



UNIVERSITA' DI PISA
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia
Direttore: Chiar.mo Prof. Mario Campa

***“Diagnosi microbiologica di infezione sistemica:
metodi a confronto”***

CANDIDATO

Dott.ssa Paola Morici

RELATORE

Chiar.mo Prof. Mario Campa

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Infezioni sistemiche	1
1.2 Definizioni: sepsi e SIRS	5
1.2.1 Sistema PIRO	9
1.3 Eziologia	12
1.4 Patogenesi	13
1.5 Diagnosi di sepsi	21
1.5.1 Biomarker	23
1.5.1.1 Citochine	25
1.5.1.2 Proteina C-Reattiva (CRP)	27
1.5.1.3 Procalcitonina (PCT)	29
1.5.2 Emocoltura	31
1.5.3 Metodi molecolari.....	37
1.5.4 Spettrometria di massa MALDI-TOF.....	45
2. SCOPO DELLA TESI	51
3. MATERIALI E METODI	53
3.1 <u>Metodo tradizionale</u>	53
3.1.1 Sistema a monitoraggio continuo per emocolture	53
3.1.2 Metodo colturale	54
3.1.3 Sistema di identificazione e antibiogramma	55
3.1.4 Metodo rapido	57
3.2 <u>Metodi molecolari</u>	60
3.2.1 LightCycler® SeptiFast M ^{GRADE}	60
3.2.2 Magicplex TM Sepsis Real-Time PCR	64
3.2.3 Ibridazione fluorescente <i>in situ</i> PNA FISH	70
4. RISULTATI	72
4.1 <u>Metodo tradizionale</u>	72
4.1.1 Metodo rapido (sistema Vitek 2): confronto con il metodo colturale tradizionale.....	75
4.1.2 Metodo rapido (sistema Phoenix): confronto con il metodo colturale tradizionale.....	80
4.2 <u>Metodi molecolari</u>	84

4.2.1 LightCycler® SeptiFast M ^{GRADE}	84
4.2.2 Magicplex TM Sepsis Real-Time PCR	88
4.2.3 Ibridazione fluorescente <i>in situ</i> PNA FISH	92
5. DISCUSSIONE	94
6. CONCLUSIONI	99
7. BIBLIOGRAFIA	101

1. INTRODUZIONE

1.1 Infezioni sistemiche

Le infezioni sistemiche possono essere sostenute sia da microrganismi patogeni, che attraversano una fase batteriémica in almeno un dato momento della loro evoluzione, sia da microrganismi della normale flora microbica residente nei vari distretti, che in seguito a molteplici eventi riescono a guadagnare accesso al circolo sanguigno (Tab. 1.1).

Tabella 1.1 Modalità con le quali i microrganismi raggiungono l'apparato cardiocircolatorio.

- Propagazione da processi infettivi
- Ferite cutanee: accidentali, chirurgiche
- Lesioni mucose: accidentali, chirurgiche, per pratiche di igiene orale
- Iniezioni: farmaci, droghe, tatuaggi
- Trasfusioni
- Cateterismi intravascolari
- Morsicature: di animali, uomo incluso

La presenza di batteri nel sangue si denota con il termine di batteriémia. Secondo un criterio temporale, le batteriémie possono essere classificate in batteriémie transitorie, intermittenti e continue (Seifert H., 2009).

Una batteriemia transitoria a bassa carica microbica decorre tipicamente in forma asintomatica e ha breve durata (pochi minuti o poche ore). E' un evento frequente e si verifica come conseguenza di un trauma della cute o di superfici mucose normalmente rivestite da una flora endogena. Essa può inoltre essere causata da una manipolazione chirurgica dei tessuti orali infetti, da caterizzazione del tratto urinario inferiore infetto, dall'incisione e dal drenaggio di un ascesso, dalla colonizzazione di presidi invasivi, in particolare cateteri venosi centrali e intracardiaci, cateteri uretrali, e presidi per stomie. Può fare seguito a una procedura odontoiatrica nei pazienti a rischio e specialmente nei pazienti con patologia cardiaca valvolare, con protesi valvolari o con altre protesi intravascolari (Birocchi F., Testa M. *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2010). La batteriemia transitoria può insorgere spontaneamente come conseguenza di microtraumi provocati dalla masticazione o dal lavaggio dei denti (Bhanji S. *et al.*, 2002). L'incidenza della batteriemia varia dal 5% al 75% per i soggetti con periodontite, dal 5% al 20% per i soggetti con gengivite (Daly C. *et al.*, 1997; Forner L. *et al.*, 2006).

La batteriemia intermittente, invece, si verifica in seguito al rilascio periodico, da un focolaio infettivo, di batteri nel sangue a partire da ascessi extravascolari, cellulite disseminante o infezioni da cavità corporee, quali l'empiema, la peritonite o l'artrite settica (Mancini *et al.*, 2010).

La batteriemia sostenuta da germi Gram negativi ha un andamento a carattere tipicamente intermittente. Sebbene essa non debba necessariamente esitare in setticemia, può essere estremamente grave in soggetti immunocompromessi, in soggetti sottoposti a chemioterapia, affetti da patologie croniche e in situazioni caratterizzate da quadri di malnutrizione. Il sito primitivo di infezione è di solito rappresentato dai polmoni, dal tratto

genitourinario o gastrointestinale, dai tessuti molli, inclusa la cute, nei pazienti con ulcere da decubito.

La batteriemia continua, o persistente, comunemente insorge quando l'infezione è di natura intravascolare, ad esempio in caso di endocardite infettiva, di tromboflebiti suppurative e di aneurismi. Inoltre, essa si verifica durante le prime fasi di infezioni sistemiche batteriche, come la brucellosi e la febbre tifoide.

In tutti questi casi, la carica microbica può essere molto bassa, rendendo difficile la diagnosi microbiologica (Safdar A. *et al.*, 2006). Negli adulti, la maggior parte degli episodi di batteriemia clinicamente significativa è caratterizzata da una bassa carica batterica, invece nei bambini generalmente la carica batterica è più alta. L'entità della batteriemia è correlata in modo direttamente proporzionale con la gravità della malattia nei bambini e con il tasso di mortalità negli adulti, ma altri fattori giocano un ruolo più importante nella determinazione dell'*outcome* del paziente (Yagupsky P. *et al.*, 1990).

La batteriemia rappresenta un fattore di rischio rilevante per la presenza o la successiva comparsa di infezioni batteriche gravi. Infatti, circa il 10% dei bambini con batteriemia sviluppa sepsi, meningite, polmonite, osteomielite, artrite settica (Harper M. B. *et al.*, 1995).

Ogni processo infettivo genera una risposta infiammatoria volta a controllarlo. Tale risposta può rimanere circoscritta al sito di insorgenza dell'infezione, oppure evolvere verso un coinvolgimento sistemico dell'organismo. Quando ciò si verifica, si ha lo sviluppo di una sindrome clinica denominata "sepsi".

Il termine sepsi deriva dal greco "σήψις", che significa "putrido": in passato si pensava che la putrefazione di una ferita fosse causata dal contatto

con l'aria e che la morte sopraggiungesse quando il processo infiammatorio raggiungeva il sangue. Nel XIX secolo, l'ostetrico austriaco Semmelweis e il chirurgo inglese Lister introdussero il concetto di infezione come causa di sepsi.

La sepsi presuppone la presenza di un focolaio primitivo localizzato in qualsiasi parte dell'organismo (focolaio sepsigeno), da cui i microrganismi, in attiva fase di replicazione, invadono il torrente circolatorio in gittate successive. La sepsi è quindi sempre associata alla batteriemia; tuttavia, l'invasione microbica della circolazione ematica non è essenziale per lo sviluppo della sepsi, poiché la risposta infiammatoria può essere scatenata anche dalla diffusione di tossine microbiche o di molecole citochine (Mancini *et al.*, 2010).

In tutto il mondo, le infezioni sistemiche sono associate con tassi di morbilità e mortalità che vanno dal 20% al 70% (Barnato A. E. *et al.*, 2008). Negli Stati Uniti, ogni anno circa 750.000 pazienti sviluppano infezioni sistemiche batteriche, che causano 215.000 decessi (Martin G. S. *et al.*, 2003). In Europa, si stima che 135.000 pazienti muoiano ogni anno per le complicazioni associate a sepsi, con un'incidenza di 3 casi per 1000 individui (Lever A. *et al.*, 2007). Da uno studio multicentrico, è emerso che la sepsi è la terza causa di morte più comune in Germania, con una prevalenza complessiva del 23,4 % (Engel C. *et al.*, 2007).

La sepsi costituisce uno dei cimenti più ardui, sia per i medici sia per i ricercatori, che da anni studiano nuovi e sempre più efficaci metodi diagnostici e terapie per affrontare al meglio questa sindrome ad esito spesso fatale.

1.2 Definizioni: sepsi e SIRS

Il termine “*sepsi*” è stato utilizzato, per circa un secolo, per definire una risposta infiammatoria sistemica dell’ospite ad un’infezione. Originariamente, si riteneva che la sepsi fosse associata alla presenza di batteri nel torrente circolatorio (batteriemia), e i termini “sepsi” e “setticemia” erano spesso intercambiabili dal punto di vista clinico (Levy M. M. *et al.*, 2003).

La mancanza di una terminologia e di una classificazione, definite ed ampiamente condivise, rendeva difficoltoso lo studio della sepsi, limitando la selezione di popolazioni di studio omogenee e impedendo una corretta valutazione dei trial clinici, con ripercussioni negative sulla gestione dei pazienti affetti da tale patologia.

Nel 1989, Bone e collaboratori stabilirono una semplice definizione per la sindrome settica, basata su specifici sintomi clinici, e che includeva una sorgente di infezione accertata (Bone R.C. *et al.*, 1989). Tuttavia, la sintomatologia clinica è presente frequentemente anche nei pazienti affetti da pancreatite, o colpiti da un trauma. Questa discrepanza fu tenuta in considerazione dalla Consensus Conference del 1991, nell’ambito della quale i membri dell’American College of Chest Physicians (ACCP) e la Society of Critical Care Medicine (SCCM) coniarono il termine “*Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica*” (SIRS), che non presuppone la presenza di infezione. Infatti, l’acronimo SIRS fa riferimento ad una serie complessa di segni che conseguono ad una attivazione sistemica della risposta immunitaria innata, indipendentemente dalla causa (Fig.1.2).

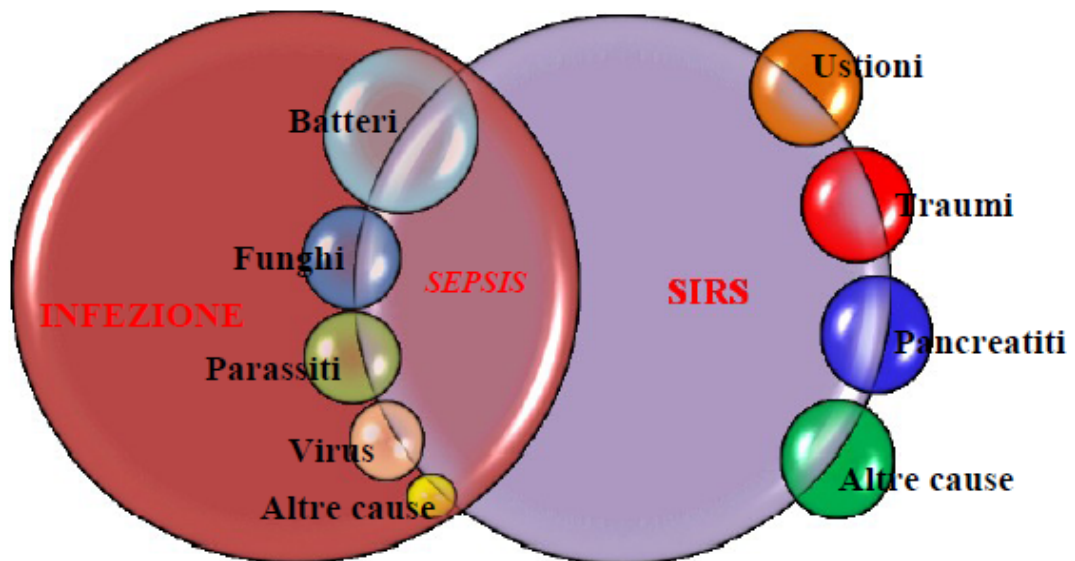


Fig. 1.2 Relazione tra infezione, sepsi e SIRS (Bone *et al.*, 1992. Modificato)

Nell'ambito della conferenza sopracitata, vennero quindi definiti dei criteri clinici classificativi della sindrome di risposta infiammatoria sistemica (Bone *et al.*, 1992):

- temperatura corporea superiore a 38°C o inferiore a 36°C
- frequenza cardiaca superiore a 90 battiti per minuto
- tachipnea (più di 20 atti respiratori per minuto) o ipoventilazione con una PaCO₂ inferiore a 32 mmHg
- alterazione della conta leucocitaria (meno di 4000 cell/mm o più di 12000 cell/mm), oppure la presenza di più del 10% di neutrofilari immaturi.

Inoltre, furono introdotti i termini di “sepsi grave” e “shock settico” per differenziare i diversi stadi della malattia (Tab. 1.2).

Tab. 1.2 Definizioni standard di SIRS, sepsi e MODS (Bone et al.,1992).

Infezione:

Processo patologico provocato dall'invasione di un tessuto “sterile”, un fluido, una cavità corporea da parte di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni.

Batteriemia:

Presenza di batteri viabili nel torrente sanguigno.

Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS):

Manifestazione clinica dell'attivazione sistemica della risposta immunitaria innata, indipendentemente dalla causa.

Sepsi:

Risposta infiammatoria sistemica ad una infezione causata da batteri, virus, protozoi o miceti.

Sepsi grave:

Sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione. Le manifestazioni cliniche includono acidosi lattica, oliguria ed alterazione dello stato mentale.

Shock settico:

Sepsi in cui è presente ipotensione refrattaria alla rianimazione mediante fluidoterapia.

Sindrome da Disfunzione Organica Multipla (MODS):

Alterazione delle funzioni di diversi organi tali da non poter mantenere l'omeostasi senza intervento.

La progressione della sepsi può portare alla compromissione funzionale di diversi organi (danno polmonare acuto, insufficienza renale acuta, etc.), fino a sfociare nella cosiddetta *sindrome di disfunzione multiorgano* (MODS) (Bone et al., 1992).

Tuttavia, i criteri clinici classificativi della sepsi, stabiliti nel 1991, evidenziarono scarsa sensibilità e specificità. Nel 2001, 29 esperti europei e nordamericani si riunirono a Washington nell'*International Sepsis Definitions*

Conference, con lo scopo principale di rivedere le definizioni correnti di sepsi e delle condizioni correlate, di aumentare l'accuratezza, la rilevabilità e l'utilità clinica della diagnosi di sepsi (Levy MM. *et al.*, 2001) (Tab. 1.2.1).

Tab. 1.2.1 Criteri per la diagnosi di sepsi (Levy *et al.*, 2001)

Variabili Generali

Febbre (temperatura >38,3°C) o Ipotermia (temperatura <36°C)
 Frequenza cardiaca >90 bpm o >2SD rispetto al valore normale per l'età
 Tachipnea > 30apm
 Stato mentale alterato
 Edema significativo o bilancio fluido positivo (>20ml/kg in 24 ore)
 Iperglicemia (glicemia >120 mg/dl in assenza di diabete mellito)

Variabili Infiammatorie

Leucitosi (WBC >12.000/μl), leucopenia (WBC <4.000/μl) o WBC normale ma con più del 10% di forme immature
 Proteina C reattiva plasmatica >2SD sopra il valore normale
 Procalcitonina plasmatica >2SD sopra il valore normale

Variabili Emodinamiche

Ipotensione arteriosa (P. Sistolica <90 mmHg, MAP <70 mmHg o calo della P. Sistolica maggiore di 40 mmHg negli adulti o di 2SD inferiore al valore normale per l'età
 Saturazione mista venosa d'ossigeno >70%
 Indice cardiaco >3,5 l/min/M

Variabili legate a disfunzione d'organo

Ipossiemia arteriosa (PaO₂/FiO₂<300)
 Oliguria acuta (output urinario <0,5 ml/kg/h)
 Incremento della Creatinina >0,5mg/dl
 Alterazione del profilo coagulativo (INR >1,5 o aPTT >60 sec)
 Ileo paralitico
 Trombocitopenia (Conta piastrinica <100.000/μl)
 Iperbilirubinemia (>4 mg/dl)

Variabili legate alla perfusione tissutale

Iperlattatemia (>1mmol/L)
 Diminuzione del tempo di riempimento capillare

Nell'ambito della stessa conferenza, venne proposto un nuovo sistema di valutazione della sindrome settica, che consente di suddividere i pazienti in base alla loro predisposizione a sviluppare sepsi e alla loro potenziale risposta alla terapia, permettendo la stadiazione clinica (Levy *et al.*, 2003).

1.2.1 Sistema PIRO

Il nuovo schema di classificazione per la sepsi, denominato sistema **PIRO** (*Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction*) stratifica i pazienti in base alle loro condizioni predisponenti per sviluppare la malattia (P); alla natura ed estensione dell'insulto (I); alla natura e alla magnitudo della risposta dell'ospite (R), e al grado di disfunzione d'organo concomitante (O) (Levy *et al.* 2003).

I fattori predisponenti hanno un impatto importante sull'esito della sindrome settica, in quanto influiscono sul processo patologico e impongono di modificare l'approccio terapeutico. I fattori genetici giocano un ruolo molto importante nella determinazione del rischio di morte prematura dovuta a sepsi, più di altre patologie, come il cancro o le patologie cardiovascolari (Levy *et al.*, 2003; Villar J. *et al.*, 2004). Un recente studio ha mostrato una predisposizione su base genetica a sviluppare infezioni gravi e shock settico negli individui (Opal, 2005).

Tra i fattori genetici associati ad un maggior rischio di sviluppare infezioni sono compresi i difetti nella risposta immunitaria innata, come ad esempio alterazioni nel sistema del complemento, difetti dei neutrofilo ed alterazioni nei meccanismi coagulativi e fibrinolitici (Levy *et al.*, 2003; Opal, 2005).

L'insulto, nel caso della sepsi, è determinato da un'infezione. Il sito, il tipo e l'estensione dell'infezione hanno un impatto significativo sulla prognosi della suddetta sindrome. Ad esempio, una polmonite o una peritonite comportano un maggior rischio di mortalità di un'infezione del tratto genito-

urinario. Un'infezione provocata da batteri Gram negativi avrà ripercussioni più gravi sulla risposta dell'ospite di un'infezione da Gram positivi (Opal e Cohen, 1999; Levy *et al.*, 2003). La prognosi della sepsi viene influenzata dal sito anatomico dell'infezione primaria e dalla natura e virulenza intrinseca dell'agente eziologico.

La "R" di PIRO denota la risposta dell'ospite. Se la risposta si scatena in modo adeguato, ha un ruolo protettivo, ma può diventare deleteria se si manifesta in maniera eccessiva o insufficiente (Marshall *et al.*, 2003).

Molti fattori possono incidere sulla risposta immunitaria innata e acquisita dell'ospite ad un'infezione, come l'età del paziente, lo stato nutrizionale, il sesso, il patrimonio genetico, i processi patologici sottostanti (Opal, 2005). La caratterizzazione della risposta da un punto di vista qualitativo e quantitativo rappresenta un ottimo strumento diagnostico e prognostico nella gestione clinica dei pazienti critici. L'utilizzo di marcatori biologici fornisce un importante contributo in questo contesto (Levy *et al.*, 2003).

Oggi giorno, diverse molecole vengono utilizzate come biomarker nella pratica clinica. Tra queste vi sono le citochine, le proteine di fase acuta, gli ormoni dello stress, altri fattori endocrini e molecole intracellulari. Le molecole più utilizzate sono la proteina C reattiva (CRP), l'interleuchina 6 (IL-6) e, più di recente, la procalcitonina (PCT) (Levy *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2003). Una migliore comprensione dello stato della risposta dell'ospite ad una infezione sistemica faciliterebbe enormemente l'uso più appropriato delle terapie nei pazienti settici (Opal, 2005). Esiste una chiara sovrapposizione tra i quattro componenti del PIRO, e in taluni pazienti, uno degli elementi può predominare sugli altri, determinando in questo modo l'*outcome* (Opal, 2005).

La presenza di disfunzione d'organo in corso di sepsi è determinante per la prognosi (Opal, 2005; Levy *et al.*, 2003), anche se è spesso difficile determinare se la disfunzione d'organo sia dovuta ad un processo patologico sottostante o al meccanismo settico in sé (Opal, 2005).

La quantificazione obiettiva del quarto elemento del PIRO è di vitale importanza per classificare e stadiare i gruppi di pazienti critici e inoltre, per consentire l'identificazione dell'esistenza, del tipo e dell'estensione della disfunzione d'organo. A questo scopo, sono stati creati diversi sistemi di punteggio, per fornire degli indici di disfunzione organica utili a monitorare il paziente e ad apportare eventuali modifiche alle strategie terapeutiche intraprese (Marshall *et al.*, 2003). I sistemi più utilizzati sono il MODS (*Multiple Organ Dysfunction Score*), il SOFA (*Sequential Organ Failure Score*) e l'APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) (Bota *et al.* 2002).

Questi sistemi si basano sulla valutazione di variabili relative alla funzionalità dei diversi organi o apparati (respiratorio, cardiovascolare, renale, epatico, gastroenterico, ematologico, neurologico). Per ciascun organo viene assegnato un punteggio da 0 a 4, secondo un grado di compromissione crescente. Il rilevamento precoce, tramite l'utilizzo di questi punteggi, di una sindrome da disfunzione multiorgano (MODS) consente d'instaurare rapidamente possibile una terapia aggressiva di supporto, che risulta attualmente lo strumento più efficace per aumentare la sopravvivenza (Bota *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004).

1.3 Eziologia

Negli ultimi decenni, l'eziologia e l'epidemiologia della sepsi hanno subito rilevanti mutamenti. In era preantibiotica, la maggior parte dei microrganismi responsabili di sepsi era rappresentata principalmente da *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, mentre le sepsi sostenute da batteri Gram negativi erano rare. A partire dagli anni '50, le sepsi da batteri Gram negativi sono progressivamente aumentate, soprattutto in ambiente ospedaliero, dove rappresentano una minaccia gravissima per i pazienti affetti da malattie che comportano uno stato di immunodepressione, come leucemie, linfomi, neoplasie solide, cirrosi, diabete mellito etc. E' stato inoltre osservato un aumento delle sepsi da batteri anaerobi nelle infezioni post-chirurgiche (soprattutto in seguito ad interventi addominali e ostetrico-ginecologici), e da miceti (*Candida* spp).

Tuttavia, tale situazione epidemiologica è in continua evoluzione, probabilmente anche in rapporto all'impiego di antibiotici attivi nei confronti dei Gram negativi e al più ampio ricorso ai cateteri venosi a permanenza. Tutto ciò ha portato a un nuovo aumento dei casi di sepsi nosocomiali di *Staphylococcus aureus* e all'affermazione di *Staphylococcus epidermidis* e di altre specie coagulasi-negative (Martin G. S. *et al.*, 2003; Esel D. *et al.*, 2003). Tra le altre specie microbiche Gram positive, è da ricordare *Enterococcus faecalis*, responsabile di sepsi soprattutto dopo manovre endoscopiche in campo urologico e dopo interventi di chirurgia addominale. Tutt'oggi, la sepsi da Gram negativi costituisce un grave problema ospedaliero e tra gli agenti patogeni predomina *E. coli*, responsabile del 30-50% delle sepsi da Gram

negativi, a cui seguono *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp e *Pseudomonas* spp. Questa elevata incidenza si spiega tenendo conto che il focolaio sepsigeno è spesso costituito dall'apparato urinario.

Nel 10-15% dei casi, l'eziologia è polimicrobica, e si hanno sepsi che vedono in causa contemporaneamente microrganismi Gram negativi e Gram positivi e, talora anche batteri anaerobi.

L'incidenza delle sepsi da anaerobi attualmente oscilla tra il 5% e il 15% (Degoricija V. *et al.*, 2006). Le specie microbiche in causa sono rappresentate sia da microrganismi anaerobi Gram negativi del genere *Bacteroides* (specialmente *B. fragilis*) e *Fusobacterium*, sia da anaerobi Gram positivi dei generi *Clostridium*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*.

1.4 Patogenesi

Il *primum movens* della risposta infiammatoria sistemica è rappresentato da uno stimolo infettivo che viene riconosciuto come estraneo dal sistema immunitario (Nguyen A. *et al.*, 2003; Tsiotou A. G. *et al.*, 2005). La prima linea di difesa dell'ospite è la risposta immunitaria innata.

