



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO

Direttore: Prof. Eugenio Baraldi

TESI DI LAUREA

ACCURATEZZA DIAGNOSTICA DI UN NUOVO TEST BASATO SULLA

COMBINAZIONE DI PROTEINE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

DELL'OSPITE (MeMED BV) PER DISTINGUERE LE INFEZIONI

BATTERICHE DA QUELLE VIRALI NEI BAMBINI FEBBRILI:

REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

Relatrice: Prof.ssa Silvia Bressan

Correlatori: Dott.ssa Giulia Brigadoi

Dott. Davide Visentin

Laureanda: Chiara Oteri

Anno Accademico 2023-2024

Sommario

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Febbre	5
1.1.1 Fisiopatologia.....	5
1.1.2 Tecniche di misurazione.....	6
1.1.3 Eziologia	7
1.2 Valutazione e gestione dei bambini febbrili	8
1.2.1 Febbre nei bambini di età superiore ai 3 mesi.....	11
1.2.2 Percorso Diagnostico	12
1.2.2.1 Anamnesi	13
1.2.2.2 Esame obiettivo.....	13
1.2.2.3 Indagini di primo livello	18
1.2.2.4 Indagini di secondo livello	20
1.2.2.5 Indagini di terzo livello	21
1.2.3 Trattamento	21
1.2.3.1 Antibiotico resistenza.....	22
1.2.4 MeMed BV®	23
2. SCOPO DELLO STUDIO	27
3. MATERIALI E METODI.....	28
3.1 Disegno di studio	28
3.2 Strategia di ricerca	29
3.3 Criteri di inclusione	30
3.4 Criteri di esclusione.....	30
3.5 PICO.....	31
3.5.1 P. Population - Popolazione studiata	31
3.5.2 I. Intervention – Intervento	31
3.5.3 C. Comparison/Control – Confronto/Controllo	32
3.5.4 O. Outcome – Esito	32
3.6 Setting.....	32
3.7 Periodo.....	33
3.8 Selezione degli studi e gestione dei dati.....	33

3.9	Valutazione del rischio di bias degli studi inclusi	35
3.10	Analisi statistica	36
4.	RISULTATI.....	37
4.1	Caratteristiche degli studi inclusi	39
4.1.1	Studi di accuratezza diagnostica	53
4.1.1.1	Studi su popolazione originale	53
4.1.1.2	Studi su sottopopolazioni di coorti originali.....	56
4.1.2	Studi relativi al cambiamento nella prescrizione di antibiotici	57
4.1.3	Valutazione della qualità degli studi	57
5.	DISCUSSIONE.....	60
6.	CONCLUSIONI	65
	BIBLIOGRAFIA	66
	APPENDICE 1.....	71
	APPENDICE 2.....	77
	APPENDICE 3.....	79
	APPENDICE 4.....	82

RIASSUNTO

Presupposti dello studio: La febbre rappresenta uno dei segni e sintomi più comuni nella popolazione pediatrica. La discriminazione tra infezione batterica ed infezione virale può essere difficile e spesso porta a prescrizione inappropriata di antibiotici. Gli esami laboratoristici e microbiologici tradizionali presentano numerosi limiti e possono non essere sufficienti a definire una eziologia. MeMed BV[®] è un nuovo strumento, che misura il dosaggio ematico di tre proteine di risposta immunitaria dell'ospite (il ligando che induce l'apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale, la proteina-10 indotta dall'interferone gamma e la proteina C reattiva) e restituisce un valore tra 0 e 100, con valori inferiori a 35 più indicativi di infezione virale e valori superiori a 65 di infezione batterica. Questo nuovo test ha il potenziale di essere un utile strumento nella pratica clinica per discriminare tra infezione batterica e virale nei bambini febbrili.

Scopo dello studio: Valutare l'accuratezza diagnostica del test di screening ematico MeMed BV[®] nella distinzione tra infezioni batteriche e virali nei pazienti febbrili di età inferiore ai 18 anni e l'impatto clinico del test sulla prescrizione di antibiotici.

Materiali e metodi: È stata condotta una revisione sistematica della letteratura con metanalisi secondo le linee guida PRISMA su cinque database bibliografici (Scopus, MEDLINE, Embase, Cochrane Library e CINAHL), senza restrizioni di lingua e con limite di data al 31.12.2023. Sono stati inclusi studi di accuratezza diagnostica, studi randomizzati controllati e studi osservazionali, mentre sono state escluse revisioni sistematiche, casi clinici e serie di casi. La selezione degli studi è stata effettuata tramite il software Covidence da due revisori indipendenti con terzo revisore preposto a risolvere i conflitti. La valutazione del rischio di bias è stata eseguita con strumenti specifici in base al tipo di studio (RoB2 per gli studi randomizzati controllati, QUADAS-2 per gli studi di accuratezza diagnostica e NIH per gli studi osservazionali). Le caratteristiche dei singoli studi sono state estratte e sintetizzate in tabelle e, data la possibilità di confronto tra diversi studi, è stata eseguita una metanalisi. Il protocollo è stato registrato su PROSPERO in data 05.02.2024 con il numero CRD42024506430.

Risultati: Dai cinque database bibliografici sono stati ottenuti 389 articoli. Dopo la rimozione dei duplicati e lo screening per titolo ed abstract, sono stati identificati 66 articoli per la valutazione del testo completo. Di questi, 50 sono stati esclusi. Nell'analisi finale sono stati inclusi 16, 13 osservazionali prospettici e 3 retrospettivi. 10 studi valutavano l'accuratezza diagnostica dello strumento su una coorte di pazienti originale, 4 studi su coorti di pazienti ottenute dalle coorti originali, 2 studi valutavano il cambiamento nella prescrizione di antibiotici. I dati estratti hanno mostrato una diversa performance di MeMed BV[®] a seconda dei criteri di inclusione ed esclusione e del diverso contesto assistenziale dei vari studi. Dove riportato, l'area sotto la curva ROC dei singoli studi presentava sempre valori compresi tra 0.8 e 1.0. Di 8 studi è stato possibile effettuare la metanalisi che ha evidenziato valori di stima combinata di sensibilità e specificità rispettivamente di 0.87 (95% CI 0.79-0.93) e di 0.90 (95% CI 0.84-0.94), rispetto ad un gold standard diagnostico costituito dal consensus raggiunto dalla valutazione di un gruppo di esperti. Due studi hanno valutato l'efficacia dello strumento MeMed BV[®] nel ridurre la prescrizione di antibiotici, dimostrando di aver influenzato positivamente le decisioni terapeutiche, modificando la decisione del medico, rispettivamente nel 21,4% e nel 12% dei casi.

Tutti gli studi di accuratezza diagnostica hanno mostrato un basso rischio di bias relativo allo standard di riferimento e ai criteri di applicabilità, mentre la selezione dei pazienti è risultata non chiara per 9 studi. Inoltre, un alto rischio di bias risulta legato alla restrizione delle analisi di accuratezza del test ai soggetti con diagnosi certa allo standard di riferimento, e non all'intera popolazione oggetto di studio.

Conclusioni: la nostra revisione ha confermato l'elevata accuratezza diagnostica dello strumento MeMed BV[®] nel discriminare tra eziologia batterica o virale nei bambini febbrili. Nonostante le limitazioni degli studi inclusi, i dati raccolti suggeriscono un potenziale impiego di MeMed BV[®] nella pratica clinica, anche al fine di ridurre la prescrizione inappropriata di antibiotici. L'implementazione dovrebbe essere guidata da un'analisi critica del contesto clinico e delle caratteristiche del paziente, ma sono necessarie ulteriori ricerche e studi per valutare l'accuratezza diagnostica dello strumento anche in pazienti con caratteristiche differenti, quali ad esempio gli immunocompromessi.

ABSTRACT

Background: Fever is a common sign and symptom in paediatrics. Differentiating between bacterial and viral infections can be challenging and can lead to inappropriate use of antibiotics. Traditional microbiological tests and biomarkers have their limitations and may not be adequate in determining the cause of the infection. However, the MeMed BV® test, which measures the levels of three different immune proteins (TNF-related apoptosis-inducing ligand, interferon gamma induced protein-10, and C-reactive protein), provides a risk score that can help to identify the underlying cause of infection. This can lead to more targeted management of paediatric febrile conditions.

Objectives: Evaluate the diagnostic accuracy of MeMed BV® blood screening test in identifying bacterial and viral infections in febrile patients under 18 years old, as well as its potential in minimising the prescription of antibiotics.

Materials and Methods: A systematic review of existing literature and meta-analysis was conducted in accordance with PRISMA guidelines across five different databases (Scopus, MEDLINE, Embase, Cochrane Library, and CINAHL) until December 31, 2023 and included studies of diagnostic accuracy, randomized controlled trials, and observational studies, excluding systematic reviews, clinical cases, and case series. Study selection used Covidence software with two independent reviewers and a third resolving discrepancies. The risk of bias was assessed based on specific tools according to the type of study (RoB2 for randomized controlled trials, QUADAS-2 for diagnostic accuracy studies, and NIH for observational studies). Individual study characteristics were extracted and synthesized in tables, with meta-analysis performed for comparability between studies. The protocol was registered on PROSPERO on February 5, 2024, with the registration number CRD42024506430.

Meta-analysis was performed when there were two or more studies with comparable features that could be analysed together.

Results: 389 articles were sourced from five bibliographic databases. Following the removal of duplicates and screening of article titles and abstracts, 66 relevant articles were identified for full-text examination. Of these, 50 were excluded. The

final analysis included 16 studies (13 prospective observational and 3 retrospective). Ten studies evaluated the diagnostic accuracy of the tool on an original patient cohort, 4 studies on cohorts derived from the original cohorts, and 2 studies assessed changes in antibiotic prescription. The results indicate that the performance of MeMed BV[®] varied based on the inclusion, exclusion, and different healthcare contexts. Where present, the area under the curve showed elevated values between 0.8 and 1.0. A meta-analysis of 8 studies demonstrated pooled sensitivity and specificity values of 0.87 (95% CI 0.79-0.93) and 0.90 (95% CI 0.84-0.94), respectively, comparing test results with expert evaluations. Two studies confirmed MeMed BV[®]'s effectiveness in reducing antibiotic prescriptions, positively influencing therapeutic decisions, changing the physician's decision in 21.4% and 12% of cases, respectively.

All diagnostic accuracy studies showed a low risk of bias related to the reference standard and applicability criteria, while patient selection remained unclear in 9 studies. Additionally, a high risk of bias was associated with restricting the test's accuracy analyses to subjects with a definite diagnosis based on the reference standard, not the entire study population.

Conclusions: Our review reported a high diagnostic accuracy of MeMed BV[®] in differentiating between bacterial and viral infections.

While the studies included in the review had some limitations, the overall evidence suggests that the test could be useful in clinical practice, potentially reducing costs associated with unnecessary testing and antibiotic treatment.

Implementation should be guided by a critical analysis of the clinical context and patient characteristics, but further research is needed to evaluate the diagnostic accuracy of the tool in patients with different characteristics, such as immunocompromised individuals.

1. INTRODUZIONE

1.1 Febbre

La febbre è un segno clinico riconosciuto da secoli come manifestazione di malattia e rappresenta una risposta adattativa ubiquitaria caratterizzata da un anormale innalzamento della temperatura corporea. Solitamente si inquadra nella risposta di difesa dell'organismo contro microrganismi, mezzi protesici o di sintesi, che l'ospite riconosce come patogeni o estranei¹.

La febbre è uno dei segni e sintomi più comunemente riscontrati in pediatria e risulta uno tra i più frequenti motivi di valutazione medica, sia presso l'ambulatorio del pediatra di libera scelta che in Pronto Soccorso Pediatrico^{3,5,6,7}. Un'adeguata valutazione clinica, ed eventualmente, laboratoristica, del bambino febbrile rappresenta, pertanto, una sfida fondamentale per il Pediatra³. Anche i pazienti con storia di febbre a domicilio ed apiressia alla valutazione, non sono da sottovalutare, in quanto la probabilità di una infezione batterica severa non è trascurabile².

1.1.1 Fisiopatologia

La temperatura corporea è determinata dall'equilibrio che si instaura tra la produzione di calore, principalmente da parte di fegato e muscoli, e la dispersione termica periferica. Normalmente il centro termoregolatore ipotalamico mantiene la temperatura corporea intorno a 37°C con una normale variazione diurna ed un picco nel tardo pomeriggio^{3,4}. La febbre si definisce quando il punto di regolazione ipotalamico si innalza oltre i 38°C, con conseguente vasocostrizione periferica e richiamo del sangue dalla periferia, in modo da ridurre le perdite di calore.

L'aumento della temperatura corporea è determinato da processi fisiopatologici mediati da citochine, proteine di fase acuta, interferenti endocrini ed immunologici. Questo complesso processo si compone di un'interazione coordinata che coinvolge risposte autonome, neuroendocrine e comportamentali, in risposta a patologie infettive e non infettive.

L'elevazione della temperatura corporea avviene in seguito ad un aumento dei livelli di prostaglandina E2 (PGE2) circolanti. In particolare, la PGE2 agisce

legandosi a specifici recettori cellulari (EP1-EP4) situati a livello cerebrale, nel nucleo ipotalamico anteriore, che rappresenta la sede principale di regolazione della temperatura corporea. Questa interazione recettoriale innalza il punto di equilibrio del termostato ipotalamico, comportando una modifica del set point su cui vengono adeguati produzione e perdita di calore^{1,3}.

Si definisce il ruolo di alcune citochine, denominate pirogeni endogeni, come l'interleuchina 1-beta (IL-1 β), l'interleuchina 6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α). Questi mediatori intercellulari sono protagonisti di molti dei processi metabolici, endocrinologici e immunologici che si verificano durante la febbre. Essi sono infatti coinvolti nella vasodilatazione, nell'incremento della proteolisi e della glicogenolisi epatica e muscolare, nella produzione dei fattori attivanti le piastrine, nella sintesi delle proteine di fase acuta, nell'attivazione della mielopoiesi, nell'attivazione dei linfociti T, nell'incrementata sintesi di IL-2 e nella proliferazione dei linfociti B¹⁸.

1.1.2 Tecniche di misurazione

La migliore tecnica per misurare la temperatura corporea dovrebbe riflettere accuratamente la *body core-temperature* ed essere poco costosa, facile, veloce e sicura e non dovrebbe essere invasiva o provocare disagio al paziente¹⁹.

Tuttavia, l'accuratezza della misurazione tramite metodi non invasivi è molto variabile: spesso vengono sovrastimate le basse temperature e sottostimate le alte. Le misurazioni orali e ascellari sono in genere inferiori di circa 0.6 e 1.1°C rispetto a quelle rettali, che rappresentano la metodica migliore di stima della temperatura centrale³. La misurazione timpanica a infrarossi ha invece dimostrato di non essere una tecnica sufficientemente sensibile¹. Nonostante questo, le linee guida italiane, in linea con quelle inglesi NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*), raccomandano una misurazione della temperatura corporea in sede ascellare piuttosto che rettale, in quanto quest'ultima viene reputata fisicamente e psicologicamente invasiva, sebbene più accurata³⁰.

La presentazione clinica dei bambini con infezione in atto è diversa a seconda di numerosi fattori. Ad esempio, i neonati possono presentarsi ipotermici o normo-

termici anche in corso presenza di infezione severa. Nei bambini più grandi, invece, si possono osservare manifestazioni febbrili estreme, con puntate febbrili oltre i 40 °C in risposta ad un'infezione di origine batterica o virale⁴. Non è infatti strettamente correlabile il raggiungimento di picchi febbrili molto elevati e la natura batterica dell'infezione. Ciò determina che il valore di temperatura corporea rilevato non è da solo sufficiente per distinguere in modo affidabile l'eziopatogenesi sottostante la febbre, come infezioni benigne o severe, patologia oncologica o ematologica, malattie autoimmuni o reazione a farmaci⁴.

1.1.3 Eziologia

Moltissime patologie possono causare febbre, ma in età pediatrica prevale principalmente una origine infettiva, seguita da malattie reumatologiche-autoimmuni e neoplasie^{4,31}.

La maggior parte delle manifestazioni febbrili nel bambino può essere classificata come segue:

- I. Febbre di breve durata accompagnata da segni e sintomi localizzati, la cui causa sottostante è solitamente diagnosticata sulla base di storia clinica ed esame obiettivo del paziente⁴;
- II. Febbre senza segni di localizzazione, comune nei bambini di età inferiore ai 3 anni, in cui l'eziopatogenesi sottostante non può essere determinata solamente da anamnesi ed esame obiettivo⁴;
- III. Febbre di origine sconosciuta (FUO), che persiste per più di 14 giorni senza una causa identificabile, nonostante una valutazione clinica di una settimana tramite anamnesi, esame obiettivo e test di laboratorio di routine⁴.

Le principali infezioni riscontrate alla valutazione medica del paziente pediatrico febbrile sono rappresentate da influenza, infezioni del tratto respiratorio superiore e inferiore, infezioni del tratto genito-urinario, infezioni del tratto gastrointestinale e infezioni del sistema nervoso centrale (meningite, encefalite), ma anche infezioni osteoarticolari e della cute.

Nel contesto delle infezioni di origine batterica, si distinguono le infezioni batteriche severe e invasive. Queste condizioni rappresentano categorie specifiche

che variano in termini di gravità e coinvolgimento di differenti sedi dell'organismo. Le principali categorie di infezione batterica severa includono:

- Batteriemia: la presenza di patogeni nel sangue, che può verificarsi ad esempio per la presenza di cateteri venosi a permanenza infetti.
- Sepsì: sindrome clinica caratterizzata dalla presenza di disfunzioni potenzialmente fatali che coinvolgono uno o più organi, dovuta ad una risposta disregolata dell'organismo.
- Meningite: infiammazione delle leptomeningi, causata da batteri che raggiungono il sistema nervoso centrale per contiguità o tramite via ematica.
- Infezioni delle vie urinarie (IVU): coinvolgono il tratto genito-urinario e possono essere causate per traslocazione batterica retrograda fino al coinvolgimento dei reni.
- Polmonite: infiammazione dei polmoni causata da batteri, spesso caratterizzata da febbre, tosse e difficoltà respiratoria.
- Osteomielite e artrite settica: infezioni che coinvolgono rispettivamente ossa e articolazioni, spesso causate da una diffusione dei batteri tramite il flusso sanguigno o dalla presenza di lesioni tissutali.

Le infezioni batteriche invasive rappresentano un sottogruppo all'interno delle infezioni batteriche severe e includono batteriemia, sepsì e meningite. Tutte le infezioni batteriche invasive sono pertanto infezioni batteriche severe, ma non tutte le infezioni batteriche severe sono necessariamente infezioni batteriche invasive. L'invasività si riferisce infatti alla modalità con cui i batteri penetrano e diffondono nell'organismo.

1.2 Valutazione e gestione dei bambini febbrili

L'importanza clinica della febbre risiede principalmente nel segno di malattia¹. Mentre in alcuni-casi, come per le infezioni urinarie, l'eziologia è prevalentemente batterica, in altre condizioni può risultare difficile discriminare tra batterica o virale dell'infezione tramite la sola valutazione clinica, come per le infezioni delle vie respiratorie^{8,9}.

Una anamnesi completa ed un esame obiettivo accurato rappresentano gli elementi fondamentali per discriminare la causa eziologica della malattia febbrile. L'età del bambino, in particolare nei pazienti neonati o lattanti, deve essere valutata attentamente poiché definire la severità della patologia sottostante alla manifestazione febbrile. Infatti, il tasso di infezione batterica severa nei bambini molto piccoli è maggiore rispetto alle altre fasce d'età. I bambini di età inferiore a 24 mesi hanno un rischio elevato di sviluppare infezioni da *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* gruppo B, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*³.

Nella maggioranza dei casi, la febbre è dovuta a infezioni virali autolimitanti e solamente in una percentuale minore, può essere causata da infezioni batteriche severe^{3,5,6}. Tuttavia, la presentazione clinica può essere molto simile.

In letteratura è pertanto proposto un approccio sistematico (Figura 1) per la gestione dei bambini con malattia febbrile acuta (< 5 giorni), formulato utilizzando i seguenti dati clinici e informazioni chiave: età del paziente, condizioni generali, presenza o assenza di sintomi e segni di allarme (*life threatening*), eventuale deficit del sistema immunitario, stato vaccinale, eventuali viaggi recenti in paesi endemici, possibili contatti con animali vettori e presenza o assenza di segni di localizzazione all'esame obiettivo³.

In caso di somministrazione di antipiretici, è importante ricordare che l'entità di riduzione della temperatura corporea non rappresenta un indice di severità della patologia sottostante o un criterio di discriminazione eziologico^{3,4}. La presenza di brividi intensi e scuotenti, invece, pur non rappresentando un sintomo specifico di patologia, suggerisce una possibile batteriemia come causa della febbre²⁰.

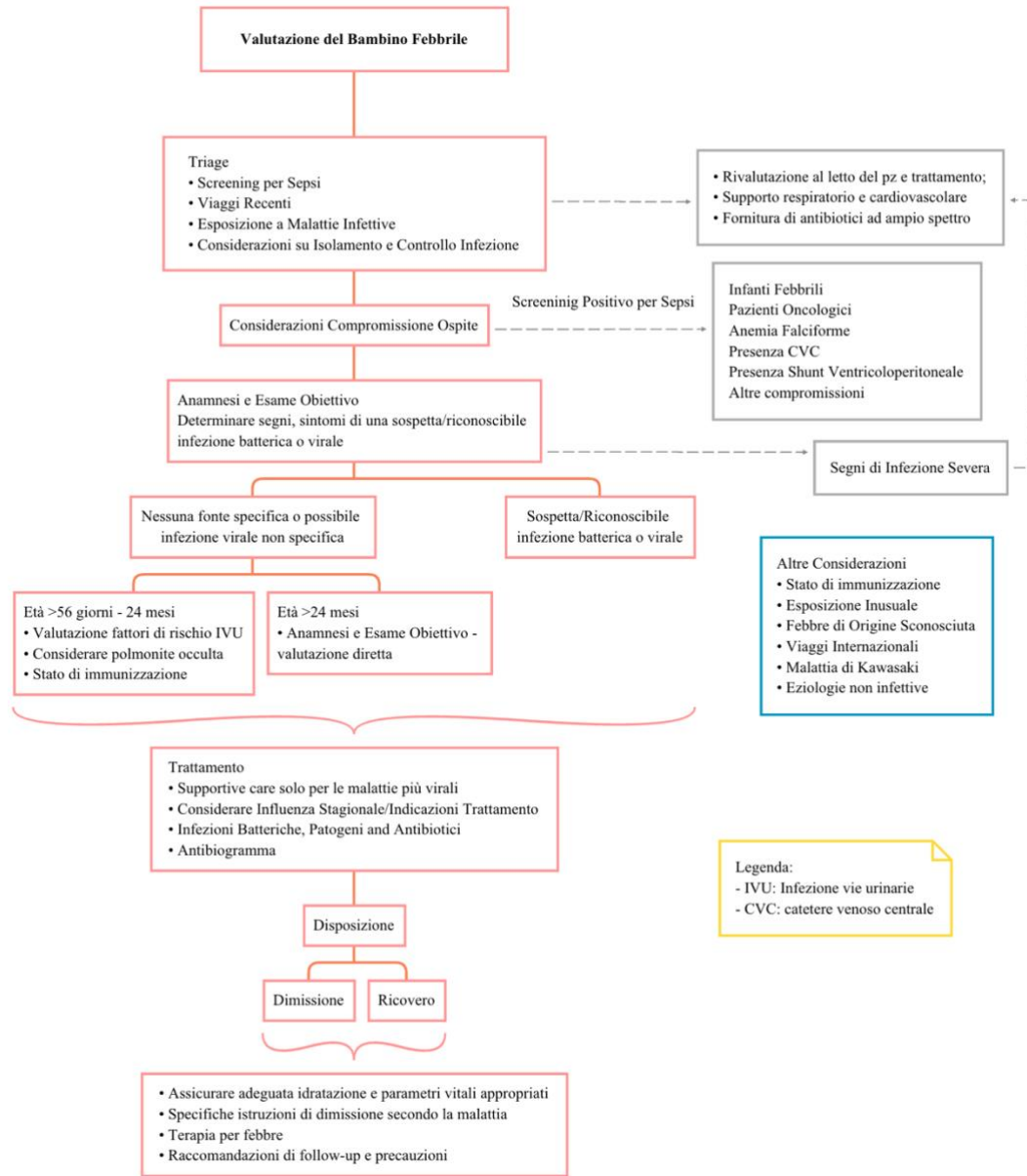


Figura 1. Algoritmo per la valutazione e il trattamento del bambino febbrile³;

1.2.1 Febbre nei bambini di età superiore ai 3 mesi

Il 55-60% dei bambini febbrili che si presentano per valutazione medica dal proprio Pediatra Curante o in Pronto Soccorso riceve una diagnosi di infezione batterica o virale¹¹. Un problema comune è rappresentato dalla valutazione dei pazienti che manifestano febbre, ma senza segni di localizzazione. Sebbene la maggior parte di questi bambini abbia infezioni virali e risoluzione spontanea, una piccola percentuale di casi avrà, in realtà, una infezione di origine batterica potenzialmente *life-threatening*⁴.

L'eventualità di una infezione batterica severa o invasiva deve essere sempre considerata nei bambini con febbre superiore a 39 °C e assenza di segni di localizzazione, soprattutto per i soggetti con età minore di 6 mesi o ciclo vaccinale incompleto per *Haemophilus influenzae* di tipo B o pneumococco^{4,10,11}.

Sebbene i bambini con infezione batterica possano presentare condizioni generali più compromesse rispetto ai bambini con infezione virale, è spesso difficile discriminare attraverso la sola clinica l'eziologia alla base del quadro infettivo. Gli esami di laboratorio possono aiutare nella diagnosi differenziale nei casi di batteriemia occulta:

- febbre superiore a 39,5°C;
- conta dei globuli bianchi superiore a 15.000/mm³;
- aumento della conta assoluta dei neutrofili;
- aumento della frazione di neutrofili immaturi;
- aumento della velocità di eritrosedimentazione (VES) o della proteina C-reattiva (PCR)⁴.

L'identificazione dell'eziologia, indispensabile per la prescrizione di una corretta terapia antibiotica nei bambini con febbre senza segni di localizzazione, può avvenire attraverso la coltura di campioni microbiologici.

La maggior parte dei bambini valutati per febbre di origine sconosciuta (Figura 2) spesso presenta infezioni virali consecutive o infezioni virali comuni protratte. È tuttavia fondamentale differenziare la febbre persistente dalle febbri ricorrenti o periodiche, che sottendono altre cause eziologiche e prevedono un trattamento

completamente differente⁴. Indipendentemente dalla causa sottostante è pertanto consigliato un attento follow-up di almeno 72 ore⁴.

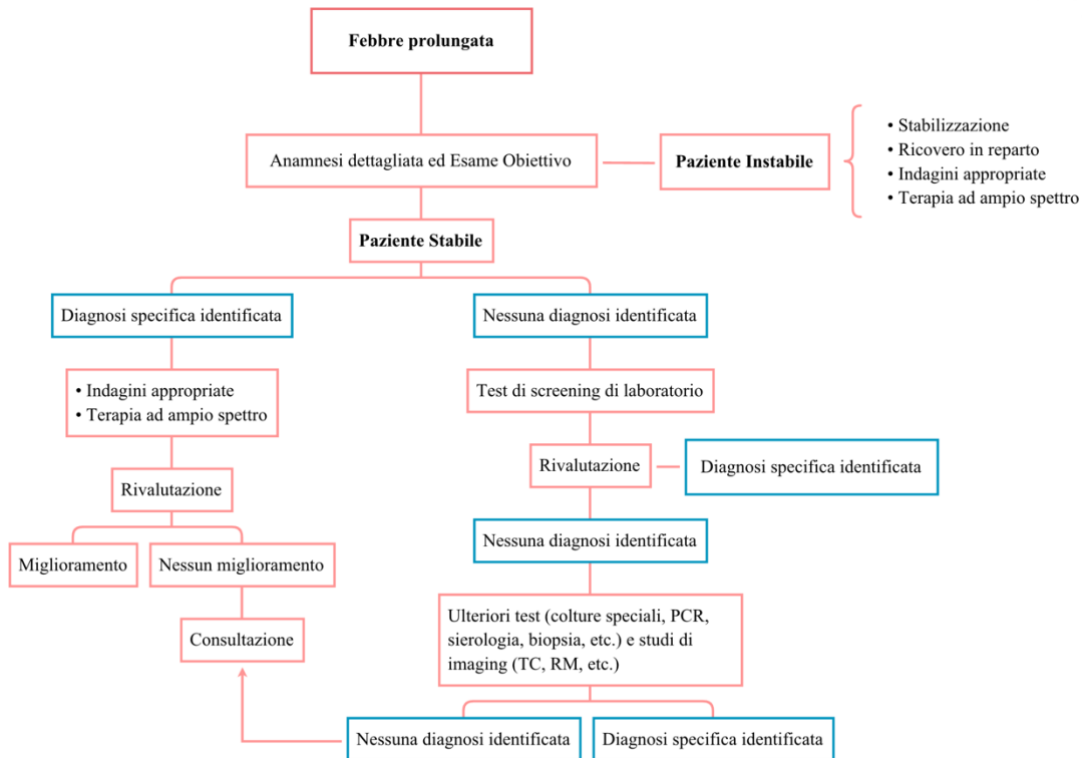


Figura 2. Approccio alla valutazione della febbre di origine sconosciuta nei bambini. I test di laboratorio di screening includono emocromo completo e formule leucocitaria, VES (velocità di eritrosedimentazione), PCR (proteina C reattiva), pannello metabolico di base, livelli di transaminasi epatiche, analisi delle urine e colture di urina e sangue. La radiografia toracica deve essere inclusa per i pazienti con sintomi polmonari⁴. TC: tomografia computerizzata; RM: risonanza magnetica.

