

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze ed Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea in Biologia

curriculum Biomedico e Biomolecolare

PROVA FINALE

Valutazione di nuovi parametri ematologici nella diagnosi precoce di sepsi

**RELATORE**

**Prof.ssa Valeria Magnelli**

**CORRELATORE**

**Dott. Mauro Scancarello**

**CANDIDATO**

**Marilena Tunno**

**20017585**

**ANNO ACCADEMICO 2023-2024**



PREMESSA .....	2
1. PARTE INTRODUTTIVA .....	3
1.1 LA SEPSI .....	3
1.1.1 EZIOLOGIA E PATOGENESI .....	4
1.1.2 RUOLO DEI MICRORGANISMI NELLA SEPSI .....	5
1.2 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO .....	8
1.2.1 GLOBULI BIANCHI .....	8
1.2.2 GLOBULI ROSSI .....	13
1.2.3 PIASTRINE .....	16
1.2.4 CELL POPULATION DATA (CPD) .....	17
1.3 ALTRI BIOMARKER DI SEPSI .....	28
1.3.1 PROCALCITONINA (PCT) .....	28
1.3.2 PROTEINA C REATTIVA (PCR) .....	29
1.3.3 MR-proADM .....	29
1.4 INDICAZIONI DI TRATTAMENTO ANTIBIOTICO E ANTIMICOTICO EMPIRICO .....	30
2. PARTE SPERIMENTALE .....	32
2.1 SCOPO DELLO STUDIO .....	32
2.2 MATERIALI E METODI .....	33
2.3 RISULTATI .....	37
2.4 DISCUSSIONE .....	43
2.5 CONCLUSIONI .....	44
Bibliografia .....	45

## PREMESSA

La sepsi rappresenta un'emergenza medica a causa della sua elevata morbilità e mortalità.

Una diagnosi precoce e un intervento terapeutico tempestivo sono fondamentali per migliorare l'esito clinico in pazienti con sepsi.

L'esame emocromocitometrico completo viene richiesto di routine nell'approccio ai pazienti con sospetta sepsi.

I moderni analizzatori ematologici, oltre ai classici parametri dell'emocromo, forniscono parametri di ricerca, cell population data (CPD), che attualmente non vengono refertati, ma sono oggetto di studio in vari campi della medicina; uno di essi è l'approccio alla sepsi in quanto potrebbero dare indicazioni immediate sulla presenza o meno di questa grave patologia.

Lo scopo di questo lavoro è stabilire se i suddetti parametri CPD siano utilizzabili per la diagnosi precoce della sepsi, in modo da prevenirne gli esiti avversi e ridurre la mortalità iniziando tempestivamente il trattamento terapeutico.

# 1. PARTE INTRODUTTIVA

## 1.1 LA SEPSI

La sepsi è una sindrome clinica di disfunzioni organiche potenzialmente letale causata da una risposta non controllata all'infezione [1]. È una patologia estremamente diffusa e severa che nei pazienti critici, immunocompromessi ed anziani degenti nelle strutture ospedaliere può essere la causa principale di morbidità e mortalità.

La sepsi rappresenta una sindrome clinica conseguente ad un'infezione, è caratterizzata dai classici segni della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS): febbre o ipotermia, tachicardia, tachipnea, leucocitosi o leucopenia. Possono verificarsi anche sintomi correlati a un'infezione specifica, come tosse nella polmonite o bruciore durante la minzione in un'infezione renale e dolore addominale nella sepsi intraddominale [9].

È una malattia eterogenea sia in termini di eziologia che in termini di patogenesi [2].

La sepsi è causata da batteri (sia Gram positivi che Gram negativi) e più raramente da miceti.

A seconda dei vari patogeni coinvolti e dalla tempestività con cui essa viene riconosciuta e trattata, rappresenta una malattia con un rischio di mortalità che va da medio a molto alto.

La patogenesi della sepsi può essere suddivisa in due fasi: una fase iniziale caratterizzata da un'intensa risposta infiammatoria all'infezione che porta al rilascio di citochine pro-infiammatorie dove la maggior parte dei pazienti (ca. 60%) guarisce, mentre il 30% passa alla fase tardiva, caratterizzata da immunosoppressione [3].

In questo contesto, la risposta immunitaria, composta dal sistema innato e da quello adattativo, ha un ruolo chiave.

Le cellule eosinofile, basofile, macrofagi e neutrofili, sono componenti del sistema immunitario innato che rappresenta la prima linea di difesa contro gli agenti patogeni e agisce rapidamente per combattere le infezioni.

Diversamente il sistema immunitario adattativo, costituito da linfociti T e B, comporta una risposta antigene-specifica, specifica per l'agente patogeno; la risposta immunitaria innata è importante per limitare l'infiammazione e il danno tissutale dopo l'infezione e per ripristinare l'omeostasi immunitaria [3].

Durante la sepsi, i modelli molecolari associati al patogeno (PAMP) e i modelli molecolari associati al pericolo (DAMP) inducono l'attivazione delle cellule immunitarie innate, che rilasciano citochine pro-infiammatorie, portando a una massiva risposta infiammatoria caratterizzata dalla cosiddetta "tempesta di citochine". L'eccessiva risposta infiammatoria

potrebbe indurre danni cellulari e tissutali, portando a disfunzioni multiorgano. Inoltre, durante la sepsi, la risposta immunitaria adattativa viene deregolamentata, portando alla soppressione immunitaria, che promuove le infezioni secondarie.

### 1.1.1 EZIOLOGIA E PATOGENESI

Una consensus conference ha definito la sepsi come «la sindrome di risposta infiammatoria sistemica che insorge nel corso dell'infezione» [4]. Questo suggerirebbe che l'ospite dovrebbe sviluppare e mettere in azione delle armi per lottare contro i microrganismi responsabili dell'invasione di tessuti normalmente sterili. In questa sindrome i tessuti che si trovano lontani dal sito d'infezione esprimono i segni principali dell'infiammazione, inclusi la vasodilatazione, l'aumentata permeabilità microvascolare e l'accumulo di leucociti.

Nonostante l'infiammazione sia una risposta essenziale dell'ospite, attualmente si ritiene che l'innescò e la progressione della sepsi siano legati a un rilascio incontrollato e massivo di mediatori pro-infiammatori capaci di attivare una catena di eventi che portano al danno tissutale diffuso [5]. Una serie di eventi patogenetici, che coinvolgono l'attivazione di monociti e macrofagi, è responsabile dell'evoluzione da sepsi a sepsi severa/shock settico.

Inizialmente si ha un'attivazione cellulare di neutrofili, monociti, macrofagi, che interagiscono con le cellule endoteliali attraverso numerosi recettori a cui fa seguito la mobilitazione di numerose sostanze del plasma quali citochine, come il TNF, interleuchine, proteasi, leucotrieni, chinine, ossido nitrico (NO) e fattore di attivazione piastrinica (PAF).

L'attivazione del complemento e della cascata coagulativa concorre ad ampliare questa elaborata catena di eventi [6][7].

Uno dei più importanti eventi responsabili di morbilità e mortalità nei pazienti con sepsi è lo sviluppo di un'insufficienza cardiovascolare con conseguente ipossia tissutale globale. Quest'ultima deriva da diversi meccanismi che includono ridotto precarico, disfunzioni della vasoregolazione, depressione miocardica, aumento della domanda metabolica e ridotto utilizzo dell'ossigeno tissutale legato a disfunzioni microcircolatorie e ipossia citopatica [8].

### 1.1.2 RUOLO DEI MICRORGANISMI NELLA SEPSI

La ripartizione dei microrganismi causa di sepsi corrisponde a: [10]:

- più della metà di batteri Gram positivi;
- più di un terzo di batteri Gram negativi;
- meno del 10% di flora polimicrobica e di germi anaerobi;
- 1% di lieviti.

Quindi i batteri Gram positivi, Gram negativi, aerobi e/o anaerobi rappresentano la causa più frequente di sepsi e shock settico, ma anche altri tipi di microrganismi (virus, funghi, protozoi, metazoi) possono produrre un quadro clinico analogo.

I batteri Gram negativi, maggiormente coinvolti, variano a seconda dell'età del paziente, della sede del processo infettivo, dell'origine comunitaria o ospedaliera dell'infezione.

Si tratta in genere di *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter*.

I più comuni germi Gram positivi responsabili di shock settico sono *Stafilococco*, *Streptococco* e *Pneumococco*. Tra i batteri anaerobi quelli più frequentemente isolati sono i Gram negativi, soprattutto i *Bacteroides*, di provenienza per lo più colica [11].

Da considerare che oggi vi è un netto incremento di germi multi-resistenti, per lo più legato alla eccessiva pressione antibiotica: tra i Gram positivi si isolano molto più frequentemente germi meticillino-resistenti quali MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) sensibili solo a vancomicina, teicoplanina, linezolid, daptomicina, tigeciclina, o addirittura VRE (Vancomycin-resistant *Enterococcus*); tra i Gram negativi germi produttori di ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) quali l'*Escherichia coli* sensibili solo ai carbapenemici e tigeciclina e ancora più recentemente vi è un incremento di *Klebsiella pneumoniae* - KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase Producing) in grado di produrre un enzima che la rende resistente ai carbapenemici e sensibile solo a colistina o gentamicina.

Tra i miceti prevalgono i lieviti e la *Candida albicans* è la più frequentemente isolata, anche se recentemente stanno aumentando le specie di *Candida non-albicans* (*Candida tropicalis*, *glabrata*, *krusei*, *parapsilosis*).

Rari gli isolati di *Aspergillus* e di altri funghi filamentosi [11].

L'esordio della risposta infiammatoria sistemica nella sepsi umana è dovuto principalmente a macromolecole di derivazione microbica, altamente conservate, che presentano modelli non

trovati nei tessuti umani. La più potente di tutte le molecole del modello molecolare associato ai patogeni (PAMP) è il lipopolisaccaride batterico (LPS), noto anche come endotossina.

Un gran numero di altri PAMP è espresso su batteri Gram-positivi, funghi, parassiti e agenti patogeni virali.

Queste molecole fungono da ligandi per i recettori di riconoscimento dei pattern espressi sulle cellule effettrici immunitarie noti come recettori Toll-like (TLR) [12,13].

La famiglia TLR è il complesso recettoriale di riconoscimento PAMP più importante, ma non l'unico, all'interno del sistema immunitario innato umano.

I TLR sono recettori transmembrana di tipo 1 per il rilevamento di LPS e di molti altri mediatori microbici, come peptidoglicano, lipopeptidi, flagelline, acidi nucleici microbici, molteplici componenti della parete cellulare fungina, proteine virali e acido lipoteicoico.

L'LPS costituisce circa il 75% dell'intera membrana esterna dei batteri enterici e in ciascuna parete cellulare batterica si trovano fino a 4 milioni di molecole di LPS [14].

L'LPS funziona come una molecola di allarme, avvisando l'ospite nella fase iniziale della possibilità di un'infezione batterica invasiva da Gram-negativi [15].

Il rilascio di LPS in circolo provoca una vigorosa risposta infiammatoria sistemica.

