

NEFROLOGO IN CORSIA

Ozone Therapy: un potenziale contratto approccio alla infezioni delle basse vie urinarie? A Case Series Report



Giuseppe Bonforte¹, Antonio Bellasi^{1,3}, Hilary Riva^{1,2}, Mariangela Ferradini¹, Emilia Arrighi¹, Gianna Groppi¹, Claudio Minoretti¹, Marianno Franzini⁴

(1) UOC di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Sant'Anna-Como, Como, Italy

(2) Clinica Nefrologica e Dipartimento di Medicina Clinica e Prevenzione, Università degli Studi Milano-Bicocca

(3) Department of Health Sciences, University of Milan, Italy

(4) Docente di Ossigeno Ozono Terapia presso l'Università degli Studi di Pavia PRESIDENTE Società Italiana di Ossigeno Ozono Terapia

Abstract

La rapida insorgenza e diffusione di ceppi batterici resistenti ai comuni antibiotici rappresenta un'emergenza clinica mondiale. La ridotta resistenza alle infezioni osservata in corso d'insufficienza renale cronica e tra i pazienti portatori di trapianto di rene così come in presenza di alcune alterazioni metaboliche quali l'iperglicemia o la glicosuria o la presenza di condizioni cliniche favorevoli le infezioni delle vie urinarie quali la vescica neurologica rappresentano comuni fattori di rischio in grado di aumentare l'incidenza di infezioni delle vie urinarie (IVU). Il ricorso indiscriminato alla terapia antibiotica spesso fornisce un sollievo parziale e transitorio dei sintomi disurici e aumenta la possibilità di selezioni di ceppi batterici multi-resistenti. Numerosi sforzi sono stati compiuti nel recente passato per sviluppare delle nuove strategie antimicrobiche per ridurre il rischio di selezione di ceppi batterici multi-resistenti. Qui di seguito presentiamo dei risultati incoraggianti per quanto preliminari relativi all'utilizzo dell'Ozono terapia per la cura delle infezioni delle basse vie urinarie.

Parole chiave: batteri multiresistenti, infezione, Ozono, UTI

Introduzione

Le proprietà antibatteriche dell'Ozono sono state scoperte alla fine del diciannovesimo secolo. Nel 1873, infatti, Fox descrisse che l'esposizione all'Ozono era in grado di uccidere sia microrganismi anaerobi che aerobici [1]. Dei lavori successivi hanno inoltre suggerito che l'Ozono possiede anche proprietà vasodilatatrici ed antalgiche [2] [3] [3] (full text). In medicina l'uso dell'Ozono terapia (sia utilizzato come gas iniettato nel sottocute o intramuscolare o insufflato per via rettale o disciolto nel sangue del paziente come auto emotrascuzione o in soluzioni fisiologica) è stato utilizzato come terapia aggiuntiva in molti campi, specialmente per curare quelle patologie non adeguatamente controllate/curate dalle terapie convenzionali come ad esempio l'arteriopatia periferica e le ulcere ischemiche, la patologia coronarica e cerebrovascolare ischemica, i processi di osteonecrosi/osteomielite, le carie dentarie, le ernie discali, la colite cronica, le fistole e alcune patologie dermatologiche [2] [3] (full text). Nel campo delle malattie infettive, l'Ozono terapia è stata impiegata in associazione alla terapia antibiotica per migliorare l'eradicazione delle infezioni

[1]. Da ultimo alcuni studi su modelli animali di danno da ischemia/riperfusion renale [4], d'infiammazione e fibrosi renale [5], di tossicità epatica e renale da acetaminofene [6] [7] fanno intuire le potenzialità che questa terapia potrebbe rivelare in medicina. Tuttavia, nonostante un razionale intrigante, l'utilizzo dell'Ozono terapia rimane controverso. Infatti, l'uso improprio di questo gas e gli effetti avversi segnalati in corso di questa terapia hanno portato la *Food and Drug Administration (FDA)* a proibire l'utilizzo dell'Ozono in medicina negli USA e la *European Medicine Agency (EMA)* a promulgare due messaggi di attenzione per l'uso di questa terapia in Europa [3] (full text).

Oggi, a distanza di quasi un secolo dalla scoperta della tossicità dell'Ozono, sono stati identificati i meccanismi di azione, gli effetti dose dipendenti e la finestra terapeutica di questo medicinale e l'Ozono terapia è comunemente e amministrata con sicurezza in tutta Europa [3] (full text). Nonostante tutto sono necessari ulteriori studi clinici per definire la reale efficacia e validità di questo presidio terapeutico e per definirne gli ambiti di impiego in medicina.

Le infezioni delle vie urinarie (UTI) sono una delle cause più comuni di infezione nei paesi sviluppati e sono responsabili di una elevata morbilità, consumo di risorse e spesso sono associate all'uso inconsiderato di antibiotici e alla selezione di ceppi batterici multi resistenti [8] (full text). Alla luce della rapida diffusione delle antibiotico resistenze, la ricerca di approcci terapeutici alternativi o aggiuntivi all'impiego di antibiotici, rappresenta un'esigenza particolarmente importante in particolare in quei sottogruppi di pazienti maggiormente suscettibili alle IVU quali i pazienti trapiantati, diabetici, con vescica neurologica necessitante di ripetute cateterizzazioni vescicali quotidiane. Qui di seguito riportiamo una serie di 3 casi di IVU trattate con Ozono terapia.