1.2.2 Percorso Diagnostico

Nella valutazione iniziale del bambino febbrile è fondamentale identificare eventuali segni o sintomi di localizzazione, per aiutare a discriminare le possibili cause sottostanti. I segni clinici iniziali possono tuttavia variare nel tempo o manifestarsi tardivamente rispetto alla febbre, ritardando il trattamento di malattie potenzialmente severe. Per tale motivo sono indispensabili una accurata anamnesi ed un attento esame obiettivo e, solo successivamente, eventuali indagini strumentali e di laboratorio⁵.

1.2.2.1 Anamnesi

Di primaria importanza risulta un'anamnesi volta a valutare approfonditamente i sintomi riportati da paziente e *caregiver*, l'entità del rialzo termico, la durata della sintomatologia ed il metodo utilizzato per misurare la temperatura corporea. Successivamente sarà necessario ricostruire anche l'andamento della curva termica. Dovranno inoltre essere indagati eventuali contatti con soggetti che presentano sintomatologia analoga. Alcune infezioni sono più comuni in determinate aree geografiche, sarà quindi necessario raccogliere una storia dettagliata su eventuali viaggi in paesi endemici. È altrettanto importante indagare sempre lo stato di immunizzazione del bambino per determinare una potenziale suscettibilità a malattie prevenibili da vaccinazione. È fondamentale, infine, una valutazione attenta alle eventuali patologie di base, condizioni predisponenti e trattamenti antibiotici recenti²⁰.

Identificare eventuali sedi di localizzazione può restringere il pannello di possibili diagnosi differenziali. Il dolore è un altro parametro importante da valutare e trattare sempre, che può aiutare nel discriminare tra le possibili cause della febbre. La presenza di brividi intensi e scuotenti, invece, pur non rappresentando un sintomo specifico di patologia, suggerisce che la febbre sia dovuta ad una possibile batteriemia²⁰.

1.2.2.2 Esame obiettivo

La valutazione tramite esame obiettivo è una parte fondamentale del processo diagnostico e deve inizialmente focalizzarsi sulla clinica del bambino per identificare una eventuale compromissione delle condizioni generali. In secondo luogo, è importante per ricercare una localizzazione di patologia e per indirizzare le decisioni cliniche successive²¹.

Elementi importanti a cui prestare attenzione sono lo stato di vigilanza, il pianto, la vocalizzazione, la consolabilità, la motricità spontanea, il gioco, la dinamica respiratoria, il colorito, la presenza di mucose umide, lacrime o altri segni di disidratazione⁴.

L'esame obiettivo si completa successivamente con una accurata analisi sistematica di tutti gli apparati e distretti corporei, tramite osservazione, palpazione, percussione e auscultazione. Particolare attenzione va posta sulla rilevazione di frequenza cardiaca e respiratoria che variano con età e temperatura corporea. Lo sforzo deve essere volto a identificare segni di localizzazione che possano aiutare a stabilire l'eziologia sottostante al quadro febbrile.

Per aiutare il clinico nel discriminare il grado di severità della patologia, nel 2007 il *Guideline Development Group* (GDG) ha sviluppato un sistema basato sull'evidenza, in modo da evidenziare graficamente i principali sintomi e segni di malattia (Tabella 1)^{21,22}. È importante puntualizzare però che non si tratta uno strumento per definire una diagnosi chiara e specifica, ma utile a identificare quali bambini necessitano di ulteriori indagini e valutazioni^{21,22}.

Il vantaggio di questo sistema, che si basa principalmente sulla misurazione dei parametri vitali e sull'osservazione del bambino, consiste nella capacità di stratificare il rischio ed escludere, o viceversa sospettare, patologie severe come batteriemia, infezione delle vie urinarie, localizzazioni settico-piemiche (artrite settica, meningite, polmonite, osteomielite), encefalite erpetica e malattia di Kawasaki, che necessitano di un pronto intervento terapeutico. Patologie diverse avranno infatti sintomi e segni caratteristici che possono aiutare a condurre il processo diagnostico nell'identificare una causa specifica (Tabella 2)³⁰.

**VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI MALATTIA SEVERA NEL BAMBINO
FEBBRILE CON ETÀ < 5 ANNI**

	Basso Rischio	Rischio Intermedio	Alto Rischio
Colore	<ul style="list-style-type: none"> • Colore normale della pelle, labbra e lingua 	<ul style="list-style-type: none"> • Pallore riferito dai genitori o da coloro che si prendono cura del bambino 	<ul style="list-style-type: none"> • Pallido, marezzato, cinereo o cianotico
Attività	<ul style="list-style-type: none"> • Risponde normalmente agli stimoli • È contento o sorride • Resta sveglio o si sveglia rapidamente • Non piange o piange normalmente 	<ul style="list-style-type: none"> • Non risponde normalmente agli stimoli • Si sveglia solo dopo stimolazioni prolungate • Attività diminuita • Non sorride 	<ul style="list-style-type: none"> • Non risponde a stimoli • Appare malato ai professionisti sanitari • Non risvegliabile o non riesce a restare vigile se svegliato • Pianto debole, di alta intensità o continuo
Respirazione	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Alitamento delle pinne nasali • Tachipnea: frequenza respiratoria > 50 atti/min (6-12 mesi) o > 40 atti/min (> 12 mesi) • Saturazione O₂ ≤ 95% • Crepitii all'auscultazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Grugnito • Tachipnea: frequenza respiratoria > 60 atti/min (a qualsiasi età) • Rientramenti intercostali moderati o severi
Idratazione	<ul style="list-style-type: none"> • Pelle e occhi normali • Mucose umide 	<ul style="list-style-type: none"> • Mucose secche • Scarso appetito nei neonati • Tempo di ricircolo ≥ 3 sec • Diuresi diminuita 	<ul style="list-style-type: none"> • Ridotto turgore della pelle
Altro	<ul style="list-style-type: none"> • Assenza delle caratteristiche riferite a lato (gialle e rosse) 	<ul style="list-style-type: none"> • Febbre ≥ 5 giorni • Arto o articolazioni gonfie • Non carica il peso o non usa un'estremità • Nuova massa > 2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura ≥ 38 °C (0-3 mesi) o ≥ 39 °C (3-6 mesi) • Rash che non impallidisce • Fontanella tesa • Rigidità nucale • Convulsioni • Segni neurologici focali • Crisi focali • Vomito biliare

Tabella 1- Valutazione del rischio di malattia severa nei bambini febbrili di età inferiore a 5 anni³⁰.

CARATTERISTICHE CLINICHE DELLE MALATTIE GRAVI SPECIFICHE CHE SI MANIFESTANO CON FEBBRE	
Diagnosi da considerare	Possibili sintomi e segni
Malattia meningococcica	Rash che non impallidisce, specialmente se associato ad almeno uno tra: <ul style="list-style-type: none"> - Rigidità nucale - Aspetto generale scadente - Lesioni di diametro > 2 mm (porpora) - Tempo di refill \geq 3 secondi
Meningite batterica	<ul style="list-style-type: none"> - Rigidità nucale - Fontanella tesa - Livello di coscienza alterato - Stato di male epilettico
Encefalite da herpes simplex	<ul style="list-style-type: none"> - Segni neurologici focali - Crisi focali - Livello di coscienza alterato
Polmonite	<ul style="list-style-type: none"> - Cianosi - Tachipnea (FR: frequenza respiratoria): <ul style="list-style-type: none"> FR > 60 atti/min (0-5 mesi di vita) FR > 50 atti/min (6-12 mesi di vita) FR > 40 atti/min (se >12 mesi di vita) - Alitamento delle pinne nasali - Rientramenti intercostali - Saturazione O₂ \leq 95% - Dolore toracico/addominale - Crepitii all'auscultazione
Infezione delle vie urinarie	<ul style="list-style-type: none"> - Vomito - Scarsa alimentazione - Letargia o irritabilità - Addome dolente o dolorabile - Disuria o poliuria
Artrite settica o osteomielite	<ul style="list-style-type: none"> - Tumefazione di arto/articolazione - Impotenza funzionale di un arto - Impossibilità a caricare il peso
Malattia di Kawasaki	Febbre di durata \geq 5 giorni e almeno 4 dei seguenti criteri: <ol style="list-style-type: none"> 1. Iniezione congiuntivale bilaterale 2. Alterazioni delle membrane mucose 3. Alterazioni delle estremità 4. Rash polimorfo 5. Linfadenopatia cervicale

Tabella 2 - Caratteristiche cliniche delle malattie gravi specifiche che si manifestano con febbre³⁰.

Dalla stratificazione del rischio derivano altrettanti approcci diagnostici-terapeutici (Figura 3)³⁰. Affinché il processo diagnostico proceda correttamente, tutti gli esami devono essere prescritti secondo criteri di priorità ed appropriatezza, dando la precedenza agli esami più semplici, economici, meno invasivi ed appropriati a sospetto clinico e contesto assistenziale²⁸.

Qualora, dopo il completamento dell'esame obiettivo, persista il sospetto diagnostico di una possibile infezione batterica severa in atto, si potrà ricorrere ad indagini laboratoristiche o strumentali di primo livello.

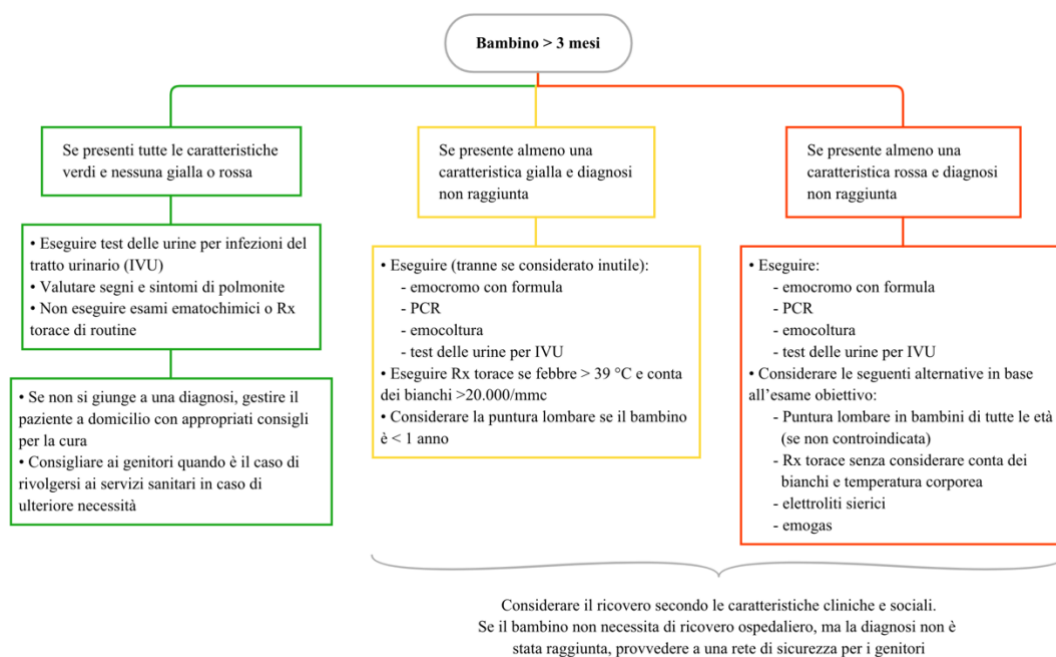


Figura 3. Valutazione del bambino febbrile con più di 3 mesi di età^{22,30}.

IVU: infezioni del tratto urinario; PCR: proteina C reattiva; Rx: radiografia

1.2.2.3 Indagini di primo livello

Le indagini di primo livello hanno come obiettivo la verifica della presenza effettiva di uno stato infiammatorio in atto, il rilevamento di segni di danno d'organo e l'eventuale riscontro di anomalie suggestive per patologie autoimmuni²⁸. Gli esami del sangue rappresentano normalmente il primo accertamento laboratoristico nella valutazione di un bambino febbrile. I test che normalmente vengono svolti sono: emocromo, indici di flogosi, profilo biochimico e funzionalità dei principali organi, emogas analisi per valutare l'equilibrio acido-base.

L'esame emocromocitometrico completo può essere utile per confermare la presenza di una risposta infiammatoria, che, soprattutto nel bambino, è caratterizzata da leucocitosi associata a neutrofilia^{4,28}. In molte patologie di origine virale, all'esordio della malattia, è stata riscontrata una linfopenia transitoria, mentre una eosinofilia è caratteristica di forme allergiche, ma può essere rilevata anche nelle parassitosi invasive⁴. I globuli bianchi, avendo il compito di proteggere il nostro organismo da microrganismi patogeni, sono infatti utilizzati come indicatore diagnostico di infezione. La sensibilità dei globuli bianchi come indicatore di infezione batterica severa è pari al 20-76%, con una specificità del 58-100% ed un rischio relativo (RR) di 1.5-5.56^{24,25}. Tenendo in considerazione, invece, solamente la conta assoluta dei neutrofilii nelle infezioni batteriche severe, il range di accuratezza diagnostica si modifica con 50-71% di sensibilità, 76-83% di specificità e 1.5-6.4 di rischio relativo (RR)^{24,25}. Va tuttavia sottolineata la presenza di altre possibili cause non legate ad infezione batterica, ma ad eventi stressanti che determinano un aumento dei globuli bianchi, come in caso di ripetuti episodi di vomito.

Altri marcatori di valutazione dello stato infiammatorio sono gli indici di infezione, quali la velocità di eritrosedimentazione (VES), la proteina C reattiva (PCR) e la procalcitonina (PCT). La risposta di fase acuta è tuttavia una cascata metabolica e infiammatoria aspecifica e pertanto tali indici possono aumentare non solamente in corso di infezioni, ma anche in seguito a traumi, malattie autoimmuni e neoplasie⁴.

La procalcitonina in condizioni fisiologiche viene sintetizzata dalle cellule C della tiroide, ma in presenza di infezioni batteriche severe si aggiunge una sintesi anche da parte di macrofagi e monociti. Considerato che la produzione di procalcitonina in corso di infezione è stimolata soprattutto da endotossine batteriche, è più probabile osservare un suo rialzo in corso di infezione batterica piuttosto che virale. L'incremento dei livelli di PCT si manifesta a circa 6 ore dall'inizio del processo infettivo e la molecola ha una emivita di circa 24 ore.

La proteina C reattiva è una proteina di fase acuta (alfa-globulina) prodotta dal fegato. In condizioni fisiologiche è rilevabile solamente in piccole quantità, ma può aumentare in modo significativo durante i processi infiammatori. La PCR inizia ad elevarsi dopo 6-8 ore dall'inizio del processo infettivo, con cinetica più lenta rispetto alla PCT. La molecola ha una emivita di 28 ore e risulta dosabile anche dopo 48 ore dalla fine dello stimolo.

Entrambe le proteine sono rilevabili nel sangue ed aumentano maggiormente in risposta ad un'infezione batterica, seppur si possano elevare anche in caso di infezione virale. Esse presentano una bassa specificità e alta sensibilità²².

Altri esami di laboratorio sono volti ad indagare possibili alterazioni nella funzionalità di diversi organi:

- urea, creatinina ed elettroliti per valutare la funzionalità renale;
- transaminasi (aspartato amino transferasi AST, alanina amino transferasi ALT), bilirubina, fosfatasi alcalina e gamma glutamil transpeptidasi (GGT) per valutare la funzionalità epatica;
- amilasemia e lipasemia per valutare la funzionalità pancreatica;
- coagulazione, soprattutto nel sospetto di infezione batterica invasiva.

Un altro accertamento utile e rapido è rappresentato dallo stick urine o dall'esame urine, che consente di valutare la presenza di un'eventuale infezione delle vie urinarie e lo stato di idratazione del paziente.

L'ecografia è una tecnica non invasiva e non prevede l'uso di radiazioni ionizzanti, è adatta una metodica ideale per lo studio degli organi solidi e utile per valutare la presenza di ascessi dei tessuti molli, per studiare la morfologia dei linfonodi più superficiali e per identificare valutare le possibili raccolte di fluidi a livello delle

articolazioni⁴. Infine, l'ecografia può essere utile nel caso di polmoniti complicate per stimare l'entità del versamento pleurico e monitorarlo nel tempo.

La radiografia (Rx) è uno strumento molto utile per la diagnosi differenziale nelle infezioni del tratto respiratorio. La radiografia del torace può essere infatti richiesta per valutare il coinvolgimento del parenchima polmonare. I pazienti con un'infezione respiratoria batterica possiedono un coinvolgimento alveolare maggiore (72%) rispetto a quelli con sola infezione virale (49%)²⁷. L'RX torace può inoltre fornire informazioni in merito ad eventuali allargamenti dell'ombra mediastinica che possono far sospettare altre cause eziologiche^{26,27}.

Infine, gli esami microbiologici sono essenziali per poter identificare l'eventuale agente eziologico responsabile dell'infezione. Un esempio di test microbiologico rapido è rappresentato dal tampone faringeo per la ricerca di *Streptococcus pyogenes*, che andrebbe eseguito nei casi di faringo-tonsillite per discriminare tra eziologia batterica o virale. L'esecuzione di urinocoltura è fondamentale in tutti i bambini con febbre senza localizzazione per escludere una infezione delle vie urinarie, da eseguire prima della somministrazione di terapia antibiotica^{4,28}. L'emocoltura deve essere eseguita a tutti i bambini con sospetta sepsi o batteriemia. La liquorcoltura, allo stesso modo, deve essere eseguita in tutti i bambini con sospetta una meningite o encefalite.

1.2.2.4 Indagini di secondo livello

Le indagini di secondo livello devono essere mirate al quesito clinico, sulla base delle informazioni ottenute da anamnesi, esame obiettivo e risultati delle indagini di primo livello. Questa tipologia di accertamenti è solitamente più costosa spesso maggiormente invasiva, e richiede frequentemente un ricovero del paziente. Le indagini di secondo livello si possono raggruppare in due sottogruppi: metodiche di imaging ed esami di laboratorio specifici²⁸.

La scelta della tecnica di diagnostica per immagini più adeguata deve basarsi sul quesito clinico e sulle differenti diagnosi differenziali.

La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) consentono una caratterizzazione delle lesioni e una precisa localizzazione anatomica. Sono esami

che vengono richiesti solitamente come approfondimento degli accertamenti strumentali di primo livello. Rappresentano tuttavia le indagini di scelta per lo studio di encefalo e midollo spinale². La prescrizione di tali accertamenti deve essere attenta e giudiziosa per gli effetti a lungo termine delle radiazioni ionizzanti e per la frequente necessità di sedazione del paziente con i rischi conseguenti⁴.

Accertamenti molto invasivi, da limitare a quesiti specifici, sono rappresentati dalle endoscopie. In particolare, la broncoscopia permette di osservare l'anatomia delle vie aeree e di raccogliere per poter individuare eventuali microrganismi patogeni²⁸.

Dal punto di vista laboratoristico, a seconda del sospetto clinico, possono essere eseguiti numerosi esami ematici di approfondimento, come striscio di sangue periferico, ferritinemia, elettroforesi delle sieroproteine e dosaggio delle immunoglobuline totali e per sottoclassi (IgG, IgM e IgA) o test anticorpali^{22,23}. Dal punto di vista microbiologico, in base al sospetto clinico, possono essere richiesti test sierologici o molecolari su sangue per inquadrare o definire l'eziologia specifica della patologia infettiva²³.

1.2.2.5 Indagini di terzo livello

Le indagini di terzo livello sono caratterizzate da una invasività ancor più elevata e dalla necessità di ospedalizzazione del paziente. Pertanto, sono giustificabili solamente in caso di esami non dirimenti o necessità di conferma diagnostica²⁸.

1.2.3 Trattamento

Il trattamento deve essere scelto sulla base dell'ipotesi diagnostica formulata. La terapia antipiretica e antinfiammatoria deve essere sempre somministrata per alleviare il *discomfort* del bambino e non al fine di ridurre solamente il valore della temperatura corporea, che non modifica il decorso dell'infezione. La difficoltà nel discriminare tra le varie eziologie può comportare un utilizzo eccessivo di antibiotici, anche per infezioni virali ed un ritardo nella prescrizione di antibiotici in caso di mancato riconoscimento di origine batterica dell'infezione, con conseguente progressione ed insorgenza di complicanze⁵.

1.2.3.1 Antibiotico resistenza

L'antibiotico resistenza è un fenomeno naturale di adattamento proprio di alcuni microrganismi, che acquisiscono la capacità di sopravvivere e crescere nonostante la presenza di un agente antibatterico, sufficiente ad inibire o uccidere microrganismi della stessa specie privi di questa caratteristica.

La resistenza agli antibiotici può essere:

- naturale o intrinseca, quando il batterio, per caratteristiche proprie, è resistente ad un antibiotico;
- acquisita, quando un batterio si adatta a resistere ad un antibiotico mediante modifiche del proprio patrimonio genetico.

L'uso eccessivo e inappropriato degli antibiotici costituisce una delle cause principali dell'aumentata insorgenza di resistenze^{6,12}. Spesso gli antibiotici sono prescritti ad ampio spettro nonostante le indagini colturali abbiano identificato un batterio specifico (con rispettivo antibiogramma) e non a spettro più ristretto. Altrettanto frequentemente gli antibiotici sono prescritti in corso di infezioni ad eziologia virale sulle quali non hanno alcuna efficacia.

Le resistenze agli antibiotici rappresentano un problema rilevante per la Sanità Pubblica, con importanti conseguenze epidemiologiche, cliniche ed economiche. La diffusione rapida e imprevedibile di organismi multi-resistenti, infatti, limita notevolmente le opzioni terapeutiche per molte infezioni e sta provoca un aumento di morbilità, mortalità, durata di malattia e sviluppo di complicanze o epidemie¹². Nel 2019, infatti, i *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) degli Stati Uniti d'America (USA) hanno pubblicato un rapporto sulle resistenze antibiotiche, nel quale viene stimata una incidenza di più di 2.8 milioni di infezioni da microrganismi resistenti ogni anno e una mortalità di oltre 35000 pazienti ogni anno¹³.

Per contrastare questo fenomeno è necessario una prescrizione appropriata degli antibiotici e la ricerca di nuove molecole efficaci contro i ceppi resistenti¹⁵. A tal proposito, in Italia è in atto un "Piano nazionale di contrasto dell'antibiotico resistenza 2022-2025 (PNCAR)" con l'obiettivo di fornire al Paese le linee

strategiche e le indicazioni operative per affrontare l'emergenza dell'antibiotico-resistenza durante prossimi anni.

1.2.4 MeMed BV®

La difficoltà nel distinguere tra infezioni ad origine batterica o virale è una delle cause principali di prescrizione impropria degli antibiotici. La decisione di avviare una terapia antibiotica si basa sulle informazioni raccolte dall'anamnesi, dall'esame obiettivo e dagli eventuali esami di laboratorio e strumentali eseguiti. Difficilmente gli esiti delle indagini microbiologiche tradizionali potranno essere disponibili al momento della valutazione clinica in ambulatorio o in Pronto Soccorso. Gli esami colturali, sierologici o i più recenti basati sugli acidi nucleici, soffrono infatti di limitazioni dovute ai lunghi tempi di esecuzione, ai costi, al prelievo del campione dal sito di infezione e alla difficoltà di interpretare i patogeni identificati come causa di malattia o colonizzazione.

Di più rapida e facile esecuzione sono gli esami di laboratorio per screening su sangue. Come precedentemente descritto, PCR e PCT rappresentano marcatori fondamentali per la valutazione dello stato di infezione. Sono molecole di fase acuta che possono tuttavia aumentare anche in presenza di altre condizioni, quali ad esempio ustioni, insufficienza renale, malattie autoimmuni o neoplasie. PCR e PCT non sono le uniche molecole di fase acuta che si modificano in corso di infezione. Numerose molecole, come citochine ed interferoni, modificano i loro livelli ematici durante, come presepsina, IL-10, TRAIL, pro-adrenomedullina. Tuttavia, queste proteine sono molto sensibili alla variabilità individuale e dipendono dal tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi, dal decorso clinico e dall'agente patogeno alla base¹⁵. Prese singolarmente, potrebbero non risultare di aiuto nel definire l'eziologia dell'infezione. Ad esempio, l'aumento isolato della PCT in un paziente con insufficienza renale non è significativo di infezione in quanto può presentare valori elevati anche in benessere.

Per migliorare le prestazioni diagnostiche nei confronti del paziente pediatrico febbrile, sono stati studiati differenti profili di espressione proteica in corso di stato infiammatorio. Dai risultati ottenuti è stato recentemente proposto di combinare tre

differenti proteine della risposta immunitaria dell'ospite in un nuovo strumento predittivo denominato MeMed BV® (Figura 4)^{13, 16}.

Tali marcatori sono rappresentati da:

1. *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), ligando che induce l'apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale. TRAIL è una citochina prodotta e secreta dalla maggior parte delle cellule e provoca l'apoptosi legandosi ai recettori di morte DR4 e DR5. Il conseguente processo apoptotico caspasi-8-dipendente attiva le caspasi effettrici a valle, portando all'attivazione di chinasi specifiche e alla morte della cellula³⁴. TRAIL lega anche il recettore *decoy* 1 (DcR1), recettore neutralizzante di TRAIL, e il recettore *decoy* 2 (DcR2), che attiva invece il *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFkB), con induzione della trascrizione di geni antagonisti alla via di segnalazione di necrosi programmata e promozione dell'infiammazione³⁴. Il TRAIL è un marcatore che risulta elevato nelle infezioni virali e, al contrario, ha mostrato livelli significativamente ridotti nei pazienti con infezione batterica^{13,15,16,36}.
2. *Interferon gamma induced protein-10* (IP-10), proteina-10 indotta dall'interferone gamma^{15,16}. IP-10 è una citochina appartenente alla famiglia delle chemochine CXC. Viene secreta da diversi tipi di cellule come monociti, cellule endoteliali e fibroblasti, in risposta allo stimolo dell'interferone- γ . Questa chemochina esercita i suoi effetti legandosi al recettore CXCR3 sulla superficie cellulare. L'IP-10 ha un ruolo di chemo-attrazione (monociti e macrofagi, cellule T, cellule NK e cellule dendritiche), di promozione dell'adesione delle cellule T alle cellule endoteliali, di attività antitumorale e angiogenesi³⁵. I livelli ematici di IP-10 sono risultati elevati nei pazienti con infezione virale e meno elevati nei pazienti con infezione batterica^{13,15,16,36}.
3. proteina C reattiva (PCR). La proteina C-reattiva è una proteina di fase acuta di origine epatica le cui concentrazioni circolanti aumentano durante l'infiammazione, in seguito alla secrezione di interleuchina-6 da parte dei macrofagi e delle cellule T. Il suo ruolo fisiologico della PCR è legarsi alla liso-fosfatidilcolina espressa sulla superficie di cellule morte e di alcuni tipi

di batteri, per attivare il sistema del complemento, promuovendo così il processo di fagocitosi. La PCR si lega anche al recettore Fc-gamma IIa, formando immunocomplessi simili agli anticorpi IgG^{32,33}.

I valori di PCR sono risultati molto elevati nei pazienti con infezioni batteriche e meno in quelli con infezioni virali^{13,15,16,36}. È ormai consolidata l'utilità della PCR nella diagnostica differenziale delle infezioni batteriche, tuttavia, le proteine che si elevano durante le infezioni virali, come TRAIL e IP-10, non sono ancora utilizzate nella pratica clinica¹³.