L'LPS è una macromolecola polare bifosforilata costituita da tre componenti distinte: una sequenza idrofobica altamente conservata di acidi grassi all'interno della sua struttura lipidica A; un glicolipide centrale contenente alcune porzioni insolite di eptosio ed esoso; elementi idrofili espressi sul suo polisaccaride ripetuto lungo i suoi componenti della superficie esterna [16]. L'LPS forma spontaneamente microaggregati (mini-micelle) in soluzioni acquose con la sua sezione lipidica idrofobica al centro della micella e i componenti polisaccaridici idrofili visualizzati sulla superficie esterna delle micelle. Nei fluidi biologici, come il plasma umano, l'LPS interagisce rapidamente con una varietà di proteine lipofile legate al siero o alla membrana. Pochissimi LPS circolano liberamente nel plasma poiché tutte vengono complessate rapidamente con proteine circolanti e lipoproteine.

Sono stati riconosciuti tre recettori per LPS nelle cellule umane: (1) molecole CD14-MD2-TLR4 solubili o legate alla membrana, (2) molecole CD11/CD18 (integrine  $\beta 2$ ) e (3) recettori scavenger per molecole lipidiche.

Nel plasma umano e in altri fluidi corporei, il transito di LPS è facilitato da una proteina plasmatica di fase acuta di derivazione epatica nota come proteina legante LPS (LBP) [17].

LBP funziona come una molecola navetta che raccoglie gli aggregati polimerici LPS e trasferisce i monomeri LPS al CD14. L'LPS compete con un'altra molecola legante l'LPS derivata dai neutrofili nota come la proteina battericida che aumenta la permeabilità (BPI).



LBP assiste nella consegna di LPS alle cellule effettrici immunitarie mentre BPI inibisce la consegna di LPS a CD14. Le concentrazioni relative di queste due proteine leganti l'LPS determinano principalmente l'effetto netto del rilascio di LPS [17].

CD14 è una proteina legata al glicosil fosfatidilinositolo che si trova principalmente sulla superficie cellulare delle cellule mieloidi. Manca di un dominio transmembrana e di un dominio intracellulare e pertanto non è in grado di trasdurre il segnale LPS attraverso le membrane cellulari per attivare le cellule bersaglio.

Dopo l'aggancio al CD14 legato alla membrana, l'LPS viene quindi consegnato a una proteina adattatrice extracellulare nota come MD2 (fattore di differenziazione mieloide-2) [18, 19].

Le strutture LPS che solitamente hanno acidi grassi lunghi legati al carbonio (C16-C18) o acidi grassi corti (C8-10) non si adattano bene alla tasca MD2 e sono scarsi attivatori del complesso MD2-TLR4. Allo stesso modo, le strutture lipidiche tetra-acilate occupano il centro di MD2, ma non possiedono le caratteristiche superficiali corrette per attivare TLR4.

Agiscono come antagonisti della segnalazione LPS piuttosto che come agonisti.

Una volta che il complesso LPS-MD2 viene presentato al dominio extracellulare di TLR4, una grande struttura dimerica di due complessi molecolari LPS-MD2-TLR4 si unisce per portare il dominio transmembrana e intracellulare delle due molecole TLR in stretta prossimità l'una con l'altra. Questa serie di eventi impegna quindi le molecole adattatrici necessarie con il dominio TIR (recettore Toll interleuchina-1) di TLR4, innescando la segnalazione intracellulare.

Il risultato finale di queste vie di trasduzione del segnale è l'attivazione di programmi genetici sensibili all'LPS all'interno del nucleo delle cellule bersaglio.

Una volta che TLR4 si lega al suo ligando LPS, possono verificarsi due possibili percorsi di attivazione cellulare attraverso il percorso MyD88 (fattore di differenziazione mieloide 88) o il percorso TRIF (adattatore del dominio del recettore Toll-like che induce l'interferone- $\beta$ ) [13,18]. Questa cascata di segnali porta infine alla fosforilazione, ubiquitilazione e degradazione del  $\kappa$ B inibitorio ( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) insieme ad altri attivatori trascrizionali. La degradazione di  $\text{I}\kappa\text{B}$  rilascia i siti di legame della membrana nucleare del fattore nucleare  $\kappa\text{B}$  ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) per legarsi e traslocare nel nucleo. Gli elementi della coagulazione, il complemento, altre proteine della fase acuta, le citochine, le chemochine e i geni dell'ossido nitrico sintasi hanno siti di legame  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nelle loro regioni promotrici. Il rilascio di citochine infiammatorie e altri mediatori infiammatori dopo l'esposizione all'LPS contribuisce all'infiammazione generalizzata, all'attività procoagulante, al danno tissutale e allo shock settico [20,21].

## 1.2 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

L'emocromo è tra gli esami di laboratorio più comunemente prescritti, fornisce numerose informazioni sullo stato di salute del paziente e nella maggior parte dei casi viene refertato in tempi molto brevi. L'interpretazione appropriata di questo test è fondamentale per la diagnosi precoce di diverse condizioni cliniche, che saranno ulteriormente indagate mediante altri esami clinici e di laboratorio.

I parametri dell'emocromo studiano i tre tipi di cellule ematiche: (1) globuli bianchi (WBC), (2) globuli rossi (RBC), (3) piastrine.

### 1.2.1 GLOBULI BIANCHI

I globuli bianchi, o leucociti, sono una popolazione eterogenea che comprende linfociti, monociti, granulociti neutrofili, granulociti eosinofili e granulociti basofili.

La conta leucocitaria circolante e la presenza di neutrofili immaturi sono uno dei criteri della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) [31]. Nella sepsi, l'aumento della conta dei neutrofili è comune a causa del rilascio accelerato dal midollo osseo, ma può esserci anche neutropenia a causa della deplezione dei precursori granulocitari, dell'arresto della maturazione dei granulociti nel midollo osseo o dell'eccessiva migrazione dei neutrofili circolanti nel sito dell'infezione [32]. Per quanto riguarda i linfociti, la linfopenia è comune nei pazienti con sepsi e la sua persistenza è associata ad aumento della mortalità [33].

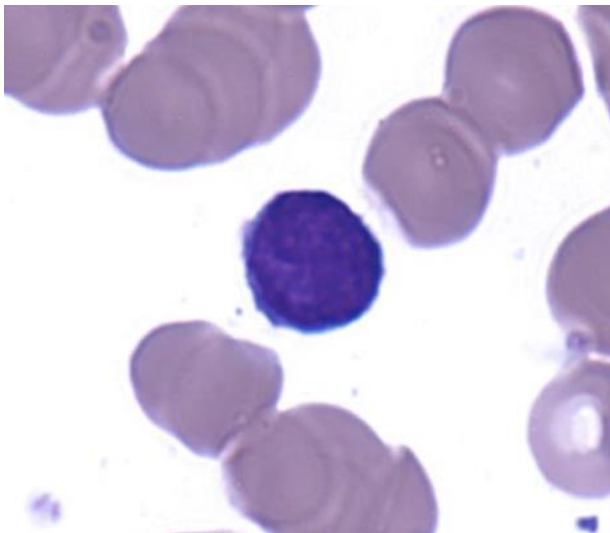
I dati delle diverse popolazioni leucocitarie sono espressi sia come percentuale che come valore assoluto; i valori assoluti sono quelli che hanno il migliore significato clinico e che quindi dovrebbero essere utilizzati. In genere, l'aumento della conta totale dei globuli bianchi è indicativo di infiammazione e infezione. Tuttavia, può essere alterato in diverse condizioni cliniche, come l'artrite reumatoide, il lupus, le neoplasie [22] e nei disturbi infiammatori non infettivi. Inoltre, la conta leucocitaria potrebbe essere normale o addirittura ridotta in alcuni casi di sepsi. Per tale motivo, i globuli bianchi totali hanno una scarsa specificità, che ne limita l'utilità come biomarker di sepsi [23].

## Linfociti

I linfociti costituiscono circa il 20-40% della conta totale dei leucociti e sono componenti chiave della risposta immunitaria adattativa. Una caratteristica della sepsi è la presenza simultanea di alterazioni pro-infiammatorie e immunosoppressive [24].

Queste ultime sono caratterizzate dalla deplezione dei linfociti dovuta a meccanismi apoptotici; studi post mortem su pazienti con shock settico hanno dimostrato che l'apoptosi si verifica sia nelle cellule circolanti che negli organi solidi [25].

Le evidenze della letteratura suggeriscono che la linfocitopenia indotta dalla sepsi potrebbe essere un indicatore di un aumento di rischio di mortalità nei pazienti con sepsi.



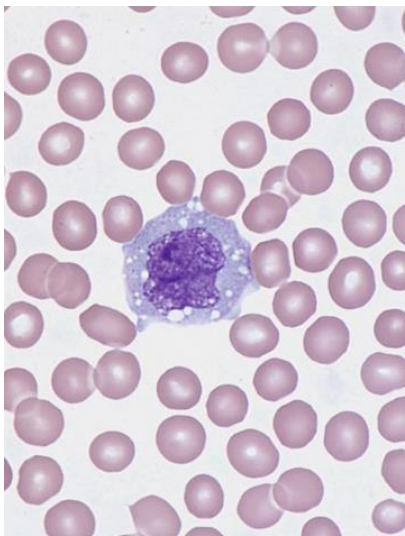
*Figura 1 Linfocita*

## Monociti

I monociti rappresentano la prima linea di difesa contro gli agenti patogeni. Sono attivati dai recettori di riconoscimento del pattern (PRR) e dall'ipossia associata alla sepsi [27].

I monociti controllano la risposta immunitaria ai patogeni sia innata che adattativa mediante diversi meccanismi: la fagocitosi, il rilascio di specie reattive dell'ossigeno, di citochine, di chemochine, il reclutamento dei neutrofili, la presentazione dell'antigene e attivazione dei linfociti [26]. Circolano nel flusso sanguigno e raggiungono i tessuti in quantità maggiori durante l'infiammazione.

I monociti possono essere classificati in tre diverse sottopopolazioni in base alla diversa espressione di un corecettore del lipopolisaccaride (LPS), dei recettori CD14 e CD16: classico, intermedio e non classico [28], che presentano caratteristiche morfologiche, funzionali e fenotipiche diverse. In condizioni fisiologiche, i monociti classici rappresentano circa l'85% del totale dei monociti circolanti; quelli intermedi incidono per circa il 5%; mentre quelli non classici rappresentano il restante 10% [29]. Durante la sepsi, i monociti modificano la loro forma da classica a intermedia e non classica [30]. La loro eterogeneità aumenta la comprensione della patogenesi dell'inflammatione e la quota maggiore di una popolazione specifica potrebbe fungere da biomarcatore delle malattie [35].



*Figura 2 Monocita*

## **Granulociti neutrofil**

I neutrofil rappresentano la popolazione cellulare innata più abbondante nella circolazione sistemica, costituendo circa dal 40 al 70% della conta totale dei leucociti [36].

Sono una componente chiave del sistema immunitario e agiscono come sentinelle per eliminare gli agenti patogeni. Quando si verifica l'infezione, i neutrofil migrano rapidamente verso il sito d'infezione ed eliminano l'agente patogeno mediante diversi meccanismi, tra cui la fagocitosi e il rilascio delle specie reattive dell'ossigeno [37].

