, però que durant una infecció es produeixen en òrgans no endocrins i presenten un patró d'expressió, similar al de les citocines [134]. El procés per a la identificació d'alguns d'aquests biomarcadors és llarg i la majoria dels casos estan basats en estudis de proteòmica [135]. Inicialment es desenvolupa un model animal, després s'identifica l'expressió diferencial de proteïnes entre els dos grups d'estudi (per exemple: injecció de LPS vs grup control) i finalment es desenvolupen els assajos immunològics per a la detecció de les proteïnes d'interès. Les molècules candidates poden ser diverses, i inclouen enzims, proteïnes estructurals i hormones.

Un cop les tècniques que permeten la detecció de la molècula d'interés estan disponibles, és quan té lloc l'avaluació clínica.

### 1.6.2.1. Citocines

Les citocines, ja descrites a l'apartat de resposta immunitària innata, són glucoproteïnes de baix pes molecular que actuen com a transmissores d'informació. S'han establert quatre grups en base als seus efectes funcionals predominants: 1) les que s'originen en la resposta immune innata i tenen, en general, caràcter pro-inflamatori; 2) les que regulen la resposta immune adaptativa i indueixen activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits cap a cèl·lules efectores; 3) les que tenen propietats immunodepressores i 4) les que regulen l'hematopoiesi [136]. La classificació en citocines pro-inflamatòries i anti-inflamatòries és una simplificació, donat que sovint presenten les dues activitats. En general, però, les citocines considerades clàssicament pro-inflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18, i diverses quimiocines, entre elles la IL-8) són mitjanceres de la immunitat innata i les considerades anti-inflamatòries [IL-10, IL-4, IL-13, IL-6, *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  i G-CSF] són mitjanceres de la immunitat adaptativa. La mesura de citocines en plasma és difícil, tot i que les tècniques d'immunoanàlisi són molt senzilles, però la seva vida mitja en plasma és curta, i la presència de factors bloquejants (receptors solubles de interleucines) pot falsejar-ne la mesura. La majoria dels immunoassajos, però, poden detectar mitjancers circulants però no aquells que es troben units a cèl·lules o receptors. De fet, la producció compartimentalitzada correspon a la major quantitat de citocines secretades, i no pas les circulants [137]. A més, són molt poc estables *in vivo* i *ex vivo*, dificultant les tècniques de determinació, a diferència del que succeeix per les proteïnes de fase aguda, que són més estables, tenen una vida mitja més llarga i les tècniques de determinació són més reproduïbles. Alguns estudis també mesuren citocines en mostres d'esput i BAL, però els resultats són variables.

### 1.6.2.2. Proteïna C- reactiva (PCR)

Es tracta d'una proteïna de fase aguda, sintetitzada pels hepatòcits estimulada principalment per la IL-6, IL-1 $\beta$ , i TNF- $\alpha$ , en resposta a una infecció o presència de teixit inflamat. El seu mecanisme d'acció és la unió a la fosfocolina [138], exposada als components fosfolipídics de cèl·lules danyades, així com a la membrana dels bacteris,

amb la funció d'opsonització i activació del complement. La PCR i el *Serum amyloid P* (SAP) són els dos membres de la família de les pentraxines que circulen en sèrum [139]. Com a funcions biològiques, és una opsonina mitjancera de fagocitosi, activa la via clàssica del complement a través de C3, i augmenta la producció de citocines a càrrec dels monòcits [140]. És un marcador molt sensible d'inflamació, que s'ha utilitzat àmpliament en diverses situacions clíniques, incloent les infeccions del tracte respiratori inferior [141,142]. La PCR augmenta en la resposta inflamatòria aguda, incloent infeccions víriques i infeccions bacterianes localitzades, essent el paràmetre més útil en aquests casos, així com en inflamacions cròniques, com l'artritis reumatoide, utilitzant-se com a marcador d'activitat. Les tècniques de determinació són molt senzilles però la seva vida mitja és llarga, i pot mantenir-se elevada fins i tot dies després de finalitzat el procés inflamatori, presentant limitacions per a la monitorització terapèutica i pronòstica a curt termini. Actualment existeixen diverses tècniques per a la determinació de PCR, i fins i tot els assajos s'han classificat en PCR convencional, *high sensitivity* PCR i *cardiac* PCR, en funció del camp d'aplicació [143].

#### **1.6.2.3. Neopterina**

La neopterina és una 2-amino-4-OH-pteridina. Se sintetitza als monòcits/macròfags així com a les cèl·lules dendrítiques en resposta a l'interferó gamma, que és secretat pels limfòcits T i actua com a mitjancer de la immunitat cel·lular [144-146]. Les concentracions de neopterina reflexen el grau d'activació de les cèl·lules Th1. Nivells elevats de neopterina en fluids biològics, com sèrum i orina s'han associat amb trastorns que involucren la immunitat cel·lular. Destacarien les infeccions virals, intracel·lulars o parasitàries, les malalties autoimmunitàries, algunes neoplàsies, el rebuig de trasplantament, malaltia coronària i desordres neurològics [147-150].

#### **1.6.2.4. Lypopolysaccharide binding protein (LBP)**

La LBP és una proteïna de 58 kD produïda al fetge [151]. Després del primer contacte del bacteri amb les cèl·lules immunitàries, el LPS s'allibera de la membrana bacteriana. La LBP, que en principi és sempre present al torrent sanguini, es fixa al LPS amb gran afinitat i n'actua com a proteïna transportadora cap a cèl·lules immunoefectores que exposin el receptor CD14 a la seva superfície. El complex LBP-LPS és capaç d'activar específicament els monòcits i macròfags mitjançant el receptor

CD14. Tot plegat condueix a l'alliberament de citocines pro-inflamatòries, que regulen l'activació de la resposta immunitària. A més, les citocines indueixen la producció de les proteïnes de fase aguda, augmentant-ne la producció de LBP.

#### **1.6.2.5. Amiloide A del sèrum (SAA)**

SAA es va identificar inicialment com una proteïna circulant que reaccionava amb anticossos contra el pèptid constituent de la fibril·la amiloide A [152]. Es considera que SAA és la proteïna precursora circulant de la proteïna amiloide A que es troba als dipòsits d'amiloide. És una proteïna de 104 aminoàcids i té un pes molecular de 12kD. La SAA es produeix al fetge com a proteïna de fase aguda en resposta a citocines proinflamatòries, però també s'ha descrit la seva expressió en teixits extrahepàtics, i està sotmesa a diversos mecanismes de regulació [153]. Exerceix funcions en el metabolisme de les lipoproteïnes d'alta densitat, actuant com a apoproteïna i intervenint en la unió i neutralització del LPS, així com activitats immunomodadores, tals com inhibició del metabolisme oxidatiu, i inducció de mecanismes d'adhesió i quimiotaxi. Es considera que durant les infeccions localitzades, SAA és produïda per cèl·lules epitelials amb la funció de neutralitzar el LPS i altres productes bacterians hidrofòbics; durant la inflamació sistèmica, és produïda al fetge i s'allibera a la circulació com a proteïna de fase aguda.

#### **1.6.2.6. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)**

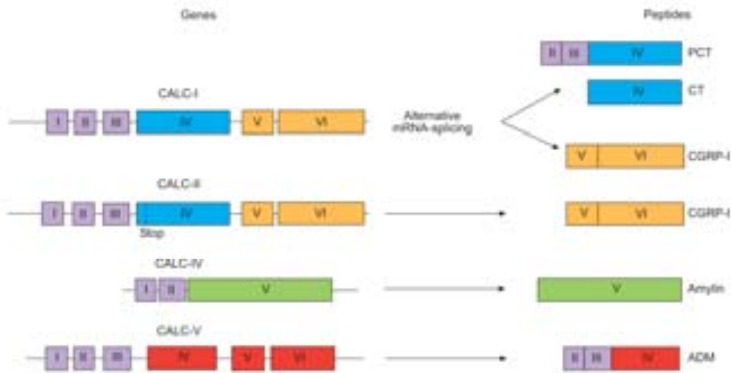
El TREM-1 és un membre de la superfamília de les immunoglobulines. La seva expressió per part de les cèl·lules fagocítiques es veu incrementada durant la presència de infeccions bacterianes i fúngiques [154,155]. Una forma soluble del TREM-1 (sTREM-1) es alliberada per part dels fagòcits activats i es pot detectar en diversos fluids biològics, com serien el RBA i el sèrum.

#### **1.6.2.7. Procalcitonina (PCT)**

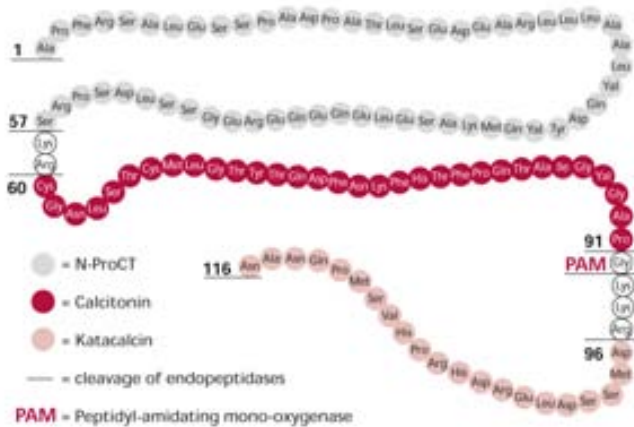
La PCT és un pèptid de 116 aminoàcids, precursor de la calcitonina. Està codificat al gen *CALC-I*, situat al cromosoma 11, que dona lloc, per *splicing* alternatiu, al *Calcitonin gene related peptide* (CGRP) a cèl·lules del sistema nerviós central, i a la



pre-pro-calcitonina a les cèl·lules C del teixit tiroïdal (Figura 10). La PCT secretada és ràpidament clivada per dipeptidases en un pèptid de 114 aminoàcids i, posteriorment, dóna lloc a la calcitonina hormonalment activa (38 aminoàcids), el carboxipèptid de la calcitonina, també anomenat katacalcina (21 aminoàcids) i el segment N-terminal o aminoprocacitonina (57 aminoàcids) (Figura 11).



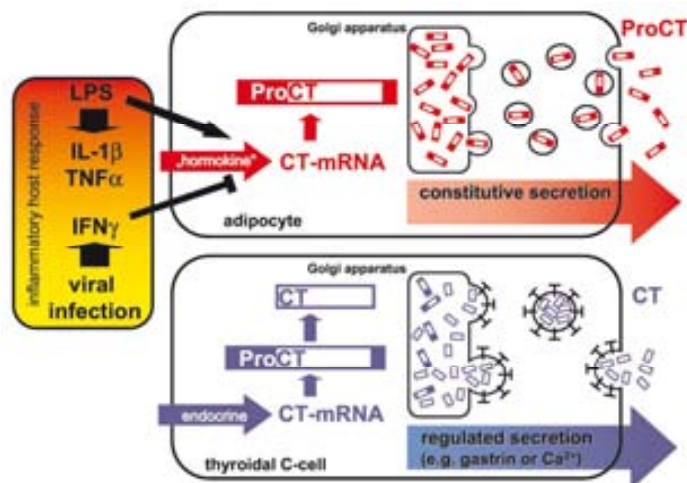
**Figura 10.** Gens CALC i pèptids de la família de calcitonina. De: Muller et al. Eur Respir J 2007; 30: 556-573.



**Figura 11.** Esquema de la seqüència aminoacídica de la PCT. De: Meisner M. Procalcitonin (PCT). A new innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag Eds. Stuttgart-New York. 2000.

En condicions normals se sintetitza a les cèl·lules C de la glàndula tiroïdes i cèl·lules neuroendocrines de pulmó i intestí. L'hormona madura s'emmagatzema en grànuls secretors i s'allibera de forma regulada [156]. Si més no, durant les infeccions severes,

és capaç de sintetitzar-se a teixits extratiroidals, fonamentalment a cèl·lules parenquimatoses sense grànuls secretors, de forma que la PCT és secretada de forma constitutiva, no regulada [157] (Figura 12).

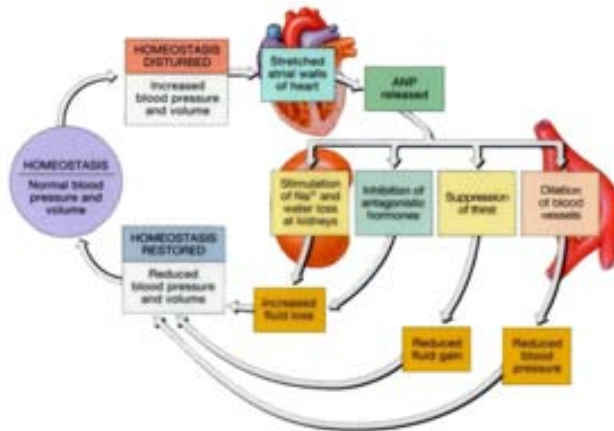


**Figura 12.** Expressió diferencial del gen CALC I en adipòcits i cèl·lules C de la glàndula tiroide. De: Linscheid et al. *Endocrinology* 2003; 144: 5578-5584

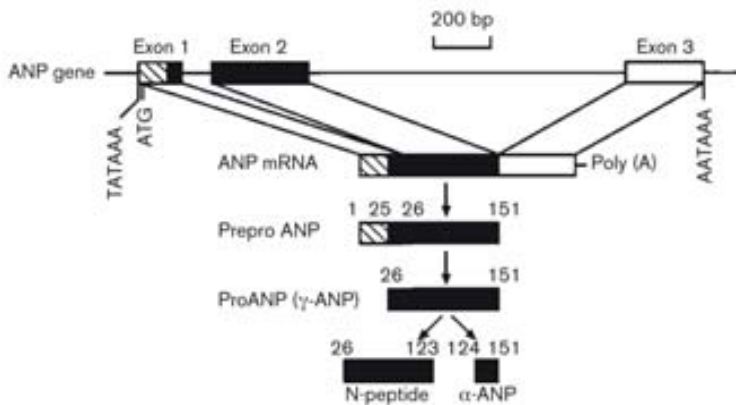
### 1.6.2.8. Pèptids natriurètics

El pèptid natriurètic atrial (ANP), és un dels membres de la família dels pèptids natriurètics que també inclou el *brain natriuretic peptide* (BNP) i el *C-type natriuretic peptide* [158]. L'ANP es sintetitza als cardiomiòcits atrials i juga un paper important en l'homeòstasi de sals i fluids de l'organisme [159-161]. Les funcions principals són regular els processos renals, humoral i cardiovasculars. La regulació de la biosíntesi i la secreció de l'ANP involucra diversos mecanismes encarregats de controlar la pressió sanguínia sistèmica i l'homeòstasi dels electròlits [160]. Diverses hormones i neurotransmissors, com l'endotelina-1 (ET-1), l'arginina vasopressina (AVP) i les catecolamines estimulen directament la secreció d'ANP, però l'estímul dominant per l'alliberament d'ANP al torrent circulatori és l'augment de volum intravascular. L'ANP alliberat actua a diferents nivells: els ronyons, els vasos sanguinis, el cervell i les glàndules adrenals produint efectes diurètics, natriurètics i vasorelaxants (Figura 13). El seu precursor, el proANP s'escindeix amb el mateix ratio molar, en dos fragments: l'extrem N-terminal i l'ANP, biològicament actiu (Figura 14). L'extrem del proANP té una vida mitja més llarga que l'ANP madur i per tant s'ha proposat com un analític més

estable per a la determinació *in vitro* de la concentració d'ANP. La regió proANP<sub>53-90</sub> es coneix també com a *mid-regional* proANP (MR-proANP) [162].



**Figura 13.** Mecanismes d'acció de l'ANP. De: Frederic H Martini. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 4th ed. Prentice Hall College Div.



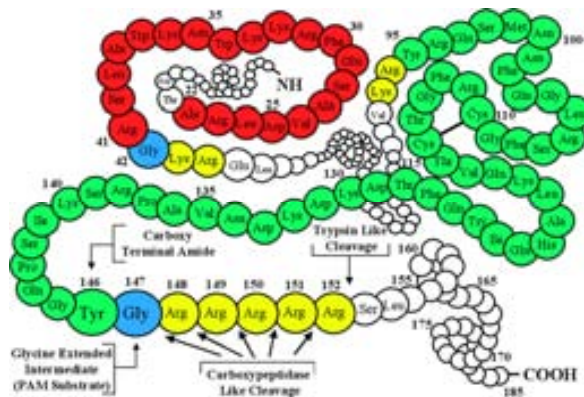
**Figura 14.** Estructura del gen i via de síntesi de l'ANP. De: Rubattu et al. J Hypertens 2001; 19:1923-1931.

Un altre membre de la família dels pèptids natriurètics és el BNP, i es sintetiza principalment als ventricles, i particularment en pacients amb malalties d'origen cardíac crònic [163]. Les seves funcions principals serien regular processos fisiològics, com serien la natriuresi, la diuresi i la vasodilatació [161]. Els estímuls principals per a la seva secreció serien l'augment de volum ventricular i de la pressió cardíaca, l'hipòxia i la presència de citocines pro-inflamatòries [164]. Deriva d'un precursor (pre-proBNP)

de 134 aminoàcids que inclou un pèptid senyal de 26 aminoàcids. Un cop s'ha escindit el pèptid senyal, la molècula de proBNP encara ha de patir una nova escissió per donar lloc finalment a la hormona biològicament activa (BNP) i a un fragment N-terminal, anomenat NT-proBNP.

#### 1.6.2.9. Adrenomedulina (ADM)

El gen que codifica per l'ADM es troba al cromosoma 11, i s'anomena CALC-V. Es un altre membre de la família del gen CALC, d'on també prové la PCT (Figura 10). Codifica per una preprohormona de 185 aminoàcids, que en perdre el pèptid senyal de 21 aminoàcids situat al extrem N-terminal, dona lloc a la proADM. Aquesta, després d'un seguit de modificacions post-traduccionals dona lloc a dos pèptids amb activitat biològica: la ADM amb 55 aminoàcids i el pèptid amino-terminal de la ADM anomenat PAMP (Figura 15). A l'any 2004, un tercer fragment derivat de la proADM (proADM 45-92) es va identificar en pacients sèptics [165]. La determinació dels nivells de ADM és difícil, donat que s'elimina ràpidament de la circulació. Donat que el fragment proADM 45-92 es produeix de forma estequiomètrica, i és més estable que la ADM, els assajos desenvolupats detecten el fragment anomenat *mid regional* d'aquesta molècula (MR-proADM) [166].



**Figura 15.** Representació esquemàtica de la preprohormona de la ADM. En vermell i verd es mostren PAMP i ADM, respectivament. De: Zudaire et al. *J Leukoc Biol* 2006; 80:237-244.

En condicions normal, el gen de la ADM s'expressa a múltiples òrgans i teixits, incloent el cor, pulmó, tracte digestiu, genitourinari i sistema nerviós central. Es tracta d'un dels agents vasodilatadors més potents, però també presenta propietats metabòliques i

immuno-moduladores [167,168]. L'expressió i acumulació de ADM a diferents epitelis (pell, pulmó, tracte digestiu) i fluids biològics (plasma, suor, saliva), elements importants en la primera línia de defensa de la immunitat innata també ha suggerit una possible funció com a agent antimicrobià i bactericida [157,168-171]. A més també s'ha suggerit una possible implicació en la cascada del complement, ja que la ADM és capaç d'interactuar amb el factor H del complement [172].

#### 1.6.2.10. Arginina vasopressina (AVP)

La AVP, també coneguda com l'hormona antidiurètica és un pèptid hormonal amb efectes osmoreguladors, hemodinàmics, endocrins i neuronals [173]. Se sintetitza a les neurones del hipotàlem, s'emmagatzema a la glàndula pituïtària i se secreta en resposta a estímuls hemodinàmics i osmòtics. Regula principalment l'homeòstasi i el sistema cardiovascular, de manera que en condicions infeccioses, hipòxiques ó d'hipotensió, la seva producció es veu incrementada. La vasopressina deriva d'un pèptid precursor, juntament amb dos altres pèptids, la neurofisiina II i la copeptina, també anomenada CT-proAVP, alliberats amb el mateix *ratio* (Figura 16). Donat que la vasopressina és inestable *in vivo* i *ex vivo*, i es troba fortament unida a les plaquetes, l'alternativa és determinar la concentració de copeptina, més estable *ex vivo* i que reflexa directament la concentració de vasopressina [174].



**Figura 16.** Representació esquemàtica del precursor de l'arginina vasopressina.

De: Morgenthaler et al. Trends Endocrinol Metab 2007; 19: 43-49.

#### 1.6.2.11. Endotelina-1 (ET-1)

L'endotelina-1, és el membre més abundant de la família de les endotelines, que inclou la ET-1, ET-2 i ET-3. Es tracta d'un pèptid de 21 aminoàcids que deriva principalment de les cèl·lules endotelials vasculares i actua seguint un patró autocrí i/o paracrí [175]. Es considera que la ET-1 juga un paper fisiopatològic molt important en el desenvolupament de desordres cardiovasculars, tals com la insuficiència cardíaca, la hipertensió pulmonar i la insuficiència renal, així com durant la sèpsia [176]. També

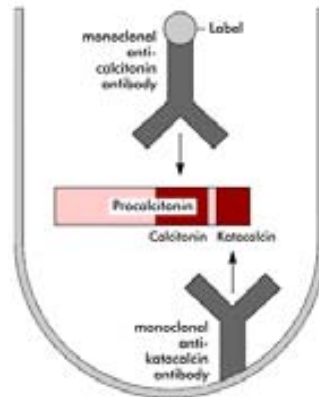
s'ha descrit un efecte pro-inflamatori important, actuant com a factor quimiotàctic i *up-regulator* d'altres mediadors inflamatoris [177]. Es difícil de mesurar i detectar donada la seva inestabilitat i la seva unió a receptors i proteïnes plasmàtiques. Per solucionar aquest problema, s'ha desenvolupat un assaig que detecta el seu precursor, anomenat proET-1, que és més estable [178].

### 1.6.3. Tècniques de determinació dels marcadors d'inflamació

Actualment es diposa de nombrosos i diferents mètodes immunològics per a la detecció de biomarcadors sistèmics en mostres de plasma i/o sèrum. Ens centrarem en els biomarcadors i les tècniques avaluades en aquesta Tesi.

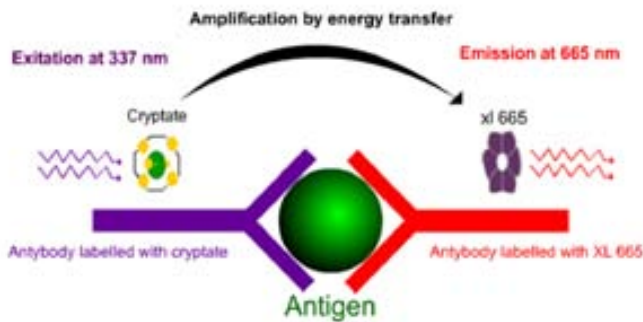
En el cas de la PCT, que té una vida mitja de 25-30 hores i és una molècula molt estable *in vivo* i *ex vivo*, la seva determinació es pot realitzar en mostres de sèrum o plasma mitjançant tècniques senzilles. Les tècniques de determinació per la PCT estan protegides per patents propietat de BRAHMS Thermo Fisher Scientific (Hennigsdorf, Alemanya). Actualment existeixen, diverses tècniques de determinació, que poden ser manuals i automatitzades. BRAHMS Thermo Fisher Scientific disposa de quatre immunoassajos diferents per a la determinació quantitativa de PCT i d'un test semiquantitatiu ICT [179]. Per tal de millorar aquest últim assaig ICT, s'està desenvolupant un nou assaig que es pot realitzar directament en mostra de sang i presenta un límit de detecció més sensible, tot mantenint-ne l'especificitat.

La **tècnica immunoluminomètrica** (PCT LIA, PCT sensitive LIA, BRAHMS Thermo Fisher Scientific) permet la determinació quantitativa de la concentració de PCT en mostra de sèrum i plasma. Es tracta d'una reacció enzimàtica tipus *sandwich*, que consta d'una fase sòlida que duu fixat un anticòs monoclonal contra el fragment katacalcina de la PCT, on s'afegeix la mostra de sèrum i, posteriorment, anticossos monoclonals contra el fragment calcitonina marcats amb un derivat d'acridina (Figura 17). Es realitza una incubació d'una hora i, posteriorment, es realitzen rentats successius i, a continuació, lectura de les mostres, estàndards i controls mitjançant un luminòmetre, que permet mesurar les unitats relatives de llum (RLUs), que són directament proporcionals a les concentracions de PCT a la mostra, un cop extrapolats els valors a la corba d'estàndards.



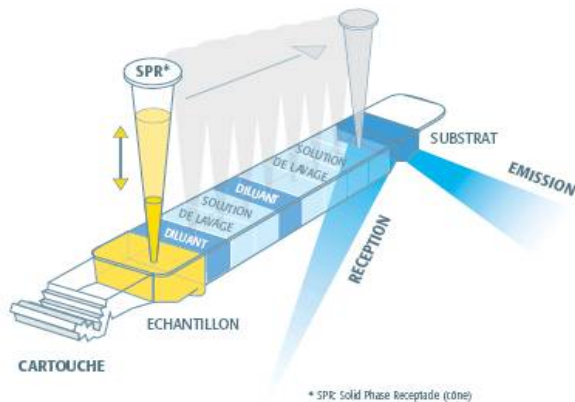
**Figura 17.** Esquema del mètode immunoluminomètric per a la determinació de procalcitonina en mostres de sèrum. De: Meisner, M. Procalcitonin (PCT). A new innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag Eds. Stuttgart-New York 2000.

La **tècnica immunofluorescent** automatitzada (KRYPTOR, BRAHMS Thermo Fisher Scientific) està basada en la tecnologia *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE®) (Figura 18). Amb aquesta tècnica s'han realitzat les determinacions de PCT, PCR, MR-proANP i MR-proADM, respectivament. Consisteix en la transferència no radiant d'energia des d'un donant (criptat) fins un acceptant (XL665), ambdós marcats fluorescentment. En funció del biomarcador que es vol detectar els anticossos policlonals i monoclonals, estaran units a fragments propis de la molècula d'interès. El kit consta d'anticossos policlonals que es troben conjugats amb criptat, i anticossos monoclonals conjugats amb XL 665. Les molècules a detectar en la mostra s'inserten entre els anticossos formant un immunocomplexe. Quan la mostra a mesurar és excitada, el criptat emet un senyal fluorescent de vida llarga a 620 nm, mentre que el XL665 emet un senyal de vida curta a 665 nm. Quan ambdós components es troben units a un immunocomplexe, a 665 nm s'amplifica el senyal de la fluorescència emesa pel criptat com a donant pel fet d'estar proper a l'acceptant (XL665). Aquest senyal de vida llarga emès per l'immunocomplexe és proporcional a la concentració de biomarcador present a la mostra. El volum requerit i el temps d'incubació varia en funció de l'anàlit considerat, però es sol situar entre 50-100 µL i 20-30 minuts d'incubació.



**Figura 18.** Fonament de la tecnologia TRACE. De: [www.kryptor.net](http://www.kryptor.net)

L'altra tècnica immunofluorescent automatitzada per a la detecció de PCT està basada en la tecnologia *Enzyme-linked fluorescent assay* (ELFA), i és també coneguda com ELISA amb lectura final en fluorescència blava (Figura 19) (VIDAS, Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France). Aquest sistema es coneix com a "load and go" i consta de dos elements clau: una punta, que actua com a fase sòlida, i un cartutx que conté tots els reactius necessaris per a realitzar la determinació. El volum de mostra requerit es de 200 µL i el temps d'inclubació són 20 minuts.



**Figura 19.** Fonament de la tècnica ELFA. De: [www.procalcitonin.net](http://www.procalcitonin.net)

Altres equips preparats per a la determinació de PCT serien LIAISON (Diasorin, USA) ADVIA centaur (Siemens, Alemanya), ELECSYS (Roche, Suïssa).



Per a la detecció de neopterina s'ha utilitzat una **tècnica d'enzimoimmunoassaig** (Neopterin ELISA, IBL Hamburg). Es tracta d'un ELISA competitiu que es basa en la competició entre antígens (neopterina) conjugats i no conjugats per un nombre determinat de llocs d'unió de l'anticòs (anti-neopterina de conill). L'assaig utilitza pouets de *microtiter* marcats amb anticòs de cabra anti-conill en què la mostra de sèrum o orina, que presuntament conté neopterina, s'incuba amb neopterina conjugada amb peroxidasa i antisèrum de conill anti-neopterina durant 90 minuts. Els complexos anticòs-antigen conjugat amb peroxidasa s'uneixen als pouets i l'antigen no unit s'elimina per rentats. A continuació s'afegeix substrat i s'atura la reacció en 10 minuts mitjançant l'addició de solució de parada. Finalment, es mesura la densitat òptica a 450 nm mitjançant un lector d'ELISA. Donat que es tracta d'un ELISA competitiu, la densitat òptica obtinguda és inversament proporcional a la concentració de neopterina present a la mostra, calculada en relació a una corba d'estàndards.





**JUSTIFICACIÓ**



## 2. JUSTIFICACIÓ

Les infeccions d'origen respiratori són les més prevalents i amb majors taxes de morbiditat i mortalitat. En concret, les infeccions del tracte respiratori superior són freqüentment d'origen víric i poc severes, mentre que les del tracte respiratori inferior estan més associades a un origen bacterià i tendeixen a ser més severes. De les síndromes clíniques més freqüentment associades a hospitalització i morbimortalitat en destaquem les pneumònies adquirides a la comunitat (PAC) i les exacerbacions de la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC).

Específicament en el maneig de les PAC, un diagnòstic precoç i una valoració del grau de severitat és de gran importància, donat que ambdós guien les decisions terapèutiques referents al tractament apropiat, així com a la necessitat d'ingrés hospitalari. S'han descrit i validat diversos *risk scores* però la majoria no mesuren el grau de severitat de la malaltia, sinó el risc de mort, que es veu altament influenciat per l'edat i per la presència de malalties coexistents. Es tracta d'eines útils per valorar el risc de mort i la necessitat d'ingressar en el moment de l'admissió, però no són capaços de predir un mal pronòstic un cop el tractament s'ha iniciat ni tampoc permeten valorar la necessitat d'intervencions ó canvis en la teràpia.

D'altra banda, la MPOC és la malaltia respiratòria de major prevalença i impacte socioeconòmic, representant en el nostre àmbit la quarta causa de mortalitat. La MPOC té un curs crònic i progressiu que alterna fases d'estabilitat clínica amb episodis aguts d'exacerbació. El diagnòstic de les exacerbacions és fonamentalment clínic, i es basa en la presència de determinats símptomes. Tot i que l'estudi microbiològic de l'espüt amb tinció de Gram i cultiu està sobretot indicat en pacients greus o que han patit fracassos terapèutics previs, l'aïllament de microorganismes potencialment patògens en mostres d'espüt causants d'exacerbacions presenta gran controvèrsia, sent un dels aspectes més discutits la possible contaminació per flora orofaríngia.

Les exacerbacions són episodis importants en la història natural de la MPOC, afectant la seva progressió i el seu pronòstic. Diverses característiques clíniques han estat àmpliament validades com a factors pronòstics de mortalitat i morbiditat en les exacerbacions de la MPOC. Però, tot i l'interès des del punt de vista epidemiològic, el valor predictiu d'aquests paràmetres clínics varia en funció dels estudis considerats, i la majoria d'ells no permeten fer una valoració individual del risc.

En els darrers anys, diversos biomarcadors han guanyat importància en l'àmbit de les infeccions. Un biomarcador, es defineix com un paràmetre que es mesura de forma objectiva, i actua com un indicador d'un procés biològic normal, un procés patogènic o com a resposta farmacològica a una intervenció terapèutica. Marcadors sistèmics com la PCR, la neopterina i més recentment alguns precursors hormonals i pèptids amb funcions de regulació metabòlica i del sistema cardiovascular, s'han avaluat per al diagnòstic i pronòstic de determinades infeccions de forma complementària als paràmetres clínics i microbiològics. Dins d'aquest últim grup de nous biomarcadors, en destacaríem la PCT, el MR-proANP i la MR-proADM.

Per tal de poder determinar la concentració dels biomarcadors d'interès s'han desenvolupat diferents assajos immunològics basats en la reacció antígen-anticòs. Principalment, aquestes tècniques han de ser ràpides i els límits de detecció, així com els valors de sensibilitat i especificitat han d'estar en acord amb la síndrome clínica d'interès. En el cas concret de la PCT, s'està desenvolupant un nou assaig immunocromatogràfic més sensible, que ha de permetre de forma ràpida i fàcil detectar la concentració PCT en mostra de sang total. Aquest fet té especial importància donat que durant les infeccions respiratòries, els nivells tot i ser elevats, es troben en un rang més estret de concentracions en comparació amb els valors observats durant les infeccions bacterianes sistèmiques.

El fet de disposar de marcadors biològics de fàcil determinació en sèrum i plasma que permetés establir d'una manera precoç la possible etiologia, i d'alguna manera reflexar el grau de resposta del hostatger, permetria racionalitzar el tractament i monitoritzar la resposta al tractament. A més, donat que els biomarcadors són mediadors de processos fisiològics, la seva determinació també podria ser utilitzada com a factor pronòstic.

Amb l'objectiu d'estudiar aspectes de la resposta de l'hostatger front la infecció des del punt de vista de l'etiologia i del pronòstic, en aquesta Tesi s'estudia la utilitat dels biomarcadors en el maneig de les infeccions d'origen respiratori, en concret les PAC i les exacerbacions de la MPOC. D'altra banda també s'estudia la importància de les tècniques de determinació dels biomarcadors en el context de les infeccions respiratòries.



**OBJECTIUS**





### 3. OBJECTIUS

1. Avaluar la influència de factors intrínsecs i extrínsecs en la concentració de biomarcadors.

1.1. Estudiar si la secreció de biomarcadors es veu afectada per la presència de malalties coexistents.

1.2. Estudiar si el tractament previ amb corticosteroids i antibiòtics influeix els nivells de biomarcadors.

2. Determinar si existeixen diferències en els nivells de biomarcadors en funció de l'agent etiològic.

2.1. Determinar si durant les pneumònies existeixen diferències en els nivells de biomarcadors en funció de l'agent etiològic involucrat.

2.2. Determinar si durant les exacerbacions de la MPOC, els biomarcadors permeten identificar els episodis de probable origen infecció, correlacionant-los amb els criteris d'Anthonisen i la presència de símptomes d'infecció respiratòria.

3. Determinar si existeixen diferències en els nivells de biomarcadors en funció de la severitat.

3.1. Estudiar si en pacients amb pneumònia, els nivells de biomarcadors correlacionen amb els índexs de severitat, la presència de bacterièmia, així com amb el posterior desenvolupament de complicacions.

3.2. Establir si les determinacions seriades en les pneumònies correlacionen amb l'evolució clínica.

3.3. Determinar si en pacients amb MPOC existeixen diferències en els biomarcadors en funció de l'estat clínic (estabilitat o exacerbació).

3.4. Valorar si els biomarcadors permeten monitoritzar l'evolució i pronòstic després d'un episodi d'exacerbació de la MPOC.

4. Estudiar l'impacte dels avenços metodològics en les tècniques de determinació de biomarcadors.

4.1. Determinar la importància de la tècnica en l'àmbit de les infeccions respiratòries.

4.2. Estandarització i validació d'una nova tècnica immunocromatogràfica.





**RESULTATS**



## 4. RESULTATS

### 4.1. Article 1

#### **Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia.**

Cristina Prat, Alicia Lacoma, Josep Dominguez, Jana Papassotiropou, Nils G Morgenthaler, Felipe Andreo, Pere Tudela, Juan Ruiz-Manzano, Vicente Ausina.

Journal of Infection. 2007; 55: 400-407.

En els darrers anys en l'àmbit de les pneumònies, la determinació de biomarcadors sistèmics ha demostrat ser una eina complementària al diagnòstic clínic i microbiològic. En aquest sentit, en aquest treball, hem avaluat un nou biomarcador, anomenat MR-proANP.

La població d'estudi van ser 300 pacients adults amb diagnòstic clínic i radiològic de pneumònia, que van ser admesos al Servei d'Urgències. Els pacients es van estratificar en funció del PSI, el CURB-65 i el desenvolupament de complicacions, definides com a insuficiència respiratòria/ xoc, progressió clínica i radiològica, empiema, admissió a UCI i decés. En el moment de l'ingrés hospitalari es van recollir mostres de sèrum i mostres adequades per als estudis microbiològics.

La troballa principal del treball va ser que els nivells de MR-proANP s'incrementen de forma significativa amb la severitat de la pneumònia, valorada segons els índexs: PSI i CURB-65. Quant a la PCT, només va mostrar diferències significatives al comparar els pacients PSI I vs V i II vs V. Tot i que els nivells de MR-proANP estan més elevats en pacients amb insuficiència cardíaca i renal, l'associació amb la severitat de la pneumònia no es veu afectada per la presència d'aquestes malalties coexistents. Els nivells també es van mostrar superiors en aquells pacients que van desenvolupar algun tipus de complicació, incloent-hi els que van morir. Quant a l'etiologia i l'extensió radiològica, els nivells de MR-proANP no van mostrar cap associació significativa, a diferència del que succeïa per la PCT. Per tal de discriminar els pacients en funció del risc (PSI I-III vs IV-V), es va establir un punt de tall de 139.7 pmol/L, amb una sensibilitat i especificitat del 65.5% i 73.7%, respectivament. Els nostres resultats mostren que la determinació dels nivells de MR-proANP pot ser útil per a la valoració del risc i el pronòstic dels pacients amb pneumònia.





## Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia<sup>☆</sup>

Cristina Prat<sup>a,d,e,\*</sup>, Alicia Lacoma<sup>a,d</sup>, Josep Dominguez<sup>a,d,e</sup>,  
Jana Papassotiriou<sup>f</sup>, Nils G. Morgenthaler<sup>f</sup>, Felipe Andreo<sup>b,d,e</sup>,  
Pere Tudela<sup>c</sup>, Juan Ruiz-Manzano<sup>b,d,e</sup>, Vicente Ausina<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>b</sup> Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>c</sup> Servei d'Urgències, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>d</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain

<sup>e</sup> Ciber Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>f</sup> Research Department, BRAHMS AG, Biotechnology Center, Hennigsdorf/Berlin, Germany

Accepted 19 July 2007

Available online 10 September 2007

### KEYWORDS

MR-proANP;  
Pneumonia;  
Pneumonia Severity  
Index;  
CURB-65;  
Complications

**Summary Objective:** To evaluate the usefulness of midregional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) measurement in the stratification of severity in community-acquired pneumonia. **Methods:** The population studied was three hundred patients admitted to Emergency Department of a tertiary university hospital presenting clinical signs of lower respiratory tract infection, a new infiltrate on the chest radiograph and a confirmed pneumonia by clinical evolution. Patients were stratified by the Pneumonia Severity Index (PSI), by CURB-65 score and by the development of complications. Serum samples were obtained at the moment of admission and prior to antibiotic therapy, and stored until analysis. MR-proANP was measured by B · R · A · H · M · S MR-proANP KRYPTOR.

**Results:** Serum levels of MR-proANP increased with the severity of pneumonia, according to PSI score and CURB-65 score. Median MR-proANP levels were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in patients with high PSI risk class (IV–V) than in those with low PSI risk class (I–III). MR-proANP levels were also significantly higher ( $p = 0.029$ ) in those patients that developed complications or died. There was no association between MR-proANP and etiology of pneumonia and the radiographic extent.

**Conclusion:** We can conclude that MR-proANP measurement was helpful for individual risk assessment in patients with pneumonia admitted to the emergency department.

© 2007 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<sup>☆</sup> An abstract with part of the results of the present study has been presented (abstract number 1596) in the congress of the American Thoracic Society, that took place in May 2007 in San Francisco, USA.

\* Corresponding author at: Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain.

E-mail address: cprat.germantrias@gencat.net (C. Prat).

## Introduction

Morbidity and mortality associated with pneumonia is still very high despite appropriate antibiotic therapy and the development of new diagnostic methods. In the management of community-acquired pneumonia (CAP) early diagnosis and assessment of the severity of the disease is of obvious importance, guiding therapeutic options and the initial site of care decision (home or hospital/intensive care unit). Several prognostic scores have been developed but most of them do not measure the severity of the disease but the risk of death, which is greatly influenced by age and the presence of coexisting illnesses.<sup>1</sup> The Pneumonia Severity Index (PSI)<sup>1</sup> or the CURB-65 score (*confusion, urea, respiratory rate, blood pressure and age*)<sup>2</sup> are valuable tools to assess the risk of worse outcome but are not able to predict outcome once the treatment has been initiated and do not allow to assess the need for further interventions and therapy changes. Another disadvantage of most scoring systems is that they are complex, and their calculation is time-consuming (e.g. PSI).

Furthermore, there are increasing circumstances of difficult diagnosis and assessment of the severity of the disease, e.g. in infants and elderly patients, immunosuppressed patients, patients with basal systemic inflammatory response syndrome (post-operated, post-traumatic) and ventilator associated pneumonia. The measurement of biomarkers needs to take place in these situations, as well as to assess the requirement of immunomodulating therapies. Nevertheless, extensive evaluations are needed in order to carefully interpret the results.

In the last decade, procalcitonin (PCT) has emerged as a specific marker of systemic bacterial infection, with correlation with etiology, severity and risk of death, being useful in the diagnosis and monitoring of infection,<sup>3,4</sup> that has even allowed interventional trials of PCT-guided therapy in respiratory tract infections<sup>5</sup> and community-acquired pneumonia.<sup>6</sup> As a prognostic marker, PCT has been shown to be especially useful in ventilator-associated pneumonia.<sup>7</sup> Nevertheless, a biomarker with elevated sensitivity for bacterial infection such as PCT can have some limitations when used for risk assessment. PCT levels are influenced by previous antibiotic treatment, and it is not uncommon that patients have started antibiotic therapy prior to presenting to an emergency department. Furthermore, some viral infections (e.g. cytomegalovirus) would need follow-up for severity which can not be assessed by PCT, as it is not elevated in viral infections.

An additional tool for the prediction of severity in pneumonia could be the use of biomarkers that act as mediators of cardiovascular dysfunction, which is common in the acutely ill, and bear prognostic significance.<sup>8</sup> Natriuretic peptides are released from the heart upon increased stretch of the myocardium, serving as markers of congestive heart failure. The family of natriuretic peptides consists of atrial (A-type) natriuretic peptide (ANP), brain (B-type) natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide.<sup>9</sup> Stimuli for the production of ANP are probably multiple, such as proinflammatory factors and hypoxia. Its expression has been found in many tissues but it is mainly produced in the atrium of the heart.<sup>10</sup>

The prohormone of atrial natriuretic peptide (proANP) is a polypeptide of 126 amino acids. Cleavage of proANP releases a 98-amino-acid amino-terminal fragment (proANP<sub>1-98</sub>) and a 28-amino-acid carboxy-terminal fragment that is mature atrial natriuretic peptide.<sup>9</sup> ProANP<sub>1-98</sub> has a much longer half-life than mature ANP and has therefore been suggested to be a more reliable analyte for measurement than ANP. All sandwich immunoassays developed for proANP combine an antibody against the N-terminal region with a second antibody against either the midregion or C-terminal region. Nevertheless, it has been shown that proANP<sub>1-98</sub> can be subject to further fragmentation<sup>11</sup> so previously used assays might have underestimated pro-ANP levels. A new immunoassay has been recently developed for midregional proANP (MR-proANP), which could have an advantage in this sense.<sup>12</sup>

Since MR-proANP is a marker of cardiovascular dysfunction associated with sepsis, the objective of the present study was to evaluate the usefulness of MR-proANP measurement in community-acquired pneumonia, assessed by PSI, CURB-65 and complications in follow-up.

## Materials and methods

### Study design. Retrospective study

#### Setting

We evaluated serum samples from consecutive patients admitted to Emergency Department of a university tertiary hospital between September 2001 and March 2003, presenting clinical signs of lower respiratory tract infection, and a new infiltrate on the chest radiograph. The study was approved by the institutional ethics committee. Data were collected for clinical, radiological and microbiological features. Microbiological tests included blood cultures, sputum or bronchial lavage specimens for culture, urine for antigen detection and serum for antibody assays.

### Selection of participants

A total of 300 patients with confirmed pneumonia, defined by clinical (fever, cough, dyspnea) and radiographic signs (pneumonic infiltrate in the chest radiograph), as well as clinical evolution, assessed by expert clinicians and radiologists, participated in the study. Children and HIV patients were not included in the study. Patients with prior antibiotic therapy were excluded from the study. Patients were stratified by the prediction rule calculated according to the PSI score, developed by the Pneumonia Outcomes Research Team<sup>1</sup> and also by CURB-65.<sup>2</sup> Patients were also grouped by the presence of unilobar or multilobar radiographic pulmonary infiltrates in order to establish the anatomical extent of the infection. All patients were followed-up during hospitalization. Complications were defined as respiratory failure/shock, clinical and radiological progression of the disease, and empyema, including patients that required admission to ICU and patients that died. Serum samples were obtained at the moment of admission and prior to antibiotic therapy, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.



**Methods and measurements**

MR-proANP was measured in all samples by the recently developed test based on time-resolved amplified cryptate emission (TRACE) technology (B · R · A · H · M · SMR-proANP KRYPTOR, Brahms AG, Hennigsdorf/Berlin, Germany). Serum levels of procalcitonin (PCT) were measured in 142 of the three-hundred patients by immunoluminometric assay (Lumitest® PCT, Brahms AG, Hennigsdorf/Berlin, Germany).

Microbial investigation. Pneumococcal pneumonia was diagnosed by isolation of *Streptococcus pneumoniae* from blood culture or by detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis.<sup>13,14</sup> *Legionella* pneumonia was diagnosed by urinary antigen detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by enzyme immunoassay (Bartels EIA *Legionella* urinary antigen. Bartels Inc., Trinity Biotech Company, Wicklow, Ireland). Isolation of a predominant microorganism in the sputum was considered as only probable etiology and not as a definite diagnosis.

**Primary data analysis**

The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the data for parametric distribution. Comparison between groups was conducted by the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. For multi-group comparisons Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by Dunn’s post test was used. Associations were considered statistically significant if the *p* value was <0.05. The commercial statistical software package used was SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Graphical representation is based on GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, Inc, Dan Diego, CA). Sensitivity, specificity and positive and negative likelihood ratios were analyzed by a receiver operating characteristic (ROC) curve.

**Results**

**Characteristics of study subjects**

A total of 1200 serum samples were collected. The diagnosis of pneumonia was confirmed in three hundred patients. The mean age of the patients included in the study was 66.27 years (standard deviation 17.15, 95% confidence interval for mean 64.32–68.22). Patients’ characteristics are shown in Table 1. During follow-up 15% of patients developed complications, and 4.6% died.

**Main results**

A certain etiological diagnosis was achieved in only 80 patients (26.6%). Isolation of a predominant micro organism in the sputum was only considered as probable etiology, especially because the prevalence of COPD was 45%. There was no association between MR-proANP values and the etiology of pneumonia (Fig. 1). When analysing only the group with definite etiological diagnosis, there was no significant difference in MR-proANP levels (*p* = 0.432) between pneumococcal and *Legionella* pneumonia. PCT levels were higher in pneumococcal pneumonia, although the difference was not significant (*p* = 0.095). Only

**Table 1** Patients’ characteristics

Characteristic	N	%
Men	205	68.3
Women	95	31.7
<b>Coexisting illnesses</b>		
Neoplastic disease	59	19.7
Liver disease	19	6.3
Congestive heart failure	70	23.3
Cerebrovascular disease	33	11
Renal disease	26	8.7
Chronic obstructive Pulmonary disease	135	45
<b>Etiology</b>		
Pneumococcal <sup>a</sup>	61	20.3
Probable pneumococcal <sup>b</sup>	21	7
<i>Legionella pneumophila</i> <sup>c</sup>	19	6.3
<i>Haemophilus influenzae</i> <sup>d</sup>	9	3
Unknown	190	63.3
Multilobar radiographic infiltrate	58	19.3
Development of complications <sup>d</sup>	45	15
Dead	14	4.6

<sup>a</sup> Blood culture/urinary antigen detection by counterimmunoelectrophoresis.

<sup>b</sup> Isolation of the microorganism only in sputum samples.

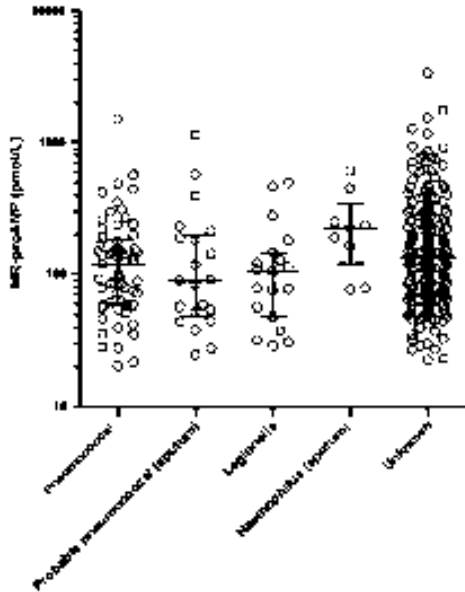
<sup>c</sup> Urinary antigen detection by enzyme immunoassay.

<sup>d</sup> Respiratory failure/shock, clinical and radiological progression, or empyema; within this group 14 patients died.

11 patients developed bacteremia and PCT levels were significantly higher (*p* = 0.002) but not MR-proANP levels (*p* = 0.422).

Furthermore, there was no difference in MR-proANP levels in patients with multilobar pneumonia in comparison to patients with unilobar pneumonia (*p* = 0.435), while PCT levels showed an association with the radiographic extent (*p* = 0.055).

Patients were stratified according to the PSI. The distribution was as follows: 20 patients (6.7%) were included in risk group I, 55 (18.3%) in group II, 77 (25.7%) in group III, 119 (39.7%) in group IV and 29 (9.7%) in group V. MR-proANP, leukocyte count and PCT values according to PSI risk groups are shown in Fig. 2. Median MR-proANP values increased with increasing severity of pneumonia (*p* < 0.0001; Fig. 2A). In contrast to MR-proANP, the total leukocyte count did not raise with the severity of the disease, classified according to the PSI score (Fig. 2B). PCT levels also increased gradually with severity, but not as pronounced as shown for MR-proANP (*p* = 0.0099, Fig. 2C). Using Dunn’s multiple comparison test MR-proANP levels showed significant differences (*p* < 0.0001) when comparing individually the five PSI groups, whereas PCT only showed significance when comparing group I vs V and group II vs V (data not shown). Patients were grouped into low risk classes (PSI I, II and III) and high risk classes (PSI IV and V). The results are shown in Fig. 3A. The serum levels of MR-proANP were significantly higher (*p* < 0.0001) in patients with high risk than in those with low-risk class (I–III). Mean, standard deviation and median MR-proANP levels of



**Figure 1** MR-proANP values (pmol/L) according to the etiology of pneumonia. Scatterplots represent individual data. Median values with interquartile ranges are shown. Isolation of the microorganism in blood cultures and urinary antigen detection was considered as definite diagnosis, whereas isolation from sputum samples was considered as probable etiology.

patients in high and low-risk PSI classes are shown in Table 2. Significant differences were also obtained for PCT ( $p = 0.017$ ). In order to study the influence of etiology, the same comparison was performed excluding the patients with pneumococcal pneumonia, and MR-proANP levels were still significantly higher in patients at high risk ( $p < 0.0001$ ) but not PCT levels ( $p = 0.165$ ). As the lower number of patients in the PCT-group could lead to loss of significance, the analysis was performed again including only the 142 patients who had both parameters measured, and the results were the same ( $p = < 0.0001$  for MR-proANP including 142 patients, and  $p = 0.005$  when excluding the patients with pneumococcal pneumonia).

To calculate the diagnostic accuracy of MR-proANP to discriminate between low and high risk class in patients with pneumonia, a receiver operating characteristic (ROC) curve was performed (Fig. 3B). The area under the ROC curve was 0.738 (standard error 0.029, 95% confidence interval 0.684–0.787). In order to get the highest diagnostic accuracy a threshold level for MR-proANP of 139.7 pmol/L was determined. Sensitivity and specificity were 65.5% (95% CI 57.3–73.2) and 73.7% (95% CI 65.9–80.5), respectively, with a positive and negative likelihood ratio of 2.49 and 0.47. Positive and negative predictive values were 70.8% and 68.7%. When analysing only the 142 patients who had both parameters measured, the area under

the curve was 0.714 (SE 0.045, 95% CI 0.625–0.803) for MR-proANP and 0.617 (SE 0.048, 95% CI 0.522–0.712) for PCT (Fig. 4).

Patients were also classified according to CURB-65 score and by the presence of complications during follow-up. Mean, standard deviation and median of MR-proANP levels for the different groups are shown in Table 2. MR-proANP levels were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in patients in CURB-65 group 3 (score 3 or more) or group 2 (score 2) versus group 1 (score 0 or 1) but no significant differences were found between group 2 and 3 ( $p = 0.931$ ). PCT levels were not significantly increased in group 3 compared to group 1 ( $p = 0.066$ ) nor to group 2 ( $p = 0.066$ ).

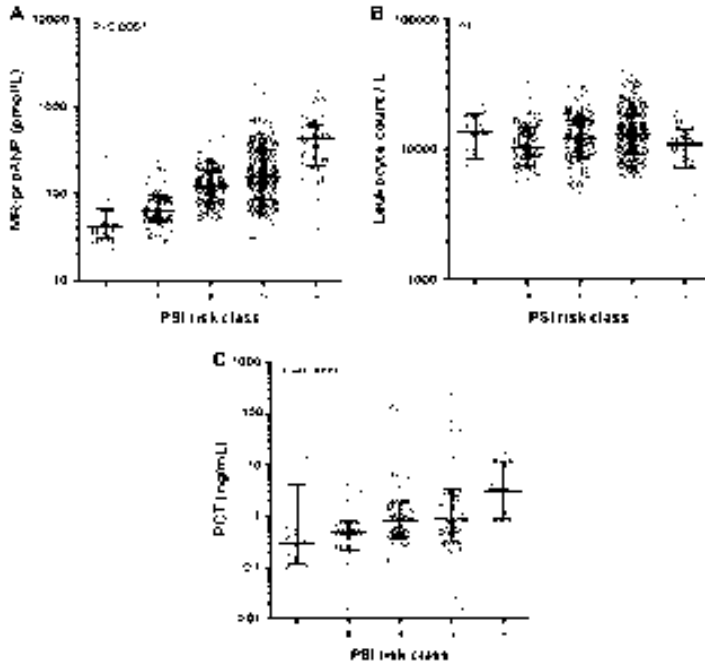
Overall, 15 patients required admission to intensive care unit (ICU), and 8 of them died. No significant differences were found for MR-proANP between ICU and non-ICU patients ( $p = 0.814$ ). In contrast, PCT levels were significantly higher ( $p = 0.008$ ) in those patients admitted to ICU. However, it is important to note that PCT was measured in only 142 of the 300 patients.

In total, 45 patients developed complications during follow-up. The distribution was as follows: twenty-six patients developed respiratory failure/shock and 12 of them died, thirteen patients presented clinical and radiological progression and 2 of them died and, finally, 6 patients developed empyema and survived. Collectively, MR-proANP levels were significantly higher ( $p = 0.029$ ) in patients with complications. Within the 45 patients who developed complications, 12 were grouped into low PSI risk classes. Three of those patients had MR-proANP levels above the defined threshold level (139.7 pmol/L). With respect to the 33 remaining patients with complications, grouped into high PSI risk class, 26 had elevated MR-proANP levels and 7 patients had MR-proANP below the threshold. Within this last group, five patients died.

Comparison of MR-proANP values was also made grouping the patients according to underlying diseases. Significant differences were not present when the coexisting illness was chronic obstructive pulmonary disease ( $p = 0.928$ ) or neoplastic disease ( $p = 0.813$ ), but MR-proANP levels were significantly higher in patients with congestive heart failure ( $p < 0.0001$ ), renal disease ( $p < 0.0001$ ), cerebrovascular disease ( $p = 0.001$ ) and liver disease ( $p = 0.028$ ). MR-proANP values in patients with and without congestive heart failure are shown in Fig. 5A. Association of MR-proANP values with PSI was re-evaluated considering firstly only those patients without congestive heart failure as underlying disease, and secondly only those with congestive heart failure, in order to check its influence on the results since ANP is a marker of chronic heart failure. Significant association was still present in both subgroups of patients ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.022$ , respectively). MR-proANP values according to the PSI in patients without congestive heart failure as underlying disease are shown in Fig. 5B. The same results were obtained when analysing patients with and without renal disease (data not shown).

## Discussion

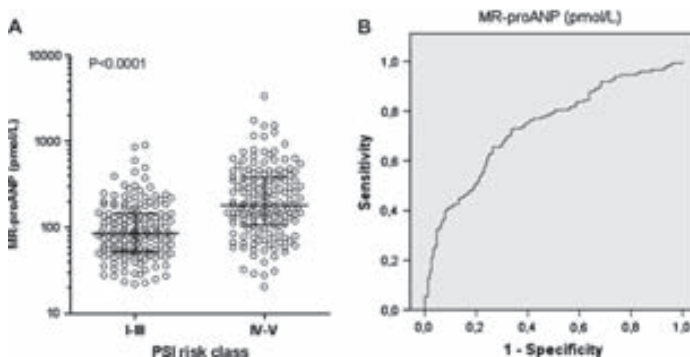
Pneumonia is still a leading cause of morbidity and mortality.<sup>1</sup> The correct etiological diagnosis as well as



**Figure 2** (A) MR-proANP values (pmol/L), (B) leukocytes (count/L) and (C) PCT (ng/mL) according to the Pneumonia Severity Index. Scatterplots represent individual data, including all the patients for MR-proANP and leukocytes, and only 142 patients for PCT. Median values with interquartile ranges and *p*-values (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) are shown; ns = not significant.

assessment of the severity and risk prediction of outcome are essential for early and effective treatment. Despite important developments in the last years, current diagnostic and prognostic methods have still limitations. Clinical signs

of pneumonia can be unspecific in certain groups of patients such as infants and elderly patients, immunosuppressed patients or patients with a basal systemic inflammatory response syndrome. Even the interpretation



**Figure 3** A. MR-proANP values (pmol/L) according to Pneumonia Severity Index, grouped as low-risk (I–III) and high-risk (IV and V). Scatterplots represent individual data. Median values with interquartile ranges are shown B. Receiver operating characteristic curve of MR-proANP with respect to prediction of high-risk of death according to Pneumonia Severity Index (PSI IV and V).

**Table 2** MR-proANP values (mean, standard deviation, median) according to Pneumonia Severity Index (PSI), grouped as low-risk (I–III) and high-risk (IV and V), the development of complications and CURB-65 score

Group	N	%	MR-proANP		
			Mean (pmol/L)	SD	Median (pmol/L)
PSI I–III	152	50.7	124.8	126.5	85.28
PSI IV–V	148	49.3	310.6	389.6	180.7
Complicated*	45	15	359.4	562.1	163.7
Uncomplicated	255	85	191.2	220.4	122.5
CURB-65 score 0–1	143	47.7	128.1	126.8	84.4
CURB-65 score 2	98	32.7	310.3	431.6	157.3
CURB-65 score $\geq 3$	59	19.7	274.5	287.2	179.3

\*Respiratory failure/shock, clinical and radiological progression of the disease, or empyema, including patients that were admitted to an ICU or died.

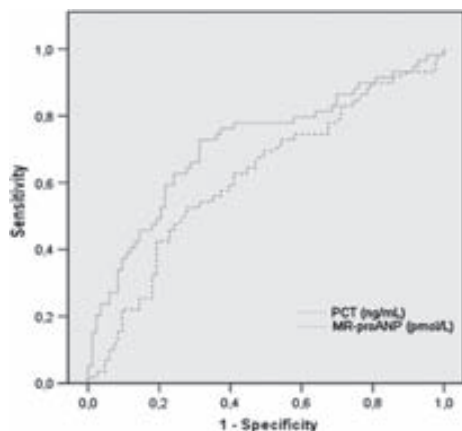
of chest radiographs is variable between radiologists.<sup>15</sup> Etiological diagnosis is still not achieved in a big number of cases. Blood cultures are positive in a low percentage of cases and results are often obtained not early enough. Sputum culture is not a gold standard for the etiological diagnosis of pneumonia, and even well validated rapid tests can be unspecific in some cases, such as the immunochromatographic urine test for *Streptococcus pneumoniae* in patients with pneumococcal carriage, such as young children<sup>16</sup> and chronic obstructive pulmonary disease patients. Limitations of validated risk scores such as PSI include its complex and time-consuming calculation, leading to an intraobserver variation,<sup>17</sup> as well as the overemphasis on age and comorbidities. Thus, some young patients with severe

hypoxemia and absence of comorbidities are at risk of death and can be discharged if PSI score is used alone. At the same time, some old individuals could be treated as outpatients and are unnecessarily admitted to the hospital.

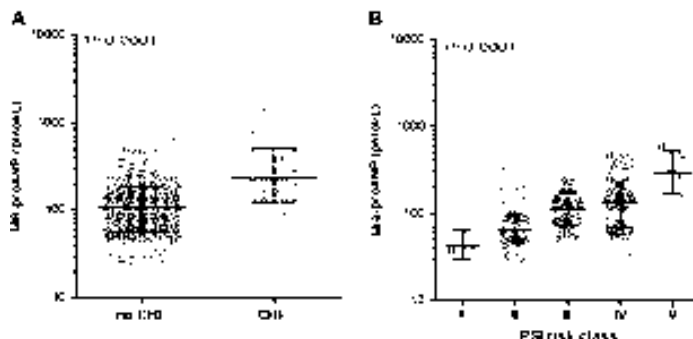
Assessment of severity of infection by the use of biomarkers has emerged in the last years as a promising approach. Both observational and intervention studies have shown PCT to improve the diagnosis of lower respiratory tract infection (LRTI)<sup>5,18</sup> allowing to identify bacterial LRTI requiring antimicrobial therapy<sup>5</sup> as well as to predict severity.<sup>7</sup> We also previously reported the correlation of PCT with etiology and severity of pneumonia.<sup>3</sup> PCT levels were increased in pneumococcal pneumonia, specially when bacteremic, and when multilobar infiltrates were present. When patients were stratified by PSI, correlation of PCT with high risk class (IV and V) was only significant in the group of pneumococcal pneumonia and not in the group of *Legionella* pneumonia. We also found highly elevated PCT levels in children with pneumococcal pneumonia in spite of a successful outcome.<sup>19</sup> We have also shown in the present study that PCT levels did not correlate with PSI when excluding the group with pneumococcal pneumonia. Therefore, when used as a prognostic marker, PCT can have some limitations since it is influenced by etiology and anatomical extent.