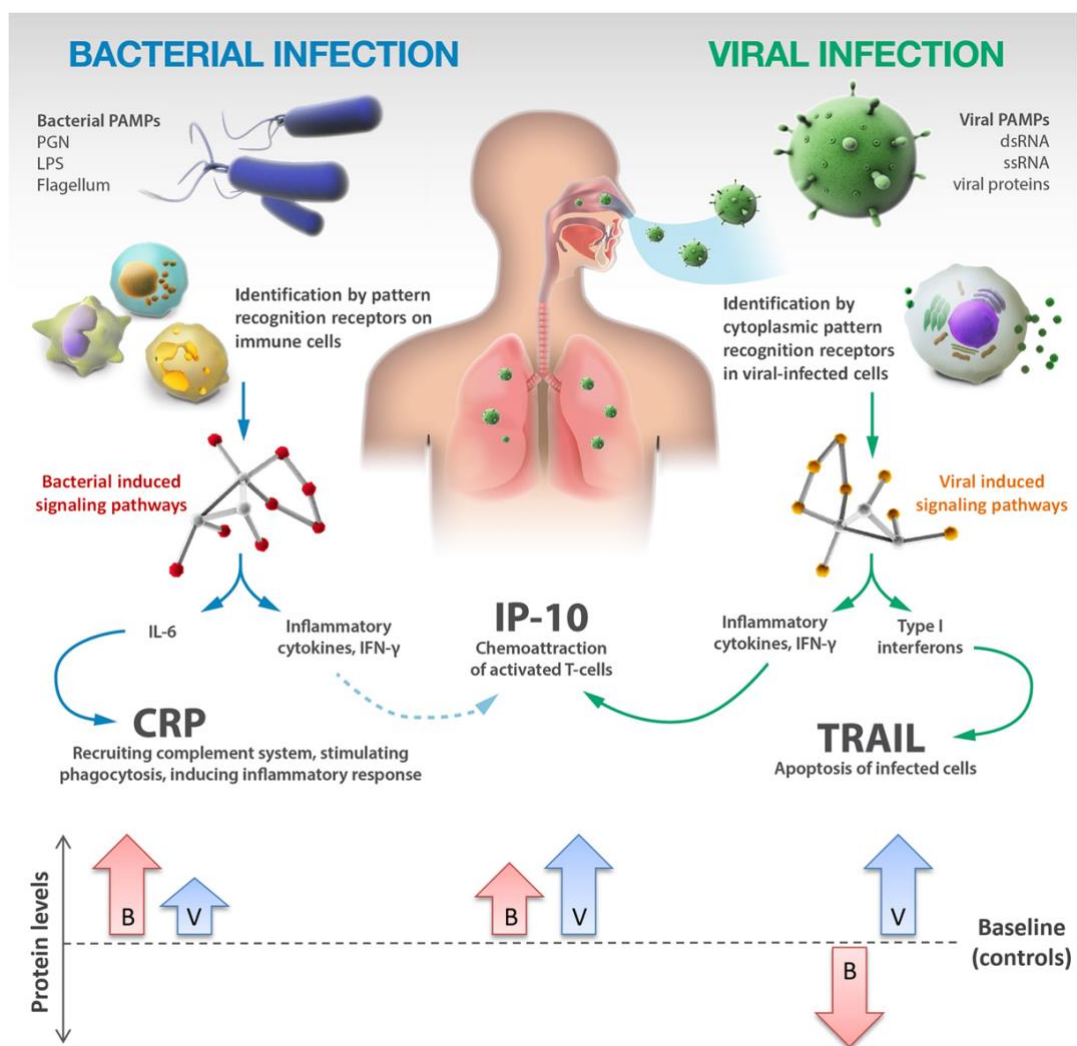


Figura 4. TRAIL, IP-10 and CRP partecipano a diverse vie di segnalazione e mostrano dinamiche complementari in risposta a infezioni batteriche (B) e virali (V). PAMPs: profili molecolari associati ai patogeni¹³; PGN: peptidoglicano; LPS: lipopolisaccaride.

MeMed BV[®], combina il valore di questi tre marcatori di infezione e restituisce un rischio complessivo:

- un punteggio da 0 a 10 identifica un'elevata probabilità di infezione virale;
- un punteggio da 10 a 35 identifica una moderata probabilità di infezione virale o altra eziologia non batterica;
- un punteggio da 35 a 65 identifica un risultato equivoco, che non fornisce informazioni diagnostiche e perciò inconcludente;
- un punteggio da 65 a 90 identifica una moderata probabilità di infezione batterica o di co-infezione batterico e virale;
- un punteggio da 90 a 100 identifica un'elevata probabilità di infezione batterica¹⁵.

L'accuratezza diagnostica di MeMed BV[®] nella differenziazione delle infezioni virali da quelle batteriche è stata convalidata da molteplici studi clinici^{13,14,15}. In letteratura sono descritti livelli di sensibilità e specificità rispettivamente del 92% e dell'89%, con una riduzione significativa sia dei falsi-negativi che dei falsi-positivi^{15,16,17}. I valori emersi dagli studi di accuratezza diagnostica risultano significativamente superiori ad altri test simili, soprattutto se utilizzato nei bambini di età prescolare con infezione delle basse vie respiratorie o febbre di origine sconosciuta^{15,16,17}.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è valutare, attraverso una revisione sistematica, i dati pubblicati in letteratura sulla accuratezza diagnostica di MeMed BV® nella distinzione tra infezioni batteriche e virali nei pazienti pediatrici febbrili e sull'utilità del test nel ridurre la prescrizione di antibiotici. La revisione sistematica della letteratura è infatti volta a comprendere il possibile impatto di questo nuovo strumento diagnostico nella pratica clinica e il potenziale contributo del test per una gestione più accurata delle infezioni febbrili nel paziente.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno di studio

Abbiamo condotto una revisione sistematica della letteratura con l'obiettivo di valutare l'accuratezza diagnostica del test MeMed BV® nella popolazione pediatrica. A condizione che ci fossero un numero sufficiente di studi con disegno simile, stessi criteri di valutazione e gruppi di controllo comparabili, è stata inoltre pianificata una metanalisi dei dati estratti dai singoli articoli.

Nelle fasi iniziali di stesura del protocollo di studio è stata svolta una ricerca preliminare per conoscere gli studi e dati già pubblicati in letteratura. In parallelo, abbiamo esaminato il database PROSPERO, un registro prospettico internazionale che raccoglie i protocolli di ricerca di revisioni sistematiche, con l'obiettivo di identificare eventuali studi non ancora pubblicati, pianificati o in corso, riguardanti lo stesso quesito.

Nel corso del processo di stesura del protocollo e nella conduzione dello studio, abbiamo seguito le linee guida per la realizzazione e la pubblicazione di revisioni sistematiche, *PRISMA Statement 2020 (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)*³⁸. Questo strumento è costituito da un diagramma di flusso che riassume le fasi del processo di selezione degli articoli e da una checklist di 27 *items*, (Appendice 1), con l'obiettivo di guidare gli autori nel migliorare il *reporting* delle revisioni sistematiche³⁸.

Il protocollo di studio "*Diagnostic accuracy of a novel biosignature in predicting bacterial infection in febrile children: a systematic review*" è stato registrato su PROSPERO (ID CRD42024506430).

3.2 Strategia di ricerca

Per identificare gli articoli di interesse, è stata elaborata una strategia di ricerca che combina i termini “TRAIL”, “IP-10”, “CRP” and “children”, selezionati dagli autori per rappresentare il quesito della revisione sistematica. Dal confronto degli autori con la biblioteca di riferimento e dalla raccolta dei termini più comprensivi possibile, è stata identificata la seguente stringa di ricerca: “(((TRAIL OR “TNF related apoptosis induced ligand” OR “tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand”)) AND (IP-10 OR “interferon γ induced protein 10” OR “interferon gamma induced protein 10”)) AND (CRP OR “C reactive protein”)) OR (MeMed OR “BV score”)) AND (child OR children OR paediatr* OR pediatr* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler*)”.

La revisione sistematica ha coinvolto la consultazione di cinque database bibliografici elettronici: Scopus, MEDLINE, Embase, Cochrane Library e CINAHL, con differenti stringhe di ricerca adeguate a ciascun database considerato elencate nell’Appendice 2.

Il nostro metodo di indagine è stato caratterizzato dall’assenza di restrizioni in termini di inizio del periodo temporale, lingua o stato di pubblicazione, al fine di garantire la massima inclusione degli studi rilevanti. La ricerca in letteratura è stata eseguita fino al 31 dicembre 2023. Per massimizzare l’identificazione di eventuali studi rilevanti, sono stati inoltre valutati i riferimenti bibliografici degli articoli selezionati.

3.3 Criteri di inclusione

L'inclusione di una vasta gamma di tipologie di studio è stata pianificata al fine di comprendere il massimo numero di articoli rilevanti e di ottenere una prospettiva completa e approfondita sull'argomento in esame. Sono quindi state prese in considerazione le seguenti tipologie di studio:

- studi di accuratezza diagnostica;
- studi randomizzati controllati;
- studi osservazionali di coorte;
- studi osservazionali caso-controllo;
- ricerche longitudinali "before-after";
- studi basati su serie temporali interrotte.

Sono stati considerati altri criteri di inclusione ben definiti quali:

- popolazione specifica, intervento specifico, comparison ben definito, outcome specifici che sono spiegati approfonditamente nella sezione PICO;
- possibilità di estrarre dati per la popolazione pediatrica in caso di studi che includessero popolazioni miste (adulti e pediatrici);
- nessuna restrizione di lingua;
- nessuna restrizione temporale;
- nessuna restrizione per la sede dell'infezione;
- qualsiasi contesto di cura.

3.4 Criteri di esclusione

Dalla ricerca in letteratura sono state escluse alcune tipologie di articoli:

- Articoli per i quali il testo completo non era disponibile o risultava inaccessibile. Questo criterio di esclusione è stato applicato anche a studi con abstract non esaustivi, incapaci di fornire una descrizione completa della metodologia e dei risultati della ricerca.
- Studi privi di controllo e confronto, come *case reports*, *case series*, commenti di articoli, editoriali, lettere ad autori o editori, articoli di opinione o altro materiale privo di dati oggettivi.

- Studi da cui non risultava possibile estrarre dati relativi alla popolazione pediatrica.

Questo approccio di esclusione è stato scelto per garantire un focus mirato ai dati ed alle informazioni rilevanti per la nostra indagine, evitando contributi meno pertinenti o non focalizzati sull'ambito pediatrico. Tali criteri sono infatti finalizzati a garantire l'inclusione dei soli studi dotati di una metodologia robusta per ottenere un'analisi dei risultati più precisa e affidabile.

3.5 PICO

3.5.1 P. Population - Popolazione studiata

Nella selezione e analisi dei dati sono stati inclusi studi riguardanti pazienti pediatrici di età inferiore ai 18 anni con sintomi febbrili. Non sono state imposte limitazioni riguardo alla sede di infezione né al setting o contesto assistenziale. È stato pertanto preso in considerazione un ampio spettro di scenari clinici legati alla febbre nel paziente pediatrico, allo scopo di limitare il meno possibile la valutazione del test MeMed BV®.

3.5.2 I. Intervention – Intervento

L'intervento valutato consiste nell'esecuzione del test MeMed BV®. Tale test si basa sulla combinazione di tre proteine legate alla risposta immunitaria dell'ospite ed è composto da: ligando che induce apoptosi legato al TNF (TRAIL), proteina-10 indotta dall'interferone gamma (IP-10) e proteina C-reattiva (PCR). Questo nuovo approccio diagnostico mira a sfruttare la sinergia di tre marcatori proteici di infezione al fine di supportare la valutazione diagnostica del singolo clinico. L'obiettivo è differenziare efficacemente, ed in modo tempestivo, le cause dell'infezione, consentendo così una tempestiva identificazione eziologica per ridurre il tasso di inappropriata prescrizione di antibiotici.

3.5.3 C. Comparison/Control – Confronto/Controllo

Il controllo per valutare l'accuratezza diagnostica del MeMed BV[®], consiste nel gold standard diagnostico utilizzato per la definizione di diagnosi di infezione batterica o virale nei diversi studi pertinenti. Se in alcuni lavori la definizione era limitata al solo riscontro microbiologico, in molti articoli è stata utilizzata quale gold standard di riferimento una valutazione formulata da un gruppo di medici esperti. La valutazione clinica ha incluso elementi di anamnesi, esame obiettivo ed esami ematochimici, test microbiologici o studi imaging, eseguito a discrezione del medico curante sul singolo paziente, per arrivare ad una definizione basata sul consensus dell'identificazione dell'eziologia sottostante la febbre presentata dai pazienti pediatrici esaminati (virale, batterica o indeterminata).

3.5.4 O. Outcome – Esito

Obiettivo principale della revisione sistematica è valutare l'efficacia del test MeMed BV[®] nell'identificare correttamente le infezioni batteriche e virali nel paziente pediatrico febbrile. È stata valutata pertanto la performance diagnostica, ovvero l'accuratezza del test in termini di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo, valore predittivo negativo ed area sotto la curva ROC. A completamento, è stata infine valutata l'efficacia del nuovo test nel ridurre la prescrizione inappropriata di antibiotici.

3.6 Setting

Nella presente revisione sistematica non sono state applicate restrizioni relative a luoghi geografici e sono state incluse tutte le tipologie assistenziali. Questo approccio intende garantire un'ampia copertura ed eterogeneità di pazienti nei diversi contesti geografici e assistenziali, consentendo una valutazione più completa e inclusiva possibile del paziente pediatrico febbrile.

3.7 Periodo

Gli studi inclusi nella nostra analisi sono stati selezionati esaminando le diverse banche dati dalla loro istituzione fino al 31 dicembre 2023.

3.8 Selezione degli studi e gestione dei dati

La nostra metodologia di ricerca si contraddistingue dall'assenza di restrizioni riguardanti lingua o stato di pubblicazione, al fine di ottenere la massima inclusione degli studi pertinenti. Per estendere ulteriormente la raccolta dei dati, è stata condotta una scrupolosa revisione dei riferimenti bibliografici degli articoli identificati nelle diverse banche dati elettroniche. Questo approccio è volto a garantire una copertura completa e accurata della letteratura pertinente al nostro ambito di studio.

Ogni articolo identificato è stato processato tramite l'utilizzo di Covidence, una piattaforma online di proprietà della Cochrane, dedicata a facilitare la selezione degli articoli da includere nella revisione e ad estrapolare i dati. Si tratta infatti di un software che facilita l'importazione degli articoli dai diversi database bibliografici e la rimozione di duplicati, lo screening per titolo e abstract, e la selezione definitiva tramite testo integrale.

In conformità alle linee guida *PRISMA Statement 2020*, gli articoli identificati sono stati raccolti e, una volta eliminati i duplicati, sono selezionati per titolo ed abstract da due revisori in modo cieco e indipendente. Tale scrutinio mirava a valutare la conformità dei vari articoli per i criteri di inclusione prestabiliti. Le scelte conflittuali dei due revisori sono state risolte da un terzo revisore indipendente. Gli studi così identificati sono stati poi analizzati attraverso la valutazione del testo completo, in modo da determinare l'effettiva conformità dell'articolo ai criteri di inclusione prestabiliti. Questa fase è stata svolta con le medesime modalità della precedente, coinvolgendo inizialmente due revisori in modo cieco e indipendente e risolvendo eventuali conflitti mediante il coinvolgimento di un terzo revisore indipendente.

Ogni articolo escluso è stato categorizzato in base al motivo specifico ed è stato elaborato un diagramma di flusso per rappresentare i risultati dell'intero processo di selezione secondo le linee guida PRISMA *Statement 2020*³⁸ (Appendice 1).

Per la fase di estrazione dati, è stato elaborato un modello standardizzato volto a riassumere le caratteristiche principali dei singoli studi per il confronto dei risultati.

Di ogni articolo sono state raccolte le seguenti informazioni:

1. Caratteristiche dello studio (titolo, autori, anno di pubblicazione, rivista di pubblicazione, disegno dello studio, nazione sede dello studio);
2. Caratteristiche dei pazienti (fascia di età, proporzione dei sessi, contesto assistenziale, criteri di inclusione e di esclusione, comorbilità, diagnosi identificata dallo standard di riferimento);
3. Prestazioni diagnostiche del test MeMed BV[®] e standard di riferimento utilizzato;
4. Impatto del test MeMed BV[®] sulla corretta prescrizione della terapia antibiotica.

3.9 Valutazione del rischio di bias degli studi inclusi

La valutazione della qualità di ciascuno studio è stata condotta in maniera cieca ed indipendente da due autori. A seconda del tipo di studio, è stato impiegato lo strumento più adatto per identificare eventuali debolezze metodologiche:

- lo strumento *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2* (QUADAS-2) è stato utilizzato per valutare la qualità metodologica degli studi sull'accuratezza diagnostica. Tale strumento è organizzato in quattro domini principali che abbracciano aspetti cruciali degli studi: selezione dei pazienti, test in studio, standard di riferimento, flusso dei pazienti e timing di test in studio. L'attuazione del metodo comporta una sequenza di quattro fasi fondamentali: inizialmente, è essenziale garantire chiarezza nel formulare il quesito per la revisione sistematica; successivamente, occorre definire con precisione le istruzioni che guideranno l'intera procedura. La terza fase implica l'esame approfondito del diagramma di flusso presentato nello studio primario o la sua creazione qualora non sia già disponibile. Infine, la quarta fase richiede una valutazione attenta dei possibili bias e dell'applicabilità dello studio. Ogni categoria di valutazione è esaminata in base al rischio di distorsione, mentre i primi tre domini sono oggetto di valutazione anche in relazione all'applicabilità generale dello studio.
- lo strumento *NIH Quality Assessment Tool*, sviluppato dal *National Institutes of Health* (NIH), è stato utilizzato per valutare la qualità degli studi osservazionali. Esso considera vari aspetti quali la selezione dei partecipanti, le caratteristiche del test e dello standard di riferimento selezionato, la misurazione degli outcome e la gestione degli eventuali fattori di confondimento.
- Lo strumento *Risk of Bias tool 2* (RoB2) è stato invece scelto per valutare il rischio di bias in studi randomizzati controllati (*randomized controlled trial*, RCT). Questo strumento esamina domini specifici, come la randomizzazione, l'occultamento della lista di randomizzazione, la cecità degli operatori e dei partecipanti, la gestione degli esiti mancanti e

l'eventuale segnalazione selettiva dei risultati. RoB2 fornisce un approccio dettagliato per valutare la qualità metodologica degli RCT.

È importante sottolineare che la valutazione della qualità di ciascuno studio non ha influito sulla sua inclusione nella presente revisione, ma è stata presa in considerazione nella sintesi qualitativa degli studi e nella discussione dei risultati ottenuti.

3.10 Analisi statistica

Sono state estratte le tabelle 2x2 utilizzate per il calcolo delle misure di accuratezza diagnostica, ovvero il numero di veri positivi, falsi positivi, veri negativi e falsi negativi, per gli studi che presentassero caratteristiche simili, tali da permettere la sintesi dei risultati tramite una metanalisi. La metanalisi, che ha considerato sia la stima degli effetti fissi che la stima degli effetti variabili, è stata eseguita, per lo scopo di questo elaborato, solo sulle misure di sensibilità e specificità.

L'eterogeneità è stata valutata con l'indice I^2 e con il valore della significatività statistica p . In accordo con le disposizioni fornite dalla *Cochrane collaboration* l'indice I^2 di eterogeneità è interpretato come potenzialmente non importante (0-19%), moderato (20-49%), sostanziale (50-79%), e considerevole (>80%).

Per l'analisi è stato utilizzato il Software STATA/MP 18.0.

Ulteriori dettagli sull'analisi con i dati estrapolati dai singoli articoli, sono consultabili nell'Appendice 3.

4. RISULTATI

Dai cinque database bibliografici elettronici, sono stati estratti un totale di 389 articoli, rispettivamente:

- 224 articoli da *Scopus*[®];
- 93 articoli da *MEDLINE*[®];
- 50 articoli da *Embase*[®];
- 21 articoli da *CINHAL*[®];
- 1 articolo da *Cochrane Library*[®].

Gli articoli così ottenuti sono stati carica sul software *Covidence* e, dopo aver rimosso i duplicati, sono stati individuati 317 articoli potenzialmente rilevanti. Successivamente, durante la fase di screening per titolo e abstract, sono stati selezionati 66 articoli che sono stati sottoposti a un esame più approfondito mediante l'analisi del testo completo.

Nel processo di selezione tramite la valutazione del testo completo, sono estati esclusi 50 elaborati. Alcuni di questi non rientravano nella tipologia di studio includibile secondo i criteri predefiniti, altri consideravano una popolazione differente rispetto a quella scelta dal nostro studio, come ad esempio coorti composte da soli soggetti adulti, altri valutavano interventi o outcome differenti da quelli prestabiliti. Alla fine del processo di selezione degli articoli identificati nelle diverse banche dati e nei riferimenti bibliografici, sono stati identificati 16 studi che rientrano nei criteri prestabiliti per la revisione sistematica.

Ulteriori dettagli riguardo alle motivazioni delle esclusioni sono disponibili nel diagramma di flusso secondo *PRISMA Statement 2020* (Figura 5), che offre una rappresentazione grafica del processo di selezione degli articoli.

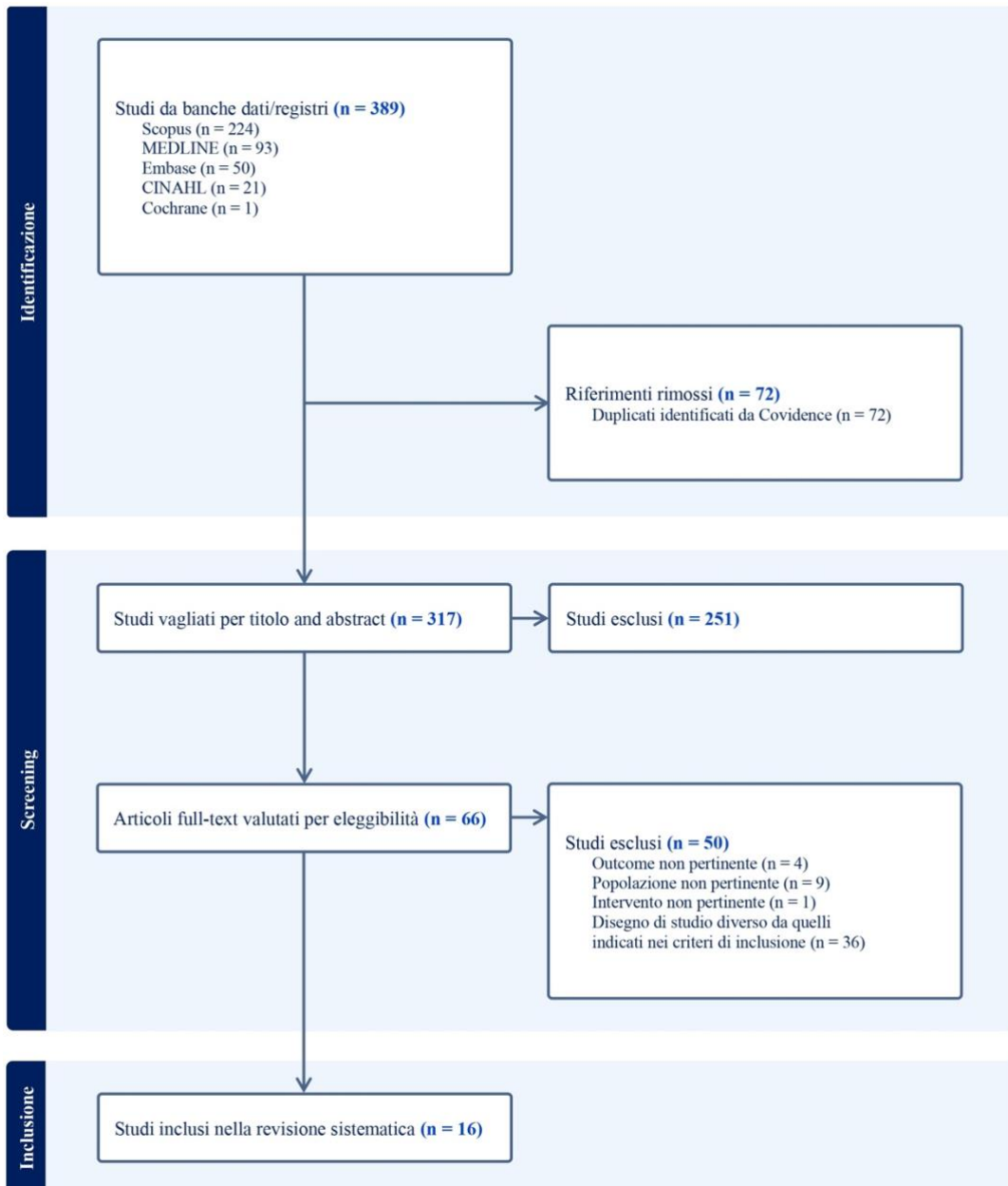


Figura 5. PRISMA Statement 2020. Diagramma di flusso della revisione sistematica.

Tutti gli studi presi in considerazione erano stati pubblicati negli ultimi 10 anni, in un periodo compreso dal 2015 al 2023. Non sono stati reperiti studi potenzialmente eleggibili pubblicati in lingua diversa dall'inglese.

4.1 Caratteristiche degli studi inclusi

Le caratteristiche degli studi inclusi sono sintetizzate in Tabella 3, mentre la Tabella 4 fornisce un riepilogo degli outcome e dei risultati corrispondenti a ciascuno studio.

Gli studi sono stati suddivisi per popolazioni originale, sottoanalisi di popolazioni tratte da altri studi e per outcome primario (accuratezza diagnostica o prescrizione di terapia antibiotica).

Dei 16 articoli selezionati dalla revisione sistematica della letteratura, 13 studi hanno un disegno osservazionale prospettico e 3 studi un disegno osservazionale retrospettivo.

Dall'analisi dei dati è emerso che 8 studi sono stati condotti in Israele, che costituisce il Paese maggiormente rappresentato. Altre nazioni di svolgimento degli studi selezionati includono Germania, Paesi Bassi, Svizzera, Italia, Francia e Stati Uniti d'America (USA).

Gli studi multicentrici rappresentano la maggioranza e sono 12. Gli studi monocentrici^{43,45,42,40} sono invece 4 con sede in Israele, Germania, Svizzera e Stati Uniti d'America.

Confrontando i criteri di inclusione ed esclusione degli studi selezionati per la revisione sistematica sono emersi diversi criteri di inclusione dei partecipanti, con una tendenza comune, tuttavia, a considerare età, sintomi febbrili e durata della febbre. Allo stesso tempo, sono scelte dai diversi autori condizioni cliniche specifiche di inclusione come le infezioni respiratorie^{29,45} o sintomi da *COVID-19*⁴². I criteri di esclusione più frequenti riguardano la presenza di neoplasie attive, condizioni di immunodeficienza o immunosoppressione, infezioni pregresse, terapie immunosoppressive o immunomodulanti o infezioni da virus dell'epatite B e C.