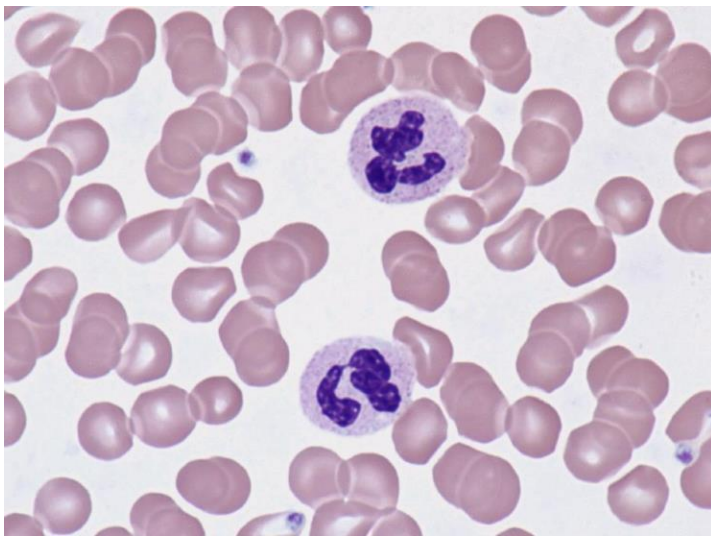
In condizioni fisiologiche, i neutrofil vanno incontro ad apoptosi per mantenere la loro omeostasi. Durante la sepsi, invece, subiscono diverse alterazioni funzionali, tra cui una ridotta migrazione, un'alterata attività antimicrobica e un'apoptosi ritardata, contribuendo alla disfunzione

immunitaria e all'inflammatione persistente [38,39]. Nel complesso, le alterazioni dei neutrofili contribuiscono al peggioramento della sepsi e allo sviluppo di complicanze secondarie.

Durante l'infezione, la conta dei neutrofili aumenta considerevolmente ed è generalmente associata alla gravità complessiva dell'infezione. Tuttavia, nella sepsi grave, l'apoptosi dei neutrofili è ritardata, limitando in alcuni casi l'utilità della conta dei neutrofili.

I fattori che portano alla neutrofilia, ossia l'aumento dei neutrofili, sono molteplici: dallo stress sia fisico che emotivo al fumo [40]. Inoltre, i disturbi cronici, come le malattie infiammatorie intestinali, le malattie reumatiche e l'epatite sono caratterizzati da neutrofilia di base [41].

Pertanto, la conta dei neutrofili da sola ha uno scarso potere diagnostico e prognostico per la sepsi.



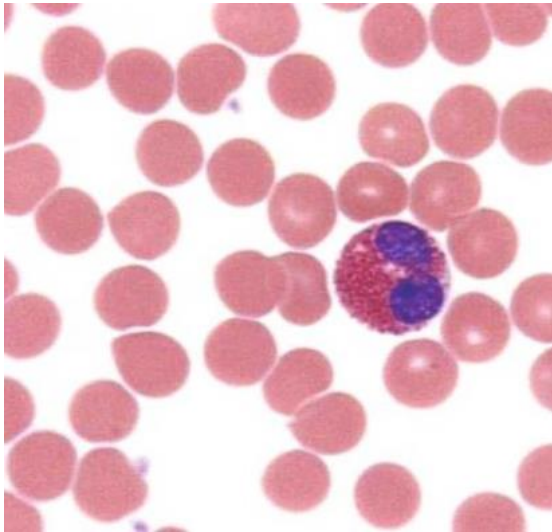
*Figura 3 Granulociti neutrofili*

## **Granulociti eosinofili**

Gli eosinofili rappresentano l'1-4% dei leucociti circolanti e hanno un ruolo fondamentale nella difesa dell'ospite contro gli elminti e nelle reazioni allergiche. Possiedono recettori per molti mediatori dell'inflammatione, producono e rilasciano una serie di molecole biologicamente attive, tra cui proteine citotossiche, mediatori lipidici, chemochine e citochine. Gli eosinofili vengono attivati in seguito a stimoli, fisiologici o patologici, come un'infezione e una volta attivi possono migrare negli organi e nei tessuti bersaglio, dove rilasciano i loro prodotti e promuovono l'inflammatione locale, nonché il rimodellamento dei tessuti [42].

Gli eosinofili sono riconosciuti come protagonisti nella modulazione delle risposte immunitarie e infiammatorie locali e sistemiche. È ormai noto che l'eosinopenia si verifica durante l'infezione acuta [43]. Abidi et al. in primo luogo, ha valutato il potenziale ruolo dell'eosinopenia come

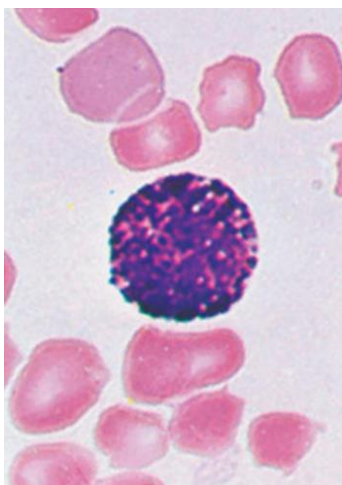
biomarker della sepsi, dimostrando che ha una buona sensibilità e specificità nella diagnosi della sepsi [44]. Successivamente, diversi autori hanno affrontato il valore dell'eosinopenia per diagnosticare e predire la prognosi della sepsi, ottenendo risultati incoerenti e controversi [45,46,47,48].



*Figura 4 Granulocita eosinofilo*

### **Granulociti basofili**

I basofili rappresentano i granulociti più rari e costituiscono circa lo 0,5-1% della conta totale dei leucociti. Sono caratterizzati dalla presenza di granuli basofili all'interno del citoplasma, contenenti diversi mediatori allergici come l'istamina, e condividono alcune importanti caratteristiche con i mastociti [49]. Sia i basofili che i mastociti esprimono il recettore delle IgE ad alta affinità sulla loro superficie e rilasciano mediatori chimici che inducono allergie come l'istamina in risposta a vari stimoli.



*Figura 5 Granulocita basofilo*

## 1.2.2 GLOBULI ROSSI

I globuli rossi, o eritrociti, sono le cellule circolanti più abbondanti e vengono prodotti nel midollo osseo attraverso un processo complesso, noto come eritropoiesi, che inizia con la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche multipotenti in precursori eritroidi. La fase finale porta alla produzione e rilascio nel circolo sanguigno dei reticolociti, globuli rossi immaturi, che completano il processo di maturazione in eritrociti. In condizioni fisiologiche, i globuli rossi hanno una caratteristica forma a disco biconcavo; hanno una durata di vita di 120 giorni e vengono metabolizzati dai macrofagi nella milza e nel fegato [50].

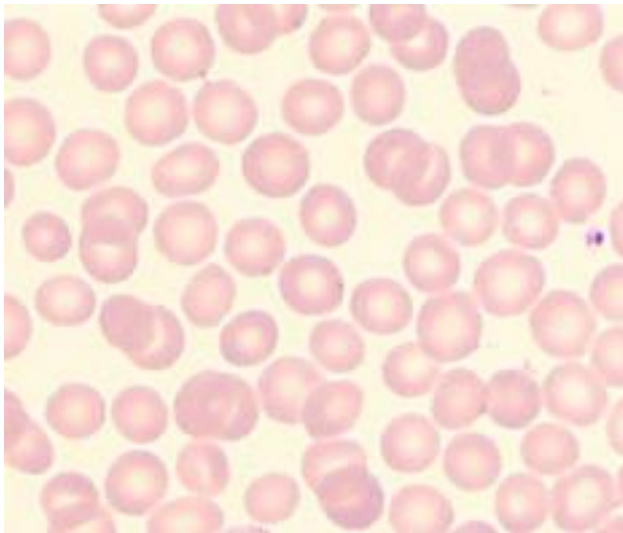
L'eritrocita è un trasportatore di gas; in particolare, è un carrier che trasporta emoglobina e favorisce lo scambio di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> tra i polmoni e altri tessuti. Tuttavia, i globuli rossi, hanno anche un ruolo importante nell'immunità cellulare del sangue, rappresentando le cellule battericide circolanti [51,52].

Quando gli eritrociti vengono lisati dai batteri, la loro emoglobina rilascia radicali liberi che distruggono la parete cellulare e la membrana dell'agente patogeno, uccidendolo [56].

La sepsi è caratterizzata da una diminuzione della conta dei globuli rossi, che potrebbe essere dovuta a diversi meccanismi legati all'alterata produzione o sopravvivenza degli stessi [53].

La soppressione della produzione di globuli rossi potrebbe essere il risultato di una carenza funzionale di ferro, di una ridotta sintesi di eritropoietina, di infezioni e di infiammazioni. Inoltre, anche delle condizioni cliniche preesistenti come cancro, malattie epatiche o insufficienza renale possono contribuire alla perdita di globuli rossi durante la sepsi [54]. La riduzione della sopravvivenza dei globuli rossi può essere dovuta ad un'alterazione indotta da agenti patogeni e reazioni immunitarie. Infatti, la sepsi, altera drasticamente la morfologia e la reologia dei globuli rossi (viscosità, aggregazione e deformabilità). Di conseguenza il sistema emocateretico elimina molto più rapidamente i globuli rossi alterati [55].

L'emocromo di base fornisce diversi parametri relativi alle caratteristiche dei globuli rossi, tra cui l'emoglobina (Hb), l'ematocrito (HCT), il volume corpuscolare medio (MCV), l'emoglobina corpuscolare media (MCV) e l'ampiezza della distribuzione del globulo rosso (RDW).



*Figura 6 Globuli rossi*

### **Emoglobina (Hb)**

L'emoglobina (Hb) è una proteina presente nei globuli rossi. Svolge diverse funzioni essenziali nel corpo umano, principalmente legate al trasporto di gas respiratori e alla regolazione dell'equilibrio acido base. La principale funzione dell'emoglobina è il trasporto di ossigeno dai polmoni ai tessuti e di anidride carbonica dai tessuti ai polmoni per essere espirata. Svolge anche un'importante funzione nella regolazione del pH del sangue agendo come tampone.

La diminuzione dell'emoglobina, definita come anemia, è comune nei pazienti con sepsi e, in generale, nelle malattie critiche [57]. La misurazione della concentrazione di Hb è fondamentale per il processo decisionale relativo alla trasfusione di globuli rossi.

### **Ematocrito (HTC)**

L'ematocrito indica il volume frazionario di un campione di sangue intero occupato dai globuli rossi, espresso in percentuale. I valori normali, oltre ad essere lievemente maggiori nell'uomo rispetto alla donna, possono variare in base a diversi fattori come l'età, la gravidanza e l'altitudine. Il test può essere usato anche per valutare e monitorare alcune condizioni che comportano variazioni nei globuli rossi.

La sepsi è caratterizzata da una riduzione dell'ematocrito [58].



## **Volume corpuscolare medio (MCV)**

L'MCV misura la dimensione e il volume medio dei globuli rossi circolanti. È un parametro utile per la classificazione dell'anemia in microcitica, normocitica e macrocitica. La sepsi è caratterizzata da anemia normocitica.

## **MCH e MCHC**

Sono due parametri che indicano il contenuto di emoglobina nei globuli rossi. MCH indica il contenuto di emoglobina per globulo rosso mentre MCHC esprime la quantità di emoglobina per unità di volume.