Metodi e materiali

Tutte le procedure sono state effettuate c/o l'U.O.C. di Nefrologia e Dialisi dell' A.O. Sant'Anna di Como. L'Ozono è stato generato con un device Medical 95 Computerised Photometric System prodotto da Multiosigen Gorle BG Italia. Lo schema utilizzato è riportato nella figura 1. Dopo aver posizionato un catetere vescicale e svuotato la vescica, si iniettano 100-150 centilitri (cc) di soluzione fisiologica prelevata da (250ml di soluzione fisiologica adizionata con 150 ml Ozono; alla concentrazione di 50 µg/ml). La soluzione fisiologica ozonizzata è poi mantenuta in vescica fino alla minzione successiva. La procedura è ripetuta nei giorni 1, 3 e successivamente con cadenza settimanale fino alla scomparsa dei sintomi di surici o alla negativizzazione dell'esame colturale. Il volume di fisiologica ozonata iniettata in vescica è progressivamente aumentato fino al raggiungimento di 250 cc o alla comparsa di discomfort del paziente.

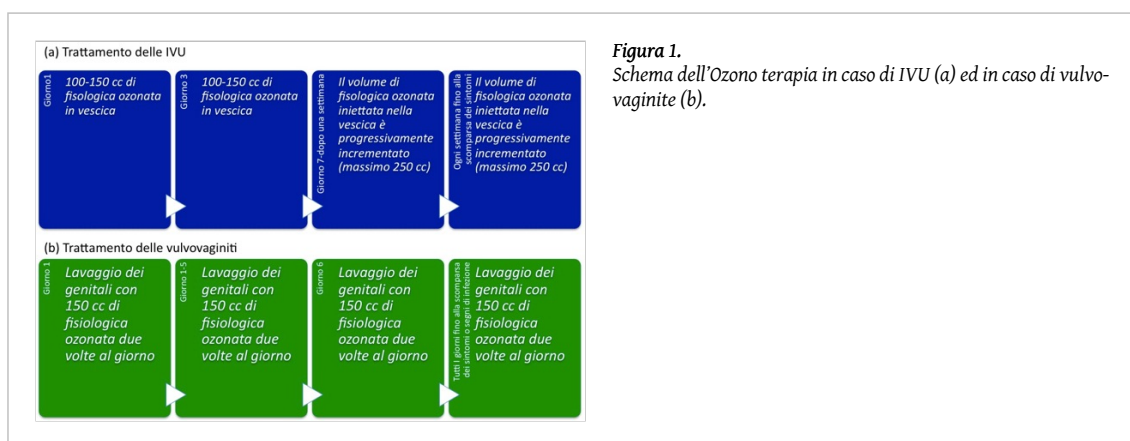


Figura 1. Schema dell'Ozono terapia in caso di IVU (a) ed in caso di vulvovaginite (b).

Il protocollo di Ozono terapia utilizzato per il trattamento delle vulvovaginiti è rappresentato in figura 1 e *consiste nel lavaggio dei genitali esterni e della vagina con 150 cc di fisiologica ozonata prelevata da (250 ml di soluzione fisiologica addizionata con 150 ml Ozono; alla concentrazione di 50 µg/ml). 2 volte al giorno per 7 giorni o fino alla scomparsa delle secrezioni vaginali.*

Risultati

Qui di seguito riassumiamo brevemente 3 casi di IVU che sono stati trattati con Ozono terapia c/o a nostra unità operativa. Le caratteristiche cliniche dei pazienti trattati maggiormente rilevanti sono riassunte in tabella 1.

CM è una signora di razza caucasica di 59 anni con frequenti episodi di IVU, vescica neurologica con diverticolo. Riceve terapia immunosoppressiva cronica quale terapia antirigetto per un trapianto di rene avvenuto nel 2002. La sua storia clinica è significativa per IVU ricorrenti causate da E.Coli e per cui è stata trattata in passato con numerosi e vari cicli di antibioticoterapia. Nell'ottobre del 2012, la paziente lamenta l'ennesimo episodio di IVU con sintomi disurici importanti e l'urinocoltura documenta la crescita batterica di *Morganella morganii*, (1.000.000 UFC/ml) resistente alle penicilline e agli aminoglicosidi. Alla luce del quadro clinico, viene iniziata l'Ozono terapia il 24 ottobre 2012. L'Ozono terapia è stata ripetuta per 4 differenti sedute (nell'arco di 2 settimane) fino al 8 Novembre 2012 quando scompare ogni sintomatologia con negativizzazione dell'urinocoltura. Il 28 dicembre 2012, per la ripresa della sintomatologia disurica, alla paziente veniva prescritto empiricamente un ciclo di antibioticoterapia con nitrofurantoin prima e con amoxicillina/clavulanico successivamente per la persistenza della sintomatologia. L'urinocoltura veniva ripetuta a gennaio 2013 e documentava una IVU da E.Coli (1.000.000 CFU/mL), resistente sia alle penicilline che alla nitrofurantoina. Si provvedeva pertanto a sospendere la terapia antibiotica e a riprendere un nuovo ciclo di Ozono terapia con un rapido miglioramento della sintomatologia. Il 5 febbraio 2013, l'urinocoltura non mostrava segni d'infezione. Tuttavia, un'ulteriore urinocoltura effettuata il 25 Febbraio 2013 mostra nuovamente segni di IVU da E.Coli (1.000.000 CFU/ml, resistente alle penicilline, nitrofurantoina e chinolonici) il che ci