We evaluated the usefulness of MR-proANP measurement as a prognostic marker in patients with pneumonia. The main finding was that MR-proANP levels correlate with severity of pneumonia, assessed by the PSI, CURB-65 and also by the development of complications. Our results are consistent with those of a recently published study by Muller et al.<sup>20</sup> that shows that MR-proANP levels are increased in LRTI, especially in community acquired pneumonia and its measurement might be useful in risk stratification. This group also measured MR-proANP, although using an immunoluminometric assay. In the population studied, mortality was higher (46 of 373) than in our study (14 of 300), and MR-proANP levels were significantly higher in non-survivors. However, in our population, 14 patients died and only 8 of them presented elevated MR-proANP levels at admission (using the threshold level determined by PSI, in absence of a real gold standard for severity). This could be due to a longer time between the admission to hospital (when serum sample for MR-proANP measurement was collected) and death: for the group of patients with higher MR-proANP levels the mean time of hospitalization was 5.50 days (SD 2.726) whereas for the other 6 patients, that presented lower MR-proANP levels, the mean time was 13 days (SD 6.033). In this sense, follow-up measurement could have been useful. The knowledge of the marker concentration and its dynamics during the course of the disease might help to make more reliable decisions regarding prognosis. In the group of patients with complications, twelve were initially classified as low risk (PSI I–III); three of them presented elevated MR-proANP. For example, one of the patients was classified into risk class I and treated as outpatient, but had to be readmitted because of the clinical and radiological progression of the pneumonia. MR-proANP level at admission was 390.5 pmol/L and PCT level was 0.397 ng/mL.

Unlike PCT, MR-proANP levels were independent of the etiology of the pneumonia and of the radiographic extent,



**Figure 4** Receiver operating characteristic curve of MR-proANP and PCT with respect to prediction of high-risk of death according to Pneumonia Severity Index (PSI IV and V), including only the 142 patients who had both parameters measured.



**Figure 5** A. MR-proANP values (pmol/L) according to the presence of congestive heart failure (CHF) as underlying disease. B. MR-proANP values (pmol/L) according to the Pneumonia Severity Index in patients without congestive heart failure as underlying disease. Scatterplots represent individual data. Median values with interquartile ranges and *p*-values (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) are shown.

indicating that MR-proANP predicts the severity of disease rather than the need of antibiotic therapy or the extension of the inflamed tissue involved. This finding has an additional value since some etiologies have been shown to present with low PCT levels.<sup>3</sup>

MR-proANP levels correlated with the presence of renal disease and congestive heart failure. It has been reported that circulating levels of natriuretic peptides are increased upon stretch of the myocardium during congestive heart failure and also during severe renal dysfunction.<sup>8</sup> Increased circulating natriuretic peptides have been shown to correlate with the myocardial depression of septic shock.<sup>8</sup> An important finding of our study is that the presence of congestive heart failure as well as renal disease as underlying diseases and not as a complication did not interfere the association of MR-proANP levels and severity of pneumonia assessed by the PSI.

This study has some limitations. First of all, the population evaluated included adult patients with pneumonia that were under physician's care in the hospital. Therefore, a group of patients without any complications or etiologies more benign than pneumococcal or *Legionella* pneumonia, such as *Mycoplasma pneumoniae* were not included. Secondly, immunosuppressed patients were excluded from the study, and this is a group of difficult management for both diagnosis and treatment that could benefit from the use of biomarkers. Furthermore, the fact that it is a retrospective study and that some samples collected during the study period lacked clinical and microbiological information and they were excluded. Finally, follow-up measurements during the course of disease can not be provided. It is also important to note that the cut-off for MR-proANP was established based on PSI, in absence of a real gold standard.

Collectively, the natriuretic peptide family counterbalances the effects of the renin-angiotensin-aldosterone system.<sup>21</sup> With the hypothesis that BNP may reflect both the severity of pneumonia as well as comorbidities, Mueller et al. measured BNP levels in patients with pneumonia, and found that they were significantly higher in patients dying

within 30 days.<sup>22</sup> It is considered that BNP may be superior to ANP in monitoring heart failure. ANP is stored within granules and released upon acute stretch while BNP is not.<sup>8</sup> The ANP prohormone in cardiac tissue is cleaved into two fragments, both of which enter the circulation.<sup>21</sup> Previously designed assays measure the N- or the C-terminal part of the precursor, which are less stable and its molecular heterogeneity causes a risk of underestimating its circulating levels.<sup>23</sup> The measurement of MR-proANP, as a more stable peptide, has been shown to have a diagnostic value comparable to that of BNP and N-terminal-proBNP in the diagnosis of acute destabilized heart failure.<sup>24</sup> Plasma MR-proANP concentrations appear to be a valuable tool for risk assessment in sepsis patients.<sup>25</sup>

Patterns of circulating markers may help to stratify patients according to the severity of the disease, in order to make therapeutical decisions such as further interventions or the prescription of immunomodulating therapies. A number of immunomodulatory therapies aimed to modulate the dysregulated inflammatory response in sepsis but most of them have not demonstrated benefit in reducing mortality.<sup>26</sup> Some of the reasons for this failure include inappropriate criteria used for patient selection and timing of the administration of the agent.<sup>26</sup> In a retrospective analysis of clinical and preclinical trials it was found that risk of death altered the efficacy of anti-inflammatory agents during sepsis.<sup>27</sup> It was concluded that clinical trials should incorporate risk prediction scores in order to ensure that patients likely to benefit (inhibiting an excessive inflammatory response) are included and that those likely to be harmed (disrupting a well-regulated inflammatory response) are excluded.<sup>27</sup>

The response to anti-inflammatory therapies may differ depending on the etiology, but also on the host factors. Since no gold standard exists for determining both the etiology and the immune status, demonstrable abnormalities in immunological or biochemical pathways may permit to detect organ dysfunction at earlier stages, before it becomes irreversible.<sup>26</sup>

Used adequately, PCT allows an early diagnosis of bacterial infection,<sup>28</sup> correlating with etiology and radiographic

extent. MR-proANP levels, not influenced either by etiology nor radiographic extent, can be a useful complementary tool for assessing the severity in patients admitted to Emergency Department with pneumonia, in order to improve decisions regarding therapy and site of care.

### Acknowledgements

The company BRAHMS AG has supplied the necessary quantity of BRAHMS MR-proANP KRYPTOR® kits and has paid the expenses for the performance of the study to the Institution.

### References

1. Fine MJ, Auble TE, Yealy TM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997;336:243–50.
2. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* May 2003;58(5):377–82.
3. Prat C, Dominguez J, Andreo F, Blanco S, Pallares A, Cuchillo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect Mar* 2006;52(3):169–77.
4. Muller B, Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect* Dec 2006;12(Suppl. 9):8–16.
5. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* Feb 21 2004;363(9409):600–7.
6. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, Muller C, Miedinger D, Huber PR, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* Jul 1 2006;174(1):84–93.
7. Luyt CE, Guerin V, Combes A, Trouillet JL, Ayed SB, Bernard M, et al. Procalcitonin kinetics as a prognostic marker of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* Jan 1 2005;171(1):48–53.
8. Beishuizen A, Hartemink KJ, Vermes I, Groeneveld AJ. Circulating cardiovascular markers and mediators in acute illness: an update. *Clin Chim Acta* Apr 2005;354(1–2):21–34.
9. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* Jul 30 1998;339(5):321–8.
10. Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 1991;60:229–55.
11. Cappellin E, Gatti R, Spinella P, De Palo CB, Woloszczuk W, Maragno I, et al. Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) fragments proANP (1–30) and proANP (31–67) measurements in chronic heart failure: a useful index for heart transplantation? *Clin Chim Acta* Aug 1 2001;310(1):49–52.
12. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* Jan 2004;50(1):234–6.
13. Coonrod JD, Rytel MW. Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis. I. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. *J Lab Clin Med* May 1973;81(5):770–7.
14. Coonrod JD, Rytel MW. Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis. II. Etiologic diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Lab Clin Med* May 1973;81(5):778–86.
15. Hopstaken RM, Witbraad T, van Engelshoven JM, Dinant GJ. Inter-observer variation in the interpretation of chest radiographs for pneumonia in community-acquired lower respiratory tract infections. *Clin Radiol* Aug 2004;59(8):743–52.
16. Dominguez J, Blanco S, Rodrigo C, Azuara M, Gali N, Mainou A, et al. Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. *J Clin Microbiol* May 2003;41(5):2161–3.
17. Aronsky D, Haug PJ. Assessing the quality of clinical data in a computer-based record for calculating the pneumonia severity index. *J Am Med Inform Assoc* Jan–Feb 2000;7(1):55–65.
18. Boussekey N, Leroy O, Georges H, Devos P, d'Esquivan T, Guery B. Diagnostic and prognostic values of admission procalcitonin levels in community-acquired pneumonia in an intensive care unit. *Infection* Aug 2005;33(4):257–63.
19. Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, Gimenez M, Azuara M, Jimenez O, et al. Procalcitonin C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* Nov 2003;22(11):963–8.
20. Muller B, Suess E, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, Bergmann A, et al. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* Dec 2006;260(6):568–76.
21. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* May 3 1997;349(9061):1307–10.
22. Mueller C, Laule-Kilian K, Scholer A, Perruchoud AP. B-type natriuretic peptide for risk stratification in community-acquired pneumonia. *J Intern Med* Oct 2005;258(4):391–3.
23. Ala-Kopsala M, Magga J, Peuhkurinen K, Leipala J, Ruskoaho H, Leppaluoto J, et al. Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-B-type natriuretic peptides. *Clin Chem* Sep 2004;50(9):1576–88.
24. Gegenhuber A, Struck J, Poelz W, Pacher R, Morgenthaler NG, Bergmann A, et al. Midregional pro-A-type natriuretic peptide measurements for diagnosis of acute destabilized heart failure in short-of-breath patients: comparison with B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP. *Clin Chem* May 2006;52(5):827–31.
25. Morgenthaler NG, Struck J, Christ-Crain M, Bergmann A, Muller B. Pro-atrial natriuretic peptide is a prognostic marker in sepsis, similar to the APACHE II score: an observational study. *Crit Care* Feb 2005;9(1):R37–45.
26. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* Jun 1999;25(6):556–66.
27. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* Nov 1 2002;166(9):1197–205.
28. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* Jul 15 2004;39(2):206–17.

## 4.2. Article 2

### **Usefulness of consecutive biomarkers measurement in the management of pneumonia.**

Alicia Lacom, Núria Rodríguez, Cristina Prat, Joan Ruiz-Manzano, Felipe Andreo, Aida Ramírez, Albert Bas, Miguel Pérez, Vicente Ausina, Jose Domínguez.  
Respiratory Medicine 2011. *Submitted.*

En el maneig de la PAC, és de gran importància la valoració inicial del risc, perquè en depenen les decisions referents al tractament, així com la necessitat d'ingrés i la ubicació. Existeixen diversos índexs de gravetat, que permeten identificar aquells pacients amb un major risc de mort, però que no són capaços de predir l'evolució un cop iniciat el tractament. En canvi, les determinacions seriades de biomarcadors són un paràmetre dinàmic, i podrien ser d'ajuda per predir l'evolució clínica.

En aquest apartat de la Tesi, hem avaluat la utilitat de les determinacions seriades de PCT, neopterina, PCR i MR-proANP en un grup de 75 pacients amb diagnòstic clínic i radiològic de pneumònia. Considerant la determinació puntual en el moment de l'ingrés hospitalari, els nivells de PCT mostren una clara relació amb les pneumònies amb diagnòstic bacterià de seguretat. Tanmateix els nivells de PCT i MR-proANP s'incrementen significativament amb els índexs de severitat, i són més elevats en aquells pacients que desenvolupen de forma posterior algun tipus de complicació, definit com ingrés a la UCI o decés. Quant a extensió radiològica, cap biomarcador va mostrar una correlació significativa. Els nivells de PCT i MR-proANP romanen en el temps significativament elevats en aquells pacients que van desenvolupar algun tipus de complicació. Els nivells de PCT disminueixen de forma significativa en el temps tant en pacients classificats com a baix i alt risc segons PSI. En el cas del MR-proANP els nivells són significativament superiors en el temps en els pacients classificats com a alt risc, segons PSI i CURB-65. En aquells pacients que no desenvolupen cap complicació, els nivells de PCT disminueixen de forma significativa de dia 1 a dia 3.

Els nostres resultats mostren que els nivells de PCT orienten sobre l'origen bacterià de la pneumònia. Els nivells de PCT i MR-proANP correlacionen amb els índex de gravetat i la determinació seriada d'aquests biomarcadors és útil donat que reflexa el pronòstic a curt termini.





## Usefulness of consecutive biomarkers measurement in the management of community acquired pneumonia.

Alicia Lacomá<sup>1,3</sup>, Nuria Rodríguez<sup>2</sup>, Cristina Prat<sup>1,3</sup>, Juan Ruiz-Manzano<sup>2,3</sup>, Felipe Andreo<sup>2,3</sup>, Alda Ramírez<sup>1</sup>, Albert Bas<sup>1</sup>, Miguel Pérez<sup>1</sup>, Vicente Ausina<sup>1,3</sup>, Jose Dominguez<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia. <sup>2</sup>Servei de Pneumologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES) Instituto de Salud Carlos III. Badalona. Barcelona. Spain.

Correspondance to: J. Domínguez. Servei de Microbiologia. Institut en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Phone: +34 93 497 88 94. Fax: +34 93 497 88 95. E-mail: jadomb@gmail.com

**Background.** The aim of this study was to investigate whether procalcitonin (PCT), neopterin, C-reactive protein (CRP) and mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) levels at admission and during the clinical course can be useful for the management of patients with pneumonia.

**Patients.** Study population consisted of 75 patients with clinical and radiological diagnosis of pneumonia. Serum samples were collected at admission and during hospitalization. Complications were defined as ICU admission or death.

**Results.** Levels of PCT were significantly higher in pneumonia of definite bacterial origin in comparison to probable bacterial or unknown origin. PCT levels were higher in pneumococcal pneumonia. PCT and MR-proANP levels increase significantly according to PSI. All biomarkers levels are higher in patients developing complications and dying. Serial levels of MR-proANP remain significantly elevated in patients developing complications and in patients classified in PSI and CURB-65 risk groups. In patients not developing complications, there is a significant decrease in PCT levels.

**Conclusions.** PCT can be useful for identifying pneumonia etiology. PCT and MR-proANP levels correlate with the severity index rules. PCT and MR-proANP serial measurements can be useful for predicting short-term prognosis. Systemic biomarkers can provide additional information regarding clinical evolution, because these are dynamic and can be measured daily.

Pneumonia is still the leading infectious cause of death despite the development of new antimicrobial agents and diagnostic methods [1]. Two essential factors for the management of community acquired pneumonia (CAP) are an early etiological diagnosis and assessment of severity, guiding therapeutic options and the initial site of care decision.

Several prognostic scores for CAP have been developed in order to assess the risk of death. The Pneumonia Severity Index (PSI) [2] and CURB-65 score (confusion, urea, respiratory rate, blood pressure and age) [3] are the most commonly validated scores for predicting mortality but are not able to predict the outcome once the treatment has been initiated. These risk scales are not designed to be re-assessed during the clinical evolution and follow-up, so they can not identify patients with higher risk of treatment failure

neither can assess the need of further interventions and therapy changes.

In the last years, an aspect that has gained importance is the systemic inflammatory and physiopathological host response to infection. Mechanisms that lead this inflammatory response depend on microbial and host factors, and both have to be considered jointly [4]. In this sense, several studies have described and identified biomarkers that might reflect this process during lower respiratory tract infections (LRTI), and specially CAP [5-7]. As a result, a sole biomarker, or a combination of biomarkers measurement at hospital admission might be a useful complementary tool for the initial assessment of etiology and severity. In fact, some circulating biomarkers can be helpful for the orientation of the etiology, particularly for the differentiation between bacterial and viral infections, having potential

implications in antibiotic prescriptions [7-11]. In addition, recent studies have also evaluated if the combination of validated risk scores, mainly CURB-65 and PSI with certain systemic biomarkers could improve the assessment of CAP severity and prognosis with promising results [6, 12]. Another interesting approach is to correlate serial biomarkers measurement with the prognosis of the infection, and the appropriateness of antibiotic therapy [13, 14]. In this regard we have evaluated four systemic biomarkers: procalcitonin (PCT), neopterin, C-reactive protein (CRP) and mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP).

PCT is a specific marker of systemic bacterial infection and specifically in the field of CAP, its levels have shown a correlation with a bacterial etiology and degree of severity [7, 15, 16]. Indeed its use for guiding antimicrobial therapy has also been demonstrated in several clinical trials [17]. More recently, sequential measurements of PCT in CAP have also assessed its value as a reliable prognosis biomarker [18, 19].

Neopterin is synthesized by monocytes and macrophages after induction by interferon- $\gamma$  secreted by T lymphocytes [20]. It has been reported to act as a mediator of cell immunity against intracellular pathogens, such as viruses and parasites. Indeed neopterin has shown to improve the discrimination between bacterial and viral etiology respiratory tract infections [8, 9].

CRP is a sensitive acute phase reactant routinely used, whose levels increase in the presence of infection and during chronic inflammatory conditions [21]. In the field of CAP, CRP has been extensively evaluated and its levels have been suggested to be valuable for revealing the development of complications [22-25]. A relationship between CRP levels normalisation and appropriateness of antibiotic treatment has also been described [14, 26].

And finally, atrial natriuretic peptide (ANP) is released from the heart upon increased stretch of the myocardium, serving as a marker of congestive heart failure. Mid regional pro-ANP (MR-proANP) is the stable

C-terminal fragment of the ANP precursor and has been evaluated as a marker of severity in LRTI, especially during pneumonia and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), its levels increasing with severity of infection and the development of complications [27-29].

The aim of this study was to investigate the systemic inflammatory and physiopathological response by means of consecutive measurements of PCT, neopterin, CRP and MR-proANP in patients with CAP. The specific objectives of the present study are to evaluate if biomarkers levels at admission can be useful for identifying etiology, for assessing initial CAP severity and clinical outcome. And secondly, to assess if serial measurements can help identifying patients with an adequate clinical and therapeutic management, since score risk do not reflect evolution but a punctual clinical state.

## **MATERIAL AND METHODS**

**Setting and study population.** The study population was adult patients admitted to the Emergency Department (ED) of Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, presenting clinical signs of LRTI (e.g. temperature >38°C, productive cough, chest pain, shortness of breath, crackles on auscultation) and a new infiltrate on the chest radiograph. Exclusion criteria were nosocomial or health-care associated pneumonia, presence of tuberculosis or infection caused by fungi or other opportunistic microorganism. The study was approved by the institutional ethics committee, and informed consent was obtained from all patients included.

Data were collected prospectively for epidemiological, clinical (presence of comorbidities, previous antibiotic and corticosteroid treatment), analytical, radiological (lobar involvement and presence of pleural effusion) and microbiological features. Samples from a total of 92 patients were collected during the period January to June 2006 and, of these, 75 were considered, after retrospective analysis by expert clinicians to have presented to the hospital with CAP. Development of complications was defined as need of ICU admission or

death. Data was obtained in the context of NAC-CALIDAD project (Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery integrated project on lower respiratory tract infections) Study Group.

**Microbiological investigations.** At the time of arrival to the ED, samples were collected for microbiological diagnosis: blood cultures, respiratory specimens for culture and urine for antigen detection. Pneumococcal pneumonia was diagnosed by isolation of *Streptococcus pneumoniae* from blood and/or pleural effusion culture or by detection of polysaccharide capsular antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis or detection of C-polysaccharide antigen by immunochromatography (ICT) (Binax Now *S.pneumoniae* urinary antigen test. Binax. Maine,USA) [30]. *Legionella* pneumonia was diagnosed by urinary antigen detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by enzyme immunoassay (Bartels EIA *Legionella* urinary antigen, Trinity Biotech Company, Ireland) [31, 32]. The isolation of a predominant microorganism in the sputum samples was considered as probable etiology and not as a definite diagnosis.

A serum sample was collected at admission (D1). During hospitalization and when possible, serial samples were collected every 24 hours, at least during the following four days. A total number of 131 serum samples were collected, and distribution according to the day obtained is as follows: D1-75 samples; D2-14; D3-26; D4-16. For 8 patients we only collected the first sample. All samples were stored at -20°C until biomarkers measurements.

**Biomarkers measurements.** CRP and MR-proANP were detected with an immunofluorescent assay based on a time-resolved amplified cryptate emission (TRACE) technology (CRP<sub>us</sub>, MR-proANP KRYPTOR, BRAHMS AG, Germany). PCT levels were measured by an enzyme linked fluorescent assay (VIDAS BRAHMS PCT, Biomérieux, France). This test has shown a good correlation and concordance with the established Kryptor reference method [33]. Finally,

neopterin levels were measured by a competitive immunoassay (Neopterin ELISA, IBL, Germany).

**Statistical analysis.** Categorical variables are expressed as counts (percentages) and continuous variables as mean and standard deviation (SD) or by median and interquartile range (IQR), as appropriate. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation. Measurements on D1 were used for assessing differences according patient's characteristics, etiology, initial pneumonia severity and development of complications. The  $\chi^2$ -test and Fisher's exact test were used, as appropriate to compare qualitative variables. In case of quantitative variables, Mann-Whitney U test, Wilcoxon, and Kruskal-Wallis, were used. To assess the accuracy of biomarkers for predicting the development of complications, including mortality, we performed receiver operating characteristic curves and determined the area under the curve (AUC), standard error (SE) and 95% confidence interval (95%CI). Serial biomarkers measurements were analyzed using a linear mixed model with repeated measures considering as explanatory variables: development of complications, PSI, CURB-65, time and its interaction.

Associations were considered statistically significant if p value <0.05. The commercial statistical software packages used were SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), GraphPad Prism 5 (Graph Pad Inc, San Diego, CA, USA) and SAS v9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

## RESULTS

The study population consisted of 75 patients with a confirmed diagnosis of pneumonia with a mean age  $\pm$  SD of 67 $\pm$  17.98. Patient's characteristics are shown in table 1. The presence of congestive heart failure and renal disease was associated with higher levels of MR-proANP ( $p=0.002$  and  $p=0.005$ ). CRP levels were significantly higher in patients with COPD ( $p=0.008$ ). There were no significant differences in the levels of biomarkers according to previous antibiotic and corticosteroid treatment.

Table 1. Patient's characteristics

Characteristics	N	%
Men	54	72
Women	21	28
Smoking status		
Yes	18	24
No	27	36
Ex	30	40
Coexisting illnesses		
Neoplasia	6	8
Liver disease	9	12
Congestive heart failure	11	14.7
Cerebrovascular disease	7	9.3
Renal disease	7	9.3
Diabetes	17	22.7
Chronic obstructive pulmonary disease	19	25.3
PSI		
I	5	6.7
II	11	14.7
III	15	20
IV	34	45.3
V	10	13.3
CURB-65		
1	16	21.3
2	33	44
3	26	34.7
Radiographic findings		
Multilobar radiographic infiltrate	14	18.7
Pleural effusion	11	14.7
Complications		
ICU admission during hospitalization	3	4
Exitus	6	8

### Biomarkers at admission

#### *Etiological diagnosis and radiographic involvement*

Etiological diagnoses were classified as definite bacterial (30.7%), probable bacterial (9.3%) and of unknown origin (60%). Microorganisms isolated in definite and probable bacterial cases are shown in Table 2. Regarding biomarkers assessed, only PCT showed a relationship with the etiology. PCT levels at admission, showed significantly higher levels in those cases with bacterial definite diagnosis (0.87 ng/mL, IQR 0.05-3.55) in comparison to the remaining groups (0.08 ng/mL, IQR 0.05-0.51) ( $p=0.018$ ). Even gathering those cases with definite and probable bacterial diagnosis, PCT levels remained significantly higher (0.53 ng/mL, IQR 0.07-2.56) in comparison to cases with unknown etiology (0.06 ng/mL, IQR 0.05-0.48) ( $p=0.014$ ). In

contrast, for CRP, neopterin and MR-proANP no significant differences were found when comparing patients according to etiological diagnosis. For the differential diagnosis of LRTI, PCT levels higher than 0.25 ng/mL have been suggested to indicate a possible bacterial infection. When applying this cut-off in our population, we found that 60.87% of patients with definite bacterial diagnosis and 56.67% of patients with definite or probable bacterial diagnosis had PCT levels higher than 0.25 ng/mL ( $p=0.027$  and  $p=0.033$ , respectively).

Twenty-one patients had pneumococcal pneumonia, and PCT levels in this group were significantly higher ( $p=0.039$ ) in comparison to patients with pneumonia of other origins, whereas for the other biomarkers no statistical differences were found. Biomarkers levels for pneumococcal and no pneumococcal pneumonia are shown in Table 3. Radiographic signs considered were the presence of pleural effusion and multilobar infiltrates. PCT, neopterin and CRP levels were significantly higher in those patients with pleural effusion ( $p=0.056$ ,  $p=0.024$  and  $p=0.004$  respectively), while no differences were found for MR-proANP ( $p=0.248$ ). Regarding lobar involvement, no differences were found for any biomarker.

Table 2. Pneumonia etiology

Etiology	N
Definite bacterial	23
Pneumococcal <sup>a</sup>	21
<i>Legionella pneumophila</i> <sup>b</sup>	1
viridans group streptococci <sup>c</sup>	1
Probable bacterial <sup>d</sup>	7
<i>S. pneumoniae</i>	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Streptococcus anginosus</i>	1
Unknown	45

<sup>a</sup> blood culture/ urinary antigen detection/pleural effusion

<sup>b</sup> urinary antigen detection

<sup>c</sup> pleural effusion culture

<sup>d</sup> Isolation of the microorganism only in the sputum samples

Table 3. Levels of PCT, neopterin, CRP and MR-proANP in pneumococcal and non-pneumococcal pneumonia.

Pneumonia	N	PCT (ng/mL)	Neopterin (ng/mL)	CRP (µg/mL)	MR-proANP (pmol/L)
Pneumococcal	21	0.87 (0.05-3.24)	16.56 (14.58-46.66)	91.69 (46.03-239.25)	69.25 (44.77-113.85)
Bacteraemic	4	7.92 (1.79-21.48)	55.12 (20.89-85.26)	349.35(233.67-536.35)	77.04 (70.58-154.49)
Non- bacteraemic	17	0.2 (0.05-2.09)	16.22 (12.90-22.09)	87.94 (28.78-141.8)	64.53 (31.84-113.85)
Non pneumococcal	54	0.07 (0.05-0.45)	21.32 (11.9-41.5)	106.90 (40.07-252.75)	88.75 (51.56-138.45)

<sup>a</sup>: This group includes: 2 different definite bacterial pneumonia (1 *L.pneumophila* and 1 *S.viridans*), 7 cases of probable bacterial origin and 45 cases of unknown origin

*Initial severity, development of complications and mortality*

The mean length of hospitalization was 8.86 ± 7.77 days and a positive correlation for MR-proANP was found (correlation coefficient: 0.240; p= 0.047). PCT levels increased significantly with the PSI (p=0.014) whereas no statistical differences were found for CURB-65 (p=0.306). Surprisingly, the group of 34 patients classified as PSI IV (45.3%), had median PCT value of 0.06 ng/mL (IQR 0.05- 0.72). Median values of PCT increased according to the CURB-65 but there was some overlapping between score groups. CRP and neopterin did not show any significant association between levels and severity assessed by PSI and CURB-65. MR-proANP levels correlated significantly

with PSI (p=0.009), whereas for CURB-65 it was nearly significant (p=0.060). Levels of PCT, neopterin, CRP and MR-proANP according to the PSI are shown in Figure 1.

Seven patients (9.3%) developed clinical complications: three patients were admitted to ICU (4%) and six patients died (8%). Regarding PSI, 1 patient was classified as PSI III, and the 5 remaining were PSI IV-V. According to CURB-65, 2 patients had score 2 and the five remaining had score 3-5. When comparing patients that developed complications in comparison to those that did not, variables that showed statistical differences were: presence of liver disease (p=0.035), PSI (p=0.033) and CURB-65 (p=0.05).

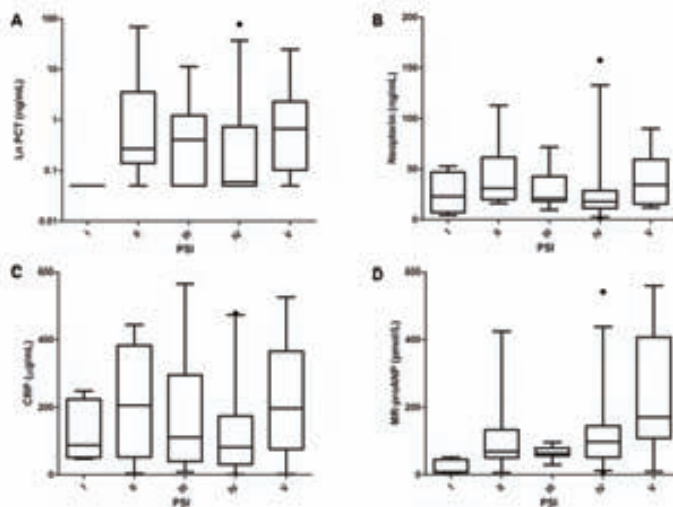


Figure 1. Levels of PCT (ng/mL) (A), neopterin (ng/mL) (B), CRP (µg/mL) (C) and MR-proANP (pmol/L) (D) according to the PSI.

Levels of PCT in patients that developed complications (9.660 ng/mL, IQR 0.12- 23.43) were significantly higher than in patients without complications (0.11 ng/mL, IQR 0.05-0.87) ( $p=0.035$ ). In case of MR-proANP, levels in complicated patients (153.95 pmol/L, IQR 83.41 – 352.37) were also higher than in non-complicated patients (76.06 IQR 48.30 – 132.15) with statistical significance ( $p= 0.044$ ). The AUC (SE, 95% IC) to predict development of complications according to PCT and MR-proANP were: 0.741 (0.109, 0.527-0.955) and 0.749 (0.084, 0.585-0.913), respectively. A PCT cut-off of 0.11 ng/mL had the highest sensitivity value (85.7%), while cut-off of 1.03 ng/mL corresponded to highest specificity (79.1%). A MR-proANP cut-off of 85.05 pmol/L had the highest sensitivity value (83.3%), while cut-off of 128.15 pmol/L corresponded to highest specificity (73.8%). In Table 4 are shown the optimal threshold, specificity and sensitivity values of PCT and MR-proANP for the prediction of complications and mortality. Although, levels of neopterin and CRP were also higher in complicated patients, no statistical significance was found. Interestingly, levels of neopterin for the 3 patients admitted to the ICU were significantly higher (71.71 ng/mL, IQR 46.55-89.79) in comparison to patients that were not admitted (20.65 ng/mL, IQR 14.38-36.95) ( $p=0.029$ ). Levels of all biomarkers were higher in non-survivors than in survivors, although MR-proANP was the only biomarker that showed a statistical significant difference ( $p=0.019$ ) (Table 5). The AUC to predict mortality according to PSI and CURB-65 index were as follows: 0.865 (SE 0.068, 95% IC 0.732-0.998) and 0.784 (SE 0.079, 95% IC 0.629-0.939), respectively. When assessing AUC to predict mortality for each biomarker analyzed, we found that MR-

proANP reached the highest value: 0.809 (SE 0.072, 95% IC 0.668-0.95), whereas for the other biomarkers values were: 0.7 (SE 0.121, 95% IC 0.463-0.937) for PCT, 0.703 (SE 0.134, 95% IC 0.440-0.966) for neopterin and 0.648 (SE 0.117, 95% IC 0.418-0.878) for CRP. Optimal threshold for predicting mortality are shown in Table 4.

#### Biomarkers and serial measurement

In eight patients, only an admission day sample was collected; therefore kinetics could not be studied. When analyzing median PCT and MR-proANP values, levels remained significantly higher along time in the group of patients that developed complications in comparison to patients without complications ( $p=0.005$  and  $p=0.043$ , respectively), while no differences were found for neopterin and CRP. Median levels of all biomarkers up to day 4 according to the development of complications are shown in Figure 2. At day 4 only one complicated patient is represented. For both patients' group, CRP levels tended to decrease during evolution regardless of whether there was favourable or unfavourable event. In case of neopterin, levels in non complicated patients remained similar along time, while for complicated patients there is a decrease from D3. Patients were also grouped into low (I-III) and high risk (IV-V) classes, according to PSI. Interestingly, for both patients groups PCT levels decreased along time statistically ( $p=0.045$ ). In case of MR-proANP levels for the high risk group remained significantly higher than in the low risk group along time ( $p=0.012$ ). In case of CURB-65, MR-proANP levels were also higher along time according to score, with higher levels in CURB-65 3-5 ( $p=0.017$ ). Same analyses were performed for neopterin and CRP and no significant differences were found.

Table 4. Optimal cut-off, specificity and sensitivity values for PCT and MR-proANP for the prediction of complications and mortality.

	Development of complications				Mortality			
	PCT (ng/mL)		MR-proANP (pmol/L)		PCT (ng/mL)		MR-proANP (pmol/L)	
<b>Cut-off</b>	0.11	1.03	85.05	128.15	0.11	1.03	85.05	128.15
<b>Specificity (%)</b>	50.7	79.1	56.9	73.8	50	77.9	57.6	74.2
<b>Sensitivity (%)</b>	85.7	57.1	83.3	66.7	83.3	50	100	80

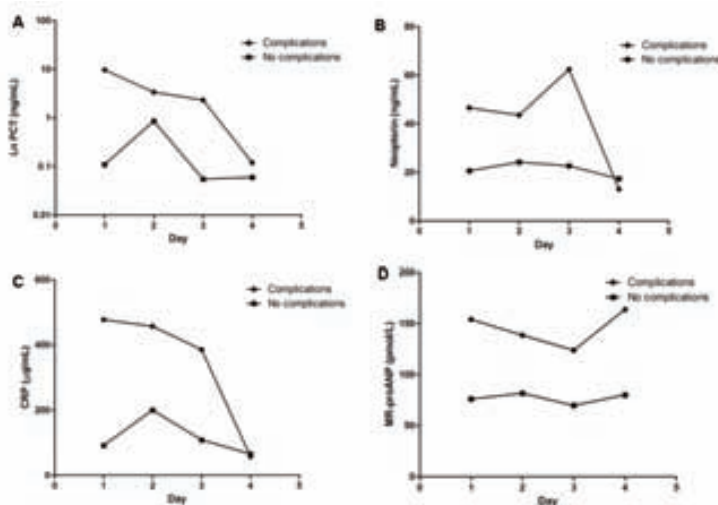


Figure 2. Serial PCT (ng/mL) (A), neopterin (ng/mL) (B), CRP (µg/mL) (C) and MR-proANP (pmol/L) (D) levels in patients with pneumonia classified according to the development of complications.

Considering the 68 patients that did not develop the complications defined for this study (ICU admission or death), 60 of them had serial PCT measurements, while 58 of them had MR-proANP serial measurements. Regarding PCT, for 24 patients values remained similar and in the negative range (0.05-0.06 ng/mL) along time. For 24 patients, levels of PCT decreased along time with higher levels at admission. Interestingly, in 12 cases PCT levels increased: for 6 patients remaining below the cut-off of 1.03 ng/mL and for 6 exceeding the cut-off level. In case of MR-proANP, for 27 patients levels increased along time while in 31, levels decreased. Only for 6 patients, levels were above the threshold of 128 pmol/L. Reviewing these 6 patients, it is of note that 2 of them had levels at admission of 132.4 and 135.2 pmol/L, being very close to the cut-off

level defined and were classified as PSI class II. The other 4 patients, presented much higher levels already at admission (245.3, 348.9, 560 and 242.6 pmol/L), that increased in serial measurements. Interestingly, these 4 patients were PSI high risk class and the patient presenting the highest levels developed an empyema.

For a subgroup of 22 patients we analyzed values of PCT and MR-proANP at D1 and D3 (Figure 3). For the group of 18 patients without complications, when comparing PCT at D1 0.11 ng/mL (IQR 0.05- 0.8350) and at D3 0.055 (IQR 0.055-0.4450), levels decreased statistically ( $p=0.016$ ). No statistical differences were found for patients with complications: PCT levels at D1 were 5 ng/mL (IQR 0.17- 10.86) and at D3 2.390 ng/mL (IQR 0.11- 39.63).

Table 5. Levels of biomarkers in non-survivors and survivors.

Biomarker	Non-survivors	Survivors	p
PCT (ng/mL)	5 (0.12 - 23.43)	0.12 (0.05 – 0.90)	0.102
Neopterin (ng/mL)	46.26 (28.36 - 65.68)	20.64 (14.61 – 36.75)	0.282
CRP (µg/mL)	162.3 (109.80 - 338.4)	91.69 (40.18 – 21.87)	0.249
MR-proANP (pmol/L)	179.5 (107.38 – 415.5)	75.55 (49.41 – 132.02)	0.019

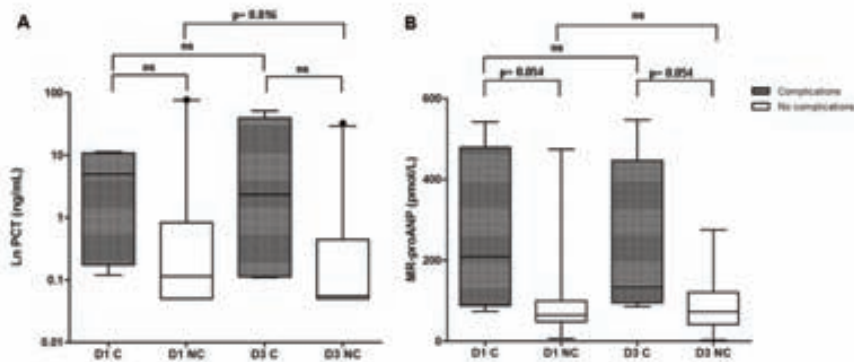


Figure 3. Box plot of PCT (ng/mL) (A) and MR-proANP (pmol/L) (B) levels on day 1 (D1) and day 3 (D3) according to the development of complications

Same analysis was performed for MR-proANP, but no significant differences were found. Levels of MR-proANP in patients without complications at D1 and D3 were 64.53 pmol/L (IQR 48.31- 110.2) and 73.11 pmol/L (IQR 40.92- 120.5), respectively. In patients developing complications, levels at D1 and D3 were (208.8 pmol/L, IQR 88.04-478.7) and (133.8 pmol/L, IQR 95.50-446.4). The comparison of PCT and MR-proANP levels at D1 and D3 according to the development of complications was also performed, and MR-proANP showed for both days significantly higher levels in those patients developing complications in comparison to those non-complicated ( $p=0.054$  and  $p=0.054$ ).

## DISCUSSION

In the last years, several systemic biomarkers have been evaluated in the field of infectious diseases. Particularly in LRTI, and more specifically in CAP and exacerbations of COPD, they have shown a potential utility in the assessment of etiology and severity [5, 34, 35].

In CAP, the etiological diagnosis is not achieved in a big number of cases. In fact, in our experience we have found that almost 60% of cases were of unknown origin. Blood cultures are positive in a low percentage of cases, and sometimes results are not obtained early enough [36]. In addition, sputum culture result is not a

gold standard because of the presence of tracheobronchial colonization in some groups of patients; and even well validated rapid test, such as the ICT assay for the detection of *S.pneumoniae* can be unspecific in patients with pneumococcal carriage, for example children and COPD patients [37, 38]. In addition, persistent excretion of *S.pneumoniae* urinary antigen has been described in patients with a previous recent diagnosis of pneumococcal pneumonia [39]. These are some of the reasons why it would be appropriate to have at one's disposal alternative useful tools for guiding etiological diagnosis. In this sense, systemic biomarkers might be a good approach.

In fact, PCT has a high accuracy to differentiate bacterial from nonbacterial causes [40]. In our experience, levels of PCT were significantly higher in those pneumonia cases with a bacterial definite diagnosis, confirming its ability to detect bacterial origin. In addition, as we showed in a previous work PCT levels reached elevated values in pneumococcal pneumonia, being higher when bacteraemic, being consistent with other studies [7, 24]. Although there are only 4 bacteraemic cases, PCT levels have shown a relationship with systemic infections [41, 42]. PCT is constitutively released during systemic bacterial infections, and this secretion is inhibited by IFN- $\gamma$ , key mediator during viral infections [43]. In fact, three interventional trials of PCT guided therapy in LRTI have



suggested that measuring PCT might help to assess the likelihood of bacterial infection and so reduce antibiotic prescriptions without negative effects on the patient's recovery [10, 44, 45]. Neopterin did not show any statistical difference when assessing etiological origin. However, in our previous experience neopterin showed elevated levels in *Legionella* and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia [7]. In the present study, there is only one case with *Legionella* or intracellular microorganism isolation, so it is reasonable to assume that this absence of statistical difference might exist. In fact, a relationship between neopterin levels and infections caused by intracellular bacteria and virus has already been found [8, 9]. In case of CRP which is one acute phase reactant, its levels increase in patients with various infections [40]. Whether CRP can be used for the etiological diagnosis of CAP has been extensively evaluated, but results have been discordant [22, 24, 25, 46, 47]. In case of MR-proANP there is no relationship with the etiological origin, as it has been described in previous studies, corroborating that MR-proANP levels reflect physiopathological dysfunction rather than etiology [27, 48, 49].

Regarding radiographic involvement, PCT, CRP and neopterin levels were higher in patients with multilobar pneumonia, although in our previous experience PCT correlated significantly with lobar involvement [7]. In contrast, in patients with pleural effusion, PCT, CRP and neopterin showed significant higher levels.

Pneumonia risk scores, such as PSI and CURB-65 are validated tools that classify patients according to the risk of death [2, 3]. These scores are greatly influenced by the presence of comorbidities and age but fail to assess the inflammatory host response to the infection. In addition, these score risks are designed to be assessed at the moment of hospital admission, and are not re-evaluated during the clinical course of the infection, so they cannot identify patients that need a therapeutic intervention or a change of therapy. To that effect, the use of systemic biomarkers could provide additional information, because these are dynamic and can be measured daily. Its synthesis and kinetics are

both related to the inflammatory host response and to the physiopathological aspects of infection.

Regarding PCT, its levels have shown a close relationship with the severity and prognosis of systemic infections [50]. Specifically in case of CAP, our results show that PCT correlates statistically with PSI classes, as described by other studies [7, 10, 51]. Interestingly, among the 34 patients classified as PSI IV, 20 of them had a PCT value  $<0.05$  ng/mL. This reinforces the fact that score risk index and inflammatory markers might mirror different aspects of the infection. In our study, regarding CURB-65 although median values were higher across risk classes, no statistical differences were found. However, in a study by Kruger et al, PCT levels at admission predicted the severity and outcome of CAP, with a similar prognostic accuracy as the modified index CRB65 [52]. PCT has also been regarded as a prognostic biomarker during CAP, as higher levels have been found in patients developing complications and dying, being in accordance with our results [7, 51, 53]. In our experience CRP was not able to accurately classify patients according to PSI. On the contrary, in a study by Hohenthal et al CRP correlated significantly with PSI and was valuable for assessing disease severity in CAP patients [25]. Our results confirm previous findings that have shown that MR-proANP correlates with PSI, CURB-65, the later development of complications and the length of hospitalization [27, 48, 49, 54, 55]. MR-proANP is involved in physiopathological changes that occur during infections, and this is one of the reasons why its levels are increased in patients with CAP. Specifically for this biomarker we have suggested a cut-off of 128.15 pmol/L for the prediction of complications and mortality. In our previous experience we determined a cut off of 139.7 pmol/L [27]. These values are similar to 135 pmol/L, a cut-off proposed by Claessens et al to discriminate admission requirement [54].

During pneumonia, the measurement of systemic biomarkers at admission has proved to improve the identification of patients with worse prognosis [5]. In this sense, the study of kinetics by means of serial measurement seems an opportunity to further evaluate

this prognostic value. CRP has been described as a valuable tool for pneumonia patient's follow-up, as levels decrease in accordance with clinical recovery [23, 25, 26, 56]. In our experience, levels of CRP also decreased although with no statistical differences. The same pattern was observed for neopterin. Bruns et al found that a delayed normalisation of CRP within the first 3-7 days of follow-up was suggestive of an inappropriate empirical antibiotic treatment [26]. The study of antibiotic appropriateness by means of PCT and CRP kinetics has also been evaluated in ICU patients with promising results [13, 14]. Boussekey et al, found that an increase of PCT levels from day 1 to day 3 in patients with severe CAP was a sign of poor prognosis [18]. In our experience, a significant decrease of PCT levels from day 1 to day 3 was observed in patients without complications, whereas for patients developing complications levels for both days remained similar. In the same direction, Menéndez et al found that low CRP and PCT levels at day 3 in addition to clinical criteria improved the identification of patients that would not develop complications [19]. Specifically in *Legionella* pneumonia De Jager et al found that CRP levels decreased independently of the clinical outcome while unfavourable clinical outcome seemed to be related to persistently elevated PCT levels [57].

Little is known about the usefulness of serial measurements of MR-proANP in pneumonia. Vazquez et al found in patients with LRTI that MR-proANP levels were lower on days 3, 5 and 7 in patients surviving in comparison to non-survivors [28]. In addition, they reported an increase over time in non-survivors, while in survivors levels were more stable or tended to decrease. All these observations are in accordance to our results, reinforcing the high prognostic value of MR-proANP in the management of pneumonia. In fact it is important to point out that patients with elevated values in serial measurements corresponded to patients that were admitted to ICU, or to non-survivors, or to patients belonging to high PSI classes or to patients developing complications different than the defined in the study, such as empyema.

This study has some limitations. First of all, study population included adult patients that were hospitalized; therefore a group of patients without any severe complications or etiologies more benign, such as *Mycoplasma pneumoniae* was not included. And secondly, serial sample collection was not always possible so the time elapsed between collection moment was not standardized for all patients. Nevertheless, despite these limitations our study provides important and new data about the usefulness of admission and serial biomarkers levels for the management of pneumonia.

In conclusion, PCT can be a useful tool for the identification of pneumonia etiology. In addition, PCT and MR-proANP levels correlate with validated risk scores such as PSI and CURB-65. Regarding the utility of serial measurements, we have shown that MR-proANP levels remain elevated in patients developing complications and in patients classified in high PSI and CURB-65 risk groups. Levels of PCT decreased along time in non complicated patients. Regarding mortality, all biomarkers analyzed were higher in non-survivors in comparison to survivors.

The association between severity of infection and serum levels of inflammatory and physiopathological markers could be important in terms of a successful identification of patients that might benefit from early intervention strategies. Therefore, for the clinical management of pneumonia an optimal complementary tool would be a panel of biomarkers, each one reflecting different aspects of the infection itself. However further research is necessary in order to better define biomarkers exact role and cut off values according to study population.

**Conflicts of Interest Disclosure.** No company had a role in the design or conducting of the study, collection, management, or interpretation of the data, preparation, review, or approval of this manuscript. The authors have no conflict of interest, including specific financial interests or relationships or affiliations to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

**Acknowledgments.** We thank R. Menéndez for providing us the computerized database from patients included at Hospital Universitari Germans Trias i Pujol in the framework of NAC-CALIDAD project of the “Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica”. We also thank Microbiology Laboratory technicians of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Oriol Martos for technical assistance. Statistical analysis was performed at Statistics Service (Universitat Autònoma de Barcelona) by O. Valero. J. Domínguez is a researcher of the “Miguel Servet” programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

## REFERENCES

- 1 Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, *et al.* Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; **44 Suppl 2**: S27-72.
- 2 Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, *et al.* A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; **336**: 243-50.
- 3 Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, *et al.* Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 2003; **58**: 377-82.
- 4 Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med* 2005; **26**: 1-9.
- 5 Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J* 2007; **30**: 556-73.
- 6 Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, Hartmann O, Suttrop N, Welte T. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **182**: 1426-34.
- 7 Prat C, Dominguez J, Andreo F, *et al.* Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; **52**: 169-77.
- 8 Ip M, Rainer TH, Lee N, *et al.* Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59**: 131-6.
- 9 Rainer TH, Chan CP, Leung MF, *et al.* Diagnostic utility of CRP to neopterin ratio in patients with acute respiratory tract infections. *J Infect* 2009; **58**: 123-30.
- 10 Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, *et al.* Procalcitonin Guidance of Antibiotic Therapy in Community-acquired Pneumonia: A Randomized Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**: 84-93.
- 11 Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, *et al.* Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003; **22**: 963-8.
- 12 Menendez R, Martinez R, Reyes S, *et al.* Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009; **64**: 587-91.
- 13 Charles PE, Tinel C, Barbar S, *et al.* Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care* 2009; **13**: R38.
- 14 Venkatesh B, Kennedy P, Kruger PS, Looke D, Jones M, Hall J, Barruel GR. Changes in serum procalcitonin and C-reactive protein following antimicrobial therapy as a guide to antibiotic duration in the critically ill: a prospective evaluation. *Anaesth Intensive Care* 2009; **37**: 20-6.
- 15 Becker KL, Nylen ES, White JC, Muller B, Snider RH, Jr. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 1512-25.
- 16 Muller B, Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12 (Suppl 9)**: 8-16.
- 17 Tang H, Huang T, Jing J, Shen H, Cui W. Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: a systematic review and meta-analysis. *Infection* 2009; **37**: 497-507.

- 18 Boussekey N, Leroy O, Alfandari S, Devos P, Georges H, Guery B. Procalcitonin kinetics in the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2006; **32**: 469-72.
- 19 Menendez R, Martinez R, Reyes S, *et al.* Stability in community-acquired pneumonia: one step forward with markers? *Thorax* 2009; **64**: 987-92.
- 20 Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001; **26**: 319-29.
- 21 Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med* 1999; **17**: 1019-25.
- 22 Almirall J, Bolibar I, Toran P, Pera G, Boquet X, Balanzo X, Sauca G. Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 2004; **125**: 1335-42.
- 23 Smith RP, Lipworth BJ, Cree IA, Spiers EM, Winter JH. C-reactive protein. A clinical marker in community-acquired pneumonia. *Chest* 1995; **108**: 1288-91.
- 24 Hedlund J, Hansson LO. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000; **28**: 68-73.
- 25 Hohenthal U, Hurme S, Helenius H, Heiro M, Meurman O, Nikoskelainen J, Kotilainen P. Utility of C-reactive protein in assessing the disease severity and complications of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 1026-32.
- 26 Bruns AH, Oosterheert JJ, Hak E, Hoepelman AI. Usefulness of consecutive C-reactive protein measurements in follow-up of severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2008; **32**: 726-32.
- 27 Prat C, Lacoma A, Dominguez J, *et al.* Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect* 2007; **55**: 400-7.
- 28 Vazquez M, Jockers K, Christ-Crain M, Zimmerli W, Muller B, Schuetz P. MR-pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) predicts short- and long-term outcomes in respiratory tract infections: A prospective validation study. *Int J Cardiol* 2010.
- 29 Lacoma A, Prat C, Andreo F, *et al.* Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 2011; **412**: 470-5.
- 30 Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; **119**: 243-9.
- 31 Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Assessment of a new test to detect Legionella urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; **41**: 199-203.
- 32 Andreo F, Dominguez J, Ruiz J, *et al.* Impact of rapid urine antigen tests to determine the etiology of community-acquired pneumonia in adults. *Respir Med* 2006; **100**: 884-91.
- 33 Schuetz P, Christ-Crain M, Huber AR, Muller B. Long-term stability of procalcitonin in frozen samples and comparison of Kryptor and VIDAS automated immunoassays. *Clin Biochem* 2010; **43**: 341-4.
- 34 Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; **18**: 96-104.
- 35 Lacoma A, Prat C, Andreo F, Lores L, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Dominguez J. Value of procalcitonin, C-reactive protein and neopterin in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis Accepted* 2011; **6**: 157-69.
- 36 Waterer GW, Wunderink RG. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. *Respir Med* 2001; **95**: 78-82.
- 37 Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, *et al.* Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respir Med* 2010; **104**: 397-403.
- 38 Dominguez J, Blanco S, Rodrigo C, *et al.* Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 2161-3.
- 39 Andreo F, Prat C, Ruiz J, *et al.* Persistence of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen excretion

- after pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol* 2008; **28**: 197-201.
- 40 Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 206-17.
- 41 Muller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, Krause M, Zimmerli W, Mueller B, Schuetz P. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. *Chest* 2010; **138**: 121-9.
- 42 Tudela P, Lacombe A, Prat C, Modol J, Gimenez M, Barallat J, Tor J. Prediction of bacteremia in patients with suspicion of infection in emergency room. *Med Clin* 2010; **135**: 685-90.
- 43 Linscheid P, Seboek D, Nysten ES, *et al*. In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue. *Endocrinology* 2003; **144**: 5578-84.
- 44 Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, Muller B. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004; **363**: 600-7.
- 45 Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, *et al*. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007; **131**: 9-19.
- 46 Ortqvist A, Hedlund J, Wretling B, Carlstrom A, Kalin M. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1995; **27**: 457-62.
- 47 Garcia Vazquez E, Martinez JA, Mensa J, Sanchez F, Marcos MA, de Roux A, Torres A. C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2003; **21**: 702-5.
- 48 Masia M, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Hernandez I, Shum C, Gutierrez F. Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal pro-vasopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 2007; **53**: 2193-201.
- 49 Muller B, Suess E, Schuetz P, *et al*. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* 2006; **260**: 568-76.
- 50 Schuetz P, Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Curr Opin Crit Care* 2007; **13**: 578-85.
- 51 Masia M, Gutierrez F, Shum C, Padilla S, Navarro JC, Flores E, Hernandez I. Usefulness of procalcitonin levels in community-acquired pneumonia according to the patients outcome research team pneumonia severity index. *Chest* 2005; **128**: 2223-9.
- 52 Kruger S, Ewig S, Marre R, *et al*. Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes. *Eur Respir J* 2008; **31**: 349-55.
- 53 Schuetz P, Widmer I, Chaudri A, Christ-Crain M, Zimmerli W, Mueller B. Prognostic value of procalcitonin in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2010.
- 54 Claessens YE, Mathevon T, Kierzek G, *et al*. Accuracy of C-reactive protein, procalcitonin, and mid-regional pro-atrial natriuretic peptide to guide site of care of community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2010; **36**: 799-809.
- 55 Kruger S, Ewig S, Kunde J, Hartmann O, Suttrop N, Welte T. Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin for predicting short-term and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German Competence Network CAPNETZ. *Thorax* 2010; **65**: 208-14.
- 56 Menendez R, Cavalcanti M, Reyes S, *et al*. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax* 2008; **63**: 447-52.
- 57 de Jager CP, de Wit NC, Weers-Pothoff G, van der Poll T, Wever PC. Procalcitonin kinetics in *Legionella pneumophila* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 1020-5.



### 4.3. Article 3

**Inflammatory and cardiovascular biomarkers to assess the etiology and the severity of lower respiratory tract infections.  
Correlation with new pneumonia severity scores.**

Alicia Lacoma, Albert Bas, Pere Tudela, Montse Giménez, Josep Maria Mòdol,  
Miguel Pérez, Vicente Ausina, Jose Dominguez, Cristina Prat.  
*Annals of Emergency Medicine* 2011. *Submitted*

Els objectius d'aquest treball han estat establir si existeixen diferències en els nivells de PCT, PCR, neopterina, MR-proANP i MR-proADM en pacients amb pneumònia en comparació amb altres infeccions de vies respiratòries baixes, i d'altra banda determinar si específicament en el cas de la pneumònia els nivells de biomarcadors correlacionen amb els índexs de severitat: PSI, CURB-65, SCAP, SMART-COP i amb el desenvolupament de complicacions, definit com a ingrés a UCI o decés.

La població d'estudi està formada per pacients admesos a urgències amb febre i símptomes d'infecció de vies baixes, i en els que per sospita de sèpsia se'ls va extreure hemocultius. De forma retrospectiva, els pacients es van classificar en 3 grups: pneumònia (n=85), exacerbacions de la MPOC (n=25) i infeccions bronquials en pacients sense pneumopatia (n=52). Els nivells de PCT i MR-proADM van ser significativament més elevats en els casos de pneumònia en comparació amb les exacerbacions de la MPOC i les infeccions bronquials. En els casos de diagnòstic bacterià de seguretat, els nivells de PCT i MR-proADM són significativament superiors, en comparació amb la resta de diagnòstics. En considerar només els pacients amb pneumònia, els nivells de MR-proANP i MR-proADM s'incrementen amb el PSI i el CURB-65. Els nivells d'aquests biomarcadors són significativament superiors en pacients classificats com a alt risc segons SCAP i SMART-CO en comparació amb els de baix risc. En considerar SMART-COP, cap biomarcador va correlacionar. Els nivells de neopterina i MR-proADM van ser significativament superiors en els pacients que van desenvolupar algun tipus de complicació. La determinació de biomarcadors pot ser útil per assolir un diagnòstic diferencial de forma precoç en pacients admesos a Urgències amb signes clínics inespecífics d'infecció respiratòria. En pacients amb pneumònia, els nivells de biomarcadors són superiors en pacients classificats com alt risc, així com en pacients amb pronòstic a curt termini desfavorable.





## Inflammatory and cardiovascular biomarkers to assess the etiology and the severity of lower respiratory tract infections. Correlation with new pneumonia severity scores.

Alicia Lacomá<sup>1,3</sup>, Albert Bas<sup>1</sup>, Pere Tudela<sup>2</sup>, Montse Giménez<sup>1</sup>, Josep Maria Mòdol<sup>2</sup>, Miguel Pérez<sup>1</sup>, Vicente Ausina<sup>1,3</sup>, Jose Domínguez<sup>1,3</sup>, Cristina Prat<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Servei de Microbiologia. <sup>2</sup> Unitat de Curta Estada-Urgències. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. <sup>3</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias. Instituto de Salud Carlos III. Badalona. Spain.

Correspondance to: Cristina Prat. Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Phone: +34 93 497 88 94. Fax: +34 93 497 88 95. E-mail: cprat.germanstrias@gencat.cat

**Objectives.** To assess if there are differences in levels of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), neopterin, mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) and mid regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) in patients with pneumonia with respect to other lower respiratory tract infections (LRTI). And specifically in patients with community acquired pneumonia (CAP) to correlate admission levels with the etiology and the severity risk scores: PSI, CURB65, severe CAP (SCAP), SMART-COP as well as short term prognosis.

**Methods.** Inclusion criteria were patients with fever and symptoms of LRTI admitted in emergency room (ER) and from whom blood cultures were drawn. After retrospective analysis, patients were classified as: pneumonia (n=85), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbation (n=25) and bronchial infection (n=52). Epidemiological, clinical, microbiological, analytical and radiological data were recorded. Plasma samples were collected at admission. Patients were stratified according to the PSI, CURB65, SCAP and SMART-COP and according to the development of complications

**Results.** PCT and MR-proADM showed significantly higher levels in pneumonia when comparing with COPD exacerbation (p=0.003 and p=0.014) and bronchial infection (p=0.002 and p=0.006). PCT and MR-proADM showed significantly higher levels in cases of definite bacterial diagnosis in comparison to other cases (p=0.017 and p=0.004). MR-proANP and MR-proADM levels increased statistically according to PSI (p=0.001 and p=0.001) and CURB-65 (p=0.001 and p=0.001). MR-proANP (p=0.010) and MR-proADM (p<0.0001) showed significantly higher levels in high risk SCAP group in comparison to low risk. When considering SMART-COP none of the biomarkers showed statistical differences. MR-proADM levels were higher in patients with high risk of needing intensive respiratory or vasopressor support in comparison to very low (p=0.003) and low risk (p=0.015) according to SMRT-CO. Neopterin (p=0.030) and MR-proADM (p=0.044) were significantly higher in patients that developed complications.

**Conclusions.** Biomarkers measurement can be helpful for an early differential diagnosis in patients admitted in ER with unspecific clinical signs of LRTI. Biomarker levels are higher in patients with a poorer prognosis according to risk scores and to the development of complications.

### INTRODUCTION

A correct clinical management of patients with fever and symptoms of lower respiratory tract infection (LRTI) in emergency room (ER) is a complex issue. In order to make clinical decisions such as therapy and initial site of care, it is important to differentiate bacterial pneumonia from other causes of LRTI, such as exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial infection. This is particularly difficult in patients with an important degree of

comorbidity and in the elderly, since clinical presentation of pneumonia may resemble an exacerbation of the chronic disease, and clinical symptoms may be unspecific, [1]. In addition, in these cases the radiographic signs might be also more difficult to interpret.

Regarding the assessment of severity, in the field of community-acquired pneumonia (CAP), several prognostic scores have been developed in order to

assess the risk of death and development of complications. The Pneumonia Severity Index (PSI) [2] and CURB-65 (confusion, urea, respiratory rate, blood pressure and age) [3] are the most commonly validated rules for predicting mortality. PSI stratifies patients into five groups, each with a different estimated risk of death. This complex system includes demographic factors, clinical history and physical examination, analytical and radiographic findings. CURB-65 is simpler to calculate, as it includes only 5 variables. This six point score also classifies patients into 3 groups according to the risk of death. However these scores are not able to predict the outcome once the treatment has been initiated.