Autore, giornale e anno di pubblicazione	Disegno dello studio	Nazione, numero di centri coinvolti, setting	Numero di soggetti inclusi	Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
Studi di accuratezza diagnostica su coorti originali					
Oved et al. ¹³ <i>PLoS ONE</i> 2015	Osservazionale prospettico di coorte (CURIOSITY)	Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso Pediatrico, Reparto Pediatrico, di Chirurgia Pediatrica, di medicina interna, d'urgenza, Dipartimento chirurgico	N = 765 382 training set 383 validation set 333 adulti 432 bambini	Età ≥ 18 anni (adulti) Età < 18 anni (bambini) Febbre > 37.5 °C Infezione acuta Sintomi ≤ 12 giorni Terapia antibiotica	Neoplasia attiva Immunodeficienza congenita Immunosoppressione iatrogena Immuno-modulazione iatrogena Infezione acuta nelle 2 settimane precedenti Infezione da HBV o HCV Infezione da HIV
Srugo et al. ¹⁶ <i>PEDIATRICS</i> 2017	Osservazionale prospettico di coorte	Svizzera Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso Pediatrico e Reparto Pediatrico	N = 361 (307 analizzati)	Età 3 mesi – 18 anni Febbre ≥ 38.0 °C Sintomi ≤ 7 days Infezione acuta	Neoplasia ematologica attiva Immunodeficienza congenita Trattamento immune-soppressivo in corso Trattamento immune-modulante in corso Infezione nelle 3 settimane precedenti Terapia antibiotica di durata > 48 ore Infezione da HIV provata o sospetta Infezione da HBV o HCV provata o sospetta Aspettativa o qualità di vita compromesse

<p>van Houten et al.⁹ <i>The Lancet Infectious Diseases</i> 2017</p>	<p>Osservazionale prospettico di coorte (OPPORTUNITY)</p>	<p>Paesi Bassi Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso Pediatrico e Reparto Pediatrico</p>	<p>N = 577 (443 analizzati)</p>	<p>Età 2 mesi – 60 mesi Febbre ≥ 38.0 °C Infezione respiratoria inferiore Febbre senza localizzazione Terapia antibiotica o meno</p>	<p>Neoplasia attiva Immunodeficienza primaria o secondaria Febbre nelle 3 settimane precedenti Infezione da HIV Infezione da HBV o HCV Disordine metabolico da moderato a severo Ritardo psicomotorio</p>
<p>Ross et al.⁴¹ <i>PLoS ONE</i> 2021</p>	<p>Osservazionale retrospettivo di coorte (dallo studio RADICAL)</p>	<p>USA <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso</p>	<p>N = 286</p>	<p>Età ≥ 2 anni Sintomi < 28 giorni Infezione respiratoria acuta Malattia infiammatoria severa (≥ 2 criteri per SIRS)</p>	<p>Mancata microbiologia di conferma Eziologia non infettiva</p>
<p>Papan et al.⁷ <i>Clinical Microbiology and Infection</i> 2022</p>	<p>Osservazionale prospettico di coorte (AutoPilot-Dx)</p>	<p>Germania Italia <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso Pediatrico</p>	<p>N = 1008 (732 analizzati)</p>	<p>Età 90 giorni – 18 anni Febbre ≥ 38.0 °C Sintomi ≤ 7 giorni Infezione respiratoria Febbre senza localizzazione</p>	<p>Neoplasia attiva Immunodeficienza primaria Immunosoppressione iatrogena Immuno-modulazione iatrogena Febbre nelle 2 settimane precedenti Terapia antibiotica nelle precedenti 48 ore Infezione da HBV o HCV provata o sospetta Infezione da HIV provata o sospetta</p>

					Disordine metabolico congenito severo Ritardo psico-motorio severo
Portefaix et al. ⁴⁴ <i>Journal of Clinical Medicine</i> 2022	Osservazionale prospettico di coorte	Francia <i>Multicentrico</i> Ricovero ospedaliero, Reparto Pediatrico, Unità di cure intermedie, Reparto di terapia intensiva	N = 669 (analizzati 240) 240 TEST set 412 TRAIN set	Età 7 giorni – 36 mesi Sospetta infezione batterica severa definita da febbre > 38.0 °C di durata ≥ 6 ore per età 7 giorni – 3 mesi febbre ≥ 38.5 °C di durata ≥ 6 ore ma < 7 giorni per età 3 mesi – 36 mesi Prescrizione di esami ematici	Immunodeficienza Malattia autoimmunitaria Malattia infiammatoria cronica Terapia antibiotica nelle precedenti 48 ore Vaccinazione con inattivato nelle precedenti 48 ore Vaccinazione con MMR nei precedenti 10 giorni Chirurgia nei 7 giorni precedenti
Chokkalla et al. ⁴⁰ <i>Clinica Chimica Acta</i> 2023	Osservazionale retrospettivo di coorte	USA <i>Singolo centro</i> Pronto Soccorso	N = 60	Età < 18 anni Febbre > 37.5 °C Sintomi ≤ 7 giorni Malattia febbrile acuta Test virale positivo Emocoltura positiva	Neoplasia attiva Immunodeficienza Immunosoppressione Immuno-modulazione Infezione da HBV o HCV Infezione da HIV

<p>Klein et al.⁴⁶ <i>PEDIATRICS</i> 2023</p>	<p>Osservazionale retrospettivo di coorte (SPIRIT)</p>	<p>Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso e Reparto Pediatrico</p>	<p>N = 2155 (1561 analizzati)</p>	<p>Età 3 mesi – 18 anni Febbre Sintomi ≤ 7 giorni Infezione febbrile acuta</p>	<p>Neoplasia di origine ematologica Immunodeficienza congenita/acquisita Malattia febbrile nelle 3 settimane precedenti Trauma o ustione nei 7 giorni precedenti Infezione gastrointestinale Infezione da HBV o HCV Aspettativa o qualità di vita compromesse</p>
<p>Lacroix et al.⁴³ <i>PLoS ONE</i> 2023</p>	<p>Osservazionale prospettico di coorte</p>	<p>Svizzera <i>Singolo centro</i> Pronto Soccorso Pediatrico</p>	<p>N = 241 (173 analizzati)</p>	<p>Età < 3 anni Febbre senza localizzazione</p>	<p>Neoplasia Immunosoppressione iatrogena Immunodeficienza primaria/secondaria Comorbidità predisponenti a infezioni</p>
<p>Mor et al.⁴⁵ <i>PloS ONE</i> 2023</p>	<p>Osservazionale prospettico di coorte (dallo studio ROSETTA)</p>	<p>Israele <i>Singolo centro</i> Pronto Soccorso</p>	<p>N = 287 (214 analizzati)</p>	<p>Età 3 mesi – 18 anni Febbre ≥ 38.0 °C Infezione respiratoria Infezione genito-urinaria Infezione gastro-intestinale Febbre senza localizzazione Prescrizione di esami ematici</p>	<p>Neoplasia attiva Stato post-trapianto Immunodeficienza primaria o secondaria Terapia antibiotica nelle precedenti 48 ore Infezione febbrile nelle 2 settimane precedenti Disordine metabolico da moderato a severo Infezione da HBV o HCV provata o sospetta Infezione da HIV provata o sospetta Altre patologie croniche severe</p>

Sottoanalisi di accuratezza diagnostica relative a specifiche corti ottenute da studi precedenti					
Ashkenazi et al. ²⁹ <i>European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases</i> 2018	Osservazionale prospettico di coorte (dallo studio CURIOSITY)	Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso, Pronto Soccorso Pediatrico, Reparto Pediatrico, di medicina interna, Ricovero ospedaliero	N = 314 111 adulti 203 bambini	≥ 18 anni (adulti) < 18 anni (bambini) Febbre > 37.5 °C Sintomi ≤ 12 giorni Infezione respiratoria Febbre senza localizzazione	Neoplasia attiva Immunodeficienza congenita Terapia immuno-soppressiva Terapia immuno-modulante Infezione acuta nelle 2 settimane precedenti Infezione da HBV o HCV Infezione da HIV
Stein et al. ¹⁷ <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> 2018	Osservazionale prospettico di coorte (dallo studio CURIOSITY)	Israele <i>Multicentrico</i> Pronto Soccorso, Pronto Soccorso Pediatrico, Reparto Pediatrico e di medicina interna	N = 161 (124 analizzati) 54 adulti 70 bambini	>18 anni (adulti) ≤ 18 anni (bambini) Febbre > 37.5 °C Sintomi ≤ 12 giorni Infezione respiratoria inferiore	Neoplasia attiva Immunodeficienza congenita Terapia immuno-soppressiva Terapia immuno-modulante Infezione acuta nelle 2 settimane precedenti Infezione da HBV o HCV
Papan et al. ⁴⁷ <i>Journal of Medical Virology</i> 2022	Osservazionale prospettico di coorte (dallo studio AutoPilot-Dx)	Germania Italia <i>Multicentrico</i> Ospedale Pediatrico	N = 333	Età 90 giorni – 18 anni Febbre ≥ 38.0 °C Sintomi ≤ 7 days Infezione respiratoria Febbre senza localizzazione Singolo virus identificato	Neoplasia attiva Immunodeficienza primaria Terapia immuno-soppressiva Terapia immuno-modulante Febbre nei 14 giorni precedenti Terapia antibiotica di durata > 48 ore

					<p>Infezione da HBV o HCV provata o sospetta</p> <p>Infezione da HIV provata o sospetta</p> <p>Disordine metabolico congenito severo</p> <p>Ritardo psico-motorio severo</p>
<p>Stein et al.³⁹</p> <p><i>Frontiers in Pediatrics</i></p> <p>2022</p>	<p>Osservazionale prospettico di coorte (dagli studi CURIOSITY e OPPORTUNITY)</p>	<p>Paesi Bassi</p> <p>Israele</p> <p><i>Multicentrico</i></p> <p>Ricovero ospedaliero</p>	<p>N = 142</p> <p>(127 analizzati)</p>	<p>Età 3 mesi – 20 anni</p> <p>Sintomi da infezione</p> <p>Positività per Adenovirus (multiplex-PCR) al tampone nasale</p>	<p>Infezione acuta nelle 2 settimane precedenti</p> <p>Immunodeficienza congenita</p> <p>Terapia immuno-soppressiva</p> <p>Terapia immuno-modulante</p> <p>Neoplasia attiva</p> <p>Infezione da HIV</p> <p>Infezione da HBV o HCV</p> <p>Immunodeficienza primaria o secondaria</p> <p>Febbre nelle 3 settimane precedenti</p> <p>Disordine metabolico da moderato a severo</p> <p>Ritardo psicomotorio</p>

Studi che valutano il cambiamento nella prescrizione di antibiotici					
Fröhlich et al. ⁴² <i>Infection</i> 2023	Osservazionale prospettico di coorte	Germania <i>Singolo centro</i> Pronto Soccorso Pediatrico	N = 53	Bambini e adolescenti Età > 90 giorni Infezione respiratoria Febbre senza localizzazione Sintomatologia da COVID-19	/
Kalmovich et al. ⁸ <i>Biomedicines</i> 2023	Osservazionale prospettico di coorte	Israele <i>Multicentrico</i> Centro di cure urgenti	N = 152 64 adulti 88 bambini	A discrezione del singolo medico	Questionario incompleto Eziologia non infettiva

Tabella 3. Caratteristiche degli studi inclusi.

Autore, giornale e anno di pubblicazione	Scopo dello Studio	Gold standard diagnostico	Età media e proporzione dei sessi	Tipo di infezione secondo il parere di esperti	Accuratezza (AUC)	Risultati
Studi di accuratezza diagnostica su coorti originali						
Oved et al. ¹³ <i>PLoS ONE</i> 2015	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	/ 53.0% maschi	319 infezioni batteriche 334 infezioni virali 112 casi controllo 98 non classificabili Bambini: 130 infezioni batteriche 272 infezioni virali	0.94 (95% CI 0.92-0.96)	Non stratificati per età SE 0.87 (95% CI 0.83-0.91) SP 0.90 (95% CI 0.86-0.93)
Srugo et al. ¹⁶ <i>PEDIATRICS</i> 2017	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	4.1 anni 53.0% maschi	68 infezioni batteriche 239 infezioni virali 54 non classificabili	/	SE 93.8% (95% CI 87.8%-99.8%) SP 89.8% (95% CI 85.6%-94.0%) VPP 74.4% (95% CI 63.6%-83.4%) VPN 97.9% (95% CI 94.7%-99.4%)

van Houten et al. ⁹ <i>The Lancet Infectious Diseases</i> 2017	Accuratezza Diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	21 mesi 56.0% maschi	71 infezioni batteriche 435 infezioni virali 71 non classificabili	0.90 (95% CI 0.86-0.95)	SE 86.7% (95% CI 75.8-93.1) SP 91.1% (95% CI 87.9-93.6) VPP 60.5% (95% CI 49.9-70.1) VPN 97.8% (95% CI 95.6-98.9)
Ross et al. ⁴¹ <i>PLoS ONE</i> 2021	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	18.5 anni 46.5% maschi	47 infezioni batteriche 162 infezioni virali 77 casi non infettivi	Batteriche: 0.832 (95% CI 0.771-0.893) Virali 0.843 (95% CI 0.799-0.888)	Infezioni batteriche: SE 80.9% (95% CI 66.7%-90.9%) SP 73.2% (95% CI 67.1%-78.7%) VPP 37.3% (95% CI 31.6%-43.4%) VPN 95.1% (95% CI 91.5%-97.2%) Infezioni virali: SE 84.6% (95% CI 78.1%-93.3%) SP 62.1% (95% CI 53.0%-70.7%) VPP 74.5% (95% CI 69.7%-78.7%)

						VPN 75.5% (95% CI 67.7%-81.9%)
Papan et al. ⁷ <i>Clinical Microbiology and Infection</i> 2022	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	3.5 anni 58.1% maschi	104 infezioni batteriche 628 infezioni virali 276 non classificabili	/	SE 93.7% (95% CI 88.7-98.7) SP 94.2% (95% CI 92.2-96.1) VPP 98.9% (95% CI 98.0-99.8) VPN 73.0% (95% CI 65.0-81.0)
Portefaix et al. ⁴⁴ <i>Journal of Clinical Medicine</i> 2022	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	264.5 giorni 51.2% maschi	206 infezioni batteriche 446 infezioni virali 17 non classificabili	TEST set: 0.810 (95% CI 0.754-0.866) TRAIN set: 0.819 (95% CI 0.776-0.862)	TEST set: SE 84%, SP 61% VPP 53%, VPN 88% TRAIN set: SE 82%, SP 61% VPP 47%, VPN 89%
Chokkalla et al. ⁴⁰ <i>Clinica Chimica Acta</i> 2023	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	/ 42.0% maschi	13 infezioni batteriche 38 infezioni virali 9 co-infezioni	0.90 (95% CI 0.79-0.97)	SE 94% (95% CI 84-100%) SP 88% (95% CI 77-99%) VPP 81% (95% CI 64-98%) VPN 97% (95% CI 91-100%)

Klein et al. ⁴⁶ <i>PEDIATRICS</i> 2023	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	1.8 anni 54.0% maschi	284 infezioni batteriche 1277 infezioni virali	/	SE 84.9% (95% CI 79.8-89.0) SP 93.1% (95% CI 91.5-94.5) VPP 72.2% (95% CI 66.7-77.2) VPN 96.7% (95% CI 95.5-97.6)
Lacroix et al. ⁴³ <i>PLoS ONE</i> 2023	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	18.1 mesi 61.0% maschi	28% infezioni batteriche 72% infezioni virali	0.827 (CI 0.764-0.890)	SE 39.7% (95% CI 27.6-52.8) SP 93.2% (95% CI 87.8-96.7)
Mor et al. ⁴⁵ <i>PLoS ONE</i> 2023	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	1.3 anni 60.3% maschi	18 infezioni batteriche 196 infezioni virali 34 non classificabili	0.96 (95% CI 0.89-1)	SE 88.9% (95% CI 74.4-100) SP 92.1% (95% CI 88.1-96.0) VPP 53.3% (95% CI 35.5-71.2) VPN 98.8% (95% CI 97.1-100)
Sottoanalisi di accuratezza diagnostica relative a specifiche corti ottenute da studi precedenti						
Ashkenazi et al. ²⁹ <i>European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases</i> 2018	Accuratezza diagnostica	Consensus di gruppo di medici esperti	Adulti 49.8 anni Bambini 4.1 anni 58.0% maschi	139 infezioni batteriche 175 infezioni virali	0.940 (95% CI 0.912-0.968)	SE 95.2% (95% CI 88.5-100) SP 94.1% (95% CI 90.1-98.1) VPP 83.3% (95% CI 72.4-94.3) VPN 98.5% (95% CI 94.2-100)

<p>Stein et al.¹⁷ <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i> 2018</p>	<p>Accuratezza diagnostica</p>	<p>Consensus di gruppo di medici esperti</p>	<p>Adulti 18.8 anni 64.0% maschi Bambini 3.9 anni 59.0% maschi</p>	<p>88 infezioni batteriche 36 infezioni virali</p>	<p>0.95 (95% CI 0.92-0.99)</p>	<p>SE 93% (95% CI 87%-99%) SP 91% (95% CI 80%-100%) VPP 96% (95% CI 89%-99%) VPN 86% (95% CI 72%-93%)</p>
<p>Papan et al.⁴⁷ <i>Journal of Medical Virology</i> 2022</p>	<p>Correlazione tra carica virale e biomarcatori</p>	<p>Consensus di gruppo di medici esperti</p>	<p>3.38 anni 57.7% maschi</p>	<p>20 infezioni batteriche 232 infezioni virali 81 non classificabili</p>	<p>/</p>	<p>/</p>
<p>Stein et al.³⁹ <i>Frontiers in Pediatrics</i> 2022</p>	<p>Accuratezza diagnostica</p>	<p>Consensus di gruppo di medici esperti</p>	<p>4.1 anni 50.7% maschi</p>	<p>12 infezioni batteriche 115 infezioni virali 15 non classificabili</p>	<p>/</p>	<p>SE 100% (95% CI 100.0%-100%) SP 89.5% (95% CI 83.2%-95.8%) VPN 100% (95% CI 92.6%-100%)</p>

Studi che valutano il cambiamento nella prescrizione di antibiotici						
Autore, giornale e anno di pubblicazione	Outcome primario	Gruppo di confronto	Età media	Tipo di infezione secondo il parere di esperti	Numero di pazienti con prescrizione di antibiotici nel gruppo di confronto	Numero di pazienti con prescrizione di antibiotici nel gruppo MeMed BV®
Fröhlich et al. ⁴² <i>Infection</i> 2023	Prescrizione antibiotica	Consensus di gruppo di medici esperti	3.1 anni 45.3% maschi	28.3% infezioni batteriche 50.9% infezioni virali	Probabile: 15/53 (28.3%) Incerta: 14/53 (26.4%) Improbabile: 24/53 (45.3%)	Probabile: 12/15 (80%) Incerta: 6/14 (42.9%) Improbabile: 1/24 (4.17%)
Kalmovich et al. ⁸ <i>Biomedicines</i> 2023	Prescrizione antibiotica	Discrezione del singolo medico	Adulti 43 anni Bambini 1.7 anni 49.3% maschi	32 infezioni batteriche 99 infezioni virali	Probabile: 39/131 (29.77%) Incerta: 38/131 (29.01%) Improbabile: 54/131 (41.22%)	Probabile: 30/39 (76.92%) Incerta: 14/38 (36.84%) Improbabile: 11/54 (20.37%)

Tabella 4. Outcome analizzati e risultati degli studi inclusi.

AUC: area under the curve; SE: sensibilità; SP: specificità; VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo.

4.1.1 Studi di accuratezza diagnostica

14 studi inclusi nella revisione sistematica consideravano come outcome primario l'accuratezza diagnostica del test in confronto al parere di un gruppo di medici esperti.

I dati estratti ed analizzati da questi articoli hanno mostrato una performance differente di MeMed BV[®] a seconda dei diversi criteri di inclusione ed esclusione e del diverso contesto assistenziale. Alcuni studi hanno evidenziato una sensibilità elevata (100% nello studio di Stein et al. del 2022)³⁹, altri una specificità elevata (94,2% nello studio di Papan et al. del 2022)⁷. Negli articoli in cui è stata valutata, l'“Area Under the Curve” (AUC), questo parametro ha mostrato costantemente valori elevati compresi tra 0.8 e 1.0, suggerendo una elevata capacità discriminativa di MeMed BV[®].

4.1.1.1 Studi su popolazione originale

Lo studio di Oved et al. del 2015 è il primo in ordine temporale che ha valutato l'accuratezza diagnostica di MeMed BV[®] e rappresenta un punto di riferimento fondamentale per la definizione del razionale dietro la combinazione dei marcatori utilizzati nel test. Questa ricerca ha sottolineato l'importanza di un approccio basato sul profilo proteomico dell'ospite per discriminare tra infezioni batteriche e virali. Tale studio ha coinvolto un ampio campione di pazienti, includendo sia la popolazione adulta che pediatrica con infezione febbrile. L'identificazione della combinazione ottimale di marcatori nel MeMed BV[®] è stata il risultato di un'analisi approfondita attraverso algoritmi di selezione e modelli computazionali di 17 proteine. L'AUC riportata da questo studio è risultata pari a 0.94 (95% CI 0.92-0.96), indicando una forte capacità discriminante del test. La sensibilità e la specificità misurate sono risultate rispettivamente di 87% (95% CI 83%-91%) e 90% (95% CI 86%-93%). Tali dati consideravano tuttavia la popolazione generale, mentre non venivano forniti dati stratificati per età¹³. Sono stati poi analizzati altri studi che hanno indagato l'accuratezza di MeMed BV[®] come test diagnostico per differenziare l'eziologia infettiva batterica e virale, ad esempio quello di Srugo et al. del 2017 che ha documentato una sensibilità del 93.8% (95% CI 87.8%-99.8%)

e una specificità dell'89.8% (95% CI 85.6%-94.0%), superando la precisione di PCR e della procalcitonina¹⁶. Dallo studio di van Houten et al. del 2017 sono emersi, invece, una sensibilità dell'86,7% (95% CI 75.8-93.1), una specificità del 91,1% (95% CI 87.9-93.6), un valore predittivo positivo del 60,5% (95% CI 49.9-70.1) e un valore predittivo negativo del 97,8% (95% CI 95.6-98.9)⁹.

Lo studio Chokkalla et al. del 2023 si proponeva di validare l'immunoanalisi MeMed BV[®] in un contesto puramente pediatrico. I risultati hanno evidenziato una precisione del test con sensibilità complessiva del 94% (95% CI 84-100%) e specificità complessiva dell'88% (95% CI 77-99%) nell'identificazione di infezioni batteriche. L'analisi ha mostrato come MeMed BV[®] sia riuscito ad ottenere una maggior accuratezza diagnostica rispetto a biomarcatori di routine come la conta dei globuli bianchi, la procalcitonina e la PCR⁴⁰.

Nello studio di Klein et al. del 2023 si può notare come in 736 casi incerti su una coorte di 3003 bambini febbrili, il test MeMed BV[®] abbia presentato una sensibilità del 89.7% (CI 82.4–94.3%) e una specificità del 92.6% (CI 90.0–94.5%), superando significativamente il sospetto eziologico del medico⁴⁶.

Lo studio di Lacroix et al. del 2023 ha dimostrato un'elevata accuratezza diagnostica di MeMed BV[®] sia in pazienti con più di 90 giorni che in quelli con meno di 90 giorni, anche se con una sensibilità del 29.3% (CI 16.1–45.5%). Lo studio di Papan et al. del 2022 ha analizzato, invece, una coorte di età compresa tra i 90 giorni e i 18 anni. Su 732 pazienti analizzati, il test ha dimostrato una sensibilità del 93.7% (95% CI 88.7-98.7) e specificità del 94.2% (95% CI 92.2-96.1), con un valore predittivo positivo del 73.0% (95% CI 65.0-81.0) e un valore predittivo negativo del 98.9% (95% CI 98.0-99.8)⁷.

Nello studio di Mor et al. del 2023, i risultati dello score sono stati posti a confronto con l'eziologia precedentemente sospettata dal gruppo di medici esperti. Il test ha dimostrato una sensibilità del 88.9% (95% CI 74.4-100) e specificità del 92.1% (95% CI 88.1-96.0), con un valore predittivo positivo del 53.3% (95% CI 35.5-71.2) e un valore predittivo negativo del 98.8% (95% CI 97.1-100), riducendo gli errori diagnostici di circa il 2 volte⁴⁵.

Lo studio di Portefaix et al. del 2022 si è concentrato su bambini febbrili di età compresa tra i 7 giorni e i 36 mesi, con sospetto di infezione batterica severa. Su

652 bambini analizzati sono stati misurati i livelli di sette proteine della fase acuta (PCR, PCT, interleuchina-6, lipocalina-2a, myxovirus-A, TRAIL, IP-10). Diverse combinazioni di marcatori hanno superato PCR e PCT, anche se nessuna ha raggiunto i criteri di performance prefissati di $LR+ \geq 5,67$ e $LR- \leq 0,5$.⁴⁴

Lo studio di Ross et al. del 2021 ha confrontato invece tre strategie di risposta dell'ospite per distinguere tra eziologia batterica e virale nelle infezioni acute delle vie respiratorie. Questi marcatori sono la procalcitonina, l'mRNA panel e le tre proteine del MeMed BV[®] che hanno dimostrato, in questa analisi, una sensibilità e specificità rispettivamente del 92% e dell'83% per il pannello di mRNA, dell'81% e del 73% per il pannello di proteine del MeMed BV[®] e del 68% e dell'87% per la procalcitonina⁴¹.

Per otto di questi studi è stato possibile eseguire una metanalisi. Sono stati esclusi gli studi di Oved et al. del 2015¹³ e Ross et al. del 2021⁴¹ in quanto non è stato possibile ottenere i dati grezzi per i soggetti di età pediatrica. Il calcolo di sensibilità e specificità degli studi su cui è stato possibile effettuare la metanalisi, sulla base dell'estrazione dei dati grezzi delle tabelle 2 x 2 per il calcolo delle misure di accuratezza diagnostica, ha evidenziato valori di sensibilità e specificità maggiori dell'80% per tutti gli studi ad eccezione di Lacroix et al. del 2023⁴³ che tuttavia prendeva in considerazione anche i risultati intermedi del test e pazienti con punteggi equivoci. La metanalisi, come si può anche vedere in Figura 6, ha evidenziato una sensibilità complessiva di 0.87 (95% CI 0.79-0.93) e una specificità di 0.90 (95% CI 0.84-0.94). L'eterogeneità, valutata mediante il parametro I^2 , ha mostrato maggiore variabilità in specificità ($\sigma^2 = 0.48$, $I^2 = 82.88\%$) piuttosto che in sensibilità ($\sigma^2 = 0.53$, $I^2 = 66.52\%$).

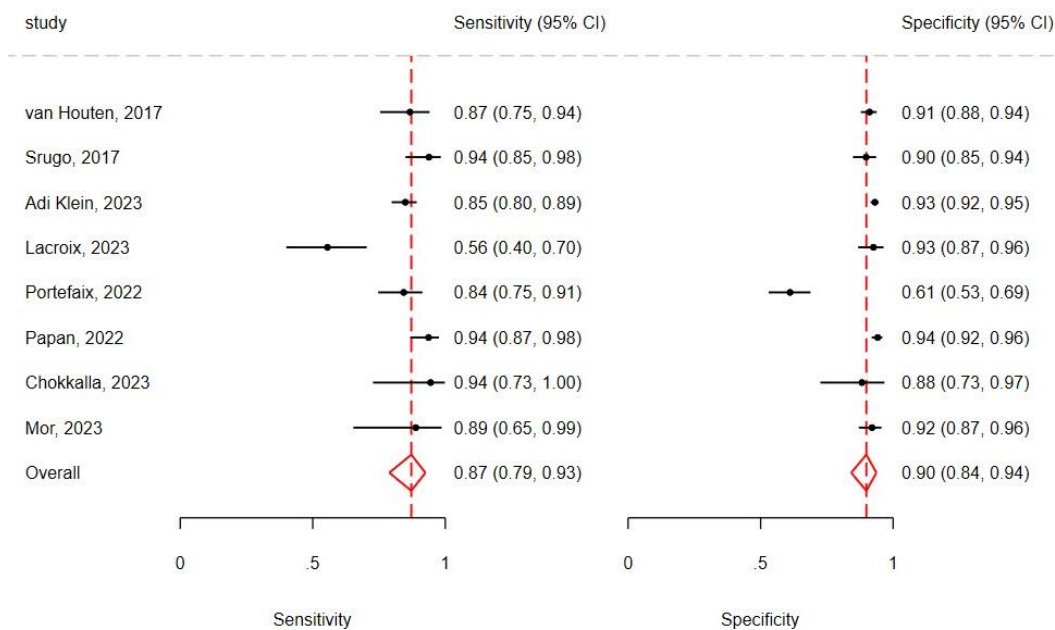


Figura 6. Forrest plot – metanalisi dell’accuratezza diagnostica tra gli studi comparabili. $I^2 = 75.59\%$ (Appendice 3).

4.1.1.2 Studi su sottopopolazioni di coorti originali

Alcuni studi riportavano invece sottoanalisi di specifiche coorti di popolazioni originali. Nello studio di Stein et al. del 2018 viene confrontata l’accuratezza diagnostica di MeMed BV[®] con i parametri di routine per distinguere tra infezioni batteriche e virali delle vie respiratorie inferiori. Il test ha dimostrato una sensibilità del 93% (95% CI 87%-99%) e una specificità del 91% (95% CI 80%-100%), superando i parametri di routine come globuli bianchi, PCR e radiografia toracica¹⁷. Nello studio di Stein del 2022, invece, veniva confermata l’efficacia di MeMed BV[®], ma in una popolazione di soggetti adenovirus positivi. I risultati hanno evidenziato una sensibilità del 100% (95% CI 100%-100%), garantendo una precisione ottimale nella diagnosi differenziale. La specificità dell’89.5% (95% CI 83.2%-95.8%) e il valore predittivo negativo del 100% (95% CI 92.6%-100%) confermano la robustezza del test. Nello studio, invece, di Ashkenazi et al. del 2018, MeMed BV[®] ha dimostrato, nella popolazione pediatrica con sospetto di infezione respiratoria o con febbre senza localizzazione, una sensibilità del 95.2% (95% CI 88.5%-100%) e una specificità del 94,1% (95% CI 90.1%-98.1%), significativamente superiori rispetto a PCR, procalcitonina, interleuchina-6 ed altri

biomarcatori. Nello studio veniva anche evidenziato un potenziale effetto nel ridurre dell'88% l'uso inappropriato di antibiotici grazie all'utilizzo del BV score²⁹. Lo studio di Papan et al. del 2022 ha tenuto conto della correlazione tra il carico virale e i biomarcatori TRAIL, IP-10 e PCR, andando oltre l'approccio qualitativo, cioè la presenza o l'assenza di un virus. I dati estrapolati dimostrano il chiaro legame fisiologico tra l'intensità della replicazione virale e la risposta immunitaria dell'ospite, esemplificata dai livelli di TRAIL e IP-10, dando prova del suo potenziale come strumento complementare per definire la severità di malattia⁴⁷.