Tabella 1. Descrizione dei casi clinici. Qui di seguito sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei pazienti trattati con Ozonoterapia.

Paziente	Età	Comorbidità rilevanti
C.M	54	Pielonefrite cronica che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Trattamento emodialitico dal 1981 al 1986 quanto effettua il primo trapianto di rene. Successivo deterioramento della funzione renale. Emodialisi dal 1995 al 2002. Nel 2002 effettua un secondo trapianto. Diverticolo della vescica Reflusso vescicoureterale. Vescica neurologica neessitante cateterizzaione. Allergica a levofloxacina. Ripetuti episodi di IVU. Un episodio di ospedalizzazione per setticemia da E.Coli nel 1986. Artriopatia periferica.
M.R.	61	Pielonefrite cronica che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Trattamento emodialitico dal 1992 al 1996 quanto esegue trapianto di rene. Successivo deterioramento della funzione renale. Emodialisi dal 1995 al 2002. Nel 2002 effettua un secondo trapianto. Reflusso vescicoureterale. Vescica neurologica necessitante cateterizzaione. Diabete mellito insulino dipendente. Cardiopatia ischemica cronica. Artriopatia periferica.
U.A.	51	APKD che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Emodialisi dal 2000 al 2005 quanto esegue trapianto di rene e nefrectomia sinistra consensuale. Ripetuti episodi di IVU. Una ospedalizzazione per cistopielite nel 2011. Intolleranza a ciproflaxacina. Fibrillazione atriale.

induceva a proseguire con l'Ozono terapia fino al 7 marzo 2013. CF è rimasta asintomatica e senza evidenza di IVU fino al 27 aprile 2013 quando l'esame colturale delle urine mostrava una nuova IVU da E.Coli per cui veniva instaurata terapia antibiotica con nitrofurantoina sulla base dell'antibiogramma.

MR è una signora di 62 anni di razza caucasica con una storia clinica significativa per vescica neurologica, reflusso vescico-ureterale, trapianto di rene, diabete mellito insulino-dipendente, cardiopatia ischemica cronica, arteriopatia periferica. Il 28 febbraio 2013 si decideva di iniziare l'Ozono terapia dopo un tentativo infruttuoso di eradicare una IVU da E.Coli con amoxicillina/clavulanato. MR è stata sottoposta a 3 sedute di Ozono terapia con l'infusione di un volume progressivamente maggiore di fisiologica ozonata (da 150 a 250 cc). Durante l'Ozono terapia abbiamo mantenuto la terapia antibiotica. Le indagini colturali sull'urina non hanno mostrato segni di infezione nei 4 mesi successivi.

UA è una donna caucasica di 51 anni seguita da anni c/o la Nostra UOC per un'insufficienza renale cronica in corso di malattia policistica auto somica dominante (APKD). UA ha ricevuto un trapianto di rene nel 2005 e consensualmente è stata sottoposta a nefrectomia sinistra. La sua storia clinica è significativa per un episodio di ospedalizzazione nel 1986 per una setticemia da E.Coli. Nell'Ottobre 2011 la paziente veniva ricoverata per un episodio di cistopielite e trattata con piperacillina/tazobactam. Nel corso del ricovero, UA sviluppa una dolorosa vulvovaginite da *Candida albicans*. Per la sintomatologia urente e dolorosa, si decideva di trattare la paziente con Ozono terapia (lavaggio dei genitali esterni e vagina con 150 cc di soluzione fisiologica ozonata due volte al giorno). Dal secondo giorno di trattamento abbiamo assistito ad un significativo e progressivo miglioramento clinico con riduzione dei sintomi e segni associati al quadro di vulvovaginite. Al sesto giorno di terapia UA era asintomatica e non si rilevavano più secrezioni o anomalie all'ispezione dei genitali.

Durante tutto il ciclo di terapia non abbiamo rilevato alcun evento avverso e il trattamento con Ozono è stato ben tollerato in tutte le pazienti trattate.