Recently, two new score risks have also been developed in the field of CAP: severe CAP (SCAP) and SMART-COP. España et al developed the SCAP rule for identifying patients with severe CAP who are at risk for an adverse outcome and might need intensive care unit (ICU) admission [4]. This index combines 2 major and 6 minor criteria, each with its corresponding score points. Another risk score recently defined by the Australian CAP study is the SMART-COP that combines 8 clinical and biochemical features: systolic blood pressure, multilobar chest radiography involvement, albumin, respiratory rate, tachycardia, confusion, oxygenation, and arterial pH [5]. This tool has been mainly designed for the prediction of patients with CAP that are likely to require intensive respiratory or vasopressor support (IRVS).

In general, severity rules developed for pneumonia consider several clinical, analytical and radiological findings that jointly reflect patient's general condition. In the last years, it has become more evident that it is also important to consider host inflammatory and cardiovascular response to an infection. In this sense, in the field of CAP, several systemic biomarkers for differential diagnosis and for assessment of severity have been evaluated with promising results [6].

Procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP) and neopterin are an example of biomarkers that can be useful for the management of patients with pneumonia,

as a correlation with the etiological origin and the pneumonia severity has been demonstrated [7-9].

Biomarkers reflecting cardiovascular impairment (including endothelial dysfunction and volume homeostasis) have also emerged as useful tools for the management of respiratory tract infections. Adrenomedullin (ADM) is a member of the CALC-gene family and has potent vasodilating, immune modulating and metabolic properties [10, 11]. Furthermore, this peptide has also antimicrobial capabilities, probably as part of the mucosal defence of the innate immune system [12-14]. It is present in cardiovascular and endocrine tissues but also in the surface mucosal epithelia of the digestive, respiratory and reproductive systems [15]. Specific metabolic conditions such as hypoxia, oxidative stress and sepsis upregulate adrenomedullin production [16]. ADM is rapidly cleared so its concentration is measured indirectly by detecting a stable precursor, named mid regional pro-ADM (MR-proADM). Initial studies have shown that MR-proADM is a novel biomarker with prognostic value for cardiovascular diseases but also helpful for sepsis management and for the stratification of patients with pneumonia [17, 18].

Atrial natriuretic peptide (ANP) is synthesized by cardiac atrial myocytes. Stimuli for natriuretic peptides production are multiple, such as proinflammatory factors, hypoxia and conditions of increased cardiac pressure and volume overload, being wall stretch the most important stimulus for its synthesis and secretion [19, 20]. Biochemical assays aim specifically at the mid-region of the precursor (MR-proANP) [21]. MR-proANP is the stable C-terminal fragment of the ANP precursor and has been evaluated as a severity and prognostic marker in lower respiratory tract infections, especially during community acquired pneumonia [22, 23] but also COPD [24]. In the field of CAP, levels of MR-proADM and MR-proANP have correlated with widely validated score risks, such as PSI, CURB-65 and the simpler CRB-65. However little is known about how these biomarkers correlate with the new defined severity rules: SCAP and SMART-COP.

The objectives of this study are three-fold: first to assess if biomarkers (PCT, CRP, neopterin, MR-proANP and MR-proADM) levels at admission can differentiate pneumonia from other LRTI in patients with suspicion of bacterial LRTI; second to study whether biomarkers might identify definite bacterial etiology and finally and specifically in pneumonia cases if biomarkers levels correlate with severity and prognosis assessed by means of risk scores.

## MATERIAL AND METHODS

**Setting and study population.** Population consists of patients with suspicion of systemic bacterial infection that consulted the medical area of the ER (excluding surgical, gynecological and pediatric areas) and from whom blood cultures were obtained. Patients were consecutively included from 1<sup>st</sup> March to 30<sup>th</sup> April 2009. Patients were followed up for 30 days after admission. Samples from 412 patients were collected, and after retrospective analysis 85 patients were considered to have presented with pneumonia, 25 patients had COPD exacerbation and 52 had other respiratory bronchial infections. Final diagnosis was set according to the clinical judgment mentioned in the emergency and hospital medical files, or in the records of outpatient care. Pneumonia was defined by clinical (presence of fever, cough, dyspnea) and radiographic signs (pneumonic infiltrate in the chest radiograph), as well as clinical evolution, assessed by experts clinicians and radiologists [25]. The presence of COPD was based on clinical history, physical examination findings, and spirometric criteria [26]. A COPD exacerbation was defined as an acute worsening of the patient's condition from stable state and beyond normal day-to-day variations, acute in onset and necessitating a change in regular medication [27]. Bronchial infection was defined as presence of clinical respiratory symptoms and no pneumonic infiltrate in chest X-ray, in patients with no history of chronic pulmonary diseases.

Epidemiological, clinical, microbiological, analytical and radiological data were recorded from all cases. Charlson index was also calculated for each patient [28]. Patients were stratified according to the PSI, CURB65, SCAP and SMART-COP [2-5]. For patients

that did not have arterial blood gas, if oxygen saturation levels were > 95% at room air, and physical examination data reported that the patient was eupneic missing values for PSI were set to normal. SMART-COP was calculated if all variables were available. SMRT-CO was applied in cases when either one of the following variables was not recorded: albumin, arterial pH, or P<sub>O</sub><sub>2</sub>. Complications were defined as: respiratory failure/ shock, need of ICU admission and death.

**Microbiological investigations.** At the time of arrival to the ER, samples were collected for microbiological diagnosis: blood cultures, respiratory specimens for culture and urine for antigen detection. Pneumococcal pneumonia was diagnosed by isolation of *Streptococcus pneumoniae* from blood and/or pleural effusion culture and/ or by detection of polysaccharide capsular antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis for patients diagnosed of COPD or detection of C-polysaccharide antigen by immunochromatography (Binax Now *S.pneumoniae* urinary antigen test. Binax. Maine.USA) [29, 30]. *Legionella* pneumonia was diagnosed by urinary antigen detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by enzyme immunoassay (Bartels EIA *Legionella* urinary antigen, Trinity Biotech Company, Ireland) or microorganism isolation in respiratory sample. Definite bacterial origin also included cases with isolation of a microorganism different from *S.pneumoniae* from blood culture and/or pleural effusion culture. The isolation of a predominant microorganism in the sputum samples was considered as probable etiology and not as a definite diagnosis.

**Biomarkers measurements.** Plasma sample per patient were collected at admission. All samples were stored at -20°C until biomarkers measurements. CRP was measured in serum samples by turbidimetric assay (RCRP, Siemens Dimension Rxl Max, Siemens, Germany). PCT, MR-proANP and MR-proADM were measured with an immunofluorescent assay (KRYPTOR BRAHMS AG, Germany). Neopterin levels were measured with a competitive immunoassay following the manufacturer's instructions (Neopterin ELISA, IBL, Germany).

**Statistical analysis.** Categorical variables are expressed as counts (percentages) and continuous variables as mean and standard deviation (SD) or by median and interquartile range (IQR), as appropriate. Biomarkers levels are expressed as median and IQR. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation. The  $\chi^2$ -test was used to compare qualitative variables. In case of quantitative variables, Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis were used as appropriate. To assess the accuracy of biomarkers for predicting the development of complications, including mortality, we performed receiver operating characteristic curves and determined the area under the curve (AUC), standard error (SE) and 95% confidence interval (95%CI). Associations were considered statistically significant if p value <0.05. The commercial statistical software package used was SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Study population

After retrospective analysis, 162 patients had a final diagnosis of respiratory infection and were classified in three groups: pneumonia (n=85), COPD exacerbation (n=25) and bronchial infection (n=52). Mean age was 68.09 (SD 1.33). PCT (p=0.001), CRP (p=0.008) and MR-proADM (p=0.006) showed significant differences when comparing levels in the three groups while no differences were found for MR-proANP and neopterin. Specifically, PCT showed significantly higher levels in pneumonia patients when comparing with COPD exacerbation (p=0.003), and bronchial infection (p=0.002). Levels of PCT were similar in COPD exacerbation and bronchial infection groups (p=0.446). CRP only showed significantly higher levels when comparing pneumonia group vs bronchial infection (p=0.002). Finally, MR-proADM showed statistical higher levels when comparing pneumonia group with COPD exacerbation (p=0.014) and bronchial infection (p=0.006). The comparison between the three groups only found statistical differences for gender (p=0.005), and previous treatment with corticosteroids (p=0.007), whereas for age (p=0.562) and for Charlson index

(grouped as <2 or ≥2) (p=0.329) no differences were observed. In Table 1 are shown patient's characteristics with final diagnosis of pneumonia. Regarding biomarkers, no significant differences were found when comparing patients according to previous antibiotic and corticosteroid therapy. Patients with congestive heart failure had higher levels of MR-proANP and MR-proADM (p<0.0001 and p=0.056, respectively). Regarding renal disease, levels of neopterin and MR-proANP were significantly higher (p=0.006, p=0.024). Neopterin levels were nearly significantly higher in patients with COPD as comorbidity (p=0.058). No significant differences were found when considering biomarkers levels and Charlson index classified as <1 and ≥2.

### Etiological diagnosis and radiographic involvement

Microbiological results are shown in Table 2. PCT (p=0.017) and MR-proADM (p=0.004) levels were significantly higher in cases of definite bacterial origin (n=22) in comparison to other cases: pneumonia cases of probable or unknown origin (n=63), COPD exacerbations (n=25) and bronchial infections (n=52).

Table 1. Characteristics of patients with a final diagnosis of pneumonia.

Characteristics	N	%
Men	59	69.4
Women	26	30.6
Inpatient	74	87
Coexisting illnesses		
Neoplasia	30	35.3
Liver disease	7	8.2
Congestive heart failure	19	22.4
Cerebrovascular disease	9	10.6
Renal disease	11	12.9
COPD	23	27.1
HIV	7	8.2
Previous antibiotic treatment	16	18.8
Previous corticosteroid therapy	25	29.4
Inhaled	15	60
Oral	10	40
Radiographic findings		
Pleural effusion	10	11.7
Multilobar	13	15.3
ICU admission	3	3.6
Death	8	9.4

Table 2. Microorganisms isolated in the three study groups.

Study group	Etiology	N	
Pneumonia (n=85)	Definite diagnosis <sup>a</sup>	22	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16	
	viridans group streptococci	2	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	
	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	2	
	Probable diagnosis <sup>d</sup>	12	
	<i>S.pneumoniae</i>	6	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	3	
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	
Other gram negative	2		
Unknown origin		51	
	<i>P. aeruginosa</i>	1	
Bronchial infection <sup>d</sup> (n=52)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	
	<i>H. influenzae</i>	1	
	<i>S.pneumoniae</i>	1	
	<i>P. aeruginosa</i>	1	
COPD exacerbation (n=25)	<i>S. aureus</i>	1	
	<i>H. influenzae</i>	1	
	<i>S.pneumoniae</i> and <i>H. influenzae</i>	1	

<sup>a</sup> blood culture/ urinary antigen detection/pleural effusion. <sup>b</sup> 3 blood culture positive and 1 pleural effusion. <sup>c</sup> *S.mitis* and *S.anginosus* isolated in blood culture and pleural effusion culture, respectively. <sup>d</sup> Isolation of the microorganism only in the sputum samples.

Specifically in pneumonia patients, PCT and MR-proADM showed significantly higher levels in cases of definite bacterial diagnosis in comparison to cases of probable bacterial origin (p=0.044 and p=0.028, respectively). If assembling cases of probable bacterial diagnosis and unknown origin, MR-proADM was the only biomarker that still showed a nearly significant difference when comparing to definite diagnosis group (p=0.059). A total of 6 blood cultures were positive: 3 for *S.pneumoniae*, 1 for *Streptococcus mitis*, 1 for *Klebsiella pneumoniae*, and 1 for *Pseudomonas aeruginosa*. Levels of MR-proADM were nearly significantly higher in patients with documented bacteremia in comparison to negative blood culture results (p=0.053).

In 13 cases there was multilobar involvement and neopterin was the only biomarker that showed significantly higher levels (p=0.011). Although there were no statistical differences, all biomarkers were higher in patients with pleural effusion.

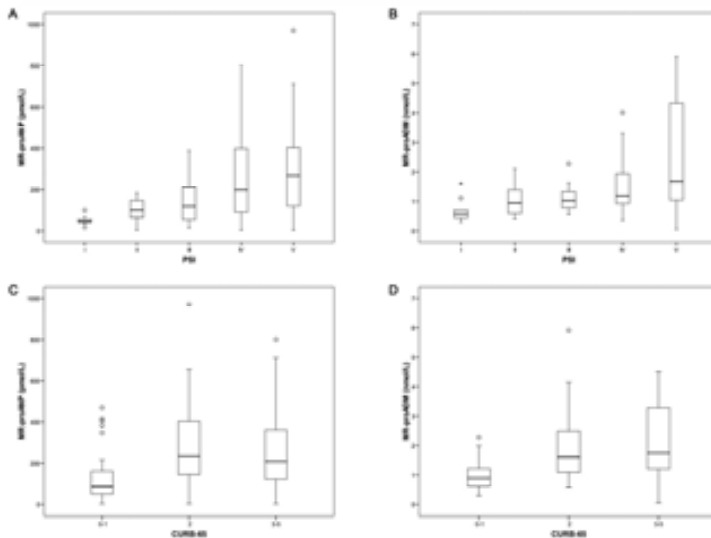


Figure 1. Levels of MR-proANP and MR-proADM according to PSI [(A) and (B)] and CURB65 [(C) and (D)].

### Severity scores and development of complications

Pneumonia patients were classified according to the PSI. MR-proANP and MR-proADM showed significant differences across groups ( $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively) and higher levels were found in high risk (IV-V) groups in comparison to low risk groups (I-III) ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). PCT, CRP and neopterin did not show any significant difference. MR-proANP and MR-proADM levels increased statistically with CURB-65 ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). If grouping patients into three groups (0-1, 2, 3-5 points), MR-proANP and MR-proADM kept statistical differences ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively) and neopterin almost reached statistical significance ( $p = 0.057$ ). In Figure 1 are shown MR-proANP and MR-proADM levels according to PSI and CURB-65.

SCAP score was also assessed for all patients. Thirty patients had SCAP criteria and showed higher levels of MR-proANP ( $p = 0.002$ ), MR-proADM ( $p = 0.001$ ), neopterin ( $p = 0.011$ ) and PCT ( $p = 0.069$ ) while for CRP levels no differences were found ( $p = 0.549$ ). When considering all pneumonia patients, regardless of SCAP criteria, MR-proANP ( $p = 0.015$ ), MR-proADM ( $p = 0.001$ ) and neopterin ( $p = 0.058$ ) showed statistical differences across the five SCAP risk groups. SCAP score can also

be classified according to low (0-9 points), intermediate (10-19) and high risk ( $\geq 20$ ). PCT ( $p = 0.010$ ), neopterin ( $p = 0.003$ ), MR-proANP ( $p = 0.010$ ) and MR-proADM ( $p < 0.0001$ ) showed higher levels in high risk group in comparison to low risk (Figure 2). MR-proANP ( $p = 0.049$ ) and MR-proADM ( $p = 0.051$ ) also presented higher levels in intermediate risk in comparison to low risk. Twenty-eight patients had SMART-COP index calculated whereas 57 patients had the modified version: SMRT-CO. When considering SMART-COP none of the biomarkers showed statistical differences. However neopterin levels were significantly higher in patients with  $\geq 3$  points in comparison to patients with  $< 3$  ( $p = 0.021$ ). For patients with SMRT-CO, MR-proADM was the only biomarker that showed significant differences across score groups ( $p = 0.050$ ). Specifically MR-proADM levels were higher in patients with high risk of needing IRVS in comparison to very low ( $p = 0.003$ ) and low risk ( $p = 0.015$ ). Patients with  $\geq 2$  points had significantly higher levels of PCT ( $p = 0.030$ ), CRP ( $p = 0.040$ ) and MR-proADM ( $p = 0.030$ ), whereas for neopterin ( $p = 0.154$ ) and MR-proANP ( $p = 0.141$ ) no statistical differences were found (Figure 3). In Table 3 are shown the frequencies of patients according to the risk scores considered.

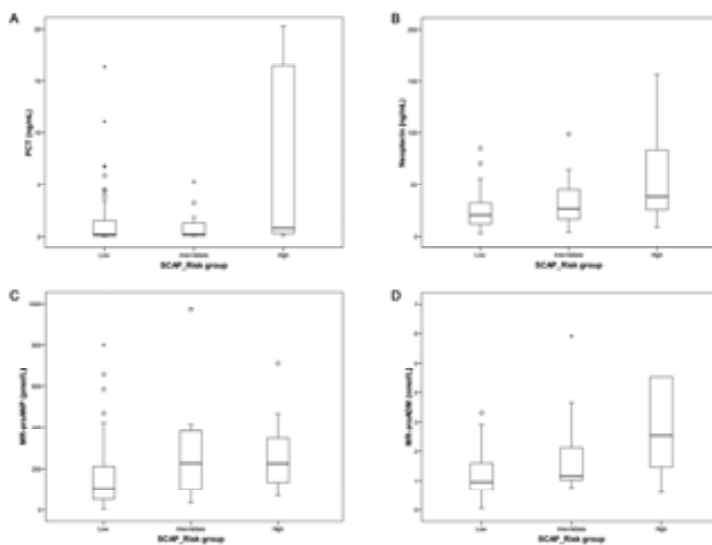


Figure 2. PCT (A), neopterin (B), MR-proANP (C) and MR-proADM (D) levels according to SCAP score.

Table 3. Distribution of patients according to the score results and the development of complications.

Score index	N (%)	Complications (N=9)	ICU (N=3)	Exitus (N=8)
<b>PSI</b>				
I	9 (10.6)	-	-	-
II	10 (11.8)	1	-	1
III	14 (16.5)	-	-	-
IV	32 (37.6)	3	1	2
V	20 (23.5)	5	2	5
I-III	33 (38.8)	1	-	1
IV-V	52 (61.2)	8	3	7
<b>CURB-65</b>				
0	20 (23.5)	1	-	1
1	24 (28.2)	1	-	1
2	24 (28.2)	3	1	3
3	11 (12.9)	1	1	1
4	5 (5.9)	2	1	1
5	1 (1.2)	1	-	1
0-1	44 (51.8)	2	-	2
2	24 (28.2)	3	1	3
3-5	17 (20)	4	2	3
<b>SCAP</b>				
0	55 (64.7)	2	-	3
1-9	2 (2.4)	-	-	-
10-19	14 (16.5)	1	-	1
20-29	11 (12.9)	5	3	3
>30	3 (3.5)	1	-	1
0-9	57 (67.1)	2	-	3
10-19	14 (16.5)	1	-	1
≥20	14 (16.5)	6	3	4
<b>SMART-COP</b>				
0-2	14 (50)	1	-	1
3-4	7 (25)	-	-	-
5-6	6 (21.4)	3	2	2
≥7	1 (3.6)	1	-	1
<3	14 (50)	1	-	1
≥3	14 (50)	4	2	3
<b>SMRT-CO</b>				
0	34 (59.6)	-	-	-
1	15 (26.3)	2	-	2
2	6 (10.5)	1	-	2
3	2 (3.5)	1	1	-
≥4	-	-	-	-
<2	49 (86)	2	-	2
≥2	8 (14)	2	1	2

Length of hospitalisation (±SD) was 9.6±10.27 days and no correlation was found for any biomarker. Ten patients developed respiratory failure/shock, 3 being admitted in ICU and 7 dying. Levels of PCT (p=0.053), neopterin (p=0.003) and MR-proADM (p=0.001) were higher in patients admitted to ICU (n=3). Globally 9 patients developed complications, defined as ICU admission and/or exitus due to respiratory failure/ shock and statistically higher levels of neopterin (p=0.030) and MR-proADM (p=0.044) were found. The AUC (SE, 95%IC) to predict development of complications according to MR-proADM was 0.706 (0.11, 0.491-

0.922). A cut-off of 0.95 nmol/L had a sensitivity and specificity of 77.8% and 39.5%, respectively. A cut-off of 1.50 nmol/L had a sensitivity and specificity of 66.7% and 65.8%, respectively. In Table 3 is shown the corresponding severity index for patients considered to have developed complications. Levels of all biomarkers, except CRP were higher in non-survivors (n=8) in comparison to survivors, although without statistical differences (Table 4). Regarding the two groups of patients without pneumonia, only one patient that had bronchial infection required ICU admission due to respiratory failure.

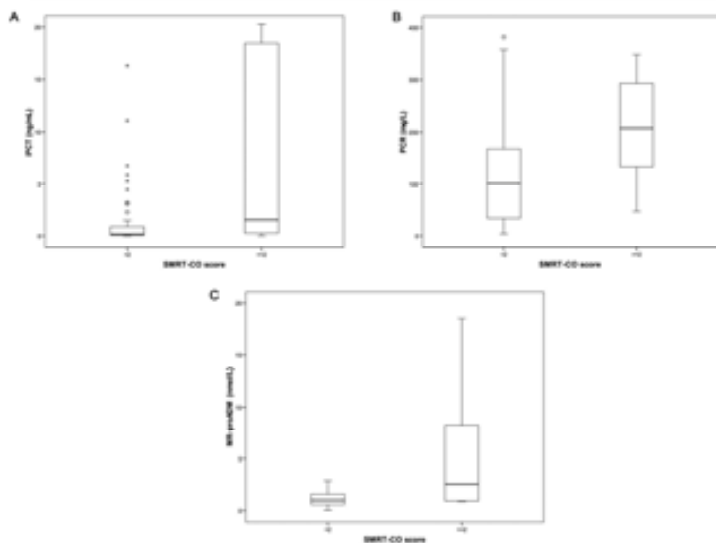


Figure 3. Levels of PCT (A), CRP (B) and MR-proADM (C) according to SMRT-CO score.

## DISCUSSION

In the management of patients admitted in the ER with fever and clinical respiratory symptoms suggestive of lower respiratory infection, it is important to reach a final diagnosis because antibiotic treatment and hospitalization options might be different. In our study, LRTI considered were: CAP, COPD exacerbation and bronchial infection. In some cases it is difficult to differentiate these clinical entities because clinical signs are unspecific and X-ray may be already pathological, especially in the elderly and in COPD patients [1]. In this setting, to have at one's disposal a tool that might help differentiating earlier these diagnoses seems a good alternative.

Our results show that PCT and MR-proADM levels are higher in patients with pneumonia in comparison to COPD exacerbations and bronchial infections. Both biomarkers belong to the calcitonin gene family and are widely and extensively synthesized during severe infections [31]. In fact, CAP of bacterial origin is a proven infection that triggers an important inflammatory response due to the presence of bacterial endotoxins and pro-inflammatory cytokines [32]. In our previous experience with COPD patients, PCT levels were also

significantly higher in patients with diagnosis of CAP than in patients undergoing an exacerbation [33]. PCT and MR-proADM levels were similar between COPD exacerbation and bronchial infections. These infections might be locally restricted, and do not set off an important inflammatory response. CRP only showed significantly higher levels when comparing CAP with bronchial infections, whereas neopterin did not show any significant difference. CRP levels are increased in COPD patients regardless of the presence of an exacerbation or pneumonia, and maybe this is one of the reasons why no statistical difference are found when comparing levels of exacerbated patients [34].

The identification of definite bacterial origin has direct implications in antibiotic treatment decisions. PCT and MR-proADM showed significantly higher levels in cases of definite bacterial diagnosis in comparison to other cases: pneumonia of probable bacterial or unknown origin, COPD exacerbations and bronchial infections. This reinforces the fact that these two biomarkers have a strong relationship with bacterial etiology. PCT has been extensively evaluated as a biomarker for bacterial infections in different clinical settings, including LRTI [7, 35-38].



Table 4. Levels of biomarkers in non-survivors and survivors patients with diagnosis of pneumonia.

Biomarker	Non-survivors	Survivors	p
PCT (ng/mL)	0.36 (0.06-12.6)	0.24 (0.09-2)	0.976
Neopterin (ng/mL)	27.14 (17.08-98.2)	22.9 (12.46-40.1)	0.306
CRP (mg/L)	77 (54.5-224.5)	119 (41-178)	0.839
MR-proANP (pmol/L)	186.4 (106.37-327.2)	134.6 (60-272.8)	0.662
MR-proADM (nmol/L)	1.28 (0.88-3.93)	1.1 (0.76-1.8)	0.399

In a recent study by Tudela et al, we described a clinical model that enabled the identification of patients with very low risk of bacteremia (0-3%) admitted to the ER combining PCT <0.4 ng/mL and Charlson index <1 [39]. A similar approach was developed by Müller et al, that found that initial PCT accurately predicted blood culture positivity in patients with CAP [38]. Regarding MR-proADM, levels were significantly higher in positive blood culture, being in accordance with a study by Christ-Crain et al [17]. In a previous study by the same group, they already reported significantly higher levels of MR-proADM in sepsis patients compared to controls [40].

Although ADM has pleiotropic effects, its role as antimicrobial agent might explain why its levels increase during sepsis [13]. In addition, levels of ADM are also likely responsible for the hypotension characteristic of septic shock [10]. It is of note that although the criteria inclusion was patients admitted in ER with suspicion of systemic bacterial infection and from who blood culture were drawn, we did not observe a higher percentage of microbiological definite diagnosis in patients with pneumonia compared to other series [25]. For patients with LRTI without pneumonia, the performance of blood cultures might be then questionable if another origin of bacteriemia is discarded.

Regarding severity assessment for pneumonia patients, different score risk have been developed, aiming to assess patient's prognosis. In this study we have focused on PSI and CURB-65 that have been widely and extensively validated, and on two new risk scores that still need testing and validation: SCAP and SMART-COP. In a recent meta-analysis Chalmers et al have shown that there were no significant differences in predicting mortality between PSI, CURB-65 and the modified CRB-65 [41]. SCAP has been evaluated in some studies with CAP patients, being as accurate as

current scoring systems [42-44]. SMART-COP is another index designed for the identification of patients that might need IRVS. In a study with patients aged <50, SMART-COP was superior to PSI and CURB-65 for the prediction of mechanical ventilation and/or inotropic support, but incorrectly stratified 15% of patients [45].

Although these rules can be useful for the management of patients with pneumonia, they also present some disadvantages such as complexity for its calculation. This is a main drawback for its use and application in the clinical practice. Other examples of disadvantages are: age overemphasis, no consideration for the presence of comorbidities and need of more testing and validation. Risk scales are not designed to be re-assessed during clinical evolution and follow-up, so they can not identify patients with higher risk of treatment failure during clinical evolution neither can assess the need of further interventions and/or therapy changes. In this sense, systemic biomarkers reflecting different physiopathological aspects, such as infection, sepsis, cardiovascular impairment, endothelial dysfunction might appear as a helpful tool to better understand the complex process of CAP.

Biomarkers measurement can predict disease severity in CAP patients, aiming to complement the available risk scores [46, 47]. In fact, several studies have shown that the combination of score risk, mainly PSI and CURB-65, with a biomarker measurement can improve the prediction of outcome [17, 48, 49]. MR-proANP and MR-proADM increased with increasing severity of CAP, classified according to PSI class and CURB-65. In our previous experience, we already demonstrated that MR-proANP correlates significantly with both rules and that this correlation is not affected by the presence of cardiac and renal comorbidities [23]. Regarding MR-proADM, we confirm previous findings that demonstrate

that MR-proADM admission levels correlate with a similar accuracy as these scores [17, 18, 49].

PCT, CRP, neopterin, MR-proANP and MR-proADM have previously shown to be useful tools for the management of pneumonia, but the correlation with new scores has not been explored yet. To our knowledge, we are the first to report how these biomarkers correlate with SCAP and SMART-COP. Regarding SCAP, both MR-proANP and MR-proADM showed a strong correlation, as higher levels were found in patients in high and intermediate risk in comparison to patients classified as low risk. Surprisingly, two patients that developed respiratory failure/shock and died did not have SCAP criteria. One patient had *P. jirovecii* pneumonia and died 50 days later and MR-proADM levels were of 0.59 nmol/L. The other one was a severely immunosuppressed patient that died because of respiratory failure after 12 days and MR-proADM levels were of 0.95 nmol/L. There is another patient that did not have SCAP criteria but died of a non related cause which was cerebral lesion progression. MR-proADM and MR-proANP levels were 0.96 nmol/L and 208.30 pmol/L. Interestingly, this index only considers a variable that is not included in PSI that is the presence of multilobar bilateral pneumonia. When considering this variable alone no differences were found between biomarkers although our previous experience showed a correlation [7]. Regarding SMART-COP, only neopterin showed significantly higher levels in patients with  $\geq 3$  points. However, when considering its simplified version SMRT-CO, which was the more available in our series, PCT, CRP and MR-proADM levels were higher in patients classified as moderate-high risk of needing IRVS in comparison to patients with very low/ low risk.

Two different cut-off for the prediction of mortality in pneumonia patients have been proposed for MR-proADM: 1.8 nmol/L and 1.3 nmol/L [17, 18]. In our experience, we choose a range of cut-off: 0.95 nmol/L and 1.50 nmol/L that corresponded to higher sensitivity and specificity.

Clinical based systems are good at quickly selecting low-risk patients that can be managed as outpatients, but have been not particularly effective at identifying patients at higher risk who are most likely to benefit from entry into trials of novel therapies [50]. It is in this context that biomarkers can play a role, identifying earlier patients with alterations in the inflammatory and cardiovascular response to an infection. However, a biomarker measurement will probably oversimplify the general vision: biomarkers are meant to complement, rather to supersede clinician's judgment and validated severity scores.

This study has some limitations. Firstly, study inclusion was limited to patients with suspicion of bacteremia and from whom blood cultures were drawn. So, patients with milder symptoms and no suspicion of bacterial infection were excluded. This could have been of interest for obtaining more clear results when comparing study populations, although the population that we finally selected reflects better the doubtful situations in clinical practice. And secondly, some of the variables required for index calculations were not available for all patients. Nevertheless, this last limitation reflects how scores are not always easy to calculate in settings such as the ER. Finally, although in our experience no significant differences were found, it is not unlikely that some biomarkers might be influenced by previous antibiotic and corticosteroid treatment.

In summary, in patients with suspicion of systemic bacterial infection in the ER, PCT and MR-proADM have shown significantly higher levels in documented bacterial pneumonia, in comparison to COPD exacerbation episodes and bronchial infections. MR-proADM and MR-proANP levels correlate significantly with validated PSI and CURB-65 index. MR-proADM has also shown higher levels in high risk groups in comparison to low risk groups, when assessing SCAP and modified SMART-COP. MR-proANP and PCT have also shown a correlation with SCAP and SMRT-CO. This is the first study evaluating the relationship between inflammatory and cardiovascular biomarkers and new scores risk and although the number of patients is low, it provides preliminary useful and

important data that has to be confirmed in further studies including a larger number of patients.

**Acknowledgments.** The company BRAHMS Thermo Fisher has supplied the necessary kits of PCT and MR-proADM. We thank Hematology Laboratory technicians of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Oriol Martos for technical assistance. J. Domínguez is a researcher of the "Miguel Servet" programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

**Conflicts of Interest Disclosure.** No company had a role in the design or conducting of the study, collection, management, or interpretation of the data, preparation, review, or approval of this manuscript. The authors have no conflict of interest, including specific financial interests or relationships or affiliations to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

## REFERENCES

1. Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, Dean N, File T, Fine MJ, Gross PA, Martinez F, Marrie TJ, Plouffe JF, Ramirez J, Sarosi GA, Torres A, Wilson R, Yu VL. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1730-1754.
2. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, Kapoor WN. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336: 243-250.
3. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 2003; 58: 377-382.
4. España PP, Capelastegui A, Gorordo I, Esteban C, Oribe M, Ortega M, Bilbao A, Quintana JM. Development and validation of a clinical prediction rule for severe community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1249-1256.
5. Charles PG, Wolfe R, Whitby M, Fine MJ, Fuller AJ, Stirling R, Wright AA, Ramirez JA, Christiansen KJ, Waterer GW, Pierce RJ, Armstrong JG, Korman TM, Holmes P, Obrosky DS, Peyrani P, Johnson B, Hooy M, Grayson ML. SMART-COP: a tool for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 375-384.
6. Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J* 2007; 30: 556-573.
7. Prat C, Dominguez J, Andreo F, Blanco S, Pallares A, Cuchillo F, Ramil C, Ruiz-Manzano J, Ausina V. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; 52: 169-177.
8. Almirall J, Bolibar I, Toran P, Pera G, Boquet X, Balanzo X, Sauca G. Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 2004; 125: 1335-1342.
9. Masia M, Gutierrez F, Shum C, Padilla S, Navarro JC, Flores E, Hernandez I. Usefulness of procalcitonin levels in community-acquired pneumonia according to the patients outcome research team pneumonia severity index. *Chest* 2005; 128: 2223-2229.
10. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 2000; 21: 138-167.
11. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, Keller U, Muller B. Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue. *Endocrinology* 2005; 146: 2699-2708.
12. Martinez A, Bengoechea JA, Cuttitta F. Molecular evolution of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP): evidence for gene co-option. *Endocrinology* 2006; 147: 3457-3461.
13. Zudaire E, Portal-Nunez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 237-244.

14. Allaker RP, Grosvenor PW, McAnerney DC, Sheehan BE, Srikanta BH, Pell K, Kapas S. Mechanisms of adrenomedullin antimicrobial action. *Peptides* 2006; 27: 661-666.
15. Asada Y, Hara S, Marutsuka K, Kitamura K, Tsuji T, Sakata J, Sato Y, Kisanuki A, Eto T, Sumiyoshi A. Novel distribution of adrenomedullin-immunoreactive cells in human tissues. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 185-191.
16. Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin—what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 5-27.
17. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, Muller C, Bingisser R, Harbarth S, Tamm M, Struck J, Bergmann A, Muller B. Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia [ISRCTN04176397]. *Crit Care* 2006; 10: R96.
18. Huang DT, Angus DC, Kellum JA, Pugh NA, Weissfeld LA, Struck J, Delude RL, Rosengart MR, Yealy DM. Midregional Proadrenomedullin as a Prognostic Tool in Community-Acquired Pneumonia. *Chest* 2009.
19. de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 7-18.
20. McGrath MF, de Bold AJ. Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides* 2005; 26: 933-943.
21. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* 2004; 50: 234-236.
22. Muller B, Suess E, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, Bergmann A, Stolz D, Tamm M, Morgenthaler NG, Christ-Crain M. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* 2006; 260: 568-576.
23. Prat C, Lacoma A, Dominguez J, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Andreo F, Tudela P, Ruiz-Manzano J, Ausina V. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect* 2007; 55: 400-407.
24. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Lores L, Latorre I, Pérez M, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Dominguez J. Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 470-475.
25. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2: S27-72.
26. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
27. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000; 117: 398S-401S.
28. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40: 373-383.
29. Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, Lores L, Blanco S, Malet A, Gallardo X, Dominguez J. Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respir Med* 2010; 104: 397-403.
30. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedrosa P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119: 243-249.
31. Becker KL, Nylen ES, White JC, Muller B, Snider RH, Jr. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1512-1525.
32. Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med* 2005; 26: 1-9.
33. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Lores L, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Dominguez J. Value of

- procalcitonin, C-reactive protein and neopterin in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011; 6: 157-169.
34. Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 96-104.
35. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 206-217.
36. Muller B, Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 9): 8-16.
37. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, Muller B. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004; 363: 600-607.
38. Muller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, Krause M, Zimmerli W, Mueller B, Schuetz P. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. *Chest* 2010; 138: 121-129.
39. Tudela P, Lacoma A, Prat C, Modol J, Gimenez M, Barallat J, Tor J. Prediction of bacteremia in patients with suspicion of infection in emergency room. *Med Clin* 2010; 135: 685-690.
40. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care* 2005; 9: R816-824.
41. Chalmers JD, Singanayagam A, Akram AR, Mandal P, Short PM, Choudhury G, Wood V, Hill AT. Severity assessment tools for predicting mortality in hospitalised patients with community-acquired pneumonia. Systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2010; 65: 878-883.
42. España PP, Capelastegui A, Quintana JM, Bilbao A, Diez R, Pascual S, Esteban C, Zalacain R, Menendez R, Torres A. Validation and comparison of SCAP as a predictive score for identifying low-risk patients in community-acquired pneumonia. *J Infect* 2010; 60: 106-113.
43. Yandiola PP, Capelastegui A, Quintana J, Diez R, Gorordo I, Bilbao A, Zalacain R, Menendez R, Torres A. Prospective comparison of severity scores for predicting clinically relevant outcomes for patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Chest* 2009; 135: 1572-1579.
44. Falcone M, Corrao S, Venditti M, Serra P, Licata G. Performance of PSI, CURB-65, and SCAP scores in predicting the outcome of patients with community-acquired and healthcare-associated pneumonia. *Intern Emerg Med* 2011. Jan 20. Epub ahead of print.
45. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. Predicting the need for mechanical ventilation and/or inotropic support for young adults admitted to the hospital with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1571-1574.
46. Niederman MS. Making sense of scoring systems in community acquired pneumonia. *Respirology* 2009; 14: 327-335.
47. Christ-Crain M, Schuetz P, Muller B. Biomarkers in the management of pneumonia. *Expert Rev Respir Med* 2008; 2: 565-572.
48. Menendez R, Martinez R, Reyes S, Mensa J, Filella X, Marcos MA, Martinez A, Esquinas C, Ramirez P, Torres A. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009; 64: 587-591.
49. Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, Hartmann O, Suttorp N, Welte T. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1426-1434.
50. Mira JP, Max A, Burgel PR. The role of biomarkers in community-acquired pneumonia: predicting mortality and response to adjunctive therapy. *Crit Care* 2008; 12 Suppl 6: S5.



#### 4.4. Article 4

##### **Value of procalcitonin, C-reactive protein and neopterin in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.**

Alicia Lacoma, Cristina Prat, Felipe Andreo, Luis Lores, Irene Latorre, Miguel Pérez,  
Joan Ruiz-Manzano, Vicente Ausina, Jose Domínguez.

International Journal of COPD 2011; 6: 157-169.

L'ús de biomarcadors sistèmics per al maneig de la MPOC és un camp d'interès creixent. L'objectiu d'aquest treball ha estat avaluar la utilitat de la PCT, PCR i neopterin en el maneig de les exacerbacions de la MPOC, per a la identificació de l'etiologia de l'episodi, i la valoració del seu pronòstic.

L'estudi inclou 318 pacients, que es van classificar en tres grups: pacients en fase estable, pacients exacerbats i pacients amb diagnòstic de pneumònia. En el moment d'inclusió: admissió hospitalària (pels pacients exacerbats o amb pneumònia) o durant la visita de control (pacients estables) es va recollir una mostra de sèrum per pacient. Els nivells de PCT i PCR van mostrar diferències significatives en comparar els tres grups, amb valors més elevats en pacients amb pneumònia, seguit dels pacients amb exacerbació. Per un subgrup de pacients exacerbats, els nivells de PCT i PCR disminuïen en un mes, mentre que els nivells de neopterin augmentaven. Els nivells de neopterin van ser superiors en pacients exacerbats amb hipertensió arterial i insuficiència renal. Quant a l'etiologia de l'episodi, els nivells de PCT no van mostrar diferències significatives mentre que els nivells de neopterin van ser significativament inferiors en pacients amb aïllament d'algun bacteri patògen. No obstant, els valors de PCT i PCR es van mostrar superiors en aquells casos amb aïllament de *S. pneumoniae*, *S. aureus* i enterobacteris. Tots els biomarcadors van mostrar nivells elevats en aquells pacients que morien en el mes posterior a l'episodi d'exacerbació.

D'acord amb els nostres resultats, els biomarcadors varien en funció de l'estat clínic. La identificació de l'etiologia de l'exacerbació mitjançant biomarcadors, tot i ser encoratjadora, té com a principal inconvenient l'absència de *gold standard* per demostrar-ne el seu valor real. Donat que nivells elevats de biomarcadors durant un episodi d'exacerbació correlacionen amb el pronòstic a curt termini, la seva determinació pot esdevenir una eina útil per al maneig dels pacients amb MPOC.





# Value of procalcitonin, C-reactive protein, and neopterin in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease

Alicia Lacoma<sup>1,4</sup>  
 Cristina Prat<sup>1,4</sup>  
 Felipe Andreo<sup>2,4</sup>  
 Luis Lores<sup>3</sup>  
 Juan Ruiz-Manzano<sup>2,4</sup>  
 Vicente Ausina<sup>1,4</sup>  
 Jose Domínguez<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, <sup>2</sup>Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; <sup>3</sup>Servei de Pneumologia, Hospital de Sant Boi, Sant Boi de Llobregat, Spain; <sup>4</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence: J Domínguez  
 Servei de Microbiologia, Fundació Institut en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain  
 Tel +34 93 497 88 94  
 Fax +34 93 497 88 95  
 Email jadomb@gmail.com

© 2011 Lacom et al, publisher and licensee Dove Medical Press Ltd. This is an Open Access article which permits unrestricted noncommercial use, provided the original work is properly cited.

**Objective:** The identification of biological markers in order to assess different aspects of COPD is an area of growing interest. The objective of this study was to investigate whether levels of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), and neopterin in COPD patients could be useful in identifying the etiological origin of the exacerbation and assessing its prognosis.

**Methods:** We included 318 consecutive COPD patients: 46 in a stable phase, 217 undergoing an exacerbation, and 55 with pneumonia. A serum sample was collected from each patient at the time of being included in the study. A second sample was also collected 1 month later from 23 patients in the exacerbation group. We compared the characteristics, biomarker levels, microbiological findings, and prognosis in each patient group. PCT and CRP were measured using an immunofluorescence assay. Neopterin levels were measured using a competitive immunoassay.

**Results:** PCT and CRP showed significant differences among the three patient groups, being higher in patients with pneumonia, followed by patients with exacerbation ( $P < 0.0001$ ). For the 23 patients with paired samples, PCT and CRP levels decreased 1 month after the exacerbation episode, while neopterin increased. Neopterin showed significantly lower levels in exacerbations with isolation of pathogenic bacteria, but no differences were found for PCT and CRP. No significant differences were found when comparing biomarker levels according to the Gram result: PCT ( $P = 0.191$ ), CRP ( $P = 0.080$ ), and neopterin ( $P = 0.109$ ). However, median values of PCT and CRP were high for *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and enterobacteria. All biomarkers were higher in patients who died within 1 month after the sample collection than in patients who died later on.

**Conclusions:** According to our results, biomarker levels vary depending on the clinical status. However, the identification of the etiology of infectious exacerbation by means of circulating biomarkers is encouraging, but its main disadvantage is the absence of a microbiological gold standard, to definitively demonstrate their value. High biomarker levels during an exacerbation episode correlate with the short-term prognosis, and therefore their measurement can be useful for COPD management.

**Keywords:** C-reactive protein, exacerbation, neopterin, procalcitonin, prognosis

## Introduction

Acute exacerbations of COPD can be precipitated by bacterial and viral infections, and by common pollutants such as tobacco and air pollution. But in up to 30% of cases, the etiological diagnosis of an exacerbation cannot be achieved.<sup>1</sup> On the other hand, several factors have been suggested to predict the overall prognosis of COPD, such as the decline in FEV<sub>1</sub>, the BODE index, the frequency and severity of exacerbations, and the influence of systemic inflammation.<sup>2-5</sup>

An area of growing interest is to identify biological markers that could assess different aspects of COPD. Pulmonary biomarkers have been measured mainly in bronchoalveolar lavage, induced sputum, and exhaled breath condensate with promising results, but the sampling procedure is invasive and for some assays the variability is very high.<sup>6</sup> A recent approach is also the measurement of systemic biomarkers that may provide additional information.<sup>7</sup> Several studies have attempted to examine different inflammatory markers during stable state and during exacerbations,<sup>8,9</sup> in order to correlate their levels with different factors, such as the inflammatory basal status, the etiological origin of the exacerbation, as well as its prognosis, and the risk of mortality.<sup>7</sup> In this regard, we have evaluated 3 biomarkers: procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), and neopterin.

PCT is a specific marker of systemic bacterial infection and its levels correlate with the etiology and severity of pneumonia.<sup>10,11</sup> Several interventional trials on lower respiratory tract infections, including acute COPD exacerbations, have also suggested that measuring PCT might help to reduce antibiotic prescriptions by means of identifying bacterial infections without affecting patient recovery.<sup>12</sup> CRP is a sensitive acute phase reactant, levels of which increase in the presence of infection and during chronic inflammatory conditions.<sup>13</sup> It has been evaluated in different settings of COPD patients, in order to establish possible association with basal systemic inflammation in the stable period, presence of cardiovascular risk events, disease prognosis and identification of infectious exacerbations.<sup>14,15</sup> Neopterin acts as a mediator of cell immunity against intracellular pathogens<sup>16</sup> and in lower respiratory tract infections it has shown to improve the discrimination between bacterial and viral origin.<sup>17</sup> In patients with community acquired pneumonia, neopterin levels have also been shown to correlate with the severity of the infection.<sup>10</sup> Therefore, these three biomarkers have been shown to be associated with the etiology of lower respiratory tract infections and may be of interest in the identification of exacerbation episodes that could benefit from antibiotic treatment. These biomarkers have also been reported as markers of severity and prognosis.

The objectives of this study are 3-fold: first to determine the levels of inflammatory markers in COPD patients in a clinically stable period, during an exacerbation and during pneumonia; second, to establish if the biomarker levels, together with the presence of clinical symptoms, can help to identify the etiological origin of the exacerbations; finally, to

examine whether biomarkers can be used to predict short- and long-term prognosis after an exacerbation episode.

## Patients and methods

### Setting and study population

We included 318 consecutive adult COPD patients from September 2001 to September 2005, who were admitted to the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and the Hospital de Sant Boi de Llobregat (Spain). Ethical approval was given by the Ethics Committee from both institutions and written informed consents were obtained.

The diagnosis of COPD was based on clinical history, physical examination and spirometric criteria according to the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR) guidelines.<sup>18</sup> The severity of the disease was categorized into mild ( $80\% < FEV_1 < 60\%$ ), moderate ( $59\% < FEV_1 < 40\%$ ) and severe ( $FEV_1 < 40\%$ ).<sup>18</sup> Exclusion criteria were as follows: patients with history of asthma, cystic fibrosis or active pulmonary tuberculosis, and patients with no adequate clinical samples available (serum samples).

The study population consisted of 46 COPD patients during a clinically stable phase (without exacerbation or pneumonia within at least 1 or 2 months, respectively); 217 undergoing an exacerbation; and 55 COPD patients diagnosed with pneumonia. Stable patients were recruited during scheduled visits, in order to define a baseline inflammatory response and for comparison with the exacerbation group. Exacerbation was defined as an acute worsening of the patient's condition from stable state and beyond normal day-to-day variations, which presents with worsened dyspnea; worsened sputum volume and/or change in its color; or any combination of these symptoms, and requires a change in regular medication.<sup>19</sup> Pneumonia was defined by clinical (presence of fever, cough, dyspnea) and radiographic signs (pneumonic infiltrate in the chest radiograph), as well as clinical evolution, assessed by expert clinicians and radiologists.<sup>20</sup>

We collected sputum samples and blood cultures for microscopic examination and standard bacteriological culture, and urine for antigen detection from those patients in the pneumonia and exacerbation groups, in order to identify the etiological origin.<sup>21</sup> A total of 272 sputum samples (217 from exacerbated patients and 55 from patients with pneumonia) was collected (1 sample per patient). Sputum samples were transported immediately to the microbiology laboratory or refrigerated until transport. After microscopic examination, only those samples with  $<25$  squamous epithelial cells

and  $>25$  polymorphonuclears per low-power field were cultured.<sup>22</sup>

Pneumococcal pneumonia was diagnosed by isolation of *Streptococcus pneumoniae* from blood culture or by detection of pneumococcal capsular polysaccharide antigen in urine samples by counterimmunoelectrophoresis.<sup>23–25</sup> *Legionella* pneumonia was diagnosed by urinary antigen detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by enzyme immunoassay (Bartels EIA *Legionella* urinary antigen, Bartels Inc., Trinity Biotech Company, Wicklow, Ireland).

Epidemiological (age, gender) and clinical history data (presence of comorbidities, smoking status, COPD status, FEV<sub>1</sub>, chronic oxygen therapy, previous steroid and antibiotic therapy) were collected. We also collected information from the exacerbated patients on the characteristics of the exacerbation episodes (Anthonisen criteria, individual clinical symptoms, microbiological findings, length of hospitalization).

### Patient follow-up

A blood sample was collected from each patient at the time of inclusion into the study: hospital admission (for the exacerbation and pneumonia group) or during the scheduled visit (for the stable group). Two years later, clinical files were retrospectively reviewed and the patient follow-up was recorded in order to assess clinical outcome (readmission, days until next episode, number of exacerbations within 1 year, and days until death, when that occurred).

Among the 217 exacerbated patients, from 23 we also collected a second serum sample 1 month later, when the patient was in the recovery phase. All serum samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until biomarkers were measured.

### Biomarker measurement

PCT and CRP were measured with an immunofluorescent assay (Kryptor Brahms AG, Hennigsdorf, Germany) with functional sensitivities of 0.06 ng/mL and 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The intra- and inter-assay coefficients for PCT at a sample concentration of 0.2 ng/mL were 10%. The intra- and inter-assay coefficients for CRP at a sample concentration of 1.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were 5.1% and 14.2%, respectively. Neopterin levels were measured with a competitive immunoassay following the manufacturers' instructions (Neopterin ELISA, IBL, Hamburg, Germany). The assay lower limit of detection was 0.7 nmol/L. The intra-assay coefficient at a sample concentration of 7.7 to 48 nmol/L was 3.6% to 6.8%, and inter-assay coefficient at a sample range of 7.4 to 59 nmol/L was 7.6% to 10.3%.

### Statistical analysis

Discrete variables are expressed as counts (percentages) and continuous variables as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median (interquartile range [IQR]). The comparison of groups was performed using the Mann–Whitney *U* test, Kruskal–Wallis test or Wilcoxon matched-pair test, as appropriate. Mann–Whitney was applied when assessing if biomarker levels varied significantly when considering the presence of several variables (comorbidities, steroid/antibiotic/oxygen treatment, smoking status) at baseline and at exacerbation (Table 2). This test was also applied for comparing biomarker levels according to the characteristics of the exacerbation episode (Anthonisen criteria, presence of individual symptoms and sputum culture result), the need for readmission, and patient survival. Kruskal–Wallis was applied when assessing if there were differences in biomarker levels between the 3 patient groups (stable vs exacerbated vs pneumonia). The Wilcoxon matched-paired test was applied when comparing biomarker levels for the subgroup of 23 patients with second samples. Pearson's chi-square test was applied when comparing baseline characteristics between the 3 patient groups and between the exacerbated patients according to the sputum culture result. Correlation analyses were performed using Spearman's correlation. The use of biomarkers and symptoms in identifying probable bacterial origin was investigated by receiver operating characteristic (ROC) analysis. Sample size was calculated in order to find differences in the biomarker levels between exacerbated patients with probable bacterial origin and those of noninfectious origin. In order to detect statistically significant differences between these 2 groups and supposing a standardized size effect of 0.60, a significance level of 5% (unilateral), and a beta risk of 20%, 97 patients are needed in both groups. To assess the influence of PCT, CRP, and neopterin levels, age and COPD severity on 2-year survival, Cox-regression univariate and multivariate analyses were performed. The time to death up to 2 year was analyzed by Kaplan–Meier survival curves, and compared by the log-rank test. Associations were considered statistically significant if *P* value was  $<0.05$ . The commercial statistical software packages used were SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and GraphPad Prism 5 (Graph Pad Inc, San Diego, CA).

## Results

### Study population

The characteristics of the 318 patients included in the study, according to their corresponding group are shown in

Table 1. FEV<sub>1</sub> measurement at the time of study inclusion was recorded for 248 patients (78%). For the remaining 70 patients, FEV<sub>1</sub> was not available, but all of them were clinically and spirometrically diagnosed with COPD. Overall, it was a predominantly male COPD population with a mean age of 71.21 years (SD: 10.10). Comparison of baseline characteristics according to patient group showed statistical differences for, smoking status, presence of congestive heart failure, severity of COPD, and use of chronic oxygen therapy and steroid treatment (Table 1). Some of the differences found can be explained by the fact that exacerbated patients have a more severe COPD, with higher frequencies of chronic oxygen therapy and steroid treatment.

Interestingly exacerbated patients also had a higher frequency of congestive heart failure. When considering only exacerbated patients, and comparing population characteristics according to sputum culture results (normal flora/negative or pathogenic bacteria), we found statistical differences only for the presence of renal disease (Table 1).

We also assessed whether PCT, CRP, and neopterin levels could be affected by the presence of comorbidities, smoking status, chronic oxygen therapy, and previous steroid and antibiotic treatment in the following 2 groups: patients at stable state (baseline) and patients undergoing an exacerbation (Table 2). Spearman's correlations were 0.087 ( $P = 0.219$ ) for PCT,  $-0.035$  ( $P = 0.621$ ) for CRP, and 0.055

**Table 1** Study population characteristics according to patient group: calculation of *P* values for the comparison of clinical and demographical characteristics for the 3 patient groups and for exacerbated patients according to the sputum culture result

Characteristic	Study population			<i>P</i> value	Exacerbated patients		<i>P</i> value
	Stable n = 46 (%)	Exacerbated n = 217 (%)	Pneumonia n = 55 (%)		Normal flora/neg n = 85 (%)	Pathogenic bacteria n = 76 (%)	
<b>Age</b>							
Mean ± SD	70.9 ± 10.3	71.4 ± 9.9	69.3 ± 10.5	0.329	72.6 ± 8.8	72.3 ± 8.7	0.88
<b>Gender</b>							
Female	1 (2.2)	13 (6)	1 (1.8)	0.290	4 (4.7)	4 (5.3)	0.260
Male	45 (97.8)	204 (94)	54 (98.2)		81 (95.3)	72 (94.7)	
<b>Current smoker</b>							
Yes	15 (32.6)	38 (17.5)	14 (25.5)	0.004*	13 (15.3)	8 (10.5)	0.633
Ex-smoker	23 (50)	150 (69.1)	38 (69.1)		60 (70.6)	9 (11.8)	
Nonsmoker	–	23 (10.6)	1 (1.8)		9 (10.6)	58 (76.4)	
Not available	8 (17.4)	6 (2.8)	2 (3.6)		3 (3.5)	1 (1.3)	
<b>Comorbidities</b>							
Neoplasia	8 (17.4)	29 (13.4)	9 (16.4)	0.525	12 (14.5)	9 (11.8)	0.627
Liver disease	–	10 (4.6)	5 (9.1)	0.107	2 (2.4)	4 (5.3)	0.346
Congestive heart failure	5 (10.9)	61 (28.1)	9 (16.4)	0.047*	24 (28.9)	25 (32.9)	0.587
Arterial hypertension	14 (30.4)	82 (37.8)	17 (30.9)	0.634	39 (47)	27 (35.5)	0.143
Cerebrovascular disease	2 (4.3)	18 (8.3)	3 (5.5)	0.725	10 (12)	5 (6.6)	0.239
Renal disease	4 (8.7)	14 (6.5)	5 (9.1)	0.513	9 (10.8)	1 (1.3)	0.013*
Diabetes	12 (26.1)	52 (24)	8 (14.5)	0.132	24 (28.9)	18 (23.7)	0.45
Not available	8 (7.4)	3 (1.4)	–		–	–	
<b>Severity COPD (FEV<sub>1</sub>)</b>							
<40%	11 (24)	102 (47)	25 (45.5)	0.005*	44 (51.8)	38 (50)	0.241
40%–59%	22 (47.8)	51 (23.5)	13 (23.6)		19 (22.3)	16 (21)	
60%–80%	3 (6.5)	17 (7.8)	4 (7.3)		5 (5.9)	8 (10.6)	
Not available	10 (21.7)	47 (21.7)	13 (23.6)		17 (20)	14 (18.4)	
<b>Chronic oxygen therapy</b>							
Yes	2 (4.3)	61 (28.1)	13 (23.6)	0.009*	29 (34.1)	22 (29)	0.420
Not available	–	5 (2.3)	1 (1.8)		1 (1.2)	1 (1.3)	
<b>Steroid treatment</b>							
Yes	7 (15.2)	121 (55.8)	28 (50.9)	0.001*	50 (58.8)	48 (63.1)	0.592
<b>Inhaled/oral</b>							
Inhaled	–	103 (85.1)	25 (45.5)	0.001*	39 (78)	43 (89.6)	0.295
Oral	4 (8.7)	10 (8.3)	2 (3.6)		6 (12)	3 (6.3)	
Not specified	3 (6.5)	8 (6.6)	1 (1.8)		5 (10)	2 (4.2)	

Note: \**P* was considered significant if the value was <0.05.

Abbreviation: SD, standard deviation.

**Table 2** Values of *P* for each biomarker when considering the presence of confounding variables at baseline and at exacerbation

	PCT		Neopterin		CRP	
	Baseline	Exacerbation	Baseline	Exacerbation	Baseline	Exacerbation
<b>Presence of comorbidities</b>						
Arterial hypertension	0.315	0.032*	0.830	0.006*	0.987	0.636
Diabetes	0.918	0.047*	0.986	0.063	0.345	0.662
Neoplastic disease	0.351	0.835	0.171	0.704	0.568	0.613
Liver disease	–	0.256	–	0.890	–	0.299
Congestive heart failure	0.325	0.917	0.909	0.389	0.225	0.149
Cerebrovascular disease	0.945	0.216	0.032*	0.741	1	0.720
Renal disease	0.886	0.101	0.510	0.001*	0.886	0.820
<b>Steroid therapy</b>						
Yes vs no	0.533	0.049*	0.901	0.031*	0.135	0.086
Oral vs inhaled	–	0.347	–	0.322	–	0.099
<b>Smoking status</b>						
Current smokers vs never smokers	–	0.659	–	0.861	–	0.935
Current smokers vs ex-smokers	0.311	0.253	0.322	0.964	0.897	0.497
Never smokers vs ex-smokers	–	0.096	–	0.694	–	0.581
<b>Previous antibiotic therapy</b>						
Yes vs no	1	0.664	0.615	0.554	0.308	0.274
<b>Home oxygen</b>						
Yes vs no	0.307	0.060	0.291	0.104	0.174	0.674
<b>Severity COPD</b>						
Mild-moderate-severe	0.548	0.146	0.799	0.179	0.900	0.688

**Note:** \**P* was considered significant if the value was <0.05.

**Abbreviations:** CRP, C-reactive protein; PCT, procalcitonin.

(*P* = 0.434) for neopterin, when considering COPD severity classified according to FEV<sub>1</sub>.

### Biomarkers and clinical state

Circulating biomarker levels in the stable population, at exacerbation, and during pneumonia are shown in Figure 1. PCT and CRP levels showed significant differences among the 3 groups of patients, being lower during clinical stability and higher during pneumonia (*P* < 0.0001). In contrast, neopterin levels did not show any significant difference. When considering the subgroup of patients with paired samples, PCT (*P* = 0.0788) and CRP (*P* = 0.0181) levels decreased at 1 month after the exacerbation episode (recovery phase), while neopterin levels increased significantly (*P* = 0.0325) (Figure 2).

### Biomarkers and exacerbation episodes

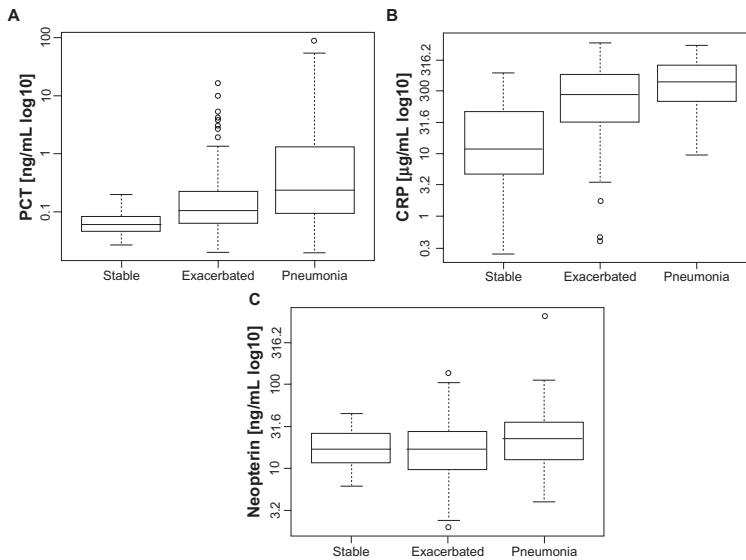
#### Etiology of the exacerbation

The characteristics of the 217 exacerbation episodes are shown in Table 3. According to the classification of Anthonisen,<sup>26</sup> none of the biomarker levels differed significantly: PCT (*P* = 0.085), CRP (*P* = 0.495), and neopterin (*P* = 0.383). When considering the presence of individual symptoms, such as fever and impairment of respiratory failure (defined as ratio of the partial pressure of oxygen in arterial blood

to the inspired oxygen fraction [PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>] <250 with respiratory rate >30/min), no biomarker showed significant difference: PCT (*P* = 0.370 and *P* = 0.827), CRP (*P* = 0.350 and *P* = 0.708), and neopterin (*P* = 0.325 and *P* = 0.837). When mucopurulent expectoration was present, neopterin levels were significantly lower (*P* = 0.039) while CRP levels were higher with almost statistical significance (*P* = 0.058), and no significance was found for PCT (*P* = 0.533).