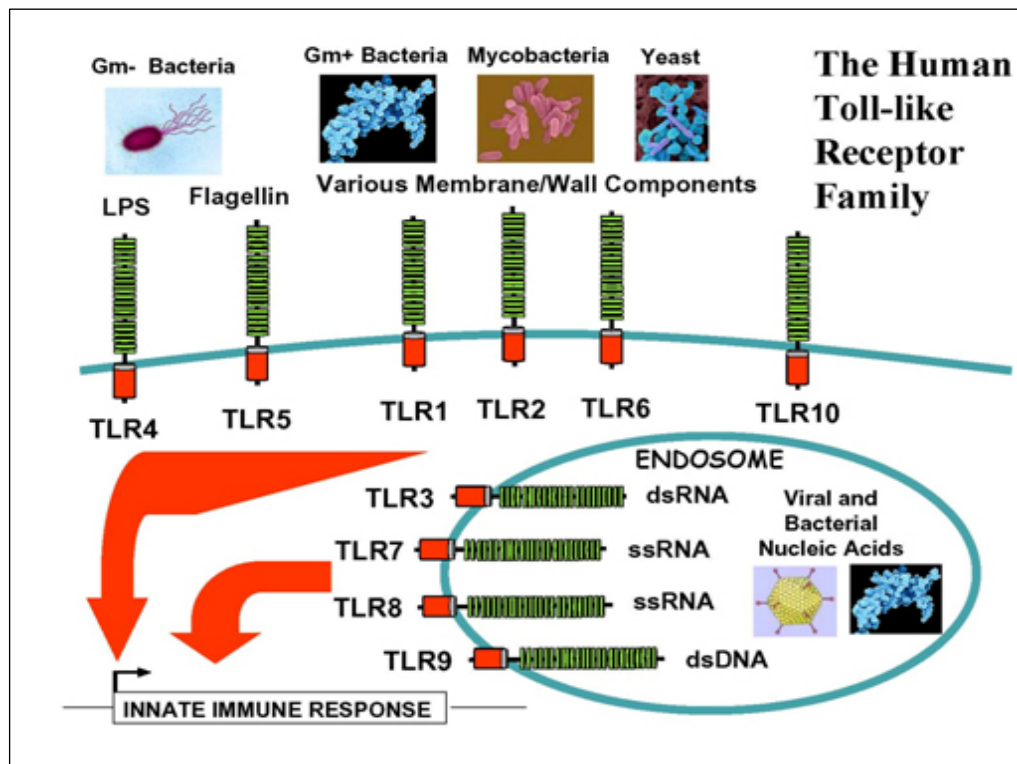
I macrofagi sono le prime cellule fagocitarie ad entrare in contatto con i microrganismi patogeni: essi svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta infiammatoria (Tsiotou A. G. *et al.*, 2005). L'induzione della risposta immunitaria è sollecitata da specifiche molecole microbiche, dette PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), che

includono il lipopolisaccaride (LPS) dei batteri Gram negativi, alcuni componenti della parete dei Gram positivi, come l'acido lipoteicoico, o dei funghi, le esotossine, il Dna batterico e la flagellina batterica (Kumar A. *et al.*, 2008).

Oltre ai PAMP, altre molecole possono attivare le cellule immunitarie competenti: le alarmino, molecole prodotte nei tessuti stressati o danneggiati in seguito a trauma, ustione, ischemia, emorragia, o ad altre condizioni in cui l'omeostasi è alterata (Kotb M. *et al.*, 1995; Castellheim A. *et al.*, 2009). Non è chiaro come il sistema immunitario riesca a distinguere i segnali dei microrganismi patogeni da quelli dei commensali (Kumar A. *et al.*, 2008). La presenza di queste molecole è avvertita da proteine di riconoscimento, i PRR (*pattern-recognition receptors*), localizzati sulla membrana cellulare delle cellule immunitarie. Il legame tra PAMP e PRR attiva una serie di eventi intramolecolari che portano alla secrezione di molecole in grado di attivare le altre cellule dell'immunità innata (Castellheim A. *et al.*, 2009). I più importanti PRR sono i *Toll-like receptors* (TLR), glicoproteine transmembrana di tipo 1 caratterizzate strutturalmente da sequenze extracellulari ripetute, ricche in residui di leucina, e da una porzione intracellulare, denominata TIR o dominio recettoriale Toll/IL-1, perché omologa al recettore per l' IL-1 (Leaver SK. *et al.*, 2007, Fischer M. *et al.*, 2008; Tizard, 2009; Barton G. M., 2009). Sono espressi in diverse popolazioni cellulari, quali macrofagi, mastociti, cellule dendritiche, eosinofili, cellule epiteliali dell'apparato gastroenterico e respiratorio (Barton, 2008). Questi domini interagiscono con diverse proteine citoplasmatiche (MyD88, TIRAP/MAL, TRAM e TRIF) che danno avvio ad una cascata di segnali molecolari.

Nei mammiferi sono stati identificati 13 TLR: alcuni (TLR 2, 4 e 5) sono localizzati sulla superficie cellulare e deputati al riconoscimento di proteine microbiche, come lipoproteine e LPS; altri (TLR 3, 7 e 9) intracitoplasmatici, sono attivati da segnali come una eventuale proliferazione batterica intracellulare o la presenza di acido nucleico virale (Barton, 2008; Tizard, 2009) (Fig. 1.4).

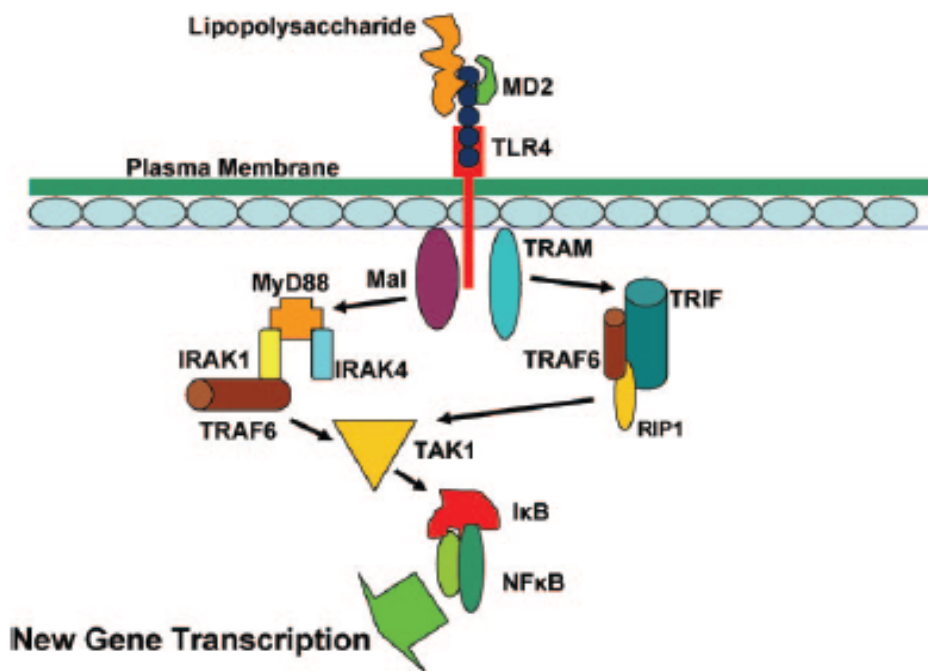
Fig. 1.4 Recettori Toll-like



TLR4 fu il primo recettore ad essere identificato (O'Neill L. A. J., 2008). Nel corso di un'infezione acuta da batteri Gram negativi, il riconoscimento del lipopolisaccaride (LPS) tramite questo recettore, situato

sulla superficie dei macrofagi, svolge un ruolo chiave nella patogenesi della sepsi (Zhu J. *et al.*, 2010). Infatti, il legame al TLR4 induce l'attivazione del fattore nucleare kB (NFkB) a livello intracellulare (Fig. 1.4.1). L'attivazione dell'NF-kB coinvolge la fosforilazione e la degradazione dell'IkB, un inibitore dell'NF-kB, che permette la traslocazione degli eterodimeri di NF-kB al nucleo. Il sistema NF-kB/IkB esercita una regolazione trascrizionale sui geni proinfiammatori, che codificano varie citochine e molecole di adesione (Barton G. M. *et al.*, 2009). Inoltre, l'attivazione del NF-kB permette l'induzione di geni effettori NF-kB dipendenti, come quelli del TNF- α , dell'IL-1, chemochine e molecole di adesione (Aderem A. *et al.*, 2000; Qiang S. *et al.*, 2006) (Tab. 1.4).

Fig. 1.4.1 Attivazione del fattore nucleare NF- kB



Tab. 1.4 Mediatori prodotti da cellule del sistema immunitario implicati nella patogenesi della sepsi

Mediatori	Effetti tipici
Citochine IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , MIF, HMGB1, IL-10	attivano i neutrofili, i linfociti e l'endotelio vascolare; stimolano le molecole di adesione cellulare; inducono le prostaglandine, l'ossido nitrico-sintasi e le proteine della fase acuta; inducono febbre; IL-10 è un regolatore negativo di questi effetti.
Chemochine IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3	mobilitano e attivano le cellule infiammatorie; attivano i macrofagi.
Mediatori lipidici Platelet-activator factor, prostaglandine, leucotrieni, trombossani, fattore tissutale	attivano l'endotelio vascolare; regolano il tono vascolare; attivano la cascata estrinseca della coagulazione
Radicali dell'ossigeno Radicale superossido e idrossile; ossido nitrico.	hanno proprietà antimicrobiche; regolano il tono vascolare

Le citochine pro-infiammatorie TNF- α e IL-1 attivano le cellule bersaglio, che includono i leucociti, le cellule endoteliali, le cellule epiteliali nell'intestino e nei polmoni, e le cellule di specifici organi, come gli epatociti, i quali possono produrre le proteine di fase acuta (Tab. 1.4.1) (Cavaillon J. M. *et al.*, 2006; Castellheim A. *et al.*, 2009). Quest'ultime rivestono un ruolo importante nella difesa dell'ospite, inducendo l'incremento della produzione di

alcune proteine del complemento e della coagulazione (Noursadeghi M. *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2006; Lagan A. L. *et al.*, 2008).

Tab. 1.4.1 Proteine di fase acuta

Proteins	Examples
Pentraxins	CRP, SAP
Transport proteins	Haptoglobin, haemopexin, ceruloplasmin
Proteinase inhibitors	PAI α1-antitrypsin, α2-antiplasmin, α1-antichymotrypsin
Other proteins	LPS-binding protein Ferritin Fibrinogen α1-acid glycoprotein Orosomucoid Lipoprotein (a) Procalcitonin
Complement proteins	C3 and C4, and C4b-binding protein
Coagulation proteins	Factor VIII

CRP, C reactive protein; SAP, serum amyloid component P; PAI, plasminogen activator inhibitor.

Nell'attivazione di uno stato settico, il primo bersaglio è l'endotelio vascolare; l'azione delle citochine sulle cellule endoteliali e l'adesione dei batteri all'endotelio stesso porta all'espressione di molecole, a cui si legano i neutrofilo circolanti, con lo scopo di fagocitare i batteri adesi alla parete vascolare (Hotchkiss R. S. *et al.*, 2003). La fagocitosi dei batteri presenti sulla

parete vascolare è poi causa di danno alla parete stessa, con fenomeni quali l'uscita di liquidi, la deplezione del volume intravascolare, l'adesione delle piastrine con riduzione delle piastrine circolanti (piastrinopenia) e conseguente attivazione dei processi coagulativi.

Nella sepsi, l'attivazione del sistema della coagulazione rappresenta un indice di criticità importante. Recenti studi hanno dimostrato che il principale attivatore della coagulazione è il fattore tissutale (TF), che viene espresso dalle cellule endoteliali e dai monociti in seguito all'azione delle citochine pro-infiammatorie (Levi M. *et al.*, 2006). In condizioni normali, l'organismo è in grado di prevenire la propagazione dei processi coagulativi tramite tre molecole principali: antitrombina, inibitore della via del fattore tissutale (TFPI) e proteina C attivata. L'attività di queste molecole può essere compromessa in pazienti con sepsi grave o shock settico, e l'attivazione sistemica della cascata della coagulazione può evolvere nella coagulazione intravascolare disseminata (CID) (Levi M. *et al.*, 2005).

La CID è caratterizzata dalla deposizione di fibrina nel circolo, che può compromettere l'apporto di sangue ai vari organi per occlusione trombotica microvascolare, e dal consumo di piastrine e proteine del sistema della coagulazione (Franchini M. *et al.*, 2006; Gando S. *et al.*, 2006; Castellheim A. *et al.*, 2009).

La compromissione dell'integrità dell'endotelio vascolare induce delle alterazioni nel trasporto di ossigeno e CO₂ dalle cellule, con conseguente ipossiemia, aumento di acido lattico e acidosi metabolica. Questo collasso circolatorio, in combinazione con le microtrombosi, conduce all'insufficienza d'organo, spesso fatale nella sepsi. Generalmente, questi pazienti sviluppano

dapprima la disfunzione di un solo organo, che evolve rapidamente in insufficienza multipla d'organo (MOF, *Multiple Organ Failure*) (Fig. 1.4.2).

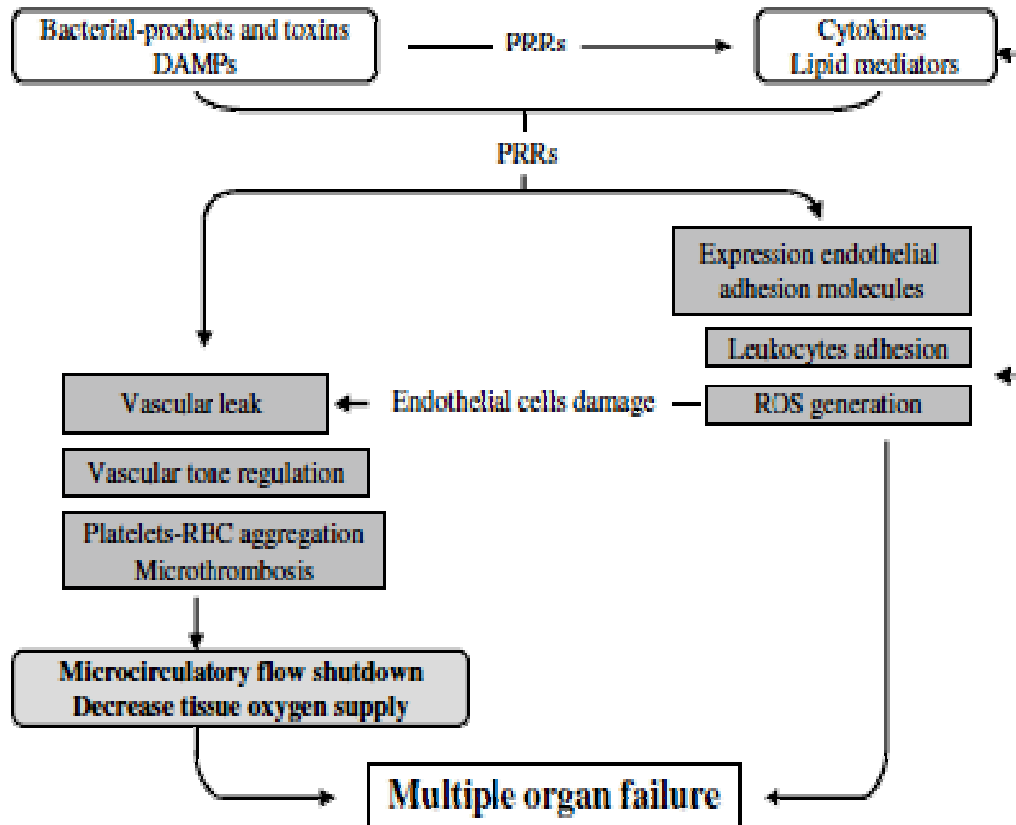


Fig. 1.4.2 Insufficienza multipla d'organo (MOF)

Non è ancora perfettamente chiaro perché solo una parte dei pazienti con batteriemia vada incontro a sepsi e quali siano i fattori responsabili dell'evoluzione del quadro fisiopatologico. Probabilmente, l'innescò della cascata settica dipende da una serie di fattori legati sia all'ospite, quali la presenza o assenza di macrofagi e PMN attivati in circolo o di altri mediatori, le condizioni cliniche del paziente prima della sepsi, la durata della sua

malattia, le condizioni dell'endotelio, e sia al microrganismo implicato nell'infezione, tra cui la virulenza e la carica microbica.

1.5 Diagnosi di sepsi

La rapida identificazione dell'agente infettivo è di importanza cruciale per l'instaurarsi di un adeguato trattamento antimicrobico e per l'esito della malattia. Il ritardo o il fallimento nelle procedure diagnostiche portano ad un trattamento inadeguato nel 25% dei casi, con un significativo aumento del rischio di morte (Harbarth S. *et al.*, 2003).

Le linee guida, recentemente pubblicate, includono tra le raccomandazioni la rapida somministrazione di terapia empirica ad ampio spettro, entro un'ora dalla diagnosi (Dellinger R. P. *et al.*, 2008). Tuttavia, alcuni studi dimostrano che un trattamento antibiotico inappropriato costituisce un importante determinante di mortalità, causa un aumento degli effetti collaterali avversi, favorisce l'insorgenza di resistenza ai farmaci antibatterici, ed aumenta i costi di gestione dei pazienti (Kollef *et al.*, 1999; Harbarth *et al.*, 2003; Kollef *et al.*, 2003; Lodise *et al.*, 2003). Tra i pazienti con infezioni del torrente circolatorio, è stata riscontrata una mortalità di circa il 20% per i pazienti trattati con una terapia empirica adeguata e del 34% per quelli trattati con una terapia inappropriata (Leibovici L. *et al.*, 1998). Inoltre, l'onere economico delle complicanze correlate alla sepsi è molto alto, con un costo

annuo, negli Stati Uniti, di circa 17 miliardi di dollari (Angus D.C. *et al.*, 2001).

I primi segni clinici della sepsi sono spesso aspecifici (febbre, leucocitosi) e quindi, può essere estremamente difficile stabilire se la causa scatenante della risposta infiammatoria sistemica è di natura infettiva o non infettiva, e localizzare il sito di infezione, specialmente in pazienti con una batteriemia primaria o in presenza di co-morbilità; i segni più tardivi e specifici, come l'ipotensione arteriosa o l'aumento della lattatemia, indicano un'imminente progressione verso la disfunzione d'organo (sepsi grave), che è associata ad un aumento del tasso di mortalità dal 35% al 70% (Reinhart *et al.*, 2006).

La diagnosi di sepsi si basa su sistemi di classificazione dei sintomi e dei segni clinici, sul dosaggio di biomarker correlati alla sepsi e sull'identificazione del microrganismo responsabile.

Attualmente, il metodo diagnostico di riferimento è l'emocoltura che, sebbene permetta di identificare i microrganismi e di saggiarne la loro suscettibilità agli antibiotici, presenta diverse limitazioni. Il maggior problema è legato alla tempestività: il rilevamento della crescita batterica richiede approssimativamente 24-48 ore, o anche di più, in caso di batteri a lenta crescita o di funghi (Peters *et al.* 2004; Lucignano B. *et al.*, 2011).

Al fine di ridurre il tempo richiesto per l'identificazione del microrganismo, negli ultimi decenni sono stati proposti diversi test aggiuntivi, che includono tecniche molecolari (PCR, FISH) e tecniche di spettrometria di massa (MALDI TOF), eseguibili su emocolture positive o su campioni di sangue (Seifert H., 2009; Ferroni A. *et al.*, 2010; Hansen W. L. J. *et al.*, 2010; Lamoth F. *et al.*, 2010; Lupetti A. *et al.*, 2010).

1.5.1 Biomarker

Nell'ambito della conferenza SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS del 2001, venne raccomandato l'utilizzo di indicatori biologici come strumenti per lo studio della sepsi. I marcatori biologici o *biomarker* derivano da una complessa risposta dell'ospite (umorale e cellulare) ad uno stimolo infettivo e sono molecole bioattive rinvenibili nel sangue o nei campioni biologici, e facilmente dosabili. Questi fattori dovrebbero essere in grado di consentire di:

- monitorare l'andamento di processi fisiologici e patologici (lo stadio della malattia);
- monitorare le risposte dell'organismo a terapie mediche o chirurgiche
- garantire una diagnosi accurata e precoce
- formulare una prognosi (Levy *et al.* 2003).

Per ridurre significativamente la mortalità, un marker di sepsi ideale dovrebbe fornire una diagnosi precoce per garantire un trattamento tempestivo (Rivers *et al.*, 2001).

Un biomarker è clinicamente utile quando è altamente sensibile, quindi varia significativamente in seguito ad un determinato processo biologico, e quando è molto specifico per il processo che si vuole monitorare. Inoltre, dovrebbe essere rilevabile in modo semplice ed economico e i risultati ottenuti su uno stesso campione dovrebbero essere riproducibili (Marshall *et al.*, 2003; Reinhart *et al.*, 2006).

Un biomarker può avere un ruolo prognostico, pur non apportando nessuna informazione sulla diagnosi, l'eziologia o i meccanismi della patologia in atto.

I biomarker sono variabili dinamiche, che devono poter essere rapidamente

misurabili, per consentire un monitoraggio seriale del processo morboso in corso e dettare eventuali cambi nella strategia terapeutica. Esempi di marker di risposta includono la PO_2 , l'indice cardiaco o la concentrazione di emoglobina, conosciuti anche come *target* terapeutici (Marshall *et al.*, 2003).

Un biomarker può avere un ruolo diagnostico: classifica i pazienti, differenziando tra quelli affetti o meno da una malattia. L'utilità è quella di fornire delle informazioni che consentano di stabilire una strategia terapeutica.

Nonostante le conoscenze biomolecolari sulla fisiopatologia della sepsi migliorino giorno per giorno, per questa patologia non sono ancora stati identificati degli indici che consentano di effettuare una diagnosi precoce, o dei fattori prognostici di elevata sensibilità e specificità. Una diagnosi tempestiva è auspicabile, perché consentirebbe di riconoscere precocemente i soggetti più a rischio e migliorerebbe l'*outcome* in molti pazienti. Attraverso il dosaggio di parametri sensibili e specifici si potrebbero attuare trattamenti più precoci, mirati ed efficaci. Negli ultimi anni, sono stati proposti innumerevoli marker biochimici di sepsi, sepsi grave e shock settico. Tra questi, i più comunemente studiati sono le citochine, la proteina C-reattiva (CRP) e la procalcitonina (PCT). Tuttavia, nessuno di essi è specifico per la sepsi, la cui diagnosi non può essere conclusa sulla base della loro presenza, ma deve essere valutata nel contesto del quadro clinico (Schinella M. e Ruscio M., 2008).

1.5.1.1 Citochine

Le principali citochine valutate in corso di sepsi sono IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8, IL-10 e IL-12 (Bozza *et al.*, 2005; Ventetuolo *et al.*, 2008).

In particolare, l'IL-6 non è solo un mediatore di sepsi, ma anche un biomarker clinico (Mancini *et al.*, 2010). Essa viene sintetizzata dalle cellule endoteliali, fibroblasti, monociti/macrofagi durante la SIRS associata non solo a cause infettive, ma anche a stress, danni tissutali, trauma e morte cerebrale (Song e Kellum, 2005). Il fegato sembra essere il principale organo *target* dell'IL-6, inducendone la produzione di CRP e LBP (*lipopolysaccharide binding protein*); dunque, elevati livelli di IL-6 plasmatica si rileveranno molto prima dell'incremento delle due proteine soprannominate (Gaini *et al.*, 2006).

Fong e colleghi hanno dimostrato un importante incremento della concentrazione di IL-6 nel siero di un gruppo di volontari, in cui era stata somministrata per via endovenosa una piccola quantità di endotossina, rilevando un picco di IL-6 già a due ore dall'iniezione (Fong *et al.*, 1989), mentre il picco della PCT e della CRP non si otteneva rispettivamente prima delle 6-8 ore e delle 36-48 ore successive all'iniezione. Perciò, l'IL-6 è molto utile nella valutazione della prima fase della sepsi, e sembra essere superiore alla PCT come marker diagnostico di infezione e sepsi (Gaini *et al.*, 2009), contrariamente alla maggior parte degli studi che ritengono la PCT sia il biomarker più attendibile e specifico (Harbarth *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2000; Aikawa *et al.*, 2005). L'IL-6 e l'IL-8 sono strettamente correlate alla gravità della risposta dell'ospite ad un'infezione o ad infiammazione sistemica (Wakefield *et al.*, 1998). Si è visto, infatti, che l'IL-6 plasmatica aumenta più

di 1000 volte nei pazienti con sepsi e inoltre mostra correlazione con il grado di disfunzione d'organo e con la prognosi (Reinhart *et al.*, 2006). In pazienti neutropenici, i livelli circolanti di IL-6 e IL-8, al contrario della CRP, mostrano una differenza significativa tra pazienti con infezione confermata e pazienti con febbre di origine sconosciuta (Engel *et al.*, 1998). Misurazioni combinate dei livelli plasmatici di IL-6 e IL-8 si sono dimostrate predittori precoci di sepsi neonatale con alta sensibilità ed specificità (Berner *et al.*, 1998).