4.1.2 Studi relativi al cambiamento nella prescrizione di antibiotici

Solamente 2 dei 16 studi inclusi nella nostra analisi si concentravano sull'impatto di MeMed BV[®] nella prescrizione di antibiotici.

Lo studio di Kalmovich et al. del 2023 dimostra un'influenza del test sulla prescrizione della terapia antibiotica nel 21,4% dei pazienti, in termini di riduzione delle prescrizioni⁸. Lo studio di Fröhlich et al. 2023, invece, ha rivelato che il 64% dei medici ha considerato MeMed BV[®] uno strumento diagnostico utile, confermando le decisioni di trattamento antibiotico nel 52% dei casi e modificandolo nel 12%⁴².

4.1.3 Valutazione della qualità degli studi

Per valutare la qualità degli studi inclusi nella revisione sistematica, lo strumento QUADAS-2 (*Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2*) è stato applicato a tutti gli studi di accuratezza diagnostica (Appendice 4). La Tabella 5 e la Figura 6 mostrano la valutazione sintetica del rischio di bias dei 14 studi di accuratezza diagnostica presi in considerazione.

Approfondendo l'analisi, si può notare come per tutti gli studi il dominio "standard di riferimento", abbia un rischio di bias basso. Dalla valutazione emerge, inoltre, una ottima applicabilità di tutti gli studi.

Per quanto concerne invece il dominio "selezione dei pazienti" tra gli studi considerati, emerge che la qualità della selezione del paziente è stata valutata come

non chiara in 9 di essi (Ashkenazi et al. 2013²⁹, Chokkalla et al. 2023⁴⁰, Klein et al. 2023⁴⁶, Mor et al. 2023⁴⁵, Papan et al. 2022⁷, Papan et al. 2022⁴⁷, Ross et al. 2021⁴¹, Srugo et al. 2017¹⁶, Stein et al. 2018¹⁷ e 2022³⁹, van Houten et al. 2017⁹), mentre in 5 articoli è stato attribuito un rischio di bias basso.

Per quanto riguarda il “test in studio”, si evidenzia come la maggior parte degli studi dimostri un rischio basso o non chiaro. In contrasto, solo due studi (Oved et al. 2015¹³ e Portefaix et al. 2022⁴⁴) presentano un rischio di bias giudicato alto. Altra criticità rilevante per la maggior parte degli studi risiede nel non comprendere l’intera popolazione inclusa per l’analisi di accuratezza del test, ma solamente soggetti con diagnosi certa di infezione batterica o virale.

Gli studi inerenti all’impatto del test sulla prescrizione della terapia antibiotica sono stati valutati tramite *NIH Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies* (Appendice 4). Per lo studio di Kamovich⁸ emerge una valutazione di qualità complessiva SCARSA (*POOR*) e per lo studio di Fröhlich⁴² emerge una valutazione di qualità complessiva ACCETTABILE (*FAIR*) dello studio rischio di bias FAIR.

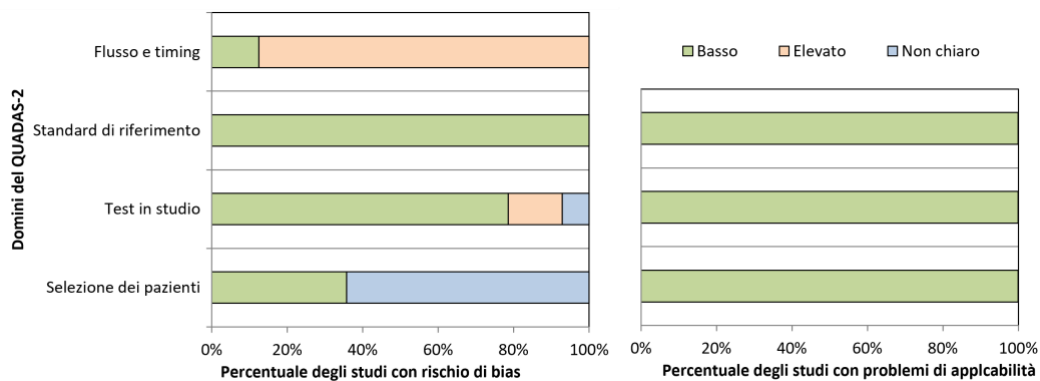


Figura 6. Valutazione del rischio di bias degli studi inclusi nella revisione sistematica.

Studi	RISCHIO DI BIAS				APPLICABILITÀ		
	Selezione del paziente	Test indice	Standard di riferimento	Flusso e Tempistica	Selezione del paziente	Test indice	Standard di riferimento
Ashkenazi ²⁹ 2013	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Chokkalla ⁴⁰ 2023	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Klein ⁴⁶ 2023	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Lacroix ⁴³ 2023	😊	?	😊	😞	😊	😊	😊
Mor ⁴⁵ 2023	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Oved ¹³ 2015	😊	😞	😊	😞	😊	😊	😊
Papan ⁷ 2022 CMI	😊	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Papan ⁴⁷ 2022 JMV	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
Portefaix ⁴⁴ 2022	?	😞	😊	😞	😊	😊	😊
Ross ⁴¹ 2021	?	😊	😊	😊	😊	😊	😊
Srugo ¹⁶ 2017	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Stein ¹⁷ 2018	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
Stein ³⁹ 2022	?	😊	😊	😞	😊	😊	😊
van Houten ⁹ 2017	😊	😊	😊	😞	😊	😊	😊




-  Rischio basso
 Rischio elevato
 Rischio non chiaro

Tabella 5. Valutazione del rischio di bias degli studi inclusi nella revisione sistematica

5. DISCUSSIONE

Con la revisione sistematica della letteratura effettuata abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica del test MeMed BV[®] nell'identificare i bambini febbrili con infezione batterica e virale rispetto al gold standard costituito dalla valutazione eseguita da un gruppo di esperti. I risultati ottenuti hanno mostrato valori di sensibilità e specificità maggiori dell'80% per tutti gli studi tranne quello di Lacroix⁴³, il quale presenta una sensibilità del 39.7%.

Questo test si conferma pertanto efficace, con un tasso di accuratezza complessivamente elevato e promettenti capacità diagnostiche. La capacità dimostrata da questo test di identificare correttamente bambini con infezione virale ed infezione batterica, suggerisce che un approccio basato sulla combinazione di biomarcatori proteici propri dell'ospite può rappresentare un ausilio significativo alle attuali metodologie diagnostiche.

Un aspetto cruciale emerso dalla analisi dei singoli studi è l'elevata accuratezza di MeMed BV[®] anche in differenti sottogruppi di pazienti. Come riportato dallo studio di Lacroix⁴³, l'età sembra influenzare le prestazioni del test. In particolare, è stata considerata la fascia d'età dei lattanti, stratificandola tra maggiore e minore di 90 giorni. In questi ultimi la sensibilità è risultata molto bassa. Questi risultati sottolineano l'importanza di considerare attentamente le caratteristiche dei pazienti per la valutazione dei risultati di MeMed BV[®].

Oltre a confrontare il risultato del MeMed BV[®] con il parere di un gruppo di esperti, alcuni studi confrontavano la capacità del MeMed BV[®] di identificare pazienti con infezione batterica o virale con altri metodi diagnostici comunemente utilizzati nella pratica clinica. Ad esempio, l'articolo di van Houten et al. del 2017 dimostrava come il test avesse migliorato significativamente la diagnosi di infezione batterica nei bambini di età compresa tra i 2 e i 60 mesi con un'infezione del tratto respiratorio inferiore o febbre senza localizzazione, rispetto all'uso della sola PCR o PCT¹⁵.

Anche i risultati ottenuti dagli studi di Srugo et al. del 2017 e Stein et al. del 2018 forniscono un interessante confronto tra questo nuovo test e altri ^{16,17}. MeMed BV[®] ha dimostrato, infatti, una precisione diagnostica che supera significativamente in

termini di sensibilità e specificità gli approcci convenzionali nella distinzione tra infezioni batteriche e virali, come la PCR o i test sierologici. Lo studio di Stein et al. 2018 ha valutato inoltre le performance di questo nuovo test rispetto a quelli già di routine, dimostrando risultati notevolmente superiori rispetto alle valutazioni diagnostiche convenzionali, incluse quelle di laboratorio, radiografiche e cliniche¹⁷. In particolare, è emerso che, nonostante alcuni parametri abbiano manifestato un'elevata sensibilità o specificità, nessuno di essi si è rivelato adeguatamente preciso nel differenziare i pazienti con infezione batterica da quelli con infezione virale. Al contrario, MeMed BV[®] ha raggiunto una sensibilità del 93% (95% IC 87%-99%) e una specificità del 91% (95% IC 80%-100%), rappresentando un miglioramento significativo sia nella riduzione dei falsi negativi (evitando il mancato riconoscimento di infezioni batteriche) che dei falsi positivi (contribuendo a limitare l'eccessivo impiego di antibiotici). Questo risultato sottolinea l'efficacia del test nel migliorare la gestione clinica delle infezioni e nell'ottimizzare l'uso degli antibiotici.

Non è stato possibile eseguire la metanalisi per sensibilità e specificità del MeMed BV[®] rispetto ad altre metodiche diagnostiche quali PCR, PCT ed emocromo per l'esiguità degli studi che fornivano i dati sufficienti per la metanalisi e l'elevata variabilità degli stessi.

Lo studio condotto da Stein et al. nel 2022 ha messo in luce invece la capacità del test MeMed BV[®] nel distinguere tra infezioni virali, batteriche e coinfezioni all'interno di una specifica sottopopolazione di pazienti pediatrici con riscontri microbiologici positivi per adenovirus. Questi risultati enfatizzano il potenziale impiego del MeMed BV[®] anche in scenari clinici caratterizzati da coinfezioni, in cui si manifesta la presenza simultanea di patogeni virali e batterici. Ciò sottolinea la versatilità del test nell'affrontare situazioni complesse e suggerisce la sua utilità in contesti in cui la presenza concomitante di diversi agenti infettivi rappresenta una sfida diagnostica significativa³⁹.

Come discusso nello studio condotto da Ross et al. nel 2021, il test MeMed BV[®] emerge come uno strumento significativamente migliore rispetto agli altri approcci attualmente disponibili⁴¹. I dati raccolti in questo studio forniscono prove concrete

che la distinzione nei profili di risposta immunitaria può costituire una robusta base per una precisa discriminazione tra le infezioni batteriche e virali.

Lo studio condotto da Mor et al. nel 2023 ha evidenziato come la disponibilità del punteggio MeMed BV[®] si traduca in un ausilio prezioso nel processo decisionale clinico. Tale strumento ha dimostrato la sua utilità anche nel contesto pediatrico, contribuendo a ridurre significativamente il tasso complessivo di errori diagnostici di circa 2 volte, dal 15.9% al 8.2%, un miglioramento statisticamente significativo ($p = 0.016$) e clinicamente rilevante⁴⁵.

Per quanto riguarda la capacità del test MeMed BV[®] nel modificare le prescrizioni di antibiotici, come riportato dallo studio di Kalmovich et al. pubblicato nel 2023, la prescrizione di antibiotico è stata modificata in tutti i casi in cui il risultato del test era compatibile con infezione batterica e per il 40,9% delle infezioni virali⁸. Questo studio riporta una modifica nell'87.0% dei casi per quanto riguarda la prescrizione di antibiotici, mentre nel restante 13.0% dei casi non ha avuto alcun impatto⁸. Anche lo studio di Papan ha riscontrato una riduzione della percentuale della prescrizione di terapia antibiotica, dall'80% al 57,6% in caso di prescrizione secondo MeMed BV[®]⁷. Questo risultato evidenzia il potenziale del nuovo test nel mitigare l'uso eccessivo di antibiotici, favorendo un utilizzo mirato di tali farmaci. Nonostante i progressi evidenziati, è fondamentale affrontare le limitazioni intrinseche agli studi inclusi, come l'eterogeneità tra i protocolli di studio, la variabilità nelle popolazioni pediatriche, la diversità di condizioni cliniche e la potenziale presenza di bias. Una valutazione critica degli studi selezionati è fondamentale per una corretta interpretazione dei risultati della revisione sistematica. Dall'analisi della qualità degli articoli, emerge infatti una diversità nella qualità metodologica, con particolare rischio di bias per quanto riguarda le fasi di selezione del paziente e di analisi parziale del campione di soggetti incluso. La percentuale di risultati equivoci nella popolazione studiata, spesso esclusi dalle valutazioni di accuratezza diagnostica, rappresenta infatti una limitazione rilevante. Nel caso dello studio condotto da Chokkalla et al. nel 2023, ad esempio, il 13,5% dei risultati è risultato inconcludente, con la metà associata a un esito positivo al test PCR virale e l'altra metà a un esito positivo all'emocoltura⁴⁰. Nello studio di Lacroix et al. del 2023, emerge invece un risultato di sensibilità molto inferiore

rispetto a quanto riportato dagli altri studi, probabilmente a causa dell'inclusione di esiti incerti nella valutazione effettuata dal gruppo di esperti⁴³. Questo dato enfatizza la necessità di adottare un approccio più cauto e attento nell'utilizzo del test, specialmente in scenari clinici complessi, e sottolinea l'importanza di condurre valutazioni cliniche e di laboratorio approfondite per le diagnosi incerte. La presenza di risultati ambigui potrebbe inoltre richiedere risorse aggiuntive, aumentando la complessità nella gestione dei pazienti e generando ulteriori costi per la conferma diagnostica definitiva⁴⁰.

Anche il test MeMed BV[®], sebbene presenti promettenti risultati, è soggetto a diverse limitazioni che necessitano di una attenta valutazione. In primo luogo, le valutazioni incerte dell'eziologia assegnata dal gruppo di esperti costituisce un elemento di potenziale distorsione, essendo fondamentalmente un giudizio soggettivo. L'inclusione di casi incerti rappresenta pertanto una sfida metodologica, richiedendo una consapevole interpretazione dei risultati.

I risultati della revisione sistematica e metanalisi richiedono una ponderata interpretazione, tenendo conto dei limiti che caratterizzano questo approccio metodologico. Tuttavia, al fine di massimizzare l'efficacia della ricerca e di comprendere il maggior numero di studi, è stata implementata una strategia di ricerca estensiva ed una revisione manuale dei riferimenti degli studi inclusi. In aggiunta, l'eterogeneità degli studi inclusi è un fattore che può influenzare il confronto e la metanalisi dei dati raccolti.

Emerge infine la necessità di un focus specifico su sottogruppi di pazienti e condizioni cliniche particolari, soprattutto per quanto riguarda le sottopopolazioni più fragili come i pazienti oncologici, immunodepressi o nei primi mesi di vita. È comunque opportuno puntualizzare che il test non è progettato per tali categorie di pazienti in quanto si presume che le disfunzioni del sistema immunitario possano influenzare la produzione di TRAIL e IP-10. Ulteriori studi sono necessari per poter valutare la cinetica di questi marcatori nei soggetti immunodepressi in quanto, attualmente, mancano studi che abbiano valutato in modo concreto i livelli ematici e la dinamica di tali marcatori in questi specifici pazienti.

Approfondire ulteriormente la comprensione dei meccanismi immunologici alla base delle risposte dell'ospite potrebbe contribuire a ottimizzare l'efficacia di

MeMed BV[®] ed espandere il potenziale clinico del test. La sua implementazione dovrebbe essere accompagnata da un'analisi critica del contesto clinico e delle caratteristiche del paziente per ottimizzare l'applicazione e massimizzare l'efficacia di questo nuovo strumento.

Considerata la necessità di ricerca sull'argomento, soprattutto nell'ambito pediatrico, e avendo analizzato con attenzione i punti di forza e le debolezze della letteratura oggetto di questa revisione sistematica, il nostro gruppo di ricerca prevede di intraprendere uno studio multicentrico al fine di valutare l'accuratezza diagnostica e l'impatto del nuovo test MeMed BV[®] nel contesto del pronto soccorso pediatrico in Italia.

6. CONCLUSIONI

Dalla revisione sistematica della letteratura emerge una buona accuratezza diagnostica di MeMed BV® nel discriminare le infezioni batteriche e virali nei bambini febbrili. Nonostante le limitazioni intrinseche degli studi analizzati, l'ampia numerosità campionaria e i dati disponibili contribuiscono a fornire un supporto solido per il potenziale impiego di MeMed BV® nella pratica clinica. L'analisi dettagliata degli articoli inclusi nella revisione sistematica sull'espressione dei biomarcatori TRAIL, IP-10 e PCR in vari contesti assistenziali e tipologie di pazienti pediatrici febbrili, suggerisce che il test rappresenta una risorsa affidabile e precisa per migliorare le decisioni cliniche.

MeMed BV® ha il potenziale di ridurre i costi associati a esami aggiuntivi e al trattamento antibiotico inappropriato, migliorando così l'efficienza dei servizi sanitari e promuovendo una gestione più mirata e personalizzata del paziente. Inoltre, la capacità di ridurre significativamente i falsi positivi sottolinea ancor più una rilevanza nella lotta contro le resistenze agli antibiotici, rappresentando un passo avanti verso una pratica clinica più sostenibile e responsabile. Il MeMed BV® si configura quindi come un ausilio chiave per le decisioni terapeutiche, contribuendo al miglioramento dell'efficacia clinica e alla mitigazione degli impatti negativi associati all'uso inappropriato di antibiotici.

Sono tuttavia necessari ulteriori studi per affrontare le attuali lacune presenti in letteratura e per fornire una base ancor più solida per integrare questo test nella pratica clinica quotidiana. Di fondamentale importanza è inoltre analizzare e comprendere il rapporto costi-benefici di MeMed BV® prima che possa diventare uno strumento diagnostico ampiamente adottato nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Aronoff DM, Neilson EG. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. *Am J Med.* settembre 2001;111(4):304–15.
- 2- Ramgopal S, Janofsky S, Zuckerbraun NS, Ramilo O, Mahajan P, Kuppermann N, et al. Risk of Serious Bacterial Infection in Infants Aged ≤ 60 Days Presenting to Emergency Departments with a History of Fever Only. *J Pediatr.* gennaio 2019;204:191–5.
- 3- Shaw KN, Bachur RG, Chamberlain JM, Lavelle J, Nagler J, Shook JE, curatori. *Fleisher & Ludwig's textbook of pediatric emergency medicine.* 8th edition. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2021.
- 4- Marcante KJ, Kliegman RM, Schuh AM, Nelson WE, curatori. *Nelson essentials of pediatrics.* 9th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2023. 829 p.
- 5- Arora R, Mahajan P. Evaluation of child with fever without source: review of literature and update. *Pediatr Clin North Am.* ottobre 2013;60(5):1049–62.
- 6- Van den Bruel A, Haj-Hassan T, Thompson M, Buntinx F, Mant D, European Research Network on Recognising Serious Infection investigators. Diagnostic value of clinical features at presentation to identify serious infection in children in developed countries: a systematic review. *Lancet Lond Engl.* 6 marzo 2010;375(9717):834–45.
- 7- Papan C, Argentiero A, Porwoll M, Hakim U, Farinelli E, Testa I, et al. A host signature based on TRAIL, IP-10, and CRP for reducing antibiotic overuse in children by differentiating bacterial from viral infections: a prospective, multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect.* maggio 2022;28(5):723–30.
- 8- Kalmovich B, Rahamim-Cohen D, Shapiro Ben David S. Impact on Patient Management of a Novel Host Response Test for Distinguishing Bacterial and Viral Infections: Real World Evidence from the Urgent Care Setting. *Biomedicines.* 22 maggio 2023;11(5):1498.
- 9- van Houten CB, Cohen A, Engelhard D, Hays JP, Karlsson R, Moore E, et al. Antibiotic misuse in respiratory tract infections in children and adults—a prospective, multicentre study (TAILORED Treatment). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* marzo 2019;38(3):505–14.
- 10- Graaf S, Keuning MW, Pajkrt D, Plötz FB. Fever without a source in children: international comparison of guidelines. *World J Pediatr.* febbraio 2023;19(2):120–8.
- 11- Finkelstein JA, Christiansen CL, Platt R. Fever in pediatric primary care: occurrence, management, and outcomes. *Pediatrics.* gennaio 2000;105(1 Pt 3):260–6.

- 12- Silvestro E, Marino R, Cusenza F, Pruccoli G, Denina M, De Intinis G, et al. Antimicrobial stewardship experience in paediatrics: first-year activity report. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* agosto 2021;40(8):1727–35.
- 13- Oved K, Cohen A, Boico O, Navon R, Friedman T, Etshtein L, et al. A Novel Host-Proteome Signature for Distinguishing between Acute Bacterial and Viral Infections. Schildgen O, curatore. *PLOS ONE.* 18 marzo 2015;10(3):e0120012.
- 14- Flynn CE, Guarner J. Emerging Antimicrobial Resistance. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* settembre 2023;36(9):100249.
- 15- van Houten CB, de Groot JAH, Klein A, Srugo I, Chistyakov I, de Waal W, et al. A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect Dis.* aprile 2017;17(4):431–40.
- 16- Srugo I, Klein A, Stein M, Golan-Shany O, Kerem N, Chistyakov I, et al. Validation of a Novel Assay to Distinguish Bacterial and Viral Infections. *Pediatrics.* 1 ottobre 2017;140(4):e20163453.
- 17- Stein M, Lipman-Arens S, Oved K, Cohen A, Bamberger E, Navon R, et al. A novel host-protein assay outperforms routine parameters for distinguishing between bacterial and viral lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* marzo 2018;90(3):206–13.
- 18- de Martino M. and Principi N. Gestione del segno/sintomo febbre in pediatria: Linee Guida della Società Italiana di Pediatria', Società Italiana Pediatri. 2008.
- 19- El-Radhi AS, Barry W. Thermometry in paediatric practice. *Arch Dis Child.* aprile 2006;91(4):351–6.
- 20- Chien YL, Huang FL, Huang CM, Chen PY. Clinical approach to fever of unknown origin in children. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* dicembre 2017;50(6):893–8.
- 21- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Feverish Illness in Children: Assessment and Initial Management in Children Younger Than 5 Years [Internet]. London: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (UK); 2013 [citato 22 gennaio 2024]. (National Institute for Health and Care Excellence: Guidelines). Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK247907/>
- 22- Richardson M, Lakhampaul M, Guideline Development Group and the Technical Team. Assessment and initial management of feverish illness in children younger than 5 years: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2 giugno 2007;334(7604):1163–4.
- 23- Antoon JW, Potisek NM, Lohr JA. Pediatric Fever of Unknown Origin. *Pediatr Rev.* settembre 2015;36(9):380–90; quiz 391.

- 24- Isaacman DJ, Burke BL. Utility of the serum C-reactive protein for detection of occult bacterial infection in children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* settembre 2002;156(9):905–9.
- 25- Pulliam PN, Attia MW, Cronan KM. C-reactive protein in febrile children 1 to 36 months of age with clinically undetectable serious bacterial infection. *Pediatrics.* dicembre 2001;108(6):1275–9.
- 26- Swingler GH. Radiologic differentiation between bacterial and viral lower respiratory infection in children: a systematic literature review. *Clin Pediatr (Phila).* novembre 2000;39(11):627–33.
- 27- Virkki R, Juven T, Rikalainen H, Svedström E, Mertsola J, Ruuskanen O. Differentiation of bacterial and viral pneumonia in children. *Thorax.* maggio 2002;57(5):438–41.
- 28- Giacometti A. Il percorso diagnostico nel paziente febbrile', *Lettere dalla facoltà.* 2019; Available: <https://letteredallafacolta.univpm.it/il-percorso-diagnostico-nel-paziente-febbrile/>
- 29- Ashkenazi-Hoffnung L, Oved K, Navon R, Friedman T, Boico O, Paz M, et al. A host-protein signature is superior to other biomarkers for differentiating between bacterial and viral disease in patients with respiratory infection and fever without source: a prospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* luglio 2018;37(7):1361–71.
- 30- Paul SP, Kini PK, Tibrewal SR, Heaton PA. NICE guideline review: fever in under 5s: assessment and initial management (NG143). *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* giugno 2022;107(3):212–6.
- 31- Kasper DL, Fauci AS, Harrison TR, curatori. *Harrison's infectious diseases.* New York: McGraw-Hill Medical; 2010. 1294 p.
- 32- Enocsson H, Karlsson J, Li HY, Wu Y, Kushner I, Wetterö J, et al. The Complex Role of C-Reactive Protein in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med.* 13 dicembre 2021;10(24):5837.
- 33- Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* febbraio 1999;7(2):169–77.
- 34- Song JJ, Lee YJ. Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily. *Cell Signal.* maggio 2008;20(5):892–906.
- 35- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. γ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature.* giugno 1985;315(6021):672–6.

- 36- van der Does Y, Rood PPM, Ramakers C, Schuit SCE, Patka P, van Gorp ECM, et al. Identifying patients with bacterial infections using a combination of C-reactive protein, procalcitonin, TRAIL, and IP-10 in the emergency department: a prospective observational cohort study. *Clin Microbiol Infect.* dicembre 2018;24(12):1297–304.
- 37- Fever in under 5s: assessment and initial management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2019. Available: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng143>
- 38- Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 29 marzo 2021;372:n71.
- 39- Stein M, Shapira M, Bamberger E, Chistyakov I, Dumov D, Srugo I, et al. BV score differentiates viral from bacterial-viral co-infection in adenovirus PCR positive children. *Front Pediatr.* 1 novembre 2022;10:990750.
- 40- Chokkalla AK, Tam E, Liang R, Cruz AT, Devaraj S. Validation of a multi-analyte immunoassay for distinguishing bacterial vs. viral infections in a pediatric cohort. *Clin Chim Acta.* giugno 2023;546:117387.
- 41- Ross M, Henao R, Burke TW, Ko ER, McClain MT, Ginsburg GS, et al. A comparison of host response strategies to distinguish bacterial and viral infection. Moreira J, curatore. *PLOS ONE.* 14 dicembre 2021;16(12):e0261385.
- 42- Fröhlich F, Gronwald B, Bay J, Simon A, Poryo M, Geisel J, et al. Expression of TRAIL, IP-10, and CRP in children with suspected COVID-19 and real-life impact of a computational signature on clinical decision-making: a prospective cohort study. *Infection.* ottobre 2023;51(5):1349–56.
- 43- Lacroix L, Papis S, Mardegan C, Luterbacher F, L’Huillier A, Sahyoun C, et al. Host biomarkers and combinatorial scores for the detection of serious and invasive bacterial infection in pediatric patients with fever without source. Chegou NN, curatore. *PLOS ONE.* 13 novembre 2023;18(11):e0294032.
- 44- Portefaix A, Pons S, Ouziel A, Basmaci R, Rebaud P, Delafay MC, et al. Performance Evaluation of Host Biomarker Combinations for the Diagnosis of Serious Bacterial Infection in Young Febrile Children: A Double-Blind, Multicentre, Observational Study. *J Clin Med.* 4 novembre 2022;11(21):6563.
- 45- Mor M, Paz M, Amir L, Levy I, Scheuerman O, Livni G, et al. Bacterial vs viral etiology of fever: A prospective study of a host score for supporting etiologic accuracy of emergency department physicians. Amanati A, curatore. *PLOS ONE.* 30 gennaio 2023;18(1):e0281018.

- 46-Klein A, Shapira M, Lipman-Arens S, Bamberger E, Srugo I, Chistyakov I, et al. Diagnostic Accuracy of a Real-Time Host-Protein Test for Infection. *Pediatrics*. 1 dicembre 2023;152(6):e2022060441.
- 47-Papan C, Argentiero A, Adams O, Porwoll M, Hakim U, Farinelli E, et al. Association of viral load with TRAIL, IP-10, CRP biomarker signature and disease severity in children with respiratory tract infection or fever without source: A prospective, multicentre cohort study. *J Med Virol*. gennaio 2023;95(1):e28113.