Among the sputum samples collected from the exacerbated patients, 163 were valuable for microbiological culture according to Murray's criteria.<sup>22</sup> In 85 cases the result was normal flora or a negative culture result; in 76 cases potential pathogenic bacteria were isolated, and for the remaining 2 cases, information was missing. Normal flora was defined as microorganisms belonging to oropharyngeal or gastrointestinal flora not usually involved in respiratory infections in nonimmunocompromised patients.<sup>22</sup>

Interestingly, neopterin (*P* = 0.018) levels were significantly higher when the culture result was normal flora or negative (18.85 ng/mL; IQR 10.48–36.79) in comparison to isolation of predominant bacteria (14.9 ng/mL; IQR 8.58–20.9). In contrast, PCT (*P* = 0.620) and CRP (*P* = 0.568) levels did not show any significant differences. For exacerbations with normal flora or negative culture results, PCT and CRP levels were 0.10 ng/mL (IQR 0.06–0.21) and 88.66 µg/mL



**Figure 1** Distribution of procalcitonin (PCT) (ng/mL) (A), C-reactive protein (CRP) ( $\mu\text{g/mL}$ ) (B), and neopterin (ng/mL) (C) levels according to patient group. PCT levels during stable state, exacerbation, and pneumonia are as follows: 0.06 ng/mL (0.04–0.08), 0.10 ng/mL (0.06–0.22), and 0.24 ng/mL (0.1–1.32). CRP levels during stable state, exacerbation and pneumonia were as follows: 11.83  $\mu\text{g/mL}$  (5.07–44.90), 88.66  $\mu\text{g/mL}$  (31.69–184.5), and 140.4  $\mu\text{g/mL}$  (67.1–252.5). Neopterin levels during stable state, exacerbation, and pneumonia are as follows: 17.09 ng/mL (12.53–25.36), 17.43 ng/mL (9.85–27.84), and 22.26 ng/mL (13.31–35.34). Values of PCT and CRP showed significant differences among the 3 groups of patients ( $P < 0.0001$ ), being lower during clinical stability. Neopterin did not show any significant differences.

(IQR 38.04–164.35), respectively. For exacerbations with pathogenic bacteria isolation, PCT and CRP levels were 0.10 ng/mL (IQR 0.07–0.22) and 88.61  $\mu\text{g/mL}$  (IQR 34.89–201.12), respectively.

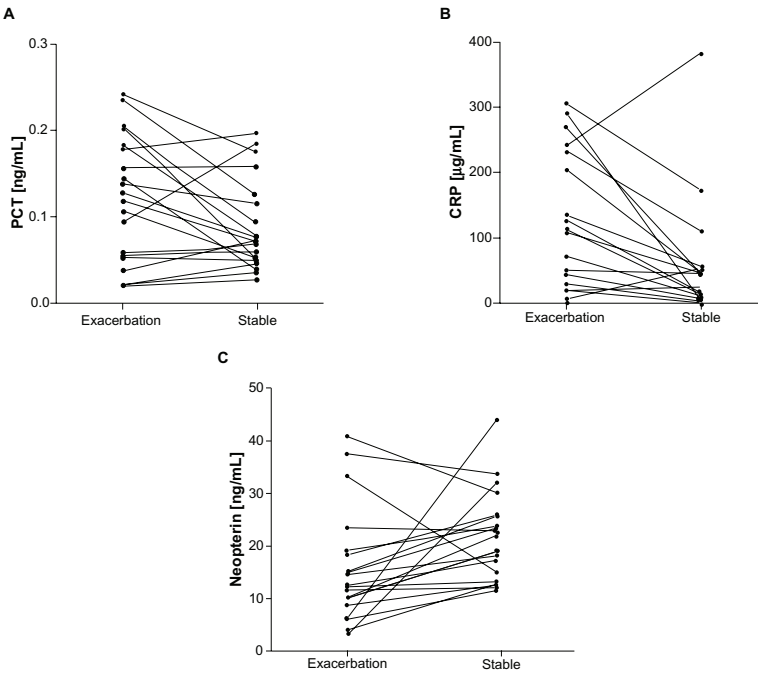
Regarding only those sputum culture results with pathogenic bacteria isolated, Gram-negative bacteria accounted for 73.7% of all microorganisms recovered; with *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Moraxella catarrhalis* being most frequently isolated (48.2%, 25%, and 16% respectively). Gram-positive bacteria accounted for 22.3%, with *S. pneumoniae* being the most frequent (88.2%). *Aspergillus fumigatus* was isolated twice (2.6%), and in the last case there was co-infection of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* (1.3%). Levels of PCT, CRP, and neopterin according to the microorganism isolated are shown in Table 4. No significant differences were found when comparing biomarker levels according to the Gram result: PCT ( $P = 0.191$ ), CRP ( $P = 0.080$ ) and neopterin ( $P = 0.109$ ). However, the median values of PCT and CRP were high for *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and enterobacteria.

In order to assess if it was possible to clinically identify the etiological origin of the exacerbations, we examined a combination of biomarker levels together with the following

variables: Anthonisen criteria, presence of fever, respiratory failure, and mucopurulent expectoration. Areas under the ROC curve (AUC) for each biomarker were higher when the combination of symptoms and biomarker levels was taken into account than when considering biomarker levels alone (Figure 3).

#### Exacerbation severity and prognosis

For the 217 patients with an exacerbation, the mean length of hospitalization was 12.92 days (SD: 29.20). Spearman's correlations were 0.171 ( $P = 0.022$ ) for PCT, 0.150 ( $P = 0.046$ ) for CRP, and 0.148 ( $P = 0.045$ ) for neopterin. Among these patients, 147 (67.7%) had to be readmitted in the following year at least once due to a new exacerbation episode and no significant differences were found for PCT ( $P = 0.258$ ), CRP ( $P = 0.778$ ), and neopterin ( $P = 0.255$ ). The mean number of days until the next hospitalization was 210.86 (median 78). Only neopterin correlated significantly with the time until next hospitalization. Thus, the correlations were  $-0.021$  ( $P = 0.803$ ) for PCT,  $-0.015$  ( $P = 0.863$ ) for CRP, and 0.209 ( $P = 0.012$ ) for neopterin. The number of exacerbations within the following year was also recorded for each patient. The mean number of exacerbations was 2.27



**Figure 2** Levels of procalcitonin (PCT) (ng/mL) (A), C-reactive protein (CRP) (µg/mL) (B) and neopterin (ng/mL) (C) for the 23 patients with 2 samples, the first collected during an exacerbation and the second collected 1 month later. Each patient is represented individually. Levels of PCT ( $P = 0.0788$ ) and CRP ( $P = 0.0181$ ) decreased in one month. Neopterin levels increased significantly ( $P = 0.0325$ ).

(SD: 2.06) and did not correlate with any of the biomarkers. Spearman's correlations were  $-0.029$  ( $P = 0.730$ ) for PCT,  $-0.0675$  ( $P = 0.434$ ) for CRP, and  $-0.115$  ( $P = 0.170$ ) for neopterin.

Fifty-five patients died, 41 in the following 2 years, and the remaining 14 later on. There were no significant differences in biomarker levels between survivors and nonsurvivors: PCT ( $P = 0.061$ ), CRP ( $P = 0.176$ ), and neopterin ( $P = 0.264$ ), although higher PCT and CRP levels were seen in those patients who died than in the survivors. The time elapsed between the time the sample was collected and the time the patient died was also recorded. There was no significant correlation between the time of the death and the biomarker levels. Spearman's correlations were  $-0.150$  ( $P = 0.290$ ) for PCT,  $0.048$  ( $P = 0.738$ ) for CRP, and  $-0.222$  ( $P = 0.111$ ) for neopterin. Nevertheless, the values of all biomarkers were higher in the group of patients who died within 1 month, decreasing whenever the time of death occurred later on (Figure 4). Indeed, PCT ( $P = 0.046$ ) and neopterin ( $P = 0.044$ ) levels were significantly higher in the

group of patients who died within 1 month than in patients dying later on.

Kaplan–Meier survival curves showing patients according to PCT, CRP, and neopterin quartiles are shown in Figure 5. In the multivariate Cox regression model analysis, age and neopterin levels were the only predictive factors independently associated with 2-year survival ( $P = 0.01$  and  $P = 0.048$ , respectively).

## Discussion

### Influence of comorbidities and previous treatment

In recent years, COPD has been described as an inflammatory disease with systemic consequences.<sup>4</sup> Circulating biomarkers might be influenced by several factors, such as the medical treatment or the underlying diseases, which play an important role in COPD management. When assessing the influence of smoking status, previous treatments, presence of comorbidities, and COPD severity itself, it is essential to take into account that COPD patients are very heterogeneous.

**Table 3** Characteristics of the 217 exacerbation episodes

AECOPD characteristics	n	%
<b>Type of AECOPD according to the Anthonisen criteria</b>		
I (increased dyspnea, sputum purulence, sputum volume)	114	52.3
II (2 of the above)	25	11.5
III (1 of the above and 1 or more minor findings*)	67	30.9
Unknown	11	5.1
<b>Symptoms</b>		
Fever	100	46.1
Respiratory failure	119	54.8
Mucopurulent sputum	150	69.1
<b>Sputum culture result (according to Murray criteria)</b>		
Poor quality or culture not done	54	24.9
Normal flora	85	39.2
Pathogenic bacteria	76	35
Unknown	2	0.9
<b>Previous antibiotherapy (before sample collection)</b>	45	20.7

**Note:** \*Minor findings include fever (>38°C) without other cause; increased wheezing; increased cough; or increased respiratory rate compared with stable baseline condition.

**Abbreviation:** AECOPD, acute exacerbations of COPD.

Secondly, it is also important to focus on how these factors might influence biomarker levels. Our results showed that the smoking habit did not statistically influence levels. But we found similar PCT, neopterin, and CRP levels in ex-smokers and current smokers, being higher in both groups than in nonsmoker patients. This reinforces the fact that the smoking habit causes a low-grade inflammatory response.<sup>27</sup> It has been reported that corticosteroid therapy decreases the levels of inflammatory markers, with the exception of PCT,<sup>28,29</sup> although we found statistically lower values of PCT in exacerbated patients treated with corticosteroids. Interestingly, exacerbated patients undergoing corticosteroid therapy also had significantly lower levels of neopterin.

COPD can also predispose individuals to the presence of other comorbidities, such as arterial hypertension, diabetes, and cardiovascular diseases that can potentially influence the outcome of COPD itself. So, the coexistence of associated

diseases is common and can affect COPD disease progression and prognosis.<sup>30</sup> In our experience, PCT and neopterin levels showed significant differences when taking the presence of arterial hypertension into account. Higher neopterin levels have been found in patients with cardiac and renal diseases.<sup>16</sup> To our knowledge, PCT levels are not related to chronic disorders.<sup>31</sup>

## Biomarkers and clinical status

Although PCT and CRP levels showed significant differences among the three patient groups, there is some overlap between the stable and the exacerbation groups. In exacerbated COPD patients, PCT levels are higher than in stable patients, although the infection might be locally restricted and too unspecific to show a notable increase in PCT. This may be due to the fact that not all patients might have the same basal levels in the stable state, so the increase in individual biomarker levels during an exacerbation episode might be different. This is one of the reasons that might explain why the ideal approach is probably not to establish biomarker cut-off levels for the overall COPD population, but to individually monitor patients and assess the intra-individual biomarker variation in the long term.

In the COPD stable group, biomarker levels reflect a basal local and systemic inflammation. During an exacerbation episode, there is an amplification of this basal inflammation, and thus there is an increase in inflammatory markers.<sup>32</sup> It is also important to point out that the severity of the exacerbation episodes could be different for each patient. Parenchymal damage in pulmonary tissue may also be present during exacerbations, even if not detected by conventional methods, such as X-ray. In these cases, biomarker levels may be higher than in those without evidence of parenchymal damage. And, finally, it is also possible that some patients might underestimate their symptoms, so in these individuals the early detection of high levels of biomarkers could be beneficial.

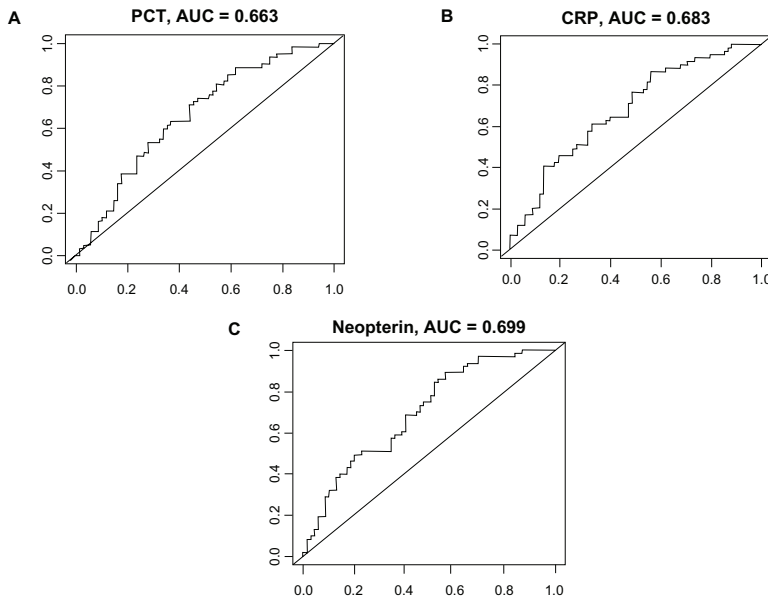
When comparing the levels of biomarkers for the 23 patients with 2 consecutive samples individually, we

**Table 4** Number of isolates and levels of PCT, CRP, and neopterin according to the microorganism isolated

Microorganism isolated	Number isolates (%)	PCT (ng/mL) median (IQR)	CRP (µg/mL) median (IQR)	Neopterin (ng/mL) median (IQR)
<i>Haemophilus influenzae</i>	27 (35.6)	0.09 (0.08–0.14)	69.8 (23.89–160.9)	15.7 (8.34–23.19)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 (18.4)	0.11 (0.05–0.23)	78.75 (19.42–181.5)	15.02 (11.39–17.89)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	9 (11.8)	0.07 (0.04–0.09)	77.63 (46.8–157.9)	9.87 (6.32–15.64)
Enterobacteria	6 (7.9)	0.20 (0.07–0.44)	101.6 (27.83–364.92)	18.02 (12.89–30.17)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15 (19.8)	0.14 (0.07–0.42)	133.4 (74.77–285.97)	12.42 (6.8–20)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (2.6)	0.44	307.95	10.83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 (2.6)	0.15	172.73	16.81
Co-infection <i>S. pneumoniae</i> and <i>H. influenzae</i>	1 (1.3)	0.34	310.7	21.07

**Abbreviations:** CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range; PCT, procalcitonin.





**Figure 3** Receiver operating characteris (ROC) for each biomarker [prolactinon (PCT) (A), C-reactive protein (CRP) (B), and neopterin (C)] when considering the combination of clinical symptoms and biomarker levels with respect to the prediction of exacerbation of probable bacterial origin. The areas under the curve (AUC), standard error (SE), and 95% confidence interval (CI) when considering PCT, CRP, and neopterin levels alone were 0.523 (0.168, 0.712–1.38), 0.527 (0.205, 0.721–1.61), and 0.609 (0.215, 0.389–0.904) respectively. When adding the information provided by all the variables above to the biomarker levels all the AUC increased: 0.663 (0.198, 0.652–1.42) for PCT, 0.683 (0.253, 0.6530–1.76) for CRP, and 0.699 (0.267, 0.305–0.867) for neopterin.

found that not all biomarkers had the same behavior over time. PCT and CRP decreased in 1 month (recovery phase), presumably to individual basal levels. The decrease in PCT and CRP has also been reported previously.<sup>33</sup> In contrast, neopterin levels increased significantly. One possible explanation for this increase is the influence of the corticosteroid treatment. Indeed, when analyzing the exacerbated population alone, patients who were not on corticosteroid therapy had statistically higher levels of neopterin. Of the 23 patients with 2 samples, 7 were having corticosteroid therapy and in 6, levels of neopterin increased in 1 month.

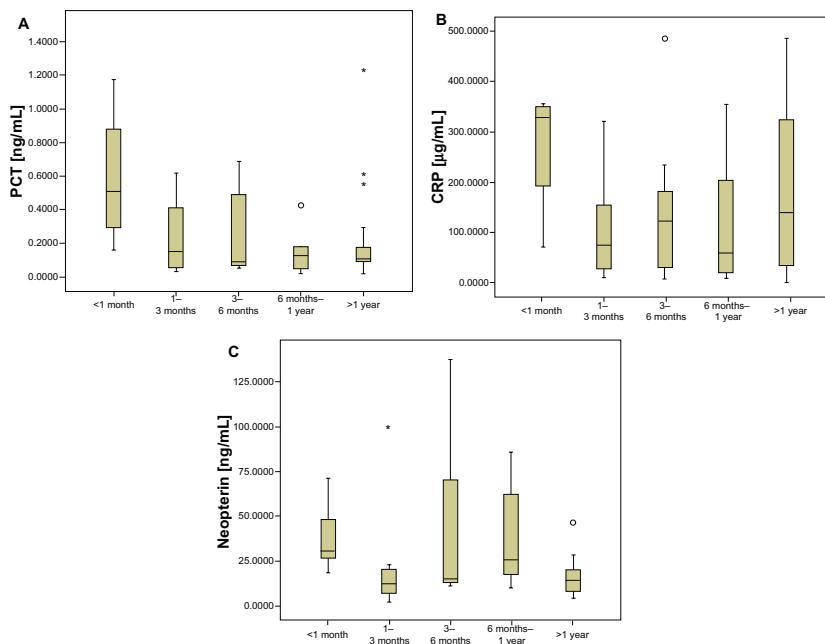
### Biomarkers and exacerbation

It is difficult and challenging to identify the exacerbations of infectious origin. In fact, between 25% and 50% of COPD patients are colonized with potential respiratory pathogens,<sup>1</sup> so the isolation of a predominant microorganism in the sputum is not sufficient to determine the etiological origin of the exacerbation. In stable COPD patients it is possible to isolate potential pathogenic bacteria in sputum samples, so the presence of bacteria during an exacerbation does not

prove its direct involvement in the episode. According to the culture result, it is not possible to differentiate between infection and colonization. So, a negative result or a normal flora result also does not exclude the presence of the microorganism responsible of the exacerbation. Therefore, in the absence of a gold standard, there is need for new tools to identify etiological origin of the episode.

Even if there are no significant differences in PCT and CRP among patients with pathogenic bacteria and normal flora culture results, it is interesting that AUC values for both biomarkers increased when considering variables suggesting infectious origin. Therefore, a relationship between biomarkers and infectious etiology is likely.<sup>12,34</sup>

Although in our study, PCT did not show significant differences with the probable etiology of the exacerbation, several pieces of evidence reinforce its correlation with bacterial origin. Firstly, in an interventionist study conducted by Stolz and colleagues,<sup>35</sup> PCT guided antibiotic therapy in a group of patients undergoing an acute exacerbation, significantly reduced the antibiotic prescription without negative consequences in the short- and long-term follow-up.



**Figure 4** Distribution of procalcitonin (PCT) (ng/mL) (A), C-reactive protein (CRP) (µg/mL) (B), and neopterin (ng/mL) (C) levels according to the time elapsed between the date of sample collection and the time of death, classified as: less than 1 month, 1 to 3 months, 3 to 6 months, 6 months to 1 year, and more than 1 year.

In addition, they found that PCT levels were not associated with bacterial sputum isolation, being also in accordance with our results. And secondly, PCT levels are significantly increased in proven bacterial infections, such as pneumonia, involving parenchymal damage and a marked inflammatory response,<sup>10</sup> as occurs in COPD patients and shown in our results.

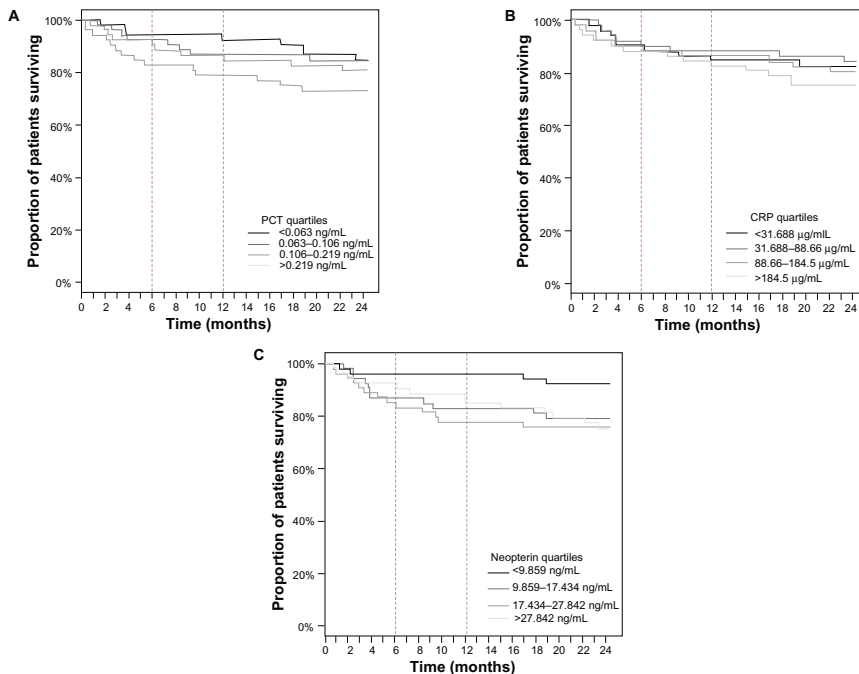
Interestingly, we found that median CRP and PCT levels were high in those exacerbations with isolation of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, and enterobacteria in comparison to patients with isolation of other pathogenic microorganisms. In fact, *S. aureus* and *S. pneumoniae* are able to trigger a significant inflammatory response during pulmonary infections.<sup>10,36,37</sup>

It has been suggested that CRP plays a role during bacterial exacerbations, since higher levels of this biomarker have been observed in exacerbations with mucopurulent expectoration and Anthonisen type I episodes.<sup>15,32,33,38</sup> In our study, CRP levels were almost significant when mucopurulent sputum was present, although no correlation with Anthonisen criteria was found.

Higher neopterin levels were found in the group of patients with normal flora or negative culture results, and these could reflect episodes of viral etiology.<sup>17</sup> Given that

viruses such as rhinovirus, influenza, and adenovirus play a role in stable COPD and in exacerbations episodes,<sup>1</sup> it would have been interesting to examine their presence in our COPD population.

Several factors have been associated with the overall prognosis of COPD.<sup>2,4</sup> It has been suggested that novel biomarkers such as copeptin, pro-adrenomedullin, and pro-atrial natriuretic peptide in combination with the classical ones, such as CRP, are potentially capable of predicting short- and long-term outcomes in exacerbations of COPD.<sup>33,39,40</sup> In our study, the mean number of exacerbations per year was 2.27, and none of the biomarker levels correlated significantly. Although no biomarker showed a relationship with the number of exacerbations in the following year, neopterin correlated significantly with the time to the next exacerbation. In addition, neopterin and age were the only predictive factors independently associated with 2-year survival. Patients who died in the first month after the sample was collected had significantly higher levels of PCT and neopterin. It is then reasonable to hypothesize that the punctual measurement of some biomarkers during an exacerbation episode might help



**Figure 5** Kaplan–Meier curves showing the proportion of patients surviving according to procalcitonin (PCT) (A), C-reactive protein (CRP) (B), and neopterin (C) levels at admission. Values of P log-rank test are 0.323 for PCT, 0.65 for CRP, and 0.089 for neopterin.

in identifying severe patients with a higher risk of death in the short term, being useful for the identification of short-term prognosis.

### Limitations

This study has some limitations. First, the low number of patients in some of the analysis subgroups is insufficient to draw robust conclusions. It is for this reason that further studies including a larger number of patients will be necessary. Second, we did not investigate for the presence of virus either by serological studies or molecular methods. And, finally, we did not take a second serum sample from all the exacerbated patients 1 month later. However, our study provides useful data about the usefulness of biomarkers in the field of COPD exacerbations.

### Conclusion

In summary, this study provides additional data on the use of systemic biomarkers in COPD patients. Biomarkers also vary depending on the COPD clinical status, when considering

patients individually. The identification of exacerbation etiology by means of circulating biomarkers is encouraging, but has as its main disadvantage the absence of a gold standard to definitely demonstrate its value. Nevertheless, interventional studies have already demonstrated the potential use of biomarkers for this purpose.<sup>35</sup> Levels of biomarkers were higher in patients who died within 1 month, providing information on the short-term prognosis. It may be that the combination of serial biomarker measurements with clinical data could help in the understanding and management of COPD patients.

### Acknowledgments

We thank the nursing staff of the Pneumology Department, and Microbiology Laboratory technicians of the Hospital de Sant Boi and the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol for technical assistance. J Domínguez is a researcher of the “Miguel Servet” programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain). The manuscript has been revised by a native English speaker who is both a professional translator

and qualified philologist from “Unitat d’Assessorament Lingüístic i Traduccions Documents de Recerca” at the Universitat Autònoma de Barcelona. We are indebted to Oliver Hartman and Irma Casas for statistical assessment, to Dr Joaquim Gea for external critical review and to Oriol Martos for his kind technical assistance.

## Financial support

This study was supported by grants from Fundació La Marató TV3, Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP03/00112), Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP), Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).

## Disclosure

No company had a role in the design or conducting of the study, collection, management, or interpretation of the data, preparation, review, or approval of this manuscript. The authors have no conflict of interest, including specific financial interests or relationships or affiliations to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

## References

- Sapey E, Stockley RA. COPD exacerbations. 2: aetiology. *Thorax*. 2006;61(3):250–258.
- Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002;57(10):847–852.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350(10):1005–1012.
- Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21(2):347–360.
- Seemungal TA, Hurst JR, Wedzicha JA. Exacerbation rate, health status and mortality in COPD – a review of potential interventions. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2009;4:203–223.
- Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(1):6–14.
- Lacoma A, Prat C, Andreo F, Dominguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev*. 2009;18(112):96–104.
- Bathoorn E, Liesker JJ, Postma DS, et al. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2009;4:101–109.
- Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung*. 2008;186(6):403–409.
- Prat C, Dominguez J, Andreo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect*. 2006;52(3):169–177.
- Muller B, Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(Suppl 9):8–16.
- Tang H, Huang T, Jing J, Shen H, Cui W. Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: a systematic review and meta-analysis. *Infection*. 2009;37(6):497–507.
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1805–1812.
- De Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J*. 2006;27(5):902–907.
- Weis N, Almdal T. C-reactive protein – can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med*. 2006;17(2):88–91.
- Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther*. 2001;26(5):319–329.
- Ip M, Rainer TH, Lee N, et al. Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(2):131–136.
- Barbera JA, Peces-Barba G, Agustí AG, et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol*. 2001;37(6):297–316.
- Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest*. 2000;117(5 Suppl 2):398S–401S.
- Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM Jr, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000;31(2):347–382.
- Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd update ed. Washington: ASM Press; 2007.
- Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc*. 1975;50(6):339–344.
- Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, et al. Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respir Med*. 2010;104(3):397–403.
- Coonrod JD, Rytel MW. Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis. I. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. *J Lab Clin Med*. 1973;81(5):770–777.
- Dominguez J, Galí N, Blanco S, et al. Detection of Streptococcus pneumoniae antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest*. 2001;119(1):243–249.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med*. 1987;106(2):196–204.
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007;131(5):1557–1566.
- De Kruijff MD, Lemaire LC, Giebelen IA, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med*. 2008;34(3):518–522.
- Perren A, Cerutti B, Lepori M, et al. Influence of steroids on procalcitonin and C-reactive protein in patients with COPD and community-acquired pneumonia. *Infection*. 2008;36(2):163–166.
- Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agustí AG. Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J*. 2006;28(6):1245–1257.
- Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J*. 2007;30(3):556–573.
- Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):867–874.
- Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest*. 2007;131(4):1058–1067.
- Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):206–217.
- Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, et al. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest*. 2007;131(1):9–19.

36. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med.* 1998; 339(8):520–532.
37. Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* 2004; 25(3):143–149.
38. Bircan A, Gokirmak M, Kilic O, Ozturk O, Akkaya A. C-reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: role of infection. *Med Princ Pract.* 2008;17(3):202–208.
39. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Plasma pro-adrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest.* 2008;134(2):263–272.
40. Lacombe A, Prat C, Andreo F, et al. Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chim Acta.* 2010;412(5–6):470–475

**International Journal of COPD**

**Publish your work in this journal**

The International Journal of COPD is an international, peer-reviewed journal of therapeutics and pharmacology focusing on concise rapid reporting of clinical studies and reviews in COPD. Special focus is given to the pathophysiological processes underlying the disease, intervention programs, patient focused education, and self management protocols.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-copd-journal>

This journal is indexed on PubMed Central, MedLine and CAS. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

**Dovepress**



#### 4.5. Article 5

##### **Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.**

Alicia Lacoma, Cristina Prat, Felipe Andreo, Luis Lores, Irene Latorre, Miguel Pérez,  
Joan Ruiz-Manzano, Vicente Ausina, Jose Domínguez.

Clinica Chimica Acta 2011; 412: 470-475.

La MPOC és una malaltia crònica amb un alt component sistèmic. Recentment, l'interès s'ha centrat en identificar biomarcadors sistèmics que aportin informació sobre el pronòstic a curt i llarg termini. En aquest segon treball hem avaluat la utilitat del MR-proANP per a la valoració del pronòstic a curt i llarg termini, en el mateix grup de pacients en que havíem avaluat biomarcadors que podien suggerir etiologia.

Els resultats mostren que els nivells de MR-proANP van ser significativament inferiors en aquells pacients en estabilitat clínica respecte als que tenien diagnòstic de pneumònia. També vàrem observar per un subgrup de pacients exacerbats, que els nivells de MR-proANP disminuïen de forma significativa en un mes. Els nivells de MR-proANP es van mostrar significativament superiors en aquells pacients amb comorbilitats d'origen cardíac i renal. Els nivells també es van mostrar superiors en les exacerbacions amb aïllament de flora comensal o cultiu negatiu. La mitjana de dies d'hospitalització va ser de 12.92 dies, i va correlacionar positivament amb els nivells de MR-proANP. Finalment, quant a mortalitat, els nivells van ser superiors en aquells pacients que morien en el mes posterior, disminuint a mesura que la data de mort es produïa més tard.

De l'estudi se'n desprèn que la identificació de l'etiologia de l'exacerbació mitjançant MR-proANP no és clínicament fiable, que els nivells varien en funció de l'estat clínic del pacient, amb valors més elevats en aquells casos amb pneumònia respecte als pacients en estabilitat i que els nivells són superiors en aquells pacients que moren en el mes posterior a l'episodi d'exacerbació.







Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim)

## Usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease

Alicia Lacoma<sup>a</sup>, Cristina Prat<sup>a</sup>, Felipe Andreo<sup>b</sup>, Luis Lores<sup>c</sup>, Irene Latorre<sup>a</sup>, Miguel Pérez<sup>a</sup>, Juan Ruiz-Manzano<sup>b</sup>, Vicente Ausina<sup>a</sup>, Jose Dominguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>b</sup> Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>c</sup> Hospital de Sant Boi, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 November 2010

Received in revised form 22 November 2010

Accepted 23 November 2010

Available online 4 December 2010

#### Keywords:

COPD

Exacerbation

Pro-atrial natriuretic peptide

Prognosis

### ABSTRACT

**Background:** A recent approach for the management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the measurement of systemic biomarkers. The aim of this study was to evaluate the usefulness of mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) to predict short and long term prognosis.

**Methods:** We included 318 COPD patients: 46 in a stable phase, 217 undergoing an exacerbation and 55 with pneumonia. Serum samples were collected at admission. For 20 exacerbated patients, we also collected a second sample one month later. MR-proANP was measured by an immunofluorescent assay.

**Results:** Statistically higher levels of MR-proANP were found in patients with pneumonia when comparing to patients in the stable state ( $p=0.031$ ). For those patients with paired samples, MR-proANP decreased statistically one month later ( $p=0.027$ ). MR-proANP showed significant lower levels in exacerbations with isolation of pathogenic bacteria ( $p=0.011$ ). MR-proANP levels were higher in patients that died within one month, decreasing as long as the moment of death occurred later on ( $p=0.163$ ).

**Conclusions:** The identification of exacerbation etiology by means of MR-proANP is not clinically reliable. Levels of MR-proANP vary depending on the clinical status, being higher during pneumonia in comparison to the stable state. MR-proANP levels were higher in patients that died within one month after the exacerbation episode.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are episodes that influence the disease progression and are closely related to morbidity and mortality rates [1]. Exacerbation definition relies basically on respiratory symptoms and its subsequent health-care utilization, being subjective and prone to intra-observer interpretation. In this sense, having at one's disposal an objective parameter, such as biomarker seems an attractive alternative [2].

In the last years, systemic inflammation has gained importance and significance in the assessment of COPD. An increase of systemic inflammation, measured as an increase of circulating cytokines, chemokines and acute phase reactants may intervene in different and several processes that can occur simultaneously during COPD, such as ischaemic heart disease and cardiac failure [3].

As long as COPD involves a systemic inflammation, it is possible to detect different biomarkers in patient's peripheral blood [4]. In this sense, a recent approach in the management of COPD is the measurement of systemic biomarkers that may assess different aspects of the disease: in one hand, identifying the etiological origin of the exacerbation; and on the other hand assessing short and long term prognosis after an exacerbation.

C-reactive protein (CRP) has been evaluated in different settings of COPD patients, and relationships with bacterial exacerbation origin, risk of hospitalization, and prognosis have been found [5–8]. Precursors of hormonal peptides, such as procalcitonin (PCT), pro-vasopressin, also known as copeptin, pro-adrenomedullin (proADM) and pro-endothelin have also been assessed in COPD population with promising results [9,10].

In contrast, data regarding pro-atrial natriuretic peptide (proANP) in COPD patients is scarce [11]. Atrial natriuretic peptide (ANP) is synthesized by cardiac atrial myocytes while brain natriuretic peptide (BNP) is preferentially synthesized in ventricles, and particularly in patients with chronic cardiac diseases [12–17]. It is conceivable that two separate cardiac endocrine systems exist, one in the atrium,

\* Corresponding author. Servei de Microbiologia, Fundació Institut en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 497 88 94; fax: +34 93 497 88 95.

E-mail address: [jadomb@gmail.com](mailto:jadomb@gmail.com) (J. Dominguez).

where ANP and its related peptides are preferentially produced, and the other one in the ventricle, prevalently secreting BNP and its related peptides [18,19]. Stimuli for natriuretic peptides production are multiple, such as proinflammatory factors, hypoxia and conditions of increased cardiac pressure and volume overload, being wall stretch the most important stimulus for its synthesis and secretion [18–22]. In some COPD patients, higher values of pulmonary capillary wedge pressure might increase the shear stress on the wall of cardiac chambers, stretching right ventricular and atrial walls and finally stimulating the secretion of ANP by atrial cardiomyocytes. According to this, increased levels of MR-proANP should be correctly interpreted as an index of cardiac stress able to stimulate the cardiac endocrine function [14]. Recent data has also reported that some cytokines produced in acute sepsis, as well as in acute or chronic inflammation of cardiac or even extra-cardiac tissues, may also stimulate the production of these hormones peptides by cardiomyocytes [23].

ANP prohormone consists on a polypeptide of 128 amino acids. Biochemical assays developed to detect proANP levels aim specifically the mid-region of the prohormone N-terminal fragment (MR-proANP) [24]. MR-proANP is the stable C-terminal fragment of the ANP precursor and has been evaluated as a severity and prognostic marker in lower respiratory tract infections, especially during community acquired pneumonia [11,25].

This study has two main objectives: to determine levels of MR-proANP in COPD patients in a clinically stable period, during an exacerbation and during pneumonia and, secondly, to establish if MR-proANP levels can be used to predict short and long-term prognosis after an exacerbation episode.

## 2. Material and methods

### 2.1. Setting and study population

We included 318 adult COPD patients from September 2001 to September 2005, that were admitted to Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Hospital de Sant Boi de Llobregat (Spain). Ethical approval was provided by the Ethics Committee from both institutions and written informed consents were obtained from participants.

The diagnosis of COPD was based on clinical history, physical examination and spirometric criteria according to the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR) guidelines [26]. Following the standard recommendations for the diagnosis and treatment of patients with COPD of SEPAR, COPD severity was categorized into mild ( $80\% < FEV_1 < 60\%$ ), moderate ( $59\% < FEV_1 < 40\%$ ) and severe ( $FEV_1 < 40\%$ ) [26]. Patients with history of asthma, cystic fibrosis or active pulmonary tuberculosis were excluded from the study.

Study population consisted on 46 COPD patients during a clinically stable phase (defined as no exacerbation within the last month or pneumonia within 2 months); 217 undergoing an exacerbation, and 55 COPD patients diagnosed of pneumonia. Exacerbation was defined by the presence of two or more of the following three symptoms: worsened dyspnea; worsened sputum volume and/or change in its colour; and a new or worsening cough [27]. Pneumonia was defined by clinical (presence of fever, cough, and dyspnea) and radiographic signs (pneumonic infiltrate in the chest radiograph), as well as clinical evolution, assessed by expert clinicians and radiologists [28].

For those patients, in both pneumonia and exacerbation groups, in order to identify the etiological origin, we collected sputum samples and blood cultures for microscopic examination and standard bacteriological culture; and urine for antigen detection [29].

Epidemiological (age, gender) and clinical history data (presence of comorbidities, smoking status, COPD status,  $FEV_1$ , chronic oxygenotherapy, and previous steroid and antibiotic therapy) were collected. For the exacerbated patients, we also collected information regarding the characteristics of the exacerbation episodes (Anthonisen criteria, individual clinical symptoms, microbiological findings, length of hospitalization).

### 2.2. Patient's follow up

At the moment of study inclusion: hospital admission (for the exacerbation and pneumonia group) or during the scheduled visit (for the stable group) a serum sample was collected from each patient. Two years later, clinical files were retrospectively revised and patient's follow-up was recorded for assessment of clinical evolution (readmission, days until next episode, number of exacerbations within one year and days until death when that occurred). Among the 217 exacerbated patients, for 23 of them we also collected a second serum sample, one month later, when the patient was back to a stable state (recovery phase). All serum samples were stored at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  until MR-proANP measurement.

### 2.3. MR-proANP measurement

MR-proANP was measured with an immunofluorescent assay (KRYPTOR BRAHMS AG, Germany). The lower detection limit of the assay is 2.1 pmol/L and the functional sensitivity is 10 pmol/L. The international guidelines and specific qualifications for measurement of cardiac natriuretic peptides (at least for B-type natriuretic peptide) recommend using ng/L as units instead of pmol/L [30,31]. In the case of MR-proANP, in converting pmol/L to ng/L, the following equation would be necessary:  $\text{ng/L} = 10.616 \text{ pmol/L}$ .

### 2.4. Statistical analysis

Discrete variables are expressed as counts (percentages) and continuous variables as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range [IQR]). MR-proANP levels are expressed as median (interquartile range [IQR]). Comparability of groups was conducted by Mann-Whitney *U* test, Kruskal Wallis tests or Wilcoxon matched-pair test, as appropriate. Correlation analyses were performed using Spearman's correlation. To assess the influence of, MR-proANP, age and COPD severity on 2-year survival a Cox-regression univariate and multivariate analysis were performed. The time to death up to 2 year was analyzed by Kaplan-Meier survival curves and compared by the log-rank test. Associations were considered statistically significant if *p* value  $< 0.05$ . The commercial statistical software packages used were SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and GraphPad Prism 5 (Graph Pad Inc, San Diego, CA).

## 3. Results

Table 1 shows the characteristics of the population study, according to their corresponding group.  $FEV_1$  measurement at the moment of study inclusion was recorded for 248 patients (78%). For the remaining 70 patients,  $FEV_1$  was not available, but all of them were spirometrically and clinically diagnosed of COPD. Study group is predominantly male (95.3%) with a mean age of 71.21 years (SD 10.10).

### 3.1. Influence of covariates

We assessed the potential influence of the following variables: presence of comorbidities, previous steroid and antibiotic therapy, smoking status, home oxygen and severity of COPD on MR-proANP levels, considering patients in the stable state (baseline) and patients undergoing an exacerbation (Table 2). Levels of MR-proANP were only significantly higher when comparing exacerbated patients with arterial hypertension, congestive heart failure, renal disease and cerebrovascular disease [(187.9 pmol/L; IQR, 105.8–267.5), (172 pmol/L; IQR, 105.45–279), (403.6 pmol/L; IQR, 154.2–801.9) and (184.7 pmol/L; IQR, 107.7–271.4), respectively] in comparison with those patients that did not have the comorbidities considered [(107.05 pmol/L; IQR, 69.3–169.2), (113.5 pmol/L; IQR, 70.62–196.7), (121.3 pmol/L; IQR, 74.5–202.1) and (122.8 pmol/L; IQR 73.77–206.2), respectively].

**Table 1**  
Characteristics of the 318 COPD patients included in the study, according to the group considered (stable, exacerbation or pneumonia).

Characteristic	Population group		
	Stable N = 46 (%)	Exacerbated N = 217 (%)	Pneumonia N = 55 (%)
Age			
Mean ± SD	70.93 ± 10.37	71.38 ± 9.97	69.33 ± 10.6
Gender			
Female	1 (2.2)	13 (6)	1 (1.8)
Male	45 (97.8)	204 (94)	54 (98.2)
Current smoker			
Yes	15 (32.6)	38 (17.5)	14 (25.5)
Ex-smoker	23 (50)	150 (69.1)	38 (69.1)
No smoker	0 (0)	23 (10.6)	1 (1.8)
Not available	8 (17.4)	6 (2.8)	2 (3.6)
Comorbidities			
Neoplasia	8 (17.4)	29 (13.4)	9 (16.4)
Liver disease	0 (0)	10 (4.6)	5 (9.1)
Congestive heart failure	5 (10.9)	61 (28.1)	9 (16.4)
Arterial hypertension	14 (30.4)	82 (37.8)	17 (30.9)
Cerebrovascular disease	2 (4.3)	18 (8.3)	3 (5.5)
Renal disease	4 (8.7)	14 (6.5)	5 (9.1)
Diabetes	12 (26.1)	52 (24)	8 (14.5)
Not available	8 (7.4)	3 (1.4)	0 (0)
Severity COPD (FEV <sub>1</sub> )			
<40%	11 (24)	102 (47)	25 (45.5)
40–59%	22 (47.8)	51 (23.5)	13 (23.6)
60–80%	3 (6.5)	17 (7.8)	4 (7.3)
Not available	10 (21.7)	47 (21.7)	13 (23.6)
Chronic oxygenotherapy			
Yes	2 (4.3)	61 (28.1)	13 (23.6)
No	33 (71.7)	151 (69.6)	41 (74.5)
Not available	11 (23.9)	5 (2.3)	1 (1.8)
Steroid therapy			
Yes	7 (15.2)	121 (55.8)	28 (50.9)
No	24 (52.2)	78 (35.9)	25 (45.5)
Type of steroid therapy			
Inhaled	0 (0)	103 (85.1)	25 (45.5)
Oral	4 (8.7)	10 (8.3)	2 (3.6)
Not specified	3 (6.5)	8 (6.6)	1 (1.8)

**Table 2**  
Effect of confusing covariates in stable and exacerbated population on MR-proANP levels (p values).

Covariates	MR-proANP	
	Baseline	Exacerbation
Comorbidities		
Arterial hypertension	0.284	<0.001*
Diabetes	0.440	0.231
Neoplastic disease	0.447	0.545
Liver disease	–	0.238
Congestive heart failure	0.732	<0.001*
Cerebrovascular disease	0.629	0.036*
Renal disease	0.753	<0.001*
Steroid therapy		
Yes vs no	0.672	0.273
Oral vs inhaled	–	0.751
Smoking status		
Current smokers vs never smokers	–	0.365
Current smokers vs ex-smokers	0.581	0.207
Never smokers vs ex-smokers	–	0.926
Previous antibiotic therapy		
Yes vs no	0.077	0.335
Home oxygen		
Yes vs no	0.061	0.872
Severity COPD		
Mild–Moderate–Severe	0.382	0.647
FEV <sub>1</sub>	0.557	0.660

\* p was considered significant if value was <0.05.

3.2. MR-proANP and clinical state

Circulating MR-proANP levels in stable population (98.77 pmol/L; IQR, 61.33–151.47), at exacerbation (126.7 pmol/L; IQR, 75.67–214.7) and during pneumonia (154.9 pmol/L; IQR, 93.02–233.3) are shown in Fig. 1. MR-proANP levels were significantly higher in patients with pneumonia comparing to stable patients (p=0.031). Levels at exacerbation and pneumonia were similar (p=0.444) and no differences were found when comparing stable state and exacerbation period (p=0.106). When analysing the subgroup of 20 patients with paired samples, MR-proANP levels during the exacerbation (148.5 pmol/L; IQR, 91.25–209.7) were higher than during the stable state (94.58 pmol/L; IQR, 60.45–127.2). As shown in Fig. 2, levels decreased statistically in one month (p=0.027).

3.3. MR-proANP and exacerbation episodes

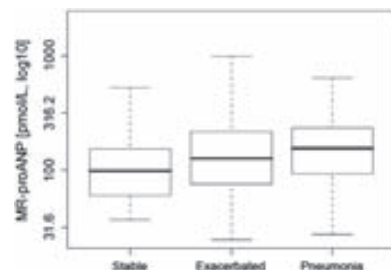
3.3.1. Etiology of the exacerbation

According to the Anthonissen criteria [27], MR-proANP did not show any significant difference (p=0.294). Considering the presence of clinical symptoms, MR-proANP showed significant higher levels in those patients with mucopurulent expectoration (p=0.011) whereas for fever (p=0.340) and respiratory failure (defined as PO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub><250 with respiratory rate>30/min) (p=0.395) no differences were found. Among the 217 sputum samples collected, 163 were valuable for microbiological culture according to Murray's criteria [32]. In 85 cases the result was normal flora and in the 76 remaining, potential pathogenic bacteria was isolated. Normal flora was defined as microorganisms belonging to the oropharyngeal or gastrointestinal flora that are not usually involved in respiratory infections in non immunocompromised patients [32]. MR-proANP (p=0.010) levels were significantly higher in those patients with a normal flora culture result (152.6 pmol/L; IQR 96.9–253.5) in comparison to cases with isolation of pathogenic bacteria (108.85 pmol/L; IQR 74.2–182.1).

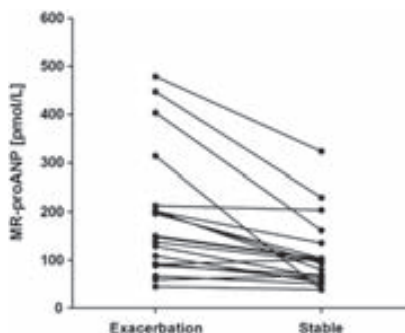
3.3.2. Exacerbation severity and patient's follow-up

The mean length of hospitalization for patients admitted for an exacerbation episode was 12.92 days (SD 29.20) and a positive correlation for MR-proANP was found (correlation coefficient 0.204; p=0.007). Among these exacerbated patients, 147 (67.7%) had to be readmitted in the following year at least once, due to a new exacerbation episode. MR-proANP levels were significantly lower (p=0.020) in patients that had to be readmitted (115.7 pmol/L; IQR 72.33–197.5) in comparison to patients that were not readmitted (146.1 pmol/L; IQR 97.33–255.6).

The mean number of days until the next hospitalization due to a new exacerbation was 210.86 (SD 309.43) and the mean number of exacerbations within the following year was 2.27 (SD 2.05). MR-



**Fig. 1.** Distribution of MR-proANP (pmol/L) levels according to the patient's group: during a clinical stable state (n=46), during an exacerbation episode (n=217) or during a pneumonia (n=55).



**Fig. 2.** Levels of MR-proANP (pmol/L) for the 20 patients with two serial samples, the first one collected during the exacerbation episode and the second one collected one month later. Each patient is represented individually. Levels of MR-proANP ( $p=0.027$ ) decreased statistically in one month.

proANP did not correlate with any of these parameters ( $p=0.662$  and  $p=0.903$ , respectively).

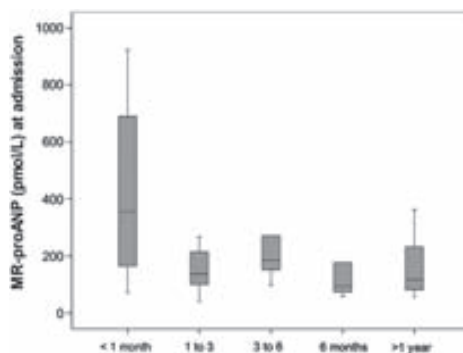
Two exacerbated patients, both with severe COPD died during the exacerbation episode, and MR-proANP levels were 456 pmol/L and 924 pmol/L. Globally, fifty-three patients died, 41 in the following two years, and the 14 remaining later on. MR-proANP levels were higher in non-survivors (143.2 pmol/L; IQR, 81.3–259.7) than in survivors (121.6 pmol/L; IQR, 74.3–204.3), although this difference was not statistically significant ( $p=0.163$ ). The time elapsed between the moment when the sample was collected and the moment that the patient died was also recorded and no correlation for MR-proANP was found (correlation coefficient  $-0.252$  and  $p=0.080$ ). MR-proANP levels in the group of patients that died within one month (355.7 pmol/L; IQR, 116.94–807) were higher than levels in those patients dying later on (139.8 pmol/L; IQR, 78.5–225), although this difference did not reach statistical significance ( $p=0.217$ ). As shown in Fig. 3 levels of MR-proANP decreased as long as the moment of death occurred later on. In the multivariate Cox regression model analysis, age was the only predictive factor independently associated with 2-year survival ( $p=0.01$ ). Kaplan–Meier survival curves showing patients according to MR-proANP quartiles levels are shown in Fig. 4. Higher levels of MR-proANP corresponded to less proportion of patients surviving, although value of  $p$  log-rank test is 0.3687.

#### 4. Discussion

In recent years, COPD has been described as an inflammatory disease with systemic consequences [33]. It is possible to assess this inflammatory response by detecting levels of different biomarkers in serum and plasma of COPD patients [4].

Theoretically, circulating biomarkers might be influenced by several factors, such as the medical treatment or the underlying diseases. It is for this reason that it is essential to identify likely reliable interferences. In our experience, MR-proANP secretion was not statistically influenced by the smoking habit, although a relationship between smoking and low-grade inflammatory response exists [34]. Regarding the impact of corticosteroids on inflammatory markers, in a previous study, de Kruijff et al. found in a human endotoxemia model that the injection of LPS resulted in an increase of MR-proANP, that was dose dependent inhibited by the administration of prednisolone [35]. Nevertheless, in our COPD population, we found no differences on MR-proANP levels when comparing patients according to the use of corticosteroid treatment.

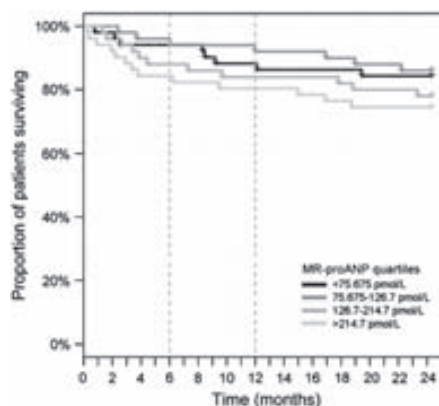
Comorbidity is frequently related to COPD affecting the disease progression and the prognosis [36]. Comorbidities more frequently found



**Fig. 3.** Distribution of MR-proANP (pmol/L) levels according to the time elapsed between the date of sample collection and the moment of death, classified as: less than one month, 1 to 3 months, 3 to 6 months, 6 months to 1 year and more than 1 year.

are arterial hypertension, diabetes mellitus, cancer and cardiovascular diseases. COPD is a chronic and progressive disease itself that if combined with the presence of other conditions has a worse prognosis. The assay of ANP and its related peptides, such as MR-proANP is absolutely cardio-specific, but not disease-specific. Indeed, increased levels of ANP can be observed in several cardiac and even extra-cardiac diseases [14]. Levels of MR-proANP showed significant higher values when considering the presence of arterial hypertension, congestive heart failure and renal disease. ANP is involved in a complex pathway that regulates vasomotor tone, systemic blood pressure and electrolyte homeostasis and has several physiological properties, ranging from blood pressure lowering properties to natriuretic and diuretic properties [37]. As ANP is a marker of renal and cardiovascular dysfunction, its levels are understandably increased in patients with these conditions [38]. Although further studies are required, serial measurements of MR-proANP might be useful for monitoring some specific COPD coexisting illnesses.

Surprisingly, levels of MR-proANP were significantly higher in those exacerbated patients with isolation of normal flora result. In recent studies assessing levels of MR-proANP in lower respiratory tract infections and pneumonia, no correlation with the etiology of the



**Fig. 4.** Kaplan–Meier curves showing the proportion of patients surviving according to MR-proANP quartiles values. Value of  $p$  log-rank test is 0.3687.

infection was found, either of bacterial or viral origin [11,25,39]. In our opinion, MR-proANP might reflect dysfunction rather than etiology, unlike other biomarkers, such as CRP and PCT whose levels have been found to correlate with etiology [40–42]. However, it is difficult to assess the relationship between MR-proANP and exacerbation origin, due to the possible colonization of the tracheobronchial tree that limits the value of sputum culture result.

MR-proANP levels were similar for patients with exacerbation and pneumonia, regardless of the main cause. In the COPD stable group, biomarkers levels might reflect a basal local and systemic inflammation [33,43]. In contrast, for those patients exacerbated or with pneumonia, there might be an amplification of this basal inflammation, and thus an increase in inflammatory markers [44,45]. This might be one of the reasons why levels in exacerbated and pneumonia groups were higher than in the stable group. In fact, the only statistically difference was found when comparing stable state to pneumonia. Indeed, pneumonia is an infection with parenchymal damage, involving a noteworthy inflammatory response [46]. It is conceivable that some COPD patients, especially those with more severe and long-standing disease and inflammatory exacerbations, or even acute pneumonia may present higher levels of MR-proANP compared to stable, due to the increase of capillary wedge pressure or increase of circulating levels of cytokines. Increased levels of MR-proANP should be correctly interpreted as an index of cardiac stress able to stimulate the cardiac endocrine function, which can be due or not to exacerbations of COPD or pneumonia in a specific patient. Interestingly, when we compared individually MR-proANP concentrations for the 20 patients with two consecutive samples, one from the exacerbation episode and the other one from the stable state, we found that levels decreased in one month, assumingly to individual basal levels.

One aspect that has also to be considered is that not all patients might have the same basal levels in the stable state and this is mainly due to different profiles of disease progression and clinical presentation. In addition, each patient has its own biological fitness, and this may influence in the biomarkers levels. Therefore, the increase of MR-proANP levels during an exacerbation or pneumonia episode, as well as final concentrations reached might be different. This is one of the reasons that might explain why the ideal approach is probably not to establish cut-off biomarkers levels for the overall COPD population but to individually monitor patients and assess the intra-individual biomarkers variation in the long term [4].

In a study by Muller et al. [11], authors assessed MR-proANP levels during lower respiratory tract infections, including exacerbations of COPD. They found that MR-proANP levels in the group of stable COPD patients were similar when comparing to exacerbated patients. On the contrary, in our experience levels were higher during exacerbation in comparison to stable state although with no statistical significance. In addition, they found that patients with underlying COPD and pneumonia had higher levels of MR-proANP than COPD patients exacerbated without pneumonia, being in accordance with our results. This reinforces the fact that pneumonia triggers an inflammatory response that is higher than the one observed in exacerbated COPD patients. Regarding COPD and exacerbation severity, assessed by means of FEV<sub>1</sub> and Anthonissen criteria, no significant differences in levels of MR-proANP have been found either in our study or in theirs. In general, MR-proANP levels in our study are slightly higher when comparing to values observed in the study by Muller et al. and maybe this is due to the patient's heterogeneity across the two studies. Although MR-proANP levels have been measured with two different techniques, the lower detection limits and functional assay sensitivities are almost identical, so these differences cannot be attributed to the immunoassays.

Several factors have been related to the overall prognosis of COPD [47–49]. Novel biomarkers such as copeptin and proADM in combination with the classical ones, such as CRP have also been suggested to predict short and long-term outcome in exacerbations of COPD [9,10],

BNP has also been investigated in COPD patients and has been proposed as predictor of exacerbation in stable COPD [50]. In a study by Stolz et al., in patients undergoing an exacerbation, BNP levels independently predicted the need for intensive care [51]. However, BNP levels failed to adequately predict short-term and long-term mortality rates.

Remarkably and in contrast to our expectations, MR-proANP levels were found to be significantly lower in exacerbated patients that had to be readmitted due to a new exacerbation episode. This difference of levels according to the need of readmission was not due to a higher mortality, presence of comorbidities and severity of COPD. MR-proANP levels at admission correlated with the length of hospitalization, similarly to copeptin and PCT as found in a study by Stolz D et al. [10]. Patients dying within the first month after the sample was collected had higher levels of MR-proANP, although no statistical difference was reached. This lack of statistical significance might be due to the small number of patients in the non-survivor group. In our opinion, it is assumable to hypothesise, that the punctual measurement of MR-proANP during an exacerbation might help identifying severe patients with a higher risk of death in that specific episode. Stolz et al. [52] found that MR-proANP predicted 2-year survival in patients admitted for COPD exacerbation and that mortality rate was significantly higher across MR-proANP quartiles levels. In our experience, although differences were not statistically significant, we also found that patients with higher levels had worse survival.

This study has some limitations. First of all, is that we did not have a second serum sample from all exacerbated patients. Otherwise the trends in MR-proANP levels from an exacerbation episode to a stable state and its correlation with treatment options would have been more justifiable. In this sense, collecting serial samples during a 2 year period would have been a better approach. Secondly, the low number of patients in some groups is insufficient to draw robust conclusions. And finally, we only assessed one marker of cardiac stress and probably the best option would be a multi-marker approach [53,54], including for example BNP and cardiac troponins I or T [55] to better stratify cardiovascular and mortality risk in COPD patients.

In conclusion, the study provides data regarding the use of MR-proANP in COPD patients. We have shown that the presence of comorbidities is a factor that potentially influences the secretion of MR-proANP, so it needs to be considered carefully. MR-proANP varies depending on the COPD clinical status, with lower levels during the stable state. One month after an exacerbation episode, there is a decrease in MR-proANP levels. The identification of the exacerbation etiology by means of MR-proANP is not clinically reliable. In contrast, MR-proANP can be used as a short term prognosis marker after an exacerbation episode. Indeed its levels were higher in patients that died within one month after the exacerbation episode.

It is essential to keep in mind that biomarkers levels, in this case MR-proANP has to be interpreted in the clinical context. So, it is the combination of MR-proANP serial measurements with clinical data will help in the understanding and management of COPD patients. In this sense, more studies assessing MR-proANP levels are required to define its exact role in the management of COPD.

#### Nomenclature

BNP	Brain natriuretic peptide
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reactive protein
MR-proANP	mid regional pro-atrial natriuretic peptide
PCT	Procalcitonin
proADM	pro-adrenomedullin
proANP	pro-atrial natriuretic peptide

#### Funding

This study was supported by grants from Fundació La Marató TV3, Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP03/00112), Fundació Catalana



de Pneumologia (FUCAP), Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). The company BRAHMS AG has supplied the necessary quantity of BRAHMS MR-proANP KRYPTOR® kits.

### Competing interests

BRAHMS had no role in the design or conduct of the study, collection, management, or interpretation of the data, preparation, review, or approval of this manuscript. Alicia Lacomá has done a scientific short stage in the R + D department of BRAHMS. The remaining authors have no conflict of interest, including specific financial interests or relationships or affiliations to the subject matter or materials discussed in the manuscript.

### Acknowledgments

We thank the nurse staff of the Pneumology Department, and Microbiology Laboratory technicians of the Hospital de Sant Boi and the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol for technical assistance. J. Domínguez is funded by the "Miguel Servet" programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain). We are indebted to Oliver Hartman for statistical assessment, Dr. Joaquim Gea for external critical review and to Oriol Martos for his kind technical assistance.

### References

- Donaldson GC, Wedzicha JA. COPD exacerbations.1: Epidemiology. *Thorax* 2006;61:164–8.
- Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000;117:3985–4015.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009;33:1165–85.
- Lacomá A, Prat C, Andreó F, Domínguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009;18:96–104.
- Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bejers SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:250–5.
- de Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguliar C, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006;27:902–7.
- de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, et al. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008;133:1336–43.
- Patel AR, Hurst JR, Wedzicha JA. The potential value of biomarkers in diagnosis and staging of COPD and exacerbations. *Semin Respir Crit Care Med* 2010;31:267–75.
- Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Plasma pro-adrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 2008;134:263–72.
- Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest* 2007;131:1058–67.
- Peppler B, Suess E, Schuetz P, et al. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* 2006;260:568–76.
- Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004;50:33–50.
- Clerico A, Fontana M, Ripoli A, Emdin M. Clinical relevance of BNP measurement in the follow-up of patients with chronic heart failure. *Adv Clin Chem* 2009;48:163–79.
- Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H17–29.
- Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004;164:1978–84.
- Felker GM, Hasselblad V, Hernandez AF, O'Connor CM. Biomarker-guided therapy in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2009;158:422–30.
- Goetze JP. Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides. *Results Probl Cell Differ* 2010;50:97–120.
- de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Circ Res* 1996;31:7–18.
- McGrath MF, de Bold AJ. Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides* 2005;26:933–43.
- Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocr Rev* 2003;24:341–56.
- Shen W, Xu X, Ochoa M, Zeballos GA, Stewart JM, Hintze TH. Contribution of the ventricles and the atrial appendages to the elevation of plasma atrial natriuretic factor (ANF) during pacing-induced heart failure in conscious dogs. *Basic Res Cardiol* 1996;91:319–28.
- Stewart JM, Wang J, Zeballos GA, Ochoa M, Schustek M, Hintze TH. Role of tachycardia and V wave wall stress in the release of ANF during volume loading. *Am J Physiol* 1993;264:H217–223.
- de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation. *J Invest Med* 2009;57:29–32.
- Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, Bergmann A. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* 2004;50:234–6.
- Prat C, Lacomá A, Domínguez J, et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect* 2007;55:400–7.
- Barbera JA, Peces-Barba G, Agustí AG, et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2001;37:297–316.
- Anthonsen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987;106:196–204.
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007;44(Suppl 2):S27–72.
- Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd update ed. Washington: ASM Press; 2007.
- Apple FS, Panteghini M, Ravkilde J, et al. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin Chem* 2005;51:486–93.
- Apple FS, Wu AH, Jaffe AS, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine practice guidelines: analytical issues for biomarkers of heart failure. *Circulation* 2007;116:e95–98.
- Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975;50:339–44.
- Agusti AG, Noguera A, Saulea J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;21:347–60.
- Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007;131:1557–66.
- de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med* 2008;34:518–22.
- Sin DD, Anthonsen NR, Soriano JB, Agustí AG. Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006;28:1245–57.
- Rubattu S, Volpe M. The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J Hypertens* 2001;19:1923–31.
- Beishuizen A, Hartemink KJ, Vermeis I, Groeneveld AJ. Circulating cardiovascular markers and mediators in acute illness: an update. *Clin Chim Acta* 2005;354:21–34.
- Masia M, Papassotiropi J, Morgenthaler NG, Hernandez I, Shum C, Gutierrez F. Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal proavopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 2007;53:2193–201.
- Muller B, Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(Suppl 9):8–16.
- Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004;39:206–17.
- Prat C, Domínguez J, Andreó F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006;52:169–77.
- Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:26–33.
- Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, Donaldson GC, Wedzicha JA. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:71–8.
- Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:867–74.
- Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med* 2005;26:1–9.
- Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847–52.
- Sin DD, Man SF. Chronic obstructive pulmonary disease: a novel risk factor for cardiovascular disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:8–13.
- Soler-Cataluna JJ, Martínez-García MA, Roman Sanchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochoa R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005;60:925–31.
- Inoue Y, Kawayama T, Iwanaga T, Aizawa H. High plasma brain natriuretic peptide levels in stable COPD without pulmonary hypertension or cor pulmonale. *Intern Med* 2009;48:503–12.
- Stolz D, Breidhardt T, Christ-Crain M, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the risk stratification of acute exacerbations of COPD. *Chest* 2008;133:1088–94.
- Bernasconi M, Christ-Crain M, Müller C, Müller B, Tamini M, Stolz D. MR-proANP predicts 2-year survival in patients admitted for acute exacerbation of COPD [Abstract]. *Eur Respir J* 2009;24(Suppl 53):A4220.
- Clerico A, Vittorini S, Passino C, Emdin M. New and emerging biomarkers of heart failure. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:107–28.
- Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006;113:2335–62.
- Clerico A, Giannoni A, Prontera C, Giovannini S. High-sensitivity troponin: a new tool for pathophysiological investigation and clinical practice. *Adv Clin Chem* 2009;49:1–30.