Diversamente, l'IL-8 ha una bassa sensibilità diagnostica in pazienti affetti da pancreatite necrotica (Rau *et al.*, 1989). Livelli elevati di IL-6 e IL-8 sono stati rinvenuti in pazienti dopo una chirurgia maggiore (Shenkin *et al.*, 1989), in seguito ad un grave trauma (Nast-Kolb *et al.*, 1997), in soggetti affetti da patologie autoimmuni (Kutukculer *et al.*, 1998; Robak *et al.*, 1998), da infezioni virali (Gendrel *et al.*, 1997; Malaguarnera *et al.*, 1997) e in pazienti con rigetto dopo trapianto d'organo (Kita *et al.*, 1996). Per cui, l'IL-6 e l'IL-8 sembrerebbero essere meno specifici nella diagnosi di sepsi.

Diversi studi riportano che l'IL-6 e l'IL-10 aumentano in corso di sepsi e che possono essere indicatori predittivi di shock settico e di morte (Marchant *et al.*, 1994; Pinsky *et al.*, 1993).

L'aumento significativo dei livelli plasmatici di TNF- α in corso di risposta infiammatoria sistemica è potenzialmente deleterio per l'organismo a causa degli effetti sul metabolismo e sull'emodinamica (Mak e Saunders, 2006). Tuttavia, la secrezione di TNF- α in circolo risulta piuttosto variabile in corso di sepsi, per cui il suo utilizzo come biomarker non sembra essere di grande utilità (Wakefield *et al.*, 1998).

1.5.1.2 Proteina C Reattiva (CRP)

La proteina C-Reattiva (CRP), è la prima proteina di fase acuta che è stata descritta (Pepys e Hirschfield, 2003; Anderson e Schmidt, 2010). Essa viene secreta dal fegato 4 o 6 ore dallo stimolo flogogeno, in seguito alla stimolazione di mediatori dell'infiammazione (come l'IL-1, l'IL-6 e l'IL-8), e duplica il suo valore in circolo entro 8 ore, raggiungendo il picco nelle 36 o 50 ore successive allo stimolo (Gabay e Kushner, 1999; Póvoa, 2002; Pepys e Hirschfield, 2003; Ventetuolo e Levy, 2008).

La CRP possiede proprietà sia pro-infiammatorie che anti-infiammatorie (Black *et al.*, 2004; Pepys e Hirschfield, 2003).

L'emivita della CRP nel plasma è di 19 ore (Vigushin *et al.*, 1993); livelli plasmatici di CRP rimangono elevati per alcuni giorni una volta eliminato lo stimolo flogogeno.

Elevati livelli plasmatici di CRP riflettono l'insorgenza di una flogosi e/o danno d'organo mentre, in caso d'insufficienza epatica, la produzione di CRP verrà notevolmente diminuita (Pepys e Hirschfield, 2003).

Nel 99% degli individui sani, il valore normale della CRP plasmatica è inferiore a 10 mg/l; questo valore può incrementarsi fino a 500 mg/l in risposta ad infezioni gravi di tipo acuto (Bozza *et al.*, 2005).

Un aumento della CRP circolante si ottiene anche in corso di infezioni meno gravi, ma non sembra essere correlata alla gravità della risposta dell'ospite e non sembra presentare differenze tra soggetti sopravvissuti e non sopravvissuti (Meisner *et al.*, 1999; Ugarte *et al.*, 1999). Concentrazioni elevate di CRP si riscontrano, infatti, anche in corso di patologie non infettive come

patologie autoimmuni, alterazioni reumatiche, sindromi acute coronariche, tumori maligni e dopo traumi o interventi chirurgici. Inoltre, alcuni ricercatori hanno dimostrato che i valori di CRP sierica non consentono di distinguere tra sepsi e SIRS di natura non infettiva (Brunkhorst *et al.*, 2000; Selberg *et al.*, 2000).

Luzzani e colleghi hanno riportato che, in corso di sepsi grave, i livelli plasmatici sono più bassi che in corso di sepsi, suggerendo che la CRP non riflette la gravità della sepsi (Luzzani *et al.*, 2003). In un recente studio, è stata evidenziata una importante correlazione tra le elevate concentrazioni plasmatiche di CRP, rilevate al momento del ricovero in pazienti critici, e un elevato rischio di disfunzione d'organo e di morte (Lobo *et al.*, 2003).

Per il rilevamento della sepsi, essa risulta molto più sensibile di parametri come la temperatura o la conta leucocitaria, ma meno specifica di altri indicatori come la PCT (Póvoa *et al.*, 1998; Brunkhorst *et al.*, 1998; Claeys *et al.*, 2002).

Nonostante la mancanza di specificità diagnostica, la CRP è ritenuta un marker sensibile di infezione o di infiammazione (Myeong H. K. *et al.*, 2011). Al momento, è il biomarker più comunemente utilizzato per la valutazione della risposta infiammatoria. Inoltre, il suo dosaggio è una tecnica non troppo costosa e ampiamente disponibile.

La CRP è inclusa tra i criteri diagnostici per la sepsi nella *International Sepsis Definitions Conference* (Levy *et al.*, 2001) e nonostante le sue limitazioni, è impiegata nella diagnosi di sepsi, quando la PCT non è disponibile come marker di laboratorio (Anderson e Schmidt, 2010).

1.5.1.3 Procalcitonina (PCT)

La procalcitonina (PCT), pro-ormone della calcitonina, è un polipeptide di 116 amminoacidi e con un peso molecolare di 13 kDa. Essa viene sintetizzata nelle cellule parafollicolari o cellule C della tiroide e in alcune cellule neuroendocrine polmonari, all'interno delle quali subisce un clivaggio enzimatico originando l'ormone maturo calcitonina, di 32 amminoacidi, coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi del calcio (Dahaba A.A., 2006; Becker, 2010).

Sebbene il ruolo patofisiologico della PCT e i suoi siti di produzione non siano completamente chiari in corso di sepsi, sembra che il maggior stimolo per la sua induzione siano le endotossine batteriche e l'azione delle citochine pro-infiammatorie (Dandona *et al.*, 1994). Il picco di PCT si ha 2 ore dopo l'instaurarsi dell'endotossitemia o batteremia (Dandona *et al.*, 1994; Brunkhorst *et al.*, 1998). Molti studi hanno dimostrato che i livelli della procalcitonina possono essere utilizzati per identificare le infezioni batteriche nei pazienti settici (Luzzani A. *et al.*, 2003; Endo S. *et al.*, 2008). Inoltre, i dati presenti in letteratura suggeriscono che, a differenza della CRP e delle altre proteine di fase acuta, i livelli della PCT raramente aumentano in risposta ad una infezione virale (Walsh *et al.*, 2008; Schultze H. *et al.*, 2009; Ingram P. R. *et al.*, 2010).

Nei soggetti sani, i livelli plasmatici della PCT risultano quasi al di sotto della soglia di rilevamento analitico (minori di 0,1 ng/ml). In pazienti settici, la PCT sierica aumenta da 5.000 a 10.000 volte, mentre i valori di calcitonina rimangono nel range di riferimento (Müller *et al.*, 2000).

Oltre alle infezioni batteriche, anche interventi chirurgici, ustioni e traumi gravi provocano un aumento di procalcitonina. Presumibilmente, queste patologie vanno accompagnate dalla traslocazione di lipopolisaccaride o altri prodotti batterici dall'apparato gastroenterico alla circolazione sanguigna (Ryan *et al.*, 1992; Ammori *et al.*, 2003; Magnotti e Deitch, 2005).

Il monitoraggio giornaliero della PCT può essere utile come indicatore precoce di complicazioni settiche in corso di chirurgia, ustioni o trauma (Reith *et al.*, 1998). I livelli plasmatici di PCT, osservati in queste ultime condizioni, non sono così elevati come lo sono, invece, in corso di sepsi grave o shock settico.

Diversi studi confermano PCT come marker di infezione grave e sepsi (Meisner, 2000). Pazienti con un livello uguale o inferiore a 0,5 ng/ml è poco probabile che siano affetti da sepsi grave o shock settico, mentre livelli al di sopra di 2 ng/ml identificano i pazienti ad alto rischio (Müller *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2007). Concentrazioni superiori a 10 ng/ml si verificano spesso in pazienti con disfunzione d'organo lontana dal sito primario di infezione (Monneret *et al.*, 1997; Meisner *et al.*, 1999).

Becker e colleghi hanno riscontrato un elevato tasso di PCT sierica in corso di infezione locale con emocoltura negativa e in assenza dei classici sintomi della sindrome settica (Becker *et al.*, 2008).

Un altro studio, eseguito su pazienti pediatrici, conferma la superiore sensibilità e specificità della PCT rispetto ad altri marker (CRP e WBC), come analita dal buon valore predittivo di shock settico (Hatherill *et al.*, 1999).

In vari studi, la PCT si è mostrata superiore come indicatore prognostico rispetto a TNF- α , IL-6 o CRP in pazienti critici (De Werra *et al.*, 1997; Oberhoffer *et al.*, 1999). Shimetani e colleghi ritengono molto utile

l'introduzione della PCT nella diagnosi differenziale delle infezioni gravi (Shimetani *et al.*, 2004). La prognosi su pazienti con shock settico può stabilirsi con la determinazione della PCT al giorno dell'ammissione (Clec'h *et al.*, 2004) e dosaggi ripetuti quotidianamente.

L'utilizzo routinario della PCT, come strumento diagnostico e per il monitoraggio dei pazienti, ne migliora la gestione e ne incrementa la sopravvivenza. Inoltre, il dosaggio con metodi ultrasensibili è in aumento nel monitoraggio delle terapie antibiotiche, avendo dimostrato di ridurre la durata dei trattamenti, il tempo e, di conseguenza, i costi di ospedalizzazione (Christ-Crain *et al.*, 2007; Schuetz P. *et al.*, 2009; Gilbert D. N. *et al.*, 2010; Myeong H. K. *et al.*, 2011).

1.5.2 Emocoltura

L'emocoltura è tradizionalmente il "gold standard" per la diagnosi di sepsi, in quanto permette di stabilire l'eziologia infettiva della risposta infiammatoria sistemica e fornisce al clinico informazioni utili per la terapia (Dellinger R. *et al.*, 2008). Attualmente, l'emocoltura viene eseguita con sistemi a monitoraggio continuo, usando strumenti completamente automatizzati e computerizzati, come Bactec serie 9000 (Beckton Dickinson), BacT/Alert (Biomerieux) e VersaTREK (DID), che permettono l'incubazione di flaconi dedicati, contenenti un brodo di coltura, in cui vengono inoculati i campioni ematici al momento del prelievo. Questi strumenti sono in grado di

rilevare la crescita microbica, tramite l'analisi del rilascio di CO₂ prodotta dal metabolismo batterico, usando sensori fluorescenti o colorimetrici; oppure, in alternativa, misurando i cambiamenti di pressione dovuti al consumo o alla produzione di gas (Mancini N. *et al.*, 2010; Riedel S. e Carroll K. C., 2010).

L'efficacia e il significato clinico dell'emocoltura dipendono da molteplici fattori. Nella fase preanalitica, le modalità di prelievo ed il numero dei campioni rappresentano elementi di fondamentale importanza per la buona riuscita dell'accertamento diagnostico. E' necessario effettuare il prelievo ai primi sospetti di infezione e prima di iniziare qualsiasi terapia antimicrobica; a terapia iniziata, è consigliabile sospendere la somministrazione dei farmaci per alcune ore, oppure bisogna prelevare il campione di sangue quando si presume che la concentrazione di antibiotico sia minima, e cioè immediatamente prima di una nuova somministrazione. Quando la sepsi è di origine extravascolare, la sintomatologia più caratteristica è la presenza di brividi e di una forte sensazione di freddo accompagnata da un rialzo della temperatura corporea in un determinato momento della giornata; in questi pazienti, è necessario che il prelievo sia eseguito quando si genera il brivido e prima del picco febbrile, perché in questo momento la concentrazione batterica è molto elevata, ma diminuirà progressivamente all'aumentare della febbre. E' ragionevole procedere a prelievi multipli, ciascuno con un set di emocolture (flacone aerobio e anaerobio) in quei pazienti, in cui si sospetta un'infezione del torrente circolatorio. Per la maggior parte degli episodi di batteriemia, la raccolta di due o tre set di emocolture nell'arco delle 24 ore sarà sufficiente a scopo diagnostico, mentre la raccolta di una sola emocoltura potrebbe non individuare circa il 35-40% degli episodi di batteriemia (Cockerill F. R. *et al.*, 2004). Prelievi più numerosi sono indicati solo per i pazienti in cui si sospetta

endocardite o altre infezioni endovascolari, e quando il decorso della malattia non è acuto (Riedel S. e Carroll K. C., 2010). Questi pazienti presentano una febbre continua, quindi si consiglia di effettuare quattro prelievi, ciascuno ogni 6 ore, al fine di avere maggiore probabilità di isolare il microrganismo responsabile. Il prelievo di un maggior numero di set aumenta la possibilità di differenziare i veri positivi dai falsi positivi. Infatti, il problema maggiore del prelievo riguarda la possibilità di contaminazioni esogene del campione, rendendo talvolta difficile la distinzione tra l'isolamento di germi realmente patogeni e dei contaminanti. La presenza accidentale di batteri commensali cutanei (stafilococchi coagulasi-negativi, corinebatteri e propionibatteri) può dar luogo alla moltiplicazione di questi, ostacolando o mascherando la crescita dei reali patogeni responsabili del processo infettivo. In particolari circostanze, questi batteri commensali possono avere un significato patologico (sepsi da catetere endovenoso, endocarditi su valvole artificiali), ma molto spesso sono contaminanti della fase del prelievo, che possono fornire informazioni fuorvianti al clinico. Generalmente, il valore predittivo positivo in caso di isolamento degli stafilococchi coagulasi-negativi è del 10-15% (in relazione alla tipologia del paziente, condizioni predisponenti, presenza di dispositivi protesici), 38% per gli streptococchi viridanti, 23% per *Clostridium perfringens* e del 5% per *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp e *Propionibacterium acnes* (Weinstein M. P. *et al.*, 2003; Tokars J. I. *et al.*, 2004; Keri K. H. e Jason A. L., 2006).

Uno dei più importanti fattori che influenzano l'efficienza diagnostica delle emocolture è il volume di sangue da prelevare, in quanto esso è in relazione diretta con la possibilità di avere una positività. In una emocoltura, è richiesto l'inoculo di almeno 3 unità formanti colonia (CFU) per millilitro, per

avere il 100% di positività (Brown D.R. *et al.*, 1995); nei pazienti adulti, in corso di sepsi, la concentrazione per millilitro di sangue è di norma 0,1-1 CFU/ml, mentre si ritiene che la carica batterica sia più alta in età pediatrica (10-100 CFU/ml) (Kreger B. E. *et al.*, 1980; Reimer L. G. *et al.*, 1997; Conti A. e De Rosa, 2008). Nell'adulto, quindi, si preleva una quantità di 5-10 ml di sangue per flacone; in età pediatrica si può prelevare una quantità minore (da 1 a 5 ml), data la più alta carica riscontrabile nelle batteriemie di questa fascia di età. Deve esserci un rapporto ottimale fra il volume del campione e quello del brodo di coltura, al fine di diluire i fattori umorali e cellulari ad attività antibatterica normalmente presenti nel sangue, che possono inibire la crescita microbica. Inoltre, il 28-63% dei pazienti hanno già ricevuto una terapia antibiotica prima del prelievo, quindi è opportuno ridurre gli effetti per l'isolamento dei microrganismi (Herzke C. A. *et al.*, 2009; Riedel S. e Carroll K. C., 2010). Il rapporto di 1:5-1:10 tra il campione di sangue e il brodo di coltura ha dimostrato di consentire la crescita di molti microrganismi (Aukenthaler R. *et al.*, 1982). I nuovi sistemi automatizzati permettono un rapporto inferiore a 1:5, per l'utilizzo di brodi di coltura contenenti sostanze aggiuntive che inattivano i fattori inibitori. Questi sistemi, inoltre, sono dotati di un dispositivo che consente il rimescolamento del brodo di coltura, facilitando la crescita microbica.

Per superare gli effetti inibitori degli antibiotici sulla crescita dei batteri presenti nel sangue, sono stati sviluppati particolari terreni di coltura contenenti resine sintetiche o carbone che, sequestrando l'antibiotico presente nel sangue, migliorano la sensibilità dell'emocoltura (Spaargaren J. *et al.*, 1998; Doern G. V. *et al.*, 1998; Riedel S. e Carroll K. C., 2010). Dai risultati ottenuti in un recente studio, Flayhart e colleghi hanno concluso che, in

presenza di antimicrobici, i flaconi con le resine generalmente permettono di rilevare i microrganismi più frequentemente e più rapidamente rispetto a quelli contenenti il carbone (Flayhart D. *et al.*, 2007), confermando quanto osservato in precedenza da altri autori (Vigano E. F. *et al.*, 2002; Nzaeko B. C. *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda i tempi di incubazione dei flaconi, il CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ha stabilito che 5 giorni di incubazione sono sufficienti per rilevare la crescita di più del 95% dei microrganismi clinicamente significativi (CLSI, 2007). Studi sistematici su un gran numero di emocolture, hanno dimostrato che nei sistemi automatizzati il 97,5% dei microrganismi presenti in coltura vengono rilevati nei primi 3 giorni di incubazione (Bourbeau P. P. *et al.*, 2005; Baron E. J. *et al.*, 2005). Tempi di incubazione più lunghi sono spesso richiesti per le emocolture prelevate da pazienti con presunta endocardite o nei casi di batteriemia sostenuta da batteri esigenti, come *Brucella* spp, *Francisella* spp, e quelli appartenenti al gruppo HACEK (*Haemophilus* spp, *Actinobacillus* spp, *Cardiobacterium* spp, *Eikenella* e *Kingella*) (Riedel S. e Carroll K. C., 2010). Molti di questi germi, infatti, possono essere responsabili di endocardite infettiva e spesso le emocolture risultano negative, confermando l'estrema difficoltà nel fornire al clinico informazioni microbiologiche utili per la diagnosi di questa patologia. Tuttavia, confrontando la percentuale di recupero di questi microrganismi dalle emocolture incubate rispettivamente a 5 e a 21 giorni, Petti e colleghi dimostrarono che un ulteriore prolungamento del tempo di incubazione non è necessario (Petti C. A. *et al.*, 2006). Altri autori, invece, concordano con il protocollo di incubazione stabilito dal CLSI (Cockerill F. R. *et al.*, 2004; Baron E. J. *et al.*, 2005).

Lo strumento automatizzato avverte della presenza di flaconi positivi con un segnale visivo e acustico, di solito entro 24-48 ore di incubazione; a questo punto è opportuno procedere ad una valutazione microscopica, allestendo un vetrino a partire da un'aliquota di brodocoltura ed eseguendo la colorazione di Gram, al fine di fornire al clinico un'informazione tempestiva sulla probabile eziologia.

L'attuale metodo di identificazione dei batteri e il test suscettibilità agli antibiotici richiedono l'allestimento di una subcoltura su terreno solido, a partire dall'emocoltura positiva. La subcoltura viene incubata per 18-24 h e da questa viene preparata una sospensione a densità ottica standard, da introdurre nel sistema automatizzato (VITEK2 o PHOENIX). Per ridurre i tempi di risposta, vari autori hanno messo a punto diversi metodi rapidi, effettuati direttamente sul brodo di coltura, opportunamente trattato, senza attendere la crescita delle colonie su terreno solido (Waites K. B. *et al.*, 1998; Bruins M. J. *et al.*, 2004). Questi metodi hanno fornito buoni risultati soltanto per i bacilli Gram negativi, ma non per i cocci Gram positivi, con una corretta identificazione a livello di specie dal 62% al 93%, a seconda dei sistemi automatizzati impiegati (Ling T. K. *et al.*, 2003; Bruins M. J. *et al.*, 2004; Funke G. *et al.*, 2004; De Cueto M. *et al.*, 2004).

Sia per le identificazioni che per i test di sensibilità diretti, non esistono, allo stato attuale, procedure standardizzate e approvate e, l'utilizzo dei vari sistemi disponibili viene lasciato alla responsabilità ed esperienza del microbiologo (Grosso S. *et al.*, 2007).

La positività di una emocoltura rappresenta il metodo più certo di diagnosi. Però, il riscontro di batteri in una emocoltura può essere un fenomeno transitorio non associato ad uno stato patologico, oppure la diffusione di

un'infezione batterica invasiva ad origine focale (Birocchi F-Testa M. *et al.*, 2005). Purtroppo, i segni e sintomi clinici di sepsi si manifestano spesso in assenza di positività all'emocoltura, che ha dimostrato livelli di sensibilità analitica variabili fra 8% ed 88% e tali valori risentono, ovviamente, anche della pregressa somministrazione di terapia antibatterica specifica o di particolari esigenze nutrizionali dei germi (Carrigan, *et al.*, 2004). Un limite intrinseco dell'emocoltura è la sua scarsa sensibilità per la ricerca di particolari germi, che spesso sono responsabili di polmoniti acquisite in comunità, quali *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, e in generale, di molti germi difficili da coltivare e non coltivabili come *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, gli ifomiceti e *Nocardia* spp, *Ricketia* spp., *Coxiella burnetii* (Peters R.P. *et al.*, 2004; Fenollar F. *et al.*, 2007).

Nel 50% dei casi, in cui la diagnosi di sepsi è certa, l'emocoltura risulta negativa (Ecker D. J. *et al.*, 2010). Il valore dell'emocoltura come test diagnostico di batteriemia e di sepsi è, inoltre, notevolmente limitato, in quanto fornisce i risultati non prima di 48 ore; un'analisi completa di identificazione di un dato germe e la valutazione della suscettibilità agli antibiotici richiede da 1 a 5 giorni o più (Ecker D. J. *et al.*, 2010; Tsalik E. L., 2010).

1.5.3 Metodi molecolari

Negli ultimi anni, diverse tecniche molecolari sono state sviluppate per la diagnosi di infezioni sistemiche, con lo scopo di superare i principali

limiti del metodo convenzionale e ridurre i tempi di risposta. Le tecniche molecolari attualmente disponibili in commercio possono essere distinte in due categorie: quelle basate sul principio di amplificazione del genoma batterico e/o fungino e quelle che sfruttano il principio dell'ibridazione.

La PCR è la tecnica più comunemente utilizzata per l'amplificazione del DNA batterico. Sono stati messi a punto diversi saggi, che identificano geni genere- o specie-specifici, saggi universali (broad-range PCR) che rilevano le sequenze conservate nel genoma batterico o fungino, come i geni ribosomiali panbatterici e panfungini (geni rRNA 16 S, 5 S e 23 S; geni rDNA 18 S, 5.8 S e 28 S); e infine, saggi multiplex che permettono di rilevare simultaneamente target genere- o specie-specifici di diversi patogeni (Mancini N. *et al.*, 2010). Questi metodi sono stati applicati principalmente alle emocolture positive, tuttavia il loro potenziale diagnostico è limitato, in quanto la sensibilità osservata non si è rivelata superiore a quella del metodo convenzionale; inoltre l'identificazione molecolare si ottiene con un anticipo di poche ore rispetto all'emocoltura (Procop G. W., 2007; Klouche M. e Schroder U., 2008; Mancini N. *et al.*, 2010).

L'identificazione diretta del DNA batterico e fungino nel sangue intero mediante PCR è uno degli approcci più promettenti (Mackay I. M. *et al.*, 2004).

In Europa, tre kit sono stati già approvati e sono disponibili per la diagnosi di sepsi direttamente da campione di sangue intero (Mancini N. *et al.*, 2010). Tra questi, il metodo più studiato in letteratura è LightCycler SeptiFast (Roche Diagnostics GmbH, Germany), che si basa sulla tecnologia PCR multiplex real-time, in grado di rilevare e identificare contemporaneamente il genoma di 25 diversi microrganismi, responsabili del 95% dei casi di sepsi

microbiologicamente confermati, direttamente da un singolo campione di sangue periferico (Lehmann L. E. *et al.*, 2008; Mancini N. *et al.* 2008; Westh H. *et al.*, 2009) (Tab. 1.5.3).

Tab. 1.5.3 Elenco delle specie identificate da LightCycler SeptiFast M^{grade}

Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria	Fungal pathogens
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Coagulase-negative</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Staphylococci</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

Esso prevede l'utilizzo di due sonde fluorescenti a trasferimento di energia di risonanza (FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), che individuano le regioni interne trascritte spaziatrici (ITS) specie-specifiche, localizzate tra i geni rRNA 16S e 23S per i batteri e, 18S e 5.8S per i funghi. Da un volume di sangue in EDTA di 1,5 ml, il DNA viene estratto mediante una lisi meccanica con delle biglie di ceramica, e dopo purificazione, viene

processato parallelamente in tre PCR multiplex real-time (Gram positivi, Gram negativi e funghi). Il limite di rilevazione di questa metodica è di 3-30 CFU/ml, variabile a seconda del microrganismo.