APPENDICE 1

PRISMA 2020 item checklist

Section and topic	Item #	Check list item	Location where item is reported
Title			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	Pag. 1
Abstract			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	Pag. 4
Introduction			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	Pag. 29
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	Pag. 30
Methods			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	Pag. 37
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organizations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	Pag. 36

Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	Pag. 36
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	Pag. 39
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	Pag. 36
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	Pag 39
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	Pag. 38
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study	Pag. 41

		and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	Pag. 52-57
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	Pag. 40
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	Pag. 40
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	Pag. 46
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	Pag. 61
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	Pag. 59
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	Pag. 63-65

Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	Pag. 63-65
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	Pag. 63-65

Results

Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	Pag. 45-57
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	Pag. 45-51
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	Pag. 45-57
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	pag.46
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	Pag. 63
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarize the characteristics and risk of bias among contributing studies.	Pag. 59-62
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g.	Pag. 63

		confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	Pag. 63-65
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	Pag. 63-65
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	Pag. 63-65
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	Pag. 63-65
<hr/>			
Discussion			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	Pag. 66-68
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	Pag. 68,69
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	Pag. 68, 69
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	Pag. 68, 69
<hr/>			
Other information			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	Pag. 35

	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	Pag. 35
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	Not applicable
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	See Protocol in Prospero
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	See Protocol in Prospero
Availability of data, code, and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	Pag. 72-76

APPENDICE 2

Search Strategy

Embase

((((TRAIL OR 'TNF related apoptosis induced ligand' OR 'tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand') AND (IP-10 OR 'interferon γ induced protein 10' OR 'interferon gamma induced protein 10') AND (CRP OR 'C reactive protein')) OR (MeMed OR 'BV score')) AND (child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* OR preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*))

MEDLINE

((((TRAIL OR "TNF related apoptosis induced ligand" OR "tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand") AND (IP-10 OR "interferon γ induced protein 10" OR "interferon gamma induced protein 10") AND (CRP OR "C reactive protein")) OR (MeMed OR "BV score")) AND (child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* or preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*))

Cochrane Library

((((TRAIL OR "TNF related apoptosis induced ligand" OR "tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand") AND (IP-10 OR "interferon γ induced protein 10" OR "interferon gamma induced protein 10") AND (CRP OR "C reactive protein")) OR (MeMed OR "BV score")) AND (child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* OR preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*))

Scopus

((((TRAIL OR "TNF related apoptosis induced ligand" OR "tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand") AND (IP-10 OR "interferon γ induced protein 10" OR "interferon gamma induced protein 10") AND (CRP OR "C reactive protein"))) OR (MeMed OR "BV score")) AND (child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* OR preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*)

(ALL(child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* or preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*)) AND (((ALL(TRAIL OR "TNF related apoptosis induced ligand" OR "tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand") AND ALL(IP-10 OR "interferon γ induced protein 10" OR "interferon gamma induced protein 10") AND ALL(CRP OR "C reactive protein")))) OR (ALL(MeMed OR "BV score")))

CINAHL

((((TRAIL OR "TNF related apoptosis induced ligand" OR "tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand") AND (IP-10 OR "interferon γ induced protein 10" OR "interferon gamma induced protein 10") AND (CRP OR "C reactive protein"))) OR (MeMed OR "BV score")) AND (child OR children OR paediatr* OR pediater* OR infan* OR kid OR kids OR baby OR babies OR neonat* OR newborn* OR toddler* OR pre-schooler* OR preschooler* OR adolescen* OR youth* OR teen* OR teenage*)

APPENDICE 3

Metanalisi

Dataset

Study	tp	fp	fn	tn
van Houten, 2017	52	34	8	349
Srugo, 2017	61	21	4	185
Adi Klein, 2023	203	78	36	1059
Lacroix, 2023	25	10	20	125
Portefaix, 2022	70	61	13	96
Papan, 2022	89	33	6	532
Chokkalla, 2023	17	4	1	30
Mor, 2023	16	14	2	162

Software

Software STATA/MP 18.0

comando metadta -- Fixed-effects and random-effects meta-analysis, meta-regression and network meta-analysis of diagnostic test accuracy (DTA) studies using logistic and logistic-normal regression.

Reference: Victoria N Nyaga, Marc Arbyn. Comparison and validation of metadta for meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. Res Synth Methods 2023 May;14(3):544-562. doi: 10.1002/jrsm.1634. Epub 2023 Apr 18.

Output

SUMMARY PERFORMANCE ESTIMATES

Parameter	Estimate	95% CI	
Sensitivity	0.87 [0.79,	0.93]
Specificity	0.90 [0.84,	0.94]
Positive Likelihood Ratio	8.6 [5.4,	13.8]
Negative Likelihood Ratio	0.14 [0.08,	0.24]
Diagnostic Odds Ratio	60 [27,	135]

Between-study heterogeneity statistics

	covar	rho
	0.03	0.05
	Tau.sq	I ² (%)
Generalized	0.25	75.59
Sensitivity	0.53	66.52
Specificity	0.48	82.88

LR Test: RE vs FE model

Chi2	degrees of	
statistic	freedom	p-val
108.29	3	0.0000

Tau.sq: è la varianza

I²(%): test d'inconsistenza esprime eterogeneità in percentuale (da 0 a100%), con valori più alti che indicano maggiore eterogeneità tra gli studi. Si rileva una eterogeneità statisticamente significativa quando I² >50%. C'è maggiore eterogeneità in specificità ($\sigma^2 = 0.48$, I² = 82.88%) che in sensibilità ($\sigma^2 = 0.53$, I² = 66.52%)

LR Test: confronta il modello a effetti casuali con quello a effetti fissi. Il valore p è 0.0000, ad indicare che il modello a effetti casuali è migliore rispetto al modello ad effetti fissi.

È stato implementato un modello ad effetti random con la sola intercetta.

```

*****
*****
Marginal summary measures of test accuracy: Absolute measures
*****
*****

```

Effect	Proportion	SE(logit)	z(logit)	P> z	Lower	Upper
Sensitivity	0.87	0.31	6.28	0.00	0.79	0.93
Specificity	0.90	0.26	8.34	0.00	0.84	0.94

NOTE: H0: P = 0.5 vs. H1: P != 0.5
HO testa che log sensibilità e log specificità siano entrambe 0.5.
Entrambi i p-value sono inferiori a 0.001 quindi si rigetta l'ipotesi nulla.

```

*****
*****

```

```

Study specific test accuracy: Absolute Measures
*****

```

Study	Sensitivity			Specificity		
	Estimate	[95% Conf. Interval]		Estimate	[95% Conf. Interval]	
van Houten, 2017	0.87	0.75	0.94	0.91	0.88	0.94
Srugo, 2017	0.94	0.85	0.98	0.90	0.85	0.94
Adi Klein, 2023	0.85	0.80	0.89	0.93	0.92	0.95
Lacroix, 2023	0.56	0.40	0.70	0.93	0.87	0.96
Portefaix, 2022	0.84	0.75	0.91	0.61	0.53	0.69
Papan, 2022	0.94	0.87	0.98	0.94	0.92	0.96
Chokkalla, 2023	0.94	0.73	1.00	0.88	0.73	0.97
Mor, 2023	0.89	0.65	0.99	0.92	0.87	0.96
Overall	0.87	0.79	0.93	0.90	0.84	0.94

APPENDICE 4

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Oved et al. 2015¹³

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

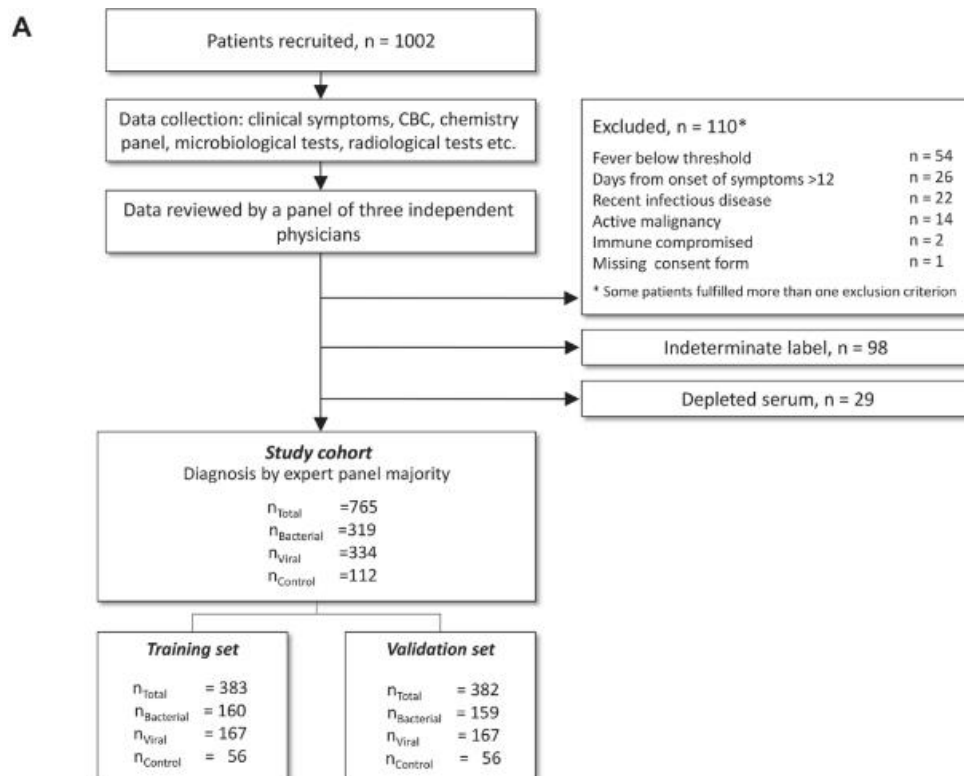
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined

above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

We prospectively recruited 1002 patients between August 2009 and November 2013 from Hillel-Yaffe and Bnai-Zion Medical Centers, Israel (NCT01917461). For each patient, the following baseline variables were recorded: demographics, medical history, physical examination, complete blood count obtained at enrollment, and chemistry panel. A nasal swab was obtained for microbiological investigation including two multiplex-PCR diagnostic assays, and a blood sample was obtained for host-protein measurements. Additional samples were obtained as deemed appropriate by the physician in cases of suspected urinary tract infection [UTI], gastroenteritis [GI] and bacteremia respectively). Radiological tests were obtained at the discretion of the physician. Half of the patients in the study were randomly assigned to the training-set (used for protein screening and model development), and the remaining half to a mutually exclusive validation-set (used to assess model performance).

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? **Yes**/No/Unclear
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Inclusion criteria for the infectious disease cohort included: clinical suspicion of an acute infectious disease, peak fever $>37.5^{\circ}\text{C}$ since onset of symptoms, and duration of symptoms 12 days. Inclusion criteria for the control group included: clinical impression of a non-infectious disease (e.g., trauma, stroke and myocardial infarction), or healthy subjects.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

Venous blood samples were stored at 4°C for up to 5 hours, subsequently fractionated into plasma, serum and total leukocytes, and stored at -80°C. Nasal swabs and stool samples were stored at 4°C for up to 72 hours and subsequently transported to a certified service laboratory for multiplex PCRs. In the screening phase, host-proteins were measured using enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA), Luminex, protein-arrays and flow-cytometry. The three proteins used in the final signature were measured as follows: CRP using either Cobas-6000, Cobas-Integra-400/800, or Modular-Analytix-P800 (Roche); TRAIL and IP-10 using commercial ELISA kits (MeMed Diagnostics).

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? Yes/**No**/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD**A. Risk of Bias**

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

For determining the infectious etiology we created a rigorous expert panel reference standard, which follows the broadly accepted recommendations of the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD), and the NHS Health Technology Assessment (NHS-HTA) for evaluation of diagnostic tests. First, we performed a thorough clinical and microbiological investigation for each patient as described above. This was followed by a review of the data collected throughout the disease course by a panel of three physicians. For adult patients the panel included the attending physician and two infectious disease specialists, while for children it included the attending pediatrician, an infectious disease expert and a senior attending pediatrician. The panel members were blinded to the labeling of their peers to prevent group pressure or influential personality bias as recommended by NHS-HTA. Importantly, they were blinded to the results of the signature.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Final diagnosis was attained in 765 patients. Additionally, 98 patients were labeled as indeterminate because disease etiology could not be established.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Thirty days after enrollment, disease course and response to treatment were recorded.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Srugo et al. 2017¹⁶

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

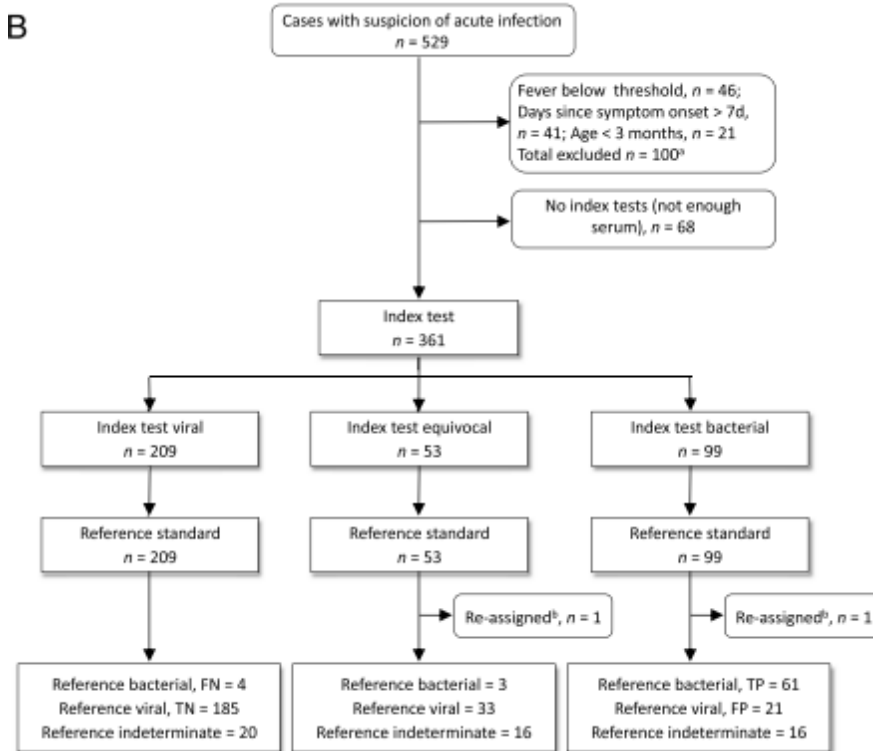
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

This study used banked, frozen serum sample remnants from the following sources: (1) pediatric patients prospectively recruited between 2008 and 2010 from the pediatric EDs (PEDs) of 2 tertiary and 1 secondary hospital in Switzerland, where the target populations were patients with clinical and radiological pneumonia for infectious patients and patients with minor elective surgery for healthy (noninfectious) patients; (2) pediatric patients prospectively recruited between 2010 and 2013 from the PED of a tertiary hospital in Switzerland, where the target population for infectious patients was patients who had fever without identified source; and (3) pediatric patients presenting to the PED and pediatric wards of 2 secondary hospitals in Israel between 2011 and 2013, from whom blood was drawn and sent to the microbiology laboratories for serological analysis.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Inclusion criteria for potentially eligible patients with no suspicion of acute infection (ie, healthy and/or noninfectious) were as follows: age ≥ 3 months and ≤ 18 years and a fever $< 38^{\circ}\text{C}$. Inclusion criteria for potentially eligible patients with suspicion of acute infection were as follows: age ≥ 3 months and ≤ 18 years and a fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$ documented at clinical encounter (Swiss patients), or a peak fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$ at some point after symptom onset was documented in the medical case record (Israeli patients), and symptom duration ≤ 7 days.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

The index test is a host-signature assay (ImmunoXpert; MeMed Diagnostics, Ltd, Tirat Carmel, Israel) that is used to measure and computationally integrate the blood levels of TRAIL, IP-10, and CRP into a bacterial/viral likelihood score. On the basis of predefined cutoffs, the index test is used to generate 3 possible

outcomes: (1) viral infection (or other nonbacterial etiology): ImmunoXpert score <35; (2) equivocal: $35 \leq$ ImmunoXpert score ≤ 65 ; and (3) bacterial infection (including mixed bacterial and viral coinfection): ImmunoXpert score >65.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

There is no single gold standard for broadly determining the underlying etiology for acute infections. Therefore, in line with the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy and National Institute for Health Research Health Technology Assessment guidelines for evaluation of diagnostic tests, predetermined criteria and a panel of experts were employed to adjudicate the reference standard for each patient. The experts were blinded to the diagnoses of their peers to prevent group pressure or influential personality bias and were blinded to the host-signature assay result.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

In total, 597 banked samples were potentially eligible for evaluation: 529 from patients with suspicion of acute infection noted on their medical case record and 68 from patients without suspicion of an acute infectious disease. Since the host-signature assay is intended to aid the clinician in discriminating between bacterial and viral infections when there is a clear suspicion of acute infection, the cohort for primary analysis included the potentially eligible infectious Patients. Review of the 529 medical case records in which the clinician noted suspicion of acute infection led to exclusion of 100 patients who failed to meet 1 or more of the infectious inclusion criteria. A further 68 patients were excluded because their samples contained insufficient volume to run the host-signature assay. The resulting infectious cohort on which the index test was performed totaled 361 participants. Application of the majority panel reference standard resulted in bacterial or viral reference standard diagnoses for 307 of the study population (85%).

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Van Hauten et al. 2017⁹

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

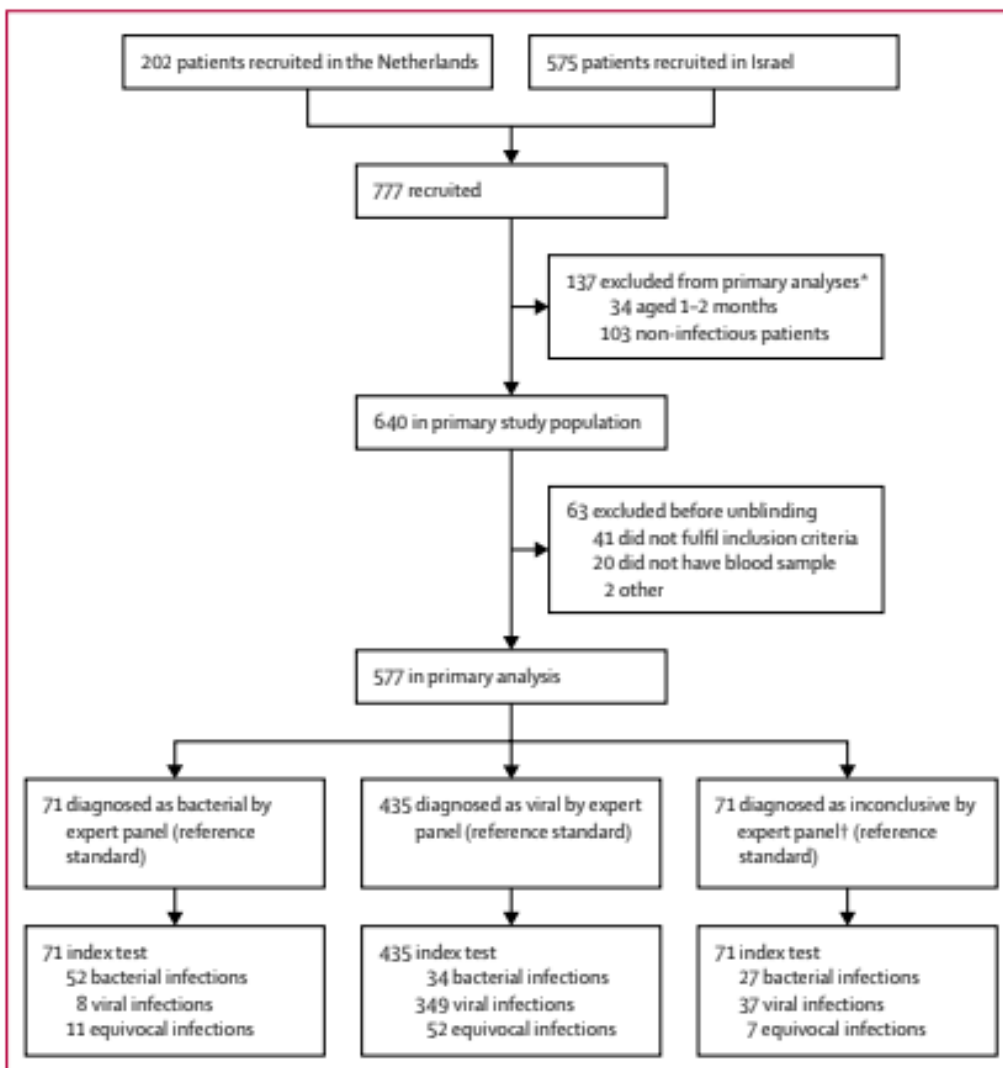
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

Children were recruited consecutively; if a child was eligible for recruitment, a member of the study team would ask parents for permission to participate in the study until the predefined number of patients was achieved.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? **Yes**/No/Unclear
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Patients aged between 2 and 60 months presenting with fever (peak temperature $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ measured by axillary, rectal, or ear thermometer) and symptoms of lower respiratory tract infection or fever without source existing for a maximum of 6 days were eligible for inclusion.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

The index test combines the concentrations of TRAIL, IP-10, and CRP using a predetermined logistic regression formula to compute the likelihood score for a bacterial or viral infection as described previously. On the basis of the likelihood score of the index test, each patient was classified as having a bacterial or a viral immune response. According to the current Conformité Européenne–In Vitro Diagnostic (CE–IVD) label, patients with an index test score below 0.35 were classified as viral, between 0.35 and 0.65 as equivocal, and above 0.65 as bacterial (appendix p 10). An equivocal or intermediate score is used more often in diagnostic tests.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

Currently, no single reference standard test exists for identifying the cause of an infection. Therefore, we followed England's National Health Service's standard for assessing diagnostic tests and compiled an expert panel reference standard. The panel comprised paediatricians with more than 10 years of clinical experience. They received a review of paediatric, emergency medicine, and infectious disease literature written by the study team as background information without any instructions or decision rules. Every recruited patient was diagnosed by three panel members affiliated to the country of recruitment using all available eCRF information, but masked for the index test results (which were done simultaneously) and for the decisions of their peers.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

A total of 777 children in Dutch and Israeli hospitals were recruited between Oct 16, 2013, and Jan 28, 2015, with final follow-up done on March 1, 2015. Children aged between 1 and 2 months (n=34) and non-infectious patients (n=103) were excluded from primary analysis. In 63 children the index test was not measured, either because the children did not fulfil inclusion criteria, did not have an available blood sample, or consent was withdrawn. Baseline characteristics of these patients are shown in the appendix. Eventually, 577 patients were available for primary analysis.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

The index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Ross et al. 2021⁴¹

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

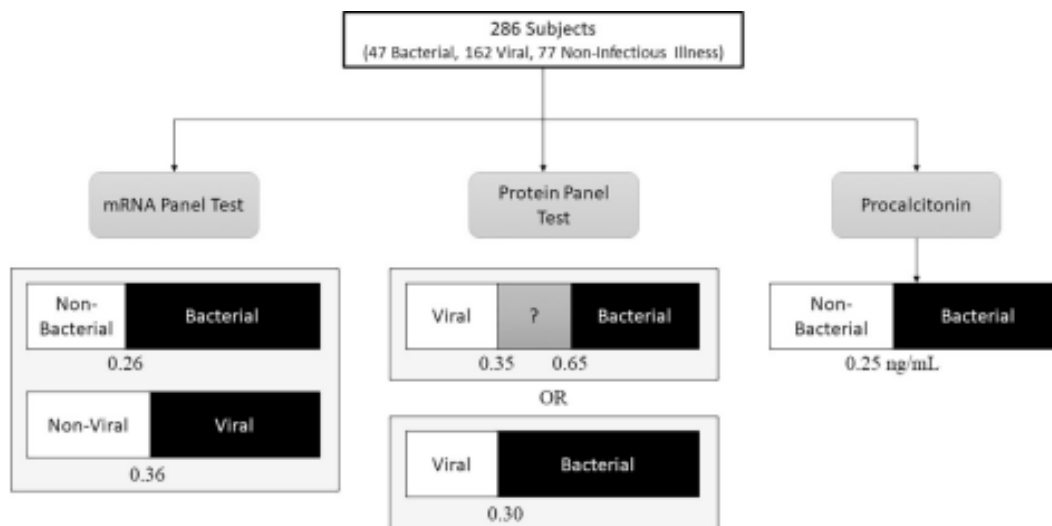
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

This is a secondary analysis of the RADICAL study, focusing on subjects with microbiologically confirmed bacterial ARI, viral ARI, or non-infectious illness and who had samples available to support all biomarker testing. The study protocol and

analysis plan for this study were not pre-specified at the time the RADICAL study was designed and implemented. Subjects with a low-confidence reference standard were excluded, consisting of those without confirmatory microbiology or bacterial/viral co-infection. They were enrolled as part of CAPSOD (Community-Acquired Pneumonia and Sepsis Outcome Diagnostics; NCT00258869) or CAPSS (Community-Acquired Pneumonia and Sepsis Study). Additional subjects were enrolled at Duke and the Durham VA as part of RADICAL (Rapid Diagnostics in Categorizing Acute Lung Infections).