## **RDW**

L'RDW (ampiezza della distribuzione dei globuli rossi) è un parametro eritrocitario che misura la variabilità delle dimensioni dei globuli rossi nel sangue. L'interpretazione del risultato di RDW riveste un'importante utilità nella diagnosi e nel monitoraggio di numerose condizioni patologiche, caratterizzate da una disomogeneità nel volume degli eritrociti.

Un valore elevato è indice di anisocitosi (presenza di variabilità nelle dimensioni dei globuli rossi), quindi può aiutare a determinare le cause delle anemie, talassemie, deficit di ferro, carenza di vitamina B12 o folati. Per la corretta interpretazione, RDW viene confrontato con gli altri indici eritrocitari (MCH, MCHC, MCV e Hb).

Più recentemente, l'indice comunemente utilizzato dell'ampiezza di distribuzione dei globuli rossi (RDW) è stato implicato come marcatore prognostico nella sepsi.

Durante la sepsi, lo stress ossidativo e l'infiammazione portano alla riduzione della sopravvivenza e alla soppressione della maturazione dei globuli rossi, con conseguente rilascio prematuro di globuli rossi e, di conseguenza, un aumento di RDW [59]. La conta dei reticolociti riflette l'attività eritropoietica del midollo osseo. Un aumento indica una risposta compensatoria del midollo osseo a una maggiore necessità di produzione di globuli rossi. Ad oggi, solo pochi studi hanno valutato l'accuratezza dell'RDW nella diagnosi di sepsi [60,61,62].

### 1.2.3 PIASTRINE

Le piastrine, o trombociti, sono frammenti anucleari derivati dai megacariociti.

Svolgono un ruolo fondamentale nella coagulazione del sangue: si attivano e aderiscono ai vasi sanguigni danneggiati formando il tappo piastrinico iniziale; contribuiscono alla cascata coagulativa che stabilizza il tappo piastrinico mediante la formazione di fibrina e promuovono la guarigione delle ferite attraverso il rilascio di fattori di crescita che stimolano la rigenerazione dei tessuti.

Le piastrine sono dotate di un sistema di rilevamento degli agenti patogeni che consentono loro di funzionare come sentinelle nel flusso sanguigno per la rapida identificazione dell'invasione microbica. Tuttavia, come con un qualsiasi potente sistema di difesa, la disregolazione dell'immunità intravascolare mediata dalle piastrine può portare a profondi danni collaterali alle cellule e ai tessuti ospiti, con conseguente disfunzione d'organo associata alla sepsi.

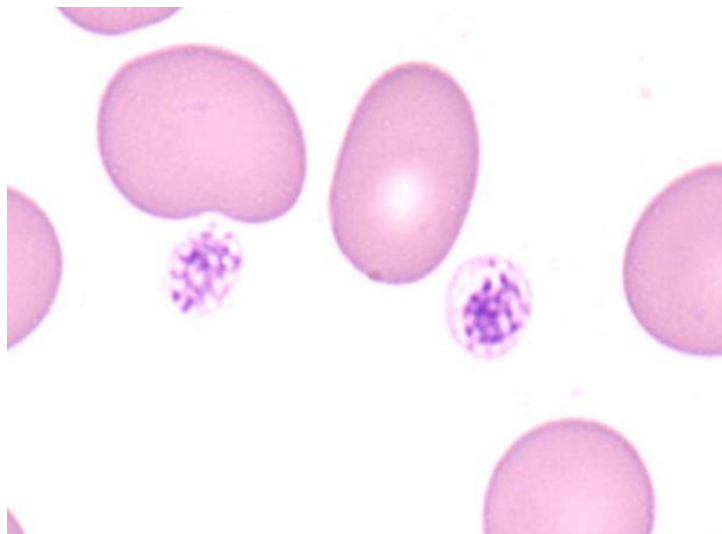
Sebbene le valutazioni quantitative delle piastrine possano sembrare rudimentali, molti studi clinici ed epidemiologici hanno identificato la conta piastrinica nel sangue periferico come un utile biomarcatore diagnostico e prognostico nella sepsi [63,64].

Un aumento acuto della conta piastrinica circolante (trombocitosi acuta) è generalmente interpretato come una manifestazione di infiammazione sistemica [65]. Tuttavia, il disturbo più comune osservato nell'infezione acuta e nella sepsi è una riduzione delle piastrine circolanti e lo sviluppo di trombocitopenia acuta [66]. La trombocitopenia associata alla sepsi è il risultato di diversi meccanismi, tra cui il notevole consumo di piastrine circolanti, che vengono reclutate dalla circolazione e sequestrate all'interno di organi altamente vascolarizzati, come i polmoni e il fegato; l'emodiluizione; l'aggregazione piastrine-leucociti; la trombocitopenia indotta da agenti patogeni; la distruzione immunomediata delle piastrine; trombocitopenia indotta da farmaci [67,68,69].

La sepsi è una delle cause più comuni di trombocitopenia nei pazienti critici, ma molte altre cause possono simulare la trombocitopenia correlata alla sepsi, come la sindrome mielodisplastica e l'anemia aplastica, così come i farmaci, i tiazidici o i chemioterapici, che inibiscono la produzione di piastrine [70].

Oltre alla conta piastrinica anche gli indici derivati dalle piastrine sono stati valutati come biomarcatori di sepsi, come l'ampiezza di distribuzione piastrinica (PDW), che aumenta durante il turnover piastrinico accelerato, e il volume piastrinico medio (MPV), che è un indicatore delle dimensioni delle piastrine; e il piastrinocrito, una misura della massa totale delle piastrine.

Alcuni autori hanno dimostrato che gli indici piastrinici sono biomarcatori prognostici affidabili della sepsi, mentre altri hanno affermato il contrario [71,72].



*Figura 7 Piastrine*

#### 1.2.4 CELL POPULATION DATA (CPD)

Negli ultimi decenni gli analizzatori ematologici hanno subito importanti progressi tecnologici. La nuova generazione può generare i cosiddetti dati sulla popolazione cellulare (CPD), parametri non ancora validati per la diagnostica, che forniscono informazioni quantitative sulle caratteristiche morfologiche e funzionali delle cellule del sangue.

I dati sulla popolazione cellulare hanno recentemente attirato l'attenzione come nuovi biomarcatori per una varietà di malattie, tra cui la sepsi [73,74,75,76,77], covid 2019 [78], e malattie ematologiche [79,80]. Le variazioni dei valori CPD possono fornire preziose informazioni sulla trasformazione morfologica e funzionale delle cellule in risposta ad un'infezione.

Pertanto, diversi parametri CPD sono stati valutati come biomarcatori di sepsi.

L'analisi CPD, eseguita utilizzando gli analizzatori ematologici, consente di espandere le informazioni sulle caratteristiche morfologiche e funzionali dei leucociti in modo semplice, accessibile, rapido e riproducibile [73].

L'applicazione clinica dei parametri CPD offre numerosi vantaggi: si tratta di parametri generati senza la necessità di campioni aggiuntivi, disponibili 24 ore su 24, 7 giorni su 7.

I dati sulla popolazione cellulare, essendo numeri, sono più oggettivi e accurati rispetto ai conteggi differenziali manuali, poiché migliaia di leucociti (WBC) vengono valutati automaticamente [81,82]

L'analisi CPD può essere generata mediante due diverse tecnologie, la tecnologia VSC e la citometria a flusso a fluorescenza.

## **Tecnologia VCS**

La tecnologia VCS serve per valutare la morfologia dei leucociti nel loro “stato quasi nativo” utilizzando tre fonti di energia indipendenti contemporaneamente. L'impedenza della corrente continua (V) misura il volume delle cellule, vengono riportate le dimensioni precise di tutti i tipi di cellule e il grado di variazione delle dimensioni delle cellule; L'opacità della radiofrequenza (C) caratterizza la conduttività, una misura della composizione interna di ciascuna cella; il raggio laser (S) misura la dispersione della luce, correlata alla granularità citoplasmatica e alla struttura nucleare.

Il “metodo Coulter” misura le variazioni di resistenza elettrica quando la cella, sospesa in un diluente conduttivo, passa attraverso una piccola apertura chiamata zona di rilevamento. Due elettrodi, uno posto su ciascun lato dell'apertura, producono una resistenza; man mano che ciascuna cellula attraversa quest'area, il percorso elettrico aumenta momentaneamente la resistenza, generando un impulso elettrico. L'accumulo di impulsi viene elaborato per la correzione della coincidenza e moltiplicato per un fattore di calibrazione, ottenendo i conteggi WBC [87].

Gli analizzatori Beckman Coulter sono stati i primi a rendere disponibili i CPD utilizzando la tecnologia VCS.

## **Citometria a flusso a fluorescenza (Sysmex)**

La Sysmex corporation, società del Giappone, applica una tecnologia basata sulla citometria a flusso di fluorescenza. Il banco ottico di lettura è costituito da una sorgente di luce laser a semiconduttori che irradia le cellule con un raggio di luce monocromatica. Specifici coloranti agiscono in modo combinato sulle cellule per evidenziare i peculiari aspetti citomorfologici e l'accurata individuazione di:

- Formula leucocitaria (5 popolazioni);
- Eritroblasti;
- Reticolociti;
- Piastrine.

Le cellule, dopo specifica colorazione, vengono trasportate con un fluido laminare nella cella di lettura dove attraversano, una dopo l'altra, il raggio di luce monocromatica.

Per l'analisi della formula leucocitaria viene utilizzato uno specifico colorante in grado di coniugarsi e marcare il DNA e l'RNA contenuti nel nucleo e negli organuli citoplasmatici dei leucociti.

Il campione viene inviato nel banco ottico di lettura per la rilevazione della rifrazione laterale di luce laser (side scatter) e dell'intensità di fluorescenza (side fluorescence).

L'intensità del segnale di side scatter dipende dalla complessità del nucleo e di granuli presenti nel citoplasma. L'intensità del segnale di side fluorescence dipende dalla quantità di acidi nucleici contenuti nella cellula. Tanto maggiore è la quantità di acidi nucleici, tanto più elevata sarà l'intensità del segnale di side fluorescence.

Le informazioni ottenute dall'analisi citofluorimetrica sono visualizzate nel canale DIFF. Ciascuna popolazione leucocitaria è rappresentata con uno specifico codice colore [83].

## **Canale differenziale WBC**

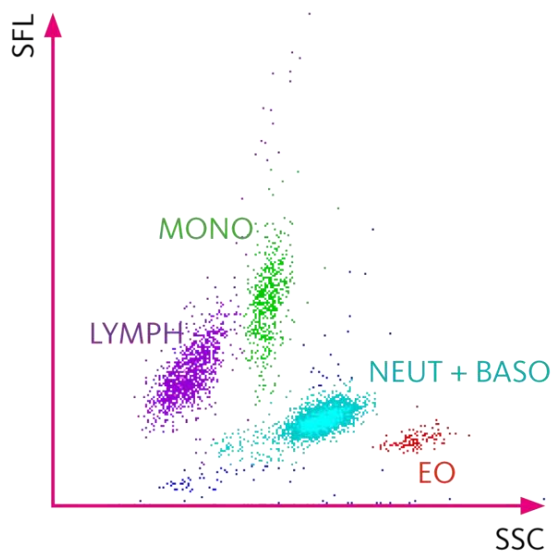
L'analisi differenziale dei globuli bianchi consiste in una reazione citochimica delle cellule con un set di reagenti, seguita dall'analisi citometrica a flusso di fluorescenza.