SeptiFast è stato recentemente usato per la diagnosi molecolare di sepsi in pazienti neutropenici, immunocompromessi ed ospedalizzati con sospetta sepsi e diversi studi clinici hanno messo a confronto questo metodo molecolare con il metodo colturale, da cui sono emersi risultati interessanti (Louie R. F. *et al.*, 2008; Mancini N. *et al.*, 2008; Lehmann L. E. *et al.*, 2009). In primo luogo, con SeptiFast sono stati identificati un maggior numero di campioni positivi rispetto all'emocoltura: questi campioni sono stati considerati clinicamente significativi sulla base dei dati clinici, e successivamente confermati dall'isolamento del microrganismo da campioni provenienti da altri distretti, sede dell'infezione (Mancini N. *et al.*, 2008; Louie R. F. *et al.*, 2008; Bloos F. *et al.*, 2009; Struelens M. J. *et al.*, 2009). Infatti, la maggiore sensibilità della PCR nel rilevare concentrazioni anche molto piccole di DNA batterico deve essere valutata nel contesto clinico del paziente. Quindi, il risultato positivo della PCR può essere considerato valido se viene accertata la presenza di un focolaio infettivo sostenuto dallo stesso germe, o quando il risultato dell'emocoltura è il medesimo, anche a distanza di giorni (Bloos F. *et al.*, 2009; Ecker D. J. *et al.*, 2010). Inoltre, la rilevazione di DNA microbico circolante, mediante metodi molecolari, non indica necessariamente la presenza del microrganismo vitale responsabile dell'infezione. L'alta sensibilità necessaria per la diagnosi diretta di sepsi può aumentare la percentuale dei falsi positivi. La presenza di DNA microbico nel sangue, infatti, può essere la traccia di una batteriemia transiente non associata ad alcuna infezione, oppure può essere correlata alla persistenza di DNA circolante rilevabile, sia quando la

terapia antimicrobica è in corso, ma anche qualche giorno dopo che essa sia stata completata (Rodero L. *et al.*, 2002; Tomas I. *et al.*, 2007; Mancini N. *et al.*, 2008; Mancini N. *et al.*, 2010). Lucignano e colleghi hanno osservato per SeptiFast una sensibilità e specificità, rispettivamente dell'85% e del 95%, maggiori rispetto ad altri metodi molecolari (Lucignano B. *et al.*, 2011). Bisogna considerare che, rispetto al metodo colturale, l'utilizzo di metodiche molecolari comporta un maggior rischio di rilevare falsi positivi, che possono essere associati alla presenza nel campione di microrganismi commensali della cute, ma anche ad un'ulteriore possibilità di contaminazione da parte di germi ambientali durante l'esecuzione del test, soprattutto quando può essere amplificato un ampio spettro di germi. Per tale motivo, l'esecuzione del metodo SeptiFast richiede particolare attenzione. Nonostante ciò, vari autori hanno riscontrato un tasso di contaminazione più basso per SeptiFast rispetto al metodo colturale (Westh H. *et al.*, 2009; Lucignano B. *et al.*, 2011; Lamoth F. *et al.*, 2010).

Uno dei principali svantaggi dei metodi basati sulla PCR è costituito dal limitato numero di specie che possono essere identificate, responsabili della maggior parte dei risultati falsi-negativi osservati. Lamoth e colleghi hanno ottenuto circa 40% di risultati falsi negativi dovuti a microrganismi non inclusi nel set di identificazione di SeptiFast (Lamoth F. *et al.*, 2010). I falsi negativi possono essere dovuti anche alla presenza di fattori inibenti, alla variabilità intrinseca della PCR o mutazioni del sito bersaglio, oppure al limite di rilevazione della PCR (Tsalik E. L. *et al.*, 2010; Lucignano B. *et al.*, 2011).

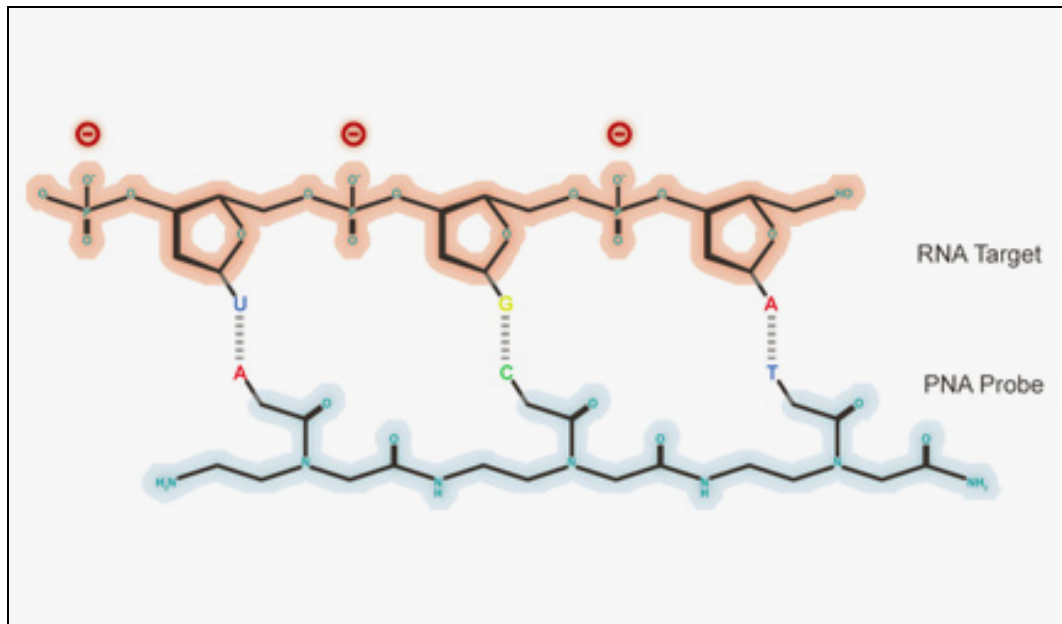
In vari studi è stata osservata una elevata concordanza tra SeptiFast e le emocolture, suggerendo che questo metodo molecolare potrebbe avere un valore aggiunto in associazione al metodo colturale per una diagnosi più rapida

di sepsi. Tsalik e colleghi hanno riscontrato una concordanza tra i due metodi dell'85,9% per i pazienti con sepsi, dell'83,3% per i pazienti con sepsi grave e dell'83,8% per i pazienti in shock settico (Tsalik E. L. *et al.*, 2010). In letteratura, altri autori hanno ottenuto una simile concordanza (Mancini N. *et al.*, 2008; Louie R. F. *et al.*, 2008; Dierkes C. *et al.*, 2009; Westh H. *et al.*, 2010).

Il tempo necessario per l'identificazione dell'agente eziologico con SeptiFast è di circa 6 ore, molto più breve rispetto a quello richiesto dal metodo colturale (24-72 ore). Nella realtà di laboratorio, però, i tempi di rilevazione del patogeno possono essere più lunghi, in media 18 ore (Lehmann L. E. *et al.*, 2008; Tsalik E. L. *et al.*, 2010; Lupetti A. *et al.*, 2010).

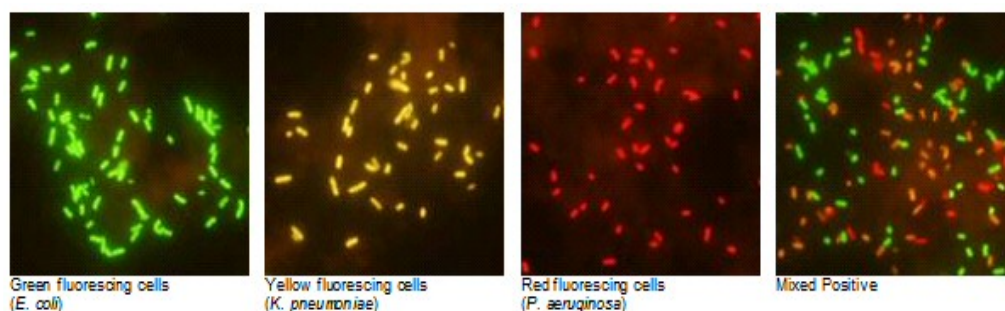
Attuali limiti del test comprendono il suo costo molto elevato (€ 150-200 per test) e la mancanza di qualsiasi informazione sulla suscettibilità agli antibiotici (Mancini N. *et al.*, 2010).

Un altro metodo molecolare utilizzato per l'identificazione dei microrganismi direttamente dalle emocolture positive è l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) con sonde oligonucleotidiche, in grado di legarsi a sequenze specie specifiche di rRNA batterici e fungini (16S rRNA, 26S rRNA). Una evoluzione delle classiche sonde sono le PNA (*Peptide Nucleic Acid*), oligomeri sintetici che mimano la struttura del DNA o dell'RNA, costituiti da unità ripetute di N-(2-amminoetil)-glicina, a cui sono legate le basi nucleotidiche tramite un legame metilene-carbonile (Pellestor F. *et al.*, 2008; Forrest G. N. *et al.*, 2008) (fig. 1.5.3). Le sonde PNA non contengono gruppi fosfato carichi, per cui l'ibridazione con il target è molto più forte rispetto a quella che si ha con le sonde classiche, grazie alla minore repulsione elettrostatica.

Fig. 1.5.3 Ibridazione della sonda PNA con RNA target

Attualmente, il test PNA FISH (AdvanDx; Woburn, MA) dispone di diverse sonde PNA (approvate dall'FDA) marcate con fluorocromi diversi, che permettono l'identificazione di alcuni microrganismi (*S. aureus*/Stafilococchi coagulasi negativi CNS, *E. coli*/*P. aeruginosa*, *E. faecalis*/Enterococcus spp., *E. coli*-*K. pneumoniae*/*P. aeruginosa*, *C. albicans*/*C. glabrata*, tripla sonda *C. albicans*/*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, o *C. glabrata*/*C. krusei*). In presenza di una emocoltura positiva, è possibile scegliere lo specifico kit di sonda PNA FISH sulla base delle informazioni riguardanti il possibile patogeno, ottenute eseguendo la colorazione di Gram.

Il test è molto semplice da eseguire e richiede poco tempo: una goccia di emocoltura viene spottata e fissata su un vetrino, e incubata con la sonda PNA. Alla fine, la fluorescenza emessa dalla sonda che ha ibridato con il target del microrganismo presente nel campione viene rilevata osservando il vetrino con un microscopio a fluorescenza (fig. 1.5.3.1).

Fig. 1.5.3.1 Fluorescenza emessa dalle sonde PNA FISH

In diversi studi, il test PNA FISH ha mostrato una sensibilità e una specificità molto elevate, rispettivamente del 99% e 100% (Wilson D. A. *et al.*, 2005; Forrest G. N. *et al.*, 2006; Forrest G. N. *et al.*, 2008; Tavares A. *et al.*, 2008; Hensley D. M. *et al.*, 2009; Peleg A. Y. *et al.*, 2009; Shepard J. R. *et al.*, 2008; Morgan M. *et al.*, 2010).

Dato il crescente aumento di farmacoresistenza, in particolare tra i Gram negativi, l'impiego di test in grado di identificare gli agenti patogeni in poche ore rappresenta un potenziale vantaggio rispetto ai metodi tradizionali, che possono richiedere da 1 a 3 giorni (Morgan M. *et al.*, 2010). Con questo metodo, l'identificazione presuntiva del patogeno si ottiene in 3 ore.

Studi di farmaco-economia sono stati condotti al fine di valutare l'impatto del test PNA FISH sulla riduzione dei costi della terapia antimicrobica. Forrest e colleghi hanno dimostrato che l'utilizzo del test PNA FISH per *S. aureus*/CNS ha determinato un minor utilizzo della vancomicina e una riduzione del periodo di permanenza in ospedale. Gli stessi autori, inoltre, hanno dimostrato che una rapida identificazione di *C. albicans* nelle emocolture ha consentito un notevole risparmio dei costi, soprattutto dovuti alla somministrazione di caspofungina, antifungino utilizzato empiricamente

nell'ospedale, in cui è stato effettuato lo studio (Forrest G. N. *et al.*, 2006). D'altra parte, il rapporto costo-efficacia del kit *S. aureus* è stato contestato da simili risultati ottenuti da altri test molto più economici, come il classico test della coagulasi in provetta, che viene eseguito direttamente su emocolture positive per stafilococchi e dà un risultato dopo solo 4 ore di incubazione (Hermsen E. D. *et al.*, 2008).

Nonostante questo metodo sia molto sensibile, specifico e rapido, presenta un grande limite, rappresentato dall'esiguo numero di sonde PNA genere- e specie-specifiche disponibili. Inoltre, un altro limite del test, comune a tutte le metodiche molecolari, è il fatto che non fornisce alcuna informazione sulla suscettibilità antimicrobica.

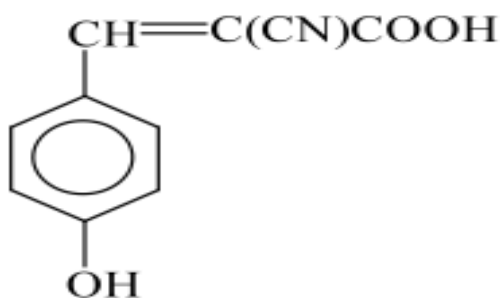
1.5.4 Spettrometria di massa MALDI-TOF

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica estremamente sensibile, che è stata sviluppata agli inizi del ventesimo secolo ed è stata utilizzata generalmente per acquisire conoscenze sulla struttura molecolare di composti incogniti e per determinazioni quantitative di composti noti; alla fine degli anni ottanta la sua applicazione è stata estesa anche all'analisi di macromolecole biologiche. Nel 1975, si ebbe la prima descrizione dell'uso di questa tecnica per l'identificazione batterica (Anhalt J. P. *et al.*, 1975). Tuttavia, ci è voluto molto tempo affinché la spettrometria di massa venisse applicata alla diagnosi microbiologica, a causa del limitato intervallo di massa

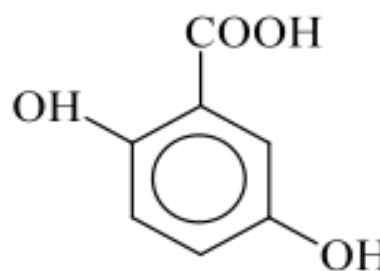
rilevabile (inferiore a 1500 Dalton), che ha ristretto il suo utilizzo a piccole molecole, come i lipidi. Queste limitazioni sono state superate con l'introduzione di una tecnica di ionizzazione "blanda", MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight*), per la quale nel 2002 Koichi Tanaka vinse il premio Nobel per la chimica (Sauer S. e Kliem M., 2010). Tale metodo di ionizzazione consente di analizzare composti poco volatili e termolabili, come le macromolecole biologiche ad elevato peso molecolare, senza provocarne la frammentazione (Brunelli T. *et al.*, 2010).

Con la spettrometria di massa MALDI-TOF è possibile identificare i microrganismi in pochi minuti, tramite la ionizzazione principalmente di proteine ribosomiali costantemente espresse, in abbondanza, nelle cellule batteriche, e più conservate rispetto alle proteine di superficie (Suh M. J. e Limbach P. A., 2004). Una singola colonia, isolata da campioni clinici, viene miscelata ad una matrice, un acido organico debole non volatile, con cromofori in grado di assorbire radiazioni UV e di formare cristalli. Le matrici più comunemente usate sono l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA) e l'acido 2,4-idrossifenil-benzoico (DHB) (fig. 1.5.4).

Fig. 1.5.4 Matrici



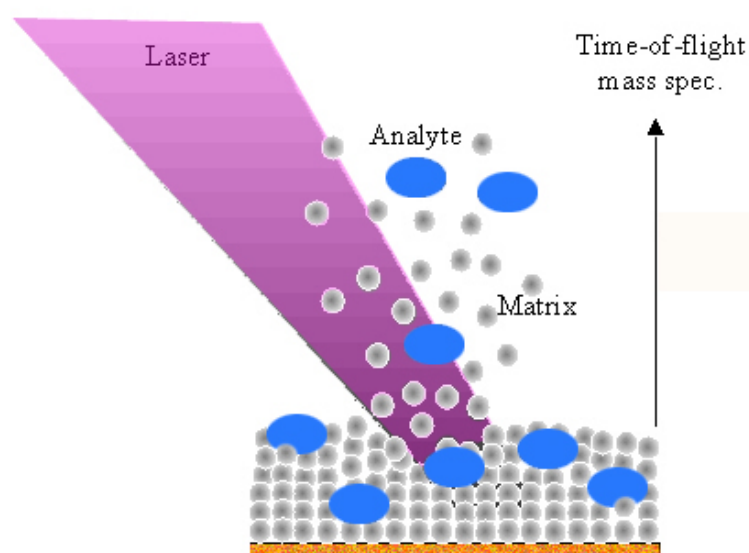
**Acido α -Ciano-4-idrossicinnamico
(HCCA)**



**Acido 2,5-Diidrossifenil benzoico
(DHB)**

Un laser pulsato (in genere, laser ad azoto) è utilizzato per ionizzare le molecole della matrice che, a sua volta, trasmettono l'energia al campione. Le molecole, caricate positivamente, passano allo stato gassoso: questo processo è chiamato desorbimento. La sorgente di ionizzazione MALDI generalmente causa la formazione di ioni monocarica.

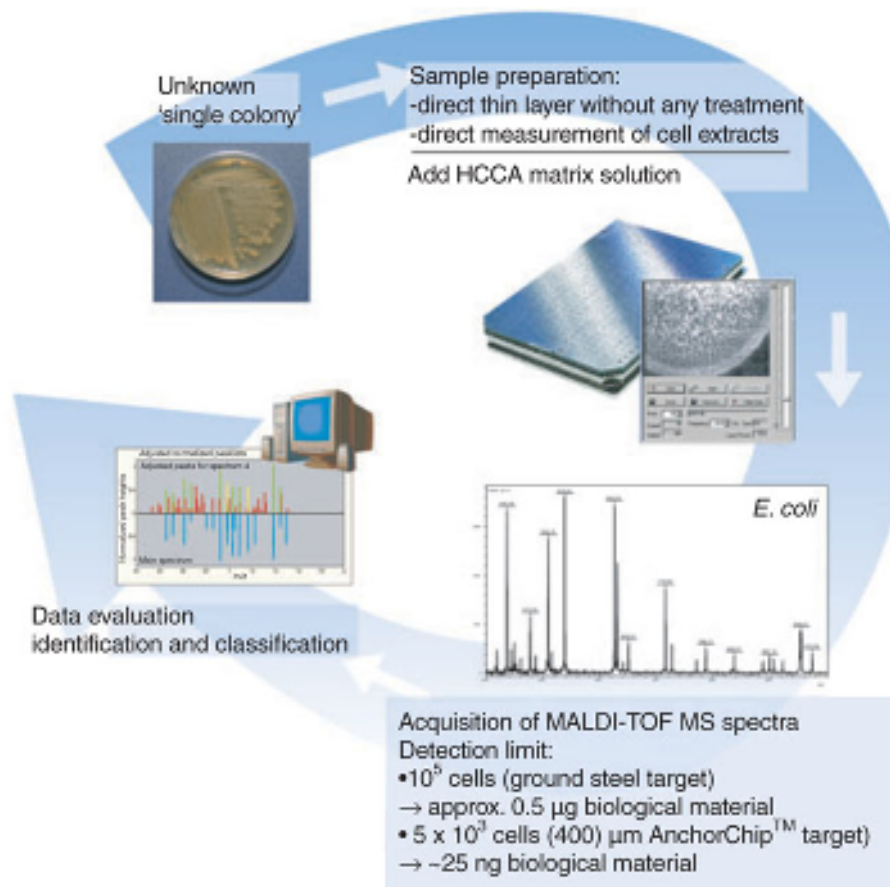
Fig. 1.5.4.1 Desorbimento/Ionizzazione



Lo spettrometro di massa MALDI-TOF è dotato di un analizzatore TOF (“*time of flight*”) costituito da un cilindro metallico sottoposto a vuoto, in cui i peptidi ionizzati vengono accelerati, attraverso l'applicazione di un elevato campo elettrostatico, e separati in base al rapporto massa/carica (m/z). L'analizzatore misura questo rapporto tramite la determinazione del tempo richiesto da ogni ione per percorrere il “tubo di volo” in tutta la sua lunghezza (*Linear ToF*): a

parità di energia cinetica, gli ioni dotati di una massa molecolare minore si muoveranno più velocemente e colpiranno il rivelatore prima di quelli con masse maggiori. I dati, giunti al rivelatore, vengono elaborati da un software, che genera per ogni campione analizzato uno spettro con masse dai 2.000 ai 20.000 Da. Lo spettro di massa, così ottenuto, viene confrontato con una banca dati, contenente gli spettri di riferimento di microrganismi ben conosciuti e caratterizzati (Fig. 1.5.4.2). Ad ogni identificazione viene assegnato un punteggio da 0 a 3000, che indica il grado di attendibilità.

Fig. 1.5.4.2 Identificazione con MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)



L'analisi di colonie batteriche e fungine mediante MALDI-TOF MS, produce dei profili spettrali genere- e specie-specifici riproducibili, che possono essere utilizzati per l'identificazione dei microrganismi a livello di specie. Questo sistema permette l'identificazione rapida di batteri Gram positivi, Gram negativi, micobatteri, lieviti e muffe (Hettick J. M. *et al.*, 2004; Pignone M. *et al.*, 2006; Carbonnelle E. *et al.*, 2007; Mellmann A. J. *et al.*, 2008; Qian J. *et al.*, 2008; Degand N. *et al.*, 2008; Seng P. *et al.*, 2009).

Attualmente, due sistemi MALDI-TOF MS sono disponibili in commercio e sono già utilizzati in diversi laboratori di microbiologia: uno è prodotto da Bruker Daltonics e l'altro da Shimadzu Corporation. Ciascuno ha sviluppato il proprio software e una propria banca dati, che contiene fino a 2000 specie con oltre 3000 spettri (rispettivamente, MALDI Biotyper e SARAMIS) (Emonet *et al.*, 2010).

Mediante questi sistemi MALDI-TOF MS, è stata ottenuta una corretta identificazione a livello di specie per i batteri comunemente isolati nel 80-99% dei casi (Seng P. *et al.*, 2009; Benagli C. *et al.*, 2009; Bizzini A. *et al.*, 2010; van Veen S. Q *et al.*, 2010; Cherkaoui A. *et al.*, 2010).

Recenti studi hanno mostrato i vantaggi dell'utilizzo della spettrometria di massa MALDI-TOF applicata anche alle emocolture positive. Sono stati proposti diversi metodi di preparazione del campione, che comprende l'estrazione delle proteine ma, attualmente, non ci sono protocolli standardizzati (Ferreira L. *et al.*, 2010). Spesso i protocolli proposti prevedono diversi passaggi di centrifugazione, a partire da una aliquota di emocoltura, necessari per eliminare l'emoglobina e le proteine del siero che possono interferire nell'interpretazione degli spettri, rendendo però la metodica laboriosa e lunga.

La Scola e Raoult hanno utilizzato due diversi protocolli, che prevedevano tre centrifugazioni ciascuno, ottenendo una corretta identificazione dei batteri in poco meno dell'80% delle emocolture positive (La Scola B. e Raoult D., 2010). Stevenson e colleghi, invece, hanno ottenuto il 95,3% di identificazioni corrette, con l'impiego di un protocollo che prevede ben 7 centrifugazioni; Ferroni e colleghi hanno utilizzato un detergente e l'acido trifluoroacetico (TFA) per l'estrazione delle proteine, che gli ha permesso di identificare il 98% dei microrganismi (Stevenson *et al.*, 2010; Ferroni A. *et al.*, 2010). In presenza di emocolture polimicrobiche, però, l'identificazione dei batteri mediante MALDI-TOF MS risulta complicata dalla simultanea presenza negli spettri di segnali caratteristici per entrambe le specie, oltre che dalla possibile soppressione di alcuni segnali tipici delle singole specie (Brunelli T. *et al.*, 2010).

L'utilizzo di questa nuova tecnica consente di ridurre i tempi di risposta in quanto, dal momento che l'emocoltura si positivizza, in pochi minuti è possibile identificare il patogeno presente nel flacone senza attendere la crescita su terreni solidi. Al momento, un limite può essere rappresentato dal fatto che non fornisce alcuna informazione sulla suscettibilità antimicrobica del patogeno identificato.

In conclusione, la spettrometria di massa MALDI-TOF è un metodo rapido che utilizza reagenti a basso costo, necessita di una minima preparazione del campione e, quindi, può essere considerato un'alternativa valida ai convenzionali sistemi di identificazione biochimici e molecolari (Brunelli T. *et al.*, 2010).