Discussione

Questi 3 casi clinici suggeriscono che l'Ozono terapia potrebbe essere utilizzata in associazione alle terapie convenzionali per l'eradicazione delle infezioni delle basse vie urinarie (IVU). L'Ozono è un gas naturalmente presente nell'atmosfera che presenta spiccate proprietà antimicrobiche contro batteri, spore, funghi, virus e protozoi [1] [2] [2]. L'Ozono è un gas instabile che si dissolve facilmente in acqua [2] [3] (full text). Sia nella forma gassosa che disciolto in acqua, le proprietà antisettiche dell'Ozono consistono nelle proprietà ossidanti in grado di indurre processi di lipoperossidazione, danno genomico e morte cellulare [1] [3] [3] (full text). Tuttavia, è stato anche ipotizzato che le proprietà antimicrobiche possano derivare dalla stimolazione dell'immunità innata (reclutamento dei linfociti e dei macrofagi) o dall'interferenza con la bilancia delle citochine pro- e anti-infiammatorie indotte dallo stress ossidativo generato da questo gas [1] [2] [3] (full text). Indipendentemente dal meccanismo d'azione, studi in vitro suggeriscono che il potenziale battericida dell'Ozono si manifesta nel giro di minuti dall'esposizione al gas, il che suggerisce una rapida e sostanziale tossicità dell'Ozono [1] [2] [3] (full text). Si ritiene, tuttavia, che le dosi terapeutiche abitualmente usate non arrechino alcun danno all'uomo e possano nello stesso tempo preservare le potenzialità antisettiche del gas. [1] [2] [3] (full text)

Studi clinici e preclinici hanno dimostrato che l'uso dell'Ozono sia in forma di gas che disciolto in soluzioni acquose ha proprietà disinfettanti. Infatti, l'Ozono è utilizzato largamente dall'industria del cibo e delle acque. Tuttavia, l'utilizzo in medicina dell'Ozono come antisettico appare contraddittorio. Alcuni studi preclinici suggeriscono infatti che

questo gas possa ridurre l'attività fagocitica dei macrofagi ed incrementare l'infiammazione [9] (full text) [10] [11]. Al contrario, altri studi preclinici suggerirebbero che l'Ozono potrebbe inibire la traslocazione batterica in corso di pancreatite necrotizzante [12], ridurre la colonizzazione batterica in corso di osteomielite [13] e peritonite [14] (full text), favorire l'eradicazione d'infezioni da *Stafilococco aureus* metacillino resistente in mediastiniti post-chirurgiche [15], favorire il recupero funzionale renale e ridurre il danno tissutale renale in corso di pielonefriti [5]. Studi condotti nell'uomo hanno invece investigato con risultati non sempre soddisfacenti, l'impiego dell'Ozono terapia nel processo di cicatrizzazione di ferite traumatiche infette, ulcere ischemiche e piede diabetico, per ridurre la carica batterica periodontale in corso di periodontiti, carie dentarie ed in numerose infezioni cutanee e mucose (applicazione topica intra vaginale, uretrale, rettale e vescicale) [14] (full text) [15] [15]. Da notare che sono anche riportati in letteratura medica casi di utilizzo dell'Ozono terapia come adiuvante per l'eradicazione d'infezioni supportate da ceppi batterici multi-resistenti come *Stafilococco aureo* metacillino resistente e *Pseudomonas aeruginosa* [15] [16] [16].

Nella nostra esperienza preliminare, l'utilizzo di fisiologica ozonata per via topica intra vescicale o vaginale (nel terzo caso di *vulvovaginite da candida*) ha mostrato dei risultati incoraggianti. Tutti i pazienti trattati presentavano, infatti, un alto rischio di UTI e di UTI ricorrenti (i pazienti presentavano fattori quali la terapia immunosoppressiva, vescica neurologica necessitante autocateterismi, reflusso vescicoureterale, diverticolo della vescica, diabete). La storia clinica di questi pazienti era caratterizzata da plurimi episodi di UTI anche talvolta complicati e necessitanti ricovero ospedaliero o ripetuti cicli di antibiotico-terapia. In questa specifica popolazione, l'impiego dell'Ozono terapia sembra facilitare la remissione della sintomatologia e l'eradicazione delle IVU. Tuttavia, la mancanza di un approccio sistematico protocollato dell'uso di Ozono e degli antibiotici in corso di IVU, la mancanza di un approccio sistemico della sorveglianza delle IVU, rende complicata l'interpretazione di questi risultati preliminari.

L'uso dell'Ozono in medicina è anche limitato dalla potenziale tossicità di questo gas se usato impropriamente e ad elevate concentrazioni a livello dei polmoni e del sistema cardiovascolare, endocrino, riproduttivo e nervoso centrale [2] [3] (full text). Tuttavia, l'applicazione topica di questo gas potrebbe ridurre il rischio di questi effetti collaterali. Nella nostra esperienza non abbiamo rinvenuto alcun evento avverso e l'Ozono terapia appariva sempre ben tollerata.

Quello che rimane da risolvere è la terapia di mantenimento con Ozono perché come dimostra anche la nostra esperienza il problema non è il risultato immediato che a volte si riesce a raggiungere anche con una certa facilità ma come mantenere il risultato acquisito nel tempo.