Il reagente di lisi appositamente sviluppato perfora inizialmente le membrane cellulari lasciando le cellule in gran parte intatte, il marcatore di fluorescenza evidenzia gli acidi nucleici intracellulari (principalmente RNA) nella seconda fase.

La composizione di questi due reagenti provoca una leggera reazione con le cellule del sangue, in modo che quasi tutta la struttura delle cellule del sangue rimanga intatta. In questo modo si ottiene una separazione ottimale, in particolare dei linfociti e dei monociti.

Il campione preparato viene quindi analizzato utilizzando la citometria a flusso a fluorescenza.

I segnali di misurazione relativi alla diffusione laterale (SSC) e alla fluorescenza laterale (SFL) vengono analizzati e rappresentati in un diagramma di dispersione. Le cellule con proprietà citochimiche simili rientrano nella stessa area dello scattergram e possono essere separate utilizzando un algoritmo software avanzato. Il canale differenziale WBC fornisce i conteggi di dieci sottopopolazioni di globuli bianchi, inclusi i granulociti immaturi (IG), nonché informazioni di segnalazione in caso di anomalie.



*Figura 8 Il diagramma di dispersione mostra una distribuzione cellulare normale misurata negli analizzatori della serie XN*

Il canale WDF, o canale DIFF, differenzia e conta i linfociti (viola), monociti (verde), eosinofili (rosso), neutrofili maturi (azzurro) e neutrofili immaturi (blu intenso) e rileva cellule anomale come globuli bianchi immaturi e cellule atipiche. L'analisi prevede la marcatura delle cellule del sangue con coloranti fluorescenti dopo la perforazione della membrana cellulare con lisati specifici. L'intensità della fluorescenza (SFL) è utilizzata per separare le cellule in base al contenuto di DNA/RNA e determinare l'imaturità e l'attivazione delle cellule esaminate (asse Y). La diffusione in avanti (FSC, asse Z) e la diffusione laterale (SSC, asse X) indicano rispettivamente la dimensione della cellula e la complessità della struttura intracellulare.

I segnali ottici lungo l'asse X (scattering laterale) sono legati alla complessità interna; la fluorescenza lungo l'asse Y rappresenta il contenuto di acido nucleico, mentre la dispersione in avanti (asse Z) è proporzionale alla dimensione della cellula.

Lungo l'asse X è riportato il seguente CPD: complessità dei neutrofili (NE-SSC), complessità dei linfociti (LY-X), complessità dei monociti (MO-X), ampiezza di dispersione della complessità dei neutrofili (NE-WX), ampiezza di dispersione della complessità dei linfociti (LY-WX) e ampiezza di dispersione della complessità dei monociti (MO-WX); CPD sull'asse y: intensità di fluorescenza dei neutrofili (NE-SFL), intensità di fluorescenza dei linfociti (LY-Y), intensità di fluorescenza dei monociti (MO-Y), ampiezza di dispersione della fluorescenza dei neutrofili (NEWY), ampiezza di dispersione della fluorescenza dei linfociti (LYWY) e larghezza di dispersione della fluorescenza dei monociti (MO-WY); e CPD riportati sull'asse z: dimensione dei neutrofili (NE-FSC), dimensione dei linfociti (LY-Z), dimensione dei monociti (MOZ), larghezza di dispersione

della dimensione dei neutrofili (NE-WZ), larghezza di dispersione della dimensione dei linfociti (LY-WZ) e l'ampiezza di dispersione delle dimensioni dei monociti (MO-WZ).

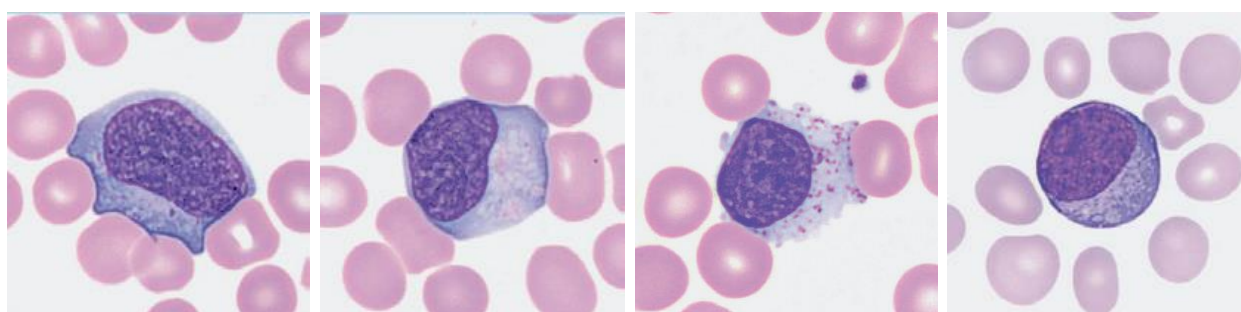
Sulla base di questa tecnologia e dei parametri CPD, Sysmex ha introdotto una serie di nuovi parametri diagnostici che supportano il rilevamento e il monitoraggio di malattie infiammatorie e infezioni. I parametri estesi di infiammazione sono un pacchetto di vari parametri clinici che consentono di valutare lo stato di attivazione dei neutrofili (Neutrofil Granularity Intensity [NEUT-GI] e Neutrofil Reactive Intensity [NEUT-RI]) e dei linfociti (RE-LYMP e AS-LYMP) quantitativamente. NEUT-GI corrisponde a NE-SSC e NEUT-RI a NE-SFL [87].

### Parametri infiammatori estesi

RE-LYMP, AS-LYMP, NEUT-GI, NEUT-RI e GI

Attivazione dei linfociti: linfociti reattivi (RE-LYMP) e linfociti che sintetizzano anticorpi (AS-LYMP)

Sia nelle infezioni batteriche che virali, nello striscio di sangue periferico si possono osservare linfociti trasformati. Solitamente queste cellule si presentano con caratteristiche morfologiche eterogenee tra cui dimensioni maggiori, un nucleo rotondo spesso con un grande nucleolo e un citoplasma abbondante e basofilo. Nella forma più matura, che è chiamata plasmacellula, le cellule B effettrici sono piene di reticolo endoplasmatico ruvido, mentre, le cellule T ne contengono pochissimo.



*Figura 9 Esempi di linfociti attivati*

I pazienti con malattie infiammatorie necessitano di una rapida diagnosi differenziale. Affinché ciò sia possibile, i medici devono distinguere tra le infiammazioni causate da infezioni e quelle che non lo sono: devono determinare l'agente patogeno responsabile e lo stato della risposta immunitaria in caso di infezione.

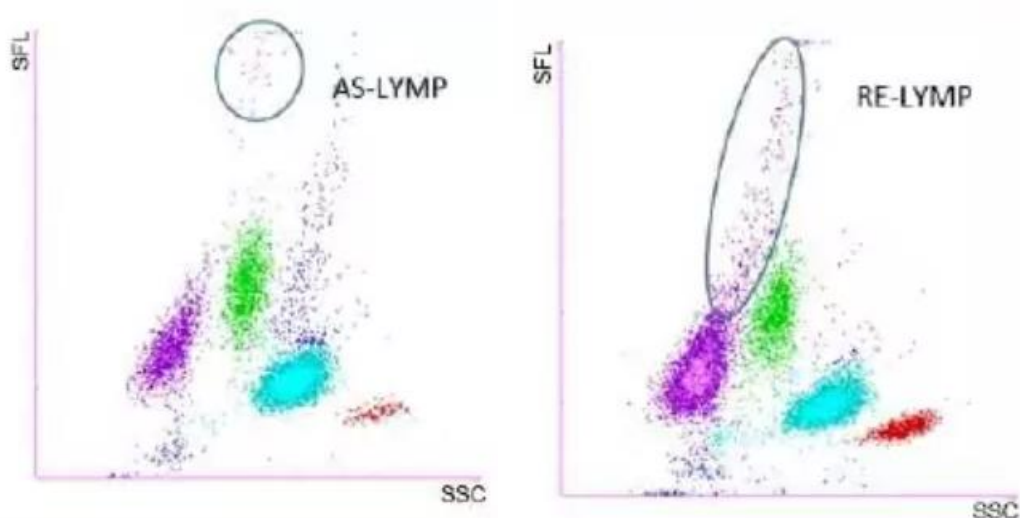
I nuovi parametri diagnostici RE-LYMP ed AS-LYMP aiutano i medici a diagnosticare, trattare e monitorare i pazienti con condizioni infiammatorie fornendo ulteriori informazioni sull'attivazione della risposta immunitaria.

RE-LYMP sta per linfociti reattivi e riflette tutti i linfociti che hanno un segnale di fluorescenza più elevato rispetto alla normale popolazione linfocitaria. Il parametro è fornito sia in assoluto che in percentuale. La popolazione di AS-LYMP è sempre inclusa nel conteggio RE-LYMP.

Il parametro AS-LYMP quantifica i linfociti B attivati (plasmacellule) che sintetizzano gli anticorpi. Viene fornito in termini assoluti e percentuali e riflette la sottopopolazione di linfociti con i segnali di fluorescenza più elevati.

La combinazione di questi parametri fornisce ulteriori informazioni sull'attivazione cellulare della risposta immunitaria innata e adattativa. La variazione di valore di questi parametri dipende dalla natura dello stimolo infiammatorio, dalla gravità e dallo stadio dell'infezione.

Le concentrazioni di queste due popolazioni cellulari indicano se esiste una risposta immunitaria cellulo-mediata o umorale ai patogeni.



*Figura 10 Scattergram dei canali WDF per spiegare l'aspetto di AS-LYMP e RE -LYMP.*



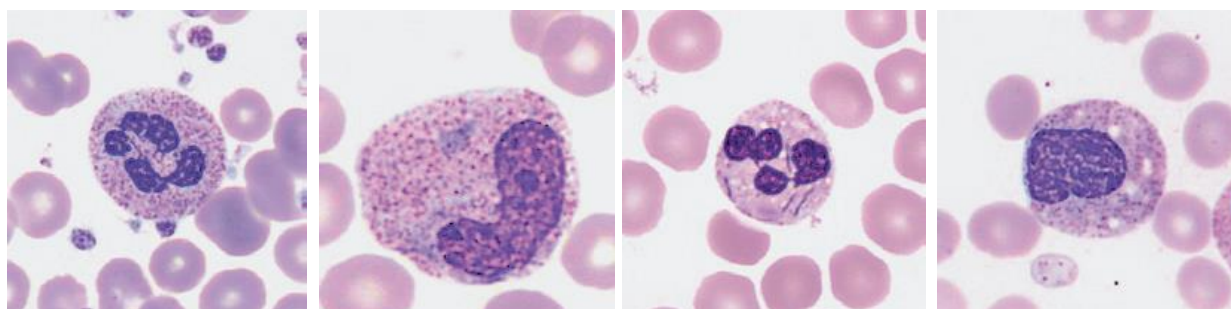
## **Attivazione dei neutrofili: intensità di reattività dei neutrofili (NEUT-RI) e intensità di granularità dei neutrofili (NEUT-GI)**

L'attivazione dei neutrofili è un indicatore della risposta immunitaria innata precoce, quindi sia NEUT-GI che NEUT-RI saranno aumentati in tale condizione. Una volta attivati secernono una varietà di citochine proinfiammatorie e sostanze antibatteriche e agiscono anche come cellule presentanti l'antigene, che sono in grado di attivare la risposta immunitaria adattativa [86]

Alterazioni nella morfologia dei neutrofili (dimensione, forma e composizione), meccanica (deformabilità) e motilità (chemiotassi e migrazione) sono stati osservati durante l'infezione [87]

A livello morfologico possiamo distinguere i neutrofili attivati dai neutrofili a riposo. Il termine "granulazione tossica" viene utilizzato per indicare un aumento di densità e colorazione dei granuli che si verifica regolarmente con l'infezione batterica. La presenza dei vacuoli citoplasmatici è indicativa di un aumento di fagociti, attività dei neutrofili in risposta all'infezione batterica.