2. SCOPO DELLA TESI

Le infezioni sistemiche costituiscono una rilevante causa di morbilità e di mortalità. Negli ultimi 20 anni, il numero di persone che, nel mondo, muoiono di sepsi è raddoppiato e sempre più pazienti, che versano già in condizioni critiche, hanno un elevato rischio di svilupparla.

La precocità dell'intervento terapeutico, inclusa la somministrazione di antibiotici attivi sull'agente eziologico, risulta decisiva ai fini prognostici. In letteratura, numerosi studi dimostrano che una precoce somministrazione di antibiotici è associata ad una riduzione della mortalità. Tuttavia, una corretta terapia antibiotica empirica, in assenza della diagnosi microbiologica, non è sempre facile da individuarsi e, spesso, contribuisce all'instaurarsi di resistenze e all'aumento dei costi di trattamento. Quindi, una diagnosi microbiologica rapida e accurata è essenziale per i clinici che devono scegliere se proseguire la terapia empirica instaurata o se modificarla.

L'emocoltura, su cui tradizionalmente si basa la diagnosi microbiologica di infezione sistemica, presenta diversi limiti, nonostante permetta di saggiarne anche la suscettibilità agli antibiotici. Il limite principale è rappresentato dal fatto che, di norma, i risultati si ottengono non prima di 48 ore, dopo che i flaconi dell'emocoltura siano pervenuti al laboratorio. Per ridurre i tempi di indagine, diversi test aggiuntivi, che includono le tecniche molecolari, possono essere eseguite sulle emocolture positive o direttamente su campioni di sangue.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare e confrontare i diversi metodi disponibili per la diagnosi di infezione sistemica, molecolari e non,

saggiati presso il Laboratorio della U.O di Microbiologia Universitaria della Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, e di metterli a confronto con il metodo colturale tradizionale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Metodo tradizionale

3.1.1 Sistema a monitoraggio continuo per emocolture

Il sistema di incubazione e rilevazione della crescita microbica utilizzato nel Laboratorio di Microbiologia Universitaria è il sistema FX, ultima evoluzione della serie Bactec 9000 (Becton Dickinson, USA). Tale sistema si avvale dell'utilizzo di flaconi dedicati, contenenti brodo di coltura per microrganismi aerobi ed anaerobi (Bactec Aerobic, Bactec Anaerobic, Bactec Peds plus).

Il brodo di coltura, costituito da tripticato di soia, contiene polianetolsulfonato di sodio 0,025/0,05% come agente anticoagulante e resine adsorbenti eventuali farmaci antibatterici, al fine di migliorare la sensibilità dell'indagine colturale.

I flaconi, giunti in laboratorio, vengono incubati per 14 giorni nelle apposite celle del sistema FX, che agita e tiene in incubazione termostata a 35°C simultaneamente fino a 200 flaconi. La produzione di CO₂, derivante dal metabolismo microbico, è direttamente proporzionale alla crescita batterica. Il sistema evidenzia la produzione di CO₂, in base alla emissione di fluorescenza da parte di un sensore fluorogenico incorporato nei flaconi. La lettura di ciascun flacone viene effettuata ad intervalli di 10 minuti.

Il rapporto fluorescenza/tempo di crescita viene registrato su un diagramma cartesiano, che mostra la curva di crescita del microrganismo. Il sistema segnala acusticamente ed otticamente le positività rilevate. Il tempo di positività (l'intervallo di tempo compreso fra l'inserimento del flacone nello strumento e la rilevazione della positività) fornito da FX è un parametro variabile. Se dopo un periodo di incubazione di 14 giorni non si evidenzia crescita batterica all'interno del flacone, l'emocoltura viene considerata negativa.

Alcuni flaconi possono risultare erroneamente positivi a seguito della produzione di CO₂ da parte di leucociti; quindi l'effettiva positività deve essere regolarmente controllata mediante subcoltura. L'esame batterioscopico è importante sia per indirizzare la scelta dei terreni da utilizzare per il prosieguo dell'indagine microbiologica, sia per fornire informazioni utili al Reparto per l'orientamento della terapia empirica.

3.1.2 Metodo colturale

In caso di positività del flacone, si esegue una subcoltura su terreni che garantiscano la crescita del microrganismo.

I terreni di coltura maggiormente usati sono: agar sangue, agar cioccolato (per i batteri più esigenti), agar Mac Conkey (terreno selettivo e discriminativo per batteri Gram-negativi), agar sale-mannite (terreno selettivo e discriminativo per stafilococchi), agar Saboraud (per i lieviti). Dopo aver seminato "ad isolamento" con ansa sterile una goccia di brodocoltura

proveniente dal flacone positivo, si incubano le piastre seminate nel termostato a 37°C, in atmosfera opportuna. Dopo 24 ore, si verifica se c'è stata crescita sui terreni e se la coltura è pura. Nel caso in cui l'emocoltura risulti essere monomicrobica, si può procedere con l'identificazione del ceppo isolato su piastra e con il saggio di suscettibilità antimicrobica con il sistema automatizzato Vitek 2 (bioMérieux).

3.1.3 Sistema di identificazione e antibiogramma

I saggi di identificazione e di suscettibilità antimicrobica sono stati eseguiti con il sistema automatizzato Vitek 2 (bioMérieux, Francia).

Lo strumento permette l'identificazione e la determinazione della suscettibilità agli antibiotici (AST) tramite l'utilizzo di speciali card, formate da un supporto plastico con 64 pozzetti contenenti, rispettivamente, reagenti biochimici o antibiotici. Nella card è preinserito il tubicino di trasferimento della sospensione del microorganismo e un'etichetta con codice a barre che permette il collegamento tra card e numero di riferimento del paziente.

Il Vitek 2 consente l'identificazione dei cocci Gram-positivi, dei bacilli Gram-negativi e dei lieviti. Lo strumento è anche in grado di saggiare, con la metodica della microdiluzione, 32 antibiotici per i cocci Gram-positivi e 46 antibiotici per i bacilli Gram-negativi, distribuiti in numero di circa 20 per card.

Il tempo medio necessario per un test di suscettibilità antimicrobica è mediamente di 5-7 ore, in un range che varia dalle 2 alle 18 ore: il tempo varia

secondo il microrganismo in esame. Il Vitek 2 AST utilizza una tecnologia turbidimetrica. Essenziale complemento del Vitek 2 è l'Advanced Expert System (AES): questo è un software innovativo per migliorare il risultato delle AST. Esso si basa su tre fasi di azione ed analizza approfonditamente i risultati dei test di identificazione ed antibiogramma:

1. conferma biologica della qualità dei risultati "in vitro", dal punto di vista tecnico;
2. interpretazione del risultato per facilitare e migliorare le terapie;
3. aggiunta sistematica di consigli che il microbiologo desidera trasmettere ai clinici.

Una sospensione del microrganismo viene preparata nella soluzione Airlife 0,45% NaCl fino a raggiungere la concentrazione standard di 0.65-0.75 McFarland al densitometro DensiCheck. Le card Vitek 2 e le provette vengono caricate nelle cassette SCS (Smart Carrier Station). I processi di inoculazione, incubazione e lettura sono eseguiti automaticamente dallo strumento. La struttura interna del Vitek 2 consiste di diverse stazioni di processazione del campione e di un lettore/incubatore. Le informazioni del paziente vengono memorizzate mediante il lettore del codice a barre SCS e trasferite allo strumento tramite un microchip contenuto nella cassetta. Completato l'intero processo, le card sono automaticamente eliminate in un apposito contenitore.

3.1.4 Metodo rapido

Se l'esame batterioscopico, dopo colorazione di Gram, mette in evidenza la presenza di batteri Gram-negativi morfologicamente omogenei, è possibile proseguire l'indagine utilizzando il metodo rapido.

Quest'ultimo consiste nel prelevare, con una siringa, circa 8-9 ml di brodocoltura dal flacone di emocoltura positivo, per dispensarli in una particolare provetta contenente un gel separatore (Serum Separatum Tubes, Becton Dickinson). Segue una centrifugazione a 2000xg per 10 minuti. Dopo centrifugazione, i globuli rossi e altri elementi figurati del sangue precipitano al di sotto del gel. Si scarta, quindi, il sovrinatante e si raccoglie con una pipette sterile la sospensione microbica di colore biancastro che si è depositata sulla superficie del gel separatore, stando attenti a non raccogliere il gel o eventuali contaminanti. Con il materiale raccolto, e servendosi di un densitometro DensiChek Vitek, si prepara una sospensione batterica in 3 ml di Airlife 0.45% NaCl di torbidità compresa tra 0.65 e 0.75 McFarland, che si utilizzerà per eseguire i saggi di identificazione e suscettibilità antimicrobica del ceppo in esame con il Vitek 2. Lo stesso procedimento è stato eseguito con un altro sistema automatizzato: il sistema Phoenix (Becton Dickinson, USA). Questo strumento permette l'identificazione e la determinazione delle AST tramite l'utilizzo di pannelli specifici provvisti di 136 micropozzetti da 50 µl contenenti reagenti essiccati, rispettivamente 51 dedicati all'ID e 85 per le AST. Per l'identificazione, il sistema Phoenix utilizza i metodi classici, che includono test di fermentazione, ossidazione, degradazione ed idrolisi di vari substrati (cromogeni, fluorogeni e a base di carbonio). I test si basano sull'utilizzazione e sulla degradazione microbica di questi substrati specifici

rilevati da vari sistemi indicatori. Per la AST si utilizza il test di microdiluizione in brodo. Lo strumento utilizza un indicatore di ossidoriduzione per rilevare la crescita di un microrganismo in presenza di un antibiotico. Per la determinazione della crescita batterica vengono effettuate misurazioni continue dei cambiamenti sia dell'indicatore che della torbidità batterica.

Nel brodo ID Phoenix si prepara una sospensione batterica di 0,5 McFarland, utilizzando un nefelometro PhoenixSpec P/N 440910 (Becton Dickinson); si trasferiscono 25 µl di questa sospensione nel brodo Phoenix AST, a cui è stata aggiunta una goccia di indicatore e, infine, si trasferiscono le sospensioni preparate nei pannelli appropriati.

Mentre per i batteri Gram negativi sono stati pubblicati numerosi studi sull'allestimento di metodi rapidi per l'identificazione e l'antibiogramma direttamente da emocoltura, la letteratura scientifica non riporta, a tutt'oggi, metodi altrettanto validi riguardo ai batteri Gram positivi.

Il primo punto critico della procedura per l'allestimento del test rapido è il recupero dei batteri dal flacone di emocoltura. E' stato evidenziato che il sedimento batterico, formato dopo centrifugazione sulla superficie del gel separatore, è più abbondante per i germi Gram negativi rispetto ai germi Gram positivi. Una piccola modifica al test rapido tradizionale, consistente nell'aggiunta di saponina al brodo di coltura contenente il sangue, risulta promettente per il recupero anche dei batteri Gram positivi. La procedura eseguita secondo tale nuovo metodo è stata la seguente:

- si prelevano 7 ml di brodocoltura dal flacone di emocoltura positivo contenente batteri Gram-positivi. Al campione si aggiunge una soluzione

di saponina all'1%, preparata in Airlife 0.45% NaCl, ad una concentrazione finale di 0.01%;

- il campione viene incubato in termostato a 37°C per 15 minuti, trasferito nella provetta contenente il gel separatore e trattato, come descritto precedentemente, per l'esecuzione del test rapido.

3.2 Metodi molecolari

3.2.1 LightCycler[®] SeptiFast M^{Grade}

Il LightCycler[®] SeptiFast M^{Grade} (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) è un test di amplificazione in vitro di acidi nucleici basato sulla tecnologia PCR multiplex real-time e sviluppato per la rilevazione e l'identificazione di DNA di batteri e di funghi in campioni di sangue umano intero in EDTA, utilizzando il sistema LightCycler[®] 2.0.

Il test si esegue secondo tre passaggi analitici principali:

1. preparazione del campione mediante lisi meccanica e purificazione del DNA dal sangue intero;
2. reazioni di amplificazione con tecnologia real-time (3 reazioni separate per batteri Gram positivi, Gram negativi e miceti) e successiva identificazione degli ampliconi, eventualmente presenti, mediante sonde specifiche;
3. analisi dei risultati con software dedicato. In particolare, il software analitico (SeptiFast Identification Software-SIS, Roche) consente, grazie ad una valutazione combinata delle temperature di melting, dei picchi e delle aree relative alle curve di melting, di stabilire se la presenza di DNA di stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS), o di streptococchi, sia da considerare come una contaminazione del campione e se il risultato si debba considerare rilevante dal punto di vista clinico. Il test è, inoltre, dotato di un sistema di controllo di qualità interno, i cui risultati sono valutati dal SIS, come presupposto per il rilascio di risultati validi.

Il flusso di lavoro per l'esecuzione del test è stato eseguito in ambiente "DNA-free" con l'impiego di reagenti e materiale monouso, fornito dal produttore. Inoltre, per far sì che il flusso di lavoro fosse completamente privo di potenziali contaminazioni da DNA ambientale, sono stati individuati locali idonei e dedicati per ciascuna fase della procedura.

La sensibilità analitica del metodo LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}, dichiarata da Roche, è di 30 CFU/ml di sangue in EDTA per tutte le specie, con la sola eccezione di *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida glabrata*, per le quali il valore minimo di sensibilità è di 100 CFU/ml.

Il volume di sangue iniziale è di 1,5 ml: il campione deve essere agitato sul "roller mixer" 30 minuti prima di essere processato.

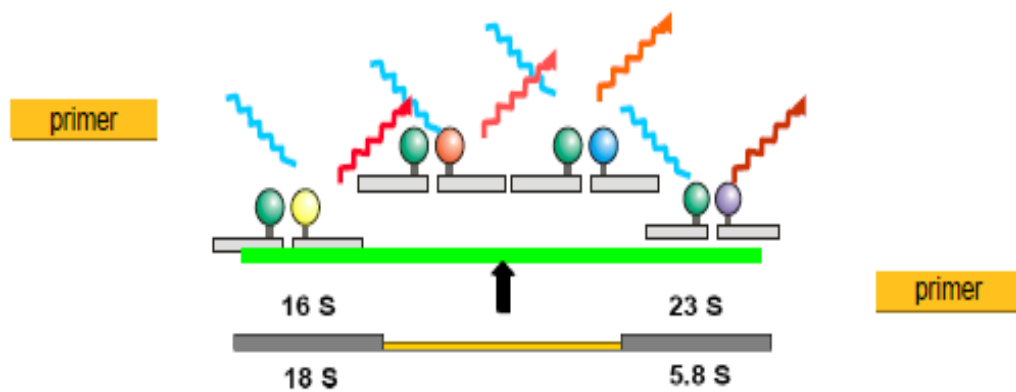
Ogni seduta di lavoro permette di esaminare al massimo 7 campioni alla volta.

La lisi meccanica dei campioni viene eseguita utilizzando il *SeptiFast Lys Kit M^{GRADE}* e lo strumento *MagNa Lyser* con biglie di vetro/ceramica. Il DNA di batteri e funghi, ottenuto dai campioni lisati, viene isolato e purificato utilizzando il test *SeptiFast Prep Kit M^{GRADE}*, che prevede l'incubazione a temperatura elevata di questi con una proteasi e un tampone di lisi caotropico, che rilascia gli acidi nucleici e li protegge dalle DNAsi cellulari.

In ciascun campione, insieme al reagente di lisi, viene introdotto un controllo interno, costituito da molecole di DNA sintetiche a doppio filamento, con siti di legame per i primer identici a quelli delle sequenze bersaglio e, contenente le regioni univoche di legame alla sonda HibProbe. Quest'ultime consentono la differenziazione del controllo interno amplificato dall'amplicone specifico del bersaglio. Dopo l'aggiunta di un tampone di "binding", la miscela

viene trasferita in una colonnina con un filtro in fibra di vetro, a cui si lega il DNA bersaglio del genoma umano e dei batteri/funghi; le sostanze non legate, come ad esempio sali, proteine ed altri frammenti cellulari, vengono eliminate con due fasi di lavaggio, al termine delle quali gli acidi nucleici assorbiti vengono eluiti a temperatura elevata. A questo punto, 50 µl di eluato contenente DNA viene sottoposto ad amplificazione PCR real-time in tre reazioni parallele e a rivelazione con sonde di ibridazione specifiche. La regione bersaglio delle specie batteriche e fungine da amplificare è quella ITS (Internal Transcribed Spacer), situata tra le regioni 16S e 23S del DNA ribosomiale batterico e tra le sequenze 18S e 5.8S di quello fungino (Fig. 3.2.1).

Fig. 3.2.1 Regione bersaglio: sequenze ITS



Prima dell'amplificazione, il rischio di contaminazione viene ridotto utilizzando l'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi), che riconosce e catalizza la reazione di distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossituridina, ma

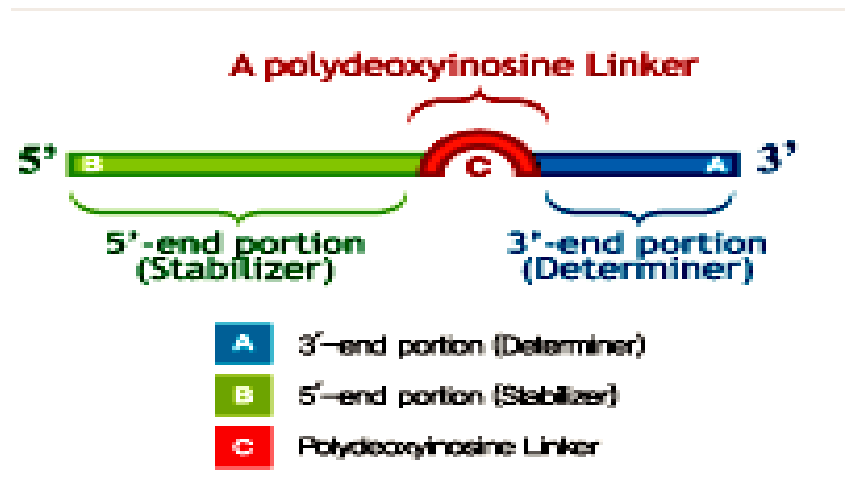
non di quelli contenenti deossitimidina. I campioni trattati vengono aggiunti alla miscela di amplificazione contenente Taq polimerasi di tipo “hot start” nei capillari LightCycler M^{GRADE}, in cui ha luogo l’amplificazione. La rilevazione dell’amplicone avviene mediante fluorescenza, tramite una coppia di sonde HibProbe. Durante la fase di “annealing” del ciclo di amplificazione, le sonde marcate con fluorocromi ibridizzano sulla sequenza bersaglio. La fluorescenza emessa viene misurata dallo strumento LightCycler 2.0 in uno dei quattro distinti canali di rivelazione. Al termine dell’amplificazione, il software di identificazione dedicato (SeptiFast Identification Software Set) esegue un’analisi della curva di melting (grafico della percentuale di DNA duplex in funzione della temperatura) e, le sonde, rilevate in un canale, permettono di differenziare le varie specie in base alle loro T_m (temperatura alla quale il 50% della molecola di DNA è presente sotto forma di doppia elica).

I risultati del LightCycler sono stati considerati negativi quando il controllo interno era positivo e non era stato rilevato nessun altro segnale; sono stati considerati negativi i campioni, in cui il controllo interno è risultato negativo. Inoltre, il microrganismo è stato considerato un agente eziologico infettivo o un contaminante sulla base dei dati clinici: temperatura corporea, conta leucocitaria, proteina C-reattiva, e la rilevazione dello stesso microrganismo nel sangue nei giorni precedenti o successivi.

3.2.2 Magicplex™ Sepsis Real-Time PCR

Il test Magicplex™ Sepsis è un saggio che permette la simultanea amplificazione degli acidi nucleici bersaglio di oltre 90 agenti patogeni responsabili di sepsi (73 Gram positivi, 12 Gram negativi, 6 lieviti) e di tre geni di resistenza agli antibiotici (*vanA*, *vanB*, *mecA*), a partire da campioni di sangue intero in EDTA. Questo metodo è composto da 2 processi: uno step di PCR multiplex con primer a doppio innesco DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) (Fig. 3.2.2) sullo strumento SeeAMP™ (Seegene) e un secondo step che è un vero e proprio step di rilevamento degli ampliconi sullo strumento CFX96 *Real-Time System* (BioRad).

Fig. 3.2.2 Primer DPO™



1 ml di sangue intero in EDTA viene pretrattato con un buffer caotropico, per il rilascio del DNA umano dalle cellule del sangue che, successivamente, viene degradato tramite l'enzima *MolDNasi B*. Questa procedura si basa sulla

tecnologia *MOLYsis Molzym*, che consente un arricchimento del DNA microbico di 40.000 volte rispetto alle tecnologie convenzionali, aumentando così la sensibilità e la specificità di analisi. Alla fine di questa procedura, quindi, l'isolamento e la purificazione del DNA microbico vengono eseguiti con lo strumento Seeprep12 (Seegene Nordiag), basato sul sistema "Arrow", utilizzando il kit *SelectNATM Blood Pathogen* (Molzym GmbH).

Di seguito, sono descritti in dettaglio i protocolli delle varie fasi del test.

Pretrattamento:

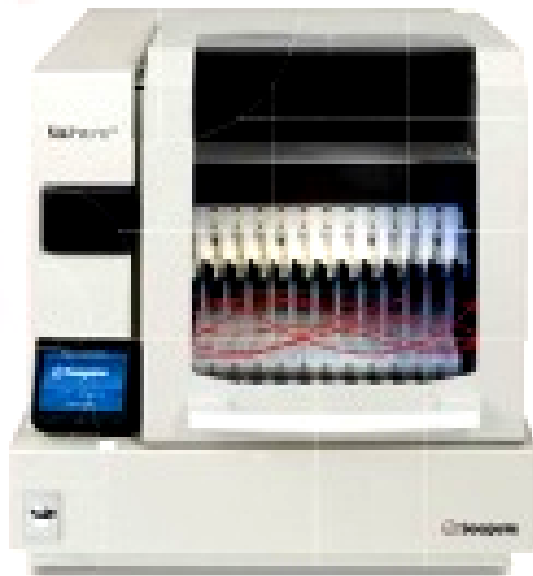
- 250 µl di buffer CM (buffer caotropico) si aggiungono ad 1 ml di sangue intero; si vortexa per 15 s e si lascia a temperatura ambiente (+18-+25°C) per 5 min;
- 250 µl di buffer DB1 e 10 µl di MolDNasi B si aggiungono al lisato e si vortexa immediatamente per 15 s;
- si centrifuga a 12.000 x g per 10 min e successivamente si rimuove il sovrnatante; il pellet si risospende in 1 ml di buffer RS e si vortexa;
- si centrifuga a 12.000 x g per 5 min, alla fine dei quali si rimuove il sovrnatante. Questo lavaggio serve per eliminare i residui dell'enzima MolDNasi B, il buffer caotropico e gli inibitori della reazione di PCR.

A questo punto, la procedura può essere interrotta e il campione può essere congelato a -15/ -25°C, oppure si procede direttamente con i seguenti passaggi:

- si aggiungono 80 µl di buffer RL per risospendere il pellet, costituito da detriti di cellule del sangue e di cellule batteriche;
- si aggiungono 20 µl della soluzione *BugLysis* e 1.4 µl di βmercaptoetanololo e si vortexa per 15 s.

Successivamente, si esegue l'estrazione vera e propria del DNA del batterio patogeno sull'estrattore Seeprep12 (Fig. 3.2.2.1). La procedura è automatica e permette di analizzare al massimo 12 campioni alla volta in 90 min.

Fig. 3.2.2.1 Seeprep12 (Seegene Nordiag)



Gli estratti, quindi, vengono sottoposti al primo step di amplificazione (PCR multiplex), con il quale viene creata la “*amplicon bank*”, che verrà poi utilizzata per la fase di rilevamento in PCR real time.

PCR multiplex

Per ogni campione biologico vengono eseguite due amplificazioni separate, una per batteri Gram positivi/geni di resistenza e una per Gram negativi/lieviti (Fig. 3.2.2.2).

Fig. 3.2.2.2 Amplificazione

Amplification

Amplicon Bank 1. Gram (+) bacteria / DR

73 Gram (+) bacteria

3 Drug resistance markers

Amplicon Bank 2. Gram (-) bacteria / Fungi

12 Gram (-) bacteria / 6 Fungi

Per ogni campione, la miscela di reazione viene preparata nel modo seguente:

- in provette per PCR da 0,2 ml, si aliquotano 30 µl Mastermix PCR (2x), costituita da 5 µl della miscela di primer al 10x (per Gram positivi/Drug Resistance, e per Gram negativi/lieviti);
- ad ogni provetta si aggiungono 20 µl di ogni campione estratto, e poi si posizionano le provette in un termociclatore preriscaldato a 94°C; a questo punto si fa iniziare la PCR impostando sullo strumento il programma mostrato nella tabella 3.2.2.