Alla luce dell'emergenza e diffusione di ceppi batterici multiresistenti ai comuni antibiotici e della necessità di trovare strategie antisettiche alternative o complementari alle terapie convenzionali, noi riteniamo che studi futuri debbano investigare e determinare l'efficacia e la sicurezza e la modalità più idonea di mantenere nel tempo il risultato ottenuto essendo questa procedura un trattamento economico e facilmente reperibile nella terapia delle infezioni delle vie urinarie.

Bibliografia

- [1] Bia?oszewski D, Bocian E, Bukowska B et al. Antimicrobial activity of ozonated water. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2010 Sep;16(9):MT71-5
- [2] Bocci V, Paulesu L Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica* 1990 Nov-Dec;75(6):510-5
- [3] Bocci V, Zanardi I, Travagli V et al. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical gas research* 2011 Apr 28;1(1):6 (full text)
- [4] Oztosun M, Akgul EO, Cakir E et al. The effects of medical ozone therapy on renal ischemia/reperfusion injury. *Renal failure* 2012;34(7):921-5
- [5] Caliskan B, Guven A, Ozler M et al. Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2011 Oct;71(6):473-80
- [6] Gul H, Uysal B, Cakir E et al. The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. *Environmental toxicology and pharmacology* 2012 Jul;34(1):81-6
- [7] Ucar F, Taslipinar MY, Alp BF et al. The effects of N-acetylcysteine and ozone therapy on oxidative stress and inflammation in acetaminophen-induced nephrotoxicity model. *Renal failure* 2013;35(5):640-7
- [8] Linhares I, Raposo T, Rodrigues A et al. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC infectious diseases* 2013 Jan 18;13:19 (full text)
- [9] Mikerov AN, Umstead TM, Gan X et al. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2008 Jan;294(1):L121-30 (full text)
- [10] Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L et al. Pre-treatment with ozonized oxygen (O3) aggravates inflammation in septic rats. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2004 Aug;53 Suppl 2:S122-5
- [11] Umstead TM, Phelps DS, Wang G et al. In vitro exposure of proteins to ozone. *Toxicology mechanisms and methods* 2002;12(1):1-16
- [12] Uysal B, Yasar M, Ersoz N et al. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2010 Jan;39(1):9-15
- [13] Oguz E, Ekinci S, Eroglu M et al. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model. *The Journal of surgical research* 2011 Nov;171(1):e61-8
- [14] Silva RA, Garotti JE, Silva RS et al. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 2009 Mar-Apr;24(2):124-7 (full text)
- [15] Gulmen S, Kurtoglu T, Meteoglu I et al. Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. *The Journal of surgical research* 2013 Jun 19;
- [16] Trafny EA Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *International journal of antimicrobial agents* 1998 Aug;10(3):223-8

NEFROLOGO IN CORSA

Ozone Therapy: A Potential Adjunct Approach to Lower Urinary Tract Infection? A Case Series Report



Giuseppe Bonforte¹, Antonio Bellasi^{1,3}, Hilary Riva^{1,2}, Mariangela Ferradini¹, Emilia Arrighi¹, Gianna Groppi¹, Claudio Minoretto¹, Marianno Franzini⁴

(1) UOC di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Sant'Anna-Como, Como, Italy

(2) Clinica Nefrologica e Dipartimento di Medicina Clinica e Prevenzione, Università degli Studi Milano-Bicocca

(3) Department of Health Sciences, University of Milan, Italy

(4) Docente di Ossigeno Ozono Terapia presso l'Università degli Studi di Pavia PRESIDENTE Società Italiana di Ossigeno Ozono Terapia

Abstract

Multi-resistant drug bacteria are an emerging health care concern around the world. A decreased resistance to infection as seen in Chronic Kidney Disease (CKD) and kidney transplanted patients as well as some metabolic abnormalities such as hyperglycemia and glycosuria or clinical conditions such as the neurogenic bladder may indeed portend a great risk of recurrent urinary tract infections (UTI). The common and indiscriminate use of antibiotics often provides the patients with only a transient or partial amelioration of the urinary tract discomforts and increases the risk of multi-resistant drug bacteria selection. Thus a great effort is made in order to develop new antibacterial approaches especially in the setting of multi- antibiotic resistant pathogens. We herein report on some promising yet preliminary results of the use of ozone therapy in UTI.

Key words: infection, multiresistant bacteria, Ozone, UTI

Introduction

The antimicrobial properties of ozonated water were discovered in the end of the nineteenth century. In 1873, Fox documented that both aerobic as well as anaerobic microorganism could be killed when exposed to Ozone [1]. Subsequent works have also suggested that Ozone is an effective vasodilator and has antalgic properties [2], [3] (full text). In the clinical setting, Ozone therapy (either as gas or dissolved in water) has been employed as adjunct therapy for many diseases especially those currently poorly controlled by conventional treatments such as peripheral arterial disease and ischemic ulcer healing, ischemic heart disease, stroke, osteonecrosis, caries, lumbar disc herniation, chronic colitis, fistulae and other skin diseases [2], [3] (full text). In the setting of infectious disease, it has been proposed that Ozone can be used in combination with antibiotics to enhance pathogens clearance [1], [2]. Finally animal studies have also shown some promising preliminary data on a beneficial effect of oxone on ischemic/reperfusion renal injuries [4], renal inflammation and fibrosis [5] or prevention of hepatic and renal toxicities from acetaminophen [6], [7]. However, in spite of an intriguing rationale, the use of Ozone in medicine remains controversial. Indeed the improper use of this gas and the adverse effect reported over the

last decades led the *Food and Drug Administration (FDA)* to prohibit the use of Ozone in medicine in the USA and *European Medicine Agency (EMA)* to issue two different warnings about the use of Ozone in Europe [3] (full text).