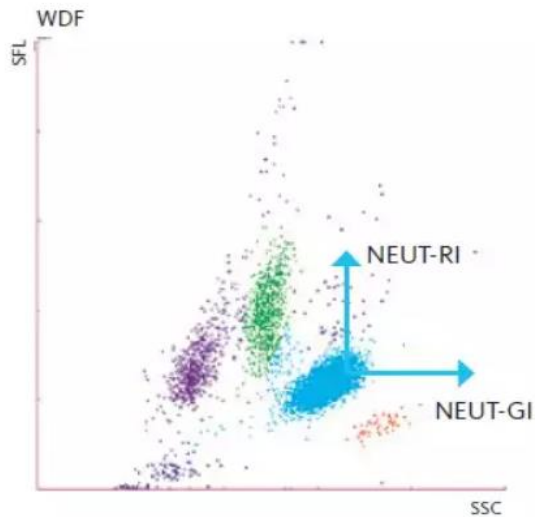
Raramente, in presenza di numerosi batteri o funghi, i microrganismi sono visibili all'interno dei vacuoli o liberamente nel citoplasma dei neutrofili. Molti neutrofili contengono corpi di Döhle che rappresentano un segno di attivazione dopo la stimolazione infiammatoria.



*Figura 11* Differenti esempi di neutrofili. 1 Granulazione tossica, 2 corpi di Dohle, 3 bastoncini intracellulari gram negativi, 4 vacuolizzazione.

Nel canale XN-DIFF, le cellule vengono differenziate in base all'intensità del segnale di fluorescenza (SFL), alla loro dimensione e alla loro struttura interna. Le cellule attivate non solo hanno una diversa composizione lipidica della membrana ma anche una maggiore attività nel citoplasma poiché producono attivamente, ad esempio, citochine. Di conseguenza, l'intensità del segnale di fluorescenza delle cellule attivate è maggiore del segnale di fluorescenza delle cellule a riposo. Il parametro NEUT-RI riflette questa intensità di reattività dei neutrofili, che rappresenta la loro attività metabolica.

La luce diffusa lateralmente a 90 gradi del segnale XN-DIFF fornisce informazioni sulla densità o complessità delle cellule, che rappresenta la granularità delle cellule. Pertanto, se la complessità dei neutrofili aumenta in seguito a un cambiamento di funzionalità, ad esempio a causa di granulazione tossica o vacuolizzazione, anche la posizione della nuvola di neutrofili nello scattergram viene influenzata.



*Figura 12 Il segnale SSC della popolazione di neutrofili, tracciato sull'asse x del diagramma di dispersione, è un'indicazione della granularità e della struttura interna delle cellule. L'intensità della fluorescenza, che corrisponde al contenuto cellulare di RNA, è tracciata sull'asse delle y ed è un indicatore di una maggiore attività dell'RNA, è tracciata sull'asse delle y ed è un indicatore di una maggiore attività dell'RNA [91].*

## Granulociti immaturi

Si tratta di precursori dei granulociti neutrofili e cioè metamielociti, mielociti e promielociti, che tranne che in alcune condizioni fisiologiche come l'età neonatale e la gravidanza, di regola non si trovano nel torrente circolatorio. La loro comparsa nel sangue periferico può indicare una risposta midollare a infezioni, neoplasie o altri processi infiammatori. Anche alcune forme leucemiche sono caratterizzate da un'elevata percentuale di granulociti immaturi. La produzione di citochine provocata da agenti patogeni può stimolare il loro rilascio dal midollo. Alcuni autori hanno scoperto che un valore elevato di IG è indicativo di sepsi [84], mentre valori bassi possono escludere in modo affidabile la sepsi [85].

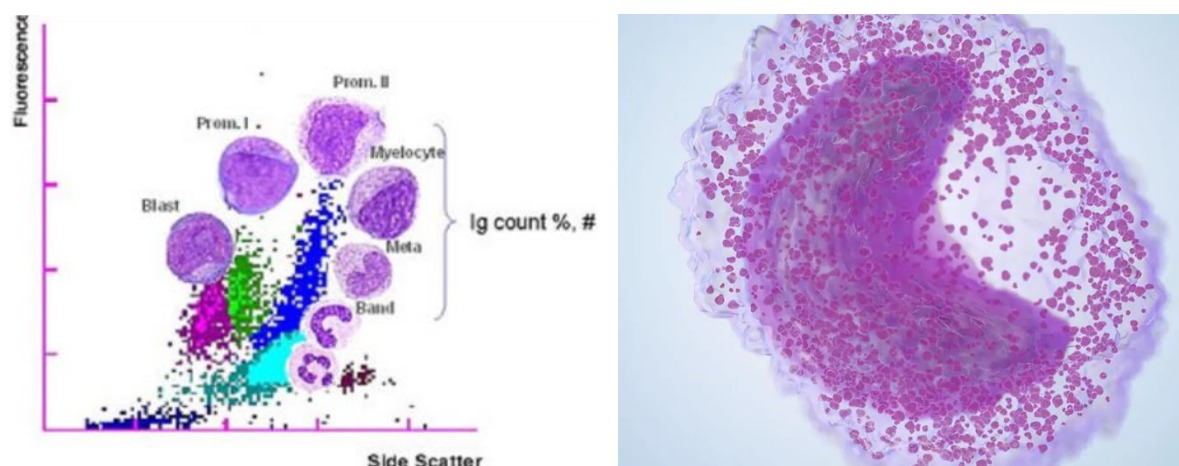


Figura 13 Scattergram del canale WDF con rappresentazione dei granulociti immaturi

## Parametri posizionali

### Complessità dei neutrofili (NE-SSC)

Questo parametro aumenta in presenza di maggiori quantità di granuli (ad esempio nei neutrofili con granulazioni tossiche), vacuoli e altre inclusioni citoplasmatiche. Diminuisce in presenza di complessità cellulari inferiori (ad esempio nei granulociti ipo-granulati).

### Ampiezza della distribuzione della complessità dei neutrofili (NE-WX)

L'aumento di questo parametro riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei neutrofili rispetto alla complessità cellulare.

### **Intensità di fluorescenza dei neutrofilii (NE-SFL)**

Aumenta in proporzione alla quantità di DNA e RNA cellulare, come ad esempio nei granulociti immaturi o nei neutrofilii a banda.

### **Ampiezza della distribuzione dell'intensità di fluorescenza dei neutrofilii (NE-WY)**

L'aumento riflette il grado eterogeneità della popolazione dei neutrofilii rispetto all'intensità di fluorescenza.

### **Ampiezza della distribuzione della dimensione cellulare dei neutrofilii (NE-WZ)**

L'aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei neutrofilii rispetto alle dimensioni cellulari.

### **Complessità dei linfociti (LY-X)**

Aumenta in presenza di maggiori quantità di granuli o vacuoli (ad esempio nei grandi linfociti granulari).

### **Ampiezza della distribuzione della complessità dei linfociti (LY-WX)**

L'aumento di questo parametro riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei linfociti rispetto alla complessità cellulare.

### **Intensità di fluorescenza dei linfociti (LY-Y)**

Aumenta in proporzione alla quantità di DNA e RNA cellulare, come nei linfociti attivati/anormali, linfoblasti, ecc.

### **Ampiezza della distribuzione dell'intensità di fluorescenza dei linfociti (LY-WY)**

L' aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei linfociti rispetto all'intensità di fluorescenza.

### **Dimensione cellulare dei linfociti (LY-Z)**

Varia al variare delle dimensioni dei linfociti (ad es., potrebbero aumentare per linfociti attivati o diminuire per linfociti picnotici).

### **Ampiezza della distribuzione della dimensione cellulare dei linfociti (LY-WZ)**

L'aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei linfociti rispetto alle dimensioni cellulari.

### **Complessità dei monociti (MO-X)**

Aumenta in presenza di maggiori quantità di granuli, vacuoli e altre inclusioni citoplasmatiche. Diminuisce in presenza di una minore complessità cellulare dei monociti.

### **Ampiezza della distribuzione della complessità dei monociti (MO-WX)**

L'aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei monociti rispetto alla complessità cellulare.

### **Intensità di fluorescenza dei monociti (MO-Y)**

Aumenta in proporzione alla quantità di DNA e RNA cellulare (ad esempio nei monociti attivati e/o nei monoblasti).

## **Ampiezza della distribuzione dell'intensità di fluorescenza dei monociti (MO-WY)**

L'aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei monociti rispetto all'intensità di fluorescenza

## **Dimensione cellulare dei monociti (MO-Z)**

Varia al variare delle dimensioni dei monociti.

## **Ampiezza della distribuzione della dimensione cellulare dei monociti (MO-WZ)**

L'aumento riflette il grado di eterogeneità della popolazione dei monociti rispetto alle dimensioni cellulari [88].

### 1.3 ALTRI BIOMARKER DI SEPSI

#### 1.3.1 PROCALCITONINA (PCT)

La procalcitonina è una proteina plasmatica solubile prodotta dalle cellule C della tiroide, dalle cellule neuroendocrine extratiroidee (polmone e intestino) e da monociti e macrofagi di vari organi. Viene prodotta selettivamente in risposta a infezioni batteriche e non aumenta (se non in modo poco significativo) nelle infezioni virali, in malattie autoimmuni e neoplasie.

Nelle persone sane, i livelli di PCT nel sangue sono molto bassi, tipicamente inferiori a 0,05 ng/ml. Tuttavia, i livelli aumentano notevolmente in seguito alla risposta alle endotossine batteriche e alle citochine pro-infiammatorie e sono fortemente correlati all'estensione e alla gravità dell'infezione. Al contrario, i livelli di PCT sono attenuati dall'interferone (INF)- $\gamma$ , una citochina rilasciata tipicamente in risposta all'infezione virale [89].