Tab. 3.2.2 Programma PCR multiplex

SEGMENTO	N° DI CICLI	TEMPERATURA	DURATA
1	1	94°C	15 min
2	10	94°C	30 sec
		60°C	90 sec
		72°C	60 sec
3	35	94°C	30 sec
		60°C	30 sec
		72°C	30 sec
4	1	72°C	2 min

Al termine di questa amplificazione, segue la fase di “*detection-screening*” che viene eseguita su uno strumento real time.

PCR multiplex real time

Permette di avere uno screening positivo/negativo per tre pannelli, “Gram positivi”, “Drug Resistance”, “Gram negativi/lieviti” (Fig. 3.2.2.3).

Fig. 3.2.2.3 Screening

Screening

Gram (+) bacteria Screening

Streptococcus spp.

Enterococcus spp.

Staphylococcus spp.

Drug Resistance (DR) Screening

vanA

vanB

mecA

Gram (-) bacteria / Fungi Screening

Gram (-) bacteria-A

Gram (-) bacteria-B

Fungi

La miscela di reazione viene preparata aliquotando 18 µl di “detection mastermix” in una piastra da 96 pozzetti e aggiungendo 2 µl dell’amplificato ottenuto dalla PCR multiplex.

La piastra, quindi, viene inserita nel termociclatore per PCR real-time, impostando il programma mostrato in tabella 3.2.2.1.

Tab. 3.2.2.1 Programma PCR real-time

SEGMENTO	N° DI CICLI	TEMPERATURA	DURATA
1	1	94°C	2 min
2	15	95°C	20 sec
3		60°C	40 sec

In caso di positività per uno o più di questi pannelli è possibile identificare il patogeno (Fig. 3.2.2.4) con un altro step di PCR real time. Il risultato si ottiene in 30 min.

Fig. 3.2.2.4 Identificazione

Identification		
ID 1.	ID 2.	ID 3.
<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>
ID 4.	ID 5.	ID 6.
<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. mirabilis</i>
ID 7.	ID 8.	ID 9.
<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>A. fumigatus</i>

3.2.3 Ibridazione fluorescente *in situ* PNA FISH

In presenza di segnalata positività del flacone di emocoltura, si sceglie lo specifico kit di sonda PNA FISH sulla base delle informazioni riguardanti il germe patogeno, ottenute dall'esame batterioscopico, dopo colorazione di Gram, e si procede all'allestimento dei vetrini per l'ibridazione fluorescente *in situ*.

Preparazione dei vetrini:

- una goccia della soluzione di fissaggio si pone sul vetrino per microscopia;
- 10 µl o una piccola goccia della coltura si aggiunge con una siringa nella soluzione di fissaggio e si mescola delicatamente per emulsionare;
- si fissano le cellule: si scaldano i preparati per 20 min a 55-80°C, si lasciano asciugare e poi si fissano alla fiamma, oppure con metanolo.

Ibridazione:

- si aggiunge una goccia della sonda PNA sul vetrino fissato precedentemente e sul vetrino di "Controllo PNA FISH";
- si posizionano i coprivetrini evitando la formazione di bolle e si incubano i vetrini per 30 min a 55±1°C;
- servendosi di un portavetrini, si immergono i vetrini in una soluzione di lavaggio preriscaldata a 55±1°C e si rimuovono delicatamente i coprivetrini. Per i preparati con i bacilli Gram negativi è necessario un

passaggio preliminare in acqua distillata preriscaldata per meno di 1 minuto.

- Si incubano i vetrini per 30 minuti a $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ e successivamente si lasciano asciugare all'aria.

Montaggio e osservazione:

- Si aggiunge una goccia di "*Mounting Medium*" al preparato e si posizionano i copri vetrini, evitando la formazione di bolle;
- si osservano i vetrini al microscopio a fluorescenza, utilizzando l'obiettivo 60x o 100x ad immersione.

4. RISULTATI

4.1 Metodo tradizionale

I campioni di sangue, pervenuti all'Unità Operativa di Microbiologia Universitaria (Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana), sono stati ottenuti da pazienti ricoverati nel reparto di Ematologia ed Ematologia Pediatrica, di Neonatologia, del Centro Grandi Ustioni e dell'Unità di Terapia Intensiva della Sezione di Trapiantologia Epatica.

Per ogni paziente incluso nello studio è stata utilizzata ogni prima emocoltura positiva contenente microrganismi Gram-positivi che è apparsa monomicrobica all'esame batterioscopico. Nel complesso, sono state analizzate 215 emocolture. Dopo subcoltura su piastra di agar sangue, 26 (12,1%) tra i campioni in esame sono risultati essere polimicrobici e, pertanto, sono stati esclusi dallo studio. Dei restanti 189 campioni monomicrobici, 183 microrganismi Gram positivi (97%) sono stati correttamente identificati dal metodo colturale tradizionale, utilizzando il sistema Vitek2; 3 microrganismi non sono stati identificati e, quindi, sono stati esclusi dallo studio, mentre altri 3 microrganismi sono stati identificati in maniera errata.

In parallelo al metodo tradizionale, i campioni monomicrobici sono stati analizzati mediante il metodo rapido (vedi paragrafo 3.1.4), utilizzando il sistema Vitek 2 per 118 emocolture e il sistema Phoenix per le altre 68.

I microrganismi correttamente identificati mediante il metodo colturale tradizionale sono riportati nelle seguenti tabelle (Tab. 4.1.1 e tab. 4.1.2).

Tab. 4.1.1 Identificazioni ottenute con il metodo colturale tradizionale utilizzati per il confronto con il metodo rapido mediante Vitek2

SPECIE	N° IDENTIFICAZIONI (%)
<i>S. epidermidis</i>	63 (53,4%)
<i>S. aureus</i>	13 (11%)
<i>S. haemolyticus</i>	11 (9,3%)
<i>S. hominis</i>	9 (7,6%)
<i>S. capitis</i>	2 (1,6%)
<i>S. warneri</i>	1 (0,9%)
<i>S. agalactiae</i>	3 (2,5%)
<i>S. pyogenes</i>	1 (0,9%)
<i>E. faecalis</i>	5 (4,2%)
<i>E. faecium</i>	3 (2,5%)
<i>E. durans</i>	1 (0,9%)
<i>Micrococcus luteus/lylae</i>	1 (0,9%)
<i>Bacillus megaterium</i>	1 (0,9%)
<i>Bacillus cereus</i>	1 (0,9%)
<i>Kokuria kristinae</i>	1 (0,9%)

Tab. 4.1.2 Identificazioni ottenute mediante metodo tradizionale, utilizzati per il confronto con il metodo rapido mediante Phoenix

SPECIE	N° IDENTIFICAZIONI (%)
<i>S. epidermidis</i>	42 (62%)
<i>S. hominis</i>	8 (12%)
<i>S. haemolyticus</i>	7 (12%)
<i>S. aureus</i>	3 (4%)
<i>S. warneri</i>	1 (1%)
<i>E. faecium</i>	4 (6%)
<i>S. agalactiae</i>	1 (1%)
<i>S. pyogenes</i>	1 (1%)
<i>S. oralis</i> gruppo <i>mitis</i>	1 (1%)

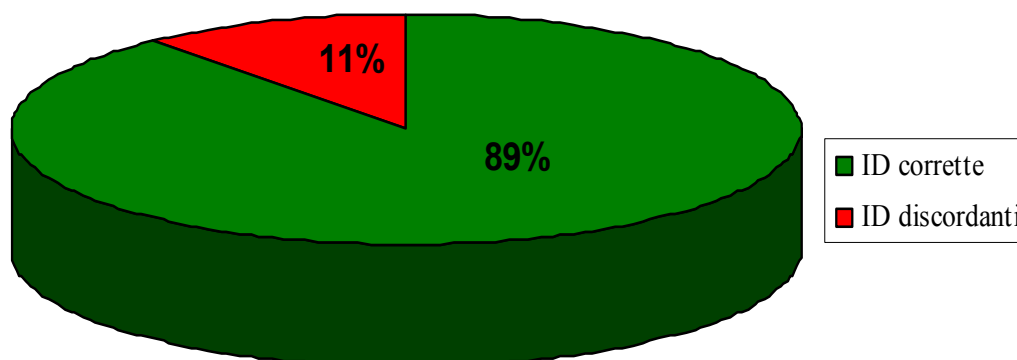
In base alla disposizione dei batteri, osservata all'esame batterioscopico, sono state allestite le card ID-GP ed AST-580 quando i cocci Gram-positivi erano disposti in ammassi irregolari, e le ID-GP ed AST-586 quando i cocci Gram-positivi erano disposti in catenelle. In totale, sono stati eseguiti 2124 test di sensibilità.

Nel caso in cui l'esame batterioscopico evidenziasse la presenza di bacilli Gram-positivi, per i quali non sono disponibili card per i saggi di identificazione e di suscettibilità antimicrobica, sono stati utilizzati, rispettivamente, i seguenti metodi manuali: API 50 CH test strip (bioMérieux) e E-test®.

4.1.1 Metodo rapido (sistema Vitek 2): confronto con il metodo colturale tradizionale

Il metodo rapido è stato valutato utilizzando come riferimento i risultati ottenuti con il metodo colturale tradizionale. I risultati hanno evidenziato che, con il nuovo metodo, 105 (89%) dei 118 microrganismi Gram-positivi sono stati correttamente identificati, mentre 13 (11%) sono stati erroneamente identificati a livello di genere o di specie (Tab. 4.1.1.1, fig. 4.1.1.1).

Fig. 4.1.1.1 Confronto tra processo di identificazione mediante il metodo rapido ed il metodo tradizionale (%).



Tab. 4.1.1.1 Identificazione dei 118 isolati con il metodo rapido e con il metodo tradizionale.

Specie	N° isolati		
	Identificazione corretta	Identificazione discordante	Totale
<i>S. epidermidis</i>	58	5	63
<i>S. aureus</i>	10	3	13
<i>S. haemolyticus</i>	10	1	11
<i>S. hominis</i>	7	2	9
<i>S. capitis</i>	2		2
<i>S. warneri</i>	1		1
<i>E. faecalis</i>	5		5
<i>E. faecium</i>	3		3
<i>E. durans</i>		1	1
<i>S. agalactiae</i>	2	1	3
<i>S. oralis</i> gruppo <i>mitis</i>	2		2
<i>S. pyogenes</i>	1		1
<i>Micrococcus luteus/lylae</i>	1		1
<i>Bacillus megaterium</i>	1		1
<i>Bacillus cereus</i>	1		1
<i>Kocuria kristinae</i>	1		1
Totale	105	13	118

In particolare, un ceppo di *Enterococcus durans* è stato identificato erroneamente come *Enterococcus gallinarum*; uno di *S. agalactiae* come *Streptococcus pluranimalium*; mentre gli altri 11 risultavano appartenere al genere *Staphylococcus* (Tab. 4.1.1.2).

Tab. 4.1.1.2 Identificazioni discordanti

Identificazione da metodo tradizionale	Identificazione discordante (n°)	Identificazione da metodo rapido
<i>S. epidermidis</i>	5	<i>K. kristinae</i> (1) <i>S. intermedius</i> (1) <i>S. hominis</i> (1)
<i>S. aureus</i>	3	<i>K. kristinae</i> (1) <i>S. intermedius</i> (1) <i>S. haemolyticus</i> (1)
<i>S. haemolyticus</i>	1	<i>G. morbillorum</i> (1)
<i>S. hominis</i>	2	<i>S. epidermidis</i> (1) <i>Kocuria varians</i> (1)
<i>E. durans</i>	1	<i>E. gallinarum</i> (1)
<i>S. agalactiae</i>	1	<i>S. pluranimalium</i> (1)

Per quanto riguarda il saggio di suscettibilità antimicrobica, i valori di MIC sono interpretati nelle categorie: sensibile (S), intermedio (I) e resistente (R). Facendo un confronto tra il nuovo metodo e il metodo colturale tradizionale, le eventuali discordanze sono state classificate in errori di diversa gravità: errori molto gravi (falsa suscettibilità), errori gravi (falsa resistenza), ed errori minori (suscettibile-resistente vs suscettibilità intermedia). L'antibiogramma è stato ottenuto per 98 degli isolati batterici identificati in maniera corretta e per 8 degli isolati erroneamente identificati. Inoltre, è emerso che 54 (55%) dei 98 isolati correttamente identificati e 5 (63%) degli 8 isolati con identificazione

discordante hanno mostrato completo accordo per tutte le categorie cliniche (S, I, R), per un totale, quindi, di 59 (56%) di 106 isolati.

Tab. 4.1.3 Comparazione tra il profilo di suscettibilità antimicrobica mediante il metodo rapido ed il metodo tradizionale.

Antibatterico	N° test svolti	Errori molto gravi	Errori gravi	Errori minori	Concordanze AST
Penicillina G	106	1 (1%)	1 (1%)		104 (98%)
Oxacillina	96	1 (1%)			95 (99%)
Clindamicina	106		2 (2%)	2 (2%)	102 (96%)
Eritromicina	106		1 (1%)	1 (1%)	104 (98%)
Levofloxacina	106				98 (92%)
Linezolid	106				106 (100%)
Rifampicina	96				93 (97%)
Tetraciclina	106		1 (1%)		105 (99%)
Gentamicina	104		1 (1%)		96 (92%)
Tobramicina	96	2 (2%)			94 (98%)
Trimetr/sulfametoss.	106				96 (91%)
Teicoplanina	106	2 (2%)	1 (1%)	2 (2%)	101 (95%)
Vancomicina	106		2 (2%)		104 (98%)
Totale (%)	1346	20 (1.5%)	9 (0.7%)	19 (1.4%)	1298 (96.4%)

Le discrepanze riscontrate tra i diversi metodi per i vari antibiotici sono state risolte tramite E-test®. I risultati hanno rivelato che con il nuovo metodo, ma non con il metodo tradizionale, il profilo di suscettibilità è stato corretto per 9 dei 44 microrganismi correttamente identificati e per 1 dei 3 microrganismi erroneamente identificati. Pertanto, 10 dei 47 antibiogrammi discordanti (ovvero il 9% dei 106 batteri isolati) hanno mostrato una suscettibilità agli antibiotici corretta. Riassumendo, dunque, 69 (65%) dei 106 isolati hanno mostrato un profilo di suscettibilità agli antimicrobici concordante/corretto per tutti gli antibiotici saggiati. L'errore percentuale totale e l'errore percentuale per ogni antibiotico sono mostrati nella tabella 4.1.3. Il tasso di errore complessivo è stato del 3.6% (1.5% errori molto gravi, 0.7% errori gravi e 1.4% errori minori). Gli errori molto gravi sono stati osservati soprattutto per trimetoprim/sulfametossazolo (50%) e per gentamicina (20%); gli errori minori principalmente per levofloxacina (42%), per gentamicina (16%) e per rifampicina (16%).

La concordanza tra i profili di suscettibilità è risultata superiore al 95% ad eccezione di levofloxacina, gentamicina e trimetoprim/sulfametossazolo.

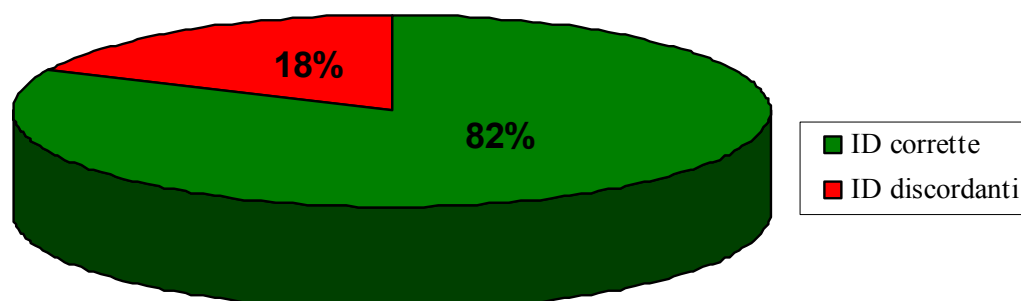
4.1.2 Metodo rapido (sistema Phoenix): confronto con il metodo culturale tradizionale

Dal confronto tra il metodo rapido e quello tradizionale, è stato osservato che 56 (82%) dei 68 microrganismi Gram-positivi sono stati correttamente identificati con il metodo rapido mediante il sistema Phoenix, 2 (3%) streptococchi (*S. pyogenes* e *S. oralis* gruppo *mitis*) non sono stati identificati, mentre 10 cocci (15%) sono stati erroneamente identificati a livello di genere o di specie (Tab. 4.1.2, fig. 4.1.2). Inoltre, 3 microrganismi sono stati identificati correttamente dal metodo rapido, ma non dal metodo tradizionale: 2 ceppi di *Staphylococcus epidermidis* sono stati identificati erroneamente come *S. hominis* e *S. haemolyticus*, e un ceppo di *S. hominis* è stato identificato come *S. epidermidis*.

Tab. 4.1.2 Identificazione dei 68 isolati con il metodo rapido e con il metodo tradizionale.

SPECIE	N° ISOLATI			
	Identificazione corretta	Nessuna identificazione	Identificazione discordante	Totale
<i>S. epidermidis</i>	36		6	42
<i>S. hominis</i>	5		3	8
<i>S. hamolyticus</i>	7			7
<i>S. aureus</i>	2		1	3
<i>S. warneri</i>	1			1
<i>E. faecium</i>	4			4
<i>S. agalactiae</i>	1			1
<i>S. pyogenes</i>		1		1
<i>S. oralis</i> gruppo <i>mitis</i>		1		1
Totale	56	2	10	68

Fig. 4.1.2 Confronto tra processo di identificazione mediante il metodo rapido ed il metodo tradizionale (%).



Come si può notare dalla tabella sottostante (Tab. 4.1.2.1), i risultati discordanti sono stati ottenuti soltanto per i ceppi appartenenti al genere *Staphylococcus*. Nel caso dell'unico ceppo di *S. aureus*, erroneamente identificato come *Pediococcus pentosaceus*, la carica batterica della sospensione inoculata nel pannello Phoenix era troppo bassa (10^4 CFU/ml).

Tab. 4.1.2.1 Identificazioni discordanti

Identificazione da metodo tradizionale	Identificazione discordante (n°)	Identificazione da metodo rapido
<i>S.aureus</i>	1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>S. epidermidis</i>	6	<i>S. hominis</i> (3) <i>S. saprophyticus</i> (1) <i>S. simulans</i> (1) <i>S. caprae</i> (1)
<i>S. hominis</i>	3	<i>S. caprae</i> (1) <i>S. epidermidis</i> (1) <i>S. haemolyticus</i> (1)

L'antibiogramma è stato ottenuto per 48 degli isolati batterici identificati in maniera corretta, per 2 isolati identificati correttamente solo dal metodo rapido, per 6 isolati identificati erroneamente e per 2 isolati non identificati (*S. pyogenes* e *S. oralis* gruppo *mitis*). Per quest'ultimi, i risultati dell'antibiogramma hanno mostrato valori di MIC corrispondenti. L'antibiogramma non è stato ottenuto, invece, per 5 isolati di *S. epidermidis*, 2 di *S. hominis*, 1 di *S. aureus* e 1 di *E. faecium*, a causa di problemi tecnici, quali la presenza di bolle di aria o di impurità nei pozzetti del pannello Phoenix, o per l'utilizzo di un pannello inadeguato. Inoltre, è emerso che, utilizzando il metodo rapido, 45 (77%) di 58 isolati hanno mostrato completo accordo per tutte le categorie cliniche (S, I, R): in particolare, 32 (55%) dei 58 isolati correttamente identificati, 11 (19%) isolati correttamente con il metodo rapido ma non con il metodo tradizionale, per 1 (2%) isolato identificato correttamente solo dal metodo rapido (*S. epidermidis*, identificato come *S. hominis* dal metodo tradizionale) e per 1 (2%) isolato identificato erroneamente (*S. epidermidis*, identificato come *S. saprophyticus*). Le discrepanze riscontrate tra i diversi metodi per i vari antibiotici sono state ulteriormente risolte tramite E-test®. Riassumendo, dunque, 45 (77%) dei 58 isolati hanno mostrato un profilo di suscettibilità agli antimicrobici concordante/corretto per tutti gli antibiotici saggiati. L'errore percentuale totale e l'errore percentuale per ogni antibiotico sono mostrati nella tabella 4.1.2.2. Il tasso di errore complessivo è stato di 1,9% (0,2% errori molto gravi, 0,4% errori gravi e 1,3% errori minori). Gli errori molto gravi sono stati osservati soprattutto per eritromicina (50%) e per ciprofloxacina (50%) e i gravi per trimetoprim/sulfametossazolo (67%); gli errori minori sono stati osservati principalmente per i fluorochinoloni (50%), per eritromicina (20%), per teicoplanina (20%) e per linezolid (10%).

La concordanza tra i profili di suscettibilità è risultata superiore al 96%, ad eccezione dei fluorochinoloni e di eritromicina (95%) (Tab.4.1.3).

Tab. 4.1.2.2 Comparazione tra il profilo di suscettibilità antimicrobica mediante il nuovo metodo ed il metodo tradizionale.

Antibatterico	N° test svolti	Errori molto gravi	Errori gravi	Errori minori	Concordanze AST
Penicillina G	56				56 (100%)
Amoxicillina/ac.clav.	53				53 (100%)
Ampicillina	56				56 (100%)
Oxacillina	53				53 (100%)
Teicoplanina	56			2 (4%)	54 (96%)
Vancomicina	56				56 (100%)
Clindamicina	56		1 (2%)		55 (98%)
Eritromicina	56	1 (2%)		2 (4%)	53 (94%)
Linezolid	56			1 (2%)	55 (98%)
Quinupristin/dalfopr.	56				56 (100%)
Gentamicina	56				56 (100%)
Levofloxacina	56			3 (5%)	53 (94%)
Ciprofloxacina	56	1 (2%)		2 (4%)	53 (94%)
Trimetr/sulfametoss.	56		2 (4%)		54 (96%)
Totale (%)	778	2 (0,2%)	3 (0,4%)	10 (1,3%)	763 (98,1%)

4.2 Metodi molecolari

4.2.1 LightCycler SeptiFast M^{Grade}

I campioni di sangue sono stati ottenuti da pazienti con sospetta sepsi, ai quali è stato effettuato parallelamente anche un prelievo per l'emocoltura (flacone aerobio e anaerobio) per permettere il confronto tra le due metodiche. In totale, sono stati analizzati 148 campioni di sangue da 52 pazienti febbrili ricoverati nel reparto di Terapia Intensiva della Sezione di Trapiantologia Epatica, del Centro Grandi Ustioni, di Terapia Intensiva Cardiovascolare e di Ematologia Pediatrica. Tramite il metodo colturale tradizionale, 30 (20%) campioni sono risultati positivi e 118 (80%) sono risultati negativi; mentre il test SeptiFast ha fornito un risultato positivo per 27 (18%) campioni e un risultato negativo per 121 (82%) campioni (Tab. 4.2.1).

Tab. 4.2.1 Risultati SeptiFast ed emocolture

RISULTATI	NEGATIVI	POSITIVI
SeptiFast	121	27
Emocolture	118	30

La concordanza complessiva tra i risultati ottenuti dal test SeptiFast e quelli delle emocolture è dell'85%: in particolare, una concordanza del 91% è stata ottenuta per i risultati negativi e del 57% per quelli positivi (Tab. 4.2.1.1).

Tab. 4.2.1.1 Concordanza tra i due metodi

METODO	Emocoltura POSITIVA	Emocoltura NEGATIVA
SeptiFast POSITIVO	17 (57%)	10
SeptiFast NEGATIVO	13	108 (91%)

Nel caso di emocoltura positiva, 13 campioni sono risultati negativi al SeptiFast: in 3 campioni non si è avuta l'amplificazione del genoma microbico per la mancanza di sonde specifiche, in 7 campioni non è stato amplificato il genoma di *Acinetobacter baumannii* e, infine, 3 campioni sono risultati negativi per le limitazioni del software analitico SIS per gli stafilococchi coagulasi (2) e per *Streptococcus* spp (1). Inoltre, nel caso di un risultato positivo al SeptiFast, 10 campioni sono risultati negativi al metodo colturale tradizionale. In particolare, in questi campioni è stato amplificato il genoma di 12 microrganismi, 5 batteri Gram positivi (4 stafilococchi coagulasi negativi e 1 *E. faecium*) e 7 Gram negativi (3 *P. aeruginosa* e 4 microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae). Di questi, soltanto 4 (33%) erano clinicamente rilevanti. *P. aeruginosa* è stato rilevato,

inizialmente, soltanto da SeptiFast e, successivamente, da entrambi i metodi in campioni di sangue prelevati dallo stesso paziente nei giorni successivi. Tre stafilococchi coagulasi-negativi sono stati rilevati da Septifast in tre campioni di un paziente, affetto da leucemia linfoblastica, che presentava una temperatura corporea di 38°C, 69,7 mg/l di CRP e 4.250 / μ l di leucociti.