More than a century after the Ozone toxicity was discovered, the basic mechanisms of action, the dose dependent effects and the therapeutic window of this drug have been established and ozone therapy is commonly available in Europe and can be safely administered [2], [3] (full text). Nonetheless, continuous efforts are needed to establish the real efficacy and validity of this versatile drug and to define its potential in medicine.

Urinary tract infection (UTI) is one of the most frequent infectious disease in developed countries with high morbidity, resources burden and often associated with antimicrobials misuse and multidrug resistance bacteria strain development [8] (full text). In a setting of the emerging and expanding multi-antibiotic resistant bacteria, an alternative or adjunct approach to recurrent lower UTI may be particularly important especially in specific subgroups of patients such as transplanted patients, diabetic patients with neurogenic urinary bladder with the need of intermittent catheterization for voiding. We herein report on a case series of three patients with lower UTIs treated with Ozonated saline.

Methods and materials

All procedures were done at the Nephrology and Dialysis Unit at Sant'Anna Hospital, Como. Ozone is generated by an Medical 95 Computerised Photometric System produced by Multisigen Gorle (BG), Italy.

The ozone treatment scheme and procedure for UTI is summarized in figura 1. After urinary bladder catheterization and urinary bladder emptying, total of 100 to 150 centiliters (cc) of ozonated normal saline are prepared (250 cc of normal saline with 150 ml Ozone mg, ozone concentration: 50 µg/ml). The ozonated saline is then injected via the catheter into the urinary bladder and let dwell until the next void. The procedure is repeated at day 1, 3 and every week thereafter until patient's symptoms disappearance or urinary tests normalization. The volume of ozonated saline injected is progressively increased to 250 cc of normal saline or until patient's discomfort.

The Ozone protocol for the treatment of vulvovaginitis (figura 1) consists of external flushing of the genitalia with 150 ml of ozonated saline (250 cc of normal saline with 150 ml Ozone mg, ozone concentration: 50 µg/ml) twice a day for 7 days or until vaginal discharge discontinuation.

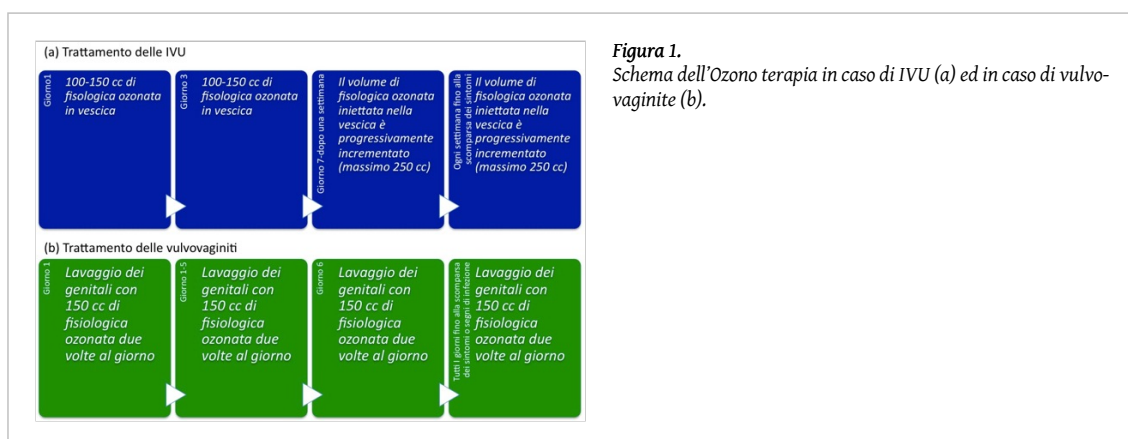


Figura 1. Schema dell'Ozono terapia in caso di IVU (a) ed in caso di vulvovaginite (b).

Results

We herein summarize three cases of lower urinary tract infections that were treated with ozone at our Unit. The most relevant patients' characteristics are summarized in table 1.