### 1.3.2 PROTEINA C REATTIVA (PCR)

La proteina C reattiva (PCR) è sintetizzata dal fegato e dagli adipociti e rappresenta un indice d'infiammazione aspecifico; infatti, la sua concentrazione nel sangue aumenta in presenza di processi infiammatori di diversa natura. Il fegato è responsabile della sintesi di un vasto numero di molecole proteiche implicate in numerosi processi omeostatici. L'esordio di un'infiammazione, segnato da specifiche citochine, induce l'organo a modificare il pattern biosintetico. In questo modo, al fine di contrastare lo stimolo infiammatorio, viene privilegiata la sintesi delle proteine di fase acuta [92]. Pertanto, durante il processo flogistico, il cambiamento biosintetico del fegato, determina un aumento repentino della concentrazione ematica della PCR. L'interleuchine-6, prodotta dai macrofagi e da altre cellule immunocompetenti, stimola le cellule epatiche e adipose a sintetizzare un quantitativo maggiore di proteina C reattiva, causando un incremento dei livelli sierici.

Generalmente si attiva per svolgere un'azione di difesa dell'organismo [93].

La presenza della PCR è fondamentale per la rimozione dei patogeni e/o delle cellule danneggiate, che altrimenti causerebbero un prolungamento della flogosi. L'aumento della PCR può verificarsi in risposta ad un gran numero di eventi fisiopatologici come infezioni, malattie autoimmuni, patologie infiammatorie croniche, traumi ecc.


### 1.3.3 MR-proADM


La proadrenomedullina sierica medio regionale (MR-proADM) è un nuovo biomarcatore prognostico di sepsi in quanto aumenta sia nelle infezioni batteriche che virali, aumenta come risposta di difesa al danno e alla disfunzione d'organo ristabilendone la funzione endoteliale, stabilizza la microcircolazione in risposta ad un'infezione e protegge dal danno d'organo indotto da LPS [94].

## 1.4 INDICAZIONI DI TRATTAMENTO ANTIBIOTICO E ANTIMICOTICO EMPIRICO

La sepsi e lo shock settico dovrebbero essere riconosciuti come emergenze mediche in cui il tempo conta, come nel caso dell'ictus e dell'infarto miocardico acuto. Il riconoscimento precoce e la rapida istituzione di misure di rianimazione sono fondamentali. Ma riconoscere la sepsi può essere una sfida. Il manuale della terapia antibiotica empirica nasce dalla necessità di uniformare i comportamenti prescrittivi degli antibiotici al fine di migliorarne la prescrizione.

L'uso inappropriato degli antibiotici sia in ambito ospedaliero che sul territorio rappresenta uno dei fattori causali della diffusione dell'antibiotico resistenza con importanti ricadute sulle infezioni correlate all'assistenza e sui costi di gestione dei casi di infezione da microrganismi multi-resistenti (MDR). Oltre al problema della diffusione di tali ceppi multi-resistenti, va tenuto in considerazione il rischio di mortalità del paziente; le più recenti evidenze scientifiche hanno dimostrato che l'uso scorretto di un antibiotico/antifungino, soprattutto in paziente critico, aumenta il rischio di mortalità e prolunga la sua degenza ospedaliera per i rischi ad esso connessi.

	<b>Protocollo</b> <b>PO DSRI ASL AL 003</b> <b>"Indicazioni di trattamento antibiotico e antimicotico empirico"</b>	Data di emissione: Luglio 2022 Revisione n° 2 Pagina 13 di 34
---	---	--

	<b>Protocollo</b> <b>PO DSRI ASL AL 003</b> <b>"Indicazioni di trattamento antibiotico e antimicotico empirico"</b>	Data di emissione: Luglio 2022 Revisione n° 2 Pagina 14 di 34
---	---	--

### 7.4.2 SEPSI

#### SEPSI A PARTENZA NON DEFINITA NON NEUTROPENICO

Acquisita in comunità o acquisita in ospedale con degenza < 5 gg senza fattori di rischio			
Patologia	Antibiotico	Allergia β-lattamici	Durata terapia ev
<b>SEPSI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>amoxicillina/clavulanato ± AMG</li> <li>ceftriaxone/cefotaxime/cefazidime ± AMG</li> </ul>	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>ceftriaxone/cefotaxime/cefazidime ± AMG</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina + AMG</li> </ul>	
<b>SHOCK SETTICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>piperacillina/tazobactam + vancomicina/daptomicina ± AMG</li> <li>cefepime + vancomicina/daptomicina ± AMG</li> </ul> Se FdR ESBL (nota 2): consulenza infettivologica Se FdR CRE (nota 3): consulenza infettivologica	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>cefepime + vancomicina</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina/ciprofloxacina (nota 5) + vancomicina/daptomicina + AMG</li> </ul>	


#### NEUTROPENIA FEBBRILE (conta neutrofili < 500 cell/mm<sup>3</sup>)

- consultare sempre oncologo/ematologo curante
- eseguire tampone nasale (per ricerca MRSA) e tampone rettale (ricerca KPC o CRE) nei pazienti neutropenici ricoverati

Patologia	Antibiotico	Allergia β-lattamici	Switch terapia orale Durata terapia ev+os
<b>BASSO RISCHIO (MASC score ≤ 21)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>amoxicillina/clavulanato + chinolonico per os</li> </ul> Escludere pazienti che non possono assumere farmaci per os (mucose, vomito) o hanno diarrea o che non possono assicurare una gestione domiciliare sicura o che non possono accedere ai controlli o che hanno eseguito profilassi con chinolonici	<ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina + ciprofloxacina + clindamicina</li> </ul>	Infezione non documentata: sino ad apiressia > 24 h e N > 500  Infezione documentata: <ul style="list-style-type: none"> <li>polmonite, tessuti molli, vie urinarie, batteriemia: almeno 2 settimane</li> <li>Candida, Stafilococco aureo: almeno 2 settimane</li> <li>Aspergillo: almeno 8-12 settimane</li> </ul>
<b>FEBBRE PERSISTENTE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>piperacillina/tazobactam ± fluconazolo</li> <li>cefepime ± fluconazolo</li> </ul> Se FdR MRSA (nota 1): consulenza infettivologica Se FdR ESBL (nota 2): consulenza infettivologica Se FdR CRE (nota 3): consulenza infettivologica	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>cefepime</li> <li>meropenem/imipenem</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina + vancomicina/daptomicina + AMG</li> </ul>	Infezione non documentata: sino ad apiressia > 24 h e N > 500  Infezione documentata: <ul style="list-style-type: none"> <li>polmonite, tessuti molli, vie urinarie, batteriemia: almeno 2 settimane</li> <li>Candida, Stafilococco aureo: almeno 2 settimane</li> <li>Aspergillo: almeno 8-12 settimane</li> </ul>

Acquisita in ospedale con degenza > 5 gg o acquisita in comunità con fattori di rischio (immunocompromesso/reciente o frequenti ricoveri)			
Patologia	Antibiotico	Allergia β-lattamici	Switch terapia orale Durata terapia ev+os
<b>SEPSI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>piperacillina/tazobactam</li> <li>cefepime</li> </ul> Se FdR MRSA (nota 1): consulenza infettivologica Se FdR ESBL (nota 2): consulenza infettivologica Se FdR CRE (nota 3): consulenza infettivologica	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>cefepime ± vancomicina</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina/ciprofloxacina (nota 5) + vancomicina/daptomicina + AMG</li> </ul>	
<b>SHOCK SETTICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>meropenem/imipenem + vancomicina/daptomicina ± AMG</li> </ul> Considerare echinocandina se FdR per candidemia  Se FdR CRE (nota 3): consulenza infettivologica	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>meropenem/imipenem + vancomicina/daptomicina ± AMG</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>levofloxacina/ciprofloxacina (nota 5) + vancomicina/daptomicina + AMG</li> </ul>	



	<b>Protocollo PO DSRI ASL AL 003 "Indicazioni di trattamento antibiotico e antimicotico empirico"</b>	Data di emissione: Luglio 2022 Revisione n° 2 Pagina 15 di 34
---	---	--

Patologia	Antibiotico	Allergia $\beta$ -lattamici	Switch terapia orale Durata terapia ev+os
<b>SHOCK SETTICO IN ALTO RISCHIO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meropenem/impinem + vancomicina/daptomicina + echinocandina <math>\pm</math> AMG</li> </ul> Se FdR CRE (nota 3): consulenza infettivologica	Allergie lievi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• meropenem/impinem + vancomicina <math>\pm</math> AMG</li> </ul> Allergia grave: <ul style="list-style-type: none"> <li>• levofloxacina + vancomicina/daptomicina + AMG</li> </ul>	Infezione non documentata: sino ad apiressia > 24 h e N > 500  Infezione documentata: <ul style="list-style-type: none"> <li>- polmonite, tessuti molli, vie urinarie, batteriemia: almeno 2 settimane</li> <li>- Candida, Stafilococco, aureo: almeno 2 settimane</li> <li>- Aspergillo: almeno 8-12 settimane</li> </ul>

Figura 14 Protocollo PO DSRI ASL AL

## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 SCOPO DELLO STUDIO

La sepsi è un'emergenza sanitaria a livello mondiale.

Si stima che circa 50 milioni di casi di sepsi si verifichino ogni anno a livello mondiale, con circa 11 milioni di decessi [96]. La sepsi può colpire chiunque senza distinzione di età, sesso, condizioni di salute anche se risultano più esposte le persone con ridotte difese immunitarie. La mortalità è elevata ed è legata al fattore tempo (inizio della terapia adeguata).

Un'altra emergenza sanitaria è costituita dall'antibiotico resistenza.

La diagnosi microbiologica dell'emocoltura richiede almeno 48 ore. Iniziare in questo intervallo di tempo una terapia empirica potrebbe ridurre, in caso di sepsi, la morbilità e la mortalità.

In caso contrario, favorirebbe l'antibiotico resistenza.

Sono stati ricercati e individuati alcuni biomarker di sepsi (procalcitonina, presepsina, MR-proADM, HBP), ma per la maggior parte di essi la rilevazione non è immediata ed ha un costo.

Per ovviare a queste problematiche sono stati studiati alcuni parametri dell'emocromo, rilevati dai moderni analizzatori ematologici automatici, che esprimono l'attivazione delle popolazioni leucocitarie di fronte ai microrganismi patogeni.

Se questi parametri ematologici avessero una sufficiente sensibilità e specificità potrebbero essere utilizzati, praticamente a costo zero, per dirigere l'atteggiamento clinico e terapeutico di fronte ad un paziente con sospetta sepsi.

In questo studio abbiamo valutato i parametri aggiuntivi dell'emocromo, prodotti dagli analizzatori Sysmex serie XN, in 348 pazienti in cui era stata eseguita l'emocoltura; lo scopo è di poter identificare degli indici dell'emocromo che possano predire con sufficiente accuratezza l'effettiva presenza di una sepsi.

## 2.2 MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati i pazienti che nel periodo dal 31/05/2022 al 31/12/2022 hanno eseguito un'emocoltura che è pervenuta al laboratorio dell'Ospedale Santo Spirito di Casale Monferrato. La loro provenienza era dai reparti di degenza e dal DEA.

In tutti i pazienti è stato anche eseguito l'esame emocromocitometrico completo, ed in alcuni sono stati dosati anche PCR e procalcitonina.

Gli emocromi raccolti in provette contenenti K2-EDTA sono stati processati entro un'ora dal prelievo sugli analizzatori ematologici XN-20 della Sysmex.