Altri campioni sono risultati positivi con entrambi i metodi, ma per diverse specie batteriche. Nella tabella 4.2.1.2 sono riportati i microrganismi identificati dal metodo SeptiFast e dal metodo colturale tradizionale.

Tab. 4.2.1.2 Microrganismi identificati da SeptiFast e dalle emocolture

MICRORGANISMI	SeptiFast	Emocoltura
<i>S. aureus</i>	4	4
<i>Staphylococcus spp (CoNS)</i>	6	4
<i>E. faecium</i>	2	1
<i>Streptococcus spp</i>	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	8	5
<i>P. putida</i>	0	1
<i>A. baumannii</i>	1	11
<i>S. maltophilia</i>	2	1
<i>Klebsiella spp</i>	3	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>	3	2
<i>Candida albicans</i>	1	1
<i>Trichosporon spp</i>	0	1
<i>Corynebacterium spp</i>	0	1
<i>Propionibacterium spp</i>	0	1
TOTALE	32	35

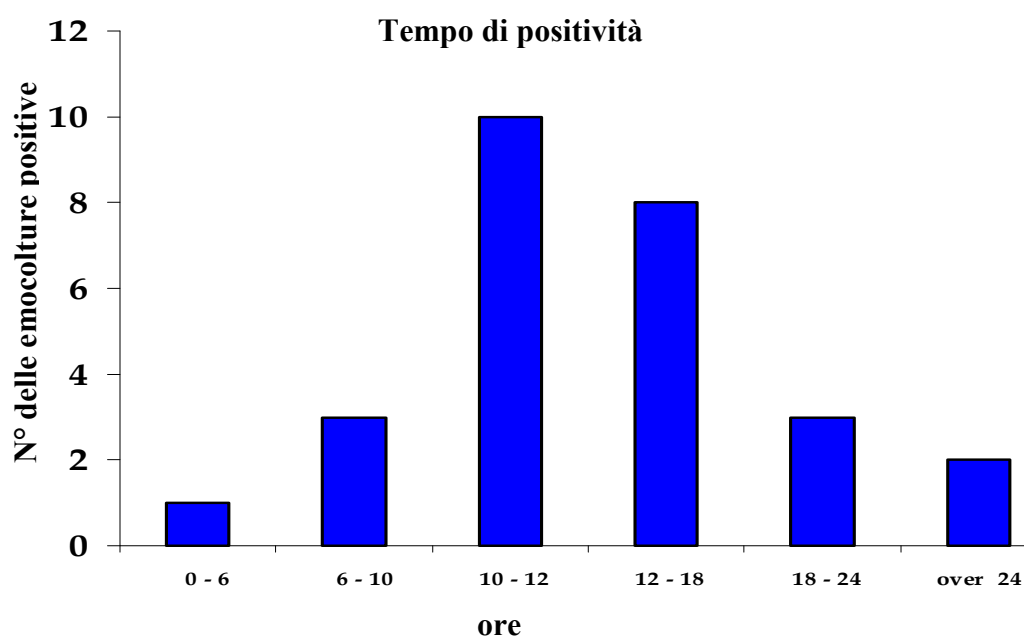
Il numero totale dei microrganismi identificati da entrambi i metodi è all'incirca lo stesso, con alcune eccezioni: 4 microrganismi (*Pseudomonas*

putida, *Trichosporon* spp, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium* spp) non sono inclusi nella lista SeptiFast, quindi, non sono stati identificati, e 10 *Acinetobacter baumannii* non sono stati amplificati dal test SeptiFast. Di contro, diverse specie batteriche non sono state identificate con il metodo colturale tradizionale.

Per l'identificazione di specie è stata osservata una concordanza del 67%. Il test Rank di Spearman ($\rho=0,572$, $P=0,0259$) conferma una correlazione positiva tra i due metodi.

Confrontando il tempo di positività delle emocolture e quello della generazione del report SeptiFast, è stato osservato che nel 97% dei casi il metodo molecolare è in grado di fornire il risultato in tempi più brevi rispetto al metodo colturale tradizionale (Fig. 4.2.1).

Fig. 4.2.1 Tempo di positività delle emocolture



4.2.2 Risultati Magicplex™ Sepsis Real-Time PCR

Con questo metodo sono stati analizzati 11 campioni di sangue (in EDTA) prelevati da 9 pazienti con sospetta sepsi, la maggior parte dei quali erano ricoverati nel reparto Centro Grandi Ustioni (4), gli altri erano ricoverati nel reparto di Terapia Intensiva della Sezione Trapianti (1), di Terapia Intensiva di Cardiocirurgia (2), di Ematologia e di Gastroenterologia Universitaria (1). Tutti i campioni di sangue pervenuti in laboratorio, dopo essere stati pretrattati ed estratti, sono stati amplificati e, successivamente, sono stati sottoposti ad un primo step di PCR multiplex real time per lo “screening” di batteri Gram positivi, di batteri Gram negativi e di geni di resistenza (vanA, vanB e mecA). Come si può osservare nella tabella 4.2.2, soltanto in 2 campioni non è stata rilevata la presenza nè di genoma batterico e/o fungino, nè di geni di resistenza.

Tab. 4.2.2 Risultati “Screening” PCR Multiplex Real Time

CAMPIONI	Screening-PCR Multiplex
1	<i>Staphylococcus</i> spp
2	<i>Enterococcus</i> spp; vanA
3	<i>Staphylococcus</i> spp/mecA
4	Gram - (gruppo A); <i>Staphylococcus</i> spp; mecA
5	Negativo
6	<i>Staphylococcus</i> spp
7	Lieviti; <i>Staphylococcus</i> spp; mecA
8	<i>Staphylococcus</i> spp
9	<i>Staphylococcus</i> spp
10	Negativo
11	Gram - (gruppo A); <i>Staphylococcus</i> spp

Gli altri 9 campioni sono risultati tutti positivi per *Staphylococcus* spp, tranne 1 campione che è risultato positivo per *Enterococcus* spp e per il gene di resistenza vanA. Il genoma di batteri Gram negativi (gruppo A) è stato rilevato in 2 campioni e un campione è risultato positivo per i lieviti. Inoltre, in 3 campioni è stato rilevato anche il gene di resistenza mecA, oltre a quello di *Staphylococcus* spp. In totale, quindi, 4 campioni sono risultati positivi per i geni di resistenza.

I campioni risultati positivi al primo step di PCR multiplex real time sono stati sottoposti ad un secondo step per identificare la specie del patogeno rilevato (Tab. 4.2.2.1). Complessivamente, sono stati identificati: 10 stafilococchi, 8 *S. epidermidis*, 1 *S. haemolyticus* e 1 *S. aureus*; i 2 Gram negativi sono stati identificati come *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, mentre l'unico lievito rilevato è stato identificato come *C. tropicalis*.

Tab. 4.2.2.1 Risultati PCR Multiplex Real-Time

CAMPIONI	Identificazione-PCR Multiplex
1	<i>S. epidermidis</i>
2	<i>Enterococcus faecium</i>
3	<i>S. epidermidis</i>
4	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. haemolyticus</i>
5	-
6	<i>S. epidermidis</i>
7	<i>C. tropicalis</i> ; <i>S. epidermidis</i> ;
8	<i>S. epidermidis</i>
9	<i>S. epidermidis</i>
10	-
11	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. aureus</i>

I risultati ottenuti dal test *MagicplexTM Sepsis* Real-Time PCR sono stati messi a confronto con quelli ottenuti dal metodo colturale tradizionale (Tab. 4.2.2.2).

Tab. 4.2.2.2 Confronto PCR Multiplex ed emocolture

CAMPIONI	PCR Multiplex	Emocolture
1	<i>S. epidermidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
2	<i>Enterococcus faecium</i> /van A	<i>E. faecium</i> VanA
3	<i>S. epidermidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
4	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. haemolyticus</i>	<i>A. baumannii</i>
5	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>
6	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>
7	<i>C. tropicalis</i> ; <i>S. epidermidis</i> ;	<i>C. tropicalis</i>
8	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>
9	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. xylosus</i>
10	Negativo	<i>K. pneumoniae</i>
11	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>

I campioni negativi alla PCR multiplex sono risultati positivi con il metodo colturale per *Klebsiella pneumoniae* e per *Pseudomonas aeruginosa*. Questi dati dell'emocoltura sono stati confermati dall'isolamento di questi microrganismi in campioni prelevati sia nei giorni precedenti che in quelli successivi.

Tramite il metodo colturale, sono stati identificati 3 batteri Gram positivi (*Enterococcus faecium*, *S. hominis*, *S. xylosus*), 6 batteri Gram negativi (3 *K. pneumoniae*, 2 *A. baumannii*, 1 *P. aeruginosa*) e 2 lieviti (*C. tropicalis* e *C. albicans*).

Entrambi i metodi hanno identificato correttamente 1 *Enterococcus faecium*, 1 *Acinetobacter baumannii* e 1 *C. tropicalis*., mentre 2 stafilococchi, identificati rispettivamente come *S. hominis* e *S. xylosus* dal metodo tradizionale, sono stati identificati come *S. epidermidis* dalla PCR multiplex. Una corretta/concorde identificazione, quindi, è stata ottenuta in 5 degli 11 campioni, però per 2 di questi solo a livello di genere. E' stato osservato un risultato discordante in un campione, in cui un ceppo di *A. baumannii*, isolato mediante il metodo colturale, è stato identificato con la PCR multiplex come *P. aeruginosa*. Inoltre, questo saggio molecolare ha fallito nell'amplificare, in un caso il genoma di *C. albicans* e in due casi di *K. pneumoniae*. Nei casi in cui il metodo colturale ha identificato *K. pneumoniae*, il saggio molecolare ha identificato erroneamente in un caso il genoma di *S. epidermidis* e nell'altro ha fornito addirittura un esito negativo.

Per quanto riguarda i geni di resistenza, soltanto la rilevazione del gene vanA è stata confermata dal profilo di suscettibilità alla vancomicina e alla teicoplanina (entrambi con M.I.C \geq 8) del ceppo di *E. faecium* isolato mediante il metodo colturale.

Dal confronto tra i due metodi è stata evidenziata una scarsa amplificazione del genoma dei batteri Gram negativi. Per tale motivo, è stata effettuata una prova su 3 campioni, partendo da un volume iniziale di 1,5 ml e di 3 ml, per escludere che fosse un problema legato al numero di copie del genoma (Tab. 4.2.2.3).

I risultati ottenuti hanno evidenziato una mancata amplificazione del genoma di *Acinetobacter baumannii*, indipendentemente dal volume iniziale del campione. Inoltre, nel campione 3, la PCR multiplex ha dato un risultato discordante, in quanto ha rilevato il genoma di *Enterococcus faecalis*,

microrganismo che non è stato mai isolato dalle emocolture dello stesso paziente. Infatti, le emocolture dei giorni precedenti erano positive per *Acinetobacter baumannii* e l'emocoltura eseguita 2 giorni prima era risultata positiva per *Staphylococcus hominis hominis*.

Tab. 4.2.2.3 Prova PCR multiplex su campioni con volumi diversi

CAMPIONI	IDENTIFICAZIONI PCR Multiplex		EMOCOLTURA
	Volume iniziale		
	1 ml	3 ml	
1	<i>S. epidermidis/MecA</i>	<i>S. epidermidis/MecA</i>	<i>A. baumannii</i>
2	<i>S. epidermidis/MecA</i>	<i>S. epidermidis /MecA</i>	<i>A. baumannii</i>
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>K pneumoniae</i>	<i>A. baumannii S. hominis hominis</i>

4.2.3 Ibridazione *in situ* PNA FISH

I vetrini per l'ibridazione fluorescente *in situ* sono stati allestiti per 5 campioni positivi, che apparivano monomicrobici all'esame batterioscopico. Sulla base delle informazioni riguardanti il germe patogeno, sono stati scelti due kit di sonda PNA FISH: uno che permette l'identificazione di *S. aureus* (fluorescenza verde) e di stafilococchi coagulasi negativi (fluorescenza rossa) e uno per i batteri Gram negativi, che mette in evidenza la presenza nel campione di *Escherichia coli* e/o *Klebsiella pneumoniae* (fluorescenza verde) e di *Pseudomonas aeruginosa* (fluorescenza rossa).

Dall'osservazione dei vetrini al microscopio a fluorescenza, sono stati identificati i seguenti microrganismi: *S. epidermidis* (1), *S. aureus* (1), *E. coli* e/o *K. pneumoniae* (3). Questi risultati sono stati confermati dalle identificazioni ottenute con il sistema Vitek 2 mediante il metodo colturale tradizionale. In 2 dei 3 campioni positivi al test PNA FISH per *E. coli* e/o *K. pneumoniae*, è stato isolato ed identificato un ceppo di *E. coli*, mentre nell'altro campione è stato rilevato un ceppo di *K. pneumoniae*.

5. DISCUSSIONE

La diagnosi microbiologica di infezione sistemica necessita dell'utilizzo di metodiche rapide e affidabili per ridurre il rischio di morte in pazienti settici o potenzialmente tali. L'emocoltura, che tuttora rappresenta il "gold standard" presenta, tuttavia, dei limiti legati principalmente ai tempi di refertazione. Uno degli approcci più promettenti, nella diagnosi microbiologica delle infezioni sistemiche, sembra quello basato sull'identificazione diretta del DNA batterico e fungino mediante metodiche molecolari.

In questo studio, diversi saggi diagnostici microbiologici sono stati valutati e confrontati con il metodo colturale tradizionale. Il metodo colturale rapido viene utilizzato normalmente nel Laboratorio della U. O di Microbiologia Universitaria di Pisa per l'identificazione dei bacilli Gram negativi, fornendo una corretta identificazione, concorde con il metodo colturale tradizionale, nel 99% delle emocolture monomicrobiche. Invece, per i cocci Gram positivi è stato necessario apportare una modifica al protocollo già esistente per ottenere dei risultati affidabili. I risultati ottenuti con il nuovo metodo rapido hanno mostrato una concordanza di identificazione dei cocci Gram positivi con il metodo tradizionale nell'89% dei campioni, utilizzando il sistema Vitek 2; una simile concordanza è stata riscontrata anche con il sistema Phoenix (82%). Per quanto riguarda il profilo di suscettibilità agli antimicrobici, è stata evidenziata una concordanza con il metodo tradizionale superiore al 95% sia con il sistema Vitek 2 che con Phoenix. Il tasso di errore complessivo è stato del 3,6% e dell'1,9% con solo l'1,5% e 0,2% di errori molto gravi, utilizzando rispettivamente Vitek 2 e Phoenix. Da ciò si evince una maggiore accuratezza

dei risultati ottenuti con Phoenix. Inoltre, è interessante notare che per gli antibatterici più frequentemente utilizzati nel trattamento delle infezioni sistemiche sostenute da stafilococchi ed enterococchi (es. vancomicina, teicoplanina e linezolid), la percentuale di errore è stata comunque inferiore al 5%, rispondendo, pertanto, ai criteri di selezione per i profili di suscettibilità di Jorgensen (Jorgensen, 1993). Questi risultati indicano che una modifica del metodo rapido, ovvero l'aggiunta di un detergente, come la saponina, al brodo di coltura delle emocolture positive, permette di ottenere risultati accurati anche per i cocci Gram positivi. Una breve esposizione delle emocolture alla saponina ha permesso di ottenere una quantità di inoculo microbico sufficiente ad eseguire i saggi di identificazione e di suscettibilità antimicrobica, riducendo così il tempo di refertazione di almeno 12 ore, più spesso di 24 ore (il tempo varia a seconda di come è organizzato il flusso di lavoro). Probabilmente, il trattamento con saponina, inducendo la lisi dei leucociti e la liberazione dei batteri internalizzati dalle cellule fagocitarie, aumenta significativamente il recupero dei microrganismi (Murray P. R. *et al.*, 1991; Lupetti A. *et al.*, 2010). Una scarsa quantità di inoculo è stata comunque evidenziata in tre campioni. Tra i metodi molecolari saggiati, è stata evidenziata una concordanza con il metodo colturale tradizionale dell'85% per il test Septifast, in accordo con i dati ottenuti da altri autori (Mancini N. *et al.*, 2008; Louie R. F. *et al.*, 2008; Dierkes C. *et al.*, 2009; Westh H. *et al.*, 2010; Tsalik E. L. *et al.*, 2010). Una maggiore concordanza è stata ottenuta per i campioni negativi (91%) piuttosto che per quelli positivi (57%). Tuttavia, i risultati dell'identificazione di specie hanno mostrato una concordanza nettamente inferiore, precisamente del 67%. Dal confronto tra i risultati ottenuti con SeptiFast e quelli del metodo tradizionale, sono emerse alcune

discrepanze. Una assenza di amplificazione è stata mostrata per 10 di 11 *Acinetobacter baumannii* identificati dall'emocoltura. Questi falsi negativi sono dovuti molto probabilmente alla presenza nel campione di fattori inibenti, alla variabilità intrinseca della PCR o mutazioni del sito bersaglio (Tsalik E. L. *et al.*, 2010; Lucignano B. *et al.*, 2011). Uno dei principali svantaggi di Septifast, comune a tutti i metodi molecolari, è rappresentato dal limitato numero di microrganismi che può essere rilevato. Infatti, per 4 microrganismi (*P. putida*, *Trichosporon* spp, *Corynebacterium* spp e *Propionibacterium* spp) non è stata evidenziata nessuna amplificazione, per mancanza di sonde disponibili. Di contro, 12 microrganismi, di cui 4 rilevanti clinicamente, sono stati identificati da Septifast ma non dal metodo colturale. Ciò dimostra la maggiore sensibilità di questo metodo molecolare rispetto a quello colturale, come è riportato in altri studi (Rodero L. *et al.*, 2002; Tomas I. *et al.*, 2007; Mancini N. *et al.*, 2008; Mancini N. *et al.*, 2010; Lucignano B. *et al.*, 2011).

Dal confronto tra il tempo di positività delle emocolture e quello necessario per l'esecuzione del test SeptiFast, è emerso che nel 97% dei casi il metodo molecolare è in grado di fornire i risultati in tempi più brevi (in media 5-6 ore) rispetto al metodo colturale tradizionale (12-48 ore). Quindi, sebbene SeptiFast non sia in grado di fornire alcuna informazione riguardante la suscettibilità antimicrobica, cosa che rappresenta il limite principale di questa metodica, la rapidità del test può contribuire ad intraprendere tempestivamente una terapia antibiotica mirata.

L'altro metodo molecolare saggiato, PCR multiplex real-time (*MagicplexTM Sepsis*), ha mostrato una corretta/concorde identificazione con il metodo colturale tradizionale soltanto in 5 degli 11 campioni analizzati, però per 2 di questi solo a livello di genere. In particolare, entrambi i metodi hanno

identificato correttamente 1 *Enterococcus faecium*, 1 *Acinetobacter baumannii* e 1 *C. tropicalis*., mentre 2 stafilococchi, identificati rispettivamente come *S. hominis* e *S. xylosus* dal metodo tradizionale, sono stati identificati come *S. epidermidis* dalla PCR multiplex. Inoltre, il confronto tra queste due metodiche ha messo in evidenza diverse discrepanze tra i risultati. Innanzitutto, 2 campioni negativi alla PCR multiplex, si sono rivelati positivi all'emocoltura per 2 Gram negativi (*P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*). Soltanto 1 ceppo (*Acinetobacter baumannii*) dei 6 batteri Gram negativi isolati dalle emocolture è stato rilevato dalla PCR multiplex. Da ciò si evince l'inefficienza di questo saggio molecolare, principalmente, nell'amplificare i batteri Gram negativi. Per quanto riguarda i batteri Gram positivi, invece, un maggior numero di stafilococchi (10), principalmente coagulasi-negativi, sono stati rilevati da questo metodo molecolare rispetto al metodo colturale (2). Questi falsi positivi sono dovuti all'amplificazione di microrganismi commensali della cute introdotti nel campione durante la fase del prelievo, oppure durante l'esecuzione del test. Infatti, diversi autori affermano che l'utilizzo di metodiche molecolari comporta un maggior rischio di rilevare falsi positivi (Westh H. *et al.*, 2009; Lucignano B. *et al.*, 2011; Lamoth F. *et al.*, 2010). Questa PCR multiplex ha permesso di saggiare i campioni anche per i geni di resistenza vanA e vanB per l'identificazione dei ceppi di *Enterococcus* spp resistenti alla vancomicina, e il gene mecA per l'identificazione dei ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti. In 3 campioni, è stato rilevato il gene di resistenza mecA e, in 1 campione, il gene vanA. Soltanto la presenza di quest'ultimo gene di resistenza è stata confermata dal profilo di suscettibilità alla vancomicina e alla teicoplanina (entrambi con M.I.C \geq 8) del ceppo di *E. faecium* identificato da entrambi i metodi.

Nonostante l'esiguo numero di campioni analizzati per questo saggio molecolare, questi risultati discordanti evidenziano delle gravi carenze, sia in termini di sensibilità che di specificità.

Infine, i pochi dati ottenuti dal test di ibridazione *in situ* (FISH), confermati dalle identificazioni ottenute con il sistema Vitek 2 mediante il metodo colturale tradizionale, suggeriscono che il test potrebbe essere utile nell'identificazione rapida (3 ore) dei patogeni, rappresentando un potenziale vantaggio rispetto ai metodi tradizionali. Tuttavia, come tutti i metodi molecolari, gli svantaggi di questa metodica sono rappresentati dal limitato numero di sonde PNA genere- e specie-specifiche disponibili e dal fatto che non fornisce alcuna informazione sulla suscettibilità antimicrobica.

6. CONCLUSIONI

Da questo studio è emerso che sia il metodo colturale rapido che i metodi molecolari saggiati, in particolare il test SeptiFast e il test FISH, identificano i microrganismi responsabili di infezione sistemica in tempi più rapidi rispetto al metodo colturale tradizionale, consentendo al clinico di intraprendere una terapia antibiotica empirica più mirata, rispetto a quella a largo spettro. Nonostante ciò, l'assenza di uno specifico profilo di suscettibilità, che necessita della coltura e dell'isolamento del microrganismo, limita l'utilità di queste tecniche molecolari nella diagnosi microbiologica. Questi metodi sembrano piuttosto costituire un valido complemento della diagnosi microbiologica tradizionale. Infatti, soltanto il metodo colturale rapido è in grado di fornire, contemporaneamente, anche il dato relativo alla suscettibilità agli antibiotici, con un anticipo di 12-24 ore rispetto al metodo tradizionale. Attualmente, il numero di marker di resistenza che possono essere individuati mediante le tecniche molecolari, come la PCR multiplex (Magicplex Sepsis Real Time PCR), è piuttosto limitato. Un ulteriore limite dei metodi molecolari è costituito dall'elevato costo. Un'alternativa valida ai convenzionali sistemi di identificazione, sia biochimici che molecolari, è rappresentata dalla spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight), un metodo rapido che necessita di una minima preparazione del campione e utilizza reagenti a basso costo, consentendo risultati accurati in pochi minuti. Questa metodica può sostituire le tecniche molecolari nell'anticipazione del risultato di identificazione, per meglio orientare la terapia empirica.

In conclusione, l'emocoltura rimane il metodo di riferimento per la diagnosi di infezione sistemica, consentendo l'isolamento dell'agente eziologico e di saggiarne la suscettibilità antimicrobica, ma l'associazione con un metodo molecolare o con la spettrometria di massa MALDI-TOF, fornisce un valido contributo, per la capacità di identificare più rapidamente i microrganismi, anche in campioni prelevati da pazienti in corso di trattamento antibiotico e per il rilevamento di quelli a lenta crescita.

7. BIBLIOGRAFIA

Aderem A. Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **2000**; 406 (6797): 782-787.

American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Med.* **1992**; 20: 864-874.

Ammori B. J., Becker K. L., Kite P., et al. Calcitonin precursors: early markers of gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* **2003**; 27: 239-243.

Anderson R, Schmidt R. Clinical biomarkers in sepsis. *Frontiers in Bioscience.* **2010**; E2, 504-520.

Anderson R., Schmidt R. Clinical biomarkers in sepsis. *Frontiers in Bioscience.* **2010**; 504-520.

Angus D.C, Wax R.S. Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med.* **2001**; 29 (7): S109-S116.

Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J.,and Pinsky M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **2001**; 29: 1303-1310.

Anhalt J. P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **1975**; 47: 219-225.

Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**; 168: 165-172.

Assicot M., Gendrel D., Carsin H., et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* **1993**; 341: 515-528.

Aukenthaler R, Istrup DM, Washington JA. Comparison of recovery of organisms from blood cultures diluted 10% (volume/volume) and 20% (volume/volume). *J Clin Microbiol.* **1982**; 15: 860-4.

Barnato, A. E., S. L. Alexander, W. T. Linde-Zwirble, and D. C. Angus. Racial variation in the incidence, care, and outcomes of severe sepsis: analysis of population, patient, and hospital characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**; 177: 279-284.