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Patients ≥ 6 -years were eligible if they had a known or suspected infection and at least two Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) criteria. RADICAL enrolled subjects ≥ 2 -years with < 28 -days duration of suspected bacterial, viral, or non-infectious ARI.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

Concentrations of plasma IP-10, TRAIL, and CRP were measured by sandwich immunoassay with electrochemiluminescent detection using the UPLEX Human IP-10 Assay, the UPLEX Human TRAIL Assay, and the VPlex Human CRP Assay with imaging using the QuickPlex SQ 120 Imager (Meso Scale Discovery, Rockville, MD). Plasma samples stored at -80°C were thawed on ice and processed according to the manufacturer's recommended protocol, similar to published methods. Calibration curves were generated using 4-fold serial dilutions of the calibrator. Generating probabilities of bacterial vs. viral infection was performed as previously described: protein concentrations were used to build a multinomial logistic regression model, establishing a bacterial likelihood score from zero to one. Subjects were classified as bacterial or viral using two different thresholds. The first used published thresholds: subjects with a score ≥ 0.35 were classified as viral or non-infectious, subjects with a score ≥ 0.65 were classified as bacterial, and scores from 0.35–0.65 were considered equivocal.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

Since there is no gold standard to define whether ARI is bacterial, viral, or non-infectious, panel adjudication served as the reference standard. Adjudications were performed by specialists in emergency medicine, infectious diseases, pulmonary medicine, or hospital medicine based on chart reviews performed >28 days after enrollment, and before measuring procalcitonin, the protein panel, or the mRNA panel. In addition, we performed supplemental microbiological testing including a multiplex viral respiratory pathogen panel (ResPlex V2.0, Qiagen; Respiratory Viral Panel, Luminex; or Respiratory Pathogen Panel, Luminex). Each case was independently adjudicated by two reviewers. If there was discordance with respect to the primary etiology, the case was reviewed by a panel of at least three reviewers.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Samples from 286 subjects were analyzed.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Due to the retrospective nature of the adjudications, the diagnostic accuracy of this reference standard is expectedly higher than what might be achieved in real-time by clinical providers.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? **Yes**/No/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Papan et al. 2022⁷

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

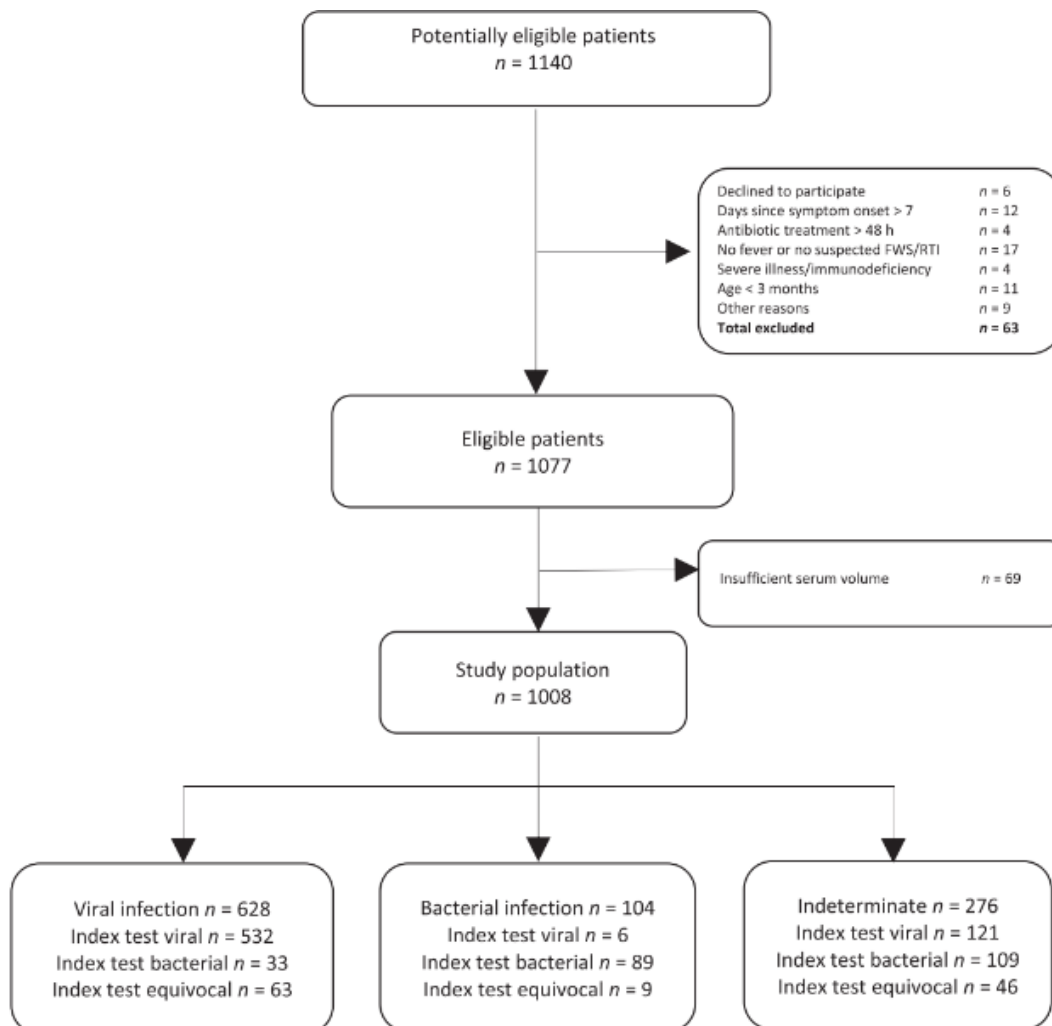
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

AutoPilot-Dx was a multicentre, prospective, cohort study conducted at two University Hospitals in Germany and Italy. Eligible subjects were children aged between 90 days and 18 years presenting consecutively to the paediatric emergency department. In addition to standard-of-care work-up, participants had a study-specific nasopharyngeal swab taken upon enrolment. Nasopharyngeal swabs underwent multiplex PCR for viral and bacterial pathogens (Allplex™ Respiratory Panel, Seegene, Seoul, Republic of Korea). A follow-up telephone interview with the participants' parents was conducted 30 days after enrolment, including questions about medical status, relapses, antibiotic use, and school/childcare/parental work absence.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? **Yes**/No/Unclear
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Patients who met one or more of the following criteria were included: clinically suspected RTI or FWS, body temperature of $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ measured at home or at the ED, and history of illness 7 days.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

Host signature measurements were performed on serum samples according to the manufacturer's instructions (ImmunoXpert™, MeMed, Israel) at the study sites on a Freedom EVO® 75 platform (Tecan, Switzerland); those performing the

measurements were blinded to the clinical diagnosis and the result of the reference standard. The signature computationally integrates the blood concentrations of TRAIL, IP-10, and CRP using a locked algorithm, generating a 0e100 score. The predetermined score cut-offs provided by the manufacturer in accordance with its Conformance Européenne In-vitro Diagnostic (CE-IVD) label were used to classify outcomes: <35 for viral infections, >65 for bacterial infections, 35-65 being deemed equivocal. The test is CE marked for use in patients aged 90 days with suspicion of acute bacterial or viral infection.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

In the absence of a single ‘gold standard’, a panel of independent adjudicators were employed to generate the reference standard as previously described. To ensure quality, adjudicators were paediatricians with >10 years of clinical experience. Adjudicators were blinded to the signature outcome and to their peers to prevent bias, and had access to all data compiled in an electronic case report form for each patient. Adjudicators were provided with a short module explaining the adjudication process. Each study patient was assigned a reference standard outcome based on adjudication as follows.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

During the study period, 1140 patients were recruited, of whom 1077 met the inclusion and exclusion criteria. Of these, 69 were excluded due to an insufficient amount of serum, resulting in a study population of 1008. The cohort for analysis that included the cases assigned bacterial or viral adjudication labels (n = 732, equivocal signature result in 9.8%). For inclusion in the analysis study cohort, a reference standard outcome was required whereby all three adjudicators unanimously assigned viral or bacterial labels with moderate or high confidence level; the remaining cases were considered 'indeterminate'.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Each adjudicator was asked to assign one label, based on the time point of sample collection.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Portefaix et al. 2022

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

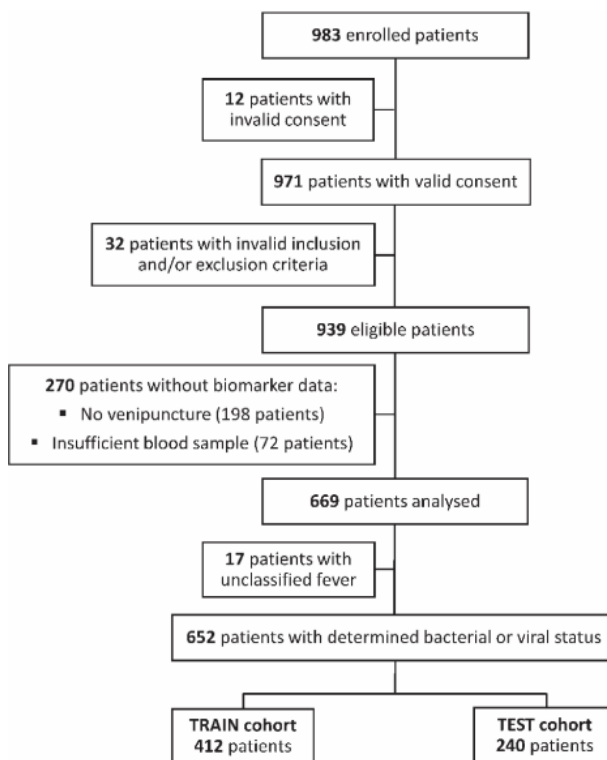
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

At the time of enrolment, investigators recorded demographics, medical history, and physical examination data. Clinical variables evaluated at enrolment included: (i) signs of poor tolerance to fever (hemodynamics, neurological, respiratory), (ii) general appearance at clinical examination (good, intermediate, bad), and (iii) associated symptoms (meningeal syndrome, otolaryngologic symptoms, vomiting, diarrhea, skin rash, purpura, acute otitis media). Standard care, as per investigator assessment, included white blood cell count, absolute neutrophil count, blood culture, CRP and/or PCT levels, urinalysis, lumbar puncture, stool culture, ultrasound scanning, and chest radiography. The decision to hospitalise or treat the patient with antibiotics was left to the discretion of the physician. At day 7 post enrolment, a clinical follow-up was conducted, by phone for discharged patients or based on medical electronic records for hospitalised patients.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Children with national health insurance coverage, aged 7 days to 36 months, presenting to PED with suspected SBI and prescribed blood withdrawal as part of standard care were enrolled. Suspected SBI was defined as fever $> 38^{\circ}\text{C}$ for more than 6 h in children aged 7 days to 3 months and fever $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ for more than 6 h but less than 7 days in children aged 3 to 36 months.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

At inclusion, up to 3 mL blood was collected solely at the time of the venipuncture prescribed for standard care, for the dosage of the seven selected host-protein markers (CRP, PCT, MxA, TRAIL, NGAL, IP-10, IL-6). PCT was measured in serum (200 μL) using the bioMérieux VIDAS B.R.A.H.M.S PCT assay (Marcy l'Etoile, France) and the VIDAS 30 instrument. CRP, TRAIL, IP-10, and IL-6

concentrations were measured in serum with the automated immunoassay Simple Plex platform (Protein simple, San Jose, CA, USA), in accordance with the instructions of the manufacturer.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? Yes/**No**/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

In the absence of gold standard for bacterial and viral infections' diagnosis, an expert panel reference standard was established, following existing recommendations. This independent adjudication committee, composed of two panels of several infectious disease paediatricians, one microbiologist, and one methodologist expert, assigned one of six diagnosis categories. Classification by the adjudication committee was blinded to all biomarker measurement results and to the decision of other members of the adjudication committee. Classification by the adjudication committee did not depend on age of patients. Clinical data comprised results of the clinical examination (at inclusion and at day 7), biological and microbiological laboratory tests, and medical imaging. Final diagnosis was determined by panel majority agreement. In case of non-majority, members of the two expert panels made a consensus decision on diagnosis.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

A total of 983 paediatric patients aged 7 days to 36 months with a suspected SBI were enrolled. Forty-four patients were excluded due to either invalid informed consent or invalid inclusion and/or exclusion criteria (Figure 1). Out of 939 eligible patients, 270 with missing biomarker data because of venipuncture failure were excluded from the analysis. Of the 669 analysed patients, 17 (2.6%) had an indeterminate infection status (unclassified fever), according to the expert adjudication committee. A total of 652 patients with a determined infection status were partitioned into a training group cohort (TRAIN set; n = 412) for biomarker computational modelling and a validation cohort (TEST set; n = 240) for the confirmation of model performance on an independent cohort. In case of venipuncture failure (when venipuncture could not be performed or blood volume was insufficient), the dosage of biomarkers was not performed and the patient was defined as having no biomarker data.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Classification by the adjudication committee was based on the clinical data collected at inclusion and at day 7, including antimicrobial treatment and hospitalisation decisions.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Mor et al. 2023⁴⁵

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

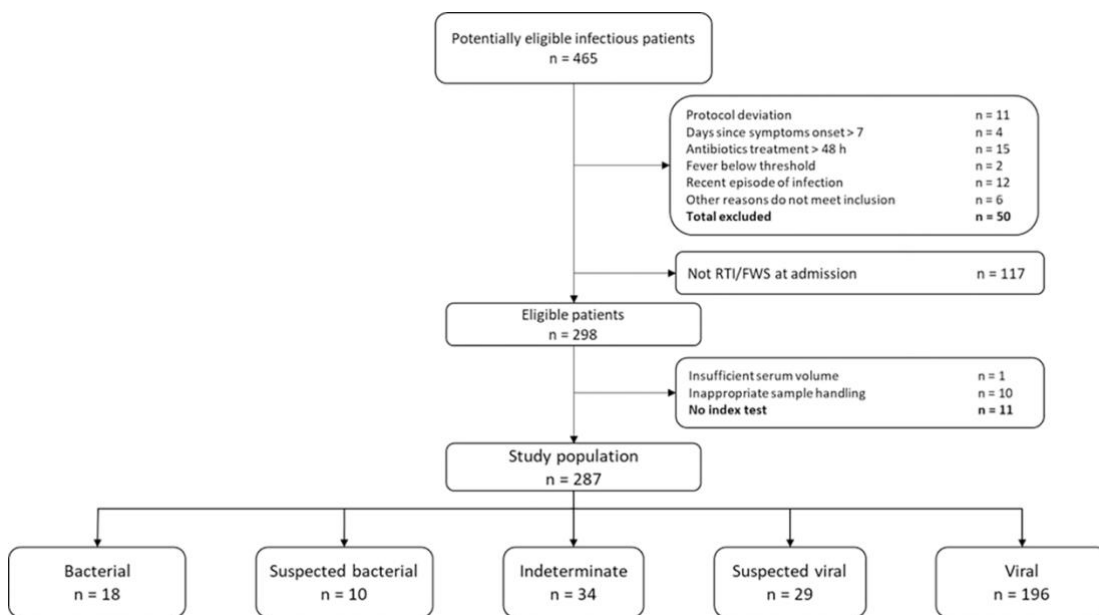
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

After enrollment, blood was drawn per treating physician's discretion. Additional workup and treatment decisions were taken by the treating physician. A serum sample was collected for study-specific BV score measurements from each participant. Also, a nasal swab sample was collected for multiplex polymerase chain reaction (PCR) detection of common respiratory viruses for the reference standard. For each patient, a questionnaire was filled by the ED treating physician, after history taking and physical examination. In the questionnaire, the physicians were asked to state their seniority level (intern/specialist), the suspected clinical syndrome and their tentative etiological suspicion. Additionally, physicians were requested to indicate their degree of diagnostic certainty. They were also asked to indicate if relevant test results were available to them at the time of the questionnaire. A research assistant contacted the family within 28 days of discharge to collect additional data, specifically additional diagnoses and antibiotic prescription.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Children aged 3 months to 18 years old with fever $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ documented at least once within a week from their presentation, and with clinical suspicion of RTI or with FWS, or with urinary tract infection (UTI) or with gastroenteritis (GE), were prospectively enrolled. Only children for whom blood testing at the ED was deemed necessary were included in the study.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

BV score is based on the computational combination of circulating levels of TRAIL, CRP and IP-10. The serum concentrations of the three host proteins were measured and computationally integrated into a score indicative of bacterial versus viral

infection that ranges from 0 to 100 using ImmunoXpert™ (MeMed, Israel). The algorithm for integrating the serum levels of the three proteins was derived based on data from over a thousand patients and is identical to the algorithm used in previous validation studies. For more details regarding the algorithm based on logistic regression. Cutoffs were validated in previous studies and are based on manufacturer's instructions for use, i.e., score < 35 indicates viral infection (or other non-bacterial etiology); score > 65 indicates bacterial infection (including co-infection); and 35-65 is considered equivocal. Equivocal scores do not provide etiological information and the physician is advised to employ other patient data in their decision making.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

Given the absence of a gold standard for determining bacterial versus viral etiology in real-life patients, the reference standard for determining the etiology of the patients' disease was generated based on expert panel adjudication in line with the National Health Service (NHS) Health Technology Assessment Guidelines for Evaluation of Diagnostic Tests and previous studies. Three pediatricians, each with more than 7 years of experience, independently assessed the case report form for each patient (including clinical, laboratory, microbiological, radiological and follow up data), and assigned one of the following classifications: bacterial (this included both pure bacterial and mixed bacterial-viral infections), viral, non-infectious, or indeterminate. Experts were blinded to their peers' classifications and to BV score result and were not provided any structured guidelines.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW**/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW**/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Out of 465 potentially eligible subjects, 167 did not meet eligibility criteria and 11 had samples with insufficient volume for measuring BV score; the resulting study population was 287 children. The primary analysis cohort (n = 214) included 196 patients with reference standard viral diagnoses and 18 patients with reference standard bacterial diagnoses.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

The BV score and PCR results were not available during the patient's ED or hospital stay.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/**HIGH**/UNCLEAR

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Lacroix et al. 2023⁴³

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

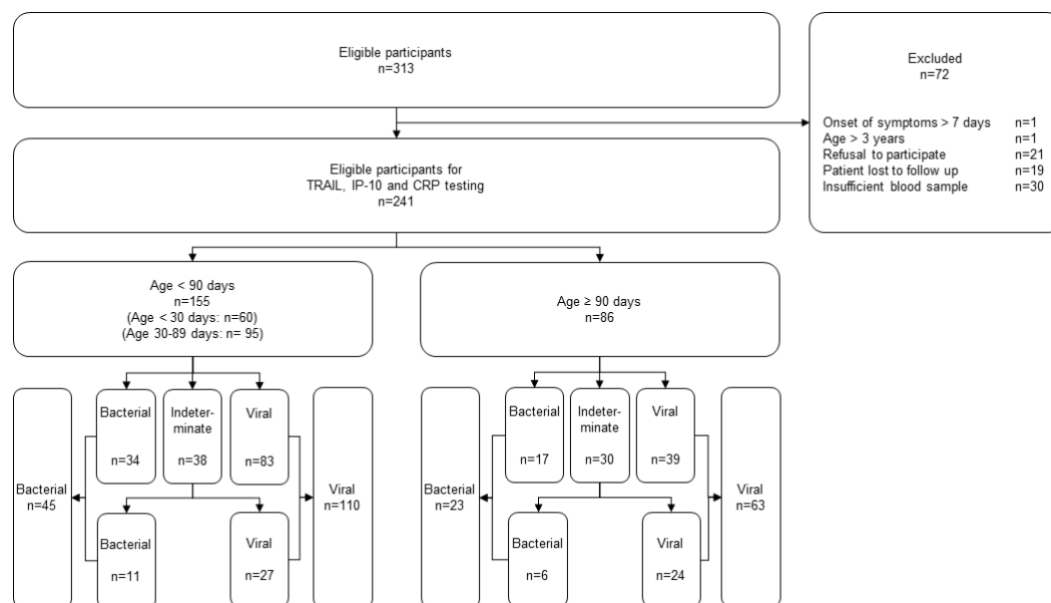
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

Prospective diagnostic accuracy study in children with FWS aged less than 3 years old (consecutive sample), performed in the pediatric emergency department (PED) of a single Swiss tertiary center from November 2015 to January 2018. After informed consent was obtained, patients' characteristics were recorded (age, sex, delay between fever onset and presentation, maximum temperature before presentation). Patients were assessed with white blood cell count (WBC), absolute neutrophil count (ANC), band count, CRP, PCT, urinary dipstick and culture, and blood culture. Additional testing (CSF culture, chest X-ray, synovial fluid or stool culture etc.) was optional. We did not find healthy pediatric control samples in Switzerland, but an existing healthy Canadian cohort could meet this specific objective. A group of 50 healthy Canadian children from trauma and dental clinics served as control patients.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? **Yes**/No/Unclear
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Patients aged less than 3 years old presenting to the PED with FWS after a thorough history and physical exam were eligible. Exclusion criteria were comorbidities predisposing to infections such as cancer, primary or secondary immunodeficiency, and iatrogenic immunosuppression.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

An additional 0.6 mL sample was drawn, dedicated to the determination of CRP, TRAIL and IP-10 and the ImmunoXpert score. The ImmunoXpert test was performed on anonymized samples, and performers/readers of the index tests had no access to clinical information and reference standard results. The index test and panel expert reference standard outcomes were locked prior to unblinding at the end of the recruitment phase.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? Yes/No/**Unclear**

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

Reference standard was based on expert panel adjudication, which is a common approach to assigning a final diagnosis in fields where gold standard is lacking, specifically in patients with FWS. On termination of the recruitment phase, the experts (one senior pediatric infectious-disease specialist and two senior pediatric emergency physicians) independently performed an initial etiologic classification (viral, bacterial, or indeterminate). Then, they were asked to independently classify patients with indeterminate diagnosis into a dichotomous outcome (viral or bacterial infection), as recommended in most studies using this kind of reference standard [18]. Experts had access to full medical records but were blinded to the diagnosis of their peers and to TRAIL, IP-10 and ImmunoXpert results; CRP, PCT and urinary dipstick data were available to the experts.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Overall, 58120 patients attended our PED during the study period. Among 313 potentially eligible participants, 72 were excluded and 241 were eligible for testing. When analyzing this reference standard, children with an indeterminate etiology or showing equivocal ImmunoXpert score were excluded from the subgroup analysis.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Klein et al. 2023⁴⁶

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

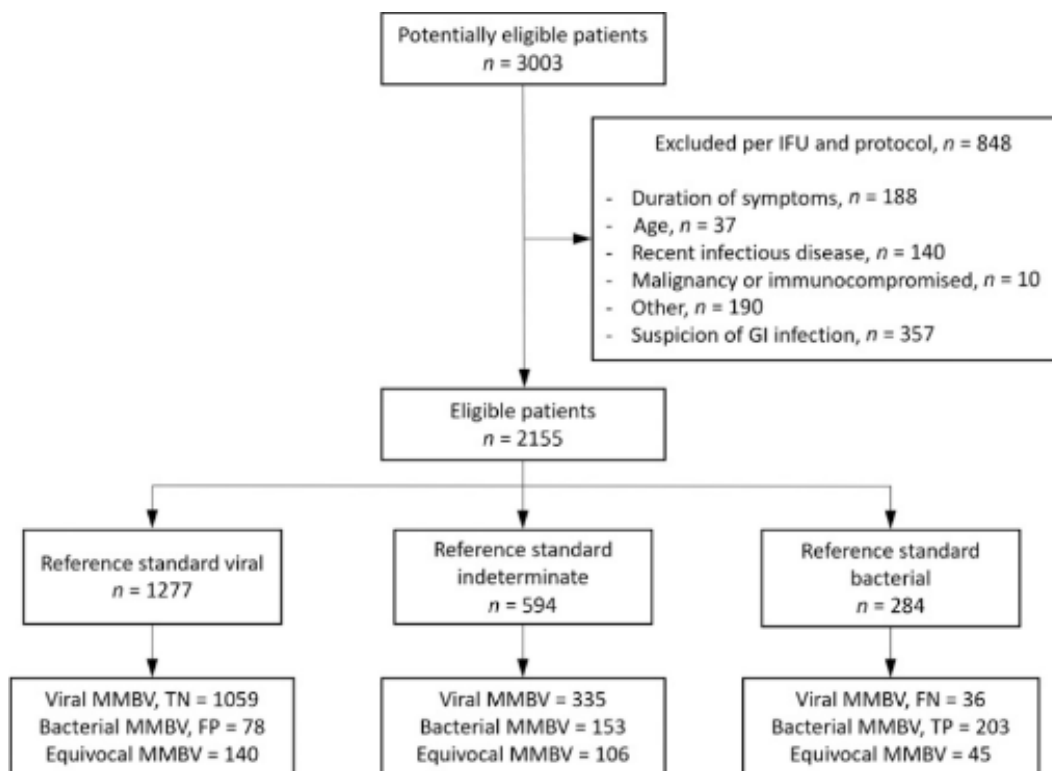
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

Blood samples for MMBV were obtained during the ED stay or the initial evaluation in the pediatric ward. Upon ordering MMBV, physicians were requested to complete a questionnaire documenting the suspected clinical indication at the time of blood draw and their level of certainty in the infection etiology that they suspected. The questionnaire was filled out after obtaining medical history and physical examination, and physicians documented the extent of available clinical information at the time of questionnaire completion. The patients' demographic data, medical history, physical examination findings, and all ancillary testing results, including laboratory, microbiology, and imaging assays performed as part of routine care, were recorded in electronic case report forms.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Inclusion criteria were age 3 months to 18 years, symptoms of acute infection with fever within a week prior to presentation, and MMBV ordered at the physician's discretion as part of routine care to aid in differentiating between bacterial and viral infection.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

TRAIL and IP-10 were measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay kit, ImmunoXpert (MeMed, Israel), and CRP was measured by using COBASc501. MMBV is a score ranging from 0 to 100 that computationally integrates TRAIL, IP-10, and CRP measurements using an algorithm derived previously and employed in all previous studies; ImmunoXpert software was used to calculate MMBV. Cutoffs were based on the manufacturer's instructions for use, ie, MMBV <35 indicated viral infection or other nonbacterial condition. Physicians were trained on the intended use and limitations of ImmunoXpert. Based on the training,

physicians ordered MMBV at their discretion. The test was performed once daily during weekdays by an experienced technician within the medical center's central laboratory, and so the result was often not received by the physician before antibiotic decision making.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

In the absence of a gold standard for determining bacterial versus viral etiology, the reference standard for infection diagnosis was generated based on expert panel adjudication in accordance with the National Health Service (NHS) Health Technology Assessment Guidelines for Evaluation of Diagnostic Tests.³⁰ The experts were 3 pediatricians who independently assessed the case report form for each case. The experts were provided with all laboratory biomarkers taken as part of routine care, including WBC, ANC, and CRP. Of note, procalcitonin was not in routine use for children in Israel at the time of this study. After reviewing the eCRF, the experts assigned one of the following labels: bacterial (including a mixed bacterial and viral coinfection), viral, noninfectious, and indeterminate. Experts were blinded to their peers' labels and to MMBV results.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

The medical records of 3003 patients for whom MMBV was ordered as part of routine management were reviewed. Of these, 1768 patients were enrolled at Hillel-Yaffe Medical Center and 1235 at Bnai-Zion Medical Center. Of them, 2155 patients met the inclusion criteria for the study. Analysis cohort (n = 1561).

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

MMBV results were provided to the physicians within hours to days from blood draw.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)Chokkalla et al. 2023⁴⁰**Phase 1: State the review question:**

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study

A retrospective cohort study was conducted to assess the diagnostic accuracy using plasma samples from pediatric patients with acute febrile illness who visited the emergency department of the Texas Children's Hospital, Houston, TX, for whom a CRP test was requested.

Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION**A. Risk of Bias**

Describe methods of patient selection:

For each patient, the following information was obtained from the electronic medical records: 1) demographics; 2) clinical history; 3) white blood cell (WBC) counts; and 4) antibiotic receipt. Parallely, the levels of PCT, which is a biomarker for bacterial sepsis, were also measured. Since there is no single diagnostic reference method for distinguishing bacterial vs viral infection, we applied a two-pronged approach to assess the diagnostic accuracy of the MeMed-BV test.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

The following inclusion criteria were employed: 1) age \leq 18 years during the clinical encounter; 2) peak fever $>$ 37.5 °C with the onset of symptoms such as cough, sore throat, abdominal pain or nausea and vomiting; 3) duration of symptoms \leq 7 days; and 4) a positive nucleic acid amplification test (for virus) or abnormal blood culture (for bacteria).

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW**/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

MeMed controls or patient samples (100 μ L) were tested with MeMed-BV (Tirat Carmel, Israel) immunoassay within 2 h of collection. The test was performed on the MeMed Key analyzer following the manufacturer's instructions, including calibration and quality control procedures. A bacterial versus viral score on a scale of 0–100, along with the absolute concentration of CRP (mg/L), TRAIL (pg/ml) and IP-10 (pg/ml), were recorded. This study was conducted in accordance with the protocol approved by the Baylor College of Medicine Institutional Review Board.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW**/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW**/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

First, we compared the MeMed-BV test results with microbial confirmation by PCR or blood cultures. Next, an expert clinician blinded to the test results adjudicated the etiology for each patient based on thorough clinical, microbiological and radiological evidence. Diagnostic accuracy was evaluated by comparing MeMed-

BV test results with the final diagnosis made by a blinded pediatric infectious disease specialist based on clinical, microbiological and radiological evidence.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Out of 60 patients, 38 were diagnosed with viral infection, 13 were diagnosed with bacterial infection and 9 were diagnosed with co-infection. The 8 equivocal samples were excluded, co-infections were classified as bacterial, and the bacterial outcome was considered positive.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)
Ashkenazi et al. 2018²⁹

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

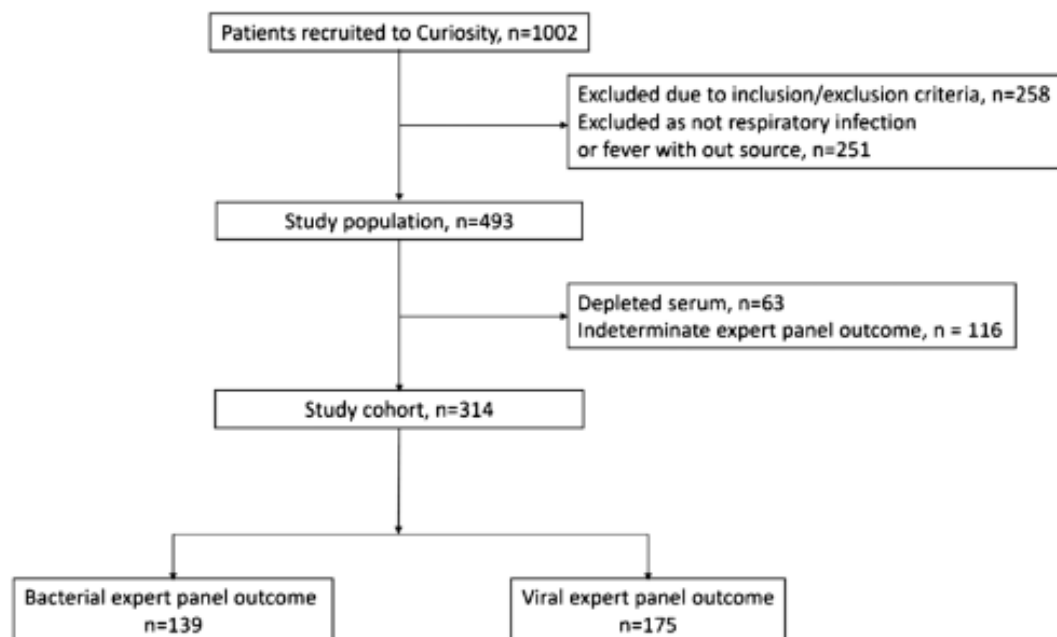
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

Biomarker measurements were performed on specimens from defined subpopulations of the Curiosity study that was conducted prospectively at two secondary medical centers in Israel. Data on demographics, medical history, physical examination, complete blood count, and chemistry panel were obtained at enrollment. Data were also collected relating to additional diagnostic tests and imaging studies performed on a clinical basis, such as blood culture, throat culture, and serological testing for cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Mycoplasma pneumoniae, and Coxiella burnetii. A nasal swab was obtained for microbiological investigation. A single blood specimen was obtained for measurement of the various biomarkers upon recruitment of the patient to the study; in the case of ED patients, this was at presentation to the ED and in the case of inpatients, it was within 48 h of admission. The CRP, TRAIL and IP-10 measurements, and a small subset of PCT (n = 76) and IL-6 (n = 43) measurements were performed as part of the Curiosity study.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

The Curiosity study population comprised inpatients and emergency department (ED) arrivals, both children and adults, presenting with diverse clinical syndromes and a spectrum of pathogens. Inclusion criteria included report of fever >37.5 °C since onset of symptoms and duration of symptoms ≤ 12 days.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

Laboratory technicians conducting biomarker tests were blinded to clinical data and comparator method outcomes. Cutoff values for WBC, ANC, CRP, IL-6, and PCT were defined prior to data analysis based on literature and guidelines. Prediction rules combining biomarkers at different cutoffs were defined based on

the relevant literature prior to data analysis. The host-protein signature score ranging from 0 to 100 is based on computational integration of TRAIL, IP-10, and CRP concentrations and was calculated using the ImmunoXpert™ software (MeMed).