CM is a 59 years old Caucasian lady with repeated UTI, neurogenic urinary bladder and a urinary bladder diverticulum. She is on chronic immunosuppressant therapies as part of her anti-rejection therapy since a successful kidney transplant in 2002. Her recent past medical history is remarkable for recurrent urinary E.Coli infections treated with various antibiotic regimens. In October 2012, she complained of urinary discomforts and tested positive for *Morganella morganii*, (1.000.000 UFC/ml) resistant to penicillin and aminoglycoside antibiotics. She was started on ozone therapy on October 24th 2012. The ozone was repeated for four different sessions (2 weeks) until November 8th 2012 when the patient's symptoms subsided and the urinary microbiological tests did not show evidence of UTI. On December 28th 2012, CF reported on the recurrence of urinary tract discomforts and empirically treated with a course of nitrofurantoin and subsequently with a amoxicillin, due to the persistence of dysuria. In January 2013, CF was tested positive for urinary E.Coli infection (1.000.000 CFU/mL), resistant to penicillin and nitrofurantoin. Antibiotics were discontinued and CF was started on a new course of ozone therapy with a rapid clinical improvement. On February 5th, 2013, CF's urinary tests did not show evidence of UTI. However, 3 weeks after on February 25th 2013, CF's urinary tests revealed a new E.Coli infection (1.000.000 CFU/ml, resistant to penicillin and nitrofurantoin, quinolone antibiotics) that prompted us to prolong the ozone therapy until March 7th 2013. CF remained symptoms free until April 27th 2013, when CF was tested positive for a new E.Coli UTI and was treated with nitrofurantoin based on the laboratory antibiogram.

MR is a 62 years old Caucasian lady with a past medical record significant for neurogenic urinary bladder, vesicoureteral reflux, kidney transplantation and insulin dependent diabetes mellitus, ischemic heart disease and peripheral artery disease. On February 28th 2013 she was started on Ozone therapy and nitrofurantoin after an unsuccessful course of amox-

Tabella 1. Descrizione dei casi clinici. Qui di seguito sono riportate le principali caratteristiche cliniche dei pazienti trattati con Ozonoterapia.

Paziente	Età	Comorbidità rilevanti
C.M	54	Pielonefrite cronica che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Trattamento emodialitico dal 1981 al 1986 quanto effettua il primo trapianto di rene. Successivo deterioramento della funzione renale. Emodialisi dal 1995 al 2002. Nel 2002 effettua un secondo trapianto. Diverticolo della vescica Reflusso vescicoureterale. Vescica neurologica neessitante cateterizzaione. Allergica a levofloxacina. Ripetuti episodi di IVU. Un episodio di ospedalizzazione per setticemia da E.Coli nel 1986. Artriopatia periferica.
M.R.	61	Pielonefrite cronica che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Trattamento emodialitico dal 1992 al 1996 quanto esegue trapianto di rene. Successivo deterioramento della funzione renale. Emodialisi dal 1995 al 2002. Nel 2002 effettua un secondo trapianto. Reflusso vescicoureterale. Vescica neurologica necessitante cateterizzaione. Diabete mellito insulino dipendente. Cardiopatia ischemica cronica. Artriopatia periferica.
U.A.	51	APKD che ha condizionato una progressiva perdita della funzione renale. Emodialisi dal 2000 al 2005 quanto esegue trapianto di rene e nefrectomia sinistra consensuale. Ripetuti episodi di IVU. Una ospedalizzazione per cistopielite nel 2011. Intolleranza a ciproflucaxina. Fibrillazione atriale.

icillin/clavulanate for an E.Coli UTI. She underwent 3 urinary bladder injection of 150 to 250 cc of ozonated saline over a week time. Though on antibiotics, she recovered from this UTI episode and the urinary tests did not show any evidence of infection for the following 4 months.

UA is a 51 years old Caucasian lady receiving care at our Unit due to renal failure secondary to APKD. She was transplanted in 2005 and consensually she underwent a left kidney nephrectomy. Her past medical history is relevant for repeated UTIs and one hospitalization for E. Coli septicemia in 1986. In October 2011 she was admitted to the Nephrology ward due to cystopyelitis. She was started on piperacillin/tazobactam with progressive improvement of her clinical condition. While on antibiotics, she developed a *vulvovaginal candidiasis*. Due to the severe itching and burning symptoms she was treated with ozonated saline flushing of the external genitalia twice a day. On the second day of the treatment she reported on a significant improvement of the symptoms. On day 6 no vaginal discharge could be noted and the mucosa of the external genitalia looked normal.

Notably we did not observe any adverse effect during the administration of Ozonated saline during treatments in these three patients.

Discussion

This report suggests the potential use of ozone as a complementary therapeutic approach to lower urinary tract infections (UTIs). Ozone is a known antioxidant gas naturally present in the atmosphere with powerful antimicrobial properties against bacteria, spore, fungi, virus and protozoa [1], [2]. Ozone is an unstable gas that easily dissolves in water [2], [3] (full text). Either in its gaseous or aqueous form, Ozone antiseptic potential relies upon the oxidizing properties that induce lipid peroxidation, DNA damage and cell death [1], [2], [3] (full text). However, it has also been postulated that the antimicrobial properties may be mediated by the stimulation of innate immune system (i.e. increase number of lymphocytes and macrophages) or disturbance of the pro- anti-inflammatory cytokines balance triggered by the oxidative stress induced by this gas [1], [2], [3] (full text). Independently of the mechanisms of action, *in vitro* evidence suggests that Ozone bactericide potential develops within minutes from exposure, suggesting a rapid and substantial toxicity [1], [2], [3] (full text). Nevertheless, it has been established that the commonly adopted dosages in medicine are safe and may preserve some antibacterial potential [1], [2], [3] (full text).

Previous clinical and preclinical works have shown that the use of ozonated water or gas is effective as disinfecting agent. Indeed, Ozone is extensively used as disinfectant in food and water industries. However, the use of Ozone in infectious disease medicine as antiseptic agent is still controversial. Some lines of evidence suggest that this gas may impair the phagocytic activity of macrophages and enhance inflammation [9] (full text), [10], [11]. To the contrary, other experimental studies document that ozone can inhibit bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis [12], decrease bacterial colonization in osteomyelitis [13] and peritonitis [14] (full text), enhance methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* elimination in post-surgical mediastinitis [15], accelerate renal function recovery and reduce tissue injury in pyelonephritis [5]. In the clinical setting, Ozone has been used with benefits to facilitate wound healing of infected traumatic injuries, infected diabetic ulcers, to reduce periodontal bacterial colonization, plaque bacteria, to treat dental caries, and in numerous cutaneous and mucosal infections (topic application into vaginal, urethral, rectal and vesical cavities) [14] (full text), [15]. Notably the microbicidal effect of ozone is documented on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* and other multi-drug resistant bacteria strains [15], [16].

In our preliminary experience, Ozonated water topic application into urinary bladder and vaginal (the third case of *vulvovaginal candidiasis*) and has shown promising results. All treated patients presented a high-risk profile for UTI and UTI recurrences (such as immunosuppressant therapy, neurogenic bladder requiring intermittent catheterization, vesicoureteral reflux, urinary bladder diverticulum, diabetes). The past medical histories were remarkable for recurrent UTI episodes some of which requiring hospitalization and/or repeated antibiotic regimens. In this setting, the use of ozonated water allowed a substantial bacterial clearance and prolonged urinary discomforts relief. However, the lack of a protocol for antibiotics prescription and UTI surveillance severely complicate the interpretation of current results.

The use of ozone in medicine is also limited by its potential toxicities to the lungs, cardiovascular, endocrine, reproductive and central nervous systems, induced by the formation free reactive oxygen radicals(3). However, the topic application of Ozonated water may attenuate the risk of adverse effect. In our limited experience, we could not detect any adverse effect and Ozone application was well tolerated.

Another unanswered question is how to manage Ozone maintenance therapy. As per our experience, patients tend to improve shortly after Ozone therapy however it is to establish whether these results can be preserved.

In light of the emerging multidrug resistant bacteria strains and the need for alternative or adjunct antiseptic strategies, we believe that future studies should investigate and establish the best way to administer Ozone, the safety, efficacy and long term outcomes of this cheap and commonly available drug for UTI management.

Bibliografia

- [1] Białoszewski D, Bocian E, Bukowska B et al. Antimicrobial activity of ozonated water. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2010 Sep;16(9):MT71-5
- [2] Bocci V, Paulesu L Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica* 1990 Nov-Dec;75(6):510-5
- [3] Bocci V, Zanardi I, Travagli V et al. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical gas research* 2011 Apr 28;1(1):6 (full text)
- [4] Oztosun M, Akgul EO, Cakir E et al. The effects of medical ozone therapy on renal ischemia/reperfusion injury. *Renal failure* 2012;34(7):921-5
- [5] Caliskan B, Guven A, Ozler M et al. Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2011 Oct;71(6):473-80
- [6] Gul H, Uysal B, Cakir E et al. The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. *Environmental toxicology and pharmacology* 2012 Jul;34(1):81-6
- [7] Ucar F, Taslipinar MY, Alp BF et al. The effects of N-acetylcysteine and ozone therapy on oxidative stress and inflammation in acetaminophen-induced nephrotoxicity model. *Renal failure* 2013;35(5):640-7
- [8] Linhares I, Raposo T, Rodrigues A et al. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC infectious diseases* 2013 Jan 18;13:19 (full text)
- [9] Mikerov AN, Umstead TM, Gan X et al. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2008 Jan;294(1):L121-30 (full text)
- [10] Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L et al. Pre-treatment with ozonized oxygen (O3) aggravates inflammation in septic rats. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2004 Aug;53 Suppl 2:S122-5
- [11] Umstead TM, Phelps DS, Wang G et al. In vitro exposure of proteins to ozone. *Toxicology mechanisms and methods* 2002;12(1):1-16
- [12] Uysal B, Yasar M, Ersoz N et al. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2010 Jan;39(1):9-15
- [13] Oguz E, Ekinci S, Eroglu M et al. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model. *The Journal of surgical research* 2011 Nov;171(1):e61-8
- [14] Silva RA, Garotti JE, Silva RS et al. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta cirurgica brasileira /*

Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia
2009 Mar-Apr;24(2):124-7 (full text)

[15] Gulmen S, Kurtoglu T, Meteoglu I et al. Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. *The Journal of surgical research* 2013 Jun 19;

[16] Trafny EA Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *International journal of antimicrobial agents* 1998 Aug;10(3):223-8