#### 4.6. Article 6

##### **Biomarkers in the management of COPD.**

Alicia Lacoma, Cristina Prat, Felipe Andreo, Jose Domínguez.

European Respiratory Review 2009; 18: 96-104.

En aquest treball, hem resumit les troballes més recents, tot revisant les publicacions entre els anys 2000-2009, referents a l'ús de biomarcadors sistèmics en la MPOC, quant a la seva aplicabilitat i potencials limitacions.

Donada la importància de la MPOC en termes de morbiditat i mortalitat, en els darrers anys s'ha fet més evident la necessitat de disposar de noves eines per al maneig dels pacients amb aquesta malaltia. En aquest sentit, l'ús de nous biomarcadors mesurables en sang ha esdevingut una bona alternativa. Les funcions principals d'aquests biomarcadors, serien d'una banda facilitar la identificació de l'origen de les exacerbacions, i d'altra banda permetre una valoració individual del risc, quant a termes de morbiditat i mortalitat.

La influència de factors propis de l'individu, com serien la severitat i presentació de la MPOC, la presència de comorbiditats i els tractaments previs, fan que de cara al futur, la millor opció sigui monitoritzar els nivells de biomarcadors de forma individual durant l'evolució clínica del pacient, en comptes d'establir punts de tall per la població general.







## REVIEW

# Biomarkers in the management of COPD

A. Lacoma<sup>\*,#</sup>, C. Prat<sup>\*,#</sup>, F. Andreo<sup>#,†</sup> and J. Domínguez<sup>\*,#</sup>

**ABSTRACT:** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is still a leading cause of morbidity and mortality worldwide, with a huge socioeconomic impact. New strategies for the management of COPD are required, not only for identifying the origin of the exacerbation episodes, but also to assess an individual risk for each patient. A promising approach is to measure systemic biomarkers and correlate their levels with exacerbation characteristics and clinical prognosis of the disease. Several biomarkers have clearly correlated with the aetiology of lower respiratory tract infections and the response to antibiotic treatment, indicating a potential utility in COPD exacerbation. Nevertheless, the results available at the moment, together with the absence of a gold standard for identifying the aetiological origin of an exacerbation, impedes establishing the real utility of these biomarkers for this concrete task. Regarding the clinical evolution and prognosis, several clinical characteristics have been correlated to biomarker levels. The potential influence of many factors (severity of the disease, presence of comorbidities and treatment) leads to the conclusion that, in the future, the best option would be to monitor levels individually, rather than establishing cut-off points for the general COPD population.

**KEYWORDS:** Biomarker, chronic obstructive pulmonary disease, exacerbation, inflammation

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the leading respiratory disease in terms of prevalence and socioeconomic impact worldwide [1]. The prevalence and burden will continue to increase in the coming years, owing to the continued exposure to risk factors, such as tobacco, and the ageing of the world's population. The disease is characterised by the presence of an airflow limitation that is not fully reversible, and is usually progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to noxious particles or gases [2]. Until recently, COPD was thought to cause only pulmonary abnormalities, but recent studies have demonstrated the presence of systemic and extrapulmonary effects [3].

Exacerbation episodes are an important problem for healthcare systems, because of the morbidity and mortality rates. The frequency and severity of these episodes have a significant impact on the patient's quality of life and the course of the disease. In addition, the identification of the aetiological origin of the exacerbation based on the culture of respiratory samples remains controversial, due to the colonisation present in some patients. The traditional marker for COPD progression, in the absence of other validated markers, has been lung function measurement: specifically, forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>). However,

these measurements correlate poorly with the presence of some symptoms and do not take into account extrapulmonary effects [4].

For these reasons, new strategies for the management of COPD patients are required, not only for identifying the origin of the exacerbation episodes, but also to assess individual risk for each patient.

Measurement of circulating biomarkers in peripheral blood of COPD patients has emerged as a new tool, having mainly two applications. One would consist of assessing its utility for exacerbation episodes and use a combination of biomarkers and clinical symptoms to identify the aetiological origin and degree of severity. The second would be to monitor and assess the clinical evolution of the disease, correlating biomarker levels with the response to therapy interventions (inhaled corticosteroids and oxygenotherapy) and also with the potential development of complications that might arise. Both approaches would enable a better risk stratification and correct management of COPD patients.

### BIOMARKERS

A huge amount of biomarkers has been evaluated in COPD patients, but this review summarises the main findings from those used most frequently or those regarded as the most promising.

### AFFILIATIONS

<sup>\*</sup>Servei de Microbiologia, and  
<sup>†</sup>Servei de Pneumologia, Hospital  
 Universitari Germans Trias i Pujol,  
 Fundació Institut d'Investigació en  
 Ciències de la Salut Germans Trias i  
 Pujol, Universitat Autònoma de  
 Barcelona, Badalona, and  
<sup>#</sup>Centro de Investigación Biomédica  
 en Red de Enfermedades  
 Respiratorias (CIBERES), Instituto de  
 Salud Carlos III, Spain.

### CORRESPONDENCE

C. Prat  
 Servei de Microbiologia  
 Hospital Universitari Germans Trias  
 i Pujol  
 Carretera del Canyet s/n  
 08916 Badalona  
 Barcelona  
 Spain  
 E-mail:  
 cprat.germanstrias@gencat.cat

### Received:

February 26 2009  
 Accepted after revision:  
 March 05 2009

### STATEMENT OF INTEREST

None declared.

### PROVENANCE

Submitted article, peer reviewed.

European Respiratory Review  
 Print ISSN 0905-9180  
 Online ISSN 1600-0617

The measurement of cytokines in lower respiratory tract infections and inflammatory conditions is not sufficiently useful. This is mainly due to short plasma half-life, rapid turnover, presence of blocking factors, and compartmentalised production in the lung. In addition, when they are detected in serum, they undergo a fast downregulation. Therefore, acute phase proteins and the so-called hormokines seem to be more reliable, owing to their longer plasma half-life, fewer variations in daily levels and stability *in vivo* and *ex vivo*.

An acute phase reactant extensively evaluated in clinical situations is C-reactive protein (CRP). Its levels are increased in the presence of localised bacterial and viral infections, and also in chronic inflammatory conditions [5]. Another promising inflammatory mediator is neopterin. It is a 2-amino-4-hydroxy peridine synthesised by macrophages and monocytes after induction by interferon- $\gamma$  secreted by T-lymphocytes [6]. It has been reported to act as a mediator of cell immunity against intracellular pathogens, such as viruses, parasites and intracellular bacteria [7]. The soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)-1 is expressed on neutrophils, mature monocytes and macrophages, its levels being increased during sepsis, and not during noninfectious inflammatory conditions [8].

The following markers are also known as hormokines, unlike CRP, neopterin or sTREM-1. They can follow either a classical hormonal expression, or under specific inflammatory and infectious conditions show a cytokine-like behaviour [9, 10]. Procalcitonin (PCT) is a precursor peptide of the hormone calcitonin, and its levels have shown to help in differentiating patients with relevant bacterial infections from the ones with viral infections, the latter ones not requiring antibiotic treatment, or from inflammation not of infectious origin [11]. Adrenomedullin (ADM), whose precursor is pro-ADM, is a potent vasodilator, encoded in the CALC family gene and is mainly produced by the vascular endothelium [12]. Its properties are immunological, metabolic and bactericidal. Copeptin is the stable C-terminal fragment of arginin vasopressin (AVP). AVP is a peptide hormone produced in the hypothalamus and its stimuli for release are hyperosmolarity and hypovolaemia [13]. Finally, endothelin (ET)-1, whose precursor is pro-ET1, is a potent vasoconstrictor, mainly endothelium derived. Stimuli are multiple and include hypoxia and pulmonary infections [14].

From the family of natriuretic peptides, two biomarkers are also candidates: atrial natriuretic peptide (ANP), whose precursor is pro-ANP, and brain natriuretic peptide (BNP). ANP plays a key role in homeostasis regulation and it is released from the heart upon increased stretch of the myocardium, serving as a marker of congestive heart failure [15]. BNP is mainly synthesised in the left and right cardiac ventricles, and plays a role in the regulation of natriuresis, diuresis and vasodilation [15].

The aforementioned markers have been evaluated, particularly in community-acquired pneumonia (CAP), stating for some of them significant correlation with aetiology, severity and prognosis.

In a systematic review, CRP was found to be not sensitive enough for the detection of radiologically proved pneumonia,

and its usefulness for guiding antibiotic prescription was not consistently supported [16]. Conversely, the measurement of neopterin levels in patients with CAP has improved the discrimination between bacterial and viral aetiology [17] and has also shown a correlation with the severity of the infection [18, 19]. In turn, PCT has been extensively evaluated in the clinical context of CAP, its levels correlating with severity scores such as the pneumonia severity index [18, 20]. Regarding aetiological origin, PCT has also been shown to be a specific and sensitive marker of bacterial pneumonia [18–20]. In addition, two interventional trials of PCT-guided therapy in lower respiratory tract infections [21] and CAP [22] have suggested that measuring PCT in some groups of patients might help to reduce antibiotic prescriptions without negative effects on patient recovery. ADM, copeptin, pro-ANP, BNP, ET-1 and sTREM-1 have also been evaluated in CAP, and have been found to be useful for risk stratification [23–29]. Cytokines have also been tested with the purpose of measuring the inflammatory response associated with pneumococcal pneumonia [30, 31]. Table 1 comprises a list of biomarkers and their potential use in the management of COPD.

## BIOMARKERS AND MANAGEMENT OF THE EXACERBATION

### **Inflammation: stable state versus exacerbation**

The COPD definition includes a reference to its inflammatory and systemic component. For this reason a wide range of inflammatory mediators, cytokines, acute phase reactants and biomarkers are found in COPD patients [32]. It is widely accepted that COPD is associated with an increased systemic inflammatory response in comparison with control individuals [33] and that this inflammatory response is amplified during exacerbation episodes, increasing the levels of cytokines and other inflammatory markers [34–37]. TAKABATAKE *et al.* [38] reported higher levels of neopterin in stable COPD patients in comparison with a control group. RADSAK *et al.* [39] found that serum levels of sTREM-1 were increased in COPD patients in a clinically stable state, reflecting an inflammatory process. In addition, levels seemed to correlate negatively with the degree of severity. However, the study only included a small number of patients. It has been observed that high levels of PCT, CRP and pro-ANP present during an exacerbation episode tend to decrease once the patient is back in a stable state. On the contrary, in our experience, levels of neopterin tend to be higher once the patient was in a stable state (unpublished data). Indeed, the “vicious circle hypothesis” explains how bacterial colonisation in the lower airways of COPD patients can perpetuate the inflammation and contribute to the disease progression [40].

### **Aetiological diagnosis**

Exacerbations can be precipitated, among other causes, by bacterial and viral infections, and by common pollutants, such as tobacco and air pollution. But in up to 30% of cases, an aetiological diagnosis cannot be achieved [41]. In addition to this, 25–50% of COPD patients are colonised with potential respiratory pathogens, especially *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* [40–43]. In fact, in some COPD patients it is possible to isolate potential pathogenic bacteria in sputum, not only during an exacerbation but also during a stable state, so the presence of

**TABLE 1** Current biomarkers, biological interest and potential use in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Biomarkers	Biological interest	Potential use in COPD
<b>CRP</b>	Marker of systemic inflammation	Identify aetiological origin of exacerbation Monitor short- and long-term prognosis
<b>PCT</b>	Marker of systemic bacterial infection	Identify bacterial exacerbations Assess treatment effect
<b>Neopterin</b>	Marker of infection by pathogens activating cellular immunity	Identify aetiological origin of exacerbation Assess treatment effect
<b>Copeptin</b>	Marker of homeostasis deregulation	Monitor short- and long-term prognosis
<b>Pro-ANP</b>	Marker of cardiovascular/renal dysfunction	Monitor short- and long-term prognosis
<b>Pro-ADM</b>	Marker of cardiovascular/renal dysfunction	Monitor short- and long-term prognosis

CRP: C-reactive protein; PCT: procalcitonin; pro-ANP: pro-atrial natriuretic peptide; pro-ADM: pro-adrenomedullin.

pathogenic bacteria does not prove its direct implication in the episode.

This is one of the reasons why the identification of exacerbations of infectious origin is difficult and challenging. According to the culture result, it is not possible to differentiate between infection and colonisation. Therefore, taking into account that bacterial colonisation is present in the stable state, and that sputum microbiology is considered of limited value in exacerbation, there is a need for new tools for identifying episode origin.

Even though the presence of mucopurulent sputum expectoration is associated with isolation of pathogenic bacteria, it is difficult, or even impossible, to differentiate colonisation from infection. In addition, sputum samples can also be contaminated with oropharyngeal flora. Thus, a negative result or a normal flora result does not exclude the presence of a micro-organism responsible for the exacerbation. The criteria published by ANTHONISEN *et al.* [44] and the presence of other clinical symptoms are likelihood criteria, and as such are subjective and prone to interobserver variation. In contrast, the measurement of biological markers offers objective data, although it has to be considered in combination with the clinical criteria.

Information from different surveys indicates that although antibiotic prescription is a common practice in COPD patients undergoing an exacerbation, there is no clear evidence of its efficacy in all cases [45]. An inappropriate and uncontrolled use of antibiotics increases health-related costs but also contributes to the spread of resistant microorganisms [46]. Therefore, identifying the origin of the exacerbation would have direct clinical and therapeutic consequences, and also a reduction of antibiotic prescriptions and a lesser selective pressure for resistant bacteria.

The direct consequence of identifying the aetiological origin of an exacerbation episode is that the treatment can be chosen in accordance to the triggering factor. So, the usefulness of biomarkers in this field is to help detect which are the exacerbations that require antibiotic treatment.

PCT, which has been extensively reported to be a specific marker of bacterial infection, has also been evaluated in COPD

patients. However, in exacerbations with isolation of pathogenic bacteria in the sputum, its levels were not significantly increased [47, 48]. A probable explanation would be that in COPD patients the infection might be locally restricted and too nonspecific to result in a remarkable increase of PCT. Since there is an absence of a gold standard for identifying probable infectious exacerbations, it is possible that some positive culture might be colonisation and, in contrast, that some negative culture might be infectious exacerbations.

An interventionist study has found, in patients undergoing an acute exacerbation, that antibiotic guidance according to PCT levels significantly reduced the antibiotic prescription, with no consequences for the short- and long-term prognosis [47]. Although PCT levels are not significantly elevated during exacerbations with isolation of pathogenic bacteria, it might somehow have an influence, as it allows a substantial reduction in antibiotic prescription. In fact, for documented pneumonia clearly associated with bacterial aetiology, PCT levels were significantly increased [18]. DAUBIN *et al.* [49], in a set of COPD patients admitted to the intensive care unit, found that the likelihood of bacterial infection during acute exacerbations was low, as ~40% of the patients had values of PCT <0.1 µg·L<sup>-1</sup>, suggesting probable inappropriate antibiotic use.

HURST *et al.* [36] have proposed CRP to be a tool for identifying exacerbation episodes. Using a proteome array, they analysed the potential utility of 36 analytes in identifying and confirming the diagnosis of exacerbation, without considering the aetiological origin. They found that the most effective combination was CRP levels with the presence of a major symptom, such as dyspnoea, sputum volume or sputum purulence, even though it was not helpful for predicting severity. WEIS *et al.* [50] reported, for 166 patients admitted owing to exacerbation of COPD, that there was large variation of CRP levels, including values in the normal range. Interestingly, patients that reported mucopurulent expectoration had higher levels of CRP than patients with mucoid expectoration. In addition, patients meeting one of the Anthonisen criteria had lower levels than patients with two or more. STOLZ *et al.* [51] also found significant differences when comparing CRP levels according to the Anthonisen classification, with higher values during Anthonisen type I exacerbations. BIRCAN *et al.* [52] also evaluated CRP levels and

found that they correlated with sputum purulence and increased serum white blood cell counts, possibly indicating an infectious origin. PHUA *et al.* [53] found that patients undergoing a type I exacerbation had higher levels of sTREM-1. The authors hypothesised that the patient group with type I Anthonisen criteria might have had a higher airway bacterial load, which triggers systemic inflammation [34, 44], and so increased sTREM-1 levels.

In our experience, COPD exacerbation patients with normal flora or a negative sputum culture result have higher neopterin levels than patients with isolation of pathogenic bacteria [48]. Given that viruses such as rhinovirus, influenza and adenovirus play a role in stable COPD and during exacerbation episodes [54, 55], these higher levels could reflect episodes of viral aetiology [17].

In contrast, pro-ANP is a marker of disease severity and its levels have shown no correlation with aetiology [27]; levels could merely reflect the homeostasis dysfunction. The association between aetiology and other biomarkers involved in cardiovascular and renal regulation has not been reported, but it seems that these mediators would not show a reliable association.

Up to now, markers such as CRP help in confirming the diagnosis of exacerbation. However, what remains unclear, due to the absence of a gold standard, is the real utility they can have for identifying the aetiological origin of the exacerbations, unless we extrapolate the good correlation of some biomarkers with bacterial infection.

#### **Corticosteroid therapy**

COPD patients are also treated with corticosteroids, not only during clinical stability, but also when undergoing an exacerbation episode. As has been reported, corticosteroid therapy decreases the levels of inflammatory markers, with the exception of PCT [56, 57]. The fact that PCT is not influenced by corticosteroid therapy means that it retains its usefulness as a marker of bacterial infection, and allows monitoring of the effectiveness of the antibiotic treatment.

### **BIOMARKERS AND PROGNOSIS**

#### **Influence and impact of comorbidities**

Comorbidity is frequently related to COPD, affecting the disease progression and prognosis [58]. COPD patients are at increased risk of having other coexisting illnesses, mainly cardiovascular disease and lung cancer, even though other chronic conditions such as renal failure and hypertension may also contribute. Theoretically, circulating biomarkers might be affected by the presence of comorbidities. In particular, attention should be focused on renal and cardiovascular diseases, as some of the biomarkers presented are mediators of cardiovascular and renal dysfunction.

Interestingly, neopterin and pro-ANP are influenced by the presence of arterial hypertension and renal disease, in that their levels are higher in patients with these underlying diseases [7, 15]. In addition, pro-ANP levels are also higher in patients with congestive heart failure [27]. ANP, BNP, copeptin, pro-ADM and ET-1 are markers of renal and/or cardiovascular dysfunction, so levels are understandably increased in patients with these conditions [15]. To our

knowledge, PCT levels are not related to chronic and neoplastic disorders, with the exception of the C-cell carcinoma of the thyroid and the small cell carcinoma of the lung [9].

Smoking habits also have to be considered, as smoking causes a low-grade inflammatory response in COPD patients and may influence the levels of some biomarkers [59].

#### **Prognosis and clinical evolution**

Several parameters and characteristics that can be obtained in clinical practice have been proposed to be prognostic markers of morbidity and mortality for exacerbations [60], but their predictive value varied across studies. One example is the BODE (body mass index, airway obstruction, dyspnoea and exercise tolerance) index, which has been recently proposed to be a long-term prognosis marker for COPD patients [61]. Furthermore, the severity and rate of exacerbation have also been evaluated as prognostic factors for mortality [62].

The search for biological markers that may assess different aspects of COPD, such as the pathogenesis, severity, prognosis and response to therapy, has been investigated. Inflammatory cell and cytokine concentrations have been measured in urine, sputum, bronchoalveolar lavage, bronchial biopsy and exhaled breath condensate [63]. But specifically, the search for systemic biomarkers detectable in the peripheral blood has gained interest in the field of COPD in the past years.

Some authors have proposed that measuring some biomarkers during an exacerbation or during a clinically stable state can also be informative about the prognosis at short- and long-term [51, 64–66]. Results may vary, depending not only on the biomarker considered, but also on the characteristics of the COPD population evaluated.

Using a protein microarray platform, it has been possible to establish serum protein expression profiles in COPD patients [64]. A subset of 24 markers showed significant differences between COPD patients and controls and they had different pathobiological functions, being chemoattractants, inflammation mediators and markers of destruction and repair. These selected biomarkers correlated with FEV<sub>1</sub>, diffusing capacity for carbon monoxide, 6-min walk test, BODE index and exacerbation frequency.

CRP is one of the most studied biomarkers, having been evaluated in different settings of COPD patients in order to establish a possible association with basal systemic inflammation in the stable period, cardiovascular risk events, disease prognosis and identification of infectious exacerbations [50–52, 64–66]. When considering the stable state, CRP levels tend to be independent of smoking, lung function and BODE index, while being strongly associated with arterial oxygen tension and 6-min walk distance [67, 68]. Regarding mortality as the primary outcome, for patients with mild to moderate disease, CRP may accurately detect patients with high risk of mortality [69]. However, when patients had moderate-to-severe COPD, CRP was not found to be associated with the survival status [70].

Hormokines have also been evaluated in COPD patients, showing promising results. Specifically, copeptin and pro-ADM levels measured during an acute exacerbation independently predicted survival, and so might be candidate prognostic

**TABLE 2** Baseline information on individual studies assessing biomarkers levels in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients

First author [ref.]	Participants n	Plasma/serum biomarkers	Main findings
<b>TAKABATAKE [38]</b>	35 patients 22 controls	IFN- $\gamma$ sIL-2R Neopterin sICAM-1	Impaired systemic cell-mediated immunity is present in COPD patients and is associated with an increased susceptibility to acute respiratory tract infections. Neopterin levels are increased in stable COPD patients in comparison to the control subjects.
<b>PHUA [53]</b>	43 patients* 62 controls	sTREM-1	Serum levels of the sTREM-1 are significantly higher in COPD patients than in the control group. Anthonisen type 1 exacerbations had higher levels than types 2 and 3 and might also have a higher airway bacterial load.
<b>HURST [36]</b>	90 patients	36 analytes	Levels of CRP, IL-6 and sICAM-1 levels are increased during exacerbations in comparison to the stable state. CRP concentration and the presence of a major exacerbation symptom are useful in confirming COPD exacerbation. Systemic biomarkers were not useful for predicting severity.
<b>PINTO-PLATA [71]</b>	88 patients	CRP	CRP may be a systemic marker of the underlying inflammatory process seen in stable COPD. CRP levels are raised independently of tobacco consumption, and reduced in patients using inhaled corticosteroids.
<b>MAN [69]</b>	4803 patients	CRP	For patients with mild-to-moderate COPD, CRP may accurately detect patients at high risk mortality.
<b>WEIS [50]</b>	166 patients	CRP	CRP values are in the normal range in ~50% of patients admitted with COPD exacerbation. Patients with increased sputum purulence had higher CRP levels. CRP may be used as a marker of significant bacterial infection in exacerbation episodes.
<b>DE TORRES [68]</b>	130 patients	CRP	CRP levels in stable COPD patients are strongly associated with arterial oxygen tension and 6-min walk distance. Levels correlated independently with FEV <sub>1</sub> , GOLD stage and BODE index.
<b>MULLER [26]</b>	60 patients* 50 controls	Pro-ANP	Levels of pro-ANP were higher in the group of patients with exacerbation in comparison to the control group. There was no difference in pro-ANP levels according to the Anthonisen criteria and the severity of COPD.
<b>HURST [34]</b>	41 patients	IL-6 CRP	The systemic inflammatory response observed during an exacerbation is proportional to the inflammation present in the lower airways, and is greater in the presence of a bacterial pathogen in the sputum.
<b>PINTO-PLATA [64]</b>	48 patients 48 controls	143 analytes	Some of the biomarkers analysed are associated with clinical variables, such as degree of airflow limitation, lung transfer factor, BODE index and exacerbation frequency.
<b>DAHL [67]</b>	1302 patients	CRP	CRP levels in the stable state are a strong long-term predictor of future outcomes in COPD patients, independent of smoking and lung function.
<b>STOLZ [47]</b>	208 patients	PCT	PCT guidance for acute exacerbations offers an advantage over standard therapy in reducing antibiotic use without negative consequences for patient recovery.
<b>STOLZ [51]</b>	167 patients	Copeptin CRP PCT	Copeptin might be a better prognostic factor than CRP and PCT for short- and long-term prognosis in patients undergoing exacerbations requiring hospitalisation.
<b>RADSAK [39]</b>	12 patients 10 controls	sTREM-1	Serum concentrations of sTREM-1 are increased in patients with COPD, compared with levels in the control group. Levels of sTREM-1 during the stable state showed a significant negative correlation with lung function impairment.
<b>MULLER [25]</b>	60 patients* 50 controls	Copeptin	Levels of copeptin were higher in the group of patients with exacerbation in comparison to the control group. There was no difference in copeptin levels according to the Anthonisen criteria and the severity of COPD.
<b>PERERA [37]</b>	73 patients	IL-6 CRP	Non-recovery of symptoms at exacerbation is associated with persistently increased systemic inflammation. The time course of systemic inflammation following the exacerbation episode is different between frequent and infrequent exacerbators.

**TABLE 2** Continued.

First author [ref.]	Participants n	Plasma/serum biomarkers	Main findings
<b>PINTO-PLATA [35]</b>	20 patients	IL-6 IL-8 LTB <sub>4</sub> TNF- $\alpha$ SLPI	Patients admitted to the hospital because of an exacerbation experience significant changes in systemic cytokine levels that correlate with symptoms and lung function. During the episode there is a worsening of the airflow obstruction and an increased systemic demand.
<b>PRAT [27]</b>	135 patients*	Pro-ANP	Levels of pro-ANP are increased in COPD patients with pneumonia, and its levels correlate with PSI.
<b>BIRCAN [52]</b>	113 patients 30 controls	CRP	A high level of serum CRP may indicate infectious exacerbation origin in COPD patients and correlates with sputum purulence and increased serum WBC counts.
<b>DE TORRES [70]</b>	218 patients	CRP	For patients with moderate-to-very severe COPD, CRP levels measured during clinical stability are not associated with survival and do not add information to the risk assessment provided by the BODE index.
<b>STOLZ [65]</b>	208 patients	BNP	BNP levels predicted independently the need for intensive care, but failed to adequately predict short- and long-term prognosis in patients admitted with acute exacerbation.
<b>STOLZ [66]</b>	167 patients	Pro-ADM Pro-ET1	Levels of pro-ADM, but not pro-ET1, on admission because of an acute exacerbation, independently predicted 2-yr survival, suggesting it could be useful for predicting prognosis.

IFN: interferon; sIL-2R: soluble interleukin-2 receptor; sICAM: soluble intercellular adhesion molecule; sTREM: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells; CRP: C-reactive protein; IL: interleukin; FEV1: forced expiratory volume in 1 s; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; BODE: body mass index, airflow obstruction, dyspnoea and exercise capacity; pro-ANP: pro-atrial natriuretic peptide; PCT: procalcitonin; LTB<sub>4</sub>: leukotriene B<sub>4</sub>; TNF: tumour necrosis factor; SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor; PSI: pneumonia severity index; WBC: white blood cells; BNP: brain natriuretic peptide; pro-ADM: pro-adrenomedullin; pro-ET1: pro-endothelin-1. \*: the total population included a subgroup of COPD patients.

markers for short- and long-term prognosis [51, 66]. However, these are single-centre studies, so further studies are required to confirm these data. Table 2 summarises the main findings reported for the aforementioned biomarkers in the management of COPD.

## CONCLUSION

Establishing systemic biomarker cut-off values for the general COPD population is probably not the right approach. On one hand, there is too much heterogeneity among COPD patients, in terms of disease severity and progression, presence of comorbidities and clinical presentation. On the other hand, there is no general agreement on the real influence of covariates on biomarker levels. It seems that it would be more appropriate to individually monitor patients and assess the intra-individual biomarker variation/kinetics in the long term. To that effect, it would be possible to correlate the changes in biomarker levels with the appearance and severity of new exacerbation episodes and with complications that may arise from COPD, either from the underlying coexisting diseases or interventions (*i.e.* long-term treatment with corticosteroids or oxygenotherapy); in other words, to assess COPD prognosis by combining clinical data and serial biomarker measurement. However, in order to validate the clinical utility of biomarkers in COPD patients, further multi-institutional and longitudinal studies are required.

There is a wide range of biomarkers, several kinds of clinical samples and different methods of detection available, each with its range of sensitivity. In addition, the clinical moment when the sample is collected (stable disease or exacerbation

episode), and the degree of severity of the disease has also to be considered. All these factors impede stating conclusive affirmations and generalising study findings.

The introduction of biomarkers for the clinical routine management of COPD relies principally on the resources available. In addition, biomarker concentrations should be measured within the first hours of admission, preferably before starting treatment. Serial measurements during the hospitalisation and follow-up determinations could also be recommended. Up to the present time, these factors limit the use of biomarkers to patients requiring hospitalisation, so patients treated in primary care and at home would be excluded. It seems that the combination of diverse biomarkers is clinically informative, and at the moment only available in hospital. Therefore, a substantial investment in the development of easy and reliable immunological assays is required. One answer to this problem would be the implementation of quantitative, quick, point of care tests for the different biomarkers [72] that would be apt for both family physicians and hospital specialists.

In summary, the absence of a gold standard for identifying exacerbations of infectious origin with certainty impedes, for the time being, the understanding of the real usefulness of inflammatory markers in distinguishing between infectious (bacterial) and noninfectious origin. In the forthcoming years, it would be interesting to have at one's disposal a set of biological markers that, combined with clinical symptoms, would identify exacerbation origin according to its aetiology. This would mean that a more rational therapeutic approach, combining antibiotherapy and immunomodulatory treatment,



could be performed. In addition, the correlation of certain biomarker levels/variation with prognostic markers of COPD progression might help us to identify patients with poorer prognosis and higher risk of treatment failure. Consequently, with the combination of clinical data and biomarker levels, medical and treatment decisions might be taken in accordance.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We have received grants from the following scientific societies: Fundació La Marató TV3, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP), Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) for projects evaluating the usefulness of biomarkers in the management of pneumonia and COPD. The company BRAHMS has supplied pre-market kits for the performance of these studies.

**REFERENCES**

- 1 Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765–773.
- 2 Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532–555.
- 3 Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347–360.
- 4 Jones PW, Agusti AG. Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 822–832.
- 5 Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805–1812.
- 6 Weiss G, Murr C, Zoller H, et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 435–440.
- 7 Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26: 319–329.
- 8 Gibot S. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* 2005; 9: 485–489.
- 9 Becker KL, Nylen ES, White JC, et al. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1512–1525.
- 10 Muller B, White JC, Nylen ES, et al. Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 396–404.
- 11 Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med* 2008; 36: 941–952.
- 12 Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, et al. Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue. *Endocrinology* 2005; 146: 2699–2708.
- 13 Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, et al. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 43–49.

- 14 Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 219–224.
- 15 Beishuizen A, Hartemink KJ, Vermes I, et al. Circulating cardiovascular markers and mediators in acute illness: an update. *Clin Chim Acta* 2005; 354: 21–34.
- 16 van der Meer V, Neven AK, van den Broek PJ, et al. Diagnostic value of C reactive protein in infections of the lower respiratory tract: systematic review. *BMJ* 2005; 331: 26.
- 17 Ip M, Rainer TH, Lee N, et al. Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 131–136.
- 18 Prat C, Dominguez J, Andreo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; 52: 169–177.
- 19 Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 963–968.
- 20 Masia M, Gutierrez F, Shum C, et al. Usefulness of procalcitonin levels in community-acquired pneumonia according to the patients outcome research team pneumonia severity index. *Chest* 2005; 128: 2223–2229.
- 21 Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004; 363: 600–607.
- 22 Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 84–93.
- 23 Christ-Crain M, Breidhardt T, Stolz D, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the risk stratification of community-acquired pneumonia. *J Intern Med* 2008; 264: 166–176.
- 24 Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, et al. Proadrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia [ISRCTN04176397]. *Crit Care* 2006; 10: R96.
- 25 Muller B, Morgenthaler N, Stolz D, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 145–152.
- 26 Muller B, Suesse E, Schuetz P, et al. Circulating levels of proatrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* 2006; 260: 568–576.
- 27 Prat C, Lacoma A, Dominguez J, et al. Midregional proatrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect* 2007; 55: 400–407.
- 28 Masia M, Papassotiropu J, Morgenthaler NG, et al. Mid-regional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal proavopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 2007; 53: 2193–2201.
- 29 Schuetz P, Stolz D, Mueller B, et al. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 22.
- 30 Lieberman D, Livnat S, Schlaeffer F, et al. IL-1β and IL-6 in community-acquired pneumonia: bacteremic pneumococcal pneumonia versus *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Infection* 1997; 25: 90–94.

- 31 Ortvist A, Hedlund J, Wretling B, *et al.* Diagnostic and prognostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 457–462.
- 32 Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 515–548.
- 33 Gan WQ, Man SF, Senthilvelan A, *et al.* Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574–580.
- 34 Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, *et al.* Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 71–78.
- 35 Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, *et al.* Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131: 37–43.
- 36 Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, *et al.* Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 867–874.
- 37 Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, *et al.* Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29: 527–534.
- 38 Takabatake N, Sata M, Abe S, *et al.* Impaired systemic cell-mediated immunity and increased susceptibility to acute respiratory tract infections in patients with COPD. *Respir Med* 2005; 99: 485–492.
- 39 Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2007; 2007: 52040.
- 40 Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 336–363.
- 41 Sapey E, Stockley RA. COPD exacerbations. 2: aetiology. *Thorax* 2006; 61: 250–258.
- 42 Wedzicha JA, Donaldson GC. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2003; 48: 1204–1213.
- 43 Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 29: 1224–1238.
- 44 Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, *et al.* Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987; 106: 196–204.
- 45 Puhon MA, Vollenweider D, Latshang T, *et al.* Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are antibiotics indicated? A systematic review. *Respir Res* 2007; 8: 30.
- 46 Nseir S, Ader F. Prevalence and outcome of severe chronic obstructive pulmonary disease exacerbations caused by multidrug-resistant bacteria. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 95–100.
- 47 Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, *et al.* Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007; 131: 9–19.
- 48 Lacombe A, Prat C, Dominguez J, *et al.* Utility of procalcitonin, neopterin, C-reactive protein and MR-proANP measurement in the management of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2008; 32: Suppl. 52, 479s.
- 49 Daubin C, Parienti JJ, Vabret A, *et al.* Procalcitonin levels in acute exacerbation of COPD admitted in ICU: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 145.
- 50 Weis N, Almdal T. C-reactive protein – can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med* 2006; 17: 88–91.
- 51 Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, *et al.* Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131: 1058–1067.
- 52 Bircan A, Gokirmak M, Kilic O, *et al.* C-reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: role of infection. *Med Princ Pract* 2008; 17: 202–208.
- 53 Phua J, Koay ES, Zhang D, *et al.* Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in acute respiratory infections. *Eur Respir J* 2006; 28: 695–702.
- 54 Hurst JR, Wedzicha JA. The biology of a chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Clin Chest Med* 2007; 28: 525–536, v.
- 55 Wedzicha JA. Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 115–120.
- 56 de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, *et al.* The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med* 2008; 34: 518–522.
- 57 Perren A, Cerutti B, Lepori M, *et al.* Influence of steroids on procalcitonin and C-reactive protein in patients with COPD and community-acquired pneumonia. *Infection* 2008; 36: 163–166.
- 58 Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, *et al.* Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006; 28: 1245–1257.
- 59 Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, *et al.* Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131: 1557–1566.
- 60 Groenewegen KH, Schols AM, Wouters EF. Mortality and mortality-related factors after hospitalization for acute exacerbation of COPD. *Chest* 2003; 124: 459–467.
- 61 Celli BR, Cote CG, Marin JM, *et al.* The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 1005–1012.
- 62 Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanchez P, *et al.* Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60: 925–931.
- 63 Tzortzaki EG, Lambiri I, Vlachaki E, *et al.* Biomarkers in COPD. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1037–1048.
- 64 Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, *et al.* Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007; 62: 595–601.
- 65 Stolz D, Breidhardt T, Christ-Crain M, *et al.* Use of B-type natriuretic peptide in the risk stratification of acute exacerbations of COPD. *Chest* 2008; 133: 1088–1094.
- 66 Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, *et al.* Plasma proadrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 2008; 134: 263–272.
- 67 Dahl M, Vestbo J, Lange P, *et al.* C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 250–255.
- 68 de Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, *et al.* C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27: 902–907.



## REVIEW: BIOMARKERS IN COPD

A. LACOMA ET AL.

- 69** Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, *et al.* C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61: 849–853.
- 70** de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, *et al.* C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133: 1336–1343.
- 71** Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, *et al.* C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61: 23–28.
- 72** Price CP, Kricka LJ. Improving healthcare accessibility through point-of-care technologies. *Clin Chem* 2007; 53: 1665–1675.



#### 4.7. Article 7

### **Development, standardization and clinical evaluation of a new immunochromatographic assay for the detection and quantification of procalcitonin in whole blood.**

Alicia Lacom, Margret Schröder, Barbara Thomas.

Scientific technical report 2008.

Des de la seva descripció i un cop coneguda la seva utilitat com a marcador d'infecció bacteriana, els primers estudis avaluant la PCT es van centrar en les infeccions greus, principalment la sèpsia severa i el xoc sèptic durant els quals s'assoleixen concentracions de PCT molt elevades. Els diversos estudis, incloent els presentats en aquesta Tesi mostren que, en el cas concret de les infeccions respiratòries, els nivells són més baixos que els observats en la sèpsia, pel que es requereixen tests més precisos per tal que resultin discriminators.

Actualment existeixen diverses tècniques immunològiques per a la determinació de PCT en mostres de sèrum i plasma. La majoria de tècniques disponibles són automatitzades. L'únic assaig manual és un test ICT, que té com a principals avantatges la rapidesa, ja que s'obté el resultat en 30 minuts i la fàcil utilització. Per a la interpretació del resultat es disposa de quatre rangs de valors:  $\leq 0.5$ ,  $\geq 0.5$ ,  $\geq 2$  i  $\geq 10$  ng/mL. Aquests punts de tall permeten distingir entre sèpsia bacteriana severa d'infecció vírica, sent molt menys precisos per al diagnòstic de les infeccions respiratòries, situacions en les quals els valors de PCT es troben normalment en un rang de concentracions molt més estret: entre 0.1 ng/mL i 2 ng/mL. És per aquest motiu que és necessari disposar d'una tècnica ràpida amb major sensibilitat. En aquest sentit, s'està desenvolupant una nova ICT per a la determinació quantitativa de PCT, que ha de permetre un rang de valors més precís (0.1-5 ng/mL). Es tracta d'un test ràpid, que a més es pot realitzar en sang total, eliminant el procés de centrifugació de la mostra, pel que podria realitzar-se en centres d'atenció primària o fins i tot a la capçalera del malalt. Aquesta tecnologia és adaptable per tots els biomarcadors. En aquest apartat de la Tesi es mostren els experiments realitzats i els resultats obtinguts durant l'estada pre-doctoral al Departament de R+D de BRAHMS Thermo Fisher Scientific (Hennigsdorf, Alemanya).



## Development, standardization and clinical evaluation of a new immunochromatographic assay for the detection and quantification of procalcitonin in whole blood.

Alicia Lacoma, Margret Schröder, Barbara Thomas.  
Scientific technical report. 2008

Procalcitonin (PCT) is a useful tool for the management of infections, particularly those of bacterial origin [1]. At the moment, for the quantification of PCT, both in serum and plasma, there are five assays commercially available: an easy and rapid semi-quantitative immunochromatographic test (ICT) and four automatized different immunoassays [2]. A considerable improvement would be the development of a PCT point-of-care (POC) test. The basis for a POC device is the need of physicians to have fast and reliable results in order to give the correct diagnosis and decide the appropriate treatment [3]. This would be of major importance for patients admitted to the Emergency Department and outpatient visits. For those hospitals or medical centres that can not have access to equipments based on immunoluminometric or immunofluorescent technologies, this assay would be also an appropriate alternative.

It is true that the ICT assay available at the moment is a good alternative. However, the four cut-off points are not very precise ( $<0.5$  ng/ml;  $\geq 0.5$  ng/ml;  $\geq 2$  ng/ml;  $\geq 10$  ng/ml), because they can only distinguish between severe bacterial sepsis from viral infection, being less sensitive for the diagnosis of respiratory infections, conditions with PCT levels in a narrow range: between 0.1ng/ml and 2ng/ml. In the last years, PCT antibiotic guided therapy for respiratory infections (mainly community acquired pneumonia and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease) has emerged as an improvement for patient's management [4, 5]. For this reason, it would be necessary to have at one's disposal a sensitive, specific, easy to perform assay. Unfortunately, at the moment, with the semi-quantitative assay available, it is not possible to reach these levels of sensitivity.

### Material and Methods

**Immunochromatographic test.** In this sense, a new ICT for the quantitative determination of PCT is being developed. This new assay will have a narrow range of detection: 0.1-5 ng/ml. It is a quick test (25-45 min) that can be performed directly on whole blood samples, avoiding a sample centrifugation step. This new assay uses a monoclonal antibody anti-katacalcin conjugated with colloidal gold, present in the conjugate pad and a polyclonal antibody anti-calcitonin fixed in the solid phase (capture test line). The control line has immunoglobulin G anti-katacalcin fixed. In Figure 1 is shown an example of ICT device with its main important elements



Figure 1. ICT device elements

The test is designed for its use with whole blood (venous or capillar) and plasma, being for both cases 40 $\mu$ l the volume required. After the patient sample (whole blood, serum or plasma) has been applied to the test strip, the tracer (conjugate) binds to the PCT in the sample and marked antigen antibody complex forms. This complex moves by means of capillarity through the area containing the test band. Here, the marked antigen antibody complex binds to the fixed anti-calcitonin antibodies and forms a sandwich complex. At a concentration  $> 0.1$  ng/ml, this complex can be seen as a reddish band. Non-bound tracer diffuses into the control band zone, where it is fixed and produces an intensely coloured red control band.

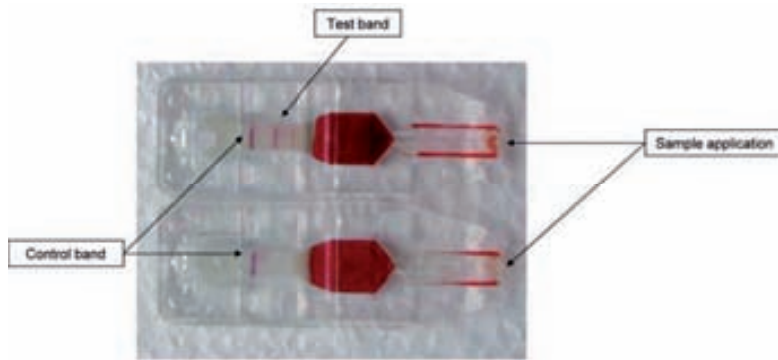


Figure 2. Example of a positive and negative sample for PCT

The functional ability of the test system is checked by means of this control band. In order to validate a result, control band has to appear visible; otherwise the result will be considered invalid (Figure 2). After performing several kinetic studies, different incubation times were established: 25 minutes for blood samples and 45 minutes for plasma samples. For both samples, incubation is performed at room temperature. Specifically, for blood samples it is important to perform lecture in the indicated time; otherwise breakthrough phenomenon appears. This happens when erythrocytes get broken and stain the lecture area. If this is the case, result has to be considered invalid.

Once the reaction has finished, quantification of PCT is done with a reader. This enables the quantitative assessment of PCT levels using a CCD high resolution camera. The green LED emits light at a wavelength of 528nm on the device. Camera compares control and test band intensities with a master curve, and results appear automatically printed.

Information corresponding to master curve is obtained in the laboratory, after performing different assays and experiments. Through a specific mathematical algorithm (MMF Model), band amplitudes will be correlated to different known concentrations of PCT and this will enable that in the future, results will be expressed in ng/ml. Nowadays, in the laboratory, a specific software analysis (Rapid Designer) enables the visualization of amplitude (amp) and area for test band (Tamp) and

control band (Camp) (Figure 3). Up to now, it has not been decided which of the two current reference PCT assays will be the gold standard (Lumitest or Kryptor), so at the moment results obtained with the new ICT are expressed as units of amplitude and not concentration.



Figure 3. Example of Rapid Designer visualization

**Calibrators.** In order to perform the different experiments, the use of lyophilized calibrators of known PCT concentration is needed. Calibrators can be reconstituted with whole blood (healthy donors) or with plasma (PCT free). Blank is defined as plasma sample (PCT free) or blood sample without adding calibrator. For the homogenization of calibrators with whole blood, the use of vortex is not recommended, because blood could hemolyse, stain the card and interfere with the results. Once the test is performed with blood, sample is centrifuged at 10000 rpm during 20 minutes, so plasma can be recovered. This last step is necessary because both Lumitest and Kryptor methods require plasma or serum as matrices.

**Objectives**

The objectives were to analyze and optimize technical aspects that can influence assay performance, and secondly to perform a clinical evaluation assessing new ICT assay concordance with reference assays

**Results and Discussion**

**Assess the influence of temperature on analytical membrane and conjugate solution stability**

Temperature can modify and affect key components of an ICT test. Nitrocellulose membrane and conjugate pad are two of these main elements. The first objective of this experiment was to assess the influence of temperature on nitrocellulose membrane and conjugate pad. For that, we analyze the following tests: ICT card stored at room temperature (RT), ICT card stored at 40°C, ICT card stored at 4°C, ICT with conjugate pad stored at 40°C and nitrocellulose membrane at RT, ICT with conjugate pad stored at RT and nitrocellulose membrane at 40°C. Calibrators were reconstituted with 700 µl of plasma PCT free used and concentrations were as follows: Cal 4: 0.31 ng/ml; Cal 5: 0.6 ng/ml; Cal 7: 2.34 ng/ml and Cal 8: 6,02 ng/ml. The most unstable element that affects PCT quantification is the conjugate pad. Its storage at 40°C corresponds to lower levels of Tamp in comparison to other combinations. Values of Tamp according to the test evaluated are shown in Figure 4. Optimal temperature for tests storage is 4°C, although if kept at RT, Tamp values are not very

affected. Nitrocellulose membrane stored at 40°C does not affect results, because Tamp values are similar to those obtained with test stored at RT.

The second aspect was to analyze the stability of conjugate solution. This solution which contains antibodies conjugated with colloidal gold particles, is prepared early in the morning, and is later applied on the corresponding pads. In previous experiments, results differed according to the moment of the day that solution was applied. To check if conjugate solution became unstable, it was applied at three different moments in the same day (I, II and III). Two different lot number ICT cards were used. Only one calibrator was used (Cal 4: 0.31 ng /ml) that was reconstituted with 700µl of plasma PCT free. Tamp and Camp values according to the moment when the conjugate was applied are shown in Figure 5 and Table 1 , respectively. Combinations 031404\_III and 030404\_III have the lowest values of Tamp and correspond to the last cards prepared with the conjugate solution. Conjugate solution is affected by time, and Tamp value decreases progressively for both lot numbers. From that moment, conjugate solution was prepared first thing in the morning, and was kept at 4°C until needed again. Camp values also decrease as long as the conjugate becomes unstable. After analyzing results from both experiments, it has been demonstrated that the sensibility and efficiency of the test depend mainly on conjugate conditions.

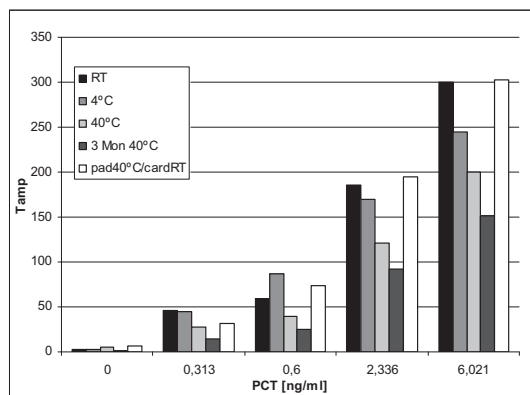


Figure 4. Tamp values according to the calibrators and cards evaluated

Table 1. Values of Camp according to the moment of conjugate application, lot number and calibrator evaluated

Tests	Camp				
	Blank	0.31 ng/ml	0.6 ng/ml	2.34 ng/ml	6.02 ng/ml
031404 I	433	440.8	425.75	409.2	373
031404 II	423.3	425.3	409.5	413.3	384.0
031404 III	352.5	364.5	341.25	319.5	290.75
030404 I	417.3	442.6	433.2	412.8	393.4
030404 II	388.3	387.4	397.6	390.4	287.2
030404 III	312.7	295.6	321.6	317.8	245.6

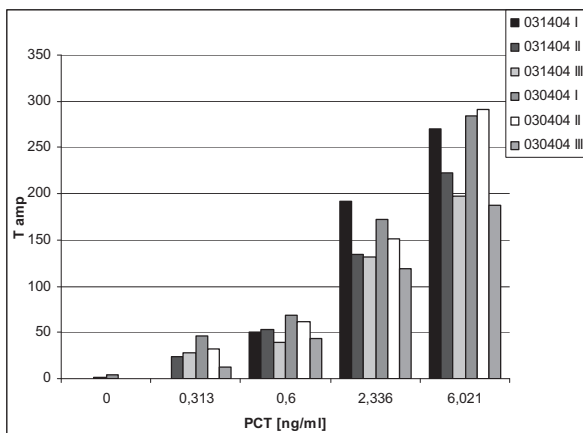


Figure 5. T amp values according to the moment of conjugate application, lot number and calibrator evaluated

#### Assess the influence of anticoagulants

In order to assess whether anticoagulants influence the test performance, we evaluated three different matrices: citrate, heparin and EDTA. And for each matrix, we used two different materials: glass and plastic. We reconstituted 10 calibrators of known concentration with blood of healthy donors. Calibrators concentrations were as follows: Cal 1: 0.22 ng/ml; Cal 2: 0.26 ng/ml; Cal 3: 0.32 ng/ml; Cal 4: 0.55 ng/ml; Cal 5: 0.97 ng/ml; Cal 6: 1.94 ng/ml; Cal 7: 3.95 ng/ml; Cal 8: 7.23 ng/ml; Cal 9: 9.32 and Cal 10: 12.01 ng/ml. Each calibrator was reconstituted with 1.5 ml of blood. Samples were kept at 4°C, and reanalyzed at 24 and 48h.

T amp values and concentrations of PCT according to the matrix considered are shown in Table 2. Amplitude values for test band tended to be lower in samples

collected in EDTA, in comparison to other matrices and these results were also observed when considering concentrations values. In general, T amp and concentration values obtained for plastic containers are more elevated. T amp values decreased along time, from the moment of extraction until the first 24h. After 24h, blood samples become unstable and hemolysis can appear.

#### Sample aging

To test the sample stability at RT, we evaluated 2 calibrators of known concentration (Cal 3: 0.45 ng/ml and Cal 7: 4.25 ng/ml) reconstituted with 6.5 ml of blood from 5 donors at time 0 (approximately 15 min after blood extraction), 2, 4, 8 and 24h. T amp values for each calibrator and donors along time are shown in Table 3



Table 2. Tamp values and concentration of PCT according to the matrix considered.

Matrix	PCTsens. [ng/ml]	PCT Kryptor [ng/ml]	PCT direct [Tamp]	Matrix	PCTsens. [ng/ml]	PCT Kryptor [ng/ml]	PCT direct [Tamp]
ciGI 1	0.045	0.1553	17	ciGI 6	0.88	1.727	123
ciPET 1	0.022	0.1514	17	ciPET 6	0.826	-	133
heGI 1	0.054	0.1383	19	heGI 6	0.865	1.75	132
hePET 1	0.058	0.1478	23	hePET 6	0.832	1.677	131
edGI 1	0.044	0.1351	11	edGI 6	1.04	1.857	101
edPET 1	0.06	0.1417	20	edPET 6	0.833	1.779	88
ed_Ref 1	0.078	0.137	10	ed_Ref 6	0.853	1.764	86
ciGI 2	0.06	0.1482	16	ciGI 7	1.55	3.049	170
ciPET 2	0.056	0.1791	20	ciPET 7	1.46	3.139	171
heGI 2	0.075	0.1875	15	heGI 7	1.49	3.167	202
hePET 2	0.06	0.2019	21	hePET 7	1.47	3.257	179
edGI 2	0.069	0.1831	14	edGI 7	1.45	3.046	157
edPET 2	0.081	0.1908	6	edPET 7	1.38	2.796	119
ed_Ref 2	0.072	0.1996	7	ed_Ref 7	2.36	2.946	141
ciGI 3	0.103	0.3079	33	ciGI 8	2.47	6.248	252
ciPET 3	0.094	0.2234	28	ciPET 8	2.33	6.574	244
heGI 3	0.054	0.3012	24	heGI 8	2.45	-	269
hePET 3	0.101	0.2898	23	hePET 8	2.49	7.228	278
edGI 3	0.153	0.2616	27	edGI 8	2.58	6.792	253
edPET 3	0.089	0.2552	18	edPET 8	2.31	6.389	224
ed_Ref 3	0.075	0.2431	7	ed_Ref 8	1.47	6.647	176
ciGI 4	0.194	0.3349	31	ciGI 9	3.38	2.613	218
ciPET 4	0.196	0.2962	38	ciPET 9	3.02	2.6	219
heGI 4	0.219	0.3241	31	heGI 9	3.03	2.353	212
hePET 4	0.207	0.3461	33	hePET 9	3.22	2.479	192
edGI 4	0.18	0.2825	20	edGI 9	3.44	2.46	196
edPET 4	0.172	0.3088	11	edPET 9	3.25	2.476	205
ed_Ref 4	0.13	0.2477	16	ed_Ref 9	2.89	2.264	193
ciGI 5	0.434	0.7184	90	ciGI 10	3.6	10.99	243
ciPET 5	0.44	0.6957	78	ciPET 10	3.98	11.31	255
heGI 5	0.411	0.7073	81	heGI_A	4.27	11.58	260
hePET 5	0.439	0.6176	76	hePET 10	4.11	11.77	242
edGI 5	0.417	0.5533	67	edGI 10	3.9	11.29	246
edPET 5	0.431	0.5906	65	edPET 10	3.58	11.16	242
ed_Ref 5	0.309	0.5258	56	ed_Ref 10	4.01	10.92	233

ciGI: citrate in glass tube; ciPET: citrate in plastic tube; heGI: heparin in glass tube; hePET: heparin in plastic tube; edGI: EDTA in glass tube; edPET: EDTA in plastic tube; ed\_Ref: EDTA reference (plastic).

A positive correlation between Tamp values and concentrations was obtained for all patients. Tamp values for the blank (direct sample) are <25, so results obtained are valid. Tamp values were almost stable along the 24 h. Data from patient 5 are shown in Figure 6. Variations observed for both calibrators correspond to small changes of Tamp (+/- 10) and these do not result in significant changes of concentration.

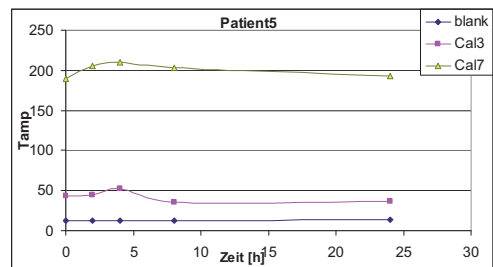


Figure 6. Values of Tamp along time for patient 5

Table 3. Tamp values for calibrators 3 and 7 along time

Donnor	Concentration	t <sub>0</sub>	2h	4h	8h	24h
P1	Blank	24	17	21	16	15
	0.45 ng/ml	52	39	43	44	38
	4.25 ng/ml	194	192	207	177	189
P2	Blank	24	18	16	16	24
	0.45 ng/ml	50	43	43	48	43
	4.25 ng/ml	216	231	218	213	190
P3	Blank	24	10	6	11	14
	0.45 ng/ml	39	36	34	36	32
	4.25 ng/ml	210	205	185	194	192
P4	Blank	24	15	16	13	19
	0.45 ng/ml	53	44	36	36	52
	4.25 ng/ml	209	235	208	181	214
P5	Blank	13	13	13	13	14
	0.45 ng/ml	43	45	53	35	36
	4.25 ng/ml	189	206	210	203	193

**Test rapid aging**

This test consists on assessing which is the stability of the test at long term. The fact of changing temperature conditions simulates different time periods. Before my incorporation to the department, the experiment had already begun in order to simulate 1 year of storage. Until then, test has been performed at 2, 4 and 6 weeks. In table 4 are shown temperature and time conditions for simulating time passing. Concentrations evaluated

were 0.31 ng/ml for Cal 4, 0.6 ng/ml for Cal 5, 2.34 ng/ml for Cal 7 and 6.02 for Cal 8. All of them were reconstituted with 700 µl plasma PCT free. PCT was measured in two groups of cards: stored 8 weeks at 4°C and 8 weeks at 40°C. In Figure 7 is shown that if cards are stored 8 weeks at 40°C, there is a loss of functionality, as Tamp values are lower. Probably membrane components such as antibodies become unstable. Histograms that correspond to 4°C and RT are similar, although for cal 8 differences are more evident.

**Clinical study**

A total number of 55 samples were included in the study. At hospital, PCT was measured in whole blood. Once tests were performed, samples were centrifuged and send to the laboratory, so measurements with LIA sensitive and Kryptor could be performed. After checking results in the laboratory, 24 tests were considered invalid because there had been problems with the reader and presence of hemolysis for some samples; therefore the final number of samples analyzed was 31. Results of PCT measurements with the three different assays for plasma samples and ICT test results for blood samples are shown in Table 5.

Table 4. Equivalences of stress and storage conditions

Temperature (°C)	Stress equivalent to 3y	Stress equivalent to 2y	Stress equivalent to 1y
70	3-4 weeks	2 weeks	1 week
60	2 months	1 month	2 weeks
50	6 months	2-4 months	1 month
40	1 year	5-7 months	2-3 months

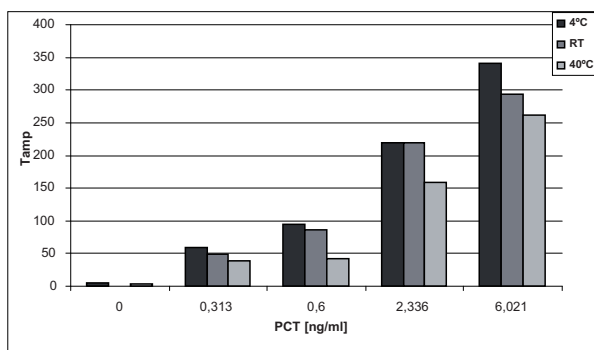


Figure 7. Tamp values according to Cal and storage conditions

Table 5. PCT concentrations according to the patient and assay considered.

Pat.Nr.	KRYPTOR PCT Conc. [ng/ml]	LIA sensitive PCT Conc. [ng/ml]	Plasma-EDTA (Tamp)	Blood-EDTA (T Amp)
PCT01	1.52	1.03	104.5	75.5
PCT03	1.69	1.07	57.5	78
PCT04	7.28	8.62	294.75	238.5
PCT06	0.06	0.05	0.5	10.5
PCT07	7.44	4.89	162.5	150
PCT11	3.38	2.32	137.75	88.5
PCT12	0.81	0.66	74.5	61
PCT15	0.27	0.09	14.25	52.5
PCT16	0.73	0.66	36.5	50
PCT26	2.79	1.89	195	132.5
PCT27	7.04	5.95	255.5	139.5
PCT34	1.62	1.68	148.5	91.5
PCT35	1.16	0.99	87.5	37.5
PCT36	1.73	1.47	114.5	0
PCT37	0.13	0.07	9	0
PCT38	11.83	13.05	323.25	235
PCT39	0.61	0.44	59.75	60
PCT40	0.12	0.06	0.75	0
PCT41	0.18	0.17	11	20.5
PCT43	6.52	5.67	185.75	81
PCT44	0.19	0.13	13	0
PCT45	0.33	0.25	12.75	18.5
PCT46	11.11	8.94	302.25	295
PCT47	12.10	0.12	260.25	221
PCT48	0.15	0.21	0	0
PCT49	2.09	1.44	174.5	144
PCT51	0.14	12.00	16	23
PCT52	0.97	0.73	87	42
PCT54	0.08	0.03	0	0
PCT55	15.90	11.70	304.25	219

Correlation between Tamp values (in plasma and whole blood) and results obtained by LIA sensitive assay is good, as shown in Figure 8. In Figure 9, the same correlation is shown for Kryptor. Trend observed for Kryptor is almost the same that LIA sensitive. In order

to establish the mathematical model that will allow the correlation between Tamp and concentration, one of the two reference test will have to be chosen. In the next figure (Figure 10) is shown the correlation between the two reference methods.