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

The comparator method applied was expert panel adjudication in line with NHS Health Technology Assessment guidelines for evaluation of diagnostic tests. The panel comprised three independent, experienced, clinically practicing physicians who reviewed after discharge clinical, laboratory, radiological, and microbiological data accrued over the course of the patient's care, including PCR analysis of nasal swabs. The physicians were blinded to the diagnoses of their peers to prevent group pressure or influential personality bias. Regarding the biomarkers and prediction rules under study, panel members were provided with CRP, WBC, and ANC data, and blinded to the following: host-protein signature, IL-6, PCT, and HNL, and results of the prediction rules.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING**A. Risk of Bias**

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

A total of 493 patients met the inclusion criteria and presented with either respiratory infection (upper or lower) or fever without source. Of these, 430 had adequate serum volume for index test measurements. Out of the 314 patients assigned unanimous expert panel diagnoses, there were 153 for whom there was clinically relevant microbiological confirmation of the diagnosis.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)
Stein et al. 2018¹⁷

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

Index test(s):

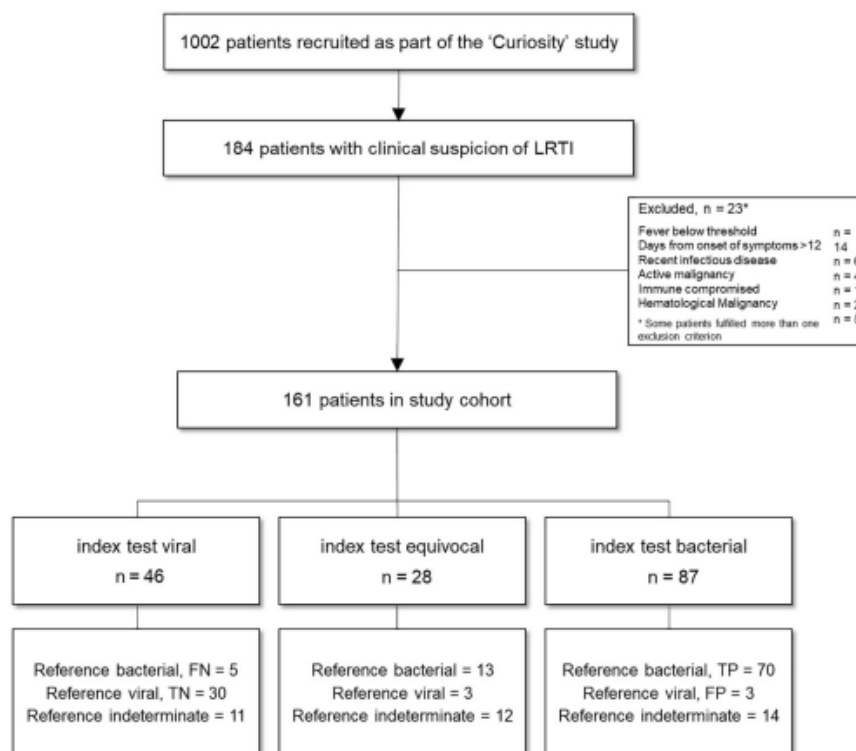
Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study

B



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

Here we describe a sub-study of the Curiosity study that was conducted prospectively between 2009 and 2013 in Hillel-Yaffe and Bnai-Zion Medical Centers, Israel. Study cohort included 184 potentially eligible pediatric (≤ 18 years) and adult (> 18 years) patients with clinical suspicion of LRTI. Pediatric patients were recruited from pediatric emergency departments and pediatric wards and adults from emergency departments and internal medicine medicine departments.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Inclusion criteria was peak fever ≥ 37.5 °C since onset of symptoms, duration of symptoms ≤ 12 days, and clinical suspicion of LRTI.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

The index test is a host-signature assay (ImmunoXpert™, MeMed Ltd.) that measures and computationally integrates the blood levels of TRAIL, IP-10 and CRP into a bacterial/viral likelihood score. Based on predefined cutoffs, the index test generates 3 possible outcomes: (i) Viral infection (or other non-bacterial etiology): ImmunoXpert™ score < 35 ; (ii) Equivocal: $35 \leq$ ImmunoXpert™ score ≤ 65 ; and (iii) Bacterial infection (including mixed bacterial and viral co-infection): ImmunoXpert™ score ≥ 65 . The assay was performed on anonymized samples and assay performers were blinded to the reference standard diagnoses.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

There is currently no single gold standard for determining the underlying etiology of LRTI patients. In line with the NHS Health Technology Assessment (NHS-HTA) guidelines for the evaluation of diagnostic tests, a panel of experts was employed to adjudicate the reference standard. For adult patients, the panel included the attending physician and 2 infectious disease specialists, while for children it included the attending pediatrician, an infectious disease expert and a senior attending pediatrician. A true reference standard diagnosis required a unanimous expert panel decision. The panel members were blinded to the assay result as well as to the assessments of their peers to prevent group pressure or influential personality bias.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? Yes/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? Yes/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

In total, 184 patients with clinical suspicion of LRTI were recruited, out of which 23 patients were excluded based on the pre-determined exclusion criteria. Out of the 161 patients included in the study cohort, 37 patients did not have a clear

reference standard (i.e. expert panel did not reach a unanimous diagnosis). Therefore, performance evaluation was performed on 124 cases.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)
Stein et al. 2022³⁹

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

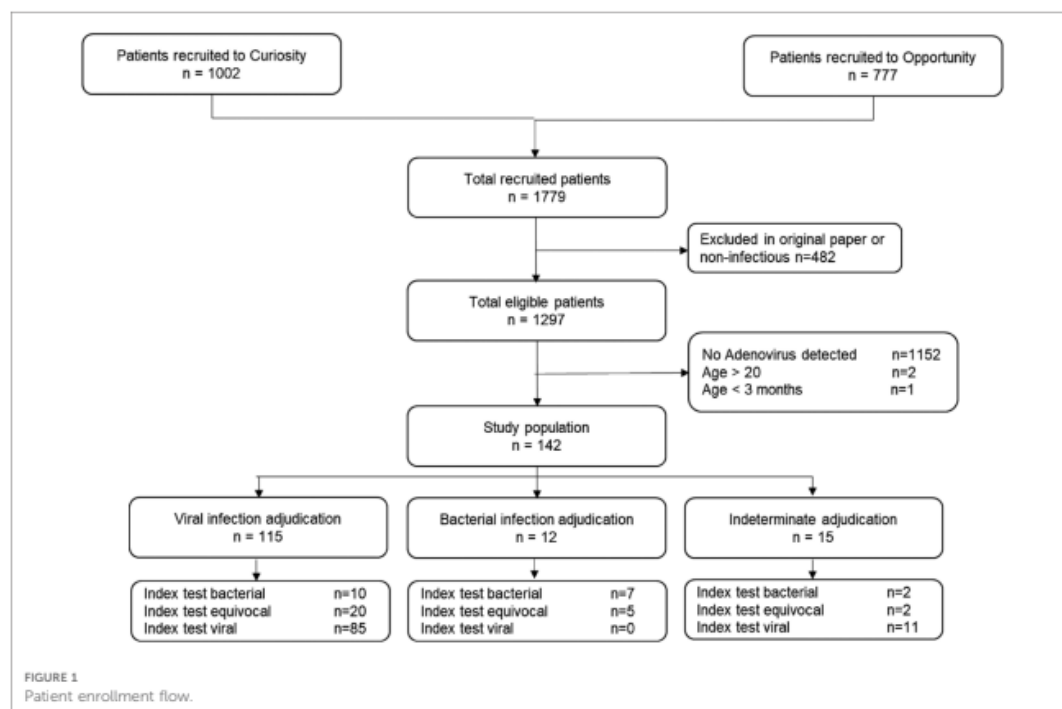
Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study



Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

A sub-analysis was performed on patients recruited in two prospective studies, CURIOSITY (NCT01917461) and OPPORTUNITY (NCT01931254). CURIOSITY recruited 1,002 patients between August 2009 and November 2013 from two hospitals in Israel. OPPORTUNITY recruited 777 patients between October 2013 and January 2015 from four hospitals in the Netherlands and two hospitals in Israel.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? Yes/No/**Unclear**
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR****

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Patients were included in the present study if they met the eligibility criteria for suspected infection of the original study, were aged 3 months to 20 years old and had adenovirus A/B/C/D/E detected by multiplex PCR in a nasal swab sample.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

The index test is based on a fixed algorithm combining the expression levels of TRAIL, CRP and IP-10; the algorithm outputs a number (0–100) called BV score that is indicative of bacterial vs. viral infection. BV is calculated by inputting TRAIL, IP-10 and CRP measurements into the ImmunoXpert™ software (MeMed). Score cutoffs were based on manufacturer's instructions for use. The performers of BV were not provided with clinical information or reference standard data regarding the patients.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? **Yes**/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? **Yes**/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

The reference standard was generated based on expert panel adjudication in line with the NHS Health Technology Assessment Guidelines for Evaluation of Diagnostic Tests. Two or three pediatricians, each with over 7 years of experience, independently reviewed the clinical, laboratory, microbiological, radiological and follow-up data for each patient and classified each patient as: bacterial (this label includes also bacterial and viral co-infection), viral, healthy/non-infectious, or indeterminate. No guideline definitions were used by the experts for the classification of the patients. In cases where there were two experts, the discharge diagnosis in the medical record served as the third expert. Experts were blinded to one another's classifications and to BV.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? Yes/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? Yes/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

Among 1,779 potentially eligible subjects from the CURIOSITY and OPPORTUNITY studies, 482 patients did not meet the original study's eligibility criteria for suspected acute infection. Among the remaining 1,297 patients, 145 had adenovirus detected by PCR (11.2%), of whom 142 satisfied age inclusion criteria.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? Yes/**No**/Unclear

Could the patient flow have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH**/UNCLEAR**

Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 (QUADAS-2)

Papan et al. 2022⁴⁷

Phase 1: State the review question:

Patients (setting, intended use of index test, presentation, prior testing):

Pediatric population (<18 years old) with fever. No restrictions for site of infection and setting of care will be considered.

Index test(s):

Performing a host-protein signature consisting of TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL), interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), and C-reactive protein (CRP).

Reference standard and target condition:

Reference standard of care, expert panel decision or diagnostic algorithm based on clinical and laboratory results, including microbiological laboratory test.

Phase 2: Draw a flow diagram for the primary study

In total, 1140 patients were recruited between February 2017 and December 2018, of whom 1077 met the eligibility criteria of the AutoPilot-Dx study. Of these, 333 had a monodetection of either FLU, RSV, AdV, or HRV. Of these, 232 (69.7%) were assigned by the adjudication process as viral infections, 20 (6.0%) as bacterial infections, and the remaining 81 (24.3%) considered indeterminate cases.

Phase 3: Risk of bias and applicability judgments

QUADAS-2 is structured so that 4 key domains are each rated in terms of the risk of bias and the concern regarding applicability to the research question (as defined above). Each key domain has a set of signalling questions to help reach the judgments regarding bias and applicability.

DOMAIN 1: PATIENT SELECTION

A. Risk of Bias

Describe methods of patient selection:

This is a subanalysis of the AutoPilot-Dx Study, which was a multicentre, prospective, cohort study run at two University Hospitals in Germany and Italy. Upon recruitment, a nasopharyngeal swab was taken from each participant with a flexible flocked swab and placed in Universal Transport Medium (Copan). Patients aged 90 days or older presenting consecutively to the children's hospital were eligible.

- Was a consecutive or random sample of patients enrolled? **Yes**/No/Unclear
- Was a case-control design avoided? **Yes**/No/Unclear
- Did the study avoid inappropriate exclusions? **Yes**/No/Unclear

Could the selection of patients have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Describe included patients (prior testing, presentation, intended use of index test and setting):

Inclusion criteria: patients aged 90 days or older; clinical suspicion of RTI or FWS; body temperature $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$; and a history of present illness ≤ 7 days.

Is there concern that the included patients do not match the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 2: INDEX TEST(S)

If more than one index test was used, please complete for each test.

A. Risk of Bias

Describe the index test and how it was conducted and interpreted:

BV score measurements were performed as described previously on serum samples according to the instructions of the manufacturer (ImmunoXpertTM; MeMed). All staff performing the measurements were blinded to the clinical diagnosis and the reference standard outcome. The signature combines the serum concentrations of TRAIL, IP-10, and CRP using a locked computational algorithm, which generates a score from 0 to 100. The predetermined score cut-offs provided by the manufacturer are as follows: <35 is classified as viral infection, >65 is classified as bacterial infection, and $35-65$ is deemed as equivocal.

- Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard? Yes/No/Unclear
- If a threshold was used, was it pre-specified? Yes/No/Unclear

Could the conduct or interpretation of the index test have introduced bias?

RISK: LOW/HIGH/UNCLEAR

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the index test, its conduct, or interpretation differ from the review question?

CONCERN: LOW/HIGH/UNCLEAR

DOMAIN 3: REFERENCE STANDARD

A. Risk of Bias

Describe the reference standard and how it was conducted and interpreted:

In the absence of a “gold standard” for determining bacterial and viral aetiologies, we employed an expert panel approach, whereby three independent adjudicators, paediatricians with >10 years of clinical experience, were asked to assign one of the following diagnoses to a case: bacterial (including bacterial/viral coinfection), viral, indeterminate, or noninfectious aetiology. To prevent bias, adjudicators were blinded to each other and to the BV score, yet had access to all remaining patient

data (including multiplex PCR). Cases not assigned the same diagnosis by the three adjudicators were regarded as indeterminate.

- Is the reference standard likely to correctly classify the target condition? **Yes**/No/Unclear
- Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test? **Yes**/No/Unclear

Could the reference standard, its conduct, or its interpretation have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

B. Concerns regarding applicability

Is there concern that the target condition as defined by the reference standard does not match the review question?

CONCERN: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

DOMAIN 4: FLOW AND TIMING

A. Risk of Bias

Describe any patients who did not receive the index test(s) and/or reference standard or who were excluded from the 2x2 table (refer to flow diagram):

In total, 1140 patients were recruited between February 2017 and December 2018, of whom 1077 met the eligibility criteria of the AutoPilot-Dx study. Of these, 333 had a monodetection of either FLU, RSV, AdV, or HRV.

Describe the time interval and any interventions between index test(s) and reference standard:

Not specified, probably the index test was done at the same time as the reference test.

- Was there an appropriate interval between index test(s) and reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did all patients receive a reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Did patients receive the same reference standard? **Yes**/No/Unclear
- Were all patients included in the analysis? **Yes**/No/Unclear

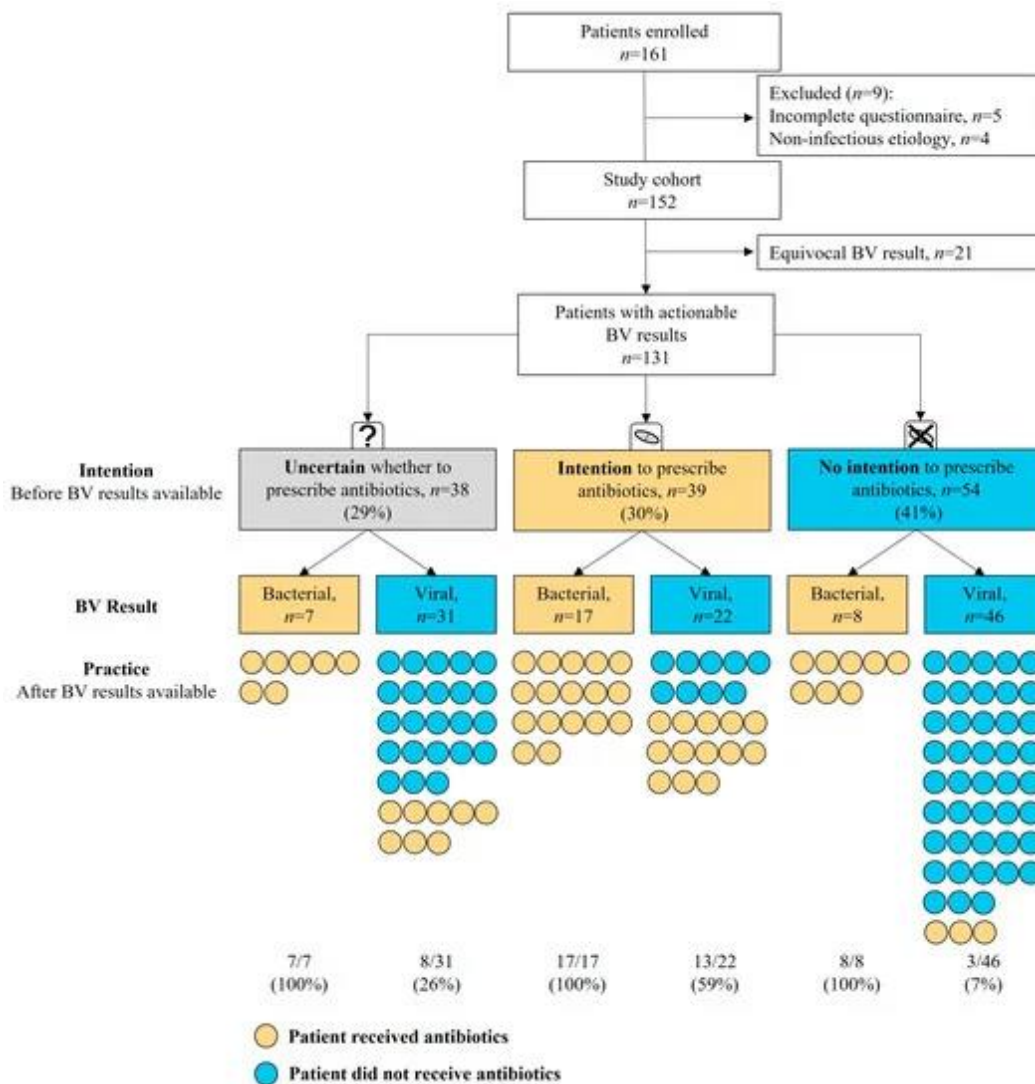
Could the patient flow have introduced bias?

RISK: **LOW/HIGH/UNCLEAR**

National Institutes of Health (NIH) Quality Assessment Tool

Guidance for Assessing the Quality of Observational Cohort and Cross-Sectional Studies

Fröhlich et al. 2023⁴²



1. Was the research question or objective in this paper clearly stated? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

In this pilot study, we examined how BV impacts patient management, i.e., antibiotic prescription, at three urgent care centers. Physicians were also asked to report whether the test impacted their decision-making process.

2. Was the study population clearly specified and defined? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

After an initial evaluation, including the patients' history and a physical examination, each physician could refer eligible patients for a BV test at the UCC,

along with additional tests such as blood and urine tests, a SARS-CoV-2 rapid antigen test, throat culture, and X-ray.

3. Was the participation rate of eligible persons at least 50%? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

475 BV tests were ordered at the physician's discretion and for 161 of the patients, the physician filled in a questionnaire.

4A. Were all the subjects selected or recruited from the same or similar populations (including the same time period)? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

The pilot study was conducted at three Maccabi Healthcare Services (MHS) Urgent Care Centers (UCCs). Between December 2020 and May 2021.

4B. Were inclusion and exclusion criteria for being in the study prespecified and applied uniformly to all participants? Yes / No / Other / **CD, cannot determine** / NA, not applicable / NR, not reported

Ordering the test was at the physician's discretion, as part of the routine management of patients presenting with suspected bacterial or viral infections.

5. Was a sample size justification, power description, or variance and effect estimates provided? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

As a pilot study, the sample size was relatively small. Future studies with larger cohorts of patients, with the possibility of performing separate sub analyses for children and adults, are warranted.

6. For the analyses in this paper, were the exposure(s) of interest measured prior to the outcome(s) being measured? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Antibiotic prescription practices were recorded in the medical file (Post-BV), and the physicians were asked to complete the second part of the questionnaire, evaluating the impact of BV on their decision-making process. Finally, the pre-BV and post-BV data were compared.

7. Was the timeframe sufficient so that one could reasonably expect to see an association between exposure and outcome if it existed? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

The BV results were made available alongside other lab findings and a clinical assessment.

8. For exposures that can vary in amount or level, did the study examine different levels of the exposure as related to the outcome (e.g., categories of exposure, or exposure measured as continuous variable)? Yes / No / Other / CD, cannot determine / **NA, not applicable** / NR, not reported

9. Were the exposure measures (independent variables) clearly defined, valid, reliable, and implemented consistently across all study participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

BV (MeMed BV®, MeMed, Haifa, Israel) can be used for adult and pediatric patients presenting to EDs and UCCs with a suspected acute bacterial or viral infection, who have had symptoms for less than seven days.

10. Was the exposure(s) assessed more than once over time? Yes / No / Other / CD, cannot determine / **NA, not applicable** / NR, not reported

11. Were the outcome measures (dependent variables) clearly defined, valid, reliable, and implemented consistently across all study participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

12. Were the outcome assessors blinded to the exposure status of participants? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Ordering the test was at the physician's discretion, as part of the routine management of patients presenting with suspected bacterial or viral infections.

13. Was loss to follow-up after baseline 20% or less? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

475 BV tests were ordered at the physician's discretion and for 161 of the patients, the physician filled in a questionnaire. Nine of these 161 enrolled patients were excluded either because of incomplete questionnaires or due to non-infectious etiology. The resulting study cohort of 152 patients included 88 children and 64 adults.

14. Were key potential confounding variables measured and adjusted statistically for their impact on the relationship between exposure(s) and outcome(s)? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

The 90% two-sided confidence interval (CI90%) was calculated using the adjusted Wald method.

Quality Rating (Good, Fair, or **Poor)**

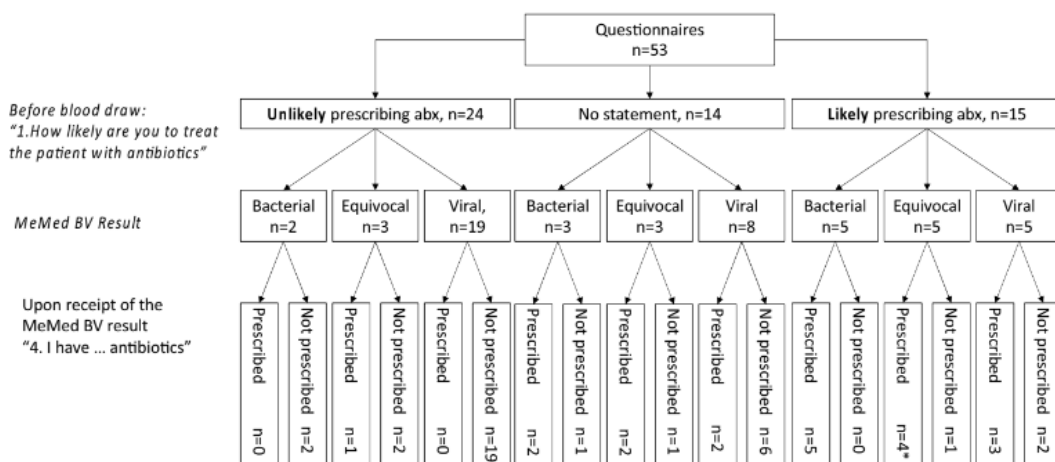
Rater #1 initials: *DV*

Rater #2 initials:

National Institutes of Health (NIH) Quality Assessment Tool

Guidance for Assessing the Quality of Observational Cohort and Cross-Sectional Studies

Kalmovich et al. 2023⁸



1. Was the research question or objective in this paper clearly stated? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Here, we (i) analyzed the BV score and its three constituent biomarkers in SARS-CoV-2 infected children, in comparison with other viral and bacterial infections, presenting to a University Medical Center; this is a subgroup analysis of the previously reported DIRECTOR study. Furthermore, we (ii) evaluated the BV score as an additional tool in the pediatric ED as an exploratory endpoint, and report on the physicians' assessments of the associated potential for improvement in clinical practice, particularly in antibiotic prescribing.

2. Was the study population clearly specified and defined? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Children and adolescents aged > 90 days with symptoms of a respiratory tract infection or fever without an apparent focus, compatible with COVID-19, were recruited.

3. Was the participation rate of eligible persons at least 50%? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Among the 111 patients, 53 fell within the original instructions for use of the BV.

4A. Were all the subjects selected or recruited from the same or similar populations (including the same time period)? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Between November 2020 and August 2021 at Saarland University Children's Hospital in Homburg, Germany.

4B. Were inclusion and exclusion criteria for being in the study prespecified and applied uniformly to all participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Children and adolescents aged > 90 days with symptoms of a respiratory tract infection or fever without an apparent focus, compatible with COVID-19, were recruited.

5. Was a sample size justification, power description, or variance and effect estimates provided? Yes / **No** / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

In this study, we showed no statistically significant difference in host-response biomarker expressions and the BV score for children with SARS-CoV-2 infections as compared to children with other viral or bacterial infections, mainly due to the small sample size.

6. For the analyses in this paper, were the exposure(s) of interest measured prior to the outcome(s) being measured? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

According to the results and in due consideration of all patient data, we divided the cohort into three groups: patients with COVID-19, patients with other viral respiratory tract infection, and patients with bacterial infection. We measured TRAIL, IP-10 and CRP and calculated the corresponding BV score. We compared the BV score's alignment with infectious disease etiology in comparison with CRP.

7. Was the timeframe sufficient so that one could reasonably expect to see an association between exposure and outcome if it existed? Yes / No / Other / **CD, cannot determine** / NA, not applicable / NR, not reported

8. For exposures that can vary in amount or level, did the study examine different levels of the exposure as related to the outcome (e.g., categories of exposure, or exposure measured as continuous variable)? Yes / No / Other / CD, cannot determine / **NA, not applicable** / NR, not reported

9. Were the exposure measures (independent variables) clearly defined, valid, reliable, and implemented consistently across all study participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

The multiplex panel (FTD Respiratory pathogens 21, Siemens Healthineers) included the following pathogen detections: influenza A; influenza A/H1N1; influenza B; parainfluenza types 1, 2, 3, 4; coronavirus NL63, 229E, OC43, HKU1; human metapneumovirus (A/B); human bocavirus; rhinovirus; adenovirus; respiratory syncytial virus (A/B); parechovirus; enterovirus and Mycoplasma pneumoniae. Bacterial infections were confirmed by bacteriologic cultures of blood, throat swabs, or other clinical samples. We measured TRAIL, IP-10 and CRP and calculated the corresponding BV score by placing 100 µL of patients' serum in a MeMed BV® cartridge and running the test on MeMed Key® (MeMed; Tirat Carmel, Israel).

10. Was the exposure(s) assessed more than once over time? Yes / No / Other / CD, cannot determine / **NA, not applicable** / NR, not reported

11. Were the outcome measures (dependent variables) clearly defined, valid, reliable, and implemented consistently across all study participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

12. Were the outcome assessors blinded to the exposure status of participants? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Three pediatricians, each with more than 10 years of work experience, formed an expert panel and evaluated each patient's disease etiology (before and after receiving test results) while blinded for each other's adjudication, as described previously.

13. Was loss to follow-up after baseline 20% or less? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

Out of 111 children screened in our pediatric ED for possible SARS-CoV-2 infection, 6 children (5.4%) tested positive for SARS-CoV-2 (COVID-19 group), one of whom was diagnosed with MIS-C. The median age of the COVID-19 group was 9.3 years (IQR 4–13.2), and 50% (n=3) were girls. Among the 111 patients, 53 fell within the original instructions for use of the BV.

14. Were key potential confounding variables measured and adjusted statistically for their impact on the relationship between exposure(s) and outcome(s)? **Yes** / No / Other / CD, cannot determine / NA, not applicable / NR, not reported

For statistical analyses, we used Kruskal–Wallis tests and pair-wise Wilcoxon rank sum tests with Bonferroni correction, using RStudio.

Quality Rating (Good, **Fair**, or Poor)

Rater #1 initials: *DV*

Rater #2 initials: