



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina comparata ed alimentazione

Corso di Laurea magistrale interfacoltà in

BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

TESI DI LAUREA

DIAGNOSI EZIOLOGICA RAPIDA DI SEPSI: VALUTAZIONE DI ALCUNE METODICHE MOLECOLARI

Relatore: **Prof.ssa BARBARA CARDAZZO**

Dipartimento di Biomedicina comparata ed alimentazione

Correlatore: **Dott.ssa LUCIA COLLINI**

U.O. Microbiologia e Virologia

Presidio Ospedaliero S. Chiara di Trento

Laureando: **Lorenzo Zeni**

Matr. 604757

Anno Accademico 2012 / 2013

INDICE

RIASSUNTO	- 3 -
INTRODUZIONE	- 5 -
INFEZIONI SISTEMICHE	- 5 -
SEPSI	- 6 -
DEFINIZIONE	- 8 -
EPIDEMIOLOGIA	- 12 -
EZIOLOGIA	- 13 -
FISIOPATOLOGIA	- 16 -
BREVE DESCRIZIONE DEL TRATTAMENTO TERAPEUTICO TRADIZIONALE NELLA SEPSI	- 27 -
MARKERS DI SEPSI	- 28 -
PROTEINA C REATTIVA (PCR)	- 30 -
PROCALCITONINA (PCT)	- 31 -
EMOCOLTURA	- 33 -
NUOVE TECNOLOGIE PER UNA RAPIDA DIAGNOSI DI SEPSI	- 39 -
AFFIANCAMENTO DELLE TECNICHE TRADIZIONALI CON QUELLE INNOVATIVE	- 40 -
TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE E RILEVAMENTO DIRETTE	- 46 -
METODI MOLECOLARI A CONFRONTO	- 50 -
SISTEMA VERIGENE® (NANOSPHERE, INC., USA)	- 50 -
FILMARRAY® BLOOD CULTURE ID PANEL (BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC., USA)	- 52 -
SCOPO	- 56 -
MATERIALI E METODI	- 58 -
METODO TRADIZIONALE	- 58 -
ANALISI MICROBIOLOGICA: L'EMOCOLTURA	- 58 -
METODI MOLECOLARI	- 65 -
SISTEMA VERIGENE® (NANOSPHERE, INC., USA)	- 65 -
FILMARRAY® BLOOD CULTURE ID PANEL (BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC., USA)	- 73 -
PROCEDURE SPERIMENTALI	- 79 -
RISULTATI	- 81 -
DISCUSSIONE	- 98 -

CONCLUSIONI **- 104 -**

BIBLIOGRAFIA **- 105 -**

SITOGRAFIA **- 116 -**

RINGRAZIAMENTI **- 119 -**

RIASSUNTO

La sepsi è un'infezione sistemica caratterizzata dalla presenza di batteri nel torrente circolatorio e attualmente è una patologia con un'incidenza in continuo aumento e un conseguente alto tasso di mortalità.

L'utilizzo nella medicina attuale di tecniche diagnostiche invasive e di terapie antibiotiche inadeguate ha causato un incremento dell'incidenza della sepsi e parallelamente lo sviluppo di microrganismi antibiotico-resistenti.

Risulta quindi evidente l'importanza di avere una diagnosi rapida che permetta al clinico di somministrare una adeguata terapia nel più breve tempo possibile.

Ciò incide enormemente sulla probabilità di sopravvivenza del paziente, con una conseguente migliore *compliance* e gestione, riduzione dei tempi di degenza e dei costi della spesa sanitaria.

Attualmente il *gold standard* nella diagnosi di laboratorio di sepsi è l'emocoltura, che consente di identificare l'agente eziologico e determinarne la sua sensibilità agli antibiotici.

Purtroppo il tempo necessario per completare tutto l'iter diagnostico con la tecnica tradizionale, e quindi fornire al clinico le informazioni necessarie per ottenere una terapia mirata, ha una durata di 4-8 giorni, un tempo ancora troppo lungo.

Un aiuto per ridurre i tempi nella diagnosi di sepsi arriva dalle nuove metodiche in biologia molecolare che hanno il potenziale di superare i numerosi limiti della coltura batterica anche se non sono ancora in grado di soppiantarla completamente.

In questo lavoro di tesi, le tecniche di biologia molecolare valutate sono il Sistema Verigene® (Nanosphere, Inc., USA), con i due kit separati per l'identificazione dei batteri Gram-negativi e Gram-positivi, e la piattaforma FilmArray® *Blood Culture Id Panel* (Biofire Diagnostics, Inc., Usa) che si basano rispettivamente sul principio dell'ibridazione del genoma e sul principio di amplificazione del genoma batterico e/o fungino.

Entrambe le metodiche identificano il microrganismo agente eziologico di sepsi direttamente da emocoltura positiva e le sequenze geniche determinanti l'antibiotico-

resistenza in pochissime ore dopo la segnalazione di crescita batterica nel campione da parte del sistema a monitoraggio continuo.

I due metodi molecolari sono stati confrontati con il metodo tradizionale analizzando emocolture positive di distinti casi clinici.

Nella seconda parte del lavoro è stata impostata una iniziale valutazione di sensibilità analitica delle due metodiche molecolari partendo da fiasca di emocoltura inoculata con sospensione batterica di un ceppo ATCC di *E. coli* a concentrazione nota.

Entrambe le metodiche si sono rivelate valide per una diagnosi rapida di sepsi ed inoltre la metodica FilmArray® *Blood Culture Id Panel* è risultata la più sensibile tra i due metodi nel rilevare la più bassa concentrazione batterica nel minor tempo possibile in una emocoltura non ancora segnalata positiva dallo strumentazione *Bactec*.

Parole chiave: sepsi, emocoltura, diagnosi tradizionale di sepsi, diagnosi rapida di sepsi, tecniche molecolari, Verigene®, FilmArray® *Blood Culture Id Panel*.

INTRODUZIONE

INFEZIONI SISTEMICHE

Le infezioni sistemiche sono sostenute o da microrganismi patogeni o da batteri della normale flora residente.

I diversi microrganismi possono instaurare un'infezione sistemica dopo vari eventi come:

- ferite cutanee accidentali, operazioni chirurgiche
- lesioni accidentali delle mucose, lesioni chirurgiche
- propagazione di processi infettivi
- iniezioni di farmaci, droghe o coloranti per tatuaggi
- trasfusioni
- cateterismo intravascolare
- morsi.

La presenza di batteri nel sangue può essere classificata in batteriemia transitoria, intermittente e continua (Seifert, H., 2009).

Una batteriemia transitoria a bassa carica decorre in forma asintomatica ed è di breve durata.

Questo evento è frequente e si verifica come conseguenza di un trauma della cute o delle mucose normalmente colonizzate dalla flora endogena, può essere provocata da cateterizzazione del tratto urinario infetto, colonizzazione batterica di presidi chirurgici invasivi come cateteri venosi centrali e intracardiaci, dall'incisione e dal drenaggio di ascessi e da procedure odontoiatriche in pazienti a rischio come quelli affetti da patologia cardiaca valvolare oppure con protesi valvolari o intravascolari (Birocchi F. et al., 2005; Mancini et al., 2010).

Inoltre la batteriemia transitoria può essere causata da microlesioni determinate dalla masticazione o dalle normali pratiche di igiene orale (Bhanji S. et al., 2002).

La batteriemia intermittente, invece, viene determinata da un periodico rilascio di batteri nel torrente circolatorio da parte di un focolaio infettivo come un ascesso extravascolare o un'infezione di una delle cavità corporee (Mancini et al., 2010).

Ha carattere tipicamente intermittente la batteriemia sostenuta da batteri Gram-negativi che è estremamente critica in pazienti sottoposti a chemioterapia, immunocompromessi, malnutriti o affetti da patologie croniche.

Il sito primitivo di infezione è per lo più rappresentato dai polmoni, dal tratto genitourinario, dall'apparato gastrointestinale e dai tessuti molli inclusa la cute nei pazienti con ulcere da decubito.

La batteriemia continua o persistente si presenta generalmente quando l'infezione è di tipo intravascolare come nel caso di endocarditi infettive, tromboflebiti suppurative e aneurismi, oppure nelle prime fasi di infezioni sistemiche batteriche come la febbre tifoide e la brucellosi (Safdar A. et al., 2006).

L'organismo ospite reagisce e controlla con la sua risposta infiammatoria il processo infettivo che può rimanere circoscritto al sito primario dell'infezione o evolvere verso un'infezione sistemica.

Nel caso di batteriemia associata ad una risposta infiammatoria di tipo sistemica si ha l'insorgenza di una sindrome definita sepsi.

La risposta infiammatoria può essere stimolata da una batteriemia caratterizzata da un focolaio primitivo localizzato in qualsiasi parte dell'organismo da cui i microrganismi irrompono nell'apparato circolatorio in diverse gittate successive, ma anche dalla diffusione nel sangue di tossine microbiche o dalla sintesi di citochine (Mancini et al., 2010; Morici P. et al., 2011).

La sepsi è un'infezione sistemica che risulta essere una grande sfida per la medicina moderna perché è quantitativamente rilevante e prognosticamente severa.

SEPSI

La sepsi è, come la meningite e la polmonite, una malattia batterica invasiva caratterizzata dalla presenza di batteri in siti normalmente sterili.

Questa patologia ha un'incidenza importante ed è caratterizzata da frequenti complicanze gravi.

La sepsi è un'infezione sistemica provocata dalla presenza persistente di un microrganismo patogeno, originario da un focolaio infettivo localizzato, che si moltiplica nel sangue senza essere controllato dal sistema immunitario e dai farmaci.

La sua severità (a seconda del patogeno) può andare da una modesta febbre che si risolve spontaneamente, sino a quadri con shock settici oppure d'insufficienza multipla d'organo che possono condurre alla morte, specialmente se non riconosciuta presto e trattata tempestivamente.

Dal punto di vista clinico, questa malattia presenta una sintomatologia scarsamente specifica per singolo agente eziologico e l'accertamento della sua eziologia è quindi molto importante ai fini terapeutici.

Abitualmente i sintomi insorgono repentinamente con febbre elevata accompagnata da brividi, cefalea e agitazione, raramente può iniziare in maniera graduale, e preceduta da un malessere diffuso, senso di spossatezza, anoressia e dolori muscolari.

Nelle fasi più acute i sintomi descritti si accompagnano anche a un aumento della frequenza respiratoria e cardiaca, alla diminuzione della pressione arteriosa fino allo shock con disturbi della coscienza; inoltre possono comparire insufficienza cardiaca, respiratoria e renale.

Un rapido intervento con semplici azioni tempestive compreso la somministrazione di antibiotici, fluidi per via endovenosa e un trattamento per ripristinare la circolazione può dimezzare il rischio di morte.

I pazienti con sospetta sepsi devono essere affidati immediatamente ad un unità operativa adeguata.

La sepsi è una emergenza medica, rimane la prima causa di morte per infezione, nonostante i progressi della medicina moderna, ed è una condizione clinica frequente e in continuo aumento, di difficile gestione clinica, associata ad una prognosi grave (Angus D.C. et al., 2001; Rivers E. et al., 2001; Kumar A. et al., 2006; Daniels R. et al., 2011; www.epicentro.iss.it).

DEFINIZIONE

I termini sepsi, setticemia, batteriemia e shock settico erano impiegati indistintamente come sinonimi nella letteratura medica fino a metà del XX secolo.

La complessità stessa del processo evolutivo della sepsi creava problemi nell'identificare e utilizzare una terminologia comune e ben definita.

La mancanza di precise definizioni e di criteri diagnostici aveva anche reso difficile o addirittura impossibile il confronto tra i diversi studi con oggetto la sepsi e per questo è stato necessario ricavare una definizione precisa e standardizzata di sepsi.

Risulta quindi importante una nomenclatura quando facilita a comprendere la fisiopatologia e a diagnosticare correttamente lo stato della malattia, questo perché permette di creare una terapia mirata per il paziente. (Russell J.A., 2006).

Furono l'*American College of Chest Physicians* (ACCP) e la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) a convocare una prima *Consensus Conference* nel 1991 per definire una terminologia standardizzata.

In quest'occasione la sepsi venne definita come una infezione associata ad una sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS).

L'introduzione del nuovo termine "*systemic inflammatory response syndrome*" (SIRS) è stato necessario per definire il complesso quadro clinico provocato dall'attivazione sistemica della risposta immunitaria dell'ospite che può essere di origine traumatica, infiammatoria o, come nel caso della sola sepsi, infettiva.

Le definizioni standardizzate prodotte dalla ACCP - SCCM *Consensus Conference* pubblicate nel 1992 furono:

- *Infezione*: fenomeno microbico caratterizzato da una risposta infiammatoria alla presenza di microrganismi o all'invasione di tessuti normalmente sterili da parte di microrganismi.
- *SIRS*: sindrome da risposta infiammatoria sistemica definita da due o più dei seguenti segni clinici:
 1. Temperatura corporea > 38 °C o < 36 °C;
 2. Frequenza cardiaca > 90 min⁻¹;
 3. Frequenza respiratoria > 20 min⁻¹ o PaCO₂ < 32 mmHg;

4. Globuli bianchi > 12.000 mL⁻¹ o < 4.000 mL⁻¹ oppure forme immature >10%.

- *Sepsi*: infezione o sospetta infezione associata a sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) (Ad esempio, febbre, tachicardia, tachipnea e leucocitosi).
- *Sepsi severa*: sepsi associata a disfunzione d'organo (ipotensione, ipossiemia, oliguria, acidosi metabolica, trombocitopenia).
- *Shock settico*: sepsi severa con ipotensione nonostante un'adeguata reintegrazione di liquidi, assieme alla presenza di anomalie della perfusione d'organo.

Lo shock settico e la disfunzione multiorgano sono le più comuni cause di morte nei pazienti con sepsi.

Queste definizioni furono utilizzate per un approccio più uniforme alla sperimentazione clinica, nella formulazione di ipotesi e nella preparazione e valutazione di terapie mirate nei pazienti con sepsi.

Tuttavia, i criteri SIRS vennero considerati troppo sensibili e aspecifici per essere utilizzati nell'identificazione di sepsi nella maggior parte della pratica clinica (Russell J.A., 2006; Ventetuolo e Levy, 2008).

Ogni parametro utilizzato per definire la SIRS può manifestarsi in differenti contesti, ad esempio un aumento del numero di globuli bianchi si osserva in molte patologie di pazienti ricoverati in terapia intensiva, o che hanno subito traumi, pancreatiti, arresto cardiaco, emorragie ed edemi polmonari, la tachicardia si può manifestare a seguito di un arresto cardiaco, anemia, arresto circolatorio, sepsi, la febbre si verifica nella sepsi ma anche a seguito di un infarto o di una embolia polmonare (Vincent J.L. et al., 2009).

Nel 2001 la terminologia è stata perciò rivisitata in un'altra Consensus Conference per rivederne la forza e la debolezza delle definizioni di sepsi e delle condizioni correlate per aumentarne l'accuratezza e l'utilità nella clinica per la diagnosi di sepsi (Figura 1).

Le definizioni di sepsi severa e shock settico sono state confermate mentre il principale cambiamento sta nella definizione di sepsi e in un elenco più completo di segni e sintomi che possono accompagnare la patologia (Levy M.M. et al., 2003).

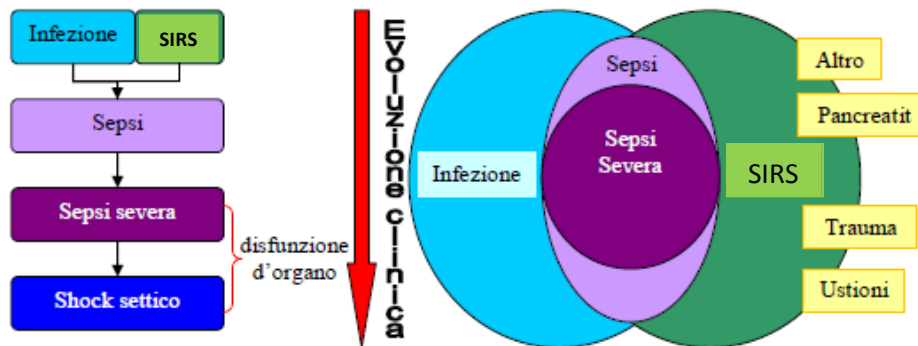


Figura 1 Relazione tra Infezione, SIRS e Sepsis (Nyström P.O., 1998)

Inoltre la conferenza sviluppò uno schema di stadiazione per la sepsi che comprendeva sia i fattori dell'ospite sia la risposta ad un particolare insulto infettivo.

Questo schema si basa su quattro specifiche caratteristiche definite dall'acronimo PIRO:

- Predisposizione, indica condizioni preesistenti potenzialmente in grado di ridurre la sopravvivenza del paziente settico,
- Insulto o Infezione, riflette la capacità patogena del microrganismo,
- Risposta dell'organismo all'evento infettivo, inclusa la manifestazione della SIRS,
- Disfunzione d'Organo, che comprende sia il fallimento d'organo che il fallimento del sistema coagulativo.

L'utilizzo di questo schema risulta utile per definire, diagnosticare e curare i pazienti con sepsi ma soprattutto per ottenere risultati migliori nelle situazioni di sepsi severa e di *shock* settico.

Il modello PIRO non è ancora del tutto definito e attualmente sono in corso diversi studi per valutarne l'efficacia (Ventetuolo e Levy, 2008).

Nella seguente tabella (Tabella 1) sono riassunte le diverse definizioni ottenute dopo i due Consensus Conference.

SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS - 2001
<p><u>SEPSI</u></p> <p>Infezione documentata o sospetta</p> <p>Processo patologico causato dall'invasione di tessuti, fluidi o cavità dell'ospite normalmente sterili da parte di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni, associata ad alcuni dei seguenti segni e sintomi:</p>

variabili generali

1. Temperatura $> 38,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Frequenza cardiaca $> 90\text{ min}^{-1}$ o $> 2\text{ SD}$ sopra il valore normale per l'età;
3. Tacnipnea;
4. Alterazione dello stato di coscienza;
5. Edema importante o bilancio dei liquidi positivo ($> 20\text{ mL/kg}$ nelle 24 ore);
6. Iperglicemia ($> 120\text{ mg/dL}$) in assenza di diabete.

variabili infiammatorie

1. Globuli bianchi $> 12.000\text{ mL}^{-1}$ o $< 4.000\text{ mL}^{-1}$;
2. Globuli bianchi nella norma ma $> 10\%$ di forme immature;
3. Proteina C reattiva $> 2\text{ SD}$ i valori normali;
4. Procalcitonina $> 2\text{SD}$ i valori normali.

variabili emodinamiche

1. Ipotensione arteriosa (SBP $< 90\text{ mmHg}$, MAP $< 70\text{ mmHg}$, o una riduzione della SBP $> 40\text{ mmHg}$ negli adulti o $< 2\text{SD}$ sotto i valori normali per l'età);
2. SvO₂ $> 70\%$;
3. Indice cardiaco $> 3,5\text{ L min}^{-1}\text{ m}^2$.

variabili di disfunzione d'organo

1. Ipossiemia (PaO₂/FiO₂ < 300);
2. Oliguria acuta ($< 0,5\text{ mL/kg/h}$);
3. Aumento della creatinina $> 0,5\text{ mg/dL}$;
4. Anormalità della coagulazione (INR $> 1,5$ o APTT $> 60\text{ sec}$);
5. Ileo (assenza di peristalsi);
6. Piastrinopenia ($< 100.000\text{ mL}^{-1}$);
7. Iperbilirubinemia ($> 4\text{ mg/dL}$).

variabili di perfusione tissutale

1. Iperlattacidemia ($> 1\text{ mmol/L}$).

SEPSI SEVERA

sepsi associata a disfunzione d'organo (ipotensione, ipossiemia, oliguria, acidosi metabolica, trombocitopenia).

SHOCK SETTICO

sepsi severa con ipotensione nonostante un'adeguata reintegrazione di liquidi, assieme alla presenza di anomalie della perfusione d'organo

Tabella 1 Definizioni di sepsi

EPIDEMIOLOGIA

Nei paesi sviluppati si stanno investendo molte risorse per comprendere la fisiopatologia della sepsi per migliorarne la diagnosi precoce e la standardizzazione della sua gestione.

Questa attenzione è dovuta alla sua crescente incidenza e all'elevato tasso di mortalità che viene stimato dal 25 al 30% nel caso di sepsi severa e dal 40 al 70% per lo *shock* settico (Russell J.A., 2006).

Il soggetto più a rischio è l'anziano a causa delle sue ridotte riserve fisiologiche e dalla concomitanza di più malattie croniche, e per questo la sepsi è una delle cause più comuni di mortalità e morbidità proprio nel paziente anziano, soprattutto se immunocompromesso e affetto da più patologie (Mussi C., 2005).

La frequenza di questa patologia purtroppo è in aumento a causa di:

- invecchiamento della popolazione,
- pazienti infetti da organismi resistenti ai comuni trattamenti,
- pazienti con il sistema immunitario compromesso (es. HIV),
- pazienti sottoposti a chirurgia prolungata e ad alto rischio di infezione (Russell J.A., 2006).

La sepsi rappresenta la più frequente causa di morte nei reparti di terapia intensiva arrivando fino al 60% e nei soggetti con più di 65 anni la percentuale risulta ancora più alta.

La sepsi è causata nel 56% dei casi da batteri Gram-positivi, anche se recenti studi dimostrano un progressivo aumento di questo valore, e in quelli rimanenti da batteri Gram-negativi, funghi e virus che possono essere responsabili della risposta infiammatoria iniziale (Mussi C., 2005).

I dati raccolti comprendono 3.147 pazienti adulti con un'età media di 64 anni dei quali il 37,4% hanno avuto la sepsi in cui il polmone è stato il sito più comune di infezione (68%), seguito dall'addome (22%) (Vincent J.L. et al., 2006).

In Italia i rilievi epidemiologici sono sporadici e considerano quasi sempre le infezioni ad insorgenza ospedaliera dove la prevalenza descritta è del 4,9%, delle quali il 30% sono di origine urinaria, con una casistica di 18.667 soggetti.

La batteriemia viene riscontrata in percentuali inferiori all'1% nei pazienti ospedalizzati anche se è presumibile che siano almeno 70-80.000 i casi all'anno.

La scarsità di studi a livello nazionale evidenzia una modesta attenzione nei confronti della tematica che purtroppo ha una prognosi generalmente infausta soprattutto se gli interventi terapeutici non sono tempestivi (Mussi C., 2005).

Un alto tasso di mortalità viene anche correlata alle infezioni del sangue causate dall'utilizzo del catetere venoso centrale (CVC), soprattutto nelle unità di terapia intensiva (Paula et al., 2012).

I Cateteri Venosi Centrali vengono usati frequentemente nella pratica clinica, sia in ospedale che sul territorio, per rendere disponibile un accesso venoso di lunga durata.

Il CVC interrompe l'integrità della cute, prima barriera verso i microrganismi, ed espone il paziente a eventuali infezioni da batteri o funghi che possono diffondersi nel torrente circolatorio (Documenti dell'Agenzia Regionale di Sanità della Toscana, 2007).

Negli Stati Uniti, secondo il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), il tasso medio di sepsi è di 1,8-5,2 casi / 1000 giorni-catetere e ogni anno si verificano 100.000 casi di sepsi CVC correlato tra i pazienti ricoverati in terapia intensiva con 30.000 decessi.

Invece i dati sono più drammatici nei paesi a risorse limitate, i tassi medi di incidenza della sepsi variano da 1,6-44,6 casi / 1000 giorni-catetere nei pazienti adulti e pediatrici ricoverati in terapia intensiva e da 2,6-60,0 casi / 1000 giorni-catetere in terapia intensiva neonatale (Paula et al., 2012).

EZIOLOGIA

L'utilizzo frequente nella medicina moderna di tecniche terapeutiche invasive, di farmaci immunosoppressori e di terapie antibiotiche ha causato un incremento dell'incidenza della sepsi in pazienti ricoverati e in quelli domiciliari, inoltre ha favorito anche lo sviluppo di microrganismi antibioticoresistenti.

Fino alla metà degli anni '80 i principali agenti eziologici della sepsi erano rappresentati dai batteri Gram-negativi ma in seguito i batteri Gram-positivi hanno occupato il loro posto, inoltre dalla metà degli anni '90 si osservò un notevole incremento nel numero di casi di sepsi ad eziologia fungina (Figura 2 e Figura 3).

In diversi studi condotti su pazienti settici hanno rilevato come nel 50% circa delle coorti di pazienti settici non è possibile identificare l'agente patogeno infettivo.

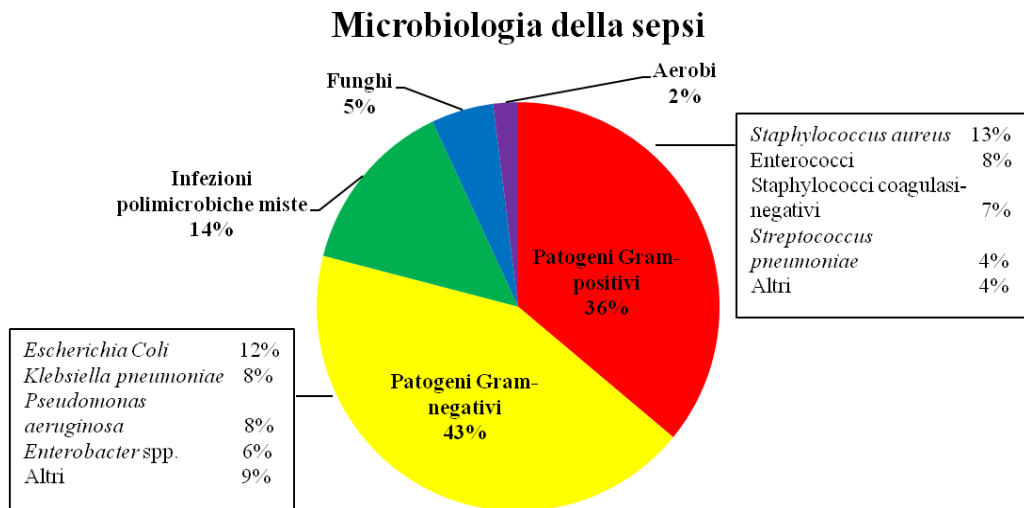


Figura 2 Patogeni nella sepsi (Fish D.N., 2002)

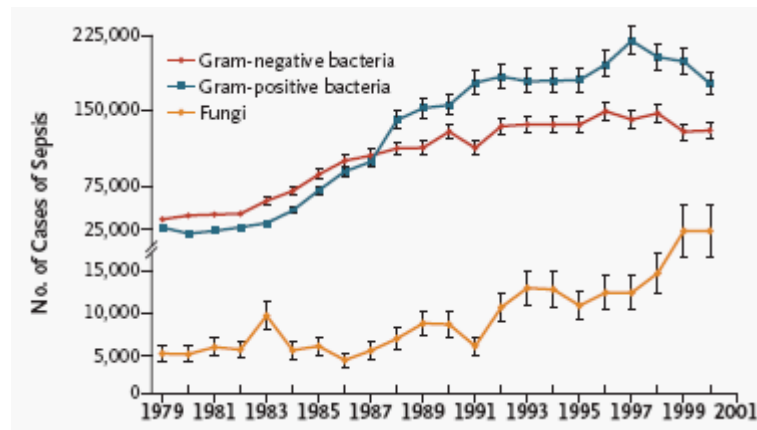


Figura 3 Numero di casi di sepsi negli USA (Martin G.S. et al., 2003)

Potenzialmente la sepsi può originare da un'infezione localizzata in ogni parte dell'ospite, ma ci sono sedi d'infezione più comuni: polmoni 36%, torrente circolatorio 20%, addome 19%, tratto urinario 13%, cute e mucose 7%, altro 5%.

Inoltre, la frequenza dei microrganismi varia a seconda delle cause predisponenti, ad esempio gli *Stafilococchi* sono caratteristici nei casi di ferite chirurgiche, catetere venoso centrale, protesi, tossicodipendenza, neutropenia, l'*E. coli* si rileva spesso nelle infezioni urinarie e cateteri vescicali e la *P. aeruginosa* è tipica nelle infezioni nosocomiali e nell'immunodeficienza.

Da un punto di vista metodologico non esiste un vero e proprio criterio classificativo della sepsi ma, per gli importanti aspetti terapeutici, legati in primo luogo alla scelta della terapia antibiotica empirica, il criterio clinico basato sull'origine dell'infezione è quello che presenta la maggiore validità.

È possibile suddividere la sepsi in:

- Sepsi di origine ignota:
 - di comunità;
 - nosocomiale.
- Sepsi da catetere intravascolare o da catetere venoso centrale;
- Sepsi in ospite immunocompromesso:
 - Tossicodipendente;
 - Splenectomizzato;
 - Neutropenico.
- Sepsi in corso di polmonite:
 - di comunità;
 - nosocomiale.
- Urosepsi:
 - di comunità;
 - nosocomiale
- Sepsi in corso di infezione endo-addominale:
 - A partenza dalle vie biliari.
- Sepsi in paziente ustionato
- Sepsi in paziente con meningite
- Sepsi in corso di artrite settica
- Sepsi a partenza dalla cute e dai tessuti molli:

- infezione dei tessuti molli di comunità;
 - infezione dei tessuti molli nosocomiale.
- Sepsis in paziente con ascite necrotizzante
 - Sepsis in paziente con malattia infiammatoria pelvica
 - Sepsis in paziente con piede diabetico (Fish D.N., 2002; Martin G.S. et al., 2003).

FISIOPATOLOGIA

La comprensione delle interazioni tra l'agente patogeno e i diversi sistemi di risposta dell'organismo ospite sono parte integrante nella ricerca della diagnosi e nell'individuazione di un adeguato piano terapeutico.

La risposta del sistema immunitario, infiammatorio e coagulativo dell'organismo ospite (Figura 4) assieme alle caratteristiche dell'agente patogeno possono dare un'indicazione sull'esito della sepsi.

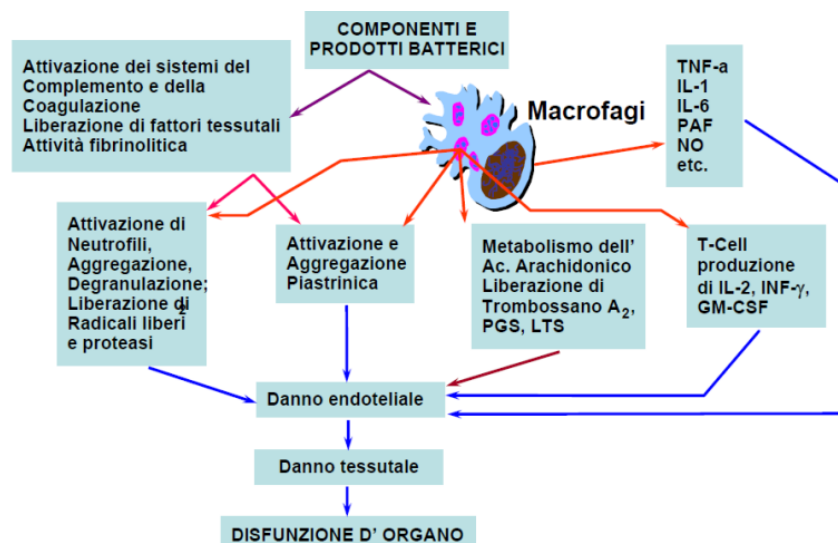


Figura 4 Risposta dell'ospite ad un insulto di tipo batterico (Bone RC., 1991)

Infatti la sepsi associata alla disfunzione d'organo si verifica soprattutto quando le risposte dell'ospite sono inadeguate, oppure quando l'ospite non riesce a contenere un'infezione primaria generalmente correlata alle caratteristiche del microrganismo (presenza di superantigeni e di altri fattori di virulenza, resistenza alla opsonizzazione e alla fagocitosi, oppure antibiotico-resistenza).

Immunità innata e la risposta infiammatoria nella fase precoce della sepsi

La risposta di un organismo ospite verso i microrganismi patogeni viene prima diretta dalle reazioni precoci dell'immunità innata e poi da altre più tardive dell'immunità adattativa.

L'immunità innata è composta da meccanismi di difesa cellulare e biochimici preesistenti all'infezione con la caratteristica di essere aspecifici ma rapidi e con la capacità di stimolare le risposte dell'immunità adattativa per renderla maggiormente efficace ad una reinfezione dello stesso patogeno.

La maggior parte delle manifestazioni cliniche della sepsi e della SIRS sono determinate dalle componenti della risposta immunitaria innata che sono:

- le barriere fisiche e chimiche come gli epitelii e le sostanze antimicrobiche da loro prodotte,
- le cellule fagocitarie (neutrofili e macrofagi) e le cellule *Natural Killer* (NK),
- le citochine che regolano e coordinano molte attività delle cellule dell'immunità innata,
- le diverse proteine del sangue come i fattori del sistema del complemento e altri mediatori della flogosi.

Alcuni di questi componenti sono regolarmente attivi, come le superfici epiteliali della cute, l'epitelio gastrointestinale e quello delle vie respiratorie che fungono da barriere fisiche attive contro l'ingresso dei microrganismi, mentre altri sono inattivi ma pronti a rispondere rapidamente come i fagociti ed il sistema del complemento.

La cute e le mucose dei tratti gastrointestinale e respiratorio sono ricoperte da un continuo strato epiteliale che impedisce l'ingresso ai microrganismi e quindi la perdita della loro integrità determina una predisposizione alle infezioni.

Gli epitelii, come pure alcuni leucociti, producono peptidi con funzione antibiotica come le defensine, secrete dalle cellule epiteliali delle mucose, dai neutrofili, dalle cellule *Natural Killer* e dai linfociti T citotossici, e le catelicidine, espresse dai neutrofili e da vari epitelii di barriera.

I meccanismi dell'immunità innata vengono attivati in modo specifico da alcuni componenti strutturali comuni a gruppi di microbi simili tra loro e sono altamente

conservati per impedire al patogeno di utilizzare la variabilità genetica per sfuggire ai meccanismi di detenzione .

Queste strutture vengono definite come profili molecolari associati ai patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPS) e possono essere strutture presenti sulla membrana esterna di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, parti strutturali di virus, parassiti e funghi, i lipopolisaccaridi (LPS), la componente lipidica A, DNA non metilato, la flagellina, il peptidoglicano e l'acido lipoteicoico.

I recettori che legano i PAMPS sono i recettori per il riconoscimento dei profili (*Pattern Recognition Receptors*, PRR), in particolare i *Toll-like Receptors* (TLR) che sono esposti sulla superficie dei mediatori dell'immunità innata come i neutrofili e i macrofagi.

Esempi di *Toll-like Receptors* sono il TLR-2 che riconosce il peptidoglicano della parete cellulare dei batteri Gram-positivi e il TLR-4 che riconosce i lipopolisaccaridi esposti sulla parete dei Gram-negativi.

La risposta infiammatoria nella fase precoce della sepsi è iperattiva e provoca direttamente e indirettamente diffusi danni tissutali coinvolgendo meccanismi di difesa cellulare e umorale.

Questi danni sono provocati, non solo dall'agente patogeno, ma soprattutto da mediatori chimici della flogosi liberati da una parte delle cellule del sistema immunitario.

Normalmente la reazione infiammatoria è caratterizzata da una vasodilatazione e da aumento della permeabilità vascolare con un conseguente passaggio di liquidi dal torrente circolatorio al tessuto lesa (edema), e dall'infiltrazione leucocitaria nell'area di lesione.

L'infiammazione ha lo scopo di distruggere e confinare l'agente patogeno ma contemporaneamente attiva anche dei meccanismi che promuovono la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato.

Dal punto di vista molecolare (Figura 5) il legame di TLR-2 o TLR-4 con i PRR determina nelle cellule immunitarie l'attivazione del fattore nucleare κB (NF- κB) citosolico, il quale trasloca dal citosol al nucleo per legarsi a specifici siti.

Questo legame provoca l'aumento della trascrizione di citochine pro-infiammatorie, in particolare del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e dell'interleuchina 1- β , e di citochine anti-infiammatorie quali l'interleuchina 10, TGF β e l'interleuchina 13.

Contemporaneamente avviene una massiccia sintesi di proteine della fase acuta come la proteina C-reattiva e l'attivazione di meccanismi di difesa umorali come il sistema del complemento che stimola la produzione di mediatori pro-infiammatori.

Le citochine pro-infiammatorie vengono prodotte soprattutto nella fase iniziale della sepsi e attivano la risposta immunitaria adattativa inducendo l'espressione di molecole di adesione sulle cellule dell'endotelio vascolare con lo scopo di reclutare al sito dell'infiammazione neutrofili, monociti, macrofagi e piastrine.

Un ruolo importante nella patogenesi iniziale della sepsi viene svolto dal TNF- α .

Le cellule endoteliali esposte al TNF- α vengono attivate per sintetizzare la molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1), la molecola di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM-1) e specifiche chemochine che stimolano direttamente anche la migrazione dei leucociti attraverso la parete dei vasi nei siti di infezione.

Allo stesso tempo i neutrofili attivati up-regolano le integrine di membrana utili a promuovere la loro adesione all'endotelio vascolare e la successiva extravasazione.

Questo reclutamento di cellule attivate e traslocate al sito di infezione per eliminare il patogeno provoca anche danni diretti ed indiretti all'organismo ospite come il danneggiamento dell'endotelio mediante il rilascio di mediatori (proteasi, fosfolipasi A2, prostaglandine e leucotrieni) che aumentano sia la vasodilatazione con alterazioni dell'equilibrio procoagulante-anticoagulante, che la permeabilità vascolare con edemi nei polmoni e in altri tessuti.

Inoltre, il rilascio di mediatori proinfiammatori durante la fase precoce della sepsi stimola l'attività dell'enzima *inducibile nitric oxide synthase* (iNOS) che induce la sintesi e il rilascio da parte delle cellule endoteliali attivate di ossido nitrico, un potente vasodilatatore e importante mediatore dello *shock* settico.

Successivamente segue la fase tardiva della sepsi (fase iporeattiva) che è caratterizzata dalla produzione di citochine anti-infiammatorie.

Tali citochine inibiscono la sintesi dei mediatori proinfiammatori ed inducono l'eliminazione di vari componenti dell'immunità innata, soprattutto dei neutrofili.

Questa situazione determina lo sviluppo di un sistema di difesa dell'ospite iporeattivo e la conseguente immunoparalisi (Russell J.A., 2006; Abbas A.K. et al., 2010).

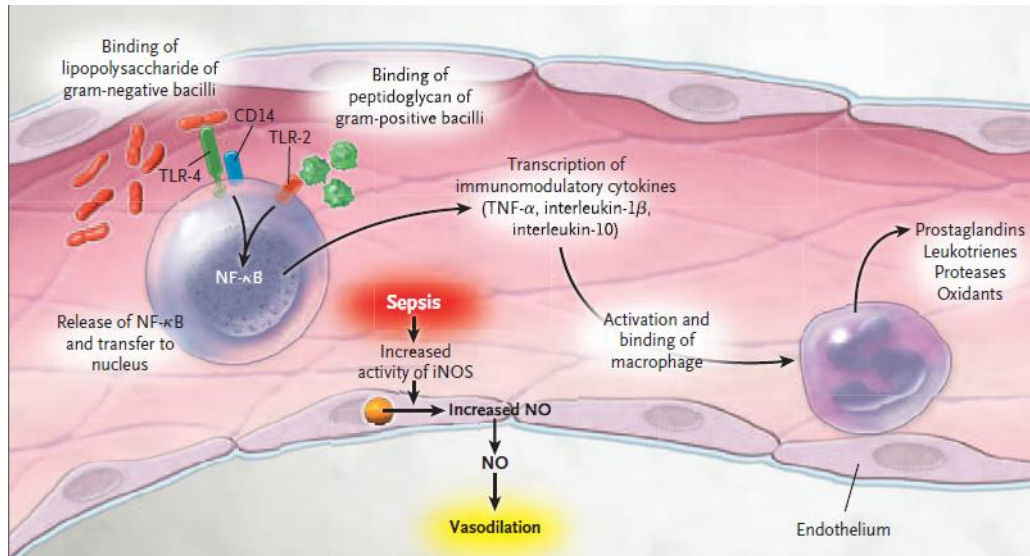


Figura 5 La risposta immunitaria innata (Russell J.A., 2006).

Immunità adattativa e la sua risposta nella sepsi

L'immunità adattativa possiede una risposta altamente specifica e fornisce un'immunità protettiva all'ospite verso quei patogeni con cui è già entrato in contatto.

La risposta immunitaria adattativa inizia e si sviluppa con la cattura e la presentazione dell'antigene da parte delle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells, APC*), come le cellule dendritiche, ai linfociti T *naive* che attiveranno la risposta immunitaria adattativa rivolta all'eliminazione del patogeno che può essere di tipo umorale o cellulo-mediata.

L'immunità umorale viene mediata dalle immunoglobuline, dette anche anticorpi, sintetizzate dai linfociti B che risiedono nel sangue e nelle secrezioni delle mucose e agiscono prevenendo le infezioni ed eliminando i patogeni.

Gli anticorpi opsonizzano i microrganismi patogeni facilitando il loro trasporto da parte delle APC ai componenti dell'immunità innata come le cellule *natural killer* e i neutrofilo.

Invece l'immunità cellulo-mediata viene diretta dai linfociti T che possono essere suddivisi in due popolazioni funzionalmente distinte: linfociti T *helper* che attivano i macrofagi ad eliminare i microrganismi fagocitati, e linfociti T citotossici (CTL) che uccidono direttamente le cellule infettate.

I linfociti T esibiscono sulla loro superficie un'ampia varietà di *T-cell receptors* altamente specifici che legano i peptidi antigenici codificati dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) presenti sulla membrana delle cellule fagocitiche APC.

Avvenuto il riconoscimento, esse si attivano e mediano una risposta verso quell'antigene specifico.

In risposta alla sollecitazione antigenica, i linfociti *T helper* (CD4+) sintetizzano le citochine che stimolano la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, oltre a diverse popolazioni cellulari come i linfociti B, i macrofagi e altri leucociti.

I linfociti *T helper* svolgono un ruolo importante nella reazione infiammatoria presente con una sepsi.

Nella fase iniziale della sepsi queste cellule assumono il fenotipo Th1 e, una volta attivate, sono in grado di sintetizzare un ampio range di citochine pro-infiammatorie, inclusi l'interferone γ , TNF- α e IL-2.

Durante l'evoluzione della sepsi gli stessi linfociti CD4+ possono evolvere verso il fenotipo Th2, producendo citochine anti-infiammatorie (IL-10, IL-4 e IL-13).

Tali citochine aiutano a ridurre gli effetti della risposta immunitaria e possono disattivare i monociti, creando una condizione di immunosoppressione.

L'altra popolazione di linfociti T, i linfociti T citotossici, sono rivolti verso l'eliminazione delle cellule che producono antigeni *no-self*, come le cellule infettate da virus o da altri microrganismi intracellulari.

Gli elementi che condizionano le modalità, la durata e la prevalenza di una risposta secretiva sono tuttora sconosciuti, ma appaiono legati al tipo di patogeno (batterio, micete, virus, parassita, tossina), alla sede e alla quantità di inoculo e alla durata dell'infezione (Russell J.A., 2006; Abbas A.K. et al., 2010; LaRosa S.P., www.clevelandclinicmeded.com).

Coinvolgimento del sistema coagulativo nella sepsi

Fisiologicamente l'emostasi è il risultato di un equilibrio finemente regolato tra il libero flusso sanguigno dove il sangue rimane liquido e la formazione di coaguli che hanno la funzione di controllare eventuali emorragie.

In condizioni patologiche la cascata coagulativa viene alterata a più livelli verso uno stato in cui viene favorita la coagulazione e una situazione antifibrinolitica.

Infatti, l'emostasi alterata permette la formazione di trombi che provocano l'ostruzione di vasi sanguigni con conseguente riduzione del flusso sanguigno agli organi vitali.

Inoltre, nei pazienti settici risulta essere frequente la coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (Figura 6) caratterizzata da un consumo di piastrine e da un prolungamento dei tempi di coagulazione (Remick D.G., 2007).

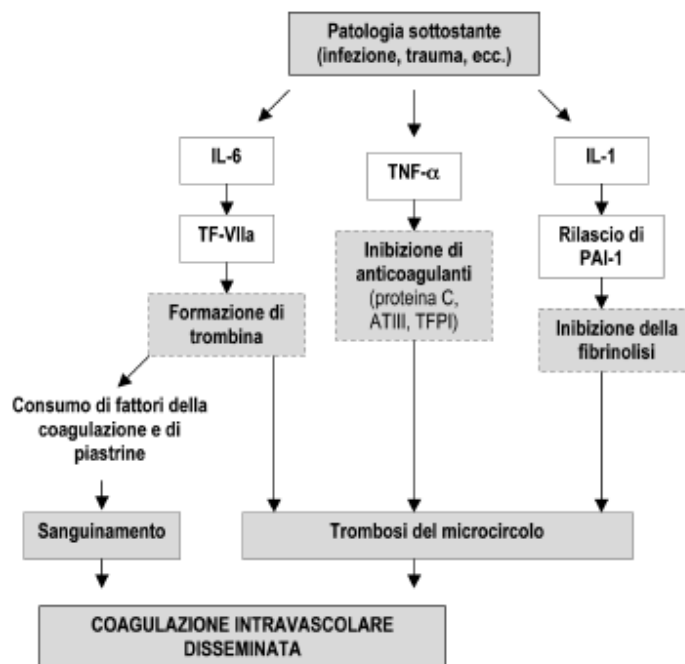


Figura 6 Patogenesi della coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (TF = Fattore tissutale; VIIa = Fattore VII attivato; PAI-1 = Inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1; TFPI = Inibitore della via del fattore tissutale) (Mussi C., 2005)

L'attivazione della coagulazione fa parte della risposta infiammatoria in quanto alcune citochine pro-infiammatorie, come ad esempio IL-6, la attivano (Mussi C., 2005).

La sepsi, con la presenza di TNF-α e di IL-1, è in grado di aumentare l'espressione del fattore tissutale dell'endotelio e quindi attivare la via estrinseca della coagulazione.

La sintesi del fattore tissutale avvia la cascata coagulativa (Figura 7) con l'attivazione dei fattori Va e VIIIa con conseguente formazione della trombina-α, una proteina proinfiammatoria che converte il fibrinogeno in fibrina.

La presenza della fibrina permette la formazione di trombi, costituiti dalle piastrine e dalla stessa proteina, che aderiranno alla parete vascolare causando, in condizioni

patologiche, ostruzioni microvascolari che possono provocare ischemia distale e ipossia tissutale.

Successivamente la trombina- α si lega alla trombomodulina che attiva la proteina C, in circolo come proenzima inattivo.

La proteina C attivata (APC) forma un complesso con il suo cofattore proteina S.

Questo complesso è in grado di inattivare proteoliticamente i fattori Va e VIIIa e di ridurre la sintesi dell'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), una proteina che blocca la fibrinolisi.

Inoltre la APC ha un'azione anti-infiammatoria, infatti riduce l'apoptosi, l'adesione dei leucociti e la produzione di citochine.

Le citochine pro-infiammatorie rilasciate durante la risposta infiammatoria, soprattutto nei casi di sepsi severa, riducono i modulatori naturali dell'infiammazione e della coagulazione.

Infatti, il TNF- α inibisce i fattori anticoagulanti come la proteina C, la proteina S, l'antitrombina III e gli inibitori degli attivatori del fattore tissutale (TFPI) che ostacolano la coagulazione, favorendo la fibrinolisi e rimuovendo i microtrombi.

La IL-1 stimola il rilascio di PAI-1 che andrà ad inibire la fibrinolisi.

Ed infine la IL-6 che attiva il fattore della coagulazione VIIa e il fattore tissutale con conseguente formazione di trombina, questa proteina determina la formazione di microtrombi ma anche un consumo eccessivo dei fattori della coagulazione e piastrine che favoriscono le emorragie.

Inoltre i lipopolisaccaridi batterici e TNF- α contrastano la sintesi della trombomodulina e dei recettori endoteliali della proteina C, provocando una ridotta attivazione della proteina C che stimola un aumento della sintesi del PAI-1 con conseguente inibizione della fibrinolisi.

Le conseguenze cliniche delle alterazioni nella coagulazione causate dalla sepsi sono l'aumento dei livelli dei *markers* della DIC ed eventi diffusi di disfunzione d'organo (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) (Russell J.A., 2006, Ventetuolo e Levy, 2008, Siner J.M., 2009).

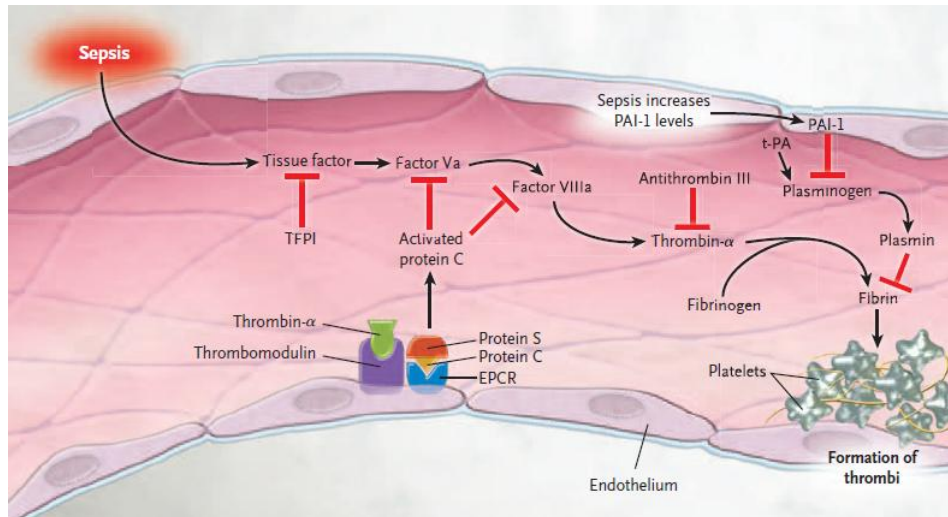


Figura 7 Attivazione della cascata coagulativa nella sepsi (Russell J.A., 2006).

Immunosoppressione e apoptosi nella sepsi tardiva

La fase precoce della sepsi è caratterizzata dalla presenza di un ampio rilascio di citochine pro-infiammatorie, ma con il progredire della patologia queste diminuiscono. Infatti nella fase tardiva della sepsi i livelli della citochina proinfiammatoria TNF- α diminuiscono e contemporaneamente aumentano quelli della citochina antiinfiammatoria interleuchina 10 (IL-10).

La IL-10 arresta la sintesi di TNF- α da parte dei macrofagi, impedisce l'espressione di molecole costimolatorie nei macrofagi e nei linfociti T, e sembra che favorisca anche una progressiva immunosoppressione dell'organismo ospite tramite l'apoptosi.

L'apoptosi di cellule immunitarie della linea linfoide viene stimolata anche dalle citochine pro-infiammatorie e dall'aumento dei livelli circolanti di glucocorticoidi ed inoltre l'aumento dei livelli di TNF- α e lipopolisaccaride durante la sepsi può indurre in apoptosi le cellule epiteliali, intestinali e polmonari.

La fase tardiva della sepsi è contraddistinta anche dall'evoluzione delle cellule T che dal fenotipo Th1, sintetizzante citochine pro-infiammatorie, passano al fenotipo Th2 che produce citochine anti-infiammatorie.

La progressiva scomparsa dei linfociti, causata dagli eventi di apoptosi, compromette la capacità del sistema immunitario di controllare l'infezione, concorrendo ad un aumento della morbilità nella sepsi.

L'apoptosi di linfociti tissutali e circolanti, come i linfociti B e T CD4+, è stata osservata sia in modelli animali sia in pazienti morti per sepsi.

Quindi, dopo una fase precoce della sepsi caratterizzata dalla risposta prevalentemente proinfiammatoria, si presenta una fase tardiva con una risposta di tipo antiinfiammatoria (Figura 8).

In questa fase, con una compromissione del sistema immunitario, l'organismo ospite diventa suscettibile a fenomeni di infezioni secondarie e di riattivazione virale.

In conclusione, i decessi che avvengono durante la fase iniziale di risposta proinfiammatoria sono causati dal massiccio rilascio di citochine pro-infiammatorie che favoriscono fenomeni di disfunzione multiorgano, mentre quelli che accadono nella fase tardiva della sepsi sono determinati dall'incapacità dell'ospite di rimuovere l'infezione primaria o dallo sviluppo di infezioni secondarie nosocomiali a seguito della immunosoppressione (Russell J.A., 2006).

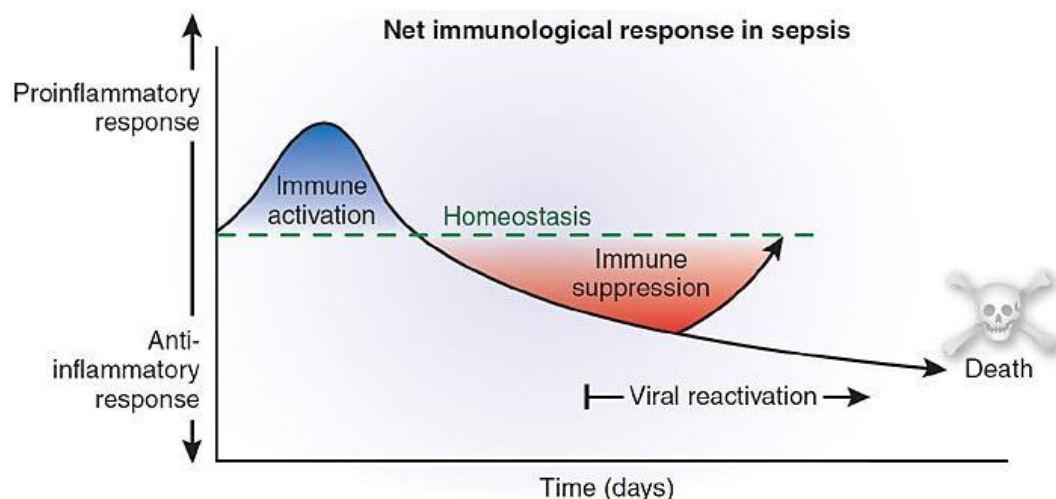


Figura 8 La risposta immunologica nella sepsi (Hotchkiss R.S. et al., 2009)

La sepsi e la disfunzione d'organo

L'alterazione delle vie di segnalazione causate dalla sepsi portano in ultima istanza a lesioni dei tessuti e ad una disfunzione multiorgano, con lo sviluppo della cosiddetta *multiple organ dysfunction syndrome* (MODS).

La MODS è definita come la presenza di alterazioni della funzione d'organo in un paziente critico tale da rendere impossibile il mantenimento dell'omeostasi senza intervento esterno ed è considerata lo stadio conclusivo della sepsi.

Il termine “disfunzione” individua un evento nel quale la funzione d’organo è incapace di mantenere l’omeostasi, mentre il termine “sindrome” indica un insieme di segni e sintomi multipli e progressivi, la cui patogenesi è correlata (Russell J.A., 2006; Mussi C., 2005).

Per la determinazione della disfunzione d’organo si possono utilizzare i criteri sviluppati da Marshall o del SOFA score (*Sequential Organ Dysfunction Assesment*) (Marshall J et al., 1995; Vincent J.L. et al., 1996).

La disfunzione di uno o più organi deve far sospettare una sepsi e nessun organo può essere considerato immune (Tabella 2).

La disfunzione cardiovascolare è caratterizzata da shock circolatorio, dalla redistribuzione del flusso sanguigno con conseguente diminuzione della resistenza vascolare, ipovolemia, diminuzione della contrattilità miocardica associata a livelli elevati di ossido nitrico, TNF- α , interleuchina-6 e altri mediatori.

La disfunzione respiratoria è contraddistinta da un’alterazione della permeabilità capillare che causa inizialmente edema interstiziale e poi alveolare; i neutrofili che raggiungono questo livello iniziano e amplificano il danno alle membrane capillari fino al raggiungimento del quadro di *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS).

Quando si riduce la portata cardiaca il primo tessuto a soffrirne è la mucosa intestinale, sia a causa della particolare circolazione dei villi intestinali sia per il fatto che è la prima ad essere sacrificata a favore di organi più importanti.

La crescita anomala di batteri nel tratto gastroenterico, per l’inversione della polarità funzionale degli enterociti, altera la barriera intestinale con il passaggio di batteri e di endotossine in circolo.

I mediatori proinfiammatori sintetizzati raggiungono il fegato e la circolazione sistemica attraverso il circolo portale.

L’organo che risente maggiormente dello stato settico è il rene, infatti la prevalenza di insufficienza renale acuta in presenza di sepsi può arrivare ad oltre il 60% ed è indicativa di prognosi severa.

La vasodilatazione provocata dai mediatori del sistema immunitario causa ipotensione sistemica e ipoperfusione del tessuto renale.

Inoltre le citochine, in particolare il TNF- α , inducono necrosi tubulare sia diretta che secondaria all'attivazione di neutrofili polimorfo nucleati (Mussi C., 2005).

Apparato cardiovascolare	Sangue
• Frequenza cardiaca ≤ 54 bpm	• Conta leucocitaria $\leq 1000/\mu\text{L}$
• Pressione arteriosa media ≤ 49 mmHg	• Conta piastrinica $\leq 20000/\mu\text{L}$
• Fibrillazione o tachicardia ventricolare	• Ematocrito $\leq 20\%$
• pH $\leq 7,24$ e PaCO ₂ < 40 mmHg	
	Fegato
Apparato respiratorio	• Bilirubina totale > 3 mg/dL
• Frequenza respiratoria ≤ 5 o ≥ 49 apm	• GOT > 2 volte la norma
• PaCO ₂ ≤ 50 mmHg	• PT INR $> 1,5$
• Dipendenza da ventilazione assistita dopo il 4° giorno di terapia intensiva	
	Apparato gastroenterico
Rene	• Sanguinamento che richiede la trasfusione di almeno due unità di sangue
• Quantità di urine ≤ 479 mL/die o ≤ 159 mL/8 ore	
• Urea 100 mg/dL	Sistema nervoso
• Creatinina 3,5 mg/dL	• Glasgow Coma Scale < 6 (in assenza di sedazione)

Tabella 2 Modificazioni a carico dei singoli organi (Mussi C., 2005)

BREVE DESCRIZIONE DEL TRATTAMENTO TERAPEUTICO TRADIZIONALE NELLA SEPSI

La diagnosi di sepsi viene stabilita in base ai sintomi e ai segni clinici del paziente abbinati a esami radiologici e a esami di laboratorio come la ricerca di *biomarkers* e l'identificazione del microrganismo responsabile dell'infezione.

La gestione del paziente settico viene fatta seguendo precise linee guida, pubblicate nel 2004 e successivamente revisionate nel 2008, che sono definite nell'articolo: *Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock*, 2008.

Le linee guida per il trattamento in emergenza della sepsi danno un chiaro ordine a somministrare al paziente una rapida e il più possibile mirata terapia sostenuta da ventilazione meccanica, somministrazione di antibiotici ad ampio spettro e, se possibile, anche di proteina C ricombinante umana attivata per evitare un rischio di trombosi venosa profonda.

Invece, nel caso di pazienti che manifestano sepsi grave viene previsto in successione l'immediato ricovero in terapia intensiva del paziente con ipotensione o lattato nel siero >4 mmol/L (entro le prime 6 ore dalla diagnosi di sepsi), rapida diagnosi dell'infezione tramite raccolta di almeno due emocolture appropriate prima della terapia antibiotica, celere somministrazione di antibiotici (entro la prima ora di riconoscimento di sepsi grave e di *shock* settico), identificazione del sito anatomico dell'infezione (tratto respiratorio, addome, cute, tratto urinario, SNC, protesi e cateteri) ed eventuale disinfezione.

Il sito di infezione e il microrganismo patogeno sono quasi sempre sconosciuti all'inizio della sepsi e quindi è importante, prima dell'assunzione dell'antibiotico, ottenere adeguati campioni per l'emocoltura.

Anche con questa scarsità di informazioni è assolutamente necessario intervenire tempestivamente con una terapia antibiotica empirica ad ampio spettro scegliendo l'antibiotico con la coscienza della possibile resistenza dell'agente infettivo al trattamento come ad esempio i bacilli Gram-negativi altamente resistenti, infezioni funginee, *Staphylococcus aureus* *meticillina-resistente* (MRSA), *Enterococcus vancomicina-resistente*, *Pneumococcus* penicillina-resistente.

Diversi studi hanno documentato come il decorso della sepsi e la manifestazione di *shock* settico aumentano se il microrganismo responsabile dell'infezione è resistente alla terapia antibiotica iniziale (Dellinger R.P., 2008; Russell J.A., 2006).

MARKERS DI SEPSI

Nei casi di sepsi, il ritardo nella diagnosi e nella terapia antibiotica incide sulla mortalità dei pazienti critici.

Stabilire diagnosi e terapia è molto importante ma ad ostacolare la loro definizione è la difficoltà nel differenziare la sepsi dagli stimoli non-infettivi nelle situazioni di SIRS, soprattutto in quei pazienti critici che possono aver sviluppato la SIRS per altre cause come pancreatiti, traumi, ustioni, ecc..

Questa situazione spinge prevalentemente a stabilire una terapia con antibiotici ad ampio spettro che purtroppo aumentano l'antibiotico-resistenza da parte dei patogeni soprattutto negli ambienti di terapia intensiva.

Pertanto, l'individuazione di un *biomarker* della sepsi altamente preciso risulta decisivo in situazioni critiche con la capacità di escludere o confermare un'infezione batterica acuta, di valutare la risposta infiammatoria sistemica all'infezione e la risposta dell'ospite alla terapia instaurata.

Questi sono fattori importanti per il trattamento e la prognosi di pazienti settici (Kibe S.,2011).

Un *marker* biologico ideale deve avere diverse caratteristiche:

- utile nella diagnosi precoce, fornire informazioni per una diagnosi definitiva o un aiuto per individuare una probabile diagnosi,
- fornire informazioni riguardanti la prognosi includendo il paziente in sottopopolazioni il cui outcome è migliore/peggiore della popolazione in esame,
- fornire, nel decorso clinico, utili informazioni di come il paziente risponde alla terapia ed eventualmente aiutare nella modulazione della strategia terapeutica,
- alta specificità e sensibilità,
- possedere un tempo di emivita clinicamente utile,
- essere facilmente determinabile,
- nel caso della sepsi, permettere diagnosi differenziale tra eziologia infettiva e non infettiva.

I marcatori disponibili per la diagnosi di sepsi sono numerosi:

conta leucocitaria, Proteina C reattiva (PCR), Procalcitonina (PCT), Endotossina, Citochine, Recettore di IL-1, Fattori del complemento, Endotelina-1, ICAM-1 e VCAM-1, Fosfolipasi A2, PGE2, Lattoferrina, Neopterin, Elastasi, diverse interleuchine (ILS), adrenomedullina (ADM) e pro-ADM, peptide natriuretico atriale (ANP) e pro-ANP, pro-

vasopressina (copeptina), interferone- γ (IFN- γ), *triggering receptor* espresso su cellule mieloidi 1 (TREM-1) e resistina (Schinella M. et al., 2008; Kibe S., 2011).

Purtroppo attualmente, nella sepsi, non è ancora stato individuato un *marker* ideale e quelli utilizzati normalmente (febbre, leucocitosi, PCR, PCT, ecc) spesso sono dotati di scarsa sensibilità e specificità, di conseguenza hanno una utilità limitata nella gestione dei pazienti.

Il loro dosaggio dovrà essere utilizzato e valutato nel contesto del quadro clinico in cui si trova il paziente e quindi risulta indispensabile determinare l'appropriatezza della richiesta dei singoli marcatori in collaborazione con il clinico per sfruttarne al meglio le loro potenzialità: diagnostiche, di monitoraggio terapeutico e di prognosi (Schinella M. et al., 2008).

PROTEINA C REATTIVA (PCR)

La proteina C reattiva (PCR) viene sintetizzata dal fegato dopo l'azione di diversi mediatori dell'infiammazione come le IL-1, IL-6 e IL-8.

Questo *biomarker* viene prodotto 4-6 ore dopo lo stimolo flogistico, raddoppia la sua concentrazione in circolo entro 8 ore e raggiunge il picco in 36-50 ore (Gabay C. et al., 1999; Póvoa P. et al., 2002; Pepys M.B., et al., 2003; Ventetuolo C.E. et al., 2008).

La PCR ha caratteristiche sia pro-infiammatorie che anti-infiammatorie, la sua emivita è di 19 ore e i suoi livelli nel torrente circolatorio rimangono elevati per alcuni giorni dopo la scomparsa dell'infezione.

Elevati livelli plasmatici di PCR indicano la presenza di un'infezione e/o danno d'organo mentre la sintesi della proteina verrà notevolmente ridotta nel caso di insufficienza epatica (Vigushin D.M. et al., 1993; Pepys M.B., 2003).

Il valore normale di PCR plasmatica è <10 mg/L mentre può aumentare fino a 500 mg/L in caso di infezione grave acuta (Bozza F.A. et al., 2005).

L'aumento della PCR non sembra essere correlata alla gravità della flogosi ed inoltre accresce anche in caso di patologie non infettive come malattie autoimmuni, sindromi

acute coronariche, alterazioni reumatiche, tumori maligni e dopo traumi o interventi chirurgici.

In conclusione i valori della proteina C reattiva non permettono di distinguere tra sepsi e SIRS di natura non infettiva (Meisner M. et al., 1999; Ugarte H. et al., 1999; Brunkhorst F.M. et al., 2000; Selberg O. et al., 2000).

Questo marker risulta essere più sensibile di parametri come la conta leucocitaria e la temperatura ma meno specifica di altri come la PCT (Claeys R. et al., 2002).

Tuttavia, la PCR è un *marker* comunemente utilizzato di basso costo e ampiamente disponibile.

PROCALCITONINA (PCT)

La Procalcitonina precede la proteina C-reattiva e altri marcatori tradizionali di sepsi nel circolo ematico, ma non è abbastanza precisa per evitare un giudizio clinico del paziente da parte dei medici.

Comunque appare significativo il suo utilizzo nel ridurre la terapia antibiotica nei pazienti ricoverati in terapia intensiva (Kibe S.,2011).

La procalcitonina è un precursore dell'ormone calcitonina, coinvolto nell'omeostasi del calcio, ed è secreta dalle cellule C tiroidee e dalle cellule neuroendocrine dei polmoni e dell'intestino.

In condizioni fisiologiche normali la PCT si scinde in calcitonina, katalcalcina ed altri residui proteici con livelli nel torrente circolatorio generalmente sotto il limite di rilevabilità del test clinico (0,1 ng/mL).

In seguito all'insorgenza di infezioni batteriche gravi e dei relativi quadri di risposta infiammatoria sistemica, la procalcitonina viene sintetizzata in vari tessuti neuroendocrini extratiroidei e circola nella sua forma integra.

La secrezione sistemica della PCT è una caratteristica della risposta infiammatoria che segue all'infezione microbica sistemica e per questo motivo il suo dosaggio viene utilizzato come *biomarker* di infezione batterica e sepsi grave.

In tali condizioni la procalcitonina può raggiungere concentrazioni di 100 ng/mL.

Una caratteristica dei *biomarkers* utilizzati nella diagnosi di sepsi batterica è il repentino aumento della sua concentrazione in circolo che si verifica precocemente durante il processo infettivo.

Nelle infezioni batteriche è stato dimostrato come l'aumento dei livelli plasmatici di PCT inizia 4 ore dopo la manifestazione dell'infezione sistemica e raggiunge il picco massimo tra le 8 e le 24 ore (Schinella M. et al., 2008; Kibe S., 2011).

Livelli plasmatici di PCT uguale o inferiori a 0,5 ng/mL indicano pazienti con scarsa probabilità ad essere affetti da sepsi grave o shock settico, mentre livelli al di sopra di 2 ng/mL individuano i pazienti ad alto rischio (Muller et al., 2000; Becker et al., 2007).

Concentrazioni superiori a 10 ng/mL si riscontrano spesso in pazienti con disfunzione d'organo lontana dal sito primario di infezione (Monneret et al., 1997; Meisner et al., 1999).

Nella seguente tabella (Tabella 3) sono messi a confronto i due *biomarkers* più utilizzati in ambito ospedaliero.

PROTEINA C-REATTIVA	PROCALCITONINA
Proteina della fase acuta prodotta nel fegato, viene rilasciata dopo insulto flogistico su stimolo di IL-1, IL-6 e IL-8	Precursore della calcitonina, sintetizzata nelle Cellule C della Tiroide. In corso di infiammazione anche da altri organi soprattutto fegato e polmone, modulata da LPS, IL-1 β , 2 e 6, TNF α
Azione: pro e antiinfiammatoria	Azione: mediatore pro-infiammatorio
Aumenta dopo 4-6 h	Picco dopo 3-4 ore, plateau a 6-12 ore
Emivita circa 19 h (persistenza per 48 h dopo fine stimolo)	Emivita circa 20 ore (persistenza per 24 h dopo fine stimolo)
Non aumenta in corso di infezioni acute virali	Non aumenta infezioni virali, Diminuisce con antibiotico terapia mirata in atto
Individui sani = valore tra 0.2 e 0.4 mg/dL	Individui sani = < 0.1 – 0.3 ng/mL (0.5 ng/mL)
Valori di CRP > 8 mg/dL sono predittivi di sepsi	Valori di PCT > 2 ng/mL (> 5 ng/mL) sono predittivi di sepsi.

Tabella 3 Confronto fra PCR e PCT (Sierra R. et al., 2004; Luzzani A. et al., 2003)

EMOCOLTURA

L'emocoltura è l'esame "gold standard" per diagnosticare la sepsi in quanto permette di determinare l'agente eziologico e fornisce al clinico utili informazioni per una terapia mirata (Dellinger R. et al., 2008).

L'emocoltura è un prelievo di sangue inoculato in due flaconi separati contenenti un brodo di coltura dedicato allo sviluppo di batteri aerobi e anaerobi (Figura 9).



Figura 9 Set di flaconi emocolture (www.bd.com)

Successivamente al prelievo i flaconi di emocoltura vengono inseriti in una strumentazione (Figura 10) FX Bactec, il più utilizzato, che li mantiene in continua agitazione, a temperatura costante e li monitora in continuo per rilevare l'eventuale sviluppo di microrganismi.



Figura 10 Esempio di un sistema di monitoraggio continuo per emocolture (www.bd.com)

Questi sistemi di monitoraggio continuo, utilizzati nei più comuni laboratori di microbiologia, sono strumenti completamente automatizzati e computerizzati in grado di riconoscere una crescita microbica tramite la rilevazione della produzione di CO₂ scaturito dal metabolismo batterico oppure misurando i cambiamenti di pressione all'interno del flacone derivante dal consumo o dalla produzione di gas (Mancini N. et al., 2010).

Diversi fattori possono influenzare l'efficacia e il significato clinico dell'emocoltura.

Nella fase pre-analitica sono molto importanti le modalità di prelievo e il numero di campioni.

Il prelievo deve essere fatto al sorgere dei primi sospetti di infezione e soprattutto prima della somministrazione di qualsiasi antibiotico, in caso contrario si dovrebbe sospendere la terapia per qualche ora oppure effettuare il prelievo prima della successiva somministrazione dell'antibiotico in modo tale che la concentrazione ematica del farmaco risulti la più bassa possibile.

Quando la sepsi è di origine extravascolare, il paziente presenta generalmente brividi e una forte sensazione di freddo accompagnata da un aumento della temperatura corporea in un determinato momento della giornata.

In questi casi il campione deve essere prelevato quando si genera il brivido e prima del picco febbrile perché è il momento in cui la concentrazione batterica arriva al suo culmine.

Al momento del prelievo si deve riempire un set di flaconi per emocoltura composto da una fiasca per i batteri aerobi e una per i batteri anaerobi.

Nella maggior parte degli episodi di batteriemia è necessario raccogliere due o tre set di emocoltura nell'arco della 24 ore per identificare il patogeno, nel caso si prelevasse un unico set di campioni la probabilità di non identificare un paziente con sepsi è di circa il 35-40% (Cockerill F.R. et al., 2004).

Nei pazienti con endocarditi o altre infezioni endovascolari, oppure con un decorso della malattia non acuto viene raccomandata l'esecuzione di 4 prelievi, uno ogni 6 ore, in modo da avere una maggiore probabilità di individuare il patogeno.

Il prelievo di un maggior numero di emocolture permette di differenziare con maggior accuratezza i veri positivi dai falsi positivi.

Infatti, un problema che riguarda le emocolture è la possibile contaminazione esogena del campione, causata da errori nella fase di prelievo, che rende in certe circostanze difficile capire se il microrganismo è responsabile dell'infezione o rappresenta una contaminazione.

L'accidentale presenza di eventuali batteri commensali della cute, come *stafilococchi coagulasi-negativi*, *corinebatteri* e *propionibatteri*, può ostacolare o addirittura mascherare la crescita dei veri patogeni con la conseguenza di fornire informazioni fuorvianti al clinico (Weinstein M.P., 2003; Tokars J.I., 2004; Hall K.K. et al., 2006).

Un fattore importante per l'accuratezza della diagnosi è il volume di sangue presente nella fiasca dell'emocoltura, infatti è necessario l'inoculo di almeno 3 Unità Formanti Colonie (CFU) per millilitro per avere il 100% di positività (Brown D.R. et al., 1995); si ritiene tuttavia che nei pazienti adulti, in corso di sepsi, la concentrazione per millilitro di sangue è di norma pari a 0,1-1 CFU/mL, mentre in età pediatrica la carica batterica è pari a 10-100 CFU/mL (Kreger B.E. et al., 1980; Reimer L.G. et al., 1997; Conti A. et al., 2008).

Quindi, nell'adulto la quantità ideale di sangue sarà quindi di 5-10 mL per flacone mentre per i pazienti pediatrici da 1-5 mL.

Il rapporto tra il volume del campione e quello del brodo di coltura dovrà permettere la crescita di molti microrganismi, questo rapporto è di 1:5 – 1:10 anche se con l'aggiunta di sostanze che disattivano i fattori inibitori il rapporto ottimale è di 1:5.

Infatti un rapporto ottimale tra il campione ematico e brodo di coltura permette una diluizione dei fattori umorali e cellulari ad attività antibatterica normalmente presenti nel sangue oltre a ridurre gli effetti della terapia antibiotica che risulta già somministrata nel 28-63 % dei pazienti sottoposti all'indagine (Aukenthaler R. et al., 1982; Herzke C. A. et al., 2009; Riedel S. et al., 2010).

Il contenuto delle fiasche di emocoltura, oltre al brodo di coltura, è costituito da resine o carbone che sequestrano le molecole di antibiotico; diversi studi hanno confermato che le resine, rispetto al carbone, permettono di rilevare i microrganismi con maggior frequenza e in minor tempo migliorando la sensibilità dell'esame (Spaargaren J. et al., 1998; Doern G.V. et al., 1998; Flayhart D. et al., 2007; Riedel S. et al., 2010).

Altro fattore importante per una ottima esecuzione dell'emocoltura è il tempo di incubazione.

Il *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ha stabilito che 5 giorni di incubazione sono sufficienti per rilevare la crescita del 95% dei batteri clinicamente significativi (CLSI, 2007).

Diversi studi hanno dimostrato che nel 97,5% delle emocolture contenenti un patogeno risultano positive dopo 3 giorni utilizzando i sistemi automatizzati (Bourbeau P.P. et al., 2005; Baron E.J. et al., 2005).

Nel caso di sospetta endocardite sostenuta da batteri esigenti, oppure setticemie da lieviti o nei casi di pazienti pediatrici, i tempi di incubazione vengono prolungati.

Il sistema di incubazione avvisa della presenza di emocolture positive tramite un segnale acustico e visivo, a questo punto si procede con una valutazione microscopica del patogeno sviluppatosi nei flaconi che darà delle prime indicazioni al clinico per avviare una terapia antibiotica.

Perciò, viene allestito un vetrino di una piccola aliquota del brodo di coltura con colorazione di Gram, questo permette di valutare la dimensione e la forma dei microrganismi in modo da riconoscere la presenza di batteri o miceti ed inoltre aiuta a discriminare i batteri Gram-positivi dai Gram-negativi.

Le informazioni raccolte alla valutazione microscopica permettono al laboratorio, se previsto nel loro flusso di lavoro, di preparare un antibiogramma preliminare utile ad individuare eventuali resistenze o sensibilità alle diverse molecole.

Contemporaneamente all'allestimento dell'antibiogramma preliminare, viene messa in coltura un aliquota del campione di emocoltura positiva su terreno solido che verrà incubata per 18-24h.

Le colonie dei microrganismi presenti sul terreno solido saranno identificate anche con l'uso di saggi biochimici e utilizzate per preparare una sospensione a densità ottica standard da introdurre in un sistema automatizzato che misurerà la sua suscettibilità a diversi antibiotici.

L'antibiogramma preliminare e maggiormente quello definitivo permetteranno al clinico di individuare la terapia più efficace (Morici P. et al, 2011).

Purtroppo, i segni e i sintomi clinici di sepsi si manifestano spesso in assenza di positività dell'emocoltura.

Inoltre, un eventuale somministrazione di una terapia precedente al prelievo dei campioni o la presenza di un patogeno con particolari esigenze nutrizionali abbassa la capacità dell'indagine di individuare il microrganismo, infatti si è dimostrato che i livelli di sensibilità analitica variano fra 8% ed 88% (Carrigan, et al., 2004).

Un limite dell'emocoltura è la scarsa sensibilità nella ricerca di particolari batteri che spesso sono responsabili di polmoniti acquisite in comunità, come *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia pneumoniae* e di altri germi difficilmente coltivabili o addirittura non coltivabili come *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.*, *Nocardia spp* (Peters R.P. et al., 2004; Fenollar F. et al., 2007).

Il valore dell'emocoltura come test diagnostico per batteriemia e sepsi è limitato, infatti, emerge che nel 50% dei casi l'emocoltura risulta negativa anche se la diagnosi di sepsi è certa (Ecker D.J. et al., 2010) ed inoltre i primi risultati vengono forniti dopo 48 ore per concludere l'analisi con l'identificazione e la sensibilità agli antibiotici del patogeno dopo 5 giorni o più (Figura 11) (Ecker D.J. et al., 2010; Tsalik E.L. et al., 2010, Morici P. et al, 2011).

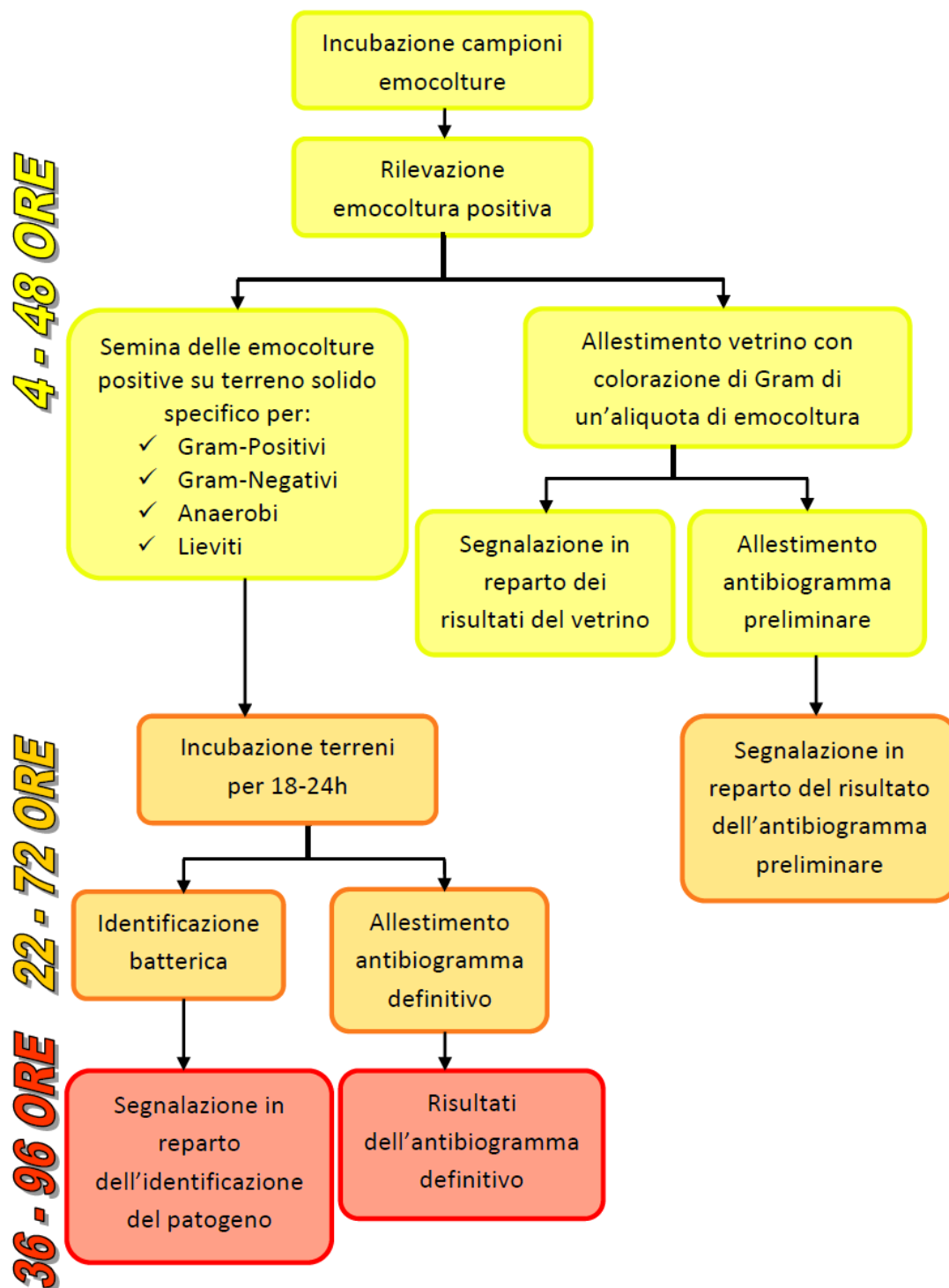


Figura 11 Flusso di lavoro tradizionale con relativa tempistica associato all'analisi di emocoltura positiva

NUOVE TECNOLOGIE PER UNA RAPIDA DIAGNOSI DI SEPSI

Le tecniche per la diagnosi delle infezioni del sangue sono in continuo sviluppo, tuttavia attualmente c'è la necessità di migliorare le caratteristiche dei metodi e soprattutto c'è l'esigenza di ridurre i tempi di risposta.

Un metodo diagnostico ideale dovrebbe identificare in tempi rapidi l'organismo infettante e determinarne anche la resistenza agli antibiotici.

Queste caratteristiche sono necessarie per ottenere una tempestiva e appropriata antibiotico-terapia, soprattutto nei casi di infezioni del sangue più gravi associate a *shock* settico in cui la velocità di risposta influisce notevolmente sul rischio di mortalità, infatti, nei pazienti con *shock* settico ogni ora di ritardo nel somministrare la terapia è associato un calo del 7,6% nella sopravvivenza.

Il *gold standard* attuale per la diagnosi di infezioni del torrente circolatorio è l'emocoltura, purtroppo una sua limitazione importante è il tempo necessario per completare l'indagine che va da 1 a 5 o più giorni nel caso di sospetta sepsi causata da lieviti.

I tempi di risposta di questa tecnica non sono quindi compatibili con la necessità di ottenere risposte rapide per guidare l'antibiotico-terapia.

Inoltre con l'emocoltura è possibile non ottenere risposte nel caso di microrganismi esigenti che possono essere difficili o impossibili da coltivare, oppure si possono ottenere risultati potenzialmente fuorvianti nel caso di una somministrazione antibiotica precedente al prelievo di sangue.

Le tecniche molecolari hanno il potenziale di superare molte limitazioni della coltura batterica ma non è ancora in grado di soppiantarla completamente.

La situazione ideale sarebbe analizzare il sangue del paziente *on site* e fornire tutte le informazioni necessarie per indirizzare immediatamente verso una terapia antibiotica mirata, e in seguito il test dovrebbe fornire dati per la valutazione della terapia misurando la *clearance* degli acidi nucleici del patogeno presenti nel sangue in un certo intervallo di tempo.

Il test molecolare ideale non esiste ma queste caratteristiche dovranno essere poste come obiettivo a lungo termine nella progettazione di nuove tecniche molecolari per la diagnosi di sepsi.

Un obiettivo realizzabile nel breve termine è quello di analizzare il sangue in parallelo ai metodi di coltura e identificarne gli agenti patogeni responsabili dell'infezione tra cui gli organismi non coltivabili, e inoltre rilevare alcuni dei fattori determinanti la resistenza ai farmaci.

Queste informazioni potranno essere disponibili sicuramente prima con le indagini di tipo molecolare rispetto all'emocoltura, anche se non tutti i determinanti molecolari che riguardano la resistenza agli antibiotici sono conosciuti, attualmente sono stati identificati solo i geni che codificano per la resistenza alla meticillina, vancomicina e carbapenem (Ecker D.J. et al., 2010).

Le tecniche molecolari attualmente disponibili in commercio possono essere distinte in quelle basate sul principio di amplificazione del genoma batterico e/o fungino e quelle che sfruttano il principio dell'ibridazione (Morici P. et al, 2011).

AFFIANCAMENTO DELLE TECNICHE TRADIZIONALI CON QUELLE INNOVATIVE

L'emocoltura affiancata alle indagini molecolari comporta alcuni svantaggi intrinseci al metodo tradizionale come il ritardo nella risposta con una sua possibile alterazione dovuta a un prelievo non idoneo e all'incapacità di fornire i nutrienti necessari allo sviluppo di microrganismi esigenti.

In commercio esistono diversi kit in biologia molecolare che identificano il patogeno da campioni di emocoltura positive.

Un esempio sono i metodi molecolari che sfruttano il principio dell'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).

Un'evoluzione delle classiche sonde sono le *Peptide Nucleic Acid* (PNA), oligomeri sintetici che mimano la struttura del DNA o dell'RNA, costituite da unità ripetute di N-(2

amminoetil)-glicina a cui sono legate le basi nucleotidiche tramite un legame metilene-carbonile (Figura 12) (Pellestor F. et al., 2008; Forrest G.N. et al., 2008).

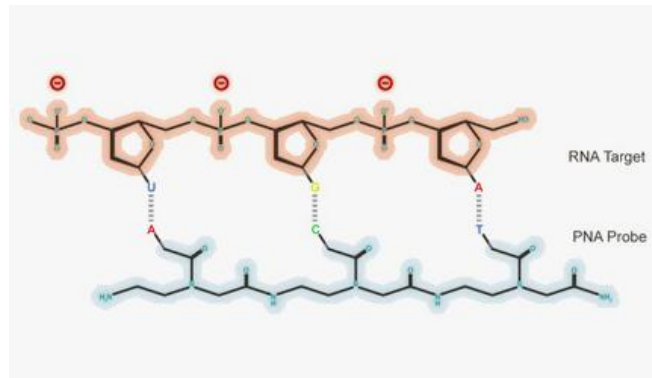


Figura 12 Ibridazione della sonda PNA con RNA target (Morici P. et al, 2011)

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.

Un metodo PNA FISH commerciale è prodotto da AdvanDx (MA, USA) che offre diverse sonde PNA (approvate dalla FDA) marcate con diversi fluorocromi 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 un'emocoltura positiva si sceglie il kit di sonde PNA FISH sulla base delle informazioni raccolte con la colorazione di Gram (Morici P. et al, 2011).

Il primo kit commerciale PNA FISH di AdvanDx, *Staphylococcus aureus* PNA FISH, (Figura 13) utilizza sonde verso 16S rRNA di *S. aureus* eventualmente presente nelle emocolture positive, questo saggio distingue tra i batteri *S. aureus* o *non-S. aureus* in poche ore.

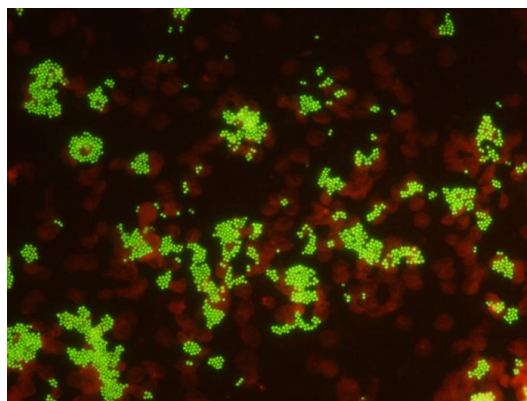


Figura 13 *Staphylococcus aureus* da emocolture positive (www.advandx.com)

Il test, semplice e abbastanza rapido, richiede il fissaggio su un vetrino di una goccia di emocoltura (5 min) con una successiva incubazione di 90 minuti con la sonda PNA.

Alla fine, la fluorescenza emessa dalla sonda che ha ibridato con il target del microorganismo presente nel campione viene rilevata osservando il vetrino con un microscopio a fluorescenza (Ecker D.J. et al., 2010).

La capacità di ottenere una presunta identificazione del patogeno in meno di 3 ore permette di ottenere informazioni utili al clinico molto prima se si fossero usati le tecniche tradizionali che possono richiedere da 1 a 3 giorni.

Diversi studi affermano che il test PNA FISH mostra una sensibilità e una specificità molto elevate, rispettivamente del 99% e 100% (Wilson D.A. et al., 2005; Forrest G. N. et al., 2008; Hensley D.M. et al., 2009; Peleg A.Y. et al., 2009).

Nonostante questo metodo sia molto sensibile, specifico e rapido, presenta diversi limiti come il numero esiguo di sonde PNA genere- e specie-specifiche disponibili o l'incapacità di fornire informazione sulla suscettibilità agli antibiotici (Morici P. et al, 2011).

Altro kit commerciale è il sistema StaphPlex (Qiagen, CA, USA) che è stato progettato per l'identificazione e la rilevazione simultanea in *Staphylococcus spp.* dei geni codificanti per la tossina *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL), sintetizzata da *S. aureus* meticillino resistente (MRSA) con azione litica sui leucociti provocando lesioni gravi a livello degli epitelii, e le severe antibiotico-resistenze determinate dagli *stafilococchi*.

L'eventuale utilizzo di questo metodo è preceduto dalla valutazione microscopica dell'emocoltura positiva che distinguerà dei cocci Gram-positivi a grappolo tipico degli stafilococchi.

Il sistema StaphPlex consiste in una PCR che rileva e amplifica contemporaneamente 18 geni specifici del genere *Staphylococcus spp.*

Questa PCR è in grado di identificare il gene *tuf* caratteristico degli *stafilococchi coagulasi-negativi*, il gene *nuc* specifico per *S. aureus*, il gene *mecA* che conferisce resistenza alla meticillina, il gene *aacA* responsabile della resistenza agli aminoglicosidi, i geni *ermA* ed *ermC* che contribuiscono alla resistenza ai macrolidi, lincosamidi e streptogramine, e infine i geni *tetM* e *tetK* che sono responsabili della resistenza alla tetraciclina.

L'intero processo, dalla positività del campione di emocoltura al risultato della PCR, ha una durata di 5 h.

Questo sistema permette di ridurre notevolmente il tempo normalmente necessario per l'identificazione batterica e per ricavare informazioni riguardanti la sensibilità agli antibiotici (Ecker D.J. et al., 2010).

Il sistema StaphPlex presenta una sensibilità del 100,0% e una specificità che varia dal 95,5% al 100,0% se sono saggiati campioni contenenti il genere *Staphylococcus spp.* (Tang Y.W., 2007).

Un nuovo e più ampio approccio per l'identificazione dei batteri è data dall'introduzione della spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight*) (MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Questo metodo di ionizzazione analizza composti poco volatili e termolabili, come le macromolecole biologiche a elevato peso molecolare, senza frammentarle (Brunelli T. et al., 2010).

La spettrometria di massa MALDI-TOF permette di identificare i microrganismi in pochi minuti tramite la ionizzazione fondamentalmente di proteine ribosomiali che hanno le caratteristiche di essere costantemente espresse in abbondanza nelle cellule batteriche e di essere più conservate rispetto alle proteine di superficie (Suh M.J. et al., 2004).

Le colonie prelevate da una piastra di terreno solido o da coltura liquida vengono miscelate a una matrice, un acido organico debole non volatile, con cromofori in grado di assorbire radiazioni UV e di formare cristalli.

Le matrici più utilizzate sono l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA) e l'acido 2,4-idrossifenil-benzoico (DHB).

Un laser pulsato, generalmente viene utilizzato un laser ad azoto, ionizza le molecole della matrice che a sua volta cedono l'energia alle molecole del campione che, caricate positivamente, passano allo stato gassoso.

Lo spettrofotometro di massa MALDI-TOF è dotato di un analizzatore costituito da un cilindro metallico sottovuoto in cui i peptidi ionizzati vengono accelerati sotto l'azione di un campo elettrostatico.

I peptidi ionizzati vengono separati in base al rapporto massa/carica (m/z) e quindi l'analizzatore quantifica questo rapporto misurando il tempo impiegato dallo ione a percorrerlo in tutta la sua lunghezza.

Quindi, a parità di energia, gli ioni che hanno una massa molecolare maggiore si muoveranno più lentamente e colpiranno il rivelatore dopo rispetto agli ioni con massa minore.

Successivamente, i dati raccolti dal rivelatore vengono inviati a un computer dotato di software dedicato alla loro elaborazione che genererà per ogni campione analizzato uno spettro con masse dai 2000 ai 20000 Da.

Lo spettro di massa ricavato verrà confrontato con una banca dati contenente gli spettri di riferimento di numerosi microrganismi ben conosciuti e caratterizzati oltre ad assegnare a ogni identificazione un punteggio da 0 a 3000 che indica il grado di attendibilità (Morici P. et al, 2011).

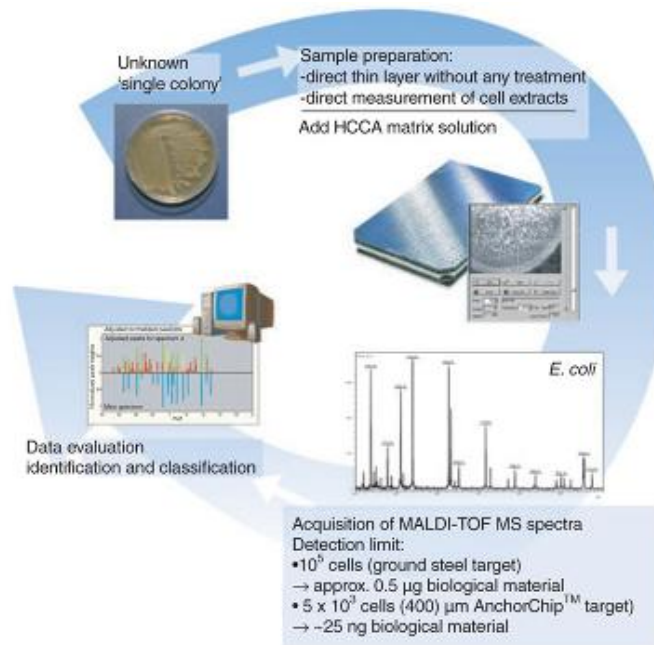


Figura 14 Identificazione con MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)

Mediante il sistema MALDI-TOF MS, è stata ottenuta una corretta identificazione nel 95,4% dei casi, 84,1% a livello di specie e 11,3% a livello di genere (Ecker D.J. et al., 2010).

Purtroppo, in presenza di emocolture polimicrobiche, l'identificazione dei batteri risulta complicata dalla simultanea presenza negli spettri di segnali caratteristici di entrambe le specie, oltre che dalla possibile soppressione di alcuni segnali tipici delle singole specie (Brunelli T. et al., 2010).

Il vantaggio di questa tecnica è la riduzione nei tempi di risposta in quanto, dal momento che l'emocoltura diventa positiva e dopo un breve trattamento del campione, è possibile identificare il patogeno senza attendere la crescita su terreni solidi.

Al momento, un limite può essere rappresentato dall'incapacità di fornire informazioni sulla sensibilità agli antibiotici.

Tuttavia, grazie alla facilità d'uso, la capacità di identificare rapidamente le specie batteriche e il basso costo dei reattivi, questa tecnica può essere considerato un'alternativa valida ai convenzionali sistemi di identificazione biochimici e molecolari (Ecker D.J. et al., 2010).

TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE E RILEVAMENTO DIRETTE

Il metodo molecolare ideale è un metodo che possa analizzare direttamente i campioni di sangue o di altro tipo per identificare i microrganismi presenti e, per quanto possibile, identificare la presenza dei geni associati alla resistenza ai farmaci.

Negli ultimi anni diversi kit sono stati sviluppati per la diagnosi di infezioni del sangue e tutti seguono il modello: lisi batterica e / o fungina, estrazione degli acidi nucleici, purificazione e l'amplificazione mediante PCR seguita dal rilevamento e identificazione del patogeno.

Un certo numero di kit commerciali hanno il marchio CE, mentre nessuno è attualmente approvato dalla FDA per l'uso negli Stati Uniti.

Un elenco dei kit molecolari commerciali per la ricerca di patogeni responsabili di infezioni del sangue e le loro caratteristiche sono nella Tabella 4.

Company	Product	Status	Sample volume	Specimen preparation	Enrichment	Amplification	Detection	Bacteria	Fungi
Roche	SeptiFast®	CE marked	1.5 ml	Manual	None	Broad-range PCR	Fluorescent probes	20 species	<i>Candida</i> and <i>Aspergillus</i> spp.
SIRS-Lab	LOOKSTER®/ VYOO™	CE marked	5 ml	Manual	Microbial DNA enrichment via affinity	Broad-range PCR	Gels	40 species, 5 antibiotic determinants	<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> and panfungal
MolZym	SeptiTest	CE marked	5 ml	Manual	Microbial DNA enrichment via selective lysis	Broad-range PCR	Gels, then sequencing	>300 species	<i>Candida</i> spp. and <i>Cryptococcus</i>
Abbott/Ibis	PLEX-ID BAC Spectrum	In clinical studies	1.5 ml	Magnetic beads on KingFisher	None	Broad-range PCR	Mass spectrometry	>300 species, 3 antibiotic determinants	<i>Candida</i> speciation

Tabella 4 Test molecolari per diagnosi di infezione del torrente circolatorio (Ecker D.J. et al., 2010)

Tra i test commerciali più studiati in letteratura è LightCycler SeptiFast® (Roche Diagnostics GmbH, Germany) che utilizza la tecnologia *PCR multiplex real-time* ed è in grado, con un singolo campione di sangue periferico, di rilevare e identificare contemporaneamente 25 diversi microrganismi (Tabella 5) responsabili del 90% dei casi di sepsi.

Il metodo prevede l'estrazione dell'acido nucleico da 1,5 mL di sangue intero utilizzando una lisi meccanica con biglie in ceramica e, dopo purificazione con colonnina, 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.

Per identificare i patogeni vengono utilizzate 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, mentre per i funghi tra i geni 18S e 5.8S.

Gram (-)	Gram (+)	Funghi
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Acinetobacter baumannii</i> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • CoNS (Coagulase negative <i>Staphylococci</i>)* • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus spp.**</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> • <i>Candida tropicalis</i> • <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Candida krusei</i> • <i>Candida glabrata</i> • <i>Aspergillus fumigatus</i>
<small>△ Table 1</small>		<small>*S. epidermidis, S. haemolyticus **S. pyogenes, S. agalactiae, S. mitis</small>

Tabella 5 Elenco delle specie identificate da LightCycler SeptiFast® (Roche Molecular Diagnostics)

I tempi di esecuzione del test SeptiFast® è inferiore alle 6 ore, ma calando il test nel contesto laboratoristico, dalla consegna del campione al risultato, il tempo medio necessario di risposta è di 18-27h.

L'emocoltura riesce a individuare poco più del 50% dei casi di sepsi provocata da batteri o funghi, mentre SeptiFast® riesce a individuare più campioni positivi rispetto alle emocolture; questi risultati positivi sono stati considerati clinicamente significativi sulla base dei dati clinici, e successivamente confermati dall'isolamento del microrganismo da campioni provenienti dalla sede di infezione o da altri distretti.

La maggiore sensibilità della PCR nel rilevare anche concentrazioni molto piccole di DNA batterico rende necessaria una valutazione del risultato nel contesto clinico del paziente, per questo un risultato positivo dovrà essere sempre confermato dalla presenza di un focolaio infettivo o da emocolture positive sostenute dallo stesso germe, anche a distanza di giorni.

L'alta sensibilità del test può generare, quindi, dei falsi positivi a causa della presenza di DNA microbico nel sangue derivante da tracce di una batteriemia transitoria non associata ad alcuna infezione sistemica, oppure può essere correlata alla persistenza di DNA circolante di microrganismi morti dopo terapia antimicrobica (Ecker D.J. et al., 2010; Morici P. et al, 2011).

SeptiFast® possiede una sensibilità e specificità, rispettivamente dell'85% e del 95%, maggiori rispetto ad altri metodi molecolari (Lucignano B. et al., 2011).

Uno dei principali svantaggi dei metodi basati sulla PCR è il limitato numero di specie che possono essere identificate, questo origina dei falsi negativi (Lamoth F. et al., 2010).

I falsi negativi possono essere causati anche dalla presenza di fattori inibenti, mutazioni del sito bersaglio oppure dal limite di rilevazione della PCR (Lucignano B. et al., 2011).

Altri limiti del test comprendono il suo elevato costo (€ 150-200 per test) e l'incapacità di indicare la sensibilità dei microrganismi agli antibiotici (Mancini N. et al., 2010).

Altri test, dopo SeptiFast®, sono stati progettati con lo scopo di individuare il patogeno direttamente dal sangue del paziente e sono SeptiTest® & LOOXSTER® / VYOO™.

La ricerca del DNA patogeno direttamente nei campioni di sangue risulta ostacolata dalla grande quantità di DNA umano proveniente dai globuli bianchi circolanti.

Infatti, la presenza di DNA umano, co-estratto in grande quantità rispetto al DNA patogeno, inibisce la PCR e diminuisce la sensibilità del metodo verso il patogeno ricercato.

Il kit commerciale denominato MolZym SeptiTest® incorpora in un unico passaggio la preparazione del campione di sangue intero e la rimozione di quasi tutto il DNA umano.

Questo metodo elimina il DNA umano utilizzando un trattamento con DNasi dopo una delicata lisi dei globuli bianchi e successivamente, con una lisi più aggressiva, viene liberato e recuperato il DNA patogeno.

Infine, viene amplificato il DNA ribosomiale 16S patogeno presente nel campione e successivamente identificato tramite sequenziamento.

Lo svantaggio di questo metodo è l'incapacità di rilevare eventuali patogeni intracellulari, questo perché il trattamento con DNasi degraderà il DNA umano ma anche il DNA patogeno che si libererà dalla prima lisi.

Un metodo che elimina il DNA umano senza però perdere la capacità di rilevare eventuali patogeni intracellulari è il kit commerciale LOOXSTER®, prodotto da SIRS-Lab, che sfrutta le differenze di metilazione tra DNA batterico / fungino e DNA umano.

Sfruttando le differenze di metilazione, il DNA umano viene eliminato mediante una cromatografia di affinità e successivamente il DNA del patogeno viene amplificato e identificato.

Una nuova strategia per la diagnosi molecolare di infezioni del sangue è l'utilizzo della PCR abbinata alla ionizzazione elettrospray con lo spettrometro di massa (PCR / ESI-MS). Questo metodo applicato all'identificazione dei patogeni responsabili di batteriemie viene prodotto da Abbott con il nome PLEX-ID BAC *Spectrum Assay* ed è attualmente in fase di sviluppo.

Questa tecnica (Figura 15) utilizza più coppie di *primer* per amplificare accuratamente regioni selezionate di genomi batterici o fungini; i siti di legame del *primer* sono ampiamente conservati mentre la regione amplificata contiene informazioni sull'identità microbica.

In queste regioni sono presenti geni che codificano per l'RNA ribosomiale e i gene *housekeeping* che codificano proteine.

Successivamente il campione viene sottoposto a ESI-MS e lo spettro ricavato degli ampliconi della PCR, o della miscela di ampliconi, viene registrato e confrontato con altri spettri di organismi noti contenuti in un database.

Questa strumentazione è completamente automatizzata e permette, con 1,5 mL di campione di sangue intero, di ottenere l'identificazione di oltre 300 specie batteriche con la rilevazione dei geni di resistenza antibiotica *mecA*, *vanA* e *vanB*, *bla_{KPC}*, oltre ad essere in grado di identificare le specie di *Candida*, infine questa tecnologia ha il vantaggio di non utilizzare sonde specifiche (Ecker D.J. et al., 2010).

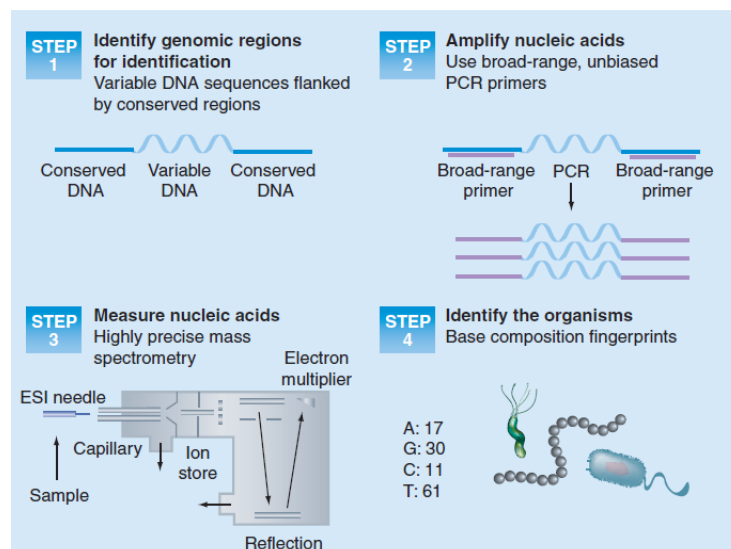


Figura 15 Identificazione microbica con PCR / ESI-MS (Ecker D.J. et al., 2010)

METODI MOLECOLARI A CONFRONTO

In questo studio sono stati messi a confronto sistemi d'indagine molecolare che ricercano il patogeno a partire dalla emocoltura positiva.

I sistemi messi a confronto sono stati: un microarray (sistema Verigene® della Nanosphere, Inc.) e un film array (piattaforma FilmArray® della BioFire Diagnostics Inc.).

SISTEMA VERIGENE® (NANOSPHERE, INC., USA)

Il sistema Verigene® (Nanosphere, Inc., USA) è una workstation per la diagnostica molecolare creata per rilevare e identificare l'acido nucleico di diversi patogeni che possono essere presenti in campioni di varia natura (campioni respiratori, emocolture positive).

Questa tecnologia rende i test diagnostici molecolari accessibili e flessibili grazie a procedure semplici che garantiscono ugualmente un'elevata sensibilità, specificità e precisione, inoltre è in grado di ottenere un rapido rilevamento dei *target multiplex* richiesti.

Il sistema Verigene® è costituito da uno o più Verigene Processor SP e da un lettore Verigene Reader (Figura 16).



Figura 16 Il sistema Verigene® Instruments costituito da un lettore Verigene Reader e da uno o più Verigene Processor SP (www.nanosphere.us)

Il modulo Verigene Processor SP è un analizzatore completamente automatizzato che estrae, purifica, amplifica (se necessario) e ibridizza l'acido nucleico batterico.

Invece, il lettore Verigene Reader gestisce le informazioni del campione ricavate dalla lettura della cartuccia di prova ed è in grado di controllare più processori che possono lavorare contemporaneamente e autonomamente.

La diagnosi molecolare di sepsi con il sistema Verigene® viene realizzata impiegando kit specificatamente studiati per i batteri Gram-positivi (Figura 17) e Gram-negativi (Figura 18) e sono in grado di eseguire l'identificazione di genere, di specie e di determinanti genetici che causano l'antibiotico-resistenza dei più comuni patogeni presenti nelle emocolture positive (Tabella 6).

Verigene® BC-GP Test	Verigene® BC-GN Test
<p>Species</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus anginosus Group</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>Species</p> <p><i>Escherichia coli/Shigella spp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i></p>
<p>Genus</p> <p><i>Staphylococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Listeria spp.</i></p>	<p>Genus</p> <p><i>Acinetobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i></p>
<p>Resistance</p> <p><i>mecA</i> <i>vanA</i> <i>vanB</i></p>	<p>Resistance</p> <p><i>KPC</i> <i>NDM</i> <i>CTX-M</i> <i>VIM</i> <i>IMP</i></p>

Tabella 6 Batteri e antibiotico-resistenze rilevabili con il sistema Verigene® (www.nanosphere.us)



Figura 17 Verigene® Gram-Positive Blood Culture Test (www.nanosphere.us)



Figura 18 Verigene® BC-GN Test (www.nanosphere.us)

Il sistema Verigene® *Blood Culture Nucleic Acid Test* utilizza la tecnologia brevettata delle *probes* oligonucleotidiche associate a nanoparticelle d'oro per rilevare i *targets* di acido nucleico batterico presenti nelle aliquote di emocolture positive per mezzo dell'ibridazione agli oligonucleotidi sonda di cattura legati a un *microarray*.

Il kit dedicato ai batteri Gram-positivi, approvato dalla *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), è denominato Verigene® *Gram-Positive Blood Culture Test* (BC-GP) e identifica 13 *targets* batterici e 3 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 2 ore e 50 minuti, mentre il kit dedicato ai batteri Gram-negativi, ancora in fase di sviluppo e da non utilizzare in procedure diagnostiche ma solo in ambito di ricerca, è definito Verigene® *Gram-Negative Blood Culture Test* (BC-GN) e identifica 9 *targets* batterici e 6 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 1 ora e 50 minuti.

La separazione del test molecolare in kit dedicati ai batteri Gram-positivi e Gram-negativi comporta necessariamente, prima dell'impiego del metodo molecolare, l'analisi microscopica con la colorazione di Gram per classificare i batteri presenti nell'emocoltura positiva.

FILMARRAY® BLOOD CULTURE ID PANEL (BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC., USA)

La piattaforma integrata FilmArray® della BioFire Diagnostics Inc. (Figura 19) è un sistema chiuso, estremamente rapido e semplice nell'uso che svolge in modo automatico le reazioni di estrazione, purificazione e amplificazione dell'acido nucleico batterico/fungino presente in un campione.

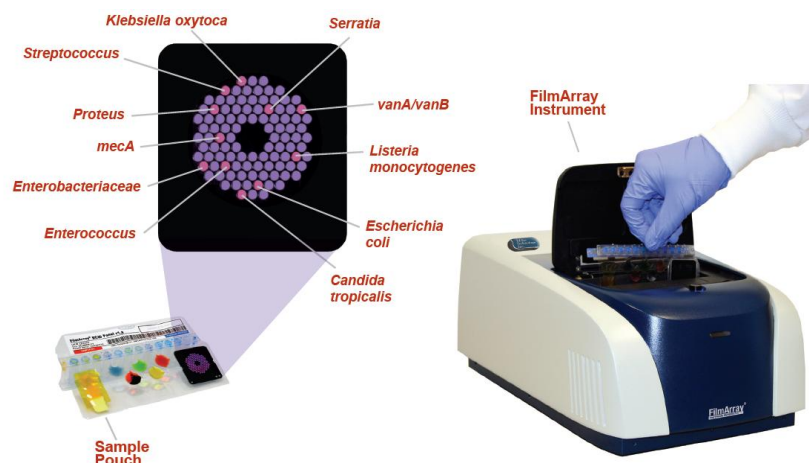


Figura 19 Sistema FilmArray® della BioFire Diagnostics Inc. (www.filmarray.com)

La semplicità di utilizzo di questo sistema è rappresentato dai soli 3 minuti richiesti per la preparazione del campione ottenendo l'identificazione del patogeno dopo un ora circa e inoltre non sono richieste operazioni di precisione poiché i diversi volumi delle soluzioni vengono aggiunti ai reattivi tramite un sistema sottovuoto.

Questo sistema è in grado di ricercare nei campioni, utilizzando diversi kit dedicati, i microrganismi patogeni più comuni del apparato respiratorio, del tratto intestinale e del sangue.

Il FilmArray® *Blood Culture ID Panel* (BCID) è il kit dedicato alla ricerca dei più comuni patogeni che causano la sepsi ed è in grado di identificare 20 *targets* batterici sia a livello di genere che di specie, 5 specie di lieviti e 4 determinanti genetici che conferiscono resistenza antibiotica in aliquote di campioni provenienti da emocolture positive (Tabella 7).

BATTERI GRAM-POSITIVI	BATTERI GRAM-NEGATIVI
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Coagulase negative Staphylococcus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus species</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Streptococcus species</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>

	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Citrobacter spp</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Shigella spp.</i>)
LIEVITI	ANTIBIOTICO-RESISTENZE
<i>C. albicans</i>	<i>mecA</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>vanA</i>
<i>C. krusei</i>	<i>vanB</i>
<i>C. parapsolosis</i>	<i>KPC</i>
<i>C. tropicalis</i>	

Tabella 7 FilmArray® BCID Panel (www.filmarray.com)

Questo sistema utilizza un protocollo di *nested multiplex PCR* (nmPCR) che consiste in una prima reazione di amplificazione (circa 20 cicli) con una coppia di *primer* “esterni” ad ampio range complementari a domini proteici conservati presenti nei batteri di interesse, a cui segue una seconda PCR che impiega come stampo l’amplificato diluito della prima reazione e una coppia di *primer* specie-specifica di una regione interna all’ampliconi prodotto dalla prima PCR (Figura 20).

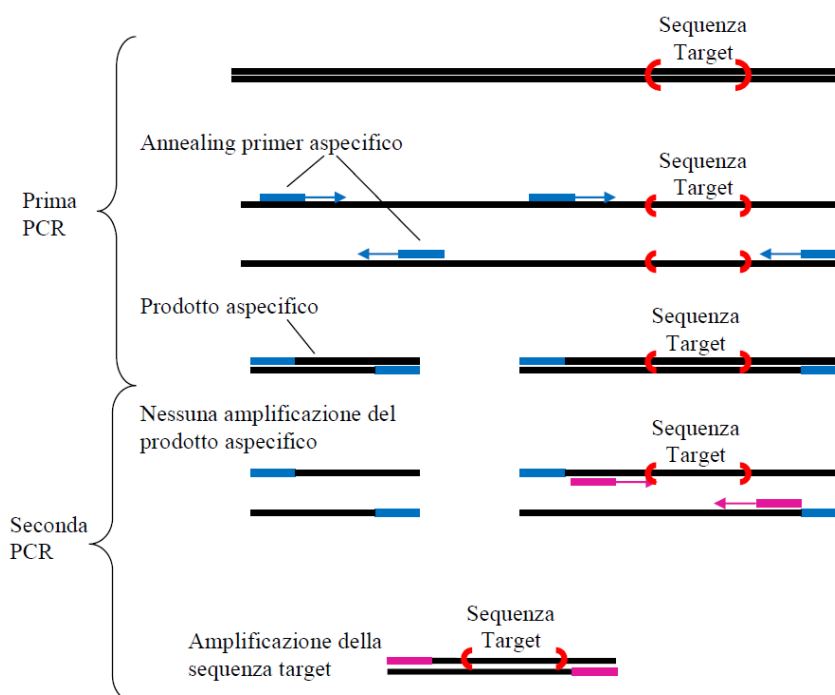


Figura 20 Nested-PCR

Questa tecnica è molto specifica e sensibile, inoltre è in grado di eliminare eventuali prodotti aspecifici sintetizzati nella prima PCR.

SCOPO

La sepsi è un'infezione sistemica che nella medicina moderna risulta essere sempre più frequente e con un alto tasso di mortalità, soprattutto nei reparti di terapia intensiva.

Un tempestivo intervento terapeutico, inclusa la somministrazione di una mirata terapia antibiotica, è decisivo per ottenere una prognosi favorevole.

Infatti, una riduzione della mortalità viene associata a una precoce e corretta somministrazione di antibiotici.

L'individuazione di un'adeguata terapia, in assenza di una corretta diagnosi microbiologica, è molto difficile e, se errata, può contribuire all'instaurarsi di resistenze causando un aumento dei costi di gestione del paziente settico.

Diventa pertanto essenziale ottenere una diagnosi microbiologica rapida e accurata.

Attualmente l'esame di laboratorio "gold standard" per la diagnosi di sepsi è l'emocoltura in quanto permette di determinare l'agente eziologico e le sue sensibilità agli antibiotici, informazioni utili al clinico per realizzare una terapia mirata.

Purtroppo, la raccolta di tutte le informazioni necessarie si ottengono non prima delle 36 / 96 ore, dopo che i flaconi dell'emocoltura sono pervenuti in laboratorio.

La riduzione dei tempi di indagine può essere ottenuta utilizzando metodiche molecolari che possono essere eseguite sulle emocolture positive o direttamente su campioni di sangue.

Lo scopo di questa tesi è stato valutare e confrontare il metodo tradizionale con due diversi metodi molecolari: il Sistema Verigene® e la piattaforma integrata FilmArray®.

Le due metodiche molecolari sono in grado, all'interno del loro pannello di microrganismi, di identificare il patogeno e l'eventuale antibiotico-resistenza presente in un campione di emocoltura positiva.

Inoltre sono stati eseguiti dei saggi preliminari di valutazione della soglia di sensibilità dei due metodi utilizzando un ceppo ATCC di *E. coli*.

Il lavoro di valutazione e confronto tra le diverse metodiche è stato eseguito presso il Laboratorio dell'U.O. Microbiologia e Virologia del Presidio Ospedaliero S. Chiara di Trento che ha ottenuto da parte di Bureau Veritas la Certificazione di conformità ai requisiti della norma ISO 9001:2008 e la certificazione di conformità rispetto allo

standard Bureau Veritas: "Qualità e sicurezza in medicina di laboratorio rev. 2010" che integra e completa le norme ISO 15189:2003, ISO15190:2003, ISO 9001:2008.

MATERIALI E METODI

METODO TRADIZIONALE

Le procedure tradizionali utilizzate per il trattamento e la gestione dei flaconi di emocoltura eseguite presso il Laboratorio dell'U.O. Microbiologia e Virologia del Presidio Ospedaliero S. Chiara di Trento sono descritte nelle istruzioni operative (IOTN214) raccolte in un sistema informatico di laboratorio (Isolab).

ANALISI MICROBIOLOGICA: L'EMOCOLTURA

Sistema a monitoraggio continuo per emocolture

Il sistema a monitoraggio continuo per emocolture utilizzato nel Laboratorio dell'U.O. Microbiologia e Virologia del Presidio Ospedaliero S. Chiara di Trento è BD BACTEC™ FX (BD Becton Dickinson Company, USA).

Il sistema BD BACTEC™ FX (Figura 21) è un sistema di incubazione e di rilevazione della crescita microbica in flaconi di emocoltura mantenuti costantemente in agitazione.



Figura 21 Sistema BD BACTEC™ FX (www.bd.com)

I flaconi di emocoltura utilizzati sono (Figura 22):

- BD Bactec *plus Aerobic* adatto alla ricerca di batteri aerobi obbligati, aerobi facoltativi e miceti,
- BD Bactec *plus Anaerobic* per la ricerca di microrganismi anaerobi obbligati e facoltativi,
- BD Bactec *Peds Plus* per batteri aerobi e miceti nei pazienti pediatrici.



Figura 22 Set di flaconi per emocolture (www.bd.com)

Ogni flacone contiene 25mL di brodo di coltura costituito da caseina di soia addizionata con:

- CO₂ e altre sostanze che aiutano la crescita dei batteri “difficili” come estratto di lievito, saccarosio, emina, vitamina B6 ecc.,
- Sodio Polianetolsulfonato (SPS) al 0.025/0,05 %, una sostanza anticoagulante che si trova ad una concentrazione sufficiente e al tempo stesso inferiore al valore di tossicità per batteri come Neisserie, Emofili e Pneumococco; questa molecola, inoltre, è in grado di neutralizzare l’effetto del lisozima, inibire la fagocitosi, inattivare gli aminoglicosidi ed inibire in parte la cascata del complemento,
- substrato cromogeno sensibile alla CO₂ in grado di emettere fluorescenza protetto in una matrice solida sul fondo del flacone,
- resine cationiche e non ioniche (Figura 23, Figura 24) in grado di adsorbire gli eventuali antibiotici presenti nel campione con lo scopo di migliorare la sensibilità dell’esame.

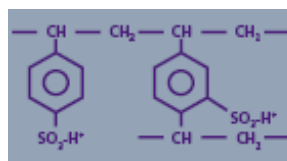


Figura 23 BD BACTEC™ Cationic Exchange Resin (www.bd.com)

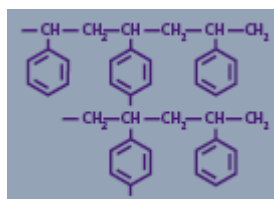


Figura 24 BD BACTEC™ Polymeric Adsorbent Resin (www.bd.com)

Per ottenere una buona sensibilità nella ricerca microbica è necessario eseguire 2-3 prelievi, ciascuno dei quali composto da un flacone per aerobi e uno per anaerobi, per un totale di 4-6 flaconi ed incubare i campioni nel sistema a monitoraggio continuo nel più breve tempo possibile (max 2 h).

Il sistema BD BACTEC™ FX è costituito da un modulo con quattro cassette, ciascuno della capacità di 100 flaconi, in cui le stazioni sono disposte in file orizzontali all'interno di supporti indipendenti.

I flaconi di emocoltura inseriti nelle stazioni del sistema BD BACTEC™ FX sono mantenuti ad una temperatura costante di $35^{\circ}\text{C} \pm 1.5$, in continua agitazione ad una velocità di 30 movimenti completi al minuto e continuamente monitorati con una lettura ogni 10 minuti per l'eventuale positività dell'emocoltura.

La crescita microbica in fase liquida viene rilevata sfruttando un sistema che evidenzia la produzione di CO_2 derivante dal metabolismo batterico ed è direttamente proporzionale al loro sviluppo.

Posto sul fondo del flacone e incorporato in una matrice solida protettiva è presente una sostanza che reagisce con la CO_2 prodotta dai microrganismi in grado di emettere fluorescenza.

Mediante un diodo ad emissione luminosa, un rilevatore a fotodiodi e filtri adeguati, lo strumento è in grado di misurare la fluorescenza emessa dal fluoroforo e trasformare il segnale luminoso in un segnale digitale che verrà elaborato da un computer.

Il rapporto fluorescenza/tempo di crescita viene registrato su un diagramma cartesiano per costruire la curva di crescita del microrganismo presente nel flacone di emocoltura.

La segnalazione dei flaconi positivi è immediata e avviene attraverso segnali ottici e sonori.

Alcuni flaconi possono risultare falsi positivi a causa della produzione di CO₂ da parte dei leucociti; quindi la positività dovrà essere confermata dall'esame microscopico e da una coltura su terreni solidi.

Esame microscopico

L'emocoltura segnalata positiva dal sistema a monitoraggio continuo viene immediatamente rimossa e sottoposta a esame microscopico.

Utilizzando l'apposito ago *BBL venting unit*, un ago di sicurezza, si sono versati in una provetta sterile una decina di gocce di brodo proveniente dall'emocoltura positiva.

L'esame microscopico consisteva nel preparare un vetrino con la colorazione di Gram:

1. con ansa monouso sterile depositare e distribuire uniformemente una piccola aliquota di campione e lasciare asciugare,
2. fissare alla fiamma e lasciare raffreddare,
3. immergere il vetrino nel cristalvioletto per 1 minuto e sciacquare,
4. versare sul vetrino la soluzione di Lugol per 1 minuto e sciacquare,
5. decolorare con alcool per circa 10 secondi e sciacquare abbondantemente,
6. versare sul vetrino la safranina come colorazione di contrasto per 30-60 secondi,
7. risciacquare bene con acqua e asciugare delicatamente,
8. il vetrino viene osservato a 100x in immersione con la visione dei batteri Gram-positivi in blu porpora, mentre i Gram-negativi in rosa-viola.

Se l'esame microscopico non evidenziava la presenza di microrganismi, si procedeva alla centrifugazione di circa 2 mL di campione e dal sedimento si allestivano due vetrini, uno con colorazione di Gram e uno con la colorazione di Arancio di Acridina.

La colorazione di Arancio di Acridina viene utilizzata perché presenta una sensibilità maggiore rispetto alla colorazione di Gram ed è in grado di differenziare i microrganismi presenti nel concentrato.

Allestimento del vetrino con la colorazione di Arancio di Acridina:

1. con ansa monouso sterile depositare e distribuire uniformemente una piccola aliquota di campione e lasciare asciugare
2. fissare lo striscio con metanolo al 50% per 30"
3. rimuovere il metanolo in eccesso e lasciare asciugare

4. coprire il campione con Arancio di Acridina per 2 minuti
5. sciacquare con acqua corrente e lasciare asciugare
6. il vetrino viene osservato con un microscopio a fluorescenza con ingrandimento 100x, 400x ed infine a 1000x in immersione; i batteri e funghi appariranno in arancio brillante, il fondo in nero – giallo/verde, mentre le cellule epiteliali e infiammatorie in verde pallido – giallo ed infine i leucociti in giallo, arancio o rosso a seconda del livello di attivazione.

Se la visione al microscopio è ancora negativa, il flacone di emocoltura veniva nuovamente incubato considerando il campione un possibile falso positivo.

Esame subcolturale su terreni solidi delle emocolture positive ed identificazione

La classificazione del microrganismo presente nell'emocoltura con la colorazione di Gram permette di utilizzare i terreni di coltura più idonei per la sua crescita.

Tutti i campioni positivi vengono seminati per isolamento con ansa sterile e tecnica dei 4 quadranti.

Terreni utilizzati in caso di batteri aerobi

Tutti i campioni positivi, provenienti da flaconi di emocoltura per batteri aerobi, sono stati seminati sui terreni agar sangue e agar cioccolato perché non sono selettivi e quindi permettono la crescita di tutti i batteri anche di quelli più esigenti

Il campione, che all'esame microscopico presentava batteri Gram-negativi, veniva seminato su terreno agar *Mac Conkey*, questo terreno solido possiede la caratteristica di essere selettivo ed in grado di distinguere i lattosio fermentanti.

Invece, se al microscopio venivano rilevati batteri Gram-positivi con una morfologia tipica dei:

- *stafilococchi*, si eseguiva il test della coagulasi in plasma di coniglio per differenziare i *stafilococchi coagulasi negativo* dallo *S. aureus* che è coagulasi positivo, per l'isolamento di questi batteri si è utilizzato il terreno selettivo agar sale mannite che in presenza di *S. aureus* vira dal colore rosso a quello giallo,
- *streptococchi*, veniva eseguita l'agglutinazione su vetrino per *pneumococchi* che in caso di positività si passava all'identificazione del sierotipo. Inoltre veniva eseguita

una subcoltura in agar sangue con un dischetto di Optochina, per distinguere gli *streptococchi viridanti* dai *pneumococchi* che sono sensibili all'antibiotico, e in agar CNA, un terreno selettivo per l'isolamento di microrganismi Gram-positivi,

- bacilli, e quindi si sospettava della presenza della *Lysteria monocytogenes* con la conseguenza che si procedeva ad una subcoltura come per *Streptococcus spp.*.

Se al microscopio veniva identificata la presenza di miceti si eseguiva una semina sul terreno selettivo *Sabouraud* con Cloramfenicolo (CAF), antibiotico che inibisce la maggior parte di contaminanti batterici, e *Chromagar Candida*, terreno cromogeno utile per identificare le diverse specie di *Candida spp.*.

Le piastre per la ricerca dei batteri aerobi a base di sangue o sangue cioccolato venivano incubate a 37°C in atmosfera arricchita di CO₂ mentre le altre venivano incubate a 37°C ed in entrambi i casi lette dopo 24h.

Terreni utilizzati in caso di batteri anaerobi

Nel caso l'emocoltura fosse positiva per batteri anaerobi si seminava il campione sui terreni:

- ✓ *Schaedler* con un dischetto di Metronidazolo, un terreno non selettivo altamente nutritivo utilizzato per l'isolamento di anaerobi stretti, il dischetto di antibiotico ha la funzione di discriminare gli anaerobi obbligati che ne sono sensibili,
- ✓ *Schaedler* Kanamicina + Vancomicina, la kanamicina inibisce gli anaerobi facoltativi Gram-negativi e diversi altri batteri facoltativi, mentre la vancomicina inibisce i batteri Gram-positivi. L'aggiunta di questi antibiotici rende il terreno selettivo per gli anaerobi stretti Gram-negativi, come i *Bacteroides*.

Le piastre per la ricerca dei batteri anaerobi venivano inserite nell'apposito incubatore ad atmosfera anaerobia a 37°C per almeno 48h con un eventuale controllo per verificarne la crescita dopo 24h.

Quando vi è crescita si procedeva con l'identificazione e l'antibiogramma.

Antibiogramma preliminare

L'antibiogramma preliminare veniva allestito già il giorno successivo alla positivizzazione dell'emocoltura con la funzione di informare in tempi rapidi il clinico.

La procedura per allestimento dell'antibiogramma preliminare consiste in:

- preparazione di una sospensione con qualche goccia ricavata dal flacone positivo in soluzione fisiologica fino ad ottenere una torbidità pari a 0.5McFarland,
- semina con tampone sterile ottenendo una patina confluyente sul terreno di Mueller Hinton Agar con o senza aggiunta di sangue,
- posizionamento di supporti antibiotati (dischetti, *E-test*) a seconda del ceppo rilevato al microscopio,
- lettura degli aloni di inibizione dopo 18-24 ore di incubazione.

Isolamento, identificazione e test di sensibilità ai chemioterapici

Il giorno successivo alla semina dei campioni, tutte le colture per aerobi e anaerobi venivano sottoposte ad una prima lettura e se non si evidenziava una crescita batterica si incubavano fino alle 48-72h per la lettura definitiva.

La condizione per procedere con l'antibiogramma e l'identificazione è di disporre del ceppo batterico in coltura pura, infatti, nel caso di una coltura non pura si procedeva all'isolamento su terreni selettivi con la lettura dopo 24 h.

L'antibiogramma è un test in vitro che viene utilizzato nella valutazione del profilo di sensibilità batterica a diversi antibiotici.

Questo test consiste nel sottoporre una sospensione batterica a concentrazione standard a una serie di antibiotici a concentrazione crescente.

I saggi di identificazione e di suscettibilità antimicrobica utilizzati nella U.O. di Microbiologia e Virologia di Trento sono stati eseguiti con il sistema *MicroScan Walk-Away*® (DADE BEHRING INC., West Sacramento, CA)

Il sistema *MicroScan*® utilizza piastre per microdiluzione in plastica con 96 pozzetti che contengono o i substrati biochimici utilizzati per l'identificazione batterica o le diluizioni degli antibiotici per la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) oppure entrambi.

Questo sistema è in grado di identificare, a livello di specie, batteri aerobi Gram-negativi e Gram-positivi, anaerobi facoltativi e lieviti oltre a valutare la loro sensibilità agli antibiotici.

L'identificazione nei pannelli basati sulla rilevazione delle variazioni di pH, sull'utilizzo dei substrati e sulla crescita in presenza di molecole antibiotiche avviene in 18-24 h di incubazione a 35°C.

Mentre l'identificazione nei pannelli basati sulla rilevazione dell'idrolisi di substrati fluorogenici, sui cambiamenti di pH conseguenti al consumo dei substrati, sulla sintesi di substrati metabolici specifici e sulla produzione di metaboliti intermedi avviene dopo 2 h di incubazione a 35°C.

Le prove di sensibilità all'antibiotico avviene con la rilevazione diretta della crescita batterica oppure indirettamente come incremento della fluorescenza in un tempo medio di 20 h.

METODI MOLECOLARI

SISTEMA VERIGENE® (NANOSPHERE, INC., USA)

Descrizione del sistema

Il sistema è abbastanza semplice nel suo utilizzo, la preparazione dello strumento all'analisi dura mediamente 5-10 minuti ed è sufficiente inserire nel modulo Verigene Processor SP i materiali monouso descritti in seguito (Figura 25).

- Vassoio per l'estrazione dell'acido nucleico: un supporto di plastica monouso, costituito da 15 pozzetti quasi tutti contenenti i reagenti necessari all'estrazione degli acidi nucleici presenti nel campione. In uno di questi pozzetti è contenuto un tampone utilizzato durante l'ibridazione, quello di maggiori dimensioni (*Sample well*) è riservato al caricamento del campione (350 µL per batteri Gram-positivi, 700 µL per batteri Gram-negativi) e il pozzetto denominato *Residual DNA well* raccoglie una quantità variabile dell'ordine dei µL di *DNA target*. Tra i reagenti contenuti nel vassoio un ruolo di fondamentale importanza è svolto da una soluzione contenente le microparticelle magnetiche, le quali catturano gli acidi nucleici durante la fase di estrazione.

- Supporto puntali monouso: contiene due puntali e una guarnizione di gomma, viene utilizzato in tutte le operazioni automatizzate di estrazione e di ibridazione nel processatore.
- Vassoio di amplificazione / controllo: è un supporto in plastica monouso contenente i reagenti utilizzati per eseguire la retrotrascrizione e l'amplificazione del *targets* presente nel campione. La retrotrascrizione e l'amplificazione non viene eseguita nel test BC-GP e BC-GN, ma sono presenti nell'analisi per l'identificazione di virus respiratori. Il vassoio contiene anche il controllo interno, utilizzato per garantire la corretta esecuzione dei vari passaggi della procedura. Tale controllo è rappresentato da una spora di *Bacillus Subtilis* contenuta nel cosiddetto *Processing Control 1 Tube*.
- *Test Cartridge*: è costituita dal pacco reagente, contenente i reagenti coinvolti nella reazione di ibridazione, e dal supporto del substrato, che ne rappresenta la parte inferiore (il pacco del reagente è fissato al supporto del substrato mediante specifici agganci). Il supporto del substrato contiene l'*array* su cui viene eseguita la reazione di ibridazione. La cartuccia viene fornita con un involucro protettivo che sigilla i contenitori dei reagenti. Inoltre ogni cartuccia possiede un *barcode* utilizzato per l'associazione al campione.



Figura 25 Materiale monouso utilizzato dal sistema Verigene® (www.nanosphere.us)

Le diverse fasi di analisi del sistema Verigene® *Blood Culture Nucleic Acid Test* sono:

1. Estrazione e purificazione.

La procedura di estrazione lisa le cellule e gli acidi nucleici vengono sequestrati utilizzando microparticelle magnetiche, successivamente il sistema Processor SP esegue un lavaggio per rimuovere i contaminanti e i residui cellulari.

Gli acidi nucleici catturati vengono rilasciati in un tampone di eluizione.

2. Amplificazione.

Nel test per la diagnosi di sepsi non viene eseguita l'amplificazione dell'acido nucleico anche se attualmente si sta studiando per implementare questo step nella procedura.

Il dispositivo Processor SP può amplificare i target RNA e DNA mediante retrotrascrizione con PCR o semplicemente PCR prima delle fasi successive dell'analisi.

3. Ibridazione (Figura 26).

Inizialmente il DNA genomico viene frammentato mediante sonicazione e denaturato da parte del Processor SP (i target sottoposti ad amplificazione non richiedono invece ne frammentazione ne denaturazione).

I frammenti di ssDNA *targets* si ibridizzano con gli oligonucleotidi complementari, denominati sonde di cattura, fissati su una fase solida.

Ogni sonda di cattura si localizza in uno spot presente sull'*array* formando sul vetrino una struttura a forma di griglia.

In contemporanea vengono aggiunte le nanoparticelle in oro (13-20 nm di dimensioni) a cui sono adesi gli oligonucleotidi sonda complementari ai *targets* batterici.

Le nano particelle d'oro sono distribuite in distinti pozzetti del pacco reagenti della cartuccia e sono specifiche per le diverse specie batteriche che il *kit* può identificare.

Completate le due fasi di ibridizzazione, ogni frammento di acido nucleico *target* si trova tra la sonda di cattura complementare e le sonde complementari adese alle nanoparticella d'oro.

Successivamente viene eseguito un lavaggio, in questo modo vengono rimossi tutti i frammenti di DNA e le nanoparticelle d'oro non ibridate, mentre gli acidi nucleici perfettamente legati alla sonde di cattura saranno trattenuti sulla superficie dell'*array*.

Infine si esegue una reazione catalitica terminale con la funzione di amplificare il segnale di luminescenza delle nanoparticelle d'oro attraverso la deposizione sulla loro superficie di argento elementare.

Ora è possibile eseguire la lettura dell'*array* sul Verigene® Reader.

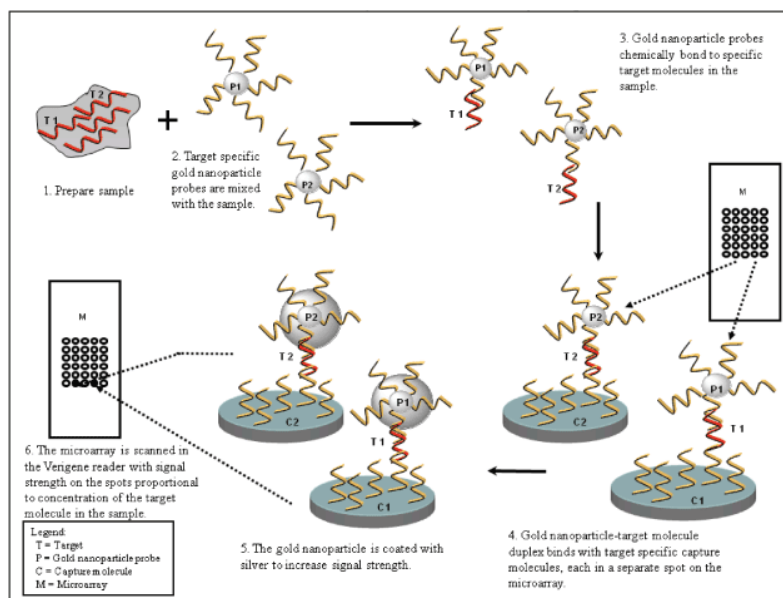


Figura 26 Ibridazione del frammento di DNA *target* (www.nanosphere.us)

4. Lettura vetrino *microarray*.

Il vetrino *microarray* viene infine inserito nel Verigene® Reader dove viene sottoposto a scansione.

Il rilevamento della reazione di ibridazione e quindi della presenza degli acidi nucleici *target* si riscontra per mezzo della tecnologia a luce riflessa.

Il vetrino viene sottoposto ad un fascio di luce che verrà diffusa dalle nanoparticelle in oro, questo permette l'identificazione ottica della presenza degli acidi nucleici *target*.

L'intensità del segnale luminoso emesso da ogni *spot* è proporzionale alla concentrazione della molecola batterica *target* nel campione.

Ogni patogeno identificato dal dispositivo emette un segnale luminoso in sei *spot* di cattura, ciascuno localizzato in posizioni distanti ma fisse sull'*array*.

Questo indica che il test di ibridazione viene ripetuto sei volte sull'*array*, a garanzia della corretta identificazione del *target* batterico nel campione.

La creazione del referto contenete i risultati dell'analisi avviene solamente se vengono rilevati, tramite l'emissione di un segnale luminoso, tutti i sei spot complementari al *target* e gli *spot* di controllo qualità (posti lateralmente sull'array) (Figura 27 e Figura 28) (Collini L. et al., 2013; Rossetti E. et al., 2013; www.nanosphere.us).

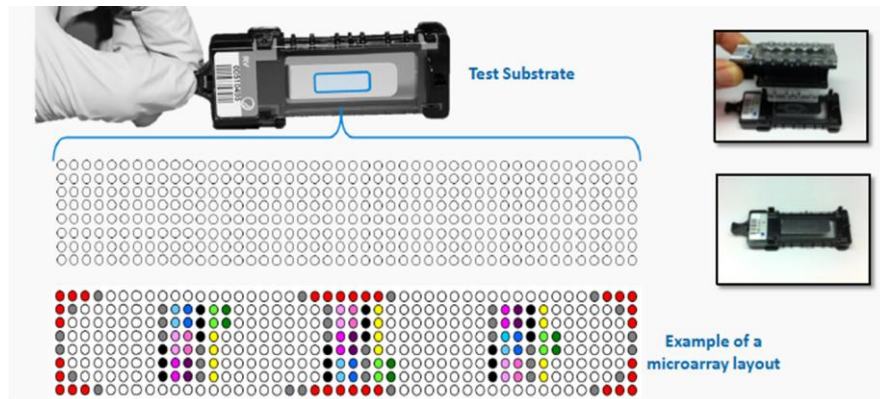


Figura 27 Esempio di microarray (www.nanosphere.us)

See application's package insert for details regarding results.

Sample	baa42 mrsa	Processing completed	06-24-11, 02:04 p.m.
Test	BSI+	Analysis completed	06-24-11, 02:19 p.m.
Cartridge	01821007		
Summary			
※ Staphylococcus	1.00 Detected	※ S. aureus	1.00 Detected
※ mecA	1.00 Detected		
Detail			
※ Staphylococcus	1.00 Detected	※ S. aureus	1.00 Detected
S. epidermidis	Not Detected	S. lugdunensis	Not Detected
※ mecA	1.00 Detected	Streptococcus	Not Detected
S. agalactiae	Not Detected	S. pyogenes	Not Detected
S. pneumoniae	Not Detected	S. enginosus gp.	Not Detected
E. faecalis	Not Detected	E. faecium	Not Detected
vanA	N/A	vanB	N/A
Listeria	Not Detected	Micrococcus	Not Detected

Figura 28 Esempio di referto prodotto dal sistema Verigene® (www.nanosphere.us)

Materiali

Il Sistema Verigene® (Nanosphere, Inc., USA) è una piattaforma utilizzata per la diagnosi rapida di sepsi basata sulla tecnologia *microarray multiplex* in grado, a partire da un aliquota di emocoltura positiva, di fornire l'esito entro 2/3 h.

Questo sistema è composto da:

- Strumenti
 - lettore Verigene® Reader,

- processore Verigene® Processor SP,
- Kit per la ricerca dei patogeni Gram-positivi e Gram-negativi e suoi componenti:
 - Verigene® *Gram-Positive Blood Culture Test* (BC-GP) (approvato dalla FDA)
 - Verigene® *Gram-Negative Blood Culture Test* (BC-GN) (non per uso diagnostico ma utilizzabile solo in ambito di ricerca)
 - vassoio per estrazione (temperatura di conservazione 2–8°C)
 - Verigene® BC-GP (BSI+) *Extraction Trays*
 - Verigene® BC-GN (BSI+) *Extraction Trays*
 - puntali monouso (temperatura di conservazione 8–30°C)
 - Verigene® BC-GP (BSI+) *Utility Trays*
 - Verigene® BC-GN (BSI+) *Utility Trays*
 - vassoio amplificazione / controllo (temperatura di conservazione 2–8°C per BC-GP e -20°C per BC-GN)
 - Verigene® BC-GP (BSI+) *Processing Control 1 Tubes*
 - Verigene® BC-GN (BSI+) *Processing Control 1 Tubes*
 - *test cartridge* (cartuccia reattivi + vetrino *microarray*) (temperatura di conservazione 2–8°C)
 - Verigene® BC-GP (BSI+) *Test Cartridges*
 - Verigene® BC-GN (BSI+) *Test Cartridges*

Preparazione del campione

La preparazione del campione all'analisi consiste inizialmente nella classificazione del patogeno presente nel flacone di emocoltura positiva in batteri Gram-positivi o Gram-negativi, quindi è stato allestito un vetrino con la colorazione di Gram.

Successivamente si mescola il flacone, in modo da risospendere e omogeneizzare il suo contenuto, ed è stato prelevato un volume di campione intero di almeno 1 mL.

Questo processo viene eseguito obbligatoriamente sotto cappa utilizzando siringhe sterili.

Procedura Sistema Verigene®

Le fasi per procedere all'esecuzione dell'esame sono state:

1. Preparazione dei consumabili

- rimozione dei consumabili del *kit* per la ricerca, a seconda della classificazione del patogeno, dei batteri Gram-positivi o Gram-negativi dal frigorifero o *freezer* e lasciare che raggiungano la temperatura ambiente,
- scuotere efficacemente il vassoio di estrazione per risospendere le microparticelle magnetiche e successivamente picchiettare gentilmente sulla superficie del vassoio per favorire la ricaduta dei reagenti sul fondo dei pozzetti,
- assicurarsi che la guarnizione di gomma presente nel supporto puntali sia sollevata in maniera corretta,
- miscelare i reagenti contenuti nel vassoio di amplificazione utilizzando un *mixer*, dopodiché rimuovere il tappo del *Processing Control 1 Tube* contenente il controllo interno,
- preparare la *test cartridge* rimuovendo l'involucro protettivo e successivamente colpendo delicatamente la cartuccia sul lato del *barcode*.

2. Caricamenti dei consumabili, della *test cartridge* e del campione nel Verigene® Processor SP (Figura 29)

- avviare il processore Verigene® eseguendo il login con i dati dell'operatore e caricare una nuova sessione definita con la data del giorno di esecuzione dell'analisi,
- aprire il carrello che conterrà i consumabili e alzare la pinza,
- caricare i consumabili nel carrello del Verigene® Processor SP facendo attenzione a collocare nella posizione corretta ogni singolo consumabile,
- chiudere la pinza del carrello,
- lettura del codice a barre della *test cartridge* utilizzata e inserire l'identificativo del campione in analisi per generare un'associazione test-paziente,
- inserire la *test cartridge*,
- inserire il campione nell'apposito pozzetto all'interno del vassoio di estrazione, 350 µl nel caso di batteri Gram-positivi e 700 µl nel caso di batteri Gram-negativi.



Figura 29 Carrello contenente i componenti del kit (www.nanosphere.us)

3. Preparazione automatizzata del campione ed esecuzione dell'indagine sul Verigene® Processor SP (Figura 30)

- chiudere il carrello,
- lo strumento controlla l'inserimento corretto di tutte le parti del *kit* per iniziare l'analisi,
- le informazioni relative alla procedura vengono trasferite al dispositivo Verigene® Reader e sul *display* del dispositivo Verigene® Processor vengono indicati tempo rimanente e stato, la durata dell'analisi è di 2 h e 50' nel caso di batteri Gram-positivi, mentre è di 1 h e 50' per i batteri Gram-negativi,
- terminata l'elaborazione, Verigene® Processor indica che la procedura è stata completata e il Verigene® Reader emette anche due segnali acustici in successione ogni 15 secondi per segnalare che la cartuccia può essere rimossa.



Figura 30 Verigene® Processor SP (www.nanosphere.us)

4. Lettura del vetrino con Verigene® Reader (Figura 31)

- rimuovere i consumabili dal dispositivo Verigene® Processor (eventualmente è possibile prelevare dal pozzetto denominato *Residual DNA well* il DNA target estratto),
- rimuovere la cartuccia dal processore e successivamente sganciare il pacco reagenti della cartuccia dal supporto del substrato, facendo attenzione ad

appoggiare la cartuccia su un lato, per evitare che i reagenti cadano sul vetrino invalidando il risultato,

- rimuovere il nastro protettivo argentato dal retro del vetrino,
- leggere con il lettore di codici a barre il *barcode* presente sul supporto del substrato,
- caricare il substrato nel Verigene® Reader entro 20 secondi,
- il dispositivo Verigene® Reader visualizza i risultati che verranno raccolti in un report.



Figura 31 Lettura del vetrino con Verigene® Reader (www.nanosphere.us)

FILMARRAY® BLOOD CULTURE ID PANEL (BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC., USA)

Descrizione del sistema

Le reazioni di estrazione, purificazione ed amplificazione dell'acido nucleico avvengono in un "sacchetto", definito *Pouch*.

Il *Pouch* è composto da un serbatoio contenente tutti i reagenti necessari per la preparazione del campione, l'amplificazione e l'identificazione del *target*, e da una pellicola costituita da "bolle" e canali che rappresentano le diverse celle in cui si verifica l'intero processo di analisi.

I reattivi nel *Pouch* sono liofilizzati e perciò, prima di una corsa, l'operatore inietta nel foro dedicato la soluzione di idratazione e, attraverso un'altra apertura, viene inserita un'aliquota di campione dell'emocoltura positiva precedentemente trattata con un tampone.

Un'altra caratteristica del *kit* è la capacità del *Pouch* di aspirare in modo automatico, dal vuoto presente al suo interno, la quantità esatta di soluzione idratante e di campione.

In questo modo non è richiesta una particolare precisione nel pipettamento delle soluzioni.

Successivamente il *pouch* viene inserito nello strumento FilmArray che in sequenza esegue (Figura 32):

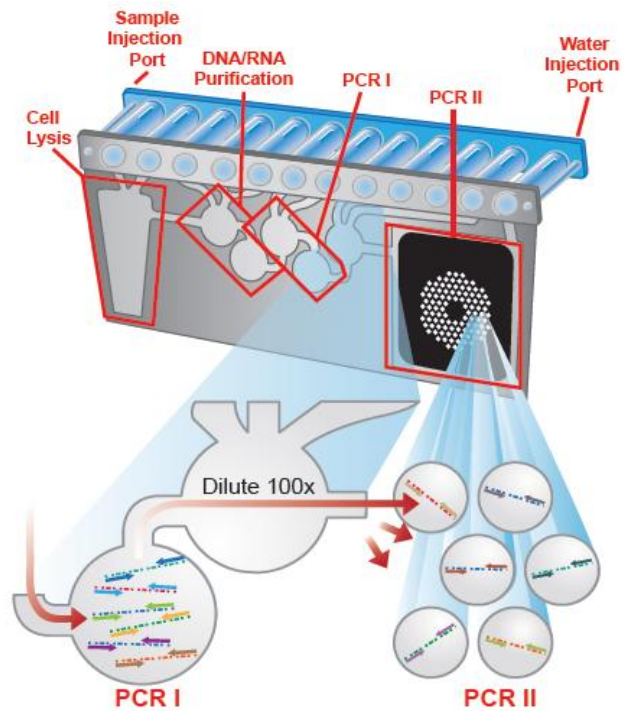


Figura 32 Pouch FilmArray (www.filmarray.com)

1. lisi cellulare,
impiegando delle biglie in ceramica messe in agitazione ad alta velocità viene liberato l'acido nucleico contenuto nelle cellule;
2. estrazione e purificazione,
nella cella di lisi vengono aggiunte in un secondo momento delle biglie magnetiche a cui si legano gli acidi nucleici. Successivamente il prodotto di lisi passa nella prima cella di purificazione dove avviene il lavaggio dei detriti cellulari e poi, nella seconda cella, un tampone di eluizione permette il rilascio del DNA/RNA legato alle biglie magnetiche;
3. esecuzione della *nested PCR multiplex*,
 - a) la prima PCR è una reazione *multiplex* in cui si verificano simultaneamente molteplici PCR. In un unico volume, numerose coppie di *primer* "esterni" amplificano il proprio target. I reattivi della PCR vengono aggiunti al DNA/RNA

nella prima cella “PCR I” per poi procedere nella seconda cella in cui avviene la reazione.

b) la seconda reazione è una *PCR real-time singleplex*, gli ampliconi sintetizzati nella prima PCR vengono diluiti (100X) e indirizzati nelle singole celle dell’*array* contenenti una sola coppia di *primer* “interni”, la rilevazione in *real-time* del prodotto della seconda PCR avviene utilizzando un intercalante fluorescente denominato *LCGreen® Plus*;

4. lettura di ogni cella dell’*array* ed esecuzione della curva di *melting* (Figura 32), il *software* del sistema FilmArray® registra le curve di amplificazione delle *PCR real-time* che avvengono nelle 102 celle dell’*array* dedicate ai diversi patogeni e ne valuta la corrispondenza con le curve di *melting* (Figura 33). Infine, valutata l’amplificazione e la curva di *melting* del controllo interno, il *software* genera un report contenente l’identificazione del patogeno ed eventuali antibiotico resistenze (Figura 34) (Collini L. et al., 2013; Rossetti E. et al., 2013; www.filmarray.com).

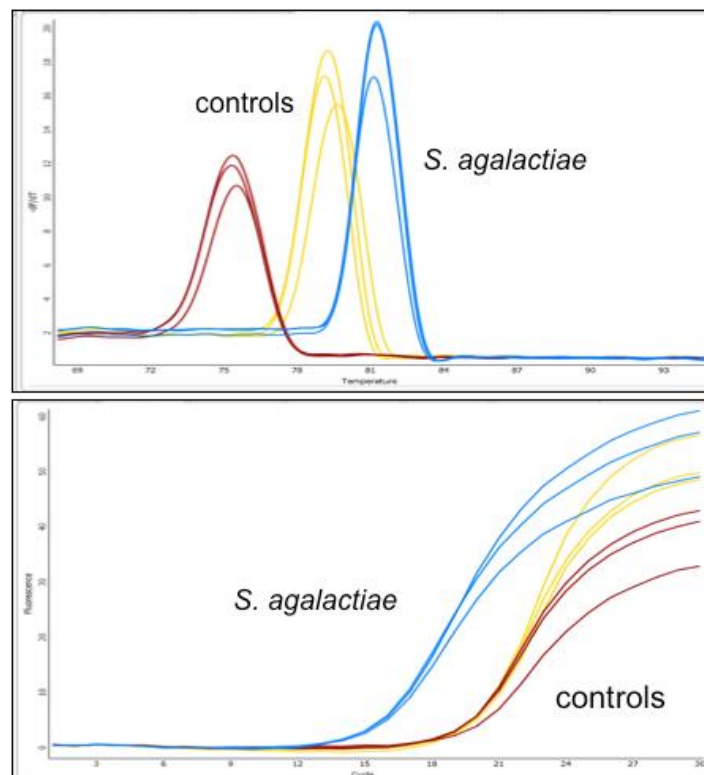


Figura 33 Risultato di identificazione del patogeno presente in una emocoltura positiva. In alto la curva di *melting* elaborata dal *software* del sistema FilmArray®. In basso le curve di amplificazione delle PCR real-time. In questa emocoltura è stato rilevato ed identificato il patogeno *S. agalactiae* e l’avvenuta amplificazione del controllo interno che valida la seduta analitica.

FilmArray® BCID Panel		FilmArray® Molecular Technology Inc. www.idahotech.com	
Run Summary			
Sample ID:	5302d MRSE-29887 8H2	Run Date:	04 Jul 2012
Detected:	Staphylococcus Methicillin resistance gene <i>mecA</i>	Controls:	7:04 PM Passed
Equivocal:	None		
Result Summary			
Not Detected	<i>Acinetobacter baumannii</i>		
Not Detected	<i>Candida albicans</i>		
Not Detected	<i>Candida glabrata</i>		
Not Detected	<i>Candida krusei</i>		
Not Detected	<i>Candida parapsilosis</i>		
Not Detected	<i>Candida tropicalis</i>		
Not Detected	Enterobacteriaceae		
Not Detected	<i>Enterobacter cloacae</i> complex		
Not Detected	<i>Enterococcus</i>		
Not Detected	<i>Escherichia coli</i>		
Not Detected	<i>Haemophilus influenzae</i>		
Not Detected	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
Not Detected	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>		
Not Detected	<i>Neisseria meningitidis</i>		
Not Detected	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Not Detected	<i>Proteus</i>		
Not Detected	<i>Serratia</i>		
✓ Detected	Staphylococcus		
Not Detected	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
Not Detected	Carbapenem resistance gene <i>KPC</i>		
✓ Detected	Methicillin resistance gene <i>mecA</i>		
Not Detected	Vancomycin resistance genes <i>vanA/B</i>		
Run Details			
Pouch:	BCID Panel v1.9	Protocol:	BC v2.1
Run Status:	Completed	Operator:	CamGun
Serial No.:	00210812	Instrument:	ITI FA 'FA2017'
Lot No.:	107312		

Figura 34 Esempio di referto prodotto dal software del sistema FilmArray® (www.filmarray.com)

Materialie

Il sistema FilmArray® Blood Culture ID Panel (Biofire Diagnostics, Inc., USA) utilizza un protocollo di *nested multiplex PCR* (nmPCR), per la ricerca di batteri e funghi presenti in campioni di emocoltura positiva, riuscendo a fornire una risposta in circa un ora.

Questa piattaforma è costituita da (Figura 35):

- Strumenti
 - FilmArray® System
- Kit per la ricerca dei patogeni
 - *Pouch*, contenente tutti i reattivi liofilizzati
 - *Hydration solution*
 - *Sample Lysis buffer*
 - Siringhe e pipetta
 - Supporto per il *Pouch*



Figura 35 Il sistema FilmArray®: strumento e consumabili (www.filmarray.com)

Procedura FilmArray®

Le fasi svolte per l'esecuzione del test sono state:

1. mescolare il flacone di emocoltura positiva, per risospendere e omogeneizzare il suo contenuto, e prelevare un volume di campione $\geq 0,5$ mL,
2. porre sotto cappa il *kit* completo per la ricerca dei patogeni,
3. inserire nel supporto il *Pouch* e le soluzioni (Figura 36),

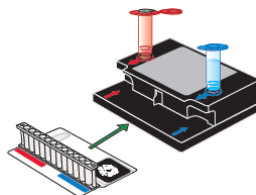


Figura 36 Inserimento nel supporto dei componenti del kit (www.filmarray.com)

4. iniettare circa 1 ml di *Hydration Solution* nel *Pouch* con la siringa dedicata, il volume necessario viene aspirato in modo automatico dal vuoto presente nel *Pouch* (Figura 37),

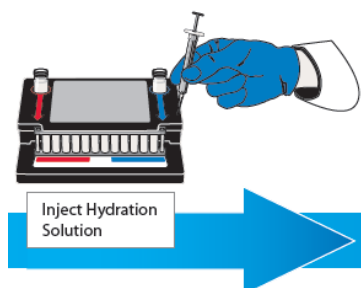


Figura 37 Iniezione della Hydration solution (www.filmarray.com)

5. prelevare con la *pasteur* sterile circa 300 μ l di campione e miscelarlo con il *Sample Lysis Buffer* (Figura 38),

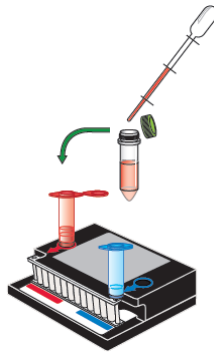


Figura 38 Preparazione del campione (www.filmarray.com)

6. iniettare nel *Pouch* circa 300 µl di soluzione campione - *Sample Lysis Buffer*, anche in questo caso la soluzione viene automaticamente aspirata dal vuoto presente nel *Pouch* (Figura 39),

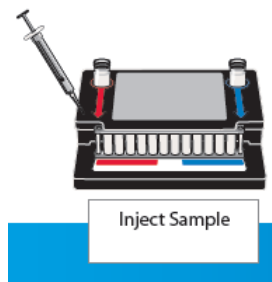


Figura 39 Iniezione del campione (www.filmarray.com)

7. caricare il *Pouch* nello strumento FilmArray® facendo leggere il suo *barcode* ed inserire i dati del paziente (Figura 40),

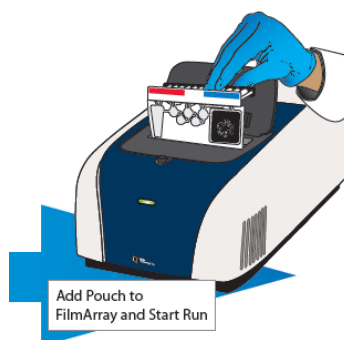


Figura 40 Inserimento del Pouch nello strumento FilmArray® (www.filmarray.com)

8. selezionare start per avviare l'analisi,
9. conclusa l'analisi, il *software* raccoglie le informazioni rilevate dalla lettura *dell'array* per produrre un report contenente i risultati dell'esame.

PROCEDURE SPERIMENTALI

La prima parte del lavoro di tesi è stata strutturata in modo da confrontare il metodo tradizionale con le metodiche di biologia molecolare con il fine di valutarne la loro specificità nell'identificare il patogeno e nel rilevare eventuali antibiotico-resistenze.

La procedura sperimentale comincia dalla positività del flacone di emocoltura segnalato dal sistema BD BACTEC™ FX.

Successivamente, un'aliquota di campione del flacone di emocoltura positivo è stato sottoposto alle indagini microbiologiche tradizionali (test di colorazione di Gram, colture su piastra, identificazione degli isolati ed antibiogramma) ed in parallelo ai test diagnostici molecolari per la diagnosi rapida di sepsi ovvero il sistema Verigene® ed il sistema FilmArray® *Blood Culture ID Panel*.

Purtroppo, non tutti i campioni sono stati analizzati in parallelo con entrambe le metodiche molecolari a causa di una temporanea interruzione nella consegna di uno dei kit, tuttavia questi risultati sono ugualmente utili.

Nella sperimentazione le analisi microbiologiche tradizionali sono state realizzate seguendo le istruzioni operative del Laboratorio dell'U.O. Microbiologia e Virologia, mentre le indagini molecolari sono state eseguite secondo le indicazioni della casa produttrice.

Nella seconda parte del lavoro è stata valutata la sensibilità dei due sistemi di indagine molecolare utilizzando un ceppo ATCC di *E. coli* a diverse concentrazioni nei flaconi di emocoltura.

Inizialmente abbiamo seminato una colonia pura del ceppo ATCC di *E. coli* su terreno solido agar sangue e poi incubata in termostato a 37°C, questo per ottenere sulla superficie del terreno solido diverse colonie pure di battere sufficienti a creare la sospensione madre da cui verranno preparate le sospensioni figlie a concentrazione nota.

Il giorno successivo, utilizzando un turbidimetro, è stata preparata una sospensione in fisiologica di *E. coli* con una torbidità di 0.5 *McFarland* che corrisponde a una concentrazione batterica pari a 10^8 UFC/mL.

La sospensione madre, utilizzando una serie di diluizioni a scalare, è stata impiegata per ottenere le sospensioni figlie alla concentrazione batterica desiderata.

Le sospensioni figlie sono state inoculate in flaconi di emocoltura che contengono 5-10 mL di sangue sterile preventivamente controllato, questo comporta la diluizione della sospensione batterica di circa un ordine di grandezza.

Il controllo della concentrazione delle soluzioni figlie è stata realizzata con una semina a spatolamento di 50 µL di sospensione su terreno agar sangue e, dopo incubazione a 37°C, sono state contate le colonie batteriche ricavando la concentrazione iniziale.

Il flacone di emocoltura inoculato è stato successivamente inserito nel sistema a monitoraggio continuo per emocolture BD BACTEC™ FX.

A questo punto, avendo nota la concentrazione batterica presente nel flacone, è stata decisa la permanenza del campione nel BD BACTEC™ FX.

In alcuni casi, dopo avere estratto un'aliquota di emocoltura, è stata reinserita la fiasca nell'incubatore per determinare il tempo necessario alla sua positivizzazione.

In questo modo sono state analizzate con i due metodi molecolari, Verigene® e FilmArray®, diverse aliquote di emocolture con la stessa concentrazione iniziale ma con tempo di incubazione diverso.

La decisione di sottoporre le diverse sospensioni batteriche all'incubazione in emocolture è stata presa per simulare il più possibile la situazione reale che avviene nei campioni provenienti dai reparti.

RISULTATI

Le emocolture segnalate positive dal sistema a monitoraggio continuo BD BACTEC™ FX sono state analizzate tutte con il metodo tradizionale e in parallelo con almeno un metodo molecolare, infatti, a causa di un'interruzione temporanea nella fornitura di uno dei kit, non è stato possibile confrontare sempre in contemporanea tutte le metodiche.

Il sistema Verigene® è stato utilizzato nell'identificazione dei patogeni presenti in 64 emocolture positive (Tabella 8), provenienti da altrettanti diversi casi clinici, delle quali 6 presentavano una coltura mista composta da due microrganismi.

In una sola occasione la strumentazione ha segnalato "NO RESULT", concordando ugualmente con il risultato ottenuto con il metodo tradizionale che refertò "nessuna precisa identificazione", mentre in due casi il referto segnalava "NO GRID" a causa di un errore nel caricamento della cartuccia.

N° campione	Esito Metodica tradizionale	Esito Verigene®
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
2	NESSUNA PRECISA IDENTIFICAZIONE	NO RESULTS
3	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus gp</i>
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
12	<i>Streptococcus anginosus</i>	NO CALL - NO GRID
13	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
14	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus</i>
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

17	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
18	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
19	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
20	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i>
21	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
22	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
23	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>
26	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
27	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
28	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>
29	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
30	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus</i>
31	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
32	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
33	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
34	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
35	<i>Staphylococcus auricularis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>
36	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
37	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>
38	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>
39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NO CALL – NO GRID
40	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus anginosus</i> gp.
41	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
42	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
43	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
44	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
45	<i>Streptococcus oralis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>

46	<i>E. coli + Streptococcus anginosus</i>	<i>E. coli + Streptococcus anginosus gp.</i>
47	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
48	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
49	<i>Staphylococcus hominis mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>
50	<i>Streptococcus salivarius + Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus</i>
51	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus gp.</i>
52	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
53	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
54	<i>Enterococcus faecium + Candida glabrata</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
55	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
56	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus</i>
57	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
58	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
59	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i>
60	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis mecA</i>
61	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
62	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
63	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i>
64	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus gp</i>

Tabella 8 Campioni analizzati con il sistema Verigene®

Il numero di patogeni Gram-positivi rilevati nelle emocolture con il sistema Verigene®

Gram-Positive Blood Culture Test (BC-GP) sono:

- n°6 *Staphylococcus spp.*,
- n°3 *Staphylococcus aureus*,
- n°4 *Staphylococcus epidermidis*,
- n°10 *Staphylococcus epidermidis mecA*,
- n°4 *Streptococcus spp.*,
- n°3 *Streptococcus pneumoniae*,
- n°1 *Streptococcus agalactiae*,

- n°1 *Streptococcus pyogenes*,
- n°5 *Streptococcus anginosus gp.*,
- n°2 *Listeria monocytogenes*,
- n°3 *Enterococcus faecalis*,
- n°2 *Enterococcus faecium*.

Il numero di patogeni Gram-negativi rilevati nelle emocolture con il sistema Verigene® *Gram-Negative Blood Culture Test (BC-GN)* sono:

- n°15 *E. coli*,
- n°2 *Klebsiella oxytoca*,
- n°1 *Klebsiella pneumoniae*,
- n°2 *Enterobacter spp.*,
- n°1 *Serratia marcescens*.

Il sistema FilmArray® è stato utilizzato nell'identificazione dei patogeni in 42 emocolture positive (Tabella 9) delle quali 6 presentavano una coltura mista composta da due microrganismi.

In due occasioni la strumentazione ha segnalato "NO RESULT", una prima volta concordando con il risultato ottenuto con il metodo tradizionale mentre la seconda volta a causa di un difetto del *Pouch*.

N° campione	Esito Metodica tradizionale	Esito FilmArray®
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus 1-2</i> <i>mecA</i>
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus 1-2</i> <i>mecA</i>
4	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
5	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>
6	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
7	NESSUNA PRECISA IDENTIFICAZIONE	NO RESULTS
8	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
9	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NO RESULTS

10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
11	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
12	<i>Staphylococcus auricularis</i> <i>mecA</i>	<i>mecA</i>
13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
14	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
15	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>
18	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
19	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>
20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2
21	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
22	<i>Streptococcus oralis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> + <i>Enterococcus</i>
23	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i>
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
25	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
26	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
27	<i>Streptococcus salivarius</i> + <i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus</i>
28	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i>
29	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
30	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
31	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Candida glabrata</i>	<i>Enterococcus</i> + <i>Candida glabrata</i>
32	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
33	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus</i>
34	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
35	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>
36	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i>

37	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus 1-2</i> <i>mecA</i>
38	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
39	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
40	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
41	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
42	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i>

Tabella 9 Campioni analizzati con il sistema FilmArray®

Questa piattaforma non necessita la distinzione preliminare del microrganismo con la colorazione di Gram e quindi, utilizzando lo stesso kit Blood Culture ID Panel per la ricerca dei patogeni, sono stati identificati:

- n°1 *Staphylococcus 1-2 (Staphylococcus coagulasi-negativo)*,
- n°9 *Staphylococcus 1-2 mecA (Staphylococcus coagulasi-negativo mecA)*,
- n°1 *Staphylococcus aureus*,
- n°7 *Streptococcus spp.*,
- n°1 *Streptococcus agalactiae*,
- n°1 *Streptococcus pneumoniae*,
- n°1 *Streptococcus pyogenes*,
- n°2 *Listeria monocytogenes*,
- n°4 *Enterococcus*,
- n°9 *E. coli*,
- n°2 *Klebsiella oxytoca*,
- n°1 *Klebsiella pneumoniae*,
- n°1 *Enterobacter cloacae*,
- n°1 *Serratia*,
- n°1 *Pseudomonas aeruginosa*,
- n°1 *Candida albicans*,
- n°1 *Candida glabrata*.

Il sistema Verigene® ha correttamente identificato il genere dell'agente eziologico di sepsi in 61 emocolture positive delle 64 analizzate, pari al 95,3% dei casi, in particolare, il test molecolare ha identificato 65 agenti eziologici di sepsi (95,6%), mentre le

metodiche tradizionali (coltura in piastra, identificazione biochimica, tipizzazione sierologica) ne hanno rilevati 68 (Tabella 10).

Inoltre si è rivelato in grado di individuare correttamente la presenza di due batteri nello stesso campione se appartenenti al suo pannello di identificativi.

Per quanto riguarda l'identificazione dei determinanti genetici di antibiotico-resistenza, il sistema Verigene® li ha individuati correttamente in tutte le indagini (100%) ma li ha determinati in 10 ceppi batterici (71,4%) su 14 caratterizzati con le metodiche tradizionali (Tabella 10).

In quattro campioni il sistema non ha fornito il risultato della rilevazione del gene di resistenza, questo perché il test molecolare identifica il patogeno con un procedimento a «cascata» che prevede prima l'identificazione del genere, poi della specie ed infine delle eventuali resistenze dell'agente eziologico.

Quindi, solo se il metodo riesce a identificare la specie del patogeno, il sistema procede a ricercare il gene di resistenza.

Nei due casi dove gli agenti patogeni erano rispettivamente *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus auricularis* lo strumento ha segnalato solo il genere senza identificare il gene di resistenza.

Nel corso della sperimentazione non è stata rilevata alcuna positività per i geni di resistenza vanA, vanB, OXA, KPC, IMP, VIM, CTX-M, NDM e gli antibiogrammi diretti eseguiti per tutti i campioni analizzati hanno fornito il medesimo risultato.

Un limite evidenziato, oltre a non riconoscere i miceti, è l'incapacità del metodo molecolare di identificare in tutti i casi la specie del patogeno ma di fermarsi al livello di genere se il pannello non permette un'indagine più precisa, al contrario della metodica tradizionale che generalmente è sempre in grado di identificare il patogeno fino al livello di specie.

Un esempio è l'analisi dell'emocoltura n°48 che utilizzando il solo metodo molecolare viene individuata la presenza di una popolazione batterica del genere *Streptococcus*, ma che in realtà, utilizzando la metodica tradizionale, sono due gli agenti eziologici della sepsi e cioè lo *Streptococcus salivarius* e lo *Streptococcus parasanguinis*.

In tre campioni (4,7%) il sistema Verigene® non è stato in grado di generare risultati di identificazione microbica.

Alla conclusione di due indagini lo strumento ha fornito un referto con il risultato “NO CALL – NO GRID”, questo è stato provocato da problemi tecnici associati alla cartuccia in cui si svolge la reazione di ibridazione tra il target batterico e gli oligonucleotidi sonda.

Mentre in una terza indagine il referto conteneva la dicitura “NO RESULT”, presuntivamente causata da una scarsa concentrazione batterica nel campione, questo perché il paziente era affetto da pancreatite acuta e quindi già trattato con massicce dosi di antibiotico prima del prelievo del campione.

In soli due campioni analizzati la metodica molecolare ha fornito risultati discordanti rispetto a quanto rilevato dalle metodiche tradizionali.

Il sistema Verigene® ha rilevato in un primo campione una positività per l’agente infettivo *Staphylococcus epidermidis*, mentre la procedura tradizionale aveva identificato uno *Staphylococcus xylosus*; mentre nell’altro campione la metodica molecolare è stata in grado solo di identificare il genere *Streptococcus* mentre il metodo colturale tradizionale lo identificava come *Streptococcus anginosus gp.*, ceppo batterico presente nel pannello.

In generale, in sole 12 (18,7%) sperimentazioni l’identificazione fenotipica basata sul metodo colturale ha fornito risultati più specifici riguardanti la specie dell’agente patogeno, questo perché nel pannello del sistema Verigene® non erano incluse le specie batteriche in questione come: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus parasanguinis*.

Tuttavia i risultati delle analisi generati dalle due tecniche possono dirsi concordanti, poiché la metodica molecolare ha comunque identificato il genere corretto dell’agente eziologico.

Microrganismo	Rilevati Metodica Tradizionale	Rilevati Verigene®
<i>Staphylococcus</i>	7	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	14
<i>Streptococcus</i>	4	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	3

<i>Streptococcus anginosus</i> gp.	7	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2
<i>Listeria</i>	2	2
<i>Enterobacter</i>	2	2
<i>E. coli</i>	15	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	(NO CALL – NO GRID)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	1
TOTALE	68	65
Antibiotico-resistenza		
<i>mecA</i>	14	10

Tabella 10 Agenti eziologici identificati con la metodica tradizionale e quella molecolare Verigene®

La piattaforma FilmArray® ha fornito risultati di identificazione microbica in 40 emocolture positive (95,2%) su 42 analizzate, in particolare il test molecolare ha identificato 44 agenti patogeni di sepsi (93,6%) mentre le tecniche tradizionali ne hanno rilevati 47; inoltre è sempre stata rilevata una perfetta concordanza tra i risultati dell'antibiogramma della metodica di riferimento con i risultati ricavati dal metodo molecolare (100%) (Tabella 11).

Sono state rilevate 10 positività per il gene di resistenza *mecA*, tutte associate a *Stafilococchi coagulasi-negativi* e confermate dagli antibiogrammi allestiti in piastra.

Non è stata invece rilevata alcuna positività per i geni *vanA/vanB* e *KPC* nei patogeni identificati, anche queste informazioni sono state confermate dagli antibiogrammi preliminari eseguiti.

Una parziale concordanza tra i metodi avviene in due analisi.

La metodica tradizionale ha rilevato in un campione la presenza dello *Staphylococcus auricularis* e in un altro un'infezione polimicrobica data dagli *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus salivarius*, invece lo strumento FilmArray® ha rispettivamente identificato solo l'antibiotico-resistenza associata al patogeno senza identificarlo e nel caso dell'emocoltura positiva per infezione polimicrobica ha evidenziato esclusivamente il genere dei microrganismi coinvolti (*Streptococcus*).

Nelle analisi abbiamo verificato che anche il FilmArray®, come il sistema Verigene®, è in grado di individuare correttamente la presenza di due microrganismi nello stesso campione.

In sole due occasioni (4,8%) il metodo FilmArray® non è riuscito a evidenziare alcun *target* genetico: in un caso il motivo era da imputare alla scarsa concentrazione batterica nel campione (stesso campione analizzato in parallelo con il sistema Verigene® ottenendo lo stesso risultato), nel secondo test fallito i controlli interni al processo non hanno mostrato alcuna curva di *melting* invalidando completamente il test, probabilmente a causa di un difetto del *Pouch* che non ha reidratato i reattivi liofilati in modo corretto.

Dalle indagini eseguite è sempre stata rilevata una perfetta concordanza tra i risultati ricavati con il metodo tradizionale con quello molecolare.

In alcuni casi la diagnostica tradizionale si è rivelata più specifica rispetto al metodo molecolare nell'identificare il patogeno fino al livello di specie, questo perché alcune specie batteriche non sono incluse nel pannello BCID come nel nostro caso lo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus anginosus*, *Staphylococcus auricularis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis*, *Serratia marcescens*.

Microrganismo	Rilevati Metodica Tradizionale	Rilevati FilmArray®
<i>Staphylococcus coagulasi</i> <i>negativo</i>	11	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1
<i>Streptococcus spp.</i>	8	7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	1
<i>Enterococcus</i>	4	4
<i>E. coli</i>	9	9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1
<i>Serratia</i>	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2

<i>Candida glabrata</i>	1	1
<i>Candida albicans</i>	1	1
TOTALE	47	44
Antibiotico-resistenza		
<i>mecA</i>	10	10

Tabella 11 Agenti eziologici identificati con la metodica tradizionale e quella molecolare FilmArray®

Il numero di indagini con il metodo tradizionale ed in parallelo con entrambe le metodiche molecolari sono state 40 (Tabella 12).

I risultati forniti dalle metodiche molecolari sono nella gran parte concordanti tra di loro e con le procedure diagnostiche tradizionali di laboratorio.

Le discordanze osservate nei risultati prodotti dalle due metodiche molecolari, presenti nella Tabella 13, sono dovute a differenze nel numero e nella tipologia dei patogeni rilevabili dai vari pannelli di identificazione microbica disponibili.

In particolare, il sistema FilmArray® dispone di un pannello con un numero maggiore di patogeni potenzialmente coinvolti nell'infezione, mentre il sistema Verigene® presenta un numero maggiore di geni di resistenza potenzialmente espressi dall'agente microbico.

	Esito Metodica tradizionale	Esito Verigene®	Esito FilmArray®
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
4	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
5	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>
6	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
7	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
8	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NO RESULTS
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
10	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
11	<i>Staphylococcus auricularis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>mecA</i>

12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
13	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
14	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NO CALL – NO GRID	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
17	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia</i>
18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2
19	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
20	<i>Streptococcus oralis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus</i> + <i>Enterococcus</i>
21	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus anginosus</i> gp.	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i>
22	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
24	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
25	<i>Streptococcus salivarius</i> + <i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
26	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> gp.	<i>Streptococcus</i>
27	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
28	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
29	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Candida glabrata</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> + <i>Candida glabrata</i>
30	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
31	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
32	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
33	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>
34	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
35	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>mecA</i>	<i>Staphylococcus</i> 1-2 <i>mecA</i>
36	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
37	<i>Candida albicans</i>	NON DETERMINABILE	<i>Candida albicans</i>
38	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

39	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
40	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> gp	<i>Streptococcus</i>

Tabella 12 Risultati dei campioni eseguiti in parallelo

Microorganismo	N° microrganismi identificati		
	Metodica Tradizionale	Verigene®	FilmArray®
<i>Staphylococcus spp.</i>		4	non presente nel pannello
<i>Staphylococcus coagulasi-negativo</i>	5	non presente nel pannello	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	7	non presente nel pannello
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1
TOTALE	12	12	11
GRAM-POSITIVI			
<i>Streptococcus spp.</i>	4	4	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	4	3	non presente nel pannello
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	2	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	1	1
TOTALE	12	11	10
<i>Enterococcus spp.</i>		non presente nel pannello	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2	non presente nel pannello
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	non presente nel pannello
TOTALE	3	3	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2	2
GRAM-NEGATIVI			
<i>Enterobacter spp.</i>		1	
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	non presente nel pannello	1
<i>E. coli</i>	8	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	NO CALL – NO GRID	1

	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	1
	<i>Serratia</i>	1	non presente nel pannello	1
	<i>Serratia marcescens</i>		1	
	TOTALE	14	13	14
MICETI	<i>Candida albicans</i>	1	non presente nel pannello	1
	<i>Candida glabrata</i>	1	non presente nel pannello	1
	TOTALE	2		2
	TOTALE	45	41	42

Tabella 13 Agenti eziologici identificati in emocolture eseguite in parallelo con metodiche tradizionale e molecolari

Diversi studi hanno coinvolto il sistema Verigene® Blood Culture Nucleic Acid Test ed hanno evidenziato la rapidità di risposta ottenendo una diagnosi di sepsi in circa 2h 50'e dalla positività dell'emocoltura.

Questi articoli riguardavano solo il kit BC-GP Verigene® perché è l'unico con l'approvazione della FDA, infatti il kit BC-GN è ancora in fase di sperimentazione.

Un altro articolo evidenzia che il test BC-GP Verigene® ha una specificità del 100% e una sensibilità del 98,5% per l'identificazione batterica e il 100% di specificità e sensibilità nel rilevamento dei determinanti genetici di resistenza (Buchan B.W. et al., 2012; Tormo N et al., 2012).

Anche il sistema FilmArray® BCID è stato valutato in alcuni studi in cui si evidenzia una specificità del 100% per l'identificazione dei 24 patogeni e dei 4 fattori di resistenza antimicrobica in emocolture positive.

Inoltre si sottolinea la sua potenzialità nel migliorare la gestione dei pazienti con sepsi ottenendo una riduzione dei tempi di identificazione di 24-72 ore rispetto al metodo tradizionale (Silbert S. et al., 2011; Ota I. et al., 2012).

Nella seconda parte della tesi abbiamo valutato la sensibilità dei due metodi molecolari utilizzando diverse sospensioni batteriche di E. coli a concentrazione nota.

Queste sospensioni sono state inoculate in flaconi per emocolture contenente sangue sterile e successivamente incubate nel sistema a monitoraggio continuo BD BACTEC™ FX.

Le diverse aliquote di campione sono state prelevate dai flaconi di emocoltura dopo un tempo prestabilito di incubazione e sottoposte all'analisi con i due metodi.

Nella Tabella 14 sono riportati tutti i risultati: nella prima e seconda colonna sono inserite le concentrazioni batteriche rispettivamente quella dell'inoculo e quella successivamente presente nella fiasca di emocoltura, nella terza colonna è inserito il tempo di incubazione della fiasca nel BD BACTEC™ FX, la quarta colonna riporta, a seconda del campione, l'esito dell'incubazione nel termostato dell'emocoltura ed eventualmente il tempo impiegato per la sua positivizzazione, ed infine, nelle ultime due colonne sono inseriti gli esiti delle analisi con i metodi molecolare.

Carica inoculata (UFC/mL)	Carica Emocoltura (UFC/mL)	Tempo incubazione (h)	Esito emocoltura	FilmArray®	Verigene®
10 ³	10 ²	0	nd	nd	Nd
10 ³	10 ²	2	nd	NEGATIVO	NEGATIVO
10 ³	10 ²	4	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVO
10 ³	10 ²	6	POSITIVA	NEGATIVO	Nd
10 ³	10 ²	7	POSITIVA (10h30')	POSITIVO	Nd
10 ³	10 ²	8	nd	NEGATIVO	NEGATIVO
10 ³	10 ²	9	POSITIVA	POSITIVO	Nd
10 ³	10 ²	18 (OVERNIGHT)	nd	POSITIVO	POSITIVO
10 ⁴	10 ³	2	POSITIVA	NEGATIVO	Nd
10 ⁴	10 ³	4	nd	POSITIVO	NEGATIVA
10 ⁴	10 ³	6	nd	POSITIVO	NEGATIVA
10 ⁵	10 ⁴	0	nd	nd	Nd
10 ⁵	10 ⁴	2	nd	NEGATIVO	NEGATIVO

10^5	10^4	4	nd	POSITIVO	NEGATIVO
10^5	10^4	6	nd	POSITIVO	NEGATIVO
10^6	10^5	4	POSITIVA (7h56')	nd	NEGATIVO
10^6	10^5	5	POSITIVA (8h38')	nd	POSITIVO
10^6	10^5	6	POSITIVA (7h56')	nd	POSITIVO

Tabella 14 Sensibilità metodi molecolari (nd = non determinato)

I risultati ottenuti con la sospensione batterica di E. coli a concentrazione 10^3 UFC/mL evidenziano la scarsa capacità del sistema Nanosphere® nel rilevare l'agente eziologico nelle prime ore di incubazione, ma solo dopo un incubazione di 18 ore.

Invece, ad esclusione del dato discordante ottenuto dopo 8 ore di incubazione, il sistema FilmArray® appare in grado di rilevare la presenza del battere E. coli entro le prime 7-9 ore di incubazione, molto prima della segnalazione di positività da parte dell'incubatore.

Anche utilizzando una sospensione batterica 10^4 UFC/mL e di 10^5 UFC/mL viene evidenziata la capacità del sistema FilmArray® nel rilevare il patogeno dopo 4 ore di incubazione mentre l'altro metodo molecolare non riesce a eseguire nessun tipo di identificazione batterica entro le prime 6 ore di incubazione.

Infine, abbiamo rilevato la capacità del sistema Nanosphere® nell'identificare l'agente patogeno entro le prime ore di incubazione, cioè entro le prime 5/6 ore di incubazione, utilizzando l'ultima sospensione batterica a concentrazione 10^6 UFC/mL.

La valutazione dei dati raccolti indica come il sistema FilmArray sia in grado di rilevare la più bassa concentrazione batterica considerata entro 7/9 h e, dopo 4 h di incubazione, è in grado di identificare il battere partendo dall'inoculo con concentrazione batterica pari a 10^4 UFC/mL.

Invece, il sistema Nanosphere® identifica il patogeno presente nell'emocoltura con la concentrazione più bassa entro le 18 h e rileva il microrganismo ad una concentrazione di inoculo pari a 10^6 UFC/mL dopo 5 h di incubazione, questo è il tempo minimo di rilevazione individuato per il sistema.

Comunque, con i pochi dati registrati, possiamo segnalare che entrambi i metodi molecolari sono riusciti a fornire l'eventuale identificazione batterica 2-3 ore prima della segnalazione di positività da parte del sistema BD BACTEC™ FX.

DISCUSSIONE

L'importanza di una diagnosi microbiologica di sepsi rapida e attendibile risulta fondamentale per ridurre il rischio di morte in pazienti settici o potenzialmente tali.

La rapidità nel somministrare al paziente una terapia mirata permette di evitare l'instaurazione di pericolose antibiotico-resistenze e ottenere una prognosi di guarigione favorevole evitando gravi complicazioni, inoltre consente una migliore gestione del paziente riducendo i giorni di permanenza in terapia intensiva.

Attualmente l'esame "*gold standard*" nella diagnosi di sepsi è l'emocoltura, un metodo di analisi microbiologico in grado di identificare l'agente eziologico fino a livello di specie e di determinarne la sensibilità agli antibiotici.

La necessità di raggiungere una diagnosi di sepsi in tempi rapidi purtroppo non concilia con il tempo necessario per ottenere l'individuazione e l'identificazione dell'agente eziologico utilizzando l'emocoltura che generalmente necessita dai 4 agli 8 giorni.

Inoltre, uno dei limiti dell'emocoltura è l'insufficiente sensibilità nella ricerca di particolari batteri difficilmente coltivabili.

Un aiuto per ridurre i tempi nella diagnosi di sepsi arriva dalle nuove metodiche in biologia molecolare che hanno il potenziale di superare molte limitazioni della coltura batterica ma non è ancora in grado di soppiantarla completamente.

Le metodiche in biologia molecolare valutate nel laboratorio dell'U.O. Microbiologia e Virologia del Presidio Ospedaliero S. Chiara di Trento sono il Sistema Verigene® (Nanosphere, Inc., USA) e la piattaforma FilmArray® *Blood Culture Id Panel* (Biofire Diagnostics, Inc., Usa) che si basano rispettivamente sul principio dell'ibridazione del genoma e sul principio di amplificazione del genoma batterico e/o fungino.

Queste tecniche innovative vengono affiancate al metodo di laboratorio tradizionale e ricercano l'agente patogeno in aliquote di campioni di emocoltura positivi che contengono, dopo un periodo di incubazione, una concentrazione batterica rilevabile dalle nuove metodiche.

L'affiancamento delle nuove tecniche all'analisi dei campioni di emocoltura comporta alcuni svantaggi intrinseci al metodo tradizionale come il ritardo nella risposta con una

sua possibile alterazione dovuta ad un prelievo non idoneo e all'incapacità di fornire i nutrienti necessari allo sviluppo di microrganismi esigenti.

Comunque, l'utilizzo delle metodiche molecolari ha il grande vantaggio di identificare l'agente patogeno, con le sue caratteristiche di sensibilità agli antibiotici, in pochissime ore dopo la segnalazione di crescita batterica nel campione da parte del sistema a monitoraggio continuo per emocolture.

Il sistema Verigene® della Nanosphere è una strumentazione semplice dal punto di vista operativo, l'unica fase preliminare all'analisi è l'allestimento di un vetrino con colorazione di Gram per classificare il patogeno e quindi utilizzare il kit adatto.

L'identificazione microbica necessita la preparazione della strumentazione, della durata di 5 minuti circa, con l'inserimento dei consumabili dedicati:

- Verigene® *Gram-Positive Blood Culture Test* (BC-GP) (approvato FDA) che identifica 13 *targets* batterici Gram-positivi e 3 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 2 ore e 50 minuti,
- Verigene® *Gram-Negative Blood Culture Test* (BC-GN) (utilizzo permesso solo in ambito di ricerca, non approvato da FDA) identifica 9 *targets* batterici di Gram-negativi e 6 determinanti genetici di antibiotico-resistenza in 1 ora e 50 minuti.

Il sistema Verigene® con i kit *Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test* e *Gram-Negative Blood Culture Nucleic Acid Test*, interpretando i dati raccolti in questo lavoro, possiede una sensibilità nell'identificare i patogeni del 95,3% e una specificità del 95,6% e abbiamo verificato anche la sua capacità di identificare più di un battere nello stesso campione; inoltre la sensibilità e la specificità nel rilevare l'eventuale antibiotico-resistenza è rispettivamente del 71,4% e 100%.

In soli tre test lo strumento non è riuscito a fornire alcun risultato di identificazione microbica, ma questo era dovuto a problemi tecnici e a campioni non idonei.

Il secondo metodo molecolare, ovvero la piattaforma FilmArray® *Blood Culture Id Panel* della Biofire Diagnostics, è in grado di rilevare e identificare 20 *targets* batterici, 5 specie di lieviti e 4 geni determinanti resistenza antibiotica in circa un ora, dopo una preparazione dello strumento e del campione che dura circa 3 minuti.

Questo sistema ha dimostrato, dai dati raccolti, di possedere una sensibilità del 95,2%, una specificità del 93,6% ed è in grado di rilevare più di un agente patogeno nello stesso

campione, inoltre la sensibilità e la specificità sono del 100% nel rilevare i geni determinanti la resistenza antibiotica.

In sole 2 sperimentazioni il sistema non è riuscito a identificare il patogeno, questo perché si sono presentati dei problemi tecnici oppure campioni non idonei.

I dati raccolti per verificare la corrispondenza dei risultati tra il metodo tradizionale e le tecniche molecolari hanno permesso di documentare come entrambi i metodi siano validi ed efficaci nel fornire una rapida diagnosi di sepsi a partire da emocolture positive. Pubblicazioni scientifiche che confrontano assieme il metodo tradizionale con i due metodi molecolari non sono ancora stati presentati, attualmente ci sono solo articoli che confrontano il metodo tradizionale con la piattaforma FilmArray® oppure con il sistema Verigene® ma considerando il solo kit per l'identificazione dei batteri Gram-positivi.

I risultati raccolti in questi articoli evidenziano una sensibilità e specificità comparabile e sempre superiore rispetto all'elaborazione dei dati presenti in questo lavoro, fatta eccezione per la ricerca dell'eventuale antibiotico-resistenza del sistema Verigene®.

Le metodiche molecolari sono state in grado di ridurre drasticamente la tempistica nella diagnosi di sepsi, infatti dalla positività del flacone di emocoltura, queste tecniche riescono a fornire i risultati in poche ore mentre il metodo tradizionale necessita di ancora almeno 3 giorni (Figura 41).

Queste tecniche possono essere utilizzate in ambito clinico e la rapidità nel fornire i risultati d'identificazione fenotipica dei principali agenti eziologici della sepsi con le relative antibiotico-resistenze permetterebbe una tempestiva, mirata ed efficace antibiotico-terapia con la conseguenza diretta di un miglioramento della gestione del paziente settico degente.

Un'adeguata antibiotico-terapia evita la somministrazione di un'iniziale terapia antibiotica empirica ad ampio spettro, l'instaurazione dello sviluppo di ceppi microbici multiresistenti con la conseguente riduzione della spesa associata ad un trattamento antibiotico prolungato del paziente.

Nella seconda parte del lavoro di tesi, utilizzando diverse sospensioni batteriche di un ceppo ATCC di E. coli a concentrazione nota, abbiamo voluto testare i due metodi molecolari per verificare la sensibilità analitica nell'identificazione del battere osservato. Il sistema FilmArray® è in grado, dopo 7 / 9 ore di incubazione, di rilevare e identificare il battere E. coli in un flacone con una concentrazione batterica pari a 10^2 UFC/mL mentre il sistema Verigene® dopo 18 ore.

Inoltre, sempre il sistema FilmArray® evidenzia una miglior capacità nel rilevare E. coli nei flaconi di emocoltura con una concentrazione batterica di 10^3 UFC/mL e 10^4 UFC/mL rispetto all'altro metodo.

Solo a una concentrazione batterica pari a 10^5 UFC/mL il sistema Verigene® riesce a rilevare il battere entro 5 ore di incubazione.

Questi valori fanno intuire come il metodo FilmArray® sia in grado di rilevare e identificare l'agente eziologico, nel nostro caso E. coli, a concentrazioni batteriche inferiori rispetto al Verigene® e quindi possieda una sensibilità analitica maggiore rispetto al secondo metodo molecolare.

Questa caratteristica, probabilmente, è determinata dalla tecnologia su cui si basa il metodo che utilizza la Nested-PCR e quindi una doppia amplificazione del genoma.

Attualmente il sistema Verigene® non utilizza la fase di amplificazione genomica nel kit per la diagnosi di sepsi anche se è in studio una sua introduzione.

Inoltre, è possibile confermare che entrambe le metodiche hanno la capacità di rilevare e identificare il patogeno con anticipo rispetto alla segnalazione di positività da parte dell'incubatore che, dai pochi valori ricavati, il risultato di positività viene anticipato di 2 / 3 ore.

Confrontando i due metodi molecolari, che in quanto a sensibilità e specificità sono abbastanza simili, il sistema Verigene® è in grado di rilevare un maggior numero di geni codificanti per la resistenza agli antibiotici rispetto al sistema FilmArray®.

I vantaggi della piattaforma FilmArray® rispetto all'altro metodo sono un numero maggiore di patogeni identificabili compresi i miceti che non sono compresi nel pannello di identificativi del sistema prodotto dalla Nanosphere, la preparazione all'analisi di un

aliquota di campione senza nessuna classificazione del battere ricercato, una rilevazione e identificazione del microrganismo in minor tempo.

Un altro vantaggio del sistema FilmArray® è la sua capacità di rilevare eventuali geni responsabili dell'antibiotico resistenza senza la necessità di identificare il genere e poi la specie del patogeno come avviene con il metodo Verigene®, questo permette l'identificazione di un maggiore numero di antibiotico-resistenze.

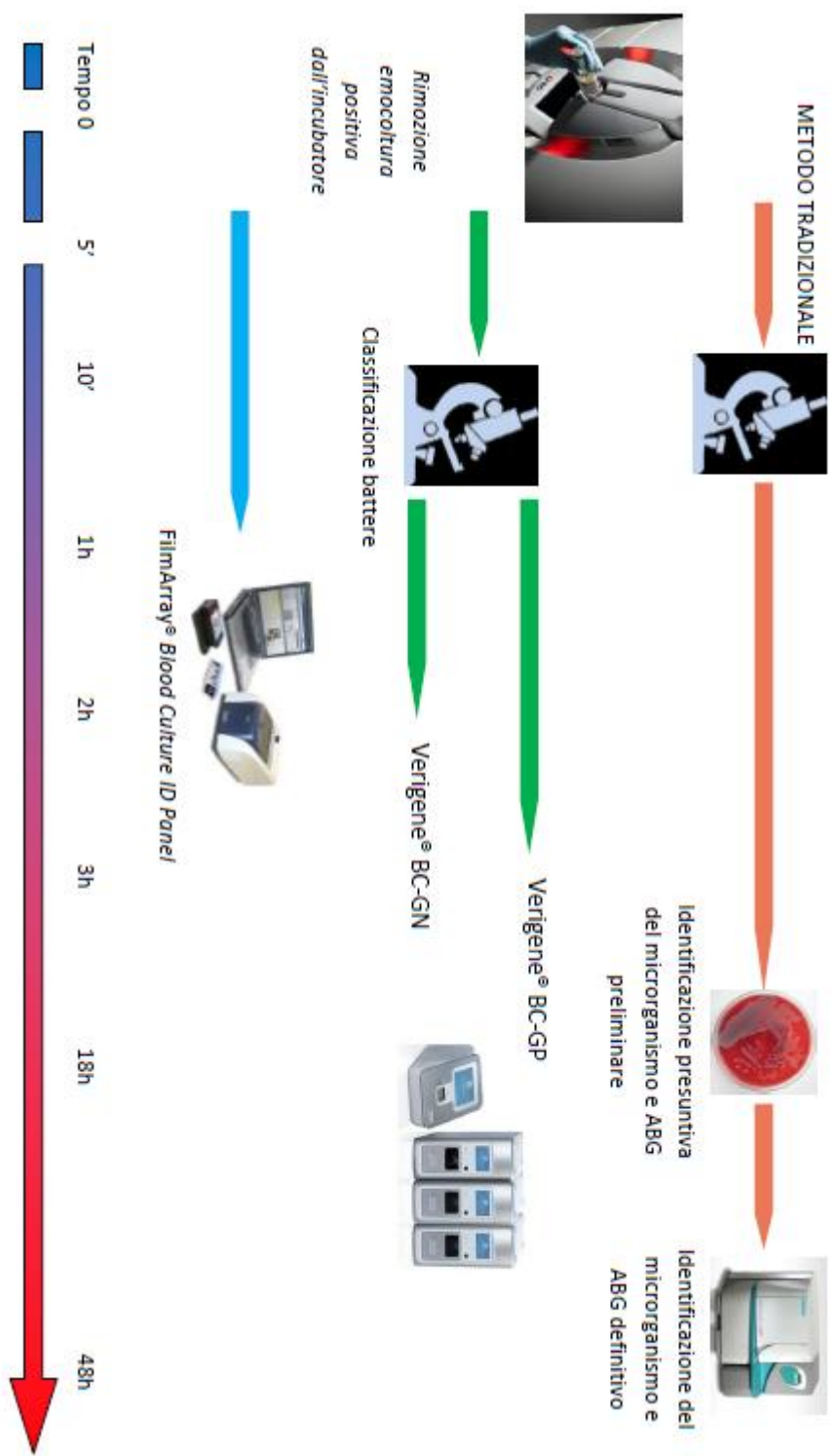


Figura 41 Tempo necessario per la diagnosi di sepsi con i diversi metodi

CONCLUSIONI

Le due tecniche molecolari si sono dimostrate di facile esecuzione, robuste, specifiche, ma soprattutto rapide nel fornire una rilevazione, identificazione di genere e possibilmente di specie dell'agente patogeno assieme ai risultati della ricerca dei geni responsabili della resistenza agli antibiotici.

In questo studio è emerso che entrambi i metodi molecolari sono potenzialmente utili nel fornire una diagnosi di sepsi in tempi più rapidi rispetto al metodo di coltura tradizionale dopo la segnalazione di positività del flacone da parte del sistema a monitoraggio continuo per emocolture.

Inoltre, queste nuove tecniche consentono al clinico di intraprendere precocemente una terapia antibiotica più mirata rispetto a quella a largo spettro e quindi fornire un notevole vantaggio nella gestione dei pazienti settici.

L'opportunità di impostare il prima possibile una terapia mirata ed efficace rende pensabile il contenimento e la riduzione di ceppi microbici multiresistenti ed inoltre permette una drastica diminuzione della spesa sanitaria associata a trattamenti terapeutici inappropriati con conseguenti tempi di degenza prolungati.

Tuttavia questi metodi non sono in grado di identificare tutte le specie batteriche presenti nei flaconi colturali e le eventuali antibiotico-resistenze associate, ma si limitano a riconoscere i microrganismi presenti nel loro pannello di identificativi.

Questi motivi inducono a mantenere e a eseguire in parallelo alle tecniche molecolari anche la metodica colturale tradizionale (identificazione biochimica/sierologica e antibiogramma).

In conclusione, l'emocoltura rimane il metodo di riferimento per la diagnosi di sepsi poiché consente l'isolamento dell'agente eziologico e la valutazione della sensibilità agli antibiotici, ma l'affiancamento con un metodo molecolare permette di aumentare la velocità di identificazione dei microrganismi patogeni e di eventuali antibiotico-resistenze utili al clinico.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S., 2010. Immunologia cellulare e molecolare. Sesta edizione aggiornata. Ed. Elsevier Masson.

Anderson C., Kaul K., Voss B., Thomson R.B., 2012. Evaluation of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Test (BC-GP). Poster, 2012.

Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R., 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med, 29(7): p. 1303-10.

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

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

Baron E.J., Scott J.D., Tompkins L.S., 2005. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis. 41: 1677-80.

Becker K.L, Snider R.H, Nylén E.S., 2007. Procalcitonin assay in systemic inflammation infection, and sepsis: clinical utility and limitations. Crit Care Med 36: 941-952.

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

Birocchi F., Testa M., Pischedda M., Fanos V., 2005. Febbre, batteriemia e sepsi nel lattante. *Acta Medica Mediterranea*, 2005, 21: 37.

Bone RC., 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115:457-469.

Bourbeau P.P., Foltzer M., 2005. Routine Incubation of BacT/ALERT FA and FN Blood Culture Bottles for More than 3 Days May Not Be Necessary. *J. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, May 2005, p. 2506–2509.

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

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

Brunkhorst F.M., Wegsheider K., Forycki Z.F., et al., 2000. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 26: 148-152.

Buchan B.W., Mackey T.A., Jannetto P.J., Ledebor N.A., 2012. Rapid detection of Gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood cultures using the microarray-based sample-to-result Verigene BC-GP assay. 22rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 02 April 2012.

Carrigan S.D., Scott G., Tabrizian M., 2004. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clinical Chemistry* 50:8 1301–1314.

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

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

Cockerill F.R., Wilson J.W., Vetter E.A., Goodman K.M., Torgerson C.A., Harmsen W.S., et al., 2004. Optimal testing parameters for blood cultures. Clin Infect Dis. 2004; 38: 1724-1730.

Collini L., Zeni L., D'Arcangelo S., Rossetti E., Bezzi C., Tomasi L., Lanzafame P., 2013. Confronto di tre metodi molecolari nella diagnosi rapida di sepsi.THE NEED FOR SPEED: IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E LE URGENZE INFETTIVE. 3° CONGRESSO NEWMICRO. Padenghe sul Garda (BS) 20–22 marzo 2013.

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

Daniels R., Nutbeam T., McNamara G., Galvin C., 2011. The sepsis six and the severe sepsis resuscitation bundle: a prospective observational cohort study. Emerg Med J. 28(6): 507-12.

Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M. et al., 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Crit. Care Med 36(1): 296–327.

Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M., Bion J., Parker M.M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D.C., Brun-Buisson C., Beale R., Calandra T., Dhainaut J.F., Gerlach H., Harvey M., Marini J.J., Marshall J. Ranieri M., Ramsay G., Sevransky J., Thompson B.T., Townsend S., Vender J.S., Zimmerman J.L., Vincent J-L, for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee, 2008. Special Article Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008 Reprint 1-33.

Documenti dell'Agenzia Regionale di Sanità della Toscana, 2007. Prevenzione e trattamento delle infezioni correlate al catetere venoso centrale. Documento di consenso Regionale 31 Maggio 2007.

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

Ecker D.J., Sampath R., Li H., Massire C., Matthews H.E., Toleno D., Hall T.A., Blyn L.B., Eshoo M.W., Ranken R., Hofstadler S.A., Tang Y.W., 2010. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn* May;10(4):399-415.

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

Fish D.N., 2002. Optimal antimicrobial therapy for sepsis. *Am J Health Syst Pharm.* Feb 15;59 Suppl 1:S13-9.

Flayhart D., Borek A.P., Wakefield T., Dick J., Carroll K.C., 2007. 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.* 45: 816-821.

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

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

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

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

Herzke C.A., Chen L.F., Anderson D.J., Choi Y., Sexton D.J., Kaye K.S., 2009. Empirical antimicrobial therapy for bloodstream infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: no better than a coin toss. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 30: 1057-1061.

Hotchkiss R.S., Coopersmith C.M., McDunn J.E., Ferguson T.A., 2009. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature Medicine* 15, 496 – 497.

Kibe S., Adams K., Barlow G., 2011. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother*; 66 Suppl 2: ii33–ii40.

Kreger B.E., Craven D.E., McCabe W.R., 1980b. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *American Journal of Medicine* m344-3 55.

Kumar A., Roberts D., Wood K.E., Light B., Parrillo J.E., Sharma S., Suppes R., Feinstein D., Zanotti S., Taiberg L., Gurka D., Kumar A., Cheang M., 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 34(6): p. 1589-96.

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

Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. For the International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med Vol. 31, No. 4: 1250-1256.

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

Luzzani A., Polati E., Dorizzi R., et al., 2003. Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. Crit Care Med 31:1737-41.

Mancini N., Carletti S., Ghidoli N., Cichero P., Burioni R., Clementi M., 2010. The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 2010, p. 235–251.

Marshall J, Cook D, Christnou N, Bernard G, Sprung C, Sibbald W., 1995. Multiple organ dysfunction score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. Crit Care Med 1995;23:1638-52.

Martin G.S., Mannino D.M., Eaton s., Moss M., 2003. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 348:1546-54.

Meisner M., Tschaikowsky K., Palmaers T., et al., 1999. 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). 3: 45-50.

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

Morici P., Campa M., 2011. Diagnosi microbiologica di infezione sistemica: metodi a confronto. UNIVERSITA' DI PISA Facolta di Medicina e Chirurgia Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia. A.A. 2010-2011.

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

Mussi C., 2005. La reazione infiammatoria sistemica e la disfunzione multiorgano in medicina geriatrica. The systemic inflammatory reaction syndrome and the multiple organ dysfunction in geriatric medicine. Centro di Valutazione e Ricerca Gerontologica, Università di Modena e Reggio Emilia. *G GERONTOL* 53:151-166.

Nyström P.O., 1998. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. Department of Surgery, University Hospital, SE-581 85 Linköping, Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, Suppl. A, 1-7.

Ota I., Barker E., Hemmert A., Baarda B., Cham O., Heyrend C., Barrett B., Garrone N., Thatcher S., Crisp R., Lephart P., Silbert S., Kubasek C., Blaschke A., Daly J., Salimnia H., Widen R., Ririe K., 2012. Rapid Automated Multiplex PCR Diagnostics for Blood Pathogens On-Site Testing in Clinical Microbiology Laboratories. 112th General Meeting of the American Society for Microbiology, June 2012.

Paula A.P., Oliveira P.R., Miranda E.P., Felix C.S., Lorigados C.B., Giovani A.M., Lima A.L.L., 2012. The long-term impact of a program to prevent central line-associated bloodstream infections in a surgical intensive care unit. *CLINICS* 67(8): 969-970.

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

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

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

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

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

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

Remick D.G., 2007. Biological Perspectives. Pathophysiology of Sepsis. *The American Journal of Pathology*, Vol. 170, No. 5: 1435-1444.

Riedel S., Carroll K.C., 2010. Blood cultures: key elements for best practices and future directions. *Journal of Infection and Chemotherapy* October 2010, Volume 16, Issue 5, pp 301-316.

Rivers E., Nguyen B., Havstad S., Ressler J., Muzzin A., Knoblich B., Peterson E., Tomlanovich M., 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345(19): p. 1368-77.

Rossetti E., Collini L., D'Arcangelo S., Bezzi C., Lanzafame P., Simione M.B., Viganò F., Cofano S., 2013. Valutazione dei test Verigene® BC-GP e Verigene® BC-GN per l'identificazione molecolare rapida di agenti eziologici di sepsi e dei relativi determinanti genetici di antibiotico-resistenza a partire da flaconi di emocoltura positivi.THE NEED

FOR SPEED: IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E LE URGENZE INFETTIVE. 3° CONGRESSO NEWMICRO. Padenghe sul Garda (BS) 20–22 marzo 2013.

Rossetti E., Collini L., D’Arcangelo S., Bezzi C., Pederzoli L., Madama S., Palumbo M., Bergese E., Lanzafame P., 2013. FilmArray® multiplex PCR: una nuova frontiera nella diagnosi eziologica di sepsi.THE NEED FOR SPEED: IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E LE URGENZE INFETTIVE. 3° CONGRESSO NEWMICRO. Padenghe sul Garda (BS) 20–22 marzo 2013.

Russell J.A., 2006. Management of Sepsis. N Engl J Med 355: 1699-713.

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

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

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

Selberg O., Hecker H., Martin M., et al., 2000. 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. 28: 2793-2798.

Sierra R., Rello J., Bailen M.A., et al., 2004. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. Intensive Care Med 30:2038-45.

Silbert S., Kubasek C., Uy D., Widen R., 2011. Laboratory Evaluation of the Idaho Technology BCID FilmArray. Association for Molecular Pathology, 2011.

Siner J.M., 2009. Sepsis: Definitions, Epidemiology, Etiology and Pathogenesis. The American College of Chest Physicians PCCSU Article 2009.

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

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

Tang Y.W., Kilic A., Yang Q., Li H.J., Miller R.S., McCormac M., Tracy K.D., Stratton C.W., Han J., 2007. StaphPlex System for rapid and simultaneous identification, antibiotic resistance determination and Panton-Valentine leukocidin detection of staphylococci from positive blood cultures. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)& 25th International Congress of Chemotherapy (ICC) 31.03.2007 - 03.04.2007.

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

Tormo N, Medina R, Ocete MR, et al., 2012. Performance of the Nanosphere Verigene BC-GP test for rapid detection of Gram-positive bacteria and resistance determinants directly from positive blood cultures. 22rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 01 April 2012.

Tsalik E.L, Jones D., Nicholson B., Waring L., Liesenfeld O., Park L.P., Glickman S.W., Caram L.B., Langley R.J., van Velkinburgh J.C., Cairns C.B., Rivers E.P., Otero R.M., Kingsmore S.F., Lalani T., Fowler V.G., Woods C.W., 2010. Emergency Department with Sepsis Infections in Patients Admitted from the Multiplex PCR To Diagnose Bloodstream. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2010, p. 26–33.

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

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

Ventetuolo C.E., Levy M.M., 2008. Sepsis: A Clinical Update. Clin J Am Soc Nephrol 3: 571-577.

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

Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G., 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. Jul;22(7):707-10.

Vincent J.L., Ocampos Martinez E., Silva E., 2009. Evolving concepts in sepsis definition. Crit Care Clin 25: 665–675.

Vincent J.L., Sakr Y., Sprung C.L., Ranieri V.M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Le Gall J.R., Payen D., on behalf of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients

Investigators, 2006. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Critical Care Medicine* 34(2): 344-353.

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

Wheeler A.P., Bernard G.R., 1999. Treating Patients with Severe Sepsis. *N Engl J Med* 340:207-214.

Wilson D.A., Joyce M.J., Hall L.S., Reller L.B., Roberts G.D., Hall G.S., Alexander B.D., Procop G.W., 2005. 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.* 43: 2909-2912.

SITOGRAFIA

AdvanDx PNA FISH Technology: <http://www.advandx.com>

Becton Dickinson Italia S.p.A.: www.bd.com

Bruker corporation: <http://www.bruker.com/>

Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS: <http://www.epicentro.iss.it>

FilmArray® Biofire Diagnostics, Inc., USA: <http://www.filmarray.com>

LaRosa S.P.. Sepsis. Cleveland Clinic Disease Management Project: www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/sepsis/

Nanosphere: <http://www.nanosphere.us/product/reader-and-processor-sp>

Roche Molecular Diagnostics: <http://molecular.roche.com>

RINGRAZIAMENTI

Il primo e il più grande ringraziamento va alla ragazza, diventata poi mia moglie nel corso di quest'avventura, che lasciandomi il tempo per studiare, incoraggiandomi ad andare avanti anche quando c'era poco da andare avanti e sacrificando anche il suo tempo, ha dato un aiuto a me e alla nostra famiglia per ben cinque anni.

GRAZIE MARIKA, una bella fetta della laurea è anche tua...e un'altra piccolina di Emilia Maria!!!

Alla dott.ssa Lucia che con la sua dedizione al lavoro e il suo grande entusiasmo mi ha dato l'occasione di concludere i miei studi con una tesi importante.

GRAZIE LUCIA!!!

Un enorme grazie ai miei genitori che mi hanno aiutato ad iniziare questo nuovo percorso di studi. GRAZIE!!!

Un ringraziamento anche ai genitori di Marika che quando serviva mi hanno sempre ospitato prima di un esame. Grazie!!!

Un ricordo per i nonni!

Un ringraziamento alla dott.ssa Barbara Cardazzo che si è resa disponibile come relatrice e mi ha aiutato a laurearmi. Un sincero ringraziamento!!!

Un ringraziamento al dott. Paolo Lanzafame, per il suo aiuto puntuale e tempestivo nel correggere il mio lavoro e per avermi dato l'opportunità di lavorare con la dott.ssa Collini.

Un ringraziamento al dott. Patrizio Caciagli che in due occasioni mi ha dato la possibilità di finire il mio percorso di studi.

Alla futura dottoressa Elisabetta e alla dott.ssa Silvia, un ringraziamento per l'enorme aiuto nella realizzazione del mio lavoro e per avermi insegnato il funzionamento dei diversi sistemi di analisi utilizzati. GRAZIE!!!

Un ringraziamento a Sandra che è sempre stata convinta che prima o poi sarei arrivato alla laurea, incoraggiandomi ad andare avanti! Un ricordo anche per Marco.

Un ringraziamento ai miei colleghi Elisabetta e Mauro per avermi lasciato la libertà, lavoro permettendo, di prendere il tempo necessario per concludere la mia tesi.

Un ringraziamento ai colleghi della microbiologia che mi hanno aiutato nella ricerca delle emocolture positive.

Grazie a Emanuela, Chiara, Francesca, Floriana, Laura e Giorgia per le lezioni, appunti, consigli d'esame e tanto altro vissuto in questi anni di BAL. Grazie!!

Un pensiero va agli ex-colleghi del laboratorio Concast Trentingrana che mi hanno sempre permesso la frequenza minima obbligatoria alle lezioni e agli esami, in particolare un ringraziamento alla dott.ssa Paola Trentin e Michele ma anche a Graziano, Walter, Fernando, Alessandra, Viviana e Crisitna.

Un ringraziamento agli ex-colleghi della Trentinalatte che mi hanno dato l'opportunità di una nuova e diversa esperienza professionale.

Un ringraziamento a tutte quelle persone che mi hanno aiutato in questo percorso, un pensiero anche a chi mi ha dato l'opportunità di terminare gli studi senza però raggiungere l'obiettivo.