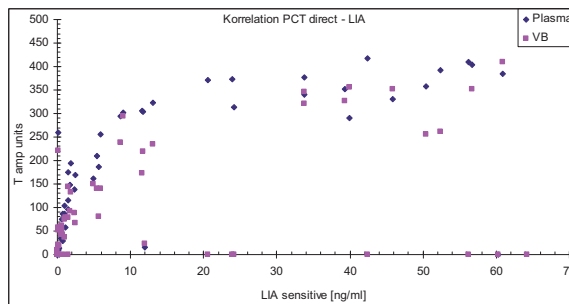


Figure 8. Correlation between Tamp and PCT concentration by means of LIA sensitive for the detection in plasma and whole blood (VB).

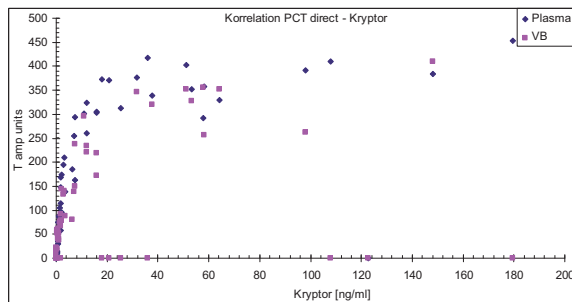


Figure 9. Correlation between Tamp and PCT concentration by means of Kryptor for the detection in plasma and whole blood (VB).

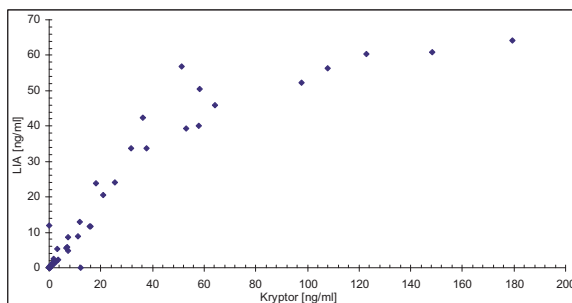


Figure 10. Correlation between LIA sensitive and Kryptor results.

As shown in Figure 10, up to levels of 50 ng/ml, correlation between both methods is satisfactory. However, over this concentration, Kryptor method is more sensitive, reaching values of 200 ng/ml, while LIA sensitive reaches plateau up to 50 ng/ml.

### Conclusions

Results obtained with this new ICT are optimal when using EDTA samples and are stable during the first 24h after blood sample extraction. Solution containing conjugate is one of the main key reagents during production process and it is for this reason that it requires a specific quality control, as it becomes highly unstable at temperatures  $>40^{\circ}\text{C}$ . In addition, it loses activity and functionality if stored at RT during a prolonged time until final production. The optimal storage condition for final product is  $4^{\circ}\text{C}$ , although if kept at RT sensibility and functionality are not affected. Preliminary clinical study results show a good correlation between amplitude values and concentrations obtained with the two reference methods.

This new assay is robust, reliable and easy to use, and might be a useful tool for daily clinical practice.

### REFERENCES

- [1] Muller B and Prat C. Markers of acute inflammation in assessing and managing lower respiratory tract infections: focus on procalcitonin. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 9):8-16.
- [2] Brahms PCT, Thermo Fisher Scientific. <http://www.procalcitonin.com>.
- [3] Price C P and Kricka L J. Improving healthcare accessibility through point-of-care technologies. *Clin Chem* 2007; 53(9):1665-75.
- [4] Christ-Crain M and Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J* 2007; 30(3):556-73.
- [5] Lacombe A, Prat C, Andreo F, et al. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18(112):96-104.



**DISCUSSIÓ**



## 5. DISCUSSIÓ

### 5.1. Factors intrínsecs i extrínsecs que potencialment influeixen els nivells de biomarcadors

Teòricament, la concentració de biomarcadors es pot veure afectada per la influència de diversos factors, com serien el consum de tabac, la presència de malalties coexistents, el tractament corticoide basal i el tractament antibiòtic previ.

El consum de tabac, causa una inflamació basal de baix nivell, i per aquest motiu pot afectar la concentració de determinats biomarcadors [180]. En la nostra experiència, no vàrem trobar diferències significatives per cap biomarcador (Article 4, Article 5). No obstant, sí que vam observar nivells més elevats de PCT i PCR en aquells pacients fumadors i ex-fumadors respecte als no fumadors. En el cas de la PCR s'han realitzat diversos estudis on es descriuen els canvis en les seves concentracions en funció de l'habit tabàquic del pacient, així com els canvis que es produeixen quan el pacient n'atura el consum [181].

La comorbiditat està freqüentment associada a la MPOC, afectant la progressió de la malaltia i el seu pronòstic [119]. Per tant, teòricament els valors de determinats biomarcadors, que al cap i a la fi reflexen processos fisiològics, podrien estar afectats per la presència de determinades malalties coexistents. En el cas de la neopterina, s'han trobat nivells elevats en pacients amb malalties cardíaques i renals, fet que també es reflexa en els nostres resultats (Article 4) [147]. En el cas de la PCT, no s'ha descrit que els seus nivells estiguin relacionats amb desordres crònics però sí s'han associat a dos tipus de tumors: carcinoma medul·lar de tiroides i carcinoma pulmonar de cèl·lula petita [182]. En el cas del MR-proANP, al tractar-se d'un mediador cardiovascular implicat en els mecanismes encarregats de controlar la pressió sanguínia i l'homeòstasi dels electrolits, els seus nivells es veuen irremediament afectats per la presència de comorbiditats d'origen cardíac i renal, com serien la insuficiència renal i insuficiència cardíaca congestiva [159,161,183]. En la nostra experiència en població adulta amb pneumònia, els nivells de MR-proANP van ser significativament més elevats en aquells pacients amb insuficiència cardíaca congestiva i insuficiència renal, en comparació amb els pacients que no les presentaven (Article 1, Article 3). Una troballa important del nostre estudi és que la presència d'aquestes malalties coexistents, i no com a complicacions degudes a la

pneumònia, no interfereix en l'associació dels nivells de MR-proANP amb el grau de severitat valorat pel PSI i el CURB-65 (Article 1). Aquest fet també va ser investigat per Kruger et al, que conclouen que el valor pronòstic del MR-proANP era independent d'un diagnòstic pre-existent de insuficiència cardíaca congestiva o d'altres malalties cardíques [184]. En el cas del MR-proADM, els nivells es troben augmentats en diverses comorbiditats, entre les que destacaríen també les d'origen cardíac i renal (Article 3) [167,168]. No obstant, els nivells més elevats s'han observat en pacients amb xoc sèptic, on jugaria un paper important en la fisiopatologia [168].

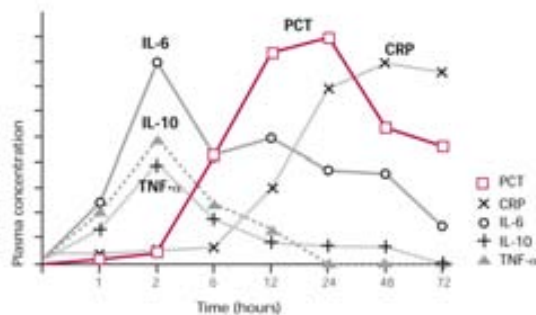
Els corticosteroids, ja siguin inhalats o orals es prescriuen en alguns casos de diagnòstic de pneumònia greu quan s'associa a broncoespasme, així com en pacients amb MPOC [75,121]. S'ha descrit que el tractament amb corticosteroids disminueix els nivells d'alguns biomarcadors, amb l'excepció de la PCT. En un model humà d'endotoxèmia, es va demostrar que els nivells de MR-proADM, MR-proANP, CT-proAVP i PCT s'incrementaven després d'una injecció de LPS, i que els nivells de MR-proADM, MR-proANP i CT-proAVP s'inhibien per l'administració prèvia de prednisolona [185]. No obstant, en un estudi previ es va descriure una inhibició dels nivells de PCT per part d'alguns agents anti-inflamatoris [186]. Perren et al, també van avaluar quina era la influència dels corticosteroids en els nivells de PCT i PCR considerant pacients amb pneumònia. Els pacients es van classificar en dos grups: pacients amb PAC que van rebre únicament tractament antibiòtic i pacients amb MPOC i PAC que van rebre antibiòtics i corticosteroids. En pacients amb MPOC, la disminució en els nivells de PCT i PCR al llarg de 7 dies no va mostrar diferències significatives i conclouen que els corticosteroids no modificaven el procés de disminució de les concentracions de PCT i PCR quan la PAC es tractava adequadament [187]. En la nostra experiència en pacients MPOC exacerbats, els nivells de neoptèrina i PCT van mostrar diferències significatives en funció del tractament previ amb corticosteroids, però la significació estadística es va perdre en considerar els pacients en estat estable (Article 4). En població amb diagnòstic de pneumònia no vam trobar diferències significatives per cap dels biomarcadors analitzats (Article 2, Article 3).

L'impacte dels corticosteroids en els nivells de PCR es manté confús. Alguns treballs declaren nivells més baixos de PCR en pacients MPOC tractats amb corticoides inhalats, mentre que de Torres et al no van trobar diferències en aquest dos grups de pacients [188-190]. La mateixa controvèrsia es dona en considerar els pacients tractats amb corticoides sistèmics. Noguera et al no van trobar canvis significatius en



els nivells de PCR durant la recuperació de pacients exacerbats amb tractament intravenós, mentre que Sin et al van trobar una reducció del 63% en els pacients tractats amb corticoides orals [188,191]. En la nostra experiència en pacients amb diagnòstic de pneumònia i pacients MPOC exacerbats no vam trobar diferències significatives, tot i que vàrem observar que els nivells de PCR eren inferiors en aquells pacients que havien pres corticosteroids previs.

En diversos estudis s'observa com l'administració de tractament antibiòtic correcte fa disminuir els nivells de PCT mentre que, si no es tracta adequadament, els nivells romanen elevats (Figura 20) [153,192]. La cinètica de la PCT consisteix en una inducció molt ràpida en resposta a un estímul, dins de les primeres 2-6 hores. Després d'un increment inicial, els valors depenen del balanç entre la seva vida mitja a plasma (25-30 hores) i la nova producció de PCT [193,194]. Aquesta troballa potencia la seva utilització en la monitorització de l'evolució, però també pot emascarar els resultats en cas de tractament antibiòtic previ a la determinació del marcador. En el nostre medi, no és infreqüent que els pacients arribin a Urgències, ja amb tractament antibiòtic previ. S'han descrit comportaments diferents en funció del biomarcador considerat. En pacients amb pneumònia sense tractament antibiòtic previ s'han descrit nivells més elevats de coceptina, PCT, però no PCR, en comparació amb aquells pacients que sí havien rebut tractament previ. Krüger et al van descriure com els valors de coceptina i PCT s'incrementaven en acord amb la gravetat de la pneumònia, però només en aquells pacients que no havien rebut tractament previ [195,196]. En la nostra experiència, considerant pacients amb diagnòstic de pneumònia i pacients amb MPOC no vàrem trobar diferències significatives en comparar els nivells de PCT, PCR, neopterinina, MR-proANP i MR-proADM en funció de la presa prèvia d'antibiòtic.



**Figura 20.** Representació esquemàtica de la vida mitja en sèrum de PCT, PCR i citocines després d'inducció. De: Meisner, M. Procalcitonin (PCT). A new innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Georg Thieme Verlag Eds. Stuttgart-New York 2000.

## 5.2. Utilitat dels biomarcadors en el maneig de la pneumònia i les exacerbacions de la MPOC

En el maneig de pacients admesos a Urgències, amb febre i símptomes clínics suggestius d'infecció respiratòria de vies baixes, és important assolir un diagnòstic final perquè les decisions referents al tractament i a la necessitat d'ingrés hospitalari són diferents. En la nostra experiència, ens hem centrat en les pneumònies, les exacerbacions de la MPOC i les infeccions bronquials. En alguns casos, pot ser difícil diferenciar aquests diagnòstics, perquè de vegades els signes clínics són inespecífics, i la placa de tòrax ja pot ser de forma basal patològica, especialment en ancians i pacients amb MPOC. En aquest context, disposar d'una eina per ajudar a diferenciar de forma precoç aquests diagnòstics seria útil. Els nostres resultats mostren que els nivells de PCT i MR-proADM van ser superiors en pacients amb pneumònia, en comparació amb les exacerbacions de la MPOC i les infeccions bronquials en pacients sense pneumopatia crònica (Article 3). Durant un episodi de pneumònia té lloc una resposta inflamatòria considerable, amb un alliberament d'endotoxines bacterianes i citocines pro-inflamatòries [197]. En canvi, les exacerbacions de la MPOC i les infeccions bronquials són infeccions locals més restringides, i aquest fet explicaria perquè no es desencadena una resposta sistèmica tant important.

En el maneig de les PAC, un diagnòstic precoç i la valoració del grau de severitat és de gran importància, donat que ambdós guien les decisions terapèutiques referents al tractament apropiat, així com a la necessitat d'hospitalització. S'han desenvolupat diferents *risk scores* per tal de valorar el risc de mort i la indicació d'ingrés, però no són capaços de predir un mal pronòstic un cop el tractament s'ha iniciat ni tampoc permeten valorar la necessitat de intervencions futures o canvis en la teràpia [57,59]. En aquest sentit, en els darrers anys han guanyat protagonisme determinats marcadors d'inflamació i de disfunció cardíaca que han demostrat ser útils en la orientació diagnòstica i pronòstica de determinades infeccions respiratòries de forma complementària als paràmetres clínics i microbiològics [130].

La MPOC provoca alteracions a nivell pulmonar, però recentment també s'han descrit manifestacions sistèmiques, que entre d'altres es tradueixen en l'alteració dels nivells de diversos biomarcadors, que són mesurables en sang circulant [113,123]. Està àmpliament acceptat que la MPOC està associada a un augment de la inflamació en comparació amb els individus sans, i que aquesta resposta inflamatòria es veu incrementada durant les exacerbacions, amb un augment de citocines i altres

mitjancers inflamatoris [115-117,198]. En aquest sentit, una nova via en el maneig de la MPOC és utilitzar els biomarcadors per identificar la probable etiologia de l'episodi d'exacerbació; i d'altra banda valorar el pronòstic a curt i llarg termini després d'un episodi [44] (Article 6).

## 5.2.1. Diferències en funció de l'agent etiològic

### 5.2.1.1. Influència en la pneumònia

En el cas de les infeccions respiratòries de vies baixes, i en concret en les pneumònies, el patró de resposta dels diferents biomarcadors és diferent en funció de l'etiologia. En el cas de la PCT, els nivells es mostren significativament més elevats en aquells casos amb diagnòstic bacterià de seguretat (Article 2, Article 3). De fet, fins i tot agrupant els casos amb diagnòstic de seguretat i els de probable origen bacterià, els nivells de PCT romanen significativament elevats, confirmant així la seva associació amb l'origen bacterià (Article 2). Els nostres resultats són consistents amb un estudi previ, en que vam observar nivells de PCT elevats en la infecció pneumocòccica, especialment quan era bacterièmica, però amb nivells molt discretament elevats en casos per *Legionella* i nivells pràcticament indetectables en infeccions per micobactèries i infeccions per *P. jirovecii* [36]. En el cas del MR-proADM s'ha descrit que la presència d'endotoxines bacterianes i citocines pro-inflamatòries incrementen l'expressió del gen de l'ADM en diversos teixits tant en models animals com en humans [157,199]. Això explicaria perquè els valors de MR-proADM són significativament superiors en aquells pacients amb diagnòstic bacterià de seguretat (Article 3). Els gens que codifiquen per la PCT i el MR-proADM pertanyen a la família del gen de la calcitonina, i s'expressen àmpliament en diversos teixits durant les infeccions bacterianes severes [156]. Aquest fet explicaria perquè els nivells d'ambdós biomarcadors es veuen incrementats durant les infeccions de diagnòstic bacterià definitiu. De fet, en les pneumònies bacterièmiques els nivells de MR-proADM també es van mostrar significativament superiors, troballa també descrita per Christ-Crain et al [200]. S'ha postulat que l'activitat bactericida de l'ADM s'exerceix per la formació de porus a la membrana bacteriana, que causaria la lisi del patogen [201]. Tot i que el MR-proADM té efectes pleiotròpics, el seu rol com a agent antimicrobià també pot en certa manera explicar els nivells elevats durant la sèpsia [170]. Tant en models animals, com en estudis amb pacients amb xoc sèptic, es produeix un augment dels nivells d'ADM, probablement actuant com a mecanisme de defensa envers la infecció.

No obstant, si la concentració esdevé excessiva, es pot produir una major hipotensió, característica del xoc sèptic [168]. La PCR, així com la neopterina també presenten nivells elevats en la infecció pneumocòccica tot i que sense assolir significació estadística (Article 2).

L'ús de la determinació dels nivells de PCR per a orientar sobre el diagnòstic etiològic de la pneumònia, s'ha estudiat àmpliament, encara que els resultats han estat discordants [142,202-205]. En població pediàtrica els nivells elevats de PCT i PCR també mostren una correlació significativa amb l'etiologia bacteriana en les infeccions de vies respiratòries baixes, mostrant una bona sensibilitat per distingir l'etiologia pneumocòccica de les etiologies d'origen atípic i viral [206]. En un estudi de Kruger et al, van trobar nivells significativament més elevats de PCT i PCR en aquells pacients amb pneumònia d'origen bacterià en comparació amb pneumònies d'origen viral o atípic [207]. En canvi, en un estudi de Masia et al, els autors no van trobar diferències significatives per la PCT en comparar la població en funció de l'etiologia. No obstant, si els pacients eren classificats en funció del PSI, els nivells elevats de PCT tendien a predir l'origen bacterià només en aquells pacients classificats com a baix risc [208]. Els nivells de MR-proANP van ser independents quan es va considerar l'etiologia de la pneumònia (Article 1) [209]. En un estudi de Masia et al, els pacients amb pneumònia atípica van mostrar nivells significativament més baixos en comparació amb la resta d'etiologies, però el solapament de valors que existia entre els diferents grups limitava l'ús del MR-proANP com a marcador per suggerir etiologia [210]. Aquests fets indicarien que MR-proANP prediu el grau de severitat de la malaltia, més que la necessitat de teràpia antibiòtica, o l'extensió del teixit inflammat, a diferència del que passaria amb altres biomarcadors com serien la PCT o la PCR. Aquest fet té un valor addicional donat que hi ha algunes etiologies que es presenten amb nivells baixos de PCT, com les pneumònies per *L. pneumophila* i *P. jirovecii*, així com les pneumònies víriques greus i que si més no poden donar lloc a presentació clínica molt severa que requerirà de mesures de suport. De fet, els nivells es troben influenciats pel microorganisme però també pel fet que aquest doni lloc a bacterièmia. En un estudi amb pacients amb sospita de bacterièmia admesos a Urgències es van trobar nivells significativament més elevats de PCT en aquells en què es confirmava la bacterièmia, independentment del microorganisme (Annex II) [211].

LBP també s'ha avaluat com a biomarcador per diferenciar l'etiologia en les pneumònies, trobant-se en concentracions més baixes en pacients amb pneumònia causada per microorganismes atípics [212]. En un estudi de Fernández-Serrano et al

van trobar que durant les infeccions causades per *Legionella*, els nivells inicials de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 i IL-10 eren més elevats respecte a les altres etiologies [213]. Després de 24h, els nivells de IL-6, IL-8 i IL-10 s'incrementaven en les pneumònies pneumocòcciques, mentre que en el mateix interval de temps disminuïen en aquelles pneumònies per *Legionella*. Probablement, els dos microorganismes i els seus components intervenen en diferents punts de la resposta inflamatòria. De fet s'ha descrit que la resposta inflamatòria enfront microorganismes Gram positius i Gram negatius, tot i compartir elements comuns també s'observen diferents patrons d'expressió de citocines [214]. En els pacients amb pneumònia pneumocòccica bacterièmica també es van observar nivells més elevats respecte a aquells casos no bacterièmics, confirmant que la resposta inflamatòria és més prolongada en els episodis bacterièmics.

#### 5.2.1.2. Influència en l'exacerbació de la MPOC

La identificació de l'etiologia de les exacerbacions de la MPOC és difícil i esdevé un repte. A partir del resultat del cultiu bacteriològic, no és possible diferenciar entre infecció i colonització [105]. De manera que, tenint en compte que la colonització bacteriana està present en l'estat estable i que el cultiu bacteriològic d'esput té un valor limitat, es fan necessàries noves eines per a identificar l'etiologia d'aquests episodis. L'alta freqüència de detecció de virus durant les exacerbacions de la MPOC, també reforça el fet que els antibiòtics estiguin sobre-prescrits en aquests pacients i per tant distingir les infeccions virals de les mixtes i les bacterianes té una gran importància. La conseqüència directa d'identificar l'etiologia d'un episodi d'exacerbació és que el tractament escollit estigui en acord amb el factor desencadenant. Així, la potencial utilitat dels biomarcadors en aquest camp, és la d'ajudar a identificar i detectar aquelles exacerbacions que realment es beneficiarien de tractament antibiòtic.

El principal inconvenient per qualsevol tipus d'estudi de l'etiologia de l'exacerbació de la MPOC és la manca de *gold standard*. Encara que en el nostre estudi vam utilitzar el resultat del cultiu bacteriològic d'esput, criteris d'Anthonisen i la presència de diversos símptomes clínics, la PCT no va mostrar diferències significatives en la identificació de la probable etiologia de les exacerbacions. No obstant, diverses evidències reforcen la seva correlació amb l'origen bacterià [215]. En pacients amb MPOC també s'ha avaluat prèviament, i tampoc es van trobar nivells significativament elevats en aquells casos amb aïllament de bacteris patògens [216]. En la nostra experiència, vam trobar

que els nivells de PCT no mostraven diferències significatives en funció del tipus de microorganisme. No obstant, els valors de PCT es van mostrar superiors en aquells casos amb aïllament de *S. pneumoniae*, *S. aureus* i enterobacteris (Article 4). Una probable explicació seria que en pacients amb MPOC, la infecció fos local, es trobés restringida, i fos prou inespecífica perquè es traduís en un increment considerable de PCT. En un primer estudi intervencionista en pacients amb MPOC exacerbats, es va definir un algoritme basat en dos paràmetres: les concentracions de PCT i el criteri mèdic. La troballa principal de l'estudi va ser que l'ús d'aquest algoritme incorporant la concentració de PCT aconseguia reduir les prescripcions antibiòtiques sense afectar al pronòstic a curt i llarg termini d'aquests malalts [216]. És impossible saber, per les seves connotacions ètiques, si el pronòstic seria el mateix si en cap cas es tractés amb antibiòtic. Però l'evidència assolida amb altres síndromes clíniques amb *gold standard* de diagnòstic etiològic, fa pensar que efectivament nivells elevats es correlacionen amb l'etiologia bacteriana.

Donat que els nivells de PCT es veuen disminuïts durant les infeccions víriques, alguns estudis han avaluat si la determinació de PCT podria ajudar a diferenciar les exacerbacions d'origen víric de les d'origen bacterià. A diferència del que succeeix amb les infeccions bacterianes, l'associació entre infeccions virals i inflamació sistèmica ha estat poc investigada [217,218]. En un estudi recent de Kherad et al, avaluant la presència de virus en pacients exacerbats van trobar que els nivells de PCT no mostraven diferències significatives entre aquells pacients amb una infecció vírica provada dels que no [219]. Una de les explicacions per aquest resultat, és que aproximadament un terç dels pacients havien pres tractament antibiòtic previ, i que aquest fet es podria haver traduït en una disminució dels nivells de PCT.

En el cas de les pneumònies, els nivells de PCT es veuen altament incrementats degut a la important resposta inflamatòria que es desencadena [36,220]. En el cas de pacients MPOC amb pneumònia, tal i com hem vist en la nostra experiència, els valors de PCT també assoleixen valors molt elevats. El fet d'incloure un grup de pacients amb MPOC i pneumònia, és que aquest grup és un "control positiu" d'infecció bacteriana. En el cas de pacients exacerbats que requereixen ingrés a la UCI, Daubin et al també han proposat la PCT com a marcador d'infecció bacteriana. Es tracta d'un estudi prospectiu, en el que es proposa un punt de tall de  $>0.1 \mu\text{g/L}$ , en comptes de  $0.25 \mu\text{g/L}$  (proposat prèviament per a les infeccions del tracte respiratori inferior [221]) per predir la probabilitat d'infecció bacteriana en pacients MPOC sever amb diagnòstic de pneumònia [222].

En diferents estudis, s'ha descrit que la PCR juga un paper durant les exacerbacions bacterianes, donat que nivells elevats d'aquest biomarcador s'han trobat elevats en exacerbacions amb expectoració mucopurulenta i amb criteris d'Anthonissen tipus I [198,223-225]. En la nostra experiència, els nivells gairebé van arribar a la significació estadística quant a mucopurulència, encara que en considerar els criteris d'Anthonissen i el resultat del cultiu bacterià no vàrem trobar diferències significatives (Article 4). Justo et al, van estudiar si la determinació dels nivells de PCR en pacients amb MPOC permetia distingir un episodi d'exacerbació d'un episodi de pneumònia. Els resultats mostren que quan es tractava d'una pneumònia i s'iniciava tractament antibiòtic, hi havia una disminució del 36.7% en els nivells de PCR en comparació amb els nivells observats a les 24 hores. En canvi, quan es tractava d'una exacerbació, la disminució en els nivells de PCR era més discreta (5.9%) [226].

En el cas del MR-proANP, va mostrar nivells més elevats en els casos de flora comensal o cultiu negatiu (Article 5). En estudis previs analitzant el comportament del MR-proANP no es va trobar cap relació amb l'etiologia de la infecció, ja fos d'origen bacterià o viral [209,210,227]. El MR-proANP reflexa disfunció cardíaca i renal més que no pas etiologia, a diferència del que hem observat per altres biomarcadors, com serien la PCT i la PCR.

En el cas de la neopterina, sí que s'han relacionat els seus nivells amb les infeccions víriques, i per patògens intracel·lulars en general [147,228]. En el nostre estudi, també es van observar nivells de neopterina significativament elevats en aquells pacients amb resultat de flora comensal o cultiu negatiu, que podrien reflectir episodis d'origen viral (Article 4). Donat que els virus, tals com els rinovirus, influenza i adenovirus juguen un paper en els períodes d'estabilitat i durant les exacerbacions, hauria estat interessant examinar-ne la seva presència [110,219].

## **5.2.2. Diferències en funció de la severitat**

### **5.2.2.1. Influència en la pneumònia**

L'**extensió radiològica** de la pneumònia està associada a un major compromís ventilatori. Fine et al no van trobar que el nombre de lòbuls afectats fos un factor independent de mal pronòstic a diferència del que succeïa amb la presència de vessament pleural [57]. No obstant, té sentit que a major nombre de lòbuls afectats,

major sigui la resposta inflamatòria. En el cas de les citocines, la secreció és compartimentalitzada, però les proteïnes de fase aguda presenten nivells elevats en sèrum, fet que permet aquesta comparació. En la nostra experiència prèvia, en el cas de les pneumònies pneumocòcciques, la PCT i la neopterina van mostrar nivells significativament més elevats en les pneumònies multilobars [36]. No obstant, en l'estudi avaluant les determinacions seriades de biomarcadors, i en l'article avaluant els nous índexs de severitat (Article 2, Article 3) no vam trobar aquesta significació. Un motiu que explicaria aquesta manca de significació resideix en el fet, que la població d'estudi és més petita en aquests dos últims estudis. En el cas del MR-proANP, no es va trobar cap associació amb l'extensió del teixit inflammat (Article 1, Article 2) mentre que pel MR-proADM nivells més elevats s'han observat en les pneumònies multilobars (Article 1, Article 3) [200]. Quant a presència de vessament pleural, els nivells de PCT, PCR i neopterina sí que van ser significativament superiors, mentre que no se'n van observar pel MR-proANP (Article 2). En la nostra experiència, els nivells de MR-proADM també van ser superiors, encara que sense significació estadística (Article 3).

Existeixen diversos **risk scores** basats en les alteracions clíniques, radiològiques i bioquímiques, com serien el PSI, el CURB-65, el SCAP i el SMART-COP [57,59,62,63]. El PSI i el CURB-65 són els índexs més àmpliament validats mentre que el SCAP i el SMART-COP són més novedosos, i encara estan en fase de validació. El càlcul del PSI és complex, donat que inclou un gran nombre de variables, limitant el seu ús generalitzat. A més, sobre-emfatitza la importància de l'edat, de manera que pot arribar a infravalorar la severitat en pacients joves sense comorbiditat. L'alternativa seria el CURB-65 que és un índex més senzill i fàcil de calcular, donat que inclou un nombre de variables més reduït. Tot i això, un inconvenient és que no considera la presència de malalties coexistents, que es poden descompensar a causa de la pneumònia. En determinats casos, també s'utilitza l'índex modificat CRB-65. En una meta-anàlisi recent, s'afirmava que tots tres índexs eren capaços de predir de forma acurada la mortalitat, sense trobar-se diferències significatives [229].

Aquests índexs de severitat es centren bàsicament en classificar els pacients en funció del risc de mort. Els nous índexs, encara en fase d'avaluació i validació estarien més centrats en identificar els pacients amb pneumònia severa que serien tributaris d'ingrés a UCI o de mesures de suport ventilatori o hemodinàmic. En qualsevol cas, cap d'aquests índexs no tenen en compte la resposta de l'hostatger envers la infecció. És en aquest context, que en els últims anys s'han avaluat diversos biomarcadors



sistèmics que en combinació amb els índexs establerts permeten millorar el maneig dels pacients amb pneumònia.

En el moment de l'admissió hospitalària, el valor pronòstic d'una determinació puntual varia en funció del biomarcador considerat. Quant a la PCT, els seus nivells han mostrat una clara relació amb el pronòstic i la severitat de les infeccions sistèmiques [230]. De fet, en els estudis realitzats pel nostre grup i que es presenten com a articles complementaris (Annex I, Annex II), es va veure la correlació de PCT i MR-proADM amb la severitat (admissió a UCI, decés en els 7 dies posteriors o necessitat d'intervenció quirúrgica en les 48h posteriors a l'ingrés) en pacients admesos a Urgències amb sospita de bacterièmia [231]. Concretament en el cas de les PAC, els nostres resultats mostren que els nivells de PCT correlacionen significativament amb el PSI, tal i com s'ha descrit en d'altres treballs (Article 1, Article 2) [36,208,232,233]. En la nostra experiència, en considerar l'índex CURB-65 els valors de PCT també s'incrementen amb la severitat. En un estudi de Kruger et al, els nivells de PCT a l'admissió predien la severitat i l'evolució clínica de la PAC, amb un valor pronòstic similar a la de l'índex modificat CRB-65 [234]. En el cas de la PCR, els seus nivells no van ser capaços de classificar els pacients en funció del PSI (Article 2, Article 3). En canvi, en un estudi de Hohenthal et al, els nivells de PCR sí que van correlacionar significativament amb el PSI, essent útil per la valoració de la severitat [204]. En la nostra experiència actual, la neopterina no va mostrar diferències significatives en comparar els valors en funció del PSI (Article 2, Article 3). En un estudi previ, el nostre grup va descriure que en pacients amb pneumònia pneumocòccica o per *Legionella* els nivells de neopterina correlacionaven encara que no de forma significativa amb el PSI, amb valors més elevats en el grup PSI V [36]. En el cas del MR-proANP i del MR-proADM els seus nivells correlacionen amb la severitat valorada pel PSI i el CURB-65 (Article 3). Els nostres resultats són consistents amb altres estudis publicats que demostren que els nivells d'ambdós biomarcadors estan elevats durant les infeccions del tracte respiratori inferior, especialment durant les pneumònies i que la seva determinació és útil per a la estratificació de la severitat [184,200,210,235-238]. La proET-1 i la coceptina també s'han avaluat en pacients amb pneumònia, i els seus nivells s'incrementen de forma gradual en considerar el PSI i el CURB-65 [210,239,240]. En diversos estudis, s'ha descrit que els valors de biomarcadors en el moment de l'admissió, en combinació amb els índexs de severitat, principalment PSI, CURB-65 i CRB-65 incrementa la predicció de la mortalitat als 30 dies, i del desenvolupament de complicacions [234,238,241-243]. Aquests resultats obren la possibilitat que en un futur els índexs de severitat incorporin com a variable més a tenir

en compte els nivells de biomarcadors, de la mateixa manera que proposem incorporar la PCT en un model predictiu de bacterièmia (Annex I) [211,244].

Fins al moment, aquest és el primer treball avaluant la correlació entre els nivells de biomarcadors i els nous índexs de severitat (Article 3). Els pacients amb criteris de pneumònia severa (SCAP) van mostrar nivells més elevats de PCT, neopterina, MR-proANP i MR-proADM. En considerar tots els pacients, independentment de la presència de criteris de SCAP, els nivells de PCT, neopterina, MR-proANP i MR-proADM van ser significativament superiors en pacients classificats com alt risc en comparació amb pacients amb baix risc. Fins i tot, els nivells de MR-proANP i el MR-proADM van mostrar diferències entre els pacients amb baix risc en comparació amb els de risc intermedi. Quant a l'altre índex de severitat: SMART-COP i la seva versió reduïda SMRT-CO, els biomarcadors presenten comportaments diferents. En considerar l'índex SMART-COP, cap dels biomarcadors va mostrar diferències significatives. No obstant, la neopterina sí que mostrava una significació estadística en classificar els pacients en funció de la puntuació recodificada ( $<3$ ,  $\geq 3$  punts). En considerar SMRT-CO, els nivells de MR-proADM van mostrar nivells més elevats en pacients amb major risc de necessitar suport intensiu. Tot i que l'anàlisi inclou un nombre de pacients amb pneumònia reduït, és cert que existeix una correlació entre els nous índexs de severitat i els nivells de biomarcadors.

Durant un episodi de pneumònia, es desencadenen un seguit de mecanismes relacionats amb la resposta inflamatòria que tenen com a principal objectiu confinar la infecció al pulmó, i eliminar-ne els agents causals. D'altra banda, també s'observen alteracions del sistema cardiovascular, que inclouen canvis en l'homeostasi i disfuncions a nivell endotelial. Exemple de **complicacions** que es poden donar durant una pneumònia serien per exemple el desenvolupament d'empiema, la presència d'insuficiència respiratòria i/o xoc amb la conseqüent necessitat de ventilació mecànica i suport inotrópic. A més no s'ha d'oblidar que les comorbiditats es poden descompensar durant el curs de la infecció. La coexistència de malalties d'origen cardíac, pulmonar i renal poden empitjorar l'evolució i incrementar la mortalitat.

La PCT també s'ha proposat com a marcador pronòstic en les pneumònies, donat que nivells significativament més elevats s'han trobat en pacients desenvolupant algun tipus de complicació [36,208,245]. Específicament quant a mortalitat, nivells baixos de PCT en el moment de l'admissió serien indicadors de baix risc, independentment de la categoria de PSI i CRB-65 [234,243]. En el treball analitzant 300 casos de PAC, els

nivells de PCT només van mostrar diferències significatives al comparar PSI I vs V, i PSI II vs V (Article 1). En un altre dels estudis, un 40% dels pacients classificats com a PSI IV van tenir valors de PCT < 0.05 ng/mL, i cap d'ells va ser admès a UCI o va morir en l'episodi (Article 2). Donat que els nivells de PCT van ser significativament superiors en aquells pacients desenvolupant alguna complicació (ingrés a UCI o decés), es va establir un rang de concentracions per tal d'obtenir el valor màxim de sensibilitat i especificitat. Un *cut off* de 0.1150 ng/mL es va correspondre a un valor de sensibilitat de 85.7%, mentre que un *cut off* de 1.03 ng/mL tenia una especificitat de 79.1%. En la nostra experiència, els nivells de MR-proANP també van correlacionar amb el desenvolupament de complicacions i l'estada hospitalària (Article 1, Article 2) [184,209,210,227,235]. El MR-proANP està involucrat en canvis fisiopatològics que tenen lloc durant les infeccions, i aquest és un dels motius que explica perquè els seus nivells estan elevats durant les pneumònies. En dos dels treballs avaluant MR-proANP en pacients amb pneumònia hem proposat dos punts de tall molt similars per a la identificació de pacients amb complicacions i risc de mort: 128.15 pmol/L i 139.7 pmol/L (Article 1, Article 2). En un estudi recent Claessens et al, van determinar que un punt de tall de 135 pmol/L, dintre del rang que hem establert, els permetia discriminar els pacients en funció de la necessitat d'hospitalització [235]. Quant a mortalitat, tot i que la taxa de mortalitat va ser baixa, els nivells de MR-proANP es van mostrar superiors en aquells pacients exitus respecte els que van sobreviure. Aquestes troballes s'han confirmat en altres estudis [184,227]. De fet s'ha proposat fins i tot com a marcador pronòstic a curt i llarg termini [184,236]. Els resultats obtinguts per la xarxa alemanya d'estudi sobre les pneumònies, anomenada CAPNETZ, també atorguen al MR-proANP la capacitat de predir mortalitat deguda a la pneumònia als 28 i 180 dies [184]. En el cas del MR-proADM, també s'ha proposat com a marcador pronòstic per al maneig de la sèpsia, i la pneumònia [200,237,238,246,247]. De fet, en la nostra experiència, els nivells de MR-proADM també van ser significativament superiors en els pacients que van desenvolupar alguna complicació, definides com a ingrés a UCI o decés per insuficiència respiratòria i/o xoc. En dos treballs diferents, s'han proposat punts de tall per a la identificació dels pacients amb pitjor pronòstic: 1.8 nmol/L i 1.3 nmol/L [200,237] En la nostra experiència, els *cut off* que otorgaven major sensibilitat i especificitat eren 0.95 nmol/L i 1.5 nmol/L, respectivament (Article 3).

Altres biomarcadors que també s'han estudiat com a marcadors pronòstics en les pneumònies serien la proET-1 i la coceptina, en ambdós casos correlacionant amb la severitat de la pneumònia i el pronòstic [210,239,240]. D'altra banda, les citocines també s'han avaluat com a marcadors pronòstics en les pneumònies, donat que s'ha

descriu una clara relació entre la intensitat de la resposta inflamatòria i la severitat del propi episodi, valorada segons la necessitat d'ingrés a UCI i la mortalitat [213,248]. Martínez et al, en un estudi prospectiu van identificar un seguit de factors que s'associaven a un increment de IL-6 i IL-8 en pacients amb pneumònia, destacant la confusió, la hipotensió, el vessament pleural i la presència de bacterièmia [249]. En un estudi del mateix grup, van trobar que els nivells de IL-6 a dia 1 i 3 estaven independentment associats a un major risc de fracàs terapèutic [250].

Donat que la determinació puntual d'alguns biomarcadors ha resultat ser útil per a la valoració del pronòstic en el moment de l'admissió, sembla raonable explorar si les **determinacions seriades** d'aquests biomarcadors també ens permeten valorar l'evolució clínica del episodi.

La PCR s'ha descrit com una eina útil pel seguiment de les pneumònies, donat que els nivells disminueixen en acord amb la millora clínica [204,250-252]. En la nostra experiència, els nivells de PCR i neopterina també van disminuir, però no de forma significativa. Bruns et al van descriure que una normalització tardana en els nivells de PCR entre els dies 3 i 7 de seguiment era suggestiva de tractament antibiòtic inapropiat [251]. L'estudi de l'adequació del tractament mitjançant l'estudi de la cinètica de la PCT i la PCR també s'ha avaluat en pacients admesos a UCI amb resultats prometedors [253,254]. L'estudi de la dinàmica de la PCT té implicacions pronòstiques, donat que nivells persistentment elevats estan associats a un pitjor pronòstic, al contrari del que succeeix quan els nivells disminueixen [156,192]. Diversos estudis han estudiat la utilitat de les determinacions en pacients amb pneumònia admesos a UCI. Jensen et al, van descriure que la mortalitat s'incrementava a cada dia que els valors de PCT augmentaven [153]. A més, van trobar que un valor màxim de PCT a dia 1 de l'ingrés a UCI juntament amb un augment en les concentracions de PCT durant l'estada era un predictor independent de mortalitat en un període de 90 dies després de l'entrada a UCI. D'altra banda, Boussekey et al van descriure que un increment de PCT de dia 1 a dia 3 en pacients amb PAC severa, era signe de mal pronòstic [255]. En la nostra experiència, tot i que només 1 dels pacients amb valors de PCT a dia 1 i 3 va ingressar a UCI una disminució significativa dels nivells de PCT de dia 1 a dia 3 es va observar en pacients que no van desenvolupar complicacions, mentre que en pacients que van acabar desenvolupant algun tipus de complicació els nivells de PCT van romandre similars (Article 2). Menéndez et al van descriure que nivells baixos de PCR i PCT a dia 3 en combinació amb el criteri clínic facilitava la identificació de pacients que no desenvoluparien complicacions [256]. Concretament en les

pneumònies per *Legionella*, De Jager et al van trobar que els nivells de PCR disminuïen independentment del pronòstic, mentre que valors persistentment elevats de PCT es relacionaven amb un mal pronòstic [257]. A excepció d'un estudi, no hi ha massa experiència sobre l'ús de les determinacions seriades de MR-proANP en les pneumònies. Vazquez et al van trobar que els nivells de MR-proANP eren inferiors a dia 3, 5 and 7 en pacients que sobreviuen en comparació amb els que moren [236]. A més, van observar un augment dels nivells en el temps en aquells pacients que serien *exitus*, mentre que en els supervivents els nivells tendien a ser més estables o a disminuir en el temps. Tots aquests resultats estan en acord amb els nostres resultats, reforçant l'alt valor pronòstic que té el MR-proANP en el maneig de les pneumònies. De fet, és important remarcar que pacients amb valors elevats durant les determinacions seriades van correspondre a pacients admesos a UCI, o bé a pacients *exitus* o a pacients classificats com PSI d'alt risc, o a pacients desenvolupant complicacions, com per exemple empiema. En un article recent de Schuetz et al, les determinacions seriades de proET-1 en pacients amb PAC també van ser predictores de mortalitat i admissió a UCI [258] .

Diversos estudis també han explorat la utilitat dels biomarcadors per al diagnòstic i monitorització de la pneumònia associada a ventilació mecànica, amb resultats prometedors per a la PCT i el MR-proANP [259-264].

#### **5.2.2.2. Influència en la exacerbació de la MPOC**

Diversos paràmetres i característiques clíniques s'han proposat i posteriorment avaluat com a factors pronòstics de morbiditat i mortalitat en les exacerbacions [98,124,265-267]. Tot i l'interès epidemiològic, el valor predictiu dels paràmetres clínics varia en funció de l'estudi considerat, i la majoria d'ells no permet una valoració individual del risc [267,268]. Factors pronòstics avaluats serien per exemple: l'índex BODE, així com la severitat i la freqüència dels episodis d'exacerbació [98,126]. En el cas del BODE, la seva determinació és feixuga, requereix la realització de la prova dels 6 minuts en estat estable i no és apropiada per a les exacerbacions severes. De manera, que en els darrers anys, hi ha hagut un interès creixent en utilitzar altres paràmetres, com serien els biomarcadors.

Alguns autors han suggerit que mesurar determinats biomarcadors durant un episodi d'exacerbació o bé durant un període d'estabilitat clínica pot donar informació sobre el

pronòstic a curt i llarg termini [225,269-271]. En aquest sentit, els resultats entre estudis poden variar no només en funció del biomarcador considerat i de la corresponent tècnica de determinació, sinó també en funció de les característiques de la població avaluada.

En la nostra experiència, quant a la severitat de l'episodi d'exacerbació, valorada segons els dies d'hospitalització, tots els biomarcadors analitzats: PCT, PCR, neopterinina i MR-proANP van mostrar una correlació positiva. Altres biomarcadors com la MR-proADM, el proET-1 i la copeptina també han mostrat una correlació amb el temps d'hospitalització [225,271]. En considerar la readmissió per un nou episodi d'exacerbació, l'únic biomarcador que va mostrar significació estadística va ser el MR-proANP. El nombre d'exacerbacions en l'any posterior també s'ha avaluat, però cap dels biomarcadors va ser prou acurat per mostrar una tendència. En un estudi de Perera et al, van proposar que avaluar la concentració de PCR 14 dies després d'un episodi d'exacerbació podia ser clínicament rellevant, donat que van trobar una relació entre nivells elevats de PCR i la presència d'episodis d'exacerbació recurrents en els següents 50 dies [117]. En relació també amb la PCR, de Torres et al van trobar que en pacients MPOC moderat- molt sever, els nivells d'aquest biomarcador no estaven associats a la supervivència, en comparació amb altres paràmetres com l'índex BODE [272]. És ben conegut, que nivells elevats de PCR són predictors de complicacions en les malalties cardiovasculars, i que també s'associen a disminució de la funció pulmonar i empitjorament de la MPOC [273-275]. En un altre estudi, els nivells de PCR en el moment de l'admissió hospitalària no van correlacionar amb el pronòstic a curt i llarg termini [225]. Una possible explicació era que els nivells de PCR augmenten ràpidament durant les infeccions, per després disminuir un cop l'estímul inicial ha desaparegut. Donada la seva alta sensibilitat, però poca especificitat, la PCR no és informativa sobre el pronòstic després d'un episodi d'exacerbació. Bernasconi et al van veure que els nivells de MR-proANP en el moment de l'admissió van ser similars al comparar els pacients amb exacerbacions recurrents greus (als 14-18 dies de l'episodi previ) respecte als que no tenien cap, en els 2 anys posteriors [276].

Quant a mortalitat durant l'episodi d'exacerbació, els nivells de MR-proADM i copeptina a l'ingrés mostren una significació estadística i una tendència, respectivament a trobar-se més elevats en aquells pacients que moren respecte als que sobreviuen [225,271]. En la nostra experiència, quant a la mortalitat global, la comparació dels nivells de biomarcadors entre els pacients que moren i els que sobreviuen no van mostrar diferències significatives, tot i que els valors de PCT, PCR i MR-proANP van ser més

elevats en aquells pacients que moren respecte als que sobreviuen. En el cas de la neopterina no es va trobar aquesta relació. Els nivells de PCT, PCR, neopterina i MR-proANP es van mostrar més elevats en aquells pacients que van morir en el mes posterior a la recollida de la mostra. Els nivells de MR-proANP, proET-1 i MR-proADM han mostrat en d'altres estudis nivells significativament més elevats en pacients que moren respecte als que sobreviuen [225,271]. En el cas de la coceptina, nivells elevats es van associar a un mal pronòstic a llarg termini, independentment de l'edat, la comorbiditat, el grau d'hipoxèmia i del grau d'afectació de la funció pulmonar. Fins i tot, es va proposar que la combinació entre els nivells de coceptina i la informació sobre hospitalitzacions prèvies per exacerbació en l'any previ incrementava encara més el valor pronòstic d'aquest biomarcador [225]. Tot i això, no ha mostrat major utilitat en estudis posteriors. En un estudi avaluant MR-proANP en pacients amb MPOC, els nivells van mostrar diferències significatives en comparar els pacients en funció de la mortalitat als 6 mesos i als 2 anys [276]. El BNP també ha estat avaluat en pacients amb MPOC, i fins i tot s'ha proposat com a predictor d'exacerbació en estabilitat clínica [270,277]. En un altre estudi avaluant aquest mateix biomarcador en pacients exacerbats, els nivells eren capaços de predir la necessitat d'ingrés a UCI. No obstant, no era prou sensible per predir la mortalitat a curt i llarg termini [270]. El SAA també s'ha avaluat en pacients exacerbats, i s'ha proposat com un altre biomarcador que pot resultar útil en la identificació de pacients amb major risc [278].

Per tant, a partir dels diversos estudis realitzats, és assumible hipotetitzar que la determinació puntual d'algun dels biomarcadors durant un episodi d'exacerbació ha d'ajudar a identificar aquells pacients severos amb més risc de mort, essent útil per a valorar el pronòstic a curt termini. Per tal de valorar el pronòstic a llarg termini, també es fan necessaris més estudis longitudinals, que permetin establir de forma acurada el valor pronòstic i predictiu real dels biomarcadors en aquests pacients.

### **5.3. Biomarcadors en el pacient MPOC amb pneumònia**

En pacients amb MPOC la presentació clínica de la pneumònia es pot confondre amb un episodi d'exacerbació. A més, sovint la radiografia de tòrax és patològica de forma basal i, si no es disposa d'imatges prèvies, pot resultar difícil d'interpretar. Finalment, en aquests pacients sovint coexisteix la insuficiència cardíaca, com a comorbiditat que també es descompensa com a conseqüència d'infecció i el diagnòstic diferencial és més difícil [279].

En pacients estables, els biomarcadors reflecteixen una inflamació basal, que es veu incrementada durant les exacerbacions, tal i com hem vist per la PCT i la PCR, fet també observat per Stolz et al [225]. Tot i això, existeix un cert solapament entre els valors en estabilitat clínica i durant un episodi d'exacerbació. En el cas del MR-proANP, els nivells només van mostrar diferències significatives en comparar els nivells en pacients en estabilitat respecte als que tenien un diagnòstic de pneumònia. De fet els nivells en exacerbació i pneumònia van ser similars, segurament reflectint una resposta inflamatòria similar i considerable. Bernasconi et al, en un estudi avaluant la utilitat del MR-proANP en les exacerbacions de la MPOC, van observar nivells significativament més elevats en pacients exacerbats respecte als pacients estables, encara que en un estudi previ del mateix grup, els valors entre pacients estables i exacerbats no van mostrar diferències [227,276].

La pneumònia en el pacient amb MPOC és una entitat que mereix ser avaluada de forma separada. De fet, en l'estudi de MR-proANP i pneumònies, hi ha un subgrup de 135 pacients amb MPOC. En dades no publicades, es va observar que tant el PSI com el CURB-65 es correlacionaven amb els nivells de MR-proANP. Si més no crida l'atenció que 2 pacients amb PSI baix, presentaven nivells molt elevats de MR-proANP: tots dos van presentar complicacions en l'evolució (progressió radiològica i empiema, respectivament). Per tant en pacients amb MPOC i pneumònia, els nivells de MR-proANP poden ser més informatius que el PSI, tenint en compte que aquest últim no inclou la MPOC com a comorbiditat.

Altres biomarcadors també avaluats en estabilitat vs exacerbació serien sTREM-1, TNF- $\alpha$ , neopterina, copeptina, MR-proADM, endotelina i SAA [271,278,280-282]. En el cas de la comparació intraindividual entre els valors en estat d'exacerbació i el proper estat d'estabilitat, hem observat que no tots els biomarcadors tenen el mateix comportament en el temps. En la nostra experiència, els nivells de PCT, PCR i MR-proANP van disminuir en un mes. La disminució de PCT, PCR i MR-proANP ja va ser descrita en dos estudis previs [225,276]. En canvi, els nivells de neopterina es van incrementar. Una possible explicació d'aquest increment seria la influència del tractament anti-inflamatori. Hurst et al, també van avaluar de forma individual un conjunt de 36 biomarcadors, i les diferències en els nivells entre estabilitat i exacerbació van resultar significatives per als següents biomarcadors: adiponectina, PCR, *soluble intercellular adhesion molecule-1*, *myeloid progenitor inhibitory factor-1*, *pulmonary and activation-regulated chemokine* i IL-6 [198].



Donat que no tots els pacients tenen els mateixos nivells en període d'estabilitat, i que existeixen diferents perfils de progressió i presentació clínica, probablement la millor opció seria monitoritzar de forma individual els valors dels biomarcadors, com un paràmetre més en el seguiment de la malaltia, en comptes d'establir punts de tall per la població general. En aquest sentit, és necessari que es facin estudis multicèntrics i longitudinals.

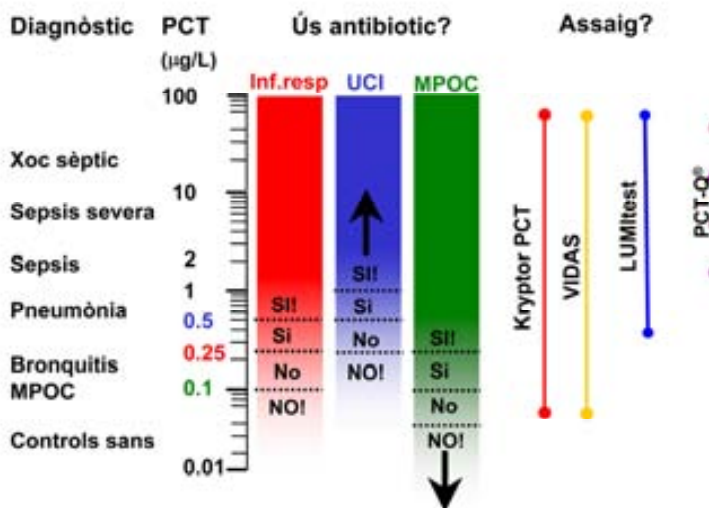
#### **5.4. Impacte dels avenços metodològics en les tècniques de determinació de biomarcadors**

Per al diagnòstic de les infeccions, els valors de sensibilitat i especificitat de la PCT, així com els punts de talls són totalment dependents de l'assaig emprat i del grup d'estudi considerat. En la Figura 21 es mostren algunes de les tècniques actuals amb els seus límits de detecció corresponents. Donat que s'han realitzat diversos estudis intervencionistes, considerant la concentració de PCT a l'hora de valorar la necessitat de prescriure antibiòtics, també és important tenir en compte que els punts de tall no són fixes i variaran en funció de la síndrome clínica.

Les determinacions realitzades en els diversos estudis presentats en aquesta Tesi s'han fet amb el mètode de referència Kryptor, i amb la tècnica ELFA, sent ambdues les més sensibles, donat que permeten detectar PCT en persones sanes. La tècnica ELFA mostra una bona correlació i concordança amb el mètode de referència, de manera que els *cut off* determinats amb la tècnica ELFA són totalment extrapolables [283]. El Lumitest era l'assaig més utilitzat abans de la introducció del Kryptor. Es tracta d'un test menys sensible, donat que el seu rang de detecció és més estret. Tot i això s'han realitzat diversos estudis amb resultats concloïents. De fet, en els estudis previs del nostre grup, es va avaluar la utilitat de la PCT en pacients adults i pediàtrics amb diagnòstic de pneumònia mitjançant aquesta tècnica [36,206].

Des d'un punt de vista més pràctic també existeix una tècnica ràpida per a la determinació semi-quantitativa dels nivells de PCT. És una tècnica ICT que a diferència de les anomenades anteriorment no necessita equips ni aparells externs. En pacients amb sèpsia greu aquest test resulta d'utilitat, perquè els nivells poden ser molt elevats [284]. Malauradament per al maneig de les infeccions respiratòries no és una tècnica prou sensible per detectar nivells lleugerament elevats de PCT. Al tractar-se d'una tècnica semi-quantitativa, els resultats no són valors absoluts sino rangs de

concentracions. Els punts de tall establerts permeten diferenciar en funció de la presència de sèpsia, sèpsia severa i xoc sèptic, sent menys sensibles per detectar PCT durant les infeccions respiratòries. Els diversos estudis, incloent els presentats en aquesta Tesi mostren que, en el cas concret de les infeccions respiratòries, els nivells són més baixos que els observats en la sèpsia, pel que es requereixen tests més precisos per tal que resultin discriminators.



**Figura 21.** Importància de l'assaig per a la determinació de PCT.

Modificat de: Christ-Crain et al. Swiss Med Wkly 2005; 135:451-460.

Recentment s'ha introduït el terme *point-of-care test* que fa referència a la necessitat de disposar de tècniques de detecció senzilles en diferents àrees, com serien l'atenció primària i els departaments d'urgències [285]. De fet, essent les infeccions respiratòries les més prevalents i les que donen lloc més freqüentment a la prescripció d'antibiòtics, sovint innecessaris, disposar d'eines que ajudin al diagnòstic diferencial és de gran importància. Donat que la PCT ha demostrat ser un biomarcador útil per al maneig de les infeccions, actualment s'està desenvolupant un nou assaig ICT, que ha de permetre detectar un rang de concentracions més estret que el del test ICT actualment disponible. A més, hi ha una altra millora considerable i és que es podrà mesurar directament en mostra de sang total, facilitant-ne el seu ús, permetent aquesta determinació a la capçalera del malalt si cal. Aquesta tecnologia és adaptable per a la resta de biomarcadors disponibles. Durant l'estada al departament de R+D es van realitzar un seguit d'experiments, per tal de comprovar el temps d'estabilitat de la

mostra i la influència del material del tub contenidor en les determinacions de PCT. D'altra banda, també es van establir les condicions òptimes per a la preparació de determinats reactius i per al posterior enmagatzematge del test. En els estudis clínics preliminars, els resultats van ser òptims de manera que es va procedir a augmentar-ne la producció. Actualment l'assaig està pendent de nous estudis clínics.





## **CONCLUSIONS**



## 6. CONCLUSIONS

### **Influence of comorbidities and previous corticosteroid and antibiotic treatment on biomarkers levels**

---

- Higher levels of neopterin, mid regional pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) and mid regional pro-adrenomedullin (MR-proADM) are found in patients with cardiac and renal coexisting illnesses, while for C-reactive protein (CPR) and procalcitonin (PCT) no statistical differences were found.
- In our experience, previous corticosteroid and antibiotic treatment did not influence biomarkers levels.

### **Influence of etiology on biomarkers levels**

---

- In patients with definite bacterial infection, we found higher levels of CRP, PCT and MR-proADM.
- PCT levels are increased in pneumococcal pneumonia, specially when bacteremic in comparison to other etiologies.
- MR-proANP is not influenced by etiology.
- The identification of COPD exacerbation etiology by means of biomarkers is encouraging, but the absence of microbiological gold standard limits its value.

### **Influence of severity on biomarkers levels**

---

- Biomarkers are influenced by the radiographic extent.
- Levels of MR-proANP and MR-proADM correlate with pneumonia severity rules: PSI, CURB-65 and SCAP.
- Neopterin correlate with SMART-COP, while PCT, CRP and MR-proADM correlate with its modified version SMRT-CO.
- MR-proANP and MR-proADM levels are higher in patients developing complications, defined as ICU admission or death.
- Serial levels of MR-proANP remain elevated along time in patients developing complications and in patients classified in high risk groups.
- Levels of PCT, CRP and MR-proANP are higher in COPD patients with pneumonia in comparison to patients in clinical stability.

- Levels of PCT, CRP and MR-proANP decrease one month after an exacerbation, while neopterin levels increase.
- Biomarkers levels can be useful for assessing short term prognosis after a COPD exacerbation.

#### **Immunoassays methodological aspects for biomarker detection**

---

- New immunochromatographic test for PCT detection has a good correlation with reference tests and limits of detection are optimal for its use in respiratory infections.
- New assay is robust, reliable and easy to use, and might be a useful tool for daily clinical practice.
- For the detection of biomarkers, point of care tests are a good option for primary care and emergency room, although more studies are required.

In summary, biomarkers can be a useful and a complementary tool together with clinical and microbiological parameters for the management of patients with pneumonia and COPD exacerbations. For their optimal use, it is important to take into account biomarkers limitations, such as influence of comorbidities or previous treatment. In the future, to have at one's disposal a panel of biomarkers, ones reflecting etiology and others being more related to severity might be useful for the management of LRTI, as well as for the assessment of immunomodulating therapies. Punctual and serial measurements complement clinical assessment, and they allow the monitoring of clinical evolution. From a technical point of view, automated assays are sensitive enough. However, a quicker test easier to implement would be also an interesting alternative.





## **BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Global Burden Disease: 2004 update. Geneva, Switzerland, 2008.
2. Canto R, Robinson II G, Reynolds H. Defense mechanisms of the respiratory tract, p.1-27. In Chmel H, Bendinelli M, Friedman H (ed.). Pulmonary infections and immunity. Plenum Press. New York., 1994
3. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur Respir J* 2000; 15:757-763.
4. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, et al. Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in eastern Finland. *Am J Epidemiol* 1993; 137:977-988.
5. Menendez R, Torres A, Aspa J, et al. Community acquired pneumonia. New guidelines of the Spanish Society of Chest Diseases and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol* 2010; 46:543-558.
6. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *Jama* 1996; 275:134-141.
7. Doerschuk CM. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation* 2001; 8:71-88.
8. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, et al. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 2000; 173:39-51.
9. Boyton RJ, Openshaw PJ. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br Med Bull* 2002; 61:1-12.
10. Labro MT. Immunopathology of respiratory infections. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4 Suppl 2:S1-S7.
11. Liles WC, Van Voorhis WC. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* 1995; 172:1573-1580.
12. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2:S27-72.
13. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Eur Respir J* 2005; 26:1138-1180.
14. Polverino E, Torres A. Diagnostic strategies for healthcare-associated pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30:36-45.
15. American Thoracic Society/ Infectious Diseases Society of America consensus guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:388-416.