Barnini S., Dodi C., Campa M. Microbiological diagnosis of sepsis: comparison between Real Time PCR and blood culture techniques. *Critical Care.* **2007**; 11(Suppl 4): P41. Poster presentation

Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis.* **2005**; 41: 1677-80.

Barton G. M. and Kagan J. C. “A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization”. *Nature Reviews Immunology.* **2009**; 9 (8): 535-542.

Becker KL, Snider RH, Nylén ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med* **2007**; 36: 941-952.

Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatric Res.* **1998**; 44: 469-477.

Bhanji S, Williams B, Sheller B, Elwood T, Mancl L. Transient bacteremia induced by toothbrushing a comparison of the Sonicare toothbrush with a conventional toothbrush. *Pediatr Dent.* **2002**; 24(4): 295-299.

Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 1549-1554.

Bloos F., Hinder F., Becker K et al. A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. *Intensive Care Med.* **2009**; 36(2): 241–247.

Bone R.C., Fisher C. J. Jr., Clemmer TP, Slotman GJ., Metz CA., Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methhylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care med* **1989**; 17 (5): 389-393.

Bozza F. A., Bozza P. T., Castro Faria Neto H. C. Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2005**; 100 (1): 217-221.

Bruins M. J., Bloembergen P., Ruijs G. J., Wolfhagen M. J. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive Bactec blood culture bottles into Vitek2. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42: 7-11.

Brunelli T., Degl'Innocenti R., Conti A., Casprini P. Use of Maldi-Tof Mass spectrometry in direct microorganism identification in clinical laboratories. *Micr. Medica.* **2010**; 25 (3): 151-153.

Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med.* **1998**; 24(8): 888-889.

Brunkhorst F. M., Wegsheider 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: 148-152.

Carbonnelle E., Beretti J. L., Cottyn S., Quesne G., Berche P., Nassif X., and Ferroni A.. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45: 2156-2161.

Castellheim A., Brekke O. L., Espevik T., Harboe M.& Mollnes T. E. Innate Immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology.* **2009**; 69: 479-491.

Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* **2006**; 12: 151-170.

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.

Claeys R., Vinken S., Spapen H., et al. Plasma procalcitonin and C reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. *Crit Care Med.* **2002**; 30(4): 757-762.

Clec'h C., Ferriere F., Karoubi P., et al. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit Care Med.* **2004**; 32: 1166-1169.

CLSI. Principles and procedures for blood cultures. Approved guideline (M47-A). Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. **2007**; 27 (17).

Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* **2004**; 38: 1724-1730.

Conti A., De Rosa R. Quality assurance della emocoltura. *Rimel/IJLaM* **2008**; 4 (Suppl.).

Dahaba A.A., Hagata B., Fall A., Rehak P.H., List W.F., Metzeler H.: Procalcitonin for early prediction of survival outcome in postoperative critically ill patients with severe sepsis. *British Journal of Anaesthesia* **2006**; 97: 503-508.

Daly C., Mitchell D., Grossberg D., Highfield J., and Stewart D. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust. Dent. J.* **1997**; 42: 77-80.

Dandona P., Nix D., Wilson M. F., et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**; 79: 1605-1608.

David J Ecker, Rangarajan Sampath¹, Haijing Li, Christian Massire, Heather E Matthews, Donna Toleno, Thomas A Hall, Lawrence B Blyn, Mark W Eshoo, Raymond Ranken, Steven A Hofstadler and Yi-Wei Tang. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2010**; 10(4): 399-415.

De Cueto M., Ceballos E., Martinez-Martinez L., Perea E. J., Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek2 system. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42: 3734-3738.

de Werra I., Jaccard C., Corradin S. B., et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations:

Comparisons in patients with septic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med.* **1997**; 25: 607-613.

Degand N., Carbonnelle E., Dauphin B., Beretti J. L., Le Bourgeois M., Sermet-Gaudelus I., Segonds C., Berche P., Nassif X., and Ferroni A. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **2008**; 46: 3361-3367.

Degoricija V, Sharma M, Legac A, Gradiser M, Sefer S, Vucicević Z. Survival analysis of 314 episodes of sepsis in medical intensive care unit in university hospital: impact of intensive care unit performance and antimicrobial therapy. *Croat Med J.* **2006**; 47(3): 385-397.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med* **2008**; 36(1): 296–327.

Dierkes C., Ehrenstein B., Siebig S., Linde H. J., Reischl U. and Salzberger B. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infectious Diseases* **2009**; 9: 126.

Doern G.V., Barton A., Rao S. Controlled comparative evaluation of Bact/Alert FAN and ESP 80A aerobic media as means for detecting bacteremia and fungemia. *J. Clin. Microbiol.* **1998**; 36: 2686-2689.

Emonet S. Shah H. N., Cherkaoui A. and Scherenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16 (11): 1604-1613.

Engel A, Mack E, Kern P, et al. An analysis of interleukin-8, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations to predict fever, gramnegative bacteremia and complicated infection in neutropenic cancer patients. *Infection.* **1998**; 26: 213-221.

Esel D., Doganay M., Alp E., Sumerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**; 9(10):1038-1044.

Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**; 30(Suppl. 1): 7-15.

Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Muñoz-Bellido J. L., González-Buitrago J. M. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**; 1-6.

Fischer M. and Ehlers M. “Toll-like receptors in autoimmunity”. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**; 1143: 21–34.

Flayhart D., Borek A.P., Wakefield T., Dick J., Carroll K.C. Comparison of Bactec Plus blood culture media to Bact/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45: 816-821.

Fong Y, Moldawer LL, Marano M, et al. Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL in man. *J Immunol.* **1989**; 142(7): 2321-2324.

Forner L., Larsen T., Kilian M., and Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* **2006**; 33: 401-407.

Forrest G. N., Mankes K., Jabra-Rizk M. A., Weekes E., Johnson J. K., Lincalis D. P., and Venezia R. A. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J. Clin. Microbiol.* **2006**; 44: 3381-3383.

Forrest G. N., Roghmann M. C., Toombs L. S., Johnson J. K., Weekes E., Lincalis D. P., Venezia R. A. Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52: 3558-3563.

Franchini M, Lippi G, and Manzato F. Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Journal.* **2006**; 4: 4.

Funke G., Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX automated microbiology system for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42: 1466-1470.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* **1999**; 340: 448-454.

Gaini S, Koldkjaer OG, Pedersen C, et al. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care Med.* **2006**; 10(2): R53.

Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Ogura H, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S, Japanese. Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation (JAAM DIC) Study Group. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: Comparing current criteria. *Crit Care Med.* **2006**; 34 (3): 625-631.

Garrouste-Orgeas M, Timsit JF, Tafflet M, Misset B, Zahar JR, Soufir L, Lazard T, Jamali S, Mourvillier B, Cohen Y, De Lassece A, Azoulay E, Cheval C, Descorps-Declere A, Adrie C, Costa de Beauregard MA, Carlet J. OUTCOMEREA Study Group: Excess risk of death from intensive care unit-acquired nosocomial bloodstream infections: a reappraisal. *Clin Infect Dis.* **2006**; 42: 1118-1126.

Gendrel D, Raymond J, Assicot M, et al. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis.* **1997**; 24: 124-1242.

Gilbert David N. Use of Plasma Procalcitonin Levels as an Adjunct to Clinical Microbiology. *MINIREVIEW Journal of clinical microbiology.* **2010**; 48 (7): 2325-2329.

Grosso S., Camporese A. Valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia di alcune procedure analitiche per ridurre il turnaround time delle emocolture. *Rimel/IJLaM.* **2007**; 3: 203-212.

Hansen W. L. J., Beuving J., Bruggeman C.A., Wolffs P.F.G. Molecular probes for the diagnosis of clinically relevant bacterial infections in bloodcultures. *J.Clin. Microbiol* **2010**; ahead of print.

Harbarth S., Garbino J., Romand J. A., Lew D. and Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am. J. Med.* **2003**; 115: 529-535.

Harper MB, Bachur R, Fleisher GR. Effect of antibiotic therapy on the outcome of outpatients with unsuspected bacteremia. *Pediatr Infect Dis J.* **1995**; 14: 760.

Hensley D. M., Tapia R., and Encina Y. An evaluation of the Advandx Staphylococcus aureus/CNS PNA FISH assay. *Clin. Lab. Sci.* **2009**; 22: 30-33.

Hermesen E. D., Shull S. S., Klepser D. G., Iwen P. C., Armbrust A., Garrett J., Freifeld A. G., and Rupp M. E.. Pharmacoeconomic analysis of microbiologic techniques for differentiating staphylococci directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol* **2008**; 46: 2924–2929.

Herzke CA, Chen LF, Anderson DJ, Choi Y, Sexton DJ, Kaye KS. Empirical antimicrobial therapy for bloodstream infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: no better than a coin toss. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2009**; 30: 1057-1061.

Hettick J. M., Kashon M. L., Simpson J. P., Siegel P. D., Mazurek G. H., and Weissman D. N. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**; 76: 5769–5776.

Hoffman M, Monroe. A cell based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* **2001**; 85: 958-965.

Hotchkiss RS., Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl J Med* **2003**; 348 (2): 138-150.

Ingram, P. R., Inglis T., Moxon D., and Speers D.. Procalcitonin and C-reactive protein in severe H1N1 influenza infection. *Intensive Care Med.* **2010**; **36**: 528-532.

Keri K. Hall and Jason A. Lyman. Updated review of blood culture contamination. *Clinical microbiology reviews.* **2006**; 19 (4): 788-802.

Kita Y, Iwaki Y, Noguchi K, et al. Daily serum interleukin-6 monitoring in multiple organ transplantation with or without liver allografts. *Transplant Proc.* **1996**; 28: 1229-1234.

Klouche M., and U. Schroder. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**; 46: 888-908.

Kollef M. H. The importance of appropriate initial antibiotic therapy for hospital-acquired infection. *Am. J. Med.* **2003**; 115: 582-584.

Kotb M. Bacterial pyrogenic exotoxin as superantigens. *Clinical Microb. Rev* **1995**; 8(3): 411-426.

Kumar V., Sharma A. Innate immunity in sepsis pathogenesis and its modulation: new immunomodulatory target revealed. **2008**.

Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F. Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenil chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol.* **1998**; 17: 288-292.

Jorgensen J. H. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *Journal of Clinical Microbiology.* **1993**; 31: 2841-2844.

La Merck Page. <http://www.merck.com> 13 Aprile 1998.

La Scola B., and Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry. *PLoS One* **2009**; 4: 8041.

Lagan AL, Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Pathogenesis of the systemic inflammatory syndrome and acute lung injury: role of iron mobilization and decompartmentalization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**; 294: 161-174.

Lamoth F., Jaton K., Prod'hom G., Senn L., Bille J., Calandra T., and Marchetti O. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol* **2010**; 48: 3510-3516.

Leaver SK, Finney SJ, Burke-Gaffney A, Evans TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Crit Care Med* **2007**; 35: 1404-1410.

Legrand M., Klijn E., Payen D. and Ince C. The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: does the pathogen matter? *J Mol. Med.* Feb **2010**; 88(2): 127-133.

Lehmann L. E., Alvarez J., Hunfeld K. P. et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit. Care Med.* **2009**; 37(12): 3085-3090.

Lehmann L. E., Hunfeld K. P., Emrich T., Haberhausen G., Wissing H., Hoefft A., et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* **2008**; 197: 313-24.

Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD, Lever A., and Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* **2007**; 335: 879-883.

Leibovici L., Shraga I., Drucker M. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection *J Intern Med.* **1998**; 244: 379-86.

Levi M, van der PT, ten CH. Tissue factor in infection and severe inflammation. *Semin Thromb Hemost* **2006**; 32: 33-39.

Levy MM., Fink MP., Marshall JC., et al. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* **2003**; 31 (4): 1250-1256.

Ling T. K., Liu Z. K., Cheng A. F. Evaluation of the Vitek2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41: 4705-4707.

Lobo S. M., Lobo F. R., Bota D. P., et al. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* **2003**; 123(6): 2043-2049.

Lodise T. P., Mckinnon P. S., Swiderski L. and Rybak M. J. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **2003**; 36: 1418-1423.

Loeffler J., Henke N., Hebart H., Schmidt D., Hagemeyer L., Schumacher U., and Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence

resonance energy transfer and the Light Cycler system. *J. Clin. Microbiol.* **2000**; 38: 586-590.

Louie R. F., Tang Z., Albertson T. E., Cohen S., Tran N. K., Kost G. J. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* **2008**; 36: 1487-1492.

Lucignano B., Ranno S., Liensfeld O., Pizzorno B., Putignani L., Bernaschi P., Menichella D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **2011**; ahead of print.

Lupetti A., Barnini S., Castagna B., Capria A. L., Nibbering P. H. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J. Clin. Microbiol Infect Dis* **2010**; 29: 89-95.

Lupetti A., Barnini S., Castagna B., Nibbering P. H., Campa M. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**; 16: 986-991.

Luzzani A., Polati E., Dorizzi R., et al. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med.* **2003**; 31:1737-1341.

Mackay I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**; 10 (3): 190-212.

Magnotti L. J., Deitch E. A. Burns, bacterial translocation. Gut barrier function, and failure. *Burn Care Rehabil.* **2005**; 26: 383-391.

Mak T. W., Saunders M. E. Perspective on immunity and immunology. *The immune response: basic and clinical principles.* Elsevier Inc. **2006**; 1: 7-13.

Malaguarnera M, Di Fazio I, Romeo MA, et al. Elevation of interleukin-6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol*; **1997**; 32: 211-215.

Mancini N., Clerici D., Diotti R., Perotti M., Ghidoli N., De Marco D., Pizzorno B., Emrich T., Burioni R., Ciceri F., et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* **2008**; 57(5): 601-604.

Marchant A, Deviere J, Byl B, et al. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*. **1994**; 343: 707-708.

Marshall J. C., Vincent J. L., Fink M. P. et al. Measures, markers and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med*. **2003**; 31: 1560-1567.

Marshall JC, Cohen J, eds. Immune Response in the Critically Ill. Berlin, Heidelberg: Springer. **2002**: 116-39.

Martin G. S., Mannino D. M., Eaton S., and Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med*. **2003**; 348: 1546-1554.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **2003**; 348: 1546-1554.

Meisner M. Patobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta*. **2002**; 323: 17-29.

Meisner M., Tschakowsky K., Palmaers T., et al. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care (Lond)*. **1999**; 3: 45-50.

Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M., and Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol*. **2008**; 46: 1946-1954.

Mokart D., Merlin M., Sannini A., et al. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth*. **2005**; 94: 767-773.

Monneret G, Lobaune J. M., Isaac C., et al. Procalcitonin and C reactive protein levels in neonatal infections. *Acta Paediatr*. **1997**; 86: 209212.

Morgan M., Marlowe E., Della-Latta P., Saliminia H., Novak-Weekley S., Wu F., Crystal B. S. Multicenter evaluation of a new shortened peptide nucleic acid fluorescens in situ hybridization procedure for species identification of select Gram-negative bacilli from blood cultures. *J. of Clin. Microbiol.* **2010**; 48(6): 2268-2270.

Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W *et al.* Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000; **28**: 977-983.

Murray P. R., Spizzo A. W., Niles A. C. Clinical comparison of the recoveries of bloodstream pathogens in Septi-Chek brain heart infusion broth with saponin, Septi-Chek tryptic soy broth, and the isolator lysis-centrifugation system. *J. Clin. Microbiol.* **1991**; 29: 901-905.

Myeong Hee Kim, Gayoung Lim, So Young Kang, Woo-In Lee, Jin-Tae Suh, and Hee Joo Lee. Utility of Procalcitonin as an Early Diagnostic Marker of Bacteremia in Patients with Acute Fever. *Yonsei Med J* 2011; 52(2): 276-281.

Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma.* **1997**; 42: 446-454.

Nguyen A, Yaffe M.B. Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis. *Crit Care Med.* **2003**; 31(1) (Suppl.).

Noursadeghi M, Cohen J. The acute phase response and enhancing resistance to bacterial infection. *J Immunol.* **2002**; 169: 913-919.

Nzaeko BC, Al-Qasabi SS. Evaluation of the neutralizing capacity of the BACTEC medium for some antibiotics. *Br J Biomed Sci.* **2004**; 61: 171-174.
O'Neill L. A. J., "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress". *Immunological Reviews.* **2008**; 226 (1): 10-18.

Oberhoffer M, Karzai W, Meier- Hellmann A, et al. Sensitive and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med.* **1999**; 27: 1814-1818.

Oberhoffer M., Stonans I., Russwurm S. et al. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by

lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med.* **1999**; 134: 49-55.

Parahitiyawa N. B., Jin L. J., Leung W. K., Yam W. C., and Samaranyake L. P. Microbiology of Odontogenic Bacteremia: beyond Endocarditis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**; 22: 46-64.

Peleg A. Y., Tilahun Y., Fiandaca M. J., D'Agata E. M., Venkataraman L., Moellering Jr. R. C., and Eliopoulos G. M. Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **2009**; 47: 830-832.

Pellestor F., Paulasova P., and S. Hamamah. Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. *Curr. Pharm. Des.* **2008**; 4: 2439-2444.

Pepys M. B., Baltz M. L. Acute phase proteins with special reference to C reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Advances in immunology.* **1983**; 34: 141-212.

Pepys M. B., Hirschfield G. M. C-reactive protein: a clinical update. *J Clin Invest.* **2003**; 111(12): 1805-1812.

Peters R.P., van Agtmael M.A., Danner S.A., Savelkoul P.H., Vandembroucke-Grauls C.M. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis.* **2004**; 4 (12): 751-760.

Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44: 257-259.

Pignone M., Greth K. M., Cooper J., Emerson D., and Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2006**; 44: 1963-1970.

Pinsky M. R., Vincent J. L., Deviere J., et al. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* **1993**; 103: 565-575.

Póvoa P, Almeida E, Moreira P, et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med.* **2002**; 24: 1052-1056.

Procop, G. W. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **2007**; 45(Suppl. 2): 99-111.

Qian, J., Cutler J. E., Cole R. B., and Cai Y. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**; 392: 439-449.

Qiang S, Chang-chun S, Xiang-hong Z, Zhuo S, Shan-shan S, Xiang-ming F, Qi-xing D, and Stuber F. Interleukin 10.G microsatellite in the promoter region of the interleukin-10 gene in severe sepsis. *Chinese Medical Journal.* **2006**; 119 (3): 197-201.

Rau B, Steinbach G, Gansauge F, et al. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut.* **1997**; 41: 832-840.

Rau S, Kohn B, Richter C. et al. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Vet Clin Pathol.* **2007**; 36: 253-260.

Redl H, Spittler A, Strohmaier W. Markers of sepsis. In Vincent J, Carlet J, Opal SM. *The Sepsis Test.* **2003**; 4: 47-66.

Reimer L.G., Wilson M. L., Weinstein M. P. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Cl. Microbiol. Rev.* **1997**; 10: 444-465.

Reinhart K., Meisner M., Brunkhorst F. M. Markers for Sepsis Diagnosis: What is Useful? *Crit Care Clin.* **2006**; 22: 503-519.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S. et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* **2001**; 345: 1368-1377.

Rodero L., Cuenca-Estrella M., Cordoba S., Cahn P., Davel G., Kaufman S., Guelfand L., and Rodriguez-Tudela J. L. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40: 2266-2269.

Safdar A., Rodriguez G. H., Balakrishnan M., Tarrand J. J., and Rolston K. V. Changing trends in etiology of bacteremia in patients with cancer. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**; 25: 522-526.

Safdar, A., G. H. Rodriguez, M. Balakrishnan, J. J. Tarrand, and K. V. Rolston. Changing trends in etiology of bacteremia in patients with cancer. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**; 25: 522-526.

Sauer S., Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**; 8: 74-82.

Schinella M., Ruscio M. Razionale utilizzo per un corretto approccio all'utilizzo dei marker di sepsi. *RiMel/IJLaM* **2008**; 4 (Suppl.).

Schuetz, P., M. Christ-Crain, R. Thomann, C. Falconnier, M. Wolbers, I. Widmer, S. Neidert, T. Fricker, Blum, C. U. Schild, K. Regez, R. Schoenenberger, C. Henzen, T. Bregenzer, C. Hoess, M. Krause, H. C. Bucher, W. Zimmerli, and B. Mueller. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections. The ProHOSP Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2009**; 302: 1059-1066.

Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD, et al. Relationship of bacteremia to tooth brushing in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc* **1973**; 87: 616-622.

Seifert, H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* **2009**; 48(Suppl. 4): 238-245.

Selberg O., Hecker H., Martin M., et al. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentration of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* **2000**; 28: 2793-2798.

Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P. E., Rolain J. M., and Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **2009**; 49: 543-551.

Shah H. N., Collins M. D. Fatty acid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Bacteroides melaninogenicus* and related taxa. *J. Appl. Bacteriol.* **1980**; 48: 75-87.

Shenkin A, Fraser WD, Series J, et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res.* **1989**; 8: 123-127.

Shepard J. R., Addison R. M., Alexander B. D., Della-Latta P., Gherna M., Haase G., Hall G., Johnson J. K., Merz W. G., Peltroche-Llacsahuanga H., Stender H., Venezia R. A., Wilson D., Procop G. W., Wu F., and Fiandaca M. J. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **2008**; 46: 50-55.

Shimetani N, Shimetani K e Mori M. Clinical evaluation of the measurement of serum procalcitonin: comparative study of procalcitonin and serum amyloid A protein in patients with high and low concentrations of serum C-reactive protein. *Scand J Clin Invest.* **2004**; 64: 469-474.

Silva E, Passos RDH, Ferri MB, Poli de Figueiredo LF. Sepsis: from bench to bedside. *Clinics.* **2008**; 63(1):109-120.

Silver JG, Martin AW, McBride BC, et al. Experimental transient bacteraemias in human subjects with clinically healthy gingivae. *J Clin Periodontol* **1979**; 6: 33-36.

Song M., Kellum J. A. Interleukin-6. *Crit Care Med.* **2005**; 33 (12): 463-465.

Spaargaren J., van Boven C.P., Voorn G.P. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus aerobic/F culture medium. *J. Clin. Microbiol.* **1998**; 36 (12): 3731-3733.

Stevenson L. G., Drake S. K., Murray P. R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2010**; 48: 444-447.

Struelens M. J. Detection of microbial DNAemia: does it matter for sepsis management? *Intensive Care Med.* **2009**; 36(2): 193-195.

Suh M. J., Limbach P. A. Investigation of methods suitable for the matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2004**; 10: 89-99.

Tokars J. I. Predictive value of blood cultures for coagulase negative Staphylococci: implication for patient care and health care quality assurance. *Clin. Infect Dis.* **2004**; 39: 333-341.

Tomas I., Alvarez M., Limeres J., Potel C., Medina J., and Diz P. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis.* **2007**; 13: 56-62.

Tsiotou A.G, Sakorafas G.H, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* **2005**; 11(3): 76-85.

Ugarte H., Silva E., Mercan D., et al. Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med.* **1999**; 27: 498-504.

Ventetuolo C. E., Levy M. M. Biomarkers: diagnosis and risk of assessment in sepsis. *Clin Chest Med.* **2008**; 29(4): 591-603.

Vigano EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT™ and BACTEC™ 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2002**; 44: 235-240.

Vigushin D. M., Pepys M. B., Hawkins P. N. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* **1993**; 91: 1351-1357.

Villar J., Maca-Meyer N., Pérez-Méndez L. and Flores C. Bench-to-bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis. *Review Critical Care June* **2004**; 8(3).

von Lilienfeld-Toal M., Lehmann L. E., Raadts A. D. et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* **2009**; 47(8): 2405-2410.

Waites K. B., Brookings E. S., Moser S. A., Zimmer B. L. Direct susceptibility testing with positive Bact/Alert blood cultures by using

Microscan overnight and rapid panels. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**; 32: 21-26.

Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, et al. Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonist and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. *Br J Surg.* **1998**; 85: 818-825.

Wallet F., Nseir S., Baumann L. et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**. Epub ahead of print.

Walsh, E., A. Falsey, E. Nylan, R. Snider, and K. Becker. Abstr. 48th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. **2008.D-2258**.

Weinstein M. P. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41: 2275-2278.

Westh H., Lisby G., Breyse F., Boddinghaus B., Chomarat M., Gant V., Goglio A., Raglio A., Schuster H., Stuber F., Wissing H., and Hoelt A. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**; 15: 544-551.

Wilson D. A., Joyce M. J., Hall L. S., Reller L. B., Roberts G. D., Hall G. S., Alexander B. D., and Procop G. W. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 43: 2909-2912.

Xiaojing Li, Kristin M. Kolltveit, Leif Tronstad and Ingar Olsen. Systemic diseases caused by oral infection. Department of Oral Biology and Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, University of Oslo, Oslo, Norway. *Clinical Microbiology Reviews.* **2000**; 13(4): 547-558.

Yagupsky P., and Nolte F. S. Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbiol. Rev.* **1990**; 3: 269-279.

Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* **2010**. Review Article.