16. Carratala J, Mykietiuk A, Fernandez-Sabe N, et al. Health care-associated pneumonia requiring hospital admission: epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes. *Arch Intern Med* 2007; 167:1393-1399.
17. Donowitz GR, Cox HL. Bacterial community-acquired pneumonia in older patients. *Clin Geriatr Med* 2007; 23:515-534.
18. Feldman C. Pneumonia in the elderly. *Clin Chest Med* 1999; 20:563-573.
19. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, et al. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 2005; 128:3854-3862.
20. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *Jama* 1995; 274:639-644.
21. Falguera M, Gudiol F, Sabriá M, et al. Protocolos clínicos SEIMC: Infecciones en el tracto respiratorio inferior. Ed: Aguado JM, Almirante B, Fortún J. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
22. Kollef MH. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. *Clin Infect Dis* 2005; 40 Suppl 2:S85-88.
23. Diaz E, Munoz E, Agbaht K, et al. Management of ventilator-associated pneumonia caused by multiresistant bacteria. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13:45-50.
24. Almirall J, Bolibar I, Balanzo X, et al. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults: a population-based case-control study. *Eur Respir J* 1999; 13:349-355.
25. Almirall J, Bolibar I, Serra-Prat M, et al. New evidence of risk factors for community-acquired pneumonia: a population-based study. *Eur Respir J* 2008; 31:1274-1284.
26. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318:727-732.
27. Waterer GW, Wunderink RG. Genetic susceptibility to pneumonia. *Clin Chest Med* 2005; 26:29-38.
28. Waterer GW, Bruns AH. Genetic risk of acute pulmonary infections and sepsis. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4:229-238.
29. Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, et al. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 1978; 64:564-568.
30. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, et al. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2010; 50:202-209.
31. Ortega L, Sierra M, Dominguez J, et al. Utility of a pneumonia severity index in the optimization of the diagnostic and therapeutic effort for community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 2005; 37:657-663.
32. Waterer GW, Wunderink RG. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. *Respir Med* 2001; 95:78-82.

33. Afshar N, Tabas J, Afshar K, et al. Blood cultures for community-acquired pneumonia: are they worthy of two quality measures? A systematic review. *J Hosp Med* 2009; 4:112-123.
34. Roson B, Carratala J, Fernandez-Sabe N, et al. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 2004; 164:502-508.
35. Padrones S, Garcia-Vidal C, Fernandez-Serrano S, et al. Impact of antibiotic therapy on systemic cytokine expression in pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:1243-1251.
36. Prat C, Dominguez J, Andreo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; 52:169-177.
37. Falguera M, Lopez A, Nogues A, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. *Chest* 2002; 122:2212-2216.
38. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc.* 1975; 50:339-344.
39. Andreo F, Ruiz-Manzano J, Prat C, et al. Utility of pneumococcal urinary antigen detection in diagnosing exacerbations in COPD patients. *Respir Med* 2010; 104:397-403.
40. Dominguez J, Blanco S, Rodrigo C, et al. Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2161-2163.
41. Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Suppl 13:19-24.
42. Hidron AI, Low CE, Honig EG, et al. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:384-392.
43. Dominguez J, Gali N, Blanco S, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119:243-249.
44. Lacoma A, Prat C, Andreo F, et al. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18:96-104.
45. Andreo F, Prat C, Ruiz J, et al. Persistence of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen excretion after pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol* 2008; 28:197-201.
46. Blanco S, Prat C, Pallares MA, et al. Centrifugal ultrafiltration method for rapid concentration of *Legionella pneumophila* urinary antigen. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4410.
47. Dominguez JA, Manterola JM, Blavia R, et al. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2334-2336.
48. Matas L, Dominguez J, De Ory F, et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM in paediatric patients. *Scand J Infect Dis* 1998; 30:289-293.

49. Ausina V, Coll P, Sambeat M, et al. Prospective study on the etiology of community-acquired pneumonia in children and adults in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:342-347.
50. Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, et al. Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:852-858.
51. Cacho JB, Meseguer MA, Oliver A, et al. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior.* Ed: Cercenado E, Cantón R. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2007.
52. Dominguez J, Gali N, Matas L, et al. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples for pneumococcal pneumonia diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:164-166.
53. Abdeldaim G, Herrmann B, Molling P, et al. Usefulness of real-time PCR for *lytA*, *ply*, and *Spn9802* on plasma samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:1135-1141.
54. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:826-829.
55. Fuenzalida L, Blanco S, Prat C, et al. Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW A&B test for detection of novel influenza (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect* 2009; Accepted for publication.
56. McQuillan P, Pilkington S, Allan A, et al. Confidential inquiry into quality of care before admission to intensive care. *BMJ* 1998; 316:1853-1858.
57. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336:243-250.
58. Neill AM, Martin IR, Weir R, et al. Community acquired pneumonia: aetiology and usefulness of severity criteria on admission. *Thorax* 1996; 51:1010-1016.
59. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 2003; 58:377-382.
60. Aujesky D, Auble TE, Yealy DM, et al. Prospective comparison of three validated prediction rules for prognosis in community-acquired pneumonia. *Am J Med* 2005; 118:384-392.
61. Liapikou A, Ferrer M, Polverino E, et al. Severe community-acquired pneumonia: validation of the Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society guidelines to predict an intensive care unit admission. *Clin Infect Dis* 2009; 48:377-385.
62. España PP, Capelastegui A, Gorordo I, et al. Development and validation of a clinical prediction rule for severe community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:1249-1256.

63. Charles PG, Wolfe R, Whitby M, et al. SMART-COP: a tool for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47:375-384.
64. Rello J, Lisboa T, Wunderink R. Severe community-acquired pneumonia and PIRO: a new paradigm of management. *Curr Infect Dis Rep* 2009; 11:343-348.
65. Rello J, Rodriguez A, Lisboa T, et al. PIRO score for community-acquired pneumonia: a new prediction rule for assessment of severity in intensive care unit patients with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med* 2009; 37:456-462.
66. Lim WS, Baudouin SV, George RC, et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* 2009; 64 Suppl 3:iii1-iii55.
67. Cross AS, Opal SM. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann Intern Med* 2003; 138:502-505.
68. Viasus D, Garcia-Vidal C, Gudiol F, et al. Statins for community-acquired pneumonia: current state of the science. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:143-152.
69. Chalmers JD, Short PM, Mandal P, et al. Statins in community acquired pneumonia: Evidence from experimental and clinical studies. *Respir Med* 2010; 104:1081-1091.
70. Confalonieri M, Urbino R, Potena A, et al. Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:242-248.
71. Marik P, Kraus P, Sribante J, et al. Hydrocortisone and tumor necrosis factor in severe community-acquired pneumonia. A randomized controlled study. *Chest* 1993; 104:389-392.
72. Monton C, Ewig S, Torres A, et al. Role of glucocorticoids on inflammatory response in nonimmunosuppressed patients with pneumonia: a pilot study. *Eur Respir J* 1999; 14:218-220.
73. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270:286-290.
74. van Leeuwen HJ, van der Bruggen T, van Asbeck BS, et al. Effect of corticosteroids on nuclear factor-kappaB activation and hemodynamics in late septic shock. *Crit Care Med* 2001; 29:1074-1077.
75. Sibila O, Agusti C, Torres A. Corticosteroids in severe pneumonia. *Eur Respir J* 2008; 32:259-264.
76. Lamontagne F, Briel M, Guyatt GH, et al. Corticosteroid therapy for acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and severe pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Crit Care* 2010; 25:420-435.
77. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23:1430-1439.
78. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* 2009; 301:2362-2375.

79. Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides: an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:10-21.
80. Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:125-131.
81. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev*; 23:590-615.
82. Menendez R, Torres A. Treatment failure in community-acquired pneumonia. *Chest* 2007; 132:1348-1355.
83. Garcia-Vidal C, Carratala J. Early and late treatment failure in community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30:154-160.
84. Halm EA, Fine MJ, Marrie TJ, et al. Time to clinical stability in patients hospitalized with community-acquired pneumonia: implications for practice guidelines. *Jama* 1998; 279:1452-1457.
85. Arancibia F, Ewig S, Martinez JA, et al. Antimicrobial treatment failures in patients with community-acquired pneumonia: causes and prognostic implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:154-160.
86. Menendez R, Torres A, Zalacain R, et al. Risk factors of treatment failure in community acquired pneumonia: implications for disease outcome. *Thorax* 2004; 59:960-965.
87. El-Solh AA, Aquilina AT, Dhillon RS, et al. Impact of invasive strategy on management of antimicrobial treatment failure in institutionalized older people with severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1038-1043.
88. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23:932-946.
89. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:532-555.
90. Soriano JB, Ancochea J, Miravittles M, et al. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007. *Eur Respir J* 2010; 36:758-765.
91. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1498-1504.
92. Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España, 2009
93. Agusti A, Celli B. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Barcelona: Masson. Elsevier, 2005
94. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:693-718.
95. Silverman EK. Genetic Epidemiology of COPD. *Chest* 2002; 121:1S-6S.



96. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1:1645-1648.
97. Donaldson GC, Wedzicha JA. COPD exacerbations .1: Epidemiology. *Thorax* 2006; 61:164-168.
98. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanchez P, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60:925-931.
99. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, et al. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57:847-852.
100. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, et al. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1418-1422.
101. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. Updated 2009. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
102. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, et al. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987; 106:196-204.
103. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000; 117:398S-401S.
104. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:336-363.
105. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359:2355-2365.
106. Rosell A, Monso E, Soler N, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2005; 165:891-897.
107. Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002; 347:465-471.
108. Diederer BM, van der Valk PD, Kluytmans JA, et al. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30:240-244.
109. Varma-Basil M, Dwivedi SK, Kumar K, et al. Role of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Microbiol* 2009; 58:322-326.
110. Wedzicha JA. Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:115-120.
111. Proud D, Chow CW. Role of viral infections in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35:513-518.
112. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454.

113. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56:515-548.
114. Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128:1995-2004.
115. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, et al. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:71-78.
116. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131:37-43.
117. Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29:527-534.
118. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59:574-580.
119. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, et al. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006; 28:1245-1257.
120. Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2000; 117:286S-291S.
121. Peces-Barba G, Barbera JA, Agusti A, et al. Diagnosis and management of chronic obstructive pulmonary disease: joint guidelines of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) and the Latin American Thoracic Society (ALAT). *Arch Bronconeumol* 2008; 44:271-281.
122. Miravittles M, Monso E, Mensa J, et al. Antimicrobial Treatment of Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: 2007 Consensus Statement. *Arch Bronconeumol* 2008; 44:100-108.
123. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:1165-1185.
124. Groenewegen KH, Schols AM, Wouters EF. Mortality and mortality-related factors after hospitalization for acute exacerbation of COPD. *Chest* 2003; 124:459-467.
125. Connors AF, Jr., Dawson NV, Thomas C, et al. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:959-967.
126. Celli BR, Cote CG, Marin JM, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1005-1012.
127. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:6-14.
128. Jones PW, Agusti AG. Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:822-832.

129. Lesko LJ, Atkinson AJ, Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:347-366.
130. Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J* 2007; 30:556-573.
131. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: The role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care* 2010; 14:203.
132. Muller B, Schuetz P, Trampuz A. Circulating biomarkers as surrogates for bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30 Suppl 1:S16-23.
133. Lacoma A, Prat C, Ausina V. Importance of biomarkers in diagnosis, prognosis and new therapies in infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:263-265.
134. Muller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. *Swiss Med Wkly* 2001; 131:595-602.
135. Struck J, Ühlein M, Bergmann A. New markers of sepsis using proteome analysis. *IBS, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2004; 19:131-137.
136. Gutiérrez M, Suárez A, Mazo L, et al. Interleucinas, quimiocinas y otras citocinas que intervienen en las respuestas inmunitarias e inflamatorias. In: Farreras P, Rozman B, eds. *Medicina Interna*. Madrid: Elsevier España, 2004
137. Cavailon JM, Munoz C, Fitting C, et al. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock* 1992; 38:145-152.
138. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, et al. C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunol Res* 1997; 16:127-136.
139. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:54-64.
140. Mortensen RF, Zhong W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol* 2000; 67:495-500.
141. van der Meer V, Neven AK, van den Broek PJ, et al. Diagnostic value of C reactive protein in infections of the lower respiratory tract: systematic review. *BMJ* 2005; 331:26.
142. Almirall J, Bolibar I, Toran P, et al. Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 2004; 125:1335-1342.
143. Review Criteria for Assessment of C-Reactive Protein (CRP), High Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP) and Cardiac C-Reactive Protein (cCRP) Assays. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Devices and Radiological Health Office of In Vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety. 2005
144. Weiss G, Murr C, Zoller H, et al. Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:435-440.
145. Murr C, Widner B, Wirleitner B, et al. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab* 2002; 3:175-187.

146. Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res* 2003; 52:313-321.
147. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26:319-329.
148. Hamerlinck FF. Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999; 8:167-176.
149. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101:1-6.
150. Fuchs D. Neopterin. A message from the Immune System. Brahms Diagnostica GmbH. Berlin, 1998.
151. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-1431.
152. Eriksen N, Benditt EP. Isolation and characterization of the amyloid-related apoprotein (SAA) from human high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6860-6864.
153. Jensen JU, Heslet L, Jensen TH, et al. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit Care Med* 2006; 34:2596-2602.
154. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410:1103-1107.
155. Gibot S, Cravoisy A. Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection. *Clin Med Res* 2004; 2:181-187.
156. Becker KL, Nylen ES, White JC, et al. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1512-1525.
157. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, et al. Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue. *Endocrinology* 2005; 146:2699-2708.
158. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997; 349:1307-1310.
159. Rubattu S, Volpe M. The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J Hypertens* 2001; 19:1923-1931.
160. Clerico A, Recchia FA, Passino C, et al. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H17-29.
161. Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004; 50:33-50.
162. Morgenthaler NG, Struck J, Thomas B, et al. Immunoluminometric assay for the midregion of pro-atrial natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chem* 2004; 50:234-236.
163. Clerico A, Fontana M, Ripoli A, et al. Clinical relevance of BNP measurement in the follow-up of patients with chronic heart failure. *Adv Clin Chem* 2009; 48:163-179.

164. de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation. *J Investig Med* 2009; 57:29-32.
165. Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, et al. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* 2004; 25:1369-1372.
166. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005; 51:1823-1829.
167. Samson WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:363-389.
168. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 2000; 21:138-167.
169. Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 2001; 22:1693-1711.
170. Zudaire E, Portal-Nunez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol* 2006; 80:237-244.
171. Allaker RP, Kapas S. Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and microorganism. *Regul Pept* 2003; 112:147-152.
172. Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem* 2001; 276:12292-12300.
173. Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, et al. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:43-49.
174. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, et al. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem* 2006; 52:112-119.
175. Shah R. Endothelins in health and disease. *Eur J Intern Med* 2007; 18:272-282.
176. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, et al. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 2000; 407:1-15.
177. Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, et al. Endothelin-1 induces GM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). *Neuropeptides* 1996; 30:551-556.
178. Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, et al. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clin Chem* 2006; 52:1144-1151.
179. Brahms PCT, Thermo Fisher Scientific. <http://www.procalcitonin.com>.
180. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, et al. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131:1557-1566.
181. Tonstad S, Cowan JL. C-reactive protein as a predictor of disease in smokers and former smokers: a review. *Int J Clin Pract* 2009; 63:1634-1641.

182. Meisner M. Procalcitonin (PCT). A new innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. 3rd ed. Stuttgart-New York, 2000
183. Beishuizen A, Hartemink KJ, Vermes I, et al. Circulating cardiovascular markers and mediators in acute illness: an update. *Clin Chim Acta* 2005; 354:21-34.
184. Kruger S, Ewig S, Kunde J, et al. Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin for predicting short-term and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German Competence Network CAPNETZ. *Thorax* 2010; 65:208-214.
185. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med* 2008; 34:518-522.
186. Preas HL, 2nd, Nylén ES, Snider RH, et al. Effects of anti-inflammatory agents on serum levels of calcitonin precursors during human experimental endotoxemia. *J Infect Dis* 2001; 184:373-376.
187. Perren A, Cerutti B, Lepori M, et al. Influence of Steroids on Procalcitonin and C-reactive Protein in Patients with COPD and Community-acquired Pneumonia. *Infection* 2008; 36:163-166.
188. Sin DD, Lacy P, York E, et al. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:760-765.
189. Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, et al. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61:23-28.
190. de Torres JP, Cordoba-Lanus E, Lopez-Aguilar C, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27:902-907.
191. Malo O, Sauleda J, Busquets X, et al. Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2002; 38:172-176.
192. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:396-402.
193. Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med* 1998; 24:888-889.
194. Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1605-1608.
195. Kruger S, Ewig S, Kunde J, et al. C-terminal provasopressin (copeptin) in patients with community-acquired pneumonia--influence of antibiotic pre-treatment: results from the German competence network CAPNETZ. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:159-162.
196. Kruger S, Ewig S, Kunde J, et al. Assessment of inflammatory markers in patients with community-acquired pneumonia - Influence of antimicrobial pre-treatment Results from the German competence network CAPNETZ. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1929-1934.
197. Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med* 2005; 26:1-9.

198. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:867-874.
199. Shoji H, Minamino N, Kangawa K, et al. Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of adrenomedullin in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:531-537.
200. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, et al. Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia [ISRCTN04176397]. *Crit Care* 2006; 10:R96.
201. Allaker RP, Zihni C, Kapas S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23:289-293.
202. Garcia Vazquez E, Martinez JA, Mensa J, et al. C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2003; 21:702-705.
203. Hedlund J, Hansson LO. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000; 28:68-73.
204. Hohenthal U, Hurme S, Helenius H, et al. Utility of C-reactive protein in assessing the disease severity and complications of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1026-1032.
205. Ortvist A, Hedlund J, Wretling B, et al. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1995; 27:457-462.
206. Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:963-968.
207. Kruger S, Ewig S, Papassotiriou J, et al. Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP: results from the German competence network CAPNETZ. *Respir Res* 2009; 10:65.
208. Masia M, Gutierrez F, Shum C, et al. Usefulness of procalcitonin levels in community-acquired pneumonia according to the patients outcome research team pneumonia severity index. *Chest* 2005; 128:2223-2229.
209. Prat C, Lacoma A, Dominguez J, et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect* 2007; 55:400-407.
210. Masia M, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, et al. Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal pro-vasopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 2007; 53:2193-2201.
211. Tudela P, Lacoma A, Prat C, et al. Prediction of bacteremia in patients with suspicion of infection in emergency room. *Med Clin* 2010; 135:685-690.
212. Masia M, Gutierrez F, Llorca B, et al. Serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein as a biochemical marker to differentiate microbial etiology in patients with community-acquired pneumonia. *Clin Chem* 2004; 50:1661-1664.

213. Fernandez-Serrano S, Dorca J, Coromines M, et al. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:813-820.
214. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2003; 71:5803-5813.
215. Simon L, Gauvin F, Amre DK, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39:206-217.
216. Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, et al. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007; 131:9-19.
217. Rohde G, Wiethage A, Borg I, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 2003; 58:37-42.
218. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1618-1623.
219. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, et al. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest* 2010; 138:896-904.
220. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:107-113.
221. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004; 363:600-607.
222. Daubin C, Parienti JJ, Fradin S, et al. Procalcitonin levels and bacterial aetiology among COPD patients admitted to the ICU with severe pneumonia: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2009; 9:157.
223. Weis N, Almdal T. C-reactive protein: can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med* 2006; 17:88-91.
224. Bircan A, Gokirmak M, Kilic O, et al. C-reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: role of infection. *Med Princ Pract* 2008; 17:202-208.
225. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Copeptin, C-Reactive Protein, and Procalcitonin as Prognostic Biomarkers in Acute Exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131:1058-1067.
226. Justo D, Lachmi S, Saar N, et al. C-reactive protein velocity following antibiotics in patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation and community acquired pneumonia. *Eur J Intern Med* 2009; 20:518-521.



227. Muller B, Suess E, Schuetz P, et al. Circulating levels of pro-atrial natriuretic peptide in lower respiratory tract infections. *J Intern Med* 2006; 260:568-576.
228. Ip M, Rainer TH, Lee N, et al. Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:131-136.
229. Chalmers JD, Singanayagam A, Akram AR, et al. Severity assessment tools for predicting mortality in hospitalised patients with community-acquired pneumonia. Systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2010; 65:878-883.
230. Schuetz P, Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13:578-585.
231. Catalan B, Vitoria S, Tudela P, et al. Clinical predictors of disease severity in patients with infection suspicion in the emergency department [Abstract]. *Intensive Care Med* 2010; 36 Suppl 2:S363.
232. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, et al. Procalcitonin Guidance of Antibiotic Therapy in Community-acquired Pneumonia: A Randomized Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:84-93.
233. Muller B, Harbarth S, Stolz D, et al. Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community-acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2007; 7:10.
234. Kruger S, Ewig S, Marre R, et al. Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes. *Eur Respir J* 2008; 31:349-355.
235. Claessens YE, Mathevon T, Kierzek G, et al. Accuracy of C-reactive protein, procalcitonin, and mid-regional pro-atrial natriuretic peptide to guide site of care of community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2010; 36:799-809.
236. Vazquez M, Jockers K, Christ-Crain M, et al. MR-pro-atrial natriuretic peptide (MR-proANP) predicts short- and long-term outcomes in respiratory tract infections: A prospective validation study. *Int J Cardiol* 2010. doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.037
237. Huang DT, Angus DC, Kellum JA, et al. Midregional Proadrenomedullin as a Prognostic Tool in Community-Acquired Pneumonia. *Chest* 2009; 136:823-831.
238. Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, et al. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1426-1434.
239. Schuetz P, Stolz D, Mueller B, et al. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis* 2008; 8:22.
240. Muller B, Morgenthaler N, Stolz D, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:145-152.
241. Menendez R, Martinez R, Reyes S, et al. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009; 64:587-591.

242. Schuetz P, Wolbers M, Christ-Crain M, et al. Prohormones for prediction of adverse medical outcome in community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections. *Crit Care* 2010; 14:R106.
243. Huang DT, Weissfeld LA, Kellum JA, et al. Risk prediction with procalcitonin and clinical rules in community-acquired pneumonia. *Ann Emerg Med* 2008; 52:48-58.
244. Niederman MS. Making sense of scoring systems in community acquired pneumonia. *Respirology* 2009; 14:327-335.
245. Schuetz P, Widmer I, Chaudri A, et al. Prognostic value of procalcitonin in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 37:384-392.
246. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, et al. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care* 2005; 9:R816-824.
247. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium* 2007; 14:345-351.
248. Tejera A, Santolaria F, Diez ML, et al. Prognosis of community acquired pneumonia (CAP): value of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and other mediators of the inflammatory response. *Cytokine* 2007; 38:117-123.
249. Martinez R, Menendez R, Reyes S, et al. Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 37:393-399.
250. Menendez R, Cavalcanti M, Reyes S, et al. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax* 2008; 63:447-452.
251. Bruns AH, Oosterheert JJ, Hak E, et al. Usefulness of consecutive C-reactive protein measurements in follow-up of severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2008; 32:726-732.
252. Smith RP, Lipworth BJ, Cree IA, et al. C-reactive protein. A clinical marker in community-acquired pneumonia. *Chest* 1995; 108:1288-1291.
253. Charles PE, Tinel C, Barbar S, et al. Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care* 2009; 13:R38.
254. Venkatesh B, Kennedy P, Kruger PS, et al. Changes in serum procalcitonin and C-reactive protein following antimicrobial therapy as a guide to antibiotic duration in the critically ill: a prospective evaluation. *Anaesth Intensive Care* 2009; 37:20-26.
255. Boussekey N, Leroy O, Alfandari S, et al. Procalcitonin kinetics in the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2006; 32:469-472.
256. Menendez R, Martinez R, Reyes S, et al. Stability in community-acquired pneumonia: one step forward with markers? *Thorax* 2009; 64:987-992.
257. de Jager CP, de Wit NC, Weers-Pothoff G, et al. Procalcitonin kinetics in *Legionella pneumophila* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:1020-1025.

258. Schuetz P, Christ-Crain M, Zimmerli W, et al. Repeated measurements of endothelin-1 precursor peptides predict the outcome in community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 2011. doi 10.1007/s00134-011-2208-2
259. Chastre J, Luyt CE, Trouillet JL, et al. New diagnostic and prognostic markers of ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:446-451.
260. Ramirez P, Garcia MA, Ferrer M, et al. Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2008; 31:356-362.
261. Luyt CE, Guerin V, Combes A, et al. Procalcitonin kinetics as a prognostic marker of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:48-53.
262. Boeck L, Eggimann P, Smyrniotis N, et al. MR-proANP and procalcitonin improve survival prediction in ventilator associated pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 37:595-603.
263. Seligman R, Meisner M, Lisboa TC, et al. Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2006; 10:R125.
264. Seligman R, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, et al. Prognostic value of midregional pro-atrial natriuretic peptide in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2008; 34:2084-2091.
265. Almagro P, Calbo E, Ochoa de Echaguen A, et al. Mortality after hospitalization for COPD. *Chest* 2002; 121:1441-1448.
266. Gunen H, Hacievliyagil SS, Kosar F, et al. Factors affecting survival of hospitalised patients with COPD. *Eur Respir J* 2005; 26:234-241.
267. Almagro P, Barreiro B, Ochoa de Echaguen A, et al. Risk factors for hospital readmission in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2006; 73:311-317.
268. Yohannes AM, Baldwin RC, Connolly MJ. Predictors of 1-year mortality in patients discharged from hospital following acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Age Ageing* 2005; 34:491-496.
269. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007; 62:595-601.
270. Stolz D, Breidhardt T, Christ-Crain M, et al. Use of B-Type Natriuretic Peptide in the Risk Stratification of Acute Exacerbations of COPD. *Chest* 2008; 133:1088-1094.
271. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, et al. Plasma pro-adrenomedullin but not plasma pro-endothelin predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 2008; 134:263-272.
272. de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, et al. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133:1336-1343.
273. Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003; 107:1514-1519.
274. Dahl M, Vestbo J, Lange P, et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:250-255.

275. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, et al. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61:17-22.
276. Bernasconi M, Tamm M, Bingisser R, et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide predicts survival in exacerbations of COPD. *Chest* 2010. doi 10.1378/chest.10-1353
277. Inoue Y, Kawayama T, Iwanaga T, et al. High plasma brain natriuretic peptide levels in stable COPD without pulmonary hypertension or cor pulmonale. *Intern Med* 2009; 48:503-512.
278. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, et al. Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:269-278.
279. Sin DD, Man SF. Chronic obstructive pulmonary disease: a novel risk factor for cardiovascular disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; 83:8-13.
280. Karadag F, Karul AB, Cildag O, et al. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung* 2008; 186:403-409.
281. Takabatake N, Sata M, Abe S, et al. Impaired systemic cell-mediated immunity and increased susceptibility to acute respiratory tract infections in patients with COPD. *Respir Med* 2005; 99:485-492.
282. Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2007. doi:10.1155/2007/52040
283. Schuetz P, Christ-Crain M, Huber AR, et al. Long-term stability of procalcitonin in frozen samples and comparison of Kryptor and VIDAS automated immunoassays. *Clin Biochem* 2010; 43:341-344.
284. Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, et al. Use of quantitative and semiquantitative procalcitonin measurements to identify children with sepsis and meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:136-138.
285. Price CP, Kricka LJ. Improving healthcare accessibility through point-of-care technologies. *Clin Chem* 2007; 53:1665-1675.



## **ANNEX I**





Original

## Predicción de bacteriemia en los pacientes con sospecha de infección en urgencias

Pere Tudela<sup>a,\*</sup>, Alicia Lacomá<sup>b</sup>, Cristina Prat<sup>b</sup>, Josep Maria Mòdol<sup>a</sup>, Montserrat Giménez<sup>b</sup>, Jaume Barallat<sup>c</sup> y Jordi Tor<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Corta Estancia-Urgencias, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España

<sup>c</sup> Servicio de Bioquímica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España

<sup>d</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 24 de noviembre de 2009

Aceptado el 6 de abril de 2010

On-line el 16 de junio de 2010

#### Palabras clave:

Bacteriemia  
Procalcitonina  
Fiebre  
Infección  
Urgencias

### RESUMEN

**Fundamento y objetivos:** Valorar la relación entre algunas variables clínicas y analíticas, y la existencia de bacteriemia para establecer un modelo predictivo.

**Pacientes y método:** Se analizaron durante 2 meses los casos atendidos en Urgencias con muestras para hemocultivos. Se elaboró con el grupo de derivación un modelo predictivo de bacteriemia y se validó en el grupo restante. Las variables significativas del análisis univariado se sometieron a regresión logística y de esta se derivó una puntuación. Se calculó la prevalencia de bacteriemia para cada puntuación en ambos grupos. Se evaluó la calibración del modelo por la prueba de Hosmer-Lemeshow, se calcularon las curvas de eficacia diagnóstica y el rendimiento del modelo.

**Resultados:** Se incorporaron al estudio 412 casos, los hemocultivos fueron positivos en el 12,8 %. Las variables significativas en el análisis multivariado fueron un índice de Charlson superior o igual a 2 y una procalcitonina superior a 0,4 ng/ml. Con el sistema de puntuación (1 y 2 puntos, respectivamente) se establecieron 4 grupos de probabilidad creciente de bacteriemia; del 0-35% en el grupo de derivación y del 2,9-27,2% en el de validación. En la curva de eficacia diagnóstica, el área bajo la curva fue de 0,80 en el grupo de derivación y de 0,74 en el de validación. El modelo presentó un valor predictivo negativo del 95,2% en el grupo de derivación y del 95,3% en el de validación.

**Conclusiones:** Se propone un modelo de predicción con las variables índice de Charlson y procalcitonina que permite delimitar un grupo con muy baja probabilidad de bacteriemia.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Prediction of bacteremia in patients with suspicion of infection in emergency room

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Bacteremia  
Procalcitonin  
Fever  
Infection  
Emergency

**Background and objectives:** To evaluate the relationship between some clinical and analytical data and the presence of bacteremia in order to establish a clinical decision rule.

**Patients and methods:** All the patients with blood cultures obtained from the emergency room in a two months period were analyzed. Patients were randomly assigned to derivation or validation sets. A logistic regression of the significant values in the univariate analysis was performed and a score obtained. The prevalence of bacteraemia for every score was calculated. The diagnostic efficacy curves and the performance of the predictive model were calculated.

**Results:** 412 patients were enrolled. The blood cultures were positive in 12.8% of them. The significant values in the univariate analysis were Charlson index  $\geq 2$  and PCT  $> 0.4$  ng/ml. Four groups of increasing risk of bacteraemia were designed, from 0 to 35% in the derivation set and from 2.9% to 27.2% in the validation set. In the diagnostic efficacy curve, the AUC was 0.8 in the derivation set and 0.74 in the validation set. The model presented a negative predictive value of 95.2% in the derivation set and 95.3% in the validation set.

**Conclusions:** A model that includes Charlson index and PCT makes possible to define a group of patients with a very low risk of bacteremia.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ptudela.germanstrias@gencat.net (P. Tudela).

## Introducción

La detección de bacteriemia tiene a menudo un importante significado diagnóstico, terapéutico y pronóstico. Por este motivo, la solicitud de hemocultivos es frecuente entre los clínicos. Sin embargo, las indicaciones para la práctica de hemocultivos, su rendimiento clínico y su interés diagnóstico han sido motivo de controversia en los últimos años, especialmente en lo que respecta a los servicios de urgencias hospitalarios (SUH). De forma concreta, se han planteado diferentes objetivos de mejora, como incrementar el porcentaje de positividad, reducir el número de contaminaciones y limitar la extracción de hemocultivos en pacientes a los que finalmente no se ingresa en el hospital<sup>1-5</sup>.

La cifra de hemocultivos positivos varía según las diferentes series, pero suele situarse entre el 2-25%, lo cual induce a pensar que, ciertamente, pueda considerarse mejorable. En cuanto a los hemocultivos de pacientes que no ingresan en el hospital, diferentes autores han cuestionado esta práctica, pero repetidamente varios grupos dentro y fuera de nuestro entorno han comunicado su experiencia en la detección de bacteriemia a través de este circuito asistencial<sup>6-11</sup>. Este no es un hecho anecdótico, se estima que entre el 3-29% del total de las bacteriemias detectadas en urgencias se ha remitido a domicilio. La mayoría de ellas corresponden a bacteriemias de origen urinario, en las que se suele haber prescrito un tratamiento antibiótico adecuado y en el que no se producen episodios desfavorables, pero en una fracción variable que puede alcanzar el 45% se trata de bacteriemias primarias no controladas, en las que cabe replantear totalmente el diagnóstico y el tratamiento del paciente. Los diagnósticos realizados a través de este circuito clínico no son intrínsecamente y incluyen endocarditis, procesos abdominales, osteomielitis, infecciones de las partes blandas, infecciones de catéter venoso y bacteriemias de origen incierto, entre otros<sup>6-11</sup>. Así, pues, parece que existe un grupo de pacientes en el que, aunque no se prevea ingreso hospitalario, puede estar indicada la práctica de hemocultivos, especialmente cuando el diagnóstico al alta es el de síndrome febril no aclarado.

Los modelos clínicos de predicción de bacteriemia, que podrían resultar útiles en este sentido, no se han acabado de incorporar a la práctica asistencial, tal vez por resultar complejos y, probablemente, por no disponer de una validación en ámbitos diferentes al que fueron elaborados. En los últimos años se ha añadido a este debate la posibilidad de que la determinación de algunos marcadores plasmáticos pueda ser decisiva en la predicción de bacteriemia. Se han propuesto diferentes moléculas, como la proteína C reactiva (PCR), la procalcitonina (PCT), la interleucina (IL)-1, la IL-2, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Las más estudiadas han sido la PCR y la PCT, especialmente esta última, para la que se ha propuesto un papel central en la predicción de bacteriemia, en la diferenciación entre infección bacteriana y vírica, y en la estimación de gravedad. No obstante, los últimos metaanálisis le han atribuido tan solo una moderada capacidad de predicción de bacteriemia y se plantea como opción de futuro la elaboración de modelos en los que intervengan otras variables<sup>12,13</sup>.

La trascendencia del tema reside en poder estimar la probabilidad de bacteriemia y, con esto, administrar mejor la indicación de practicar hemocultivos, la necesidad de ingreso hospitalario y la de tratamiento antibiótico empírico. Resultaría, pues, de gran utilidad disponer de un sistema de predicción clínica, a través de los datos clínicos y analíticos disponibles en los SUH, que permitiera mejorar en estos aspectos. El objetivo de nuestro trabajo fue valorar la posible relación entre algunas variables clínicas y analíticas, y la existencia de bacteriemia, para

establecer un modelo predictivo que fuera de ayuda en las áreas de urgencias.

## Pacientes y método

El estudio es observacional, prospectivo, descriptivo y analítico. Constituyeron la población de estudio los pacientes que consultaron al área médica del Servicio de Urgencias de nuestro centro (con exclusión de las áreas quirúrgica, ginecológica y pediátrica) y a los que, con sospecha de infección bacteriana, se les tomaron muestras para hemocultivos. Nuestro centro es un hospital público y universitario de 624 camas que atiende anualmente alrededor de 25.000 urgencias médicas. Según el protocolo asistencial del área médica de Urgencias, se practicaron hemocultivos a los pacientes que consultaron por fiebre (salvo sospecha de infección vírica respiratoria), a aquellos en que se detectó una temperatura axilar superior a 37°C en algún momento de la valoración clínica y a aquellos con deterioro inespecífico (si presentaban limitada expresividad por demencia, disminución psíquica, enfermedad psiquiátrica o edad avanzada) en los que el clínico que valoró al paciente consideró que debía descartarse un proceso infeccioso agudo.

Se incluyeron los casos desde el 1 de marzo hasta el 30 de abril de 2009. A diario se registró el listado de pacientes con muestras para hemocultivo y se inició el seguimiento a través de la historia clínica informatizada. En todos los casos se recogió edad, sexo, comorbilidad valorada en función del índice de Charlson<sup>14</sup>, existencia o no de leucocitosis superior a  $15 \times 10^9/l$ , presencia o no de bandas, existencia o no de neutropenia (menos de  $1 \times 10^9/l$ ), valor de la PCR y determinación de la PCT, todo ello según el estudio analítico inicial en Urgencias. Se recogió el diagnóstico definitivo según el juicio clínico expresado en el informe médico de Urgencias, del ingreso hospitalario o del seguimiento en las consultas externas del centro.

Los hemocultivos se procesaron mediante el sistema automático Bact/Alert<sup>®</sup> (bioMérieux, Durham, N. C.). El aislamiento de estafilococo coagulasa negativo solo se consideró significativo cuando se detectó en al menos 2 hemocultivos y el cuadro clínico era compatible. Se consideró contaminación el aislamiento de *Corynebacterium* spp. y *Propionibacterium* spp. La determinación de PCR (valores de normalidad  $< 3 \text{ mg/l}$ ) se realizó en muestras de suero mediante un ensayo turbidimétrico (RCRP, Dimension Rxl Max<sup>®</sup>, Siemens) y la de PCT en el plasma (normal  $< 0,4 \text{ ng/ml}$ ) mediante un ensayo inmunofluorescente (PCT sensitive Kryptor<sup>®</sup>, BRAHMS AG).

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows<sup>®</sup>. Se aleatorizó a los pacientes mediante un sistema automatizado en 2 grupos para crear un grupo de derivación con el 66% y uno de validación con el 33%. En el grupo de derivación se compararon las variables edad, sexo, comorbilidad (índice de Charlson categorizado en inferior o igual a 1 e igual o superior a 2), leucocitosis, bandas, neutrocitopenia, PCR (si era superior o no a 8 mg/l) y PCT (si era superior o no a 0,4 ng/ml) entre los grupos con y sin bacteriemia. Para las variables categóricas se realizó la prueba de la  $\chi^2$  al cuadrado y para las continuas la prueba de la *t* de Student; se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . El análisis multivariado se realizó para determinar los factores independientes mediante regresión logística. Los resultados se expresaron como *odds ratio* con intervalo de confianza (IC) del 95% y valor de *p*. Los valores de los coeficientes  $\beta$  se utilizaron para asignar la puntuación de cada variable en el modelo. Se calculó, entonces, la puntuación de cada paciente y, posteriormente, la probabilidad de bacteriemia para cada grado de puntuación en los grupos de derivación y validación. Para evaluar el ajuste del modelo se aplicó la prueba



de Hosmer-Lemeshow en los valores observados y predichos. Se realizaron las curvas ROC de eficacia diagnóstica con sus correspondientes IC del 95% para los grupos de derivación y validación. Finalmente, se valoró el rendimiento del modelo con los cálculos de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (VPN) en los grupos de derivación y validación.

## Resultados

Durante el período analizado se practicaron hemocultivos en 457 pacientes, de los cuales se desestimó a 45 por no haberse obtenido todos los datos necesarios, y se incluyó en el estudio a 412 casos (90,1%). Los hemocultivos fueron positivos en 53 (12,8%) de ellos. Los microorganismos más frecuentes fueron *E.coli* con 18 casos (33,9%), seguido de *Klebsiella* spp. con 6 (11,3%), *S.pneumoniae* con 6 (11,3%) y *Pseudomonas* spp. con 5 (9,4%). Fueron polimicrobianos 7 casos (12,9%). La tabla 1 muestra la distribución por diagnósticos clínicos, porcentaje de bacteriemia y microorganismos. Para la elaboración del modelo se obtuvo una muestra aleatorizada para la derivación de 275 pacientes y se validó en los 137 restantes. La tabla 2 muestra las características clínicas de la serie y de los grupos de derivación y validación.

La distribución de las variables analizadas en los grupos con y sin bacteriemia se muestra en la tabla 3. En el análisis univariado se observaron diferencias significativas en el índice de Charlson, la existencia de leucocitosis, las bandas y la PCT. El análisis multivariado se muestra en la tabla 4 y revela como variables

independientes tan solo el índice de Charlson y la PCT. Se estableció un modelo de predicción con las variables índice de Charlson igual o superior a 2 (1 punto) y PCT superior a 0,4 ng/ml (2 puntos). Se clasificaron los casos en 4 grupos (0, 1, 2 y 3) según la puntuación obtenida. La frecuencia de bacteriemia en los 4 grupos fue creciente, del 0-35% en el grupo de derivación y del 2,9-27,2% en el de derivación (tabla 5). No se detectaron diferencias entre los valores observados y los predichos por el modelo en la prueba de calibración de Hosmer-Lemeshow ( $\chi^2=2$ ; grados de libertad=2;  $p=0,181$ ). La curva de eficacia diagnóstica del modelo se muestra en la figura 1, con un área bajo la curva de 0,80 (IC del 95%: 0,73-0,86) en el grupo de derivación y de 0,74 (IC del 95%: 0,61-0,86) en el de validación. La tabla 6 muestra el rendimiento diagnóstico del modelo, se consideraron los grupos de baja puntuación (0 y 1) respecto a los de alta (2 y 3), y destacaron los VPN en torno al 95% tanto en el grupo de derivación como en el de validación. Si considerásemos el rendimiento de la prueba con el grupo de puntuación 0 respecto a los restantes, los VPN alcanzarían el 100% en el grupo de derivación y el 97,1% en el de validación.

El análisis de las puntuaciones por grupos diagnósticos mostró que mientras en la bacteriemia primaria la puntuación fue de 3 en el 75% de los casos, en la neutropenia febril y en los síndromes febriles sin evidencia de infección bacteriana las puntuaciones fueron de 0 o 1 en el 75-92%, respectivamente, lo que coincidió con la baja prevalencia de bacteriemia en estos grupos.

## Discusión

Los diferentes estudios elaborados para la predicción de bacteriemia han obtenido resultados poco coincidentes. En las primeras series se propuso el papel que podían tener diferentes variables clínicas como la edad, la temperatura, los escalofríos, la hipotensión arterial, las enfermedades de base, la leucocitosis, las bandas, la velocidad de sedimentación globular, la hipalbuminemia, la trombocitopenia, la creatinina, el foco urinario, el abdomen agudo o la presencia de catéteres vasculares, entre otras<sup>15-17</sup>. Pero los resultados han sido muy dispares, en parte por tratarse de estudios realizados en ámbitos diferentes (áreas de urgencias, unidades de hospitalizados, con o sin pacientes quirúrgicos) y en parte por utilizar criterios variables en lo que respecta a temperatura, a comorbilidad o a valores analíticos.

En nuestro entorno, el interesante modelo propuesto por Lizarralde et al<sup>18</sup> establece una probabilidad de bacteriemia creciente entre el 2-65% en función de un sistema de puntuación en el que tienen especial relevancia la presencia de foco urinario y la temperatura superior a 38 °C, así como la desviación izquierda, la velocidad de sedimentación globular, la hipalbuminemia, la trombocitopenia y la elevación de urea, la glucemia y la PCR. Algunas variables como la comorbilidad, la presencia de escalofríos

**Tabla 1**  
Distribución de las bacteriemias según foco de origen y microorganismos

Foco de origen	Bacteriemia, n (%)	Microorganismos
Neumonía	6/87 (7,1)	<i>S. pneumoniae</i> (3), <i>Klebsiella</i> spp. (1), <i>S. mitis</i> (1), <i>S. salivarius</i> (1), <i>Pseudomonas</i> spp. (1)
Urinaria	18/44 (40)	<i>E. coli</i> (14), <i>Klebsiella</i> spp. (4), <i>Enterococcus</i> spp. (1)
Neutrocitopenia febril	1/17 (5,8)	<i>Comamomas testosteroni</i>
Bacteriemia primaria	16/16 (100)	<i>Enterococcus</i> spp. (4), <i>S. aureus</i> (3), <i>Pseudomonas</i> spp. (3), <i>S. gallolyticus</i> (3), <i>E. coli</i> (2), <i>Klebsiella</i> spp. (1), <i>Proteus</i> spp. (1), <i>Salmonella</i> spp. (1)
Celulitis	4/9 (44,4)	<i>S. pyogenes</i> (3), <i>S. agalactiae</i> (1), <i>S. aureus</i> (1)
Enteritis	1/7 (14,2)	<i>E. coli</i>
Vía biliar	1/4 (25)	<i>E. coli</i>
Meningitis	3/3 (100)	<i>S. pneumoniae</i> (3)
Catéter venoso central	2/2 (100)	<i>Enterobacter</i> spp. (1), <i>Pseudomonas</i> spp. (1)
Endocarditis	1	<i>S. epidermidis</i> (1)

**Tabla 2**  
Características clínicas de la serie y de los grupos de derivación y validación

	Total (412)	Derivación (275)	Validación (137)
Años de edad, mediana (rango intercuartílico)	69 (54-78)	68 (54-78)	71 (52,5-78)
Varones, n (%)	249 (60,4)	167 (60,7)	82 (59,8)
Índice de Charlson, n (%)			
≤ 1	155 (37,6)	103 (37,4)	52 (37,9)
≥ 2	257 (62,3)	172 (62,5)	85 (62,0)
Leucocitosis, n (%)	99 (24,0)	67 (24,3)	32 (23,3)
Bandas, n (%)	141 (34,2)	94 (34,1)	47 (34,3)
Neutropenia, n (%)	27 (6,5)	16 (5,8)	11 (8,0)
Bacteriemia, n (%)	53 (12,8)	37 (13,4)	16 (11,6)

**Tabla 3**  
Distribución de las variables analizadas en los grupos con y sin bacteriemia (análisis univariado)

	Bacteriemia (37)	Sin bacteriemia (238)	p
Varones, n (%)	22 (59,5)	145 (60,9)	0,86
Años de edad, mediana (rango intercuartílico)	69 (58,5-78,5)	67,5 (54-78)	0,15
Índice de Charlson, n (%)			
≤ 1	8 (21,6)	95 (39,9)	
≥ 2	29 (78,4)	143 (60,1)	0,03
Leucocitosis, n (%)	16 (43,2)	51 (21,4)	0,004
Bandas, n (%)	20 (54,1)	74 (31,1)	0,006
Neutropenia, n (%)	1 (2,7)	15 (6,3)	0,38
PCR > 8 mg/l, n (%)	34 (91,9)	212 (89,1)	0,60
PCT > 0,4 ng/ml, n (%)	28 (75,7)	58 (24,4)	< 0,0001

PCR: proteína C reactiva; PCT: procalcitonina.

**Tabla 4**  
Análisis multivariante

	Coefficientes β	OR	IC del 95%	p	Puntuación
Índice de Charlson ≥ 2	0,9	2,494	1,038-5,991	0,041	1
PCT > 0,4 (ng/ml)	2,2	9,781	4,329-22,099	< 0,0001	2

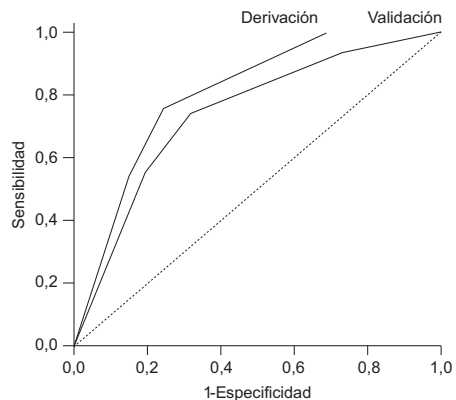
IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio; PCT: procalcitonina.

**Tabla 5**  
Prevalencia de bacteriemia en los grupos siguiendo el sistema de puntuación

Puntuación	0	1	2	3
Grupo de derivación, n (%)	73 (26,5)	115 (41,8)	30 (10,9)	57 (20,7)
Bacteriemia, n (%)	0 (0)	9 (7,8)	8 (26,6)	20 (35)
Grupo de validación, n (%)	34 (25,5)	52 (37,2)	18 (13,1)	33 (24)
Bacteriemia, n (%)	1 (2,9)	3 (5,7)	3 (16,6)	9 (27,2)

o la leucocitosis no resultan asociadas. Pero el modelo se establece para pacientes ingresados en un servicio de medicina interna, un grupo relativamente seleccionado respecto al conjunto de enfermos que se valoran en las áreas médicas de urgencias, y tiene una abrumadora mayoría de casos con bacteriemia de origen urinario. El modelo de Tokuda et al<sup>19</sup> plantea un sencillo algoritmo en función de la presencia o no de escalofríos, el valor de la PCR y la sospecha clínica con el que obtiene un VPN del 99%, aunque la tipificación de esta última variable resulta muy ambigua. Shapiro et al<sup>20</sup> proponen un modelo que estratifica el riesgo de bacteriemia en bajo (0,6-0,9%), moderado (6,8-9,1%) o alto (15,4-26%) en función de unos criterios mayores (temperatura superior a 39,4 °C, presencia de catéter venoso o sospecha de endocarditis) y de unos criterios menores (edad superior a 65, temperatura superior a 38,3 °C, escalofríos, vómitos, hipotensión, leucocitosis superior a 18.000/ml, más del 5% de bandas, trombocitopenia o insuficiencia renal). Mientras que en los pacientes de alto riesgo plantean medidas terapéuticas más activas, en los de bajo riesgo cuestionan la necesidad de practicar hemocultivos. La propuesta es interesante, aunque el modelo resulta algo laborioso y no cuenta con la posible aportación de los nuevos marcadores de inflamación.

En nuestro caso, y con el propósito de potenciar su aplicabilidad, se planteó contar con un número limitado de variables, seleccionar las más contrastadas, que fueran asequibles en los SUH, y desestimar aquellas que pudieran tener una fiabilidad inconstante. En este sentido, la temperatura a menudo puede estar modificada por la toma previa de antitérmicos o antibióticos y los escalofríos se pueden confundir con la sensación distérmica



**Figura 1.** Curvas de eficacia diagnóstica en los grupos de derivación y validación. El área bajo la curva en el grupo de derivación fue de 0,80 (intervalo de confianza del 95%: 0,73-0,86) y en el de validación fue de 0,74 (intervalo de confianza del 95%: 0,61-0,86).

según los matices de la anamnesis, que no siempre resulta muy precisa. Para valorar la comorbilidad consideramos que, más que discriminar por enfermedades concretas, podría ser útil cuantificar el grado de comorbilidad global, que resulta más operativo y refleja en conjunto la existencia o no de pluripatología, que a su vez lleva implícita la existencia de diferentes factores favorecedores de la bacteriemia.

Por otra parte, en los últimos años se ha propuesto incorporar la determinación de diferentes marcadores de inflamación sistémica a la predicción de bacteriemia. La PCR ha mostrado finalmente escasa capacidad predictiva y en diferentes estudios se ha observado una mayor sensibilidad y especificidad de la PCT, al considerar un punto de corte por encima de 2 ng/ml<sup>21-24</sup>. No obstante, la elevación de la PCT que se observa en la sepsis puede

**Tabla 6**  
Rendimiento del modelo predictivo

Grupo de derivación			
	Ausencia de bacteriemia	Bacteriemia	Total
Puntuación			
0 o 1	179	9	188
2 o 3	59	28	87
Total	238	37	275
	%	IC del 95%	
Sensibilidad	75,7	58,4-87,6	
Especificidad	75,2	69,1-80,5	
VPP	32,2	22,8-43,2	
VPN	95,2	90,8-97,6	
Grupo de validación			
	Ausencia de bacteriemia	Bacteriemia	Total
Puntuación			
0 o 1	82	4	86
2 o 3	39	12	51
Total	121	16	137
	%	IC del 95%	
Sensibilidad	75,0	47,4-91,7	
Especificidad	67,8	58,6-75,8	
VPP	23,5	13,2-37,8)	
VPN	95,3	87,9-98,5	

IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

también hallarse en procesos no infecciosos como algunas neoplasias, pancreatitis, cirugía, traumatismos y quemaduras. Teniendo esto en cuenta, en otros trabajos se plantea una mayor utilidad de la PCT como predictor negativo, en concreto se proponen puntos de corte de 0,2-0,4 ng/ml para excluir bacteriemia, con VPN del 97-98%. En nuestro estudio el punto de corte para la PCR (8 mg/l) y la PCT (0,4 ng/ml) recogió la propuesta de la literatura médica en este sentido<sup>25-27</sup>.

A pesar de todo ello, recientes metaanálisis otorgan a la PCT tan solo una moderada capacidad predictiva de bacteriemia e indican utilizarla en combinación con otros datos clínicos o analíticos<sup>28-30</sup>. La valoración conjunta de PCT y comorbilidad en nuestro estudio resulta ser concordante con este planteamiento.

Así pues, proponemos un modelo que podría estratificar la probabilidad de bacteriemia y diferenciar unos pacientes con probabilidades altas (puntuaciones 2 y 3), en los que la actuación terapéutica debería ser activa y precoz, de otros con probabilidad muy baja (puntuación 0) en los que sería cuestionable la indicación de practicar hemocultivos. Cabe resaltar que este último grupo no es de tamaño despreciable, ya que en nuestro trabajo supuso aproximadamente un 25% de los hemocultivos practicados. Quedaría finalmente un grupo con puntuación 1 en el que cabría individualizar las decisiones. La constatación de que el modelo presenta un alto VPN para bacteriemia apoya esta aplicación práctica.

En estudios previos planteamos la necesidad de sospechar y detectar la bacteriemia primaria en los casos de síndrome febril no aclarado en urgencias<sup>6,11</sup>. Nuestra propuesta actual entronca con esto e intenta delimitar el grupo de pacientes en el que este enfoque puede tener un mayor rendimiento. Consideramos que el modelo podría resultar un elemento de ayuda para los clínicos en la toma de decisiones en cuanto a indicación de practicar hemocultivos, ingreso hospitalario del paciente e inicio de tratamiento antibiótico empírico.

El único caso que escapó al modelo de predicción, con puntuación 0 y bacteriemia, correspondió a un varón de 51 años, sin comorbilidad, que presentó fiebre después de viajar a India, con una PCT de 0,16 ng/ml y bacteriemia por *Salmonella typhi*.

Como limitaciones de nuestro trabajo cabe destacar que la categorización del índice de Charlson puede ser cuestionable, así como los puntos de corte para la leucocitosis, las bandas y la PCR, que pueden haber determinado su ausencia en el modelo, pero que recogen la propuesta de otros trabajos previos y, en definitiva, suponen facilitar la aplicación práctica. No se evaluó la sospecha diagnóstica inicial, que en otros estudios ha resultado ser una variable predictiva. Respecto a otros estudios, el tamaño de la muestra puede resultar limitado.

Evaluar la relación coste-beneficio del modelo respecto a la práctica actual resulta complejo, dado que en ella intervienen múltiples factores. Por un lado, la propuesta plantea asumir los costes económicos de las determinaciones de PCT, pero por otra parte reduciría los correspondientes al procesamiento de hemocultivos, a la carga de trabajo de enfermería para la toma de muestras, al coste de las determinaciones de PCR, a la problemática derivada de la potencial contaminación y a una parte de los ingresos con carácter de observación. Asimismo, se deberían contemplar los beneficios tanto económicos como ecológicos de la limitación de los tratamientos antibióticos empíricos y los derivados de poder evitar en ocasiones las molestias emocionales y sociales generadas a pacientes con ingresos reiterados.

La aplicación experimental de nuestro modelo en otros centros podría contribuir a su posible validación y, de esta forma, determinar su utilidad práctica.

#### Conflicto de intereses

Los autores agradecen a BRAHMS AG por el soporte técnico.

#### Agradecimientos

A Elisenda Martínez, a Arantza Sanvisens y a Josep Roca por el asesoramiento estadístico. A Josep Domínguez y a los laboratorios de Microbiología, Hematología y Bioquímica.

#### Bibliografía

- Stalniewicz R, Block C. The yield of blood cultures in a department of emergency medicine. *Eur J Emerg Med.* 2001;8:93-7.
- Kamin Y, Steinberg JM, Kafka M, Hussein A, Srugo I. Is there a need for taking blood cultures from febrile adults discharged from the emergency department? *J Infect.* 2003;46:72-3.
- Wilson ML. Outpatient blood cultures: Progress and unanswered questions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:879-80.
- Cisneros JM, Sánchez M, Prados MT, Llanos C, Vigil E, Soto-Espinoza B, et al. Hemocultivos en el servicio de urgencias. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2005;23:135-9.
- Cisneros JM, Cobo J, Pujol M, Rodríguez J, Salavert M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2007;25:111-30.
- Tudela P, Queralt C, Giménez M, Carreres A, Tor J, Sopena N, et al. Detección de bacteriemia en pacientes dados de alta en Urgencias: estudio de 61 episodios. *Med Clin (Barc).* 1998;111:201-4.
- Javaloyas M, Jarné J, García D, Guddió F. Bacteriemia en pacientes dados de alta desde el servicio de Urgencias. *Med Clin (Barc).* 2001;116:692-3.
- Epstein D, Ravesh D, Schlesinger Y, Rudensky B, Gottelher NP, Vinson AM. Adult patients with occult bacteremia discharged from the emergency department: Epidemiological and clinical characteristics. *Clin Infect Dis.* 2001;32:559-65.
- Ramos JM, Masiá M, Elía M, Gutiérrez F, Royo G, Bonilla F, et al. Epidemiological and clinical characteristics of occult bacteremia in an adult emergency department in Spain: Influence of blood culture results on changes in initial diagnosis and empiric antibiotic treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:881-7.
- Terradas R, Grau S, Knobel H, Álvarez-Lerma F, Riu M, Salvadó M. Bacteriemia comunitaria tratada o identificada en forma ambulatoria tras el alta de un servicio de urgencias. *Med Clin (Barc).* 2007;129:652-4.

11. Tudela P, Módol JM, Giménez M, Prat C, Vilaseca B, Tor J. Bacteriemia en pacientes no hospitalizados: tendencias evolutivas en los últimos 10 años. *Med Clin (Barc)*. 2007;129:770-2.
12. Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Repo H. Laboratory markers of systemic inflammation as predictors of bloodstream infection in acutely ill patients admitted to hospital in medical emergency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:699-704.
13. Schneider HG, Lam QT. Procalcitonin for the clinical laboratory: A review. *Pathology*. 2007;39:383-90.
14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, McKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chron Dis*. 1987;40:373-83.
15. Bates DW, Cook EF, Goldman L, Lee TH. Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospectively validated model. *Ann Intern Med*. 1990;113:495-500.
16. Leibovici L, Greenshtain S, Cohen O, Mor F, Wysesbeek AJ. Bacteremia in febrile patients. A clinical model for diagnosis. *Arch Intern Med*. 1991;151:1801-1806.
17. Bates DW, Sands K, Miller E, Lanken PN, Hibberd PL, Graman PS, et al. Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J Infect Dis*. 1997;176:1538-1551.
18. Lizarralde E, Gutiérrez A, Martínez P, Franco R, García N, Miguel F. Bacteriemia adquirida en la comunidad: elaboración de un modelo de predicción clínica en pacientes ingresados en un servicio de medicina interna. *Med Clin (Barc)*. 2004;123:241-6.
19. Tokuda Y, Miyasato H, Stein GH. A simple prediction algorithm for bacteraemia in patients with acute febrile illness. *QJM*. 2005;98:813-20.
20. Shapiro NI, Wolfe RE, Wright SB, Moore R, Bates DW. Who needs a blood culture? A prospectively derived and validated prediction rule. *J Emerg Med*. 2008;35:255-64.
21. Wyllie DH, Bowler IC, Peto TE. Bacteraemia prediction in emergency medical admissions: Role of C reactive protein. *J Clin Pathol*. 2005;58:352-356.
22. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39:206-17.
23. Peters RP, Twisk JW, van Agtmael MA, Groeneweld AB. The role of procalcitonin in a decision tree for prediction of bloodstream infection in febrile patients. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:1207-13.
24. Julián A, Palomo MJ, Ortiz R, Pedrosa A, Parejo R, Salcedo R. Utilidad de la procalcitonina y la proteína C reactiva en el paciente con sepsis en urgencias. *Emergencias*. 2009;21:23-7.
25. Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, Gil H, Khayat N, Estavoyer JM, et al. Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis*. 2002;35:156-61.
26. Caterino JM, Scheatzle MD, Forbes ML, D'Antonio JA. Bacteremic elder emergency department patients: Procalcitonin and white count. *Acad Emerg Med*. 2004;11:393-6.
27. León C, García L, Moya M, Artigas A, Borges M, Candel F, et al. Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los Servicios de Urgencias Hospitalarios. *Emergencias*. 2007;19:260-72.
28. Jones AE, Fiechtl JF, Brown MD, Ballew JJ, Kline JA. Procalcitonin test in the diagnosis of bacteremia: A meta-analysis. *Ann Emerg Med*. 2007;50:34-41.
29. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: Systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:210-7.
30. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36:941-52.



## **ANNEX II**



## Biomarkers for the prediction of bacterial infection, bacteremia and severity in the emergency department

Pere Tudela<sup>1</sup>; Cristina Prat<sup>2,5</sup>; Alicia Lacomá<sup>2,5</sup>; Josep Maria Mòdol<sup>1</sup>; Jose Domínguez<sup>2,5</sup>; Montse Giménez<sup>2</sup>; Jaume Barallat<sup>3</sup>; Jordi Tor<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Unitat de Curta Estada-Urgències. <sup>2</sup>Servei de Microbiologia. <sup>3</sup>Servei de Bioquímica. <sup>4</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. <sup>5</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias. Instituto de Salud Carlos III. Badalona. Spain

**Correspondance to:** P. Tudela. Unitat de Curta Estada-Urgències. Crta del Canyet s/n. 08916 Badalona, Barcelona, Spain.  
Phone: +34934978952/ +34934978894. Fax: +34934978895. E-mail: ptudela.germanstrias@gencat.net

**Objectives.** To analyze potential utility of clinical and analytical variables, C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), proadrenomedullin (proADM) and neopterin measurements to predict bacterial infection, bacteremia and disease severity in the emergency department (ED).

**Methods.** Patients with blood culture drawn were included. Data recorded were: age, gender, Charlson index, leukocytosis, band cells, neutropenia, microbiological findings and levels of CRP, PCT, proADM and neopterin. Severity events were defined as admission to intensive care unit, death or need of urgent surgery. Patients were classified as group I: microbiologically documented infection; II: possible infection without microbiological documentation; III: fever of uncertain origin and IV: non infectious disease. Univariate and multivariate analysis, ROC curves and diagnostic accuracy were calculated.

**Results.** A total of 412 cases were analyzed. Frequencies for group I, II, III and IV were 28.3%, 39.3%, 9.9% and 22.3%, respectively. Blood cultures were positive in 53 cases (12.8 %), and 34 cases were severe (8.2%). For the prediction of bacterial infection, the independent variables were CRP  $\geq 70$  mg/L, PCT  $\geq 0.4$  ng/mL and presence of bands, although the diagnostic accuracy was limited. For the prediction of bacteraemia, independent variables were PCT  $>1$  ng/mL and proADM  $>2$  nmol/L, with negative predictive values (NPV) of 94% and 93%, respectively. For the prediction of severity, independent variables were PCT  $>1$  ng/mL and proADM  $>1.94$  nmol/L, with NPV around 96% for both.

**Conclusions.** For patients with suspicion of infection in the ED, PCT and proADM show a considerable diagnostic accuracy for the exclusion of bacteremia and disease severity.

### INTRODUCTION

Clinical management of patients with fever or suspicion of acute infectious disease in emergency departments (ED) is a complex and unsolved issue. It is well established that an early antibiotic treatment improves patient prognosis when bacterial infection is present. However, microbiological confirmation is usually not immediate and empirical therapy has to be initiated while waiting for laboratory results [1]. At the same time, it is considered that empirical antimicrobial therapy should not be indiscriminate in order to avoid ecological resistance and unnecessary economical expense [2].

On the other hand, there is plenty of evidence about the difficulties in diagnosis in the emergency setting. One of them being the unexpected detection of bacteremia in

patients discharged from the ED [3, 4]. It has been estimated that between 3 and 29% of patients with bacteremia detected in the ED are sent home. In most cases, the focus origin is urinary and the prescribed antimicrobial therapy is correct, thus no further complications present. But in a variable percentage, which might reach up to 45%, diagnosis and treatment options have to be reassessed as we are dealing with primary bacteremias. In this particular case, clinical diagnosis include endocarditis, abdominal processes, osteomyelitis, soft tissue infections, venous catheter infections and bacteremias of unknown origin, among others [3-6]. In addition, in recent years, indications for the performance of blood cultures, its clinical output and diagnostic interest have become a controversial issue, especially in the ED. In fact, several projects for its

improvement have been proposed, such as increasing the percentage of positive results, decreasing the number of contaminations, and limiting the number of blood cultures in patients that are finally not admitted to the hospital [7, 8].

For clinicians it is important to have criteria to facilitate and improve clinical decisions regarding the need of microbiological studies, hospital admission and site of care, as well as empirical antimicrobial therapy. Several studies have aimed to identify clinical variables that could suggest bacterial infection and/or disease severity, in order to establish rules for prediction, with inconsistent results.

In recent years, the potential usefulness of biomarkers such as C- reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT), among others, to improve diagnostic accuracy with respect to clinical variables such as body temperature, tachycardia, hypotension, anaemia or leukocyte count, has been debate [9-13]. The usefulness of neopterin as a marker of viral infection has also been [10] postulated, allowing its use as a criteria to avoid antibacterial therapy [14, 15]. A recent description of a new biomarker, proadrenomedullin (proADM), which might be useful as a marker of bacterial infection and disease severity, opens new expectations and establishes the comparison of the diagnostic and/or prognostic values of the different molecules [16]. Several studies have evaluated the usefulness of biomarkers to discard the presence of bacterial infection in critical adult patients and paediatric population, but its usefulness has not been well established in the ED setting.

The aim of our study was to analyze the potential usefulness of several clinical and analytical variables as well as the biomarkers CRP, PCT, proADM and neopterin, to predict bacterial infection, bacteremia and disease severity, in the ED setting.

## METHODS

**Study setting and population.** The study is observational, prospective, descriptive and analytical. We assessed the potential usefulness of several

systemic biomarkers in the prediction of infection. The study was approved by the ethical committee of the institution. Population consists of patients with suspicion of bacterial infection that consulted the medical area of the ED (excluding surgical, gynecological and pediatric areas) and from whom blood cultures were obtained. Our institution is a public university hospital with 624 beds that deal annually with approximately 30.000 medical emergencies. Patients were included from 1<sup>st</sup> March to 30<sup>th</sup> April 2009.

According to the ED medical protocol, blood cultures (two aerobic and one anaerobic bottles) were performed to those patients who came with fever (with the exception of suspected upper viral respiratory tract infection), or an axillar temperature above 37°C, detected during the clinical examination, as well as those with an unspecific deterioration (limited expressivity because of dementia, mental disorder, psychiatric disease or advanced age) in whom the attending clinician ruled out an acute infectious process. A list of patients with blood culture samples was registered daily, and patient's follow-up was initiated through the computerized medical file system. Data recorded from all cases were: age, gender, comorbidities according to Charlson index [17], presence of a leukocyte count above  $15 \times 10^9/L$ , of neutrophil band cells, of neutropenia (below  $1 \times 10^9/L$ ), and levels of CRP. These analytical values were recorded during the initial evaluation in the ED. Serum and plasma samples were also collected at the time of admission. Samples were frozen at -20°C for later measurement of PCT, proADM and neopterin.

Patients were followed up for 30 days after admission. Final diagnosis was set according to the clinical judgment mentioned in the emergency and hospital medical files, or in the records of outpatient care. Doubtful cases were analyzed by three different observers, so a final diagnosis was reached by consensus. According to the clinical diagnosis and microbiological results, patients were grouped as follows: a) group I: microbiologically documented infection (bacterial, fungal or viral); b) group II: possible infection, without microbiological documentation; c)



group III: fever of uncertain origin and d) group IV: non infectious disease (negative microbiological results and existence of an alternative diagnosis). Charlson index was stratified into 4 categories according to a previous model [18]. Bacteremia was defined as bloodstream infection with positive blood culture. Disease severity events were also recorded and defined as: admission in the intensive care unit, death within the following seven days or surgery within the first 48 hours since admission.

**Measures.** Blood cultures were processed by the automatic system Bact/Alert (bioMerieux, Durham, N.C.). Isolation of coagulase negative staphylococci was only considered significant when detected in at least two blood cultures and had compatible clinical features. CRP was measured in serum samples by turbidimetric assay (RCRP, Siemens Dimension Rxl Max, Siemens, Germany). PCT and proADM were measured in plasma by an immunofluorescent assay (PCT sensitive and MR-proADM Kryptor, BRAHMS AG, Germany). Neopterin was measured in serum by a competitive enzymeimmunoassay (Neopterin ELISA, IBL, Germany).

**Data analysis.** Sample size was estimated considering the prevalence of study conditions and a risk of 5% and a statistical power of 90%. Data are expressed as proportions, or median and interquartile range. Receiver Operating Curves (ROC) for diagnostic efficacy were performed, and area under the curve are expressed with a confidence interval of 95%, for the prediction of bacterial infection, bacteremia and disease severity, establishing an optimal cut-off points to convert the continuous variables into dichotomous.

Variables included were compared in three scopes: a) between groups with microbiologically documented bacterial infection (included in group I) and without infectious disease (group IV), b) with and without bacteremia and, finally c) with or without disease severity. Comparisons were performed by Chi-square test or Fisher test for categorical variables, and t-Student for continuous variables. A *P* value <0.05 was

considered significant. Multivariate analysis was performed to identify the independent factors by logistic regression. Results were expressed as Odds ratio (OR) with 95% confidence interval and *P* value. Finally, the diagnostic accuracy was evaluated and sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and positive and negative likelihood ratios were calculated. Data were analyzed with the statistical package SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## RESULTS

During the study period, blood cultures were performed to 457 patients but 45 cases were excluded because some data were missing. Finally, 412 cases (90.1%) were included in the study. Clinical characteristics of patients and distribution according to final diagnosis are shown in Table 1. Microbiologically documented infection (group I) represented a 28.3%, and was mostly constituted by bacterial infection; cases classified as possible infection (group II) represented a 39.3%; fever of uncertain origin (group III) a 9.9%, and cases without infectious disease (group IV) a 22.3%.

Blood cultures were positive in 53 cases (12.8 %). Microorganism more frequently isolated was *Escherichia coli* with 18 cases (33.3%) and seven cases (12.9%) were polymicrobial. Among the 34 severe cases (8.2%), 16 (47.0%) were documented infections, 9 (26.4%) possible infections and 9 (26.4%) were finally diagnosed of non infectious disease. Presence of severity was classified as mortality (5%), ICU admission (3.3%) and need of surgery (0.4%). Percentages of microbiological documentation, positive blood culture and microorganisms isolated in groups I and II according to the final clinical diagnosis are shown in Table 2. The most frequent groups were those of respiratory and urinary tract origin followed by febrile neutropenia and primary bacteremia cases.

Table 1. Patient characteristics

	N (%)
Age, median (range)	69 (54-78)
Sex	
Men	249 (60.4%)
Charlson	
0	59 (14.3 %)
1-2	232 (56.3%)
3-4	65 (15.8%)
≥5	56 (13.6%)
(I) Microbiologically documented infection	117 (28.3%)
Bacterial	113 (27.4%)
Fungal	3 (0.7%)
Viral	1 (0.2%)
(II) Possible infection	162 (39.3%)
(III) Fever of uncertain origin	41 (9.9%)
(IV) Non infectious disease*	92 (22.3%)
Bacteremia	53 (12.8%)
Severity	34 (8.2%)
Mortality	21 (5 %)
ICU	14 (3.3%)
Surgery	2 (0.4%)
* Final diagnosis for non infectious disease	
Neoplastic disease	24 (26 %)
Cirrhosis	14 (15.2%)
Non infectious arthritis	8 (8.6%)
Inflammatory bowel disease	6 (6.5%)
Inflammatory disorders <sup>‡</sup>	5 (5.4%)
Congestive heart failure	5 (5.4%)
Acute renal failure	4 (4.3%)
Atrial fibrillation	3 (3.2%)
Epilepsy	2 (2.1%)
Hipotension	2 (2.1%)
Miscellaneous #	19 (20.6%)

<sup>‡</sup> Includes: systemic eritematous lupus, leucocytoclastic vasculitis, polyarteritis nodosa, rheumatic polymyalgia and Still disease. # Includes: anemia, heatstroke, cardiac blockage, myocardial infarction, cholestasis, ischemic colitis, irritable bowel syndrome, diabetes, dementia, dehydration, pulmonary fibrosis, Addison disease, lumbalgia, anxiety, cranial traumatism, toxicoderma, pericarditis, insect bite, venous thrombosis.

For the prediction of bacterial infection, AUC values for each biomarker were as follows: 0.685 (95% confidence interval [CI], 0.613-0.757) for PCT; 0.648 (95% CI, 0.572-0.725) for CRP; 0.585 (95% CI, 0.507-0.663) for proADM and 0.574 (95% CI 0.495-0.652) for neopterin. In the univariate analysis, variables with statistical differences when comparing groups with microbiologically documented bacterial infection and without bacterial infection were: presence of neutrophil band cells ( $p=0.001$ ), CRP  $\geq 70$  mg/L ( $p<0.0001$ ), PCT  $>0.4$  ng/mL ( $p<0.0001$ ) and proADM  $>2.1$  nmol/L ( $p=0.003$ ). Among variables with significant statistical differences, multivariate analysis showed as independent variables: CRP ( $p=0.012$ ), PCT ( $p=0.015$ ) and neutrophil band cells ( $p=0.008$ ). Univariate and multivariate analysis results are shown in Table 3. Diagnostic accuracy values (specificity, sensitivity, negative predictive value, positive predictive value, positive and negative likelihood ratios) of these last three significant variables, considered separately and in combination are shown in Table 6. When considering variables separately, their diagnostic accuracy was very limited. The fact of combining either PCT or CRP with bands considerably improved sensitivity although specificity value was very low.

For the prediction of bacteremia, AUC values for each biomarker were as follows: 0.799 (95% CI, 0.734-0.864) for PCT; 0.711 (95% CI, 0.625-0.796) for proADM; 0.617 (95% CI 0.526-0.708) for neopterin and 0.558 (95% CI, 0.475-0.640) for CRP. In the univariate analysis, variables that showed statistical differences when comparing patients with and without bacteremia were: age ( $p=0.039$ ), leucocytosis ( $p=0.004$ ), presence of neutrophil band cells ( $p=0.006$ ), CRP  $> 65.5$ mg/L ( $p=0.019$ ), PCT  $> 1$ ng/mL ( $p<0.0001$ ), proADM  $> 2$  nmol/L ( $p<0.0001$ ) and neopterin  $> 71.9$ nmol/L ( $p<0.0001$ ). Among variables with significant statistical differences, multivariate analysis only showed as independent variables two of the biomarkers: PCT ( $p<0.0001$ ) and proADM ( $p= 0.002$ ). Univariate and multivariate analysis results are shown in Table 4.

Table 2. Main clinical diagnosis and microbiological results for patients in group I and II.

Diagnosis	N	Proven infection	Positive blood cultures	Microbiological tests	Isolated microorganisms
Pneumonia	87	30 (34.8%)	6 (7.1%)	A: 11; SC: 10; BAL: 2	<i>S.pneumoniae</i> (18), <i>H.influenzae</i> (2), <i>P.jirovecii</i> (2), <i>Streptococcus</i> spp (2), <i>E.coli</i> (1), <i>Moraxella catarrhalis</i> (1), <i>Klebsiella</i> sp (1), <i>Pseudomonas</i> sp (1).
Bronchial infection	78	8 (10.2%)	0	SC: 8	<i>H.influenzae</i> (3), <i>S. pneumoniae</i> (2), <i>S. aureus</i> (2), <i>Pseudomonas</i> spp (2).
Urinary infection	44	42 (95.5%)	18 (40%)	UC: 42	<i>E.coli</i> (32), <i>Klebsiella</i> spp (7), <i>Enterococcus</i> spp (3), <i>S.anginosus</i> (1) <i>Citrobacter</i> sp (1), <i>Providencia</i> sp (1).
Febrile neutropenia	17	1 (5.8%)	1 (5.8%)	-	<i>Comamomas testosteroni</i> .
Primary bacteremia	14	14 (100%)	14 (100%)	-	<i>Enterococcus</i> spp (4), <i>S. aureus</i> (3), <i>Pseudomonas</i> spp (3), <i>S.galloyticus</i> (3), <i>E.coli</i> (2), <i>Klebsiella</i> sp (1), <i>Proteus</i> sp (1), <i>Salmonella</i> sp (1).
Soft tissue infection	9	7 (77.7%)	4 (44.4)	EC: 3	<i>Streptococcus</i> spp (5), <i>S. aureus</i> (3)
Digestive tract infection	7	2 (28.5%)	1 (14.2)	SA: 1	<i>E.coli</i> (1), <i>Clostridium difficile</i> (1)
Biliar infection	4	1 (25%)	1 (25)	-	<i>E.coli</i>
Meningitis	3	3 (100%)	3 (100)	SCFC: 1	<i>S. pneumoniae</i> (3)
Venous catheter infection	3	3 (100%)	3 (100)	-	<i>Enterobacter</i> sp (1), <i>Pseudomonas</i> sp (1), <i>S.epidermidis</i> (1) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)
Endocarditis	1	1	1	-	<i>S.epidermidis</i>
Peritonitis	1	1	0	AFC	<i>Bacteroides</i> sp
Joint infection	1	1	0	SFC	<i>S. aureus</i>
Empyema	1	1	0	PFC	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Aspergillosis	1	1	0	A; SC	<i>Aspergillus</i> sp
Hepatitis	1	1	-	IgM	Hepatitis A virus
Miscellaneous*	7	0	-	-	-

\* Includes: acute pharyngitis (2), dental infection, Rickettsial fever, viral encephalitis, oral herpes, Psoas abscess. A: antigenuria, SC: sputum culture, BAL: bronchoalveolar lavage, UC: urine culture, EC: exudate culture, SA: stool antigen, SCFC: spinal central fluid culture, AFC: ascitic fluid culture, SFC: synovial fluid culture, PFC: pleural fluid culture

Regarding diagnostic accuracy, PCT and proADM showed high specificity values, 84.1% and 85.2%, respectively. In addition, high negative predictive values were also obtained, for PCT (94.1%) and for proADM (92.7%) (Table 6).

For the prediction of severity, AUC values for each biomarker were as follows: 0.729 (95% CI, 0.627-0.832) for proADM; 0.716 (95% CI, 0.612-0.820) for PCT; 0.668 (95% CI 0.567-0.770) for neopterin and 0.661 (95% CI, 0.565-0.756) for CRP. In the univariate analysis, variables that showed statistical differences when comparing patients with and without development of complications were: sex ( $p=0.046$ ), Charlson ( $p=0.019$ ), leucocytosis ( $p=0.043$ ), presence of neutrophil band cells ( $p=0.043$ ), presence of bacteremia

( $p=0.001$ ), PCT > 1ng/mL ( $p<0.0001$ ), proADM > 1.94 nmol/L ( $p<0.0001$ ) and neopterin >32.5nmol/L ( $p<0.0001$ ). Among variables with significant statistical differences, multivariate analysis only showed as independent variables: sex ( $p=0.009$ ), PCT ( $p=0.004$ ) and proADM ( $p=0.001$ ). Univariate and multivariate analysis results are shown in Table 5. Regarding diagnostic accuracy, PCT and proADM showed high specificity values, 80.7% and 82.5%, respectively. In addition, high negative predictive values were also obtained, 95.9% for PCT and 96% for proADM (Table 6).

## DISCUSSION

Regarding the study population analyzed, our results seem to be representative of the usual setting in the

Table 3. Comparison of patients with or without bacterial infection.

Variables		Univariate analysis			Multivariate analysis	
		Non infection (Group IV) N=92, n (%)	Bacterial infection (included in group I) N=113, n (%)	Total N=205, n (%)	P	OR [95%CI]
<b>Sex</b>	Men	46 (50)	70 (61.9)	116 (56.6)	0.086	
	Women	46 (50)	43 (38.1)	89 (43.4)		
<b>Age</b>	Median [IQR]	68.5 [54-76]	60.5 [71-79]	69 [54-78]	0.138	
<b>Charlson</b>	0	15 (16.3)	18 (15.9)	33 (16.1)	0.231	
	1-2	45 (48.9)	64 (56.6)	109 (53.2)		
	3-4	15 (16.3)	21 (18.6)	36 (17.6)		
	≥5	17 (18.5)	10 (8.8)	27 (13.2)		
<b>Leucocytes</b> (≥15.000/mL)	No	70 (76.1)	72 (63.7)	142 (69.3)	0.056	
	Yes	22 (23.9)	41 (36.3)	63 (30.7)		
<b>Bands</b>	No	69 (75)	58 (51.3)	127 (62)	0.001	2.383 [1.258-4.514]
	Yes	23 (25)	55 (48.7)	78 (38)		
<b>Neutropenia</b> (<1.000/mL)	No	88 (95.7)	109 (96.5)	197 (96.1)	0.999	
	Yes	4 (4.3)	4 (3.5)	8 (3.9)		
<b>CRP</b> (mg/L)	<70	58 (63)	40 (35.4)	98 (47.8)	<0.0001	2.254 [1.195-4.251]
	≥70	34 (37)	73 (64.6)	107 (52.2)		
<b>PCT</b> (ng/mL)	<0.4	67 (72.8)	50 (44.2)	117 (57.1)	<0.0001	2.254 [1.168-4.350]
	≥0.4	25 (27.2)	63 (55.8)	88 (42.9)		
<b>proADM</b> (nmol/L)	≤2,1	79 (86.8)	78 (69)	157 (77)	0.003	
	>2,1	12 (13.2)	35 (31)	47 (23)		
<b>Neopterin</b> (nmol/L)	≤19	41 (44.6)	36 (31.9)	77 (37.6)	0.062	
	>19	51 (55.4)	77 (68.1)	128 (62.4)		

ED and are similar to those obtained by other series with a comparable design. In general, a clinical suspicion of infectious disease in ED is confirmed late in 57-83% of the cases, although with microbiological documentation only in 34.5-49%. This means that the proportion of patients presenting with no infection reaches a percentage of 16-45.8% and suggests a very high level of suspicion of infection in ED. The frequency of bacteremia and mortality is around 15-19% and 5.6-12.3%, respectively [19-25].

In our study, none of the biomarkers analyzed had enough accuracy by itself to predict bacterial infection. Previous studies obtained variable results, although very difficult to compare. This is mainly due to the presence of differences in the inclusion criteria (fever,

leukocytosis, suspicion of infection), cut-off points for CRP or PCT, or clinical settings (emergency room, critical care unit, hospitalized patients) [19-25]. When combining both CRP and PCT levels with neutrophil band cells, we obtained a better sensitivity although with a lower specificity. Altogether, the diagnostic accuracy of this combination test is very limited and cannot be considered as criteria to establish diagnostic and therapeutic limitations. Recently, de Kruif et al [20] in a study with similar characteristics obtained a prediction model of bacterial infection that includes CRP, PCT and chills, which is better than clinical judgment. Nevertheless, the inclusion of this latter variable might represent, in our opinion, a subjective element that would limit its practical application.

Table 4. Comparison of patients with or without bacteremia.

Variables		Univariate analysis			Multivariate analysis		
		No bacteremia N=359, n (%)	Bacteremia N=53, n (%)	Total N=412, n (%)	P	OR [95%CI]	P
<b>Sex</b>	Men	221 (61.6)	28 (52.8)	249 (60.4)	0.225		
	Women	138 (38.4)	25 (47.2)	163 (39.6)			
<b>Age</b>	median [IQR]	68 [53-78]	72 [62-79]	69 [54-78]	0.039		
<b>Charlson</b>	0	52 (14.5)	7 (13.2)	59 (14.3)	0.929		
	1-2	203 (56.5)	29 (54.7)	232 (56.3)			
	3-4	55 (15.3)	10 (18.9)	65 (15.8)			
	≥5	49 (13.6)	7 (13.2)	56 (13.6)			
<b>Leucocytes</b> (≥15.000/mL)	No	281 (78.3)	32 (60.4)	313 (76)	0.004		
	Yes	78 (21.7)	21 (39.6)	99 (24)			
<b>Bands</b>	No	245 (68.2)	26 (49.1)	271 (65.8)	0.006		
	Yes	114 (31.8)	27 (50.9)	141 (34.2)			
<b>Neutropenia</b> (<1.000/mL)	No	335 (93.3)	50 (94.3)	385 (93.4)	0.999		
	Yes	24 (6.7)	3 (5.7)	27 (6.6)			
<b>CRP</b> (mg/L)	≤65.5	177 (49.3)	17 (32.1)	194 (47.1)	0.019		
	>65.5	182 (50.7)	36 (67.9)	218 (52.9)			
<b>PCT</b> (ng/mL)	≤1.0	302 (84.1)	19 (35.8)	321 (77.9)	<0.0001	5.887 [2.904-11.932]	<0.0001
	>1.0	57 (15.9)	34 (64.2)	91 (22.1)			
<b>proADM</b> (nmol/L)	≤2	305 (85.2)	24 (45.3)	329 (80)	<0.0001	3.090 [1.518-6.291]	0.002
	>2	53 (14.8)	29 (54.7)	82 (20.0)			
<b>Neopterin</b> (nmol/L)	≤71.9	335 (93.3)	37 (69.8)	372 (90.3)	<0.0001		
	>71.9	24 (6.7)	16 (30.2)	40 (9.7)			

However, when assessing the suspicion of bacterial infection in ED, we are facing a heterogeneous phenomenon, complex and difficult to predict, probably because there are several factors are involved. Biomarkers response is highly variable, and might be attributable to the bacterial species involved, the inflammatory response triggered in each patient, the source of infection and, finally to kinetic aspects that lead to limitations in punctual measurements. Accordingly, the limited sensitivity of CRP, PCT and proADM in our study could be explained by the presence of cases with slight systemic involvement or initial measurements corresponding to an early stage of the process [23, 26, 27]. Therefore, it could be appropriate to perform at least two serial measurements (within 12 to 24 hours) when the main objective is to exclude certainly bacterial infection. On the contrary,

the diagnostic accuracy for the detection of bacteremia is markedly better. While in previous studies CRP showed a limited prediction power [28], a cut-off of 1 ng/mL for PCT, shows high specificity and negative predictive values, suggesting its usefulness as an exclusion test. Some previous studies have suggested PCT cut-off points of 0.2 or 0.4 ng/mL to exclude bacteremia, with a negative predictive value of 97-99% [29-32]. In a recent study, Müller et al state that PCT is a good marker to predict bacteremia in patients with community acquired pneumonia [33]. They suggest performing blood cultures only when PCT levels are above 0.25 µg/L, given that in patients with lower levels the probability of bacteremia is very low. On the contrary, levels above 0.5 µg/L and especially above 1 µg/L, might help identify patients at higher risk, which would benefit from an early diagnosis and treatment.

Table 5. Comparison of patients according to the absence and presence of severity criteria.

Variables	Univariate analysis				Multivariate analysis		
		No severity criteria N=378, n (%)	Severity criteria N=34, n (%)	Total N=412, n (%)	P	OR [95%CI]	P
<b>Sex</b>	Men	223 (59.0)	26 (76.5)	249 (60.4)	0.046	0.308 [0.127-0.747]	0.009
	Women	155 (41.0)	8 (23.5)	163 (39.6)			
<b>Age</b>	Median [IQR]	69 [53-8.3]	68 [57-74.3]	69 [54-78]	0.846		
<b>Charlson</b>	0	56 (14.8)	3 (8.8)	59 (14.3)	0.019		
	1-2	213 (56.3)	19 (55.9)	232 (56.3)			
	3-4	63 (16.7)	2 (5.9)	65 (15.8)			
	≥5	46 (12.2)	10 (29.4)	56 (13.6)			
<b>Leucocytes</b> (>15.000/mL)	No	292 (77.2)	21 (61.8)	313 (76.0)	0.043		
	Yes	86 (22.8)	13 (38.2)	99 (24.0)			
<b>Bands</b>	No	254 (67.2)	17 (50.0)	271 (65.8)	0.043		
	Yes	124 (32.8)	17 (50.0)	141 (34.2)			
<b>Neutropenia</b> (<1.000/mL)	No	355 (93.9)	30 (88.2)	385 (93.4)	0.264		
	Yes	23 (6.1)	4 (11.8)	27 (6.6)			
<b>Bacteremia</b>	No	339 (89.7)	20 (58.8)	359 (87.1)	<0.0001		
	Yes	39 (10.3)	14 (41.2)	53 (12.9)			
<b>CRP</b> (mg/L)	≤126.5	273 (72.2)	15 (44.1)	288 (69.9)	0.001		
	>126.5	105 (27.8)	19 (55.9)	124 (30.1)			
<b>PCT</b> (ng/mL)	≤1	305 (80.7)	13 (38.2)	318 (77.2)	<0.0001	3.601 [1.499-8.654]	0.004
	>1	73 (19.3)	21 (61.8)	94 (22.8)			
<b>proADM</b> (nmol/L)	≤1.94	311 (82.5)	13 (38.2)	324 (78.8)	<0.0001	4.582 [1.902-11.038]	0.001
	>1.94	66 (17.5)	21 (61.8)	87 (21.2)			
<b>Neopterin</b> (nmol/L)	≤32.5	256 (67.7)	12 (35.3)	268 (65.0)	<0.0001		
	>32.5	122 (32.3)	22 (64.7)	144 (35.0)			

Despite all these results, according to recent meta analysis, PCT has only a moderate predictive power to detect bacteremia thus suggest to use it in combination with other clinical and analytical data [34, 35]. Accordingly, Peters et al proposed a predictive model using different variables and PCT levels above 2.45 ng/mL, with a sensitivity and specificity of 80% and 96%, respectively [36]. In a recent study, our group developed a predictive model for the ED that combines PCT < 0.4 ng/mL and Charlson index, which would allow identification of patients with low probability of bacteremia (0-2.9%), with a negative predictive value of 95% [37]. Despite these limitations, recent studies have shown that PCT measurement can be useful and safely

implemented for the improvement of empirical antimicrobial prescription [38-41]. It is well known that the indication of antimicrobial therapy is often performed intuitively and not entirely justifiably. In the study from Hausfater et al, antimicrobial therapy was prescribed to 83% of patients, although only 71% of them were considered to have bacterial infection and 35% of them were considered to have viral infection [22]. Despite acceptable clinical criteria to predict bacterial infection, antimicrobial therapy was prescribed in excess, probably because of the absence of other supporting elements. In this sense, the use of a biomarker measurement such as PCT might have been useful to rationalize the antibiotic use.

Table 6. Diagnostic accuracy for the prediction of bacterial infection, bacteremia and severity.

	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV	NPV	LR+	LR-
<b>Prediction of bacterial infection</b>						
Bands	48.7 (39.2-58.2)	75.0 (64.7-83.2)	70.5 (59.0-80.0)	54.3 (45.3-63.1)	1.9	0.6
CRP $\geq$ 70 mg/L	64.6 (55.0-73.2)	63.0 (52.3-72.7)	68.2 (58.4-76.7)	59.2 (48.8-68.9)	1.7	0.5
PCT $\geq$ 0.4 ng/mL	55.8 (46.1-65.0)	72.8 (62.4-81.3)	71.6 (60.8-80.4)	57.3 (47.8-66.3)	2	0.6
CRP $\geq$ 70 mg/L and/or bands	80,5 (71.8-87.1)	50,0 (39.5-60.5)	66.4 (57.8-74.1)	67.6 (55.1-78.2)	1.6	0.3
PCT $\geq$ 0,4 ng/mL and/or bands	73,5 (64.2-81.1)	58,7 (47.9-68.7)	68.6 (59.4-76.6)	64.3 (53.0-74.2)	1.7	0.4
<b>Prediction of bacteremia</b>						
PCT > 1.0 ng/mL	64.2 (49.7-76.5)	84.1 (79.8-87.7)	37.4 (27.6-48.2)	94.1 (90.8-96.3)	4.2	0.4
proADM >2 nmol/L	54.7 (40.6-68.2)	85.2 (81.0-88.6)	35.4 (25.3-46.8)	92.7 (89.2-95.2)	3.9	0.5
<b>Prediction of severity</b>						
PCT > 1 ng/mL	61.8 (43.6-77.3)	80.7 (76.3-84.5)	22.3 (14.7-32.3)	95.9 (92.9-97.7)	3.2	0.4
proADM > 1.94 nmol/l	61.8 (43.6-77.3)	82.5 (78.2-86.1)	24.1 (15.9-34.7)	96.0 (93.1-97.8)	3.5	0.4

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; LR+: positive likelihood ratio; LR-: negative likelihood ratio

Regarding the prediction of disease severity, PCT and especially proADM, showed elevated specificity and negative predictive values, questioning their usefulness as markers of severity in patients with suspicion of infection in the ED. These results are consistent with previous studies which propose PCT and proADM as predictors of severity [16, 42-45]. Initial prognosis prediction of severity in the ED is crucial because it settles decisions regarding the route of administration of the initial treatment, the site of care and the need of supporting measures. In fact, it is for this clinical subgroup that an early antimicrobial treatment has a major clinical benefit. Several models combining clinical variables such as tachycardia, taquipnea, shock or altered mental status have been evaluated with acceptable results [46, 47]. But the presence of these signs might be interpreted variably. In addition, the appearance of these signs frequently implies that the severity situation has already been established. Therefore, we consider that prediction using biomarkers such as proADM and PCT, among others, might be useful to establish an earlier and more objective estimation of severity [48]. It is worth emphasizing that

in our study, the group of patients with disease severity criteria, although mostly constituted by infectious processes, includes also a 26.4% of cases without infection, which could mean some overlapping occurred. However, this is the real scenario in the ED, since the prediction of disease severity has to be established at a moment when the suspicion of infection can still not be demonstrated, so it would be useful to have prediction criteria that are independent on the real cause at one's disposal.

Our study has some limitations. On one hand, most of the diagnoses have been attributed according to the evaluation made by clinicians in charge, so the possibility of some misclassified cases might exist. On the other hand, it is possible that some cases in group II might correspond to bacterial infection, representing a loss of cases for group I. The main reasons for this absence of microbiological documentation could be previous antimicrobial treatment and lack of biological samples. However this is a question still undefined since a gold standard for bacterial infection is not available. For patients with a clinical diagnosis of

infection but absence of microbiological confirmation, it is difficult to establish a definitive diagnosis [26, 27]. In our study, the distribution of patients into the four groups may look a bit excluding, but in our opinion it is the most accurate, while waiting for a better future definition. Our classification is similar to the one used in recent studies [20, 21]. Cases of viral infection are probably underestimated because an exhaustive investigation for virus was not performed, so these cases might have been included in groups II or III. This might explain why neopterin does not appear as discriminative. Biomarkers levels might be overestimated by the presence of comorbidities, such as renal failure or cardiac dysfunction. In addition, a frequent situation in ED is that patients might have received previous antimicrobial treatment and this fact may have also introduced modifications in the biomarkers levels. Categorization into Charlson index, as well as the cut-off value for leukocyte count may be questionable, but these decisions were based on the proposal from previous studies and their easy and practical use.

In conclusion, the global prediction of bacterial infection in the ED combining neutrophil band cells, CRP and PCT levels has a limited diagnostic accuracy. On the contrary,  $PCT \leq 1$  ng/mL and  $proADM \leq 1.9$  nmol/L, shows considerable diagnostic accuracy for a more specific prediction, excluding bacteremia and disease severity respectively, in patients with suspicion of infection in the ED. So, while waiting for new molecular methods that would allow an early bacterial detection, PCT and proADM might be helpful tools when taking crucial clinical decisions such as the beginning of empirical antimicrobial treatment, need of hospital admission and prediction of severity.

#### Acknowledgments

We are indebted to Elisenda Martínez, Arantza Sanvisens, Josep Roca and Roberto Muga, for statistical assessment. We also thank Microbiology, Hematology and Biochemistry Departments. The manuscript has been revised by Rosalind Morr, a native English speaker.

#### REFERENCES

- [1] Talan D A. Infectious disease issues in the emergency department. *Clin Infect Dis* 1996; 23(1):1-12, quiz 13-4.
- [2] Ansari F, Erntell M, Goossens H, et al. The European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC) point-prevalence survey of antibacterial use in 20 European hospitals in 2006. *Clin Infect Dis* 2009; 49(10):1496-504.
- [3] Epstein D, Raveh D, Schlesinger Y, et al. Adult patients with occult bacteremia discharged from the emergency department: epidemiological and clinical characteristics. *Clin Infect Dis* 2001; 32(4):559-65.
- [4] Tudela P, Queral C, Gimenez M, et al. Detection of bacteremia in patients discharged from an emergency unit: study of 61 cases. *Med Clin (Barc)* 1998; 111(6):201-4.
- [5] Modol J, Tudela P, Sabria M, et al. Patients with bacteremia who were discharged from the emergency department. *Clin Infect Dis* 2002; 35(7):899-900; author reply 00-1.
- [6] Ramos J M, Masia M, Elia M, et al. Epidemiological and clinical characteristics of occult bacteremia in an adult emergency department in Spain: influence of blood culture results on changes in initial diagnosis and empiric antibiotic treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(12):881-7.
- [7] Stalnikowicz R and Block C. The yield of blood cultures in a department of emergency medicine. *Eur J Emerg Med* 2001; 8(2):93-7.
- [8] Wilson M L. Outpatient blood cultures: progress and unanswered questions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(12):879-80.
- [9] Bossink A W, Groeneveld A B and Thijs L G. Prediction of microbial infection and mortality in medical patients with fever: plasma procalcitonin, neutrophilic elastase-alpha1-antitrypsin, and lactoferrin compared with clinical variables. *Clin Infect Dis* 1999; 29(2):398-407.
- [10] Herzum I and Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. *Curr Med Chem* 2008; 15(6):581-7.
- [11] Simon L, Gauvin F, Amre D K, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers



of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2):206-17.

[12] Reinhart K, Meisner M and Brunkhorst F M. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin* 2006; 22(3):503-19, ix-x.

[13] Guven H, Altintop L, Baydin A, et al. Diagnostic value of procalcitonin levels as an early indicator of sepsis. *Am J Emerg Med* 2002; 20(3):202-6.

[14] Ip M, Rainer T H, Lee N, et al. Value of serum procalcitonin, neopterin, and C-reactive protein in differentiating bacterial from viral etiologies in patients presenting with lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(2):131-6.

[15] Prat C, Dominguez J, Andreo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; 52(3):169-77.

[16] Christ-Crain M, Morgenthaler N G, Struck J, et al. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care* 2005; 9(6):R816-24.

[17] Charlson M E, Pompei P, Ales K L, et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; 40(5):373-83.

[18] Murray S B, Bates D W, Ngo L, et al. Charlson Index is associated with one-year mortality in emergency department patients with suspected infection. *Acad Emerg Med* 2006; 13(5):530-6.

[19] Chan Y L, Tseng C P, Tsay P K, et al. Procalcitonin as a marker of bacterial infection in the emergency department: an observational study. *Crit Care* 2004; 8(1):R12-20.

[20] de Kruif M D, Limper M, Gerritsen H, et al. Additional value of procalcitonin for diagnosis of infection in patients with fever at the emergency department. *Crit Care Med* 2010; 38(2):457-63.

[21] Delevaux I, Andre M, Colombier M, et al. Can procalcitonin measurement help in differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes? *Ann Rheum Dis* 2003; 62(4):337-40.

[22] Hausfater P, Juillien G, Madonna-Py B, et al. Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. *Crit Care* 2007; 11(3):R60.

[23] Indino P, Lemarchand P, Bady P, et al. Prospective study on procalcitonin and other systemic infection markers in patients with leukocytosis. *Int J Infect Dis* 2008; 12(3):319-24.

[24] Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, et al. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care* 2007; 11(2):R38.

[25] Munoz P, Simarro N, Rivera M, et al. Evaluation of procalcitonin as a marker of infection in a nonselected sample of febrile hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(4):237-41.

[26] Marshall J C and Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(7):2290-8.

[27] Schuetz P, Christ-Crain M and Muller B. Procalcitonin and other biomarkers to improve assessment and antibiotic stewardship in infections--hope for hype? *Swiss Med Wkly* 2009; 139(23-24):318-26.

[28] Wyllie D H, Bowler I C and Peto T E. Bacteraemia prediction in emergency medical admissions: role of C reactive protein. *J Clin Pathol* 2005; 58(4):352-6.

[29] Aalto H, Takala A, Kautiainen H, et al. Laboratory markers of systemic inflammation as predictors of bloodstream infection in acutely ill patients admitted to hospital in medical emergency. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(9):699-704.

[30] Caterino J M, Scheatzle M D, Forbes M L, et al. Bacteremic elder emergency department patients: procalcitonin and white count. *Acad Emerg Med* 2004; 11(4):393-6.

[31] Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, et al. Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis* 2002; 35(2):156-61.

[32] Prat C, Sancho J M, Dominguez J, et al. Evaluation of procalcitonin, neopterin, C-reactive protein, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(9):1752-61.

[33] Muller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, et al. Procalcitonin levels predict bacteremia in patients with

community-acquired pneumonia: a prospective cohort trial. *Chest* 2010; 138(1):121-9.

[34] Becker K L, Snider R and Nylen E S. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med* 2008; 36(3):941-52.

[35] Jones A E, Fiechtl J F, Brown M D, et al. Procalcitonin test in the diagnosis of bacteremia: a meta-analysis. *Ann Emerg Med* 2007; 50(1):34-41.

[36] Peters R P, Twisk J W, van Agtmael M A, et al. The role of procalcitonin in a decision tree for prediction of bloodstream infection in febrile patients. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(12):1207-13.

[37] Tudela P, Lacoma A, Prat C, et al. Predicción de bacteriemia en los pacientes con sospecha de infección en urgencias. *Med Clin* 2010; 135(15):685-90.

[38] Oh J S, Kim S U, Oh Y M, et al. The usefulness of the semiquantitative procalcitonin test kit as a guideline for starting antibiotic administration. *Am J Emerg Med* 2009; 27(7):859-63.

[39] Tang H, Huang T, Jing J, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: a systematic review and meta-analysis. *Infection* 2009; 37(6):497-507.

[40] Schuetz P, Albrich W, Christ-Crain M, et al. Procalcitonin for guidance of antibiotic therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8(5):575-87.

[41] Schuetz P, Batschwaroff M, Dusemund F, et al. Effectiveness of a procalcitonin algorithm to guide antibiotic therapy in respiratory tract infections outside of study conditions: a post-study survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(3):269-77.

[42] Lee C C, Chen S Y, Tsai C L, et al. Prognostic value of mortality in emergency department sepsis

score, procalcitonin, and C-reactive protein in patients with sepsis at the emergency department. *Shock* 2008; 29(3):322-7.

[43] Viallon A, Guyomarc'h S, Marjollet O, et al. Can emergency physicians identify a high mortality subgroup of patients with sepsis: role of procalcitonin. *Eur J Emerg Med* 2008; 15(1):26-33.

[44] Brunkhorst F M, Wegscheider K, Forycki Z F, et al. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 2:S148-52.

[45] Guignant C, Voirin N, Venet F, et al. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009; 35(11):1859-67.

[46] Knott J C, Tan S L, Street A C, et al. Febrile adults presenting to the emergency department: outcomes and markers of serious illness. *Emerg Med J* 2004; 21(2):170-4.

[47] Shapiro N I, Howell M D, Talmor D, et al. Mortality in Emergency Department Sepsis (MEDS) score predicts 1-year mortality. *Crit Care Med* 2007; 35(1):192-8.

[48] Shapiro N I, Trzeciak S, Hollander J E, et al. A prospective, multicenter derivation of a biomarker panel to assess risk of organ dysfunction, shock, and death in emergency department patients with suspected sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(1):96-104.



## **ANNEX III**





# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Editorial

### Relevancia de los marcadores de inflamación en el diagnóstico, pronóstico y nuevas formas de tratamiento de las enfermedades infecciosas

#### Importance of biomarkers in diagnosis, prognosis and new therapies in infectious diseases

Alicia Lacoma<sup>a,c</sup>, Cristina Prat<sup>a,b,c</sup> y Vicente Ausina<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad Funcional de Inflamación, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

A pesar de la disponibilidad de técnicas diagnósticas cada vez más eficaces y de tratamientos antibióticos de amplio espectro, en la práctica clínica diaria se presentan situaciones de aún difícil resolución en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En las últimas décadas se ha hecho evidente que en determinadas situaciones para una correcta orientación diagnóstica y terapéutica se hacen necesarios, además del diagnóstico clínico y microbiológico, los marcadores de la inflamación, que nos han de orientar sobre el grado de respuesta inflamatoria<sup>1</sup>. Numerosos estudios han centrado su interés en demostrar la utilidad de la determinación de los marcadores de inflamación, ya sean los clásicos o los de nueva descripción, en la orientación diagnóstica y terapéutica de diversos síndromes clínicos.

En este mismo número de la revista, Aznar-Oroval et al<sup>2</sup> publican un interesante artículo en el que analizan los valores de procalcitonina (PCT), interleucina 8, interleucina 6 y proteína C reactiva (PCR) en un grupo de pacientes con cáncer, y concluyen que la PCT es el marcador de infección que puede aportar más información en el diagnóstico precoz de la bacteriemia en este grupo de pacientes.

En el caso de las enfermedades infecciosas, la respuesta inflamatoria implica la activación de un conjunto de mecanismos humorales y celulares en respuesta a la presencia de un microorganismo viable en los tejidos o bien a alguno de sus componentes con el objetivo de limitar los potenciales efectos nocivos. Los mecanismos de defensa del hospedador pueden autolimitar los efectos y confinar la infección a un órgano o incluso erradicarla, o bien, si fracasa esta contención, puede persistir y evolucionar dando lugar a la liberación de microorganismos, toxinas y múltiples mediadores al torrente circulatorio, y producir una respuesta inflamatoria sistémica y un fallo multiorgánico<sup>3</sup>. Los mecanismos variarían en función de factores dependientes tanto del microorganismo como del hospedador, sin olvidar que la relación que se establece entre ambos es dinámica en el curso de la infección. En todo este proceso interviene una serie de mediadores

que se interrelacionan entre sí en una compleja y orquestada red que da lugar a diferentes manifestaciones clínicas.

La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por actuar frente a cualquier agente infeccioso sin depender de un contacto previo con este último. No se trata de una respuesta inespecífica dado que es capaz de reconocer un conjunto de componentes microbianos mediante la expresión de receptores codificados en el genoma del hospedador. Estos componentes son los llamados patrones moleculares asociados al patógeno (*pathogen associated molecular patterns*). Son estructuras conservadas en la evolución y se encuentran únicamente presentes en los microorganismos. Incluyen moléculas estructurales, como el lipopolisacárido, el peptidoglicano, la flagelina, los lipopéptidos, los mananos, los glucanos y el ARN vírico, entre otros. El sistema inmunitario innato a su vez utiliza una gran variedad de receptores de patrones moleculares (*pattern recognition receptor*), que pueden expresarse en la superficie celular, en componentes intracelulares o bien secretarse al torrente circulatorio o a otros fluidos orgánicos, de forma que sólo se necesita un número limitado de receptores para reconocer una gran variedad de microorganismos<sup>4</sup>. Entre estos receptores destacarían los *toll-like receptors*, el receptor CD14 y los receptores de péptidos formilados. La fijación a un receptor da lugar a la activación de factores de transcripción, como el *nuclear factor kappa B*, fundamental para las respuestas inflamatoria e inmunitaria. Éste se une al ADN y actúa como promotor de múltiples genes que codifican moléculas implicadas en la inflamación: citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda y moléculas de adhesión (selectinas e integrinas).

Los patrones de citocinas y los mediadores liberados pueden ser diferentes en función de la especificidad de los patógenos y de las vías de reconocimiento implicadas. Las moléculas fundamentales en la respuesta inmunitaria, como las defensinas o las citocinas, pueden ser perjudiciales si se liberan de forma excesiva a la circulación sistémica; por el contrario, niveles excesivamente bajos de estas moléculas en el lugar de la infección pueden dar lugar a una insuficiente eliminación de los microorganismos invasivos. La alteración de la homeostasis de estos marcadores da lugar a las manifestaciones de *shock séptico* si la respuesta inflamatoria es excesiva o desproporcionada (colapso

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vausina.germanstrias@gencat.cat (V. Ausina).

vascular, daño tisular y disfunción multiorgánica) o bien si es insuficiente a una infección grave. Estas manifestaciones, como sería el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tienen aún una elevada mortalidad, y es necesario que se detecten precozmente.

La descripción funcional de marcadores modulados por citocinas que presentan elevación sérica en respuesta a la infección, medibles en suero por técnicas sencillas, con pocas variaciones en los niveles diarios y con una mayor estabilidad in vivo y ex vivo ha significado una nueva aproximación a este objetivo. Destacan las proteínas de fase aguda clásicas, como la PCR, la amiloide A del suero o la neopterina, y las más recientemente descritas «hormokinas», como la PCT. En los últimos años se ha ido perfilando también el papel de los marcadores que reflejan disfunción a nivel hemodinámico y endotelial. Destacaría el péptido natriurético atrial, la adrenomedulina, la coceptina y la endotelina, no influenciados por la etiología, pero sí por la gravedad y el pronóstico de la infección. La determinación de estos marcadores es de especial importancia en las situaciones en las que la clínica y los parámetros habituales del laboratorio son más inespecíficos, como las edades extremas de la vida (niños y ancianos), las situaciones de inmunodepresión, como en el artículo que se presenta en este número<sup>2</sup>, y las de respuesta inflamatoria alterada a nivel basal (traumatismos, quemaduras y poscirugía). Además, si se tiene en cuenta que diferentes vías de señalización se activan en respuesta a diferentes patrones moleculares asociados al patógeno, algunos marcadores pueden orientar la etiología antes de disponer de los resultados microbiológicos.

De los múltiples estudios realizados en los últimos años para medir la respuesta inflamatoria en pacientes con sepsis, se desprende que lo que predomina es una disregulación de la inmunidad innata en respuesta a productos microbianos.

Diferentes estudios recientes han evaluado la utilidad de la medida de los marcadores de la inflamación, fundamentalmente los de más reciente descripción, en el diagnóstico y la monitorización de diversos síndromes de origen infeccioso así como la influencia de la edad, del agente etiológico, la extensión y la gravedad de la infección en la respuesta inflamatoria<sup>5-15</sup>.

La utilidad de cada marcador se ha de contextualizar en base a la situación clínica, la coexistencia de comorbilidad y el sitio de la infección (SNC, respiratoria, urinaria, etc.). Es por eso que los puntos de corte óptimos para cada marcador variarán en función del contexto clínico, la edad, el foco de infección así como el tipo de ensayo utilizado para su medida.

La PCT se muestra superior a la PCR cuando se trata de distinguir entre infección bacteriana y vírica, entre infección bacteriana sistémica o localizada y también entre infecciones bacterianas y causas no infecciosas de inflamación<sup>16</sup>. Como limitaciones de la PCT podemos destacar que no aumenta o sólo lo hace discretamente en infecciones confinadas a un órgano o sin manifestaciones sistémicas, y es poco útil en este tipo de infecciones, en las que la PCR aportaría más información. Tampoco es útil en la monitorización de infecciones víricas ni de enfermedades inflamatorias crónicas; en estos casos, la neopterina o la PCR pueden ser complementarias<sup>17</sup>. Hay que tener en cuenta también que los niveles de PCT disminuyen en suero cuando el tratamiento es adecuado, pero esto no indica necesariamente erradicación de la infección, únicamente que la respuesta séptica está bajo control.

Así pues, las determinaciones seriadas de los marcadores de la inflamación tienen un valor pronóstico, y se pueden utilizar en la monitorización de la respuesta al tratamiento<sup>18-20</sup>. Concretamente, se han publicado ya diferentes estudios intervencionistas que tienen en cuenta los valores de PCT para la toma de decisiones terapéuticas<sup>21</sup>.

La disponibilidad de biomarcadores que nos permitan medir el grado de respuesta inflamatoria nos permitirá en un próximo futuro instaurar medidas terapéuticas más adecuadas a cada situación, especialmente tratamientos inmunomoduladores que actúen de forma complementaria a la administración de agentes antimicrobianos y medidas de soporte. El diseño de estrategias que permitan prevenir la cascada de respuesta a los productos microbianos implica la identificación de las diversas moléculas implicadas en la fisiopatología de la sepsis y su monitorización con el objetivo de poder diseñar fármacos que reviertan los efectos nocivos de los mediadores inflamatorios sin bloquear sus efectos beneficiosos en la lucha contra la infección.

Los ensayos clínicos realizados con nuevos tratamientos antiinflamatorios mediante la utilización de agentes anticitocinas proinflamatorias o bien citocinas antiinflamatorias recombinantes generalmente no han tenido en cuenta, al incluir los pacientes en los estudios, la medición de marcadores de inflamación, aun siendo éstos las dianas. Este tipo de fármacos debería administrarse, lógicamente, durante el pico proinflamatorio, dado que su administración durante la fase compensatoria o antiinflamatoria podría alterar los mecanismos de defensa del hospedador. Actualmente, están en proceso de evaluación diversos ensayos clínicos con tratamientos antiinflamatorios, incluyendo el uso de glucocorticoides<sup>22,23</sup>.

Las infecciones clínicamente aparentes son demasiado complejas en las interacciones microorganismo-hospedador como para reducirlas a la determinación de un único marcador. Por tanto, el uso de marcadores no ha de sustituir nunca a un correcto diagnóstico y seguimiento clínico y microbiológico, pero puede aportar una más adecuada información diagnóstica y pronóstica. Además, se abren también nuevas opciones terapéuticas en cuanto a posibilidades de inmunoneutralización y utilización de tratamientos inmunomoduladores en general.

Es probable que en un próximo futuro la óptima rentabilidad se obtenga con la adecuada combinación de marcadores, teniendo en cuenta las ventajas y las limitaciones de cada uno de ellos (incluidos los que están actualmente en proceso de evaluación), en función de la edad, el síndrome clínico, la/s enfermedad/es de base y el contexto clínico (atención primaria, hospitalización, cuidados intensivos, etc.) así como la utilización de determinaciones seriadas en función de la cinética de cada marcador.

Los marcadores de la inflamación actúan a diferentes niveles durante la infección con funciones pleiotrópicas sobre los diferentes eslabones de la respuesta inflamatoria. En el momento actual, la selección y estudio de diferentes marcadores de la inflamación constituye un campo de gran actividad investigadora con una multiplicidad de aplicaciones potenciales en el diagnóstico, el pronóstico y las nuevas formas de tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Como suele suceder casi siempre, la experiencia y el conocimiento del tema serán determinantes del ámbito disciplinario en el que recaiga la responsabilidad de estas determinaciones.

## Bibliografía

1. Prat C. Importancia diagnóstica i pronóstica dels marcadors d'inflamació en patologia infecciosa. Noves molècules antiinflamatories bacterianes. Universitat Autònoma de Barcelona: Tesis doctoral; 2006.
2. Aznar-Oroval E, Sánchez-Yepes M, Lorente-Alegre P, San Juan- Gadea M, Ortiz-Muñoz B, Pérez-Ballester P, et al. Valor diagnóstico de la procalcitonina, interleucina 8, interleucina 6 y proteína C reactiva en la detección de bacteriemia y fungemia en pacientes con cáncer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:273-7.
3. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
4. Gordon S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002;111:927-30.

5. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: An observational study. *Crit Care.* 2005;9:R816–24.
6. Masia M, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Hernández I, Shum C, Gutiérrez F. Midregional pro-A-type natriuretic peptide and carboxy-terminal pro-vasopressin may predict prognosis in community-acquired pneumonia. *Clin Chem.* 2007;53:2193–201.
7. Prat C, Domínguez J, Andreo F, Blanco S, Pallares A, Cuchillo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect.* 2006;52:169–77.
8. Prat C, Domínguez J, Rodrigo C, Giménez M, Azuara M, Blanco S, et al. Use of quantitative and semiquantitative procalcitonin measurements to identify children with sepsis and meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:136–8.
9. Prat C, Domínguez J, Rodrigo C, Giménez M, Azuara M, Jiménez O, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:963–8.
10. Prat C, Domínguez J, Rodrigo C, Giménez M, Azuara M, Jiménez O, et al. Elevated serum procalcitonin values correlate with renal scarring in children with urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:438–42.
11. Prat C, Lacoma A, Domínguez J, Papassotiropoulos J, Morgenthaler NG, Andreo F, et al. Midregional pro-atrial natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia. *J Infect.* 2007;55:400–7.
12. Prat C, Ricart P, Ruyra X, Domínguez J, Morillas J, Blanco S, et al. Serum concentrations of procalcitonin after cardiac surgery. *J Card Surg.* 2008;23:627–32.
13. Jochberger S, Dorler J, Luckner G, Mayr VD, Wenzel V, Ulmer H, et al. The vasopressin and copeptin response to infection, severe sepsis, and septic shock. *Crit Care Med.* 2009;37:476–82.
14. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Muller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium.* 2007;14:345–51.
15. Prat C, Sancho J, Domínguez J, Xicoy B, Giménez M, Ferra C, et al. Evaluation of procalcitonin, neopterin, C-reactive protein, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:1752–61.
16. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:206–17.
17. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther.* 2001;26:319–29.
18. Charles PE, Tinel C, Barbar S, Aho S, Prin S, Doise JM, et al. Procalcitonin kinetics within the first days of sepsis: Relationship with the appropriateness of antibiotic therapy and the outcome. *Crit Care.* 2009;13:R38.
19. Boussekey N, Leroy O, Alfandari S, Devos P, Georges H, Guery B. Procalcitonin kinetics in the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* 2006;32:469–72.
20. Seligman R, Meisner M, Lisboa TC, Hertz FT, Filippin TB, Fachel JM, et al. Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2006;10:R125.
21. Tang H, Huang T, Jing J, Shen H, Cui W. Effect of procalcitonin-guided treatment in patients with infections: A systematic review and meta-analysis. *Infection.* 2009;37:497–507.
22. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: A systematic review. *JAMA.* 2009;301:2362–75.
23. Sligo WI, Milner Jr DA, Sundar S, Mphatswe W, Majumdar SR. Safety and efficacy of corticosteroids for the treatment of septic shock: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2009;49:93–101.







## **AGRAÏMENTS**



## AGRAÏMENTS

Després de gairebé sis anys són moltes les persones que en algun moment m'han ajudat i han aportat el seu granet de sorra a aquest projecte, i no m'agradaria oblidar-me de ningú...per això abans de res moltes gràcies a tots!

En primer lloc, gràcies a la Cristina i al Jose per tot el que m'han ensenyat al llarg d'aquests anys i per haver-me introduït en el món de la recerca. Per preocupar-se de les “nenes” en tot moment. Per la paciència infinita, sobre tot en els moments “d'empanament” i per la constància a seguir endavant en aquest projecte. Per ser propers a nosaltres. Ens ho hem passat molt bé treballant junts i hem compartit moltes rialles i bons moments. Hi ha coses inoblidables: apa que no hem revisat vegades aquelles 300 històries amb la Cris, sense oblidar els trajectes en cotxe, que ens serveixen per posar-nos al dia, i els consells del Jose sobre el format i la presentació, que són molt importants!

Al jefe, al Dr Ausina per haver confiat en mi i haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta Tesi.

A la Irene, que ha estat la meva companya i amiga de viatge, en aquest camí que significa escriure i acabar una tesi. Per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per escoltar-me quan tenia dubtes, per animar-me a seguir endavant i per facilitar-me alguns dels tràmits de l'etapa final (impresos universitat, maquetat tesi...es lo que tiene ir detrás tuyo, jejeje). Per moments, no sé si ens assemblem més a un matrimoni, o a dues germanes...però el que és ben cert, és que juntes formem un bon equip.

Als tècnics de la secció Respi/ Antígens/ BK, als “Migueles” i a la Luci perquè segur que en algun moment m'han ajudat a recuperar mostres d'algun congelador i perquè han fet que les estones a la cabina fossin més amenes. Al Miguel Ángel per tenir sempre en un raconet eppendorfs, puntes o caps de congelació per una urgència, i per estar al cas de les mostres que arriben dient-me “ésta son tus PCTs” i al Miguel Pérez i la Luci, per fer sempre un cop de mà i per tenir sempre a punt una broma, un acudit o una anècdota. A la Jéssica, tècnic de recerca que en aquests últims mesos s'ha encarregat de aliquidar, guardar i mesurar tot el que ha fet falta i més! Per tot el que ens ajuda a la Irene i a mi en el treball del dia a dia.

A les companyes de despatx, la Silvia, la Nerea i la Loreto amb qui hem compartit moltes rialles dins i fora del laboratori. Per la seva amistat. A la Silvia, per ser la "organitzadora oficial de actos y eventos", a la Nerea per introduir-nos en el món del disseny i dels colors (de gran ajuda a l'hora de triar els colors pels pòsters) i a la Miss Loret per ensenyar-nos què és el pisco i els delicatessen xilens.

No vull oblidar-me de la resta de companys de laboratori, que són molts: adjunts, tècnics, becaris i secretàries, sense oblidar als que ja no treballen aquí: en especial la Vero i el Jesús, amb qui vaig començar en el món del doctorat.

Al Servei de Pneumologia, especialment al Felipe i al Joan. Al Felipe per assistir de públic a la meva primera comunicació en un congrés i per resoldre tots els dubtes sobre els aspectes més clínics que m'han anat sorgint en el temps, i al Joan pel seu optimisme i la seva col·laboració inestimable.

A la Unitat de Curta Estada, en concret al Pere Tudela, també conegut com a PT, pels moments divertits mentre preparàvem i revisàvem els manuscrits. Per les seves visites al despatx a les 15h i per fer més entretingudes les tardes mentre parlàvem de biomarcadors i símptomes, sense oblidar-nos del que feia el Barça!

I also want to thank TBNET members for external revision and evaluation of this Thesis (Luca, Morten, Martina and Delia). TBNET is a European network of enthusiastic clinicians and scientists, from whom I have learned a lot of things and have shared several moments, specially in meetings, congresses and courses.

No voldria oblidar-me de totes aquelles persones que no treballen a l'hospital, però que indirectament d'alguna manera m'han ajudat a dur aquest projecte a terme.

A la Berta, per ajudar-me a donar-li format a la Tesi, ara l'índex, ara els títols, ara els encapçalaments...tranquil·la que ha quedat del tot compensat tot el que et vaig ajudar durant la carrera, ja estem en paus. Bé, més enllà de tots aquests aspectes més tècnics, donar-te les gràcies per ser-hi sempre que ho he necessitat i per ser una bona amiga.

A la Ona, amiga de la infantesa, amb qui hem compartit molts moments i que espero poder compartir-ne molts més.

A la Laetita, també amiga de la infantesa, que tot i pertànyer a un món completament diferent, sempre s'ha interessat per la meva feina i m'ha fet sempre costat.

A la Isabel, la tata del poble. Perquè ens coneixem de ben petites, i tot i la distància no hem perdut ni mica de la confiança que ens tenim.

Al David, pels bons moments que hem passat, pel seu sentit del humor i per ensenyar-me que: "vale más un por si que dos yo pensa".

A la Montse Sierra, per interessar-se i seguir els meus passos des que vaig començar a les Escoles Franceses fins ara que lleigeixo la Tesi.

A l'Antonio i la Clara, per preocupar-se de en quin punt estava la Tesi, i per animar-me a seguir dient-me "Ja estàs a la fase final, et queda molt poquet."

Als meus pares per la seva ajuda incondicional en tot moment. Pels valors transmesos al llarg dels anys: esforç, constància, treball i sacrifici, i que en aquesta Tesi es tradueixen en recompensa i satisfacció per la feina ben feta.

A la meva mare, per la seva visió de la vida, optimista i sempre mirant endavant malgrat els entrebancs de la vida, sense oblidar les carmanyoles que m'han fet el dia a dia més fàcil. Al meu pare, per animar-me sempre a seguir endavant i tranquil·litzar-me en aquells moments de més desànim. Quan estudiàvem junts els diumenges al matí (i d'això en fa molts anys!) em deies que els estudis eren una carrera de fons, i que tot i els obstacles l'important era arribar al final...i això és el que he anat fent fins ara.

A l'Oriol, per viure aquesta Tesi en primera persona, per les hores que aquesta Tesi ens ha robat, per animar-me en moments de desànim, per escoltar-me quan ho he necessitat, per relativitzar els meus dubtes i "patiments", per veure el got mig ple, quan jo el veia mig buit, per ajudar-me amb els aspectes més tècnics, pel teu suport incondicional...Tens raó i no en tinc cap dubte, tu també podries defensar aquesta Tesi! Per això, i per tot el demés gràcies per ser al meu costat!