Sono stati valutati: la conta dei globuli bianchi (WBC), dei neutrofilo, dei granulociti immaturi (IG), dei parametri infiammatori estesi come RE-LYMP, AS-LYMP, NEUT-GI, NEUT-RI e parametri posizionali come Scatter laterale (ASSE X), intensità di fluorescenza (ASSE Y) e scatter frontale (ASSE Z) dei neutrofilo, monociti e linfociti.



---

*Figura 15 Analizzatore ematologico Sysmex serie XN*

Procalcitonina e PCR sono state eseguite su strumenti di chimica-clinica Cobas della ditta Roche. I flaconi delle emocolture sono stati messi ad incubare sugli strumenti Bactec della ditta BD entro 2 ore dal prelievo.

BD BACTEC è un avanzato sistema utilizzato per rilevare la positività delle emocolture. È costituito da tre stazioni di lavoro integrate (incubatore, agitatore, lettore), che operano sotto il controllo di un processore interno, il quale, oltre a verificare in modo costante le condizioni operative della macchina secondo protocolli prefissati e standardizzati, fornisce in tempo reale all'operatore ogni informazione utile.

Il cuore del sistema è formato da flaconi contenenti terreni liquidi addizionati a resine per l'assorbimento di eventuali antibiotici presenti nel campione. I campioni una volta inseriti sono sottoposti ad agitazione, ad intervalli di 30 minuti e letti in modo continuo ogni 10, per tutta la durata del protocollo.

Questi flaconi rilevano una vasta gamma di microrganismi aerobi, anaerobi, lieviti e micobatteri. La rilevazione avviene mediante un metodo fluorimetrico, che sfruttando la produzione di CO<sub>2</sub> da parte dei microrganismi, permette di evidenziare la crescita batterica in modo precoce, anche a basse concentrazioni.

I flaconi sono pronti all'uso e non necessitano di nessun trattamento. Sono dotati di etichetta e codice a barre identificativo e riportano sull'etichetta il quantitativo di sangue da inoculare. Contengono brodo di crescita nel quantitativo specifico e adeguato al tipo di ricerca [90].

La crescita microbica avviene di solito entro 24-48h, ma i flaconi vengono tenuti sullo strumento fino alla positivizzazione o fino a cinque giorni.



*Figura 16 Sistema BD Bactec per il test della sterilità del sangue*

Per i campioni positivi l'identificazione e l'antibiogramma sono stati eseguiti sul Vitek 2, uno strumento automatico di microbiologia della ditta Biomerieux. Il sistema VITEK 2 è uno strumento automatizzato utilizzato in microbiologia clinica per l'identificazione e la determinazione della sensibilità agli antimicrobici di batteri e lieviti. È ampiamente utilizzato nei laboratori clinici per diagnosticare infezioni e guidarne il trattamento appropriato.

Questo sistema offre risultati rapidi e accurati grazie alla completa automazione.

Utilizza card esclusive per l'identificazione (ID) e la valutazione della sensibilità agli antimicrobici (AST). Le card sono pronte all'uso e offrono un ampio menù di test disponibili.

Il sistema è altamente automatizzato, riducendo il tempo di lavoro manuale per i tecnici di laboratorio. Questa automazione aiuta a fornire risultati più rapidi rispetto ai metodi tradizionali.

La sua facilità d'uso e l'integrazione con i sistemi informatici di laboratorio lo rendono uno strumento prezioso per la diagnostica microbiologica moderna [91].



*Figura 17 Vitek 2 per l'identificazione microbica e sensibilità agli antibiotici*

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software SPSS IBM.

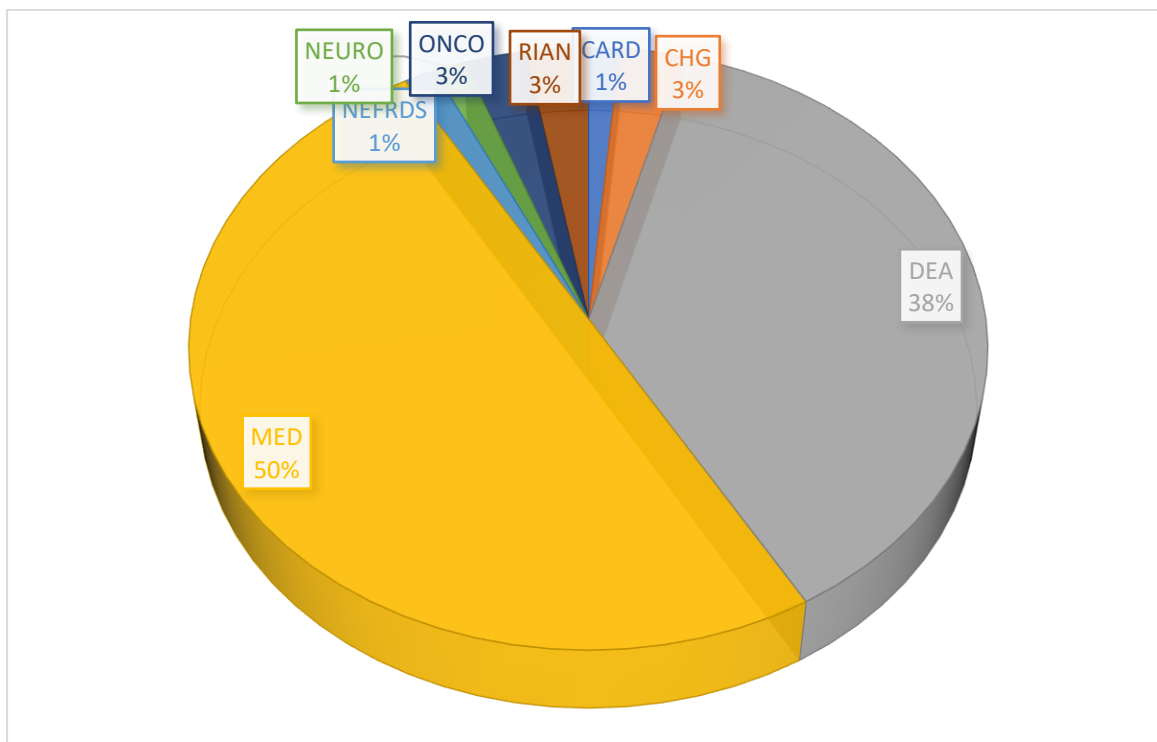
I pazienti sono stati suddivisi in positivi e negativi in base al risultato dell'emocoltura; per ogni parametro studiato nei due gruppi sono stati calcolati media e deviazione standard. Sono state confrontate le medie attraverso il test t di Student.

Attraverso l'analisi delle curve ROC sono stati individuati il cut-off, la sensibilità e la specificità di ciascun parametro.

## 2.3 RISULTATI

Su 348 pazienti studiati 73 presentano una emocoltura positiva.

La provenienza dai reparti è rappresentata graficamente dal grafico 1 e si può notare che i reparti più rappresentati sono stati medicina e DEA.



*Grafico 1 Suddivisione emocolture positive per reparti*

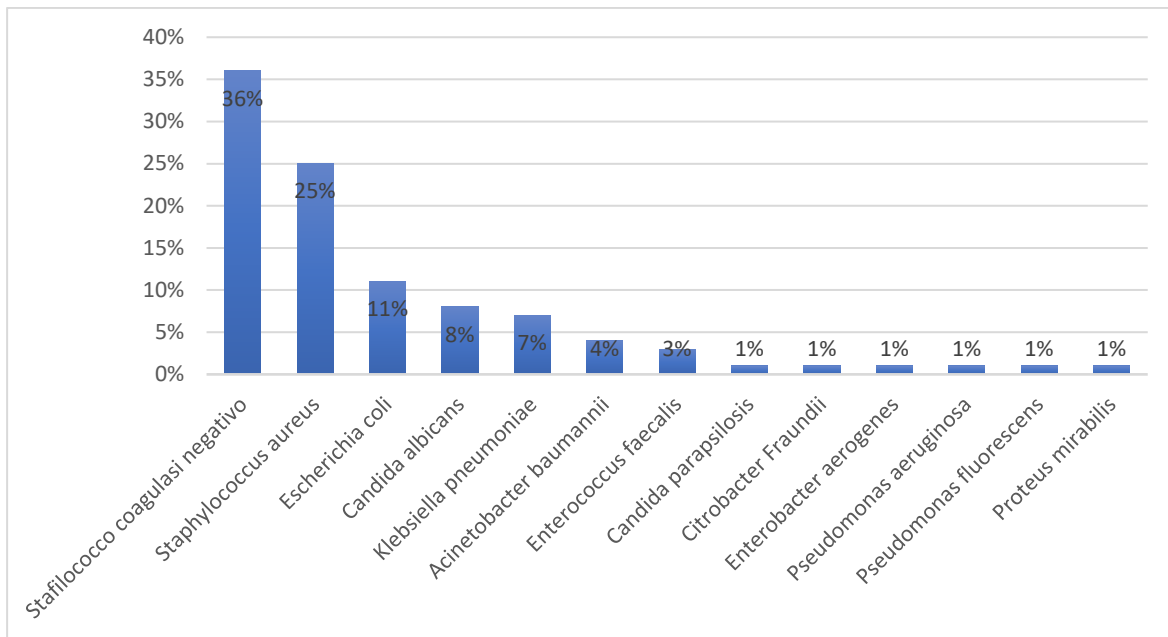
Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard di tutti i parametri considerati. La significatività della differenza tra le medie dei due gruppi è stata valutata con il test t di Student; i risultati sono illustrati nella tabella 1.

Variabile del risultato del test:	MEDIA ± DS POSITIVI	MEDIA ± DS NEGATIVI	SIGNIFICATIVITÀ POS/NEG
NE-WY	775,82 ± 202,87	693,97 ± 147,84	0,0005
NE-WX	326,63 ± 28,61	319,76 ± 33,71	0,001
IG%	2,79 ± 4,80	1,34 ± 1,81	0,004
IG#	0,54 ± 1,79	0,20 ± 0,38	0,006
ASLYMP#	0,01 ± 0,04	0 ± 0,01	0,01
RELYMP#	0,11 ± 0,14	0,07 ± 0,08	0,03
ASLYMP%	0,17 ± 0,78	0,03 ± 0,10	0,06
MOY	114,53 ± 10,74	111,89 ± 10,63	0,06
PCR	15,29 ± 11,83	20,08 ± 9,32	0,10
RELYMP%	0,95 ± 1,38	0,74 ± 0,89	0,11
NEUT-RI/SFL	52,07 ± 6,44	50,36 ± 7,42	0,12
NE-FSC	88,71 ± 10,80	88,79 ± 5,92	0,20
MOWX	259,86 ± 50,68	256,64 ± 36,81	0,20
MOWZ	690,62 ± 95,14	687,17 ± 96,67	0,20
NEUT#	12,01 ± 9,69	10,16 ± 7,13	0,26
NEUT-GI	155,96 ± 5,24	156,16 ± 5,75	0,26
WBC	13,97 ± 10,46	12,39 ± 7,40	0,30
MOZ	68,47 ± 4,29	67,62 ± 6,93	0,30
PCT	17,76 ± 32,16	9,10 ± 12,41	0,30
NEUT%	83,49 ± 11,96	78,55 ± 13,65	0,38
MOWY	725,27 ± 196,87	718,31 ± 139,90	0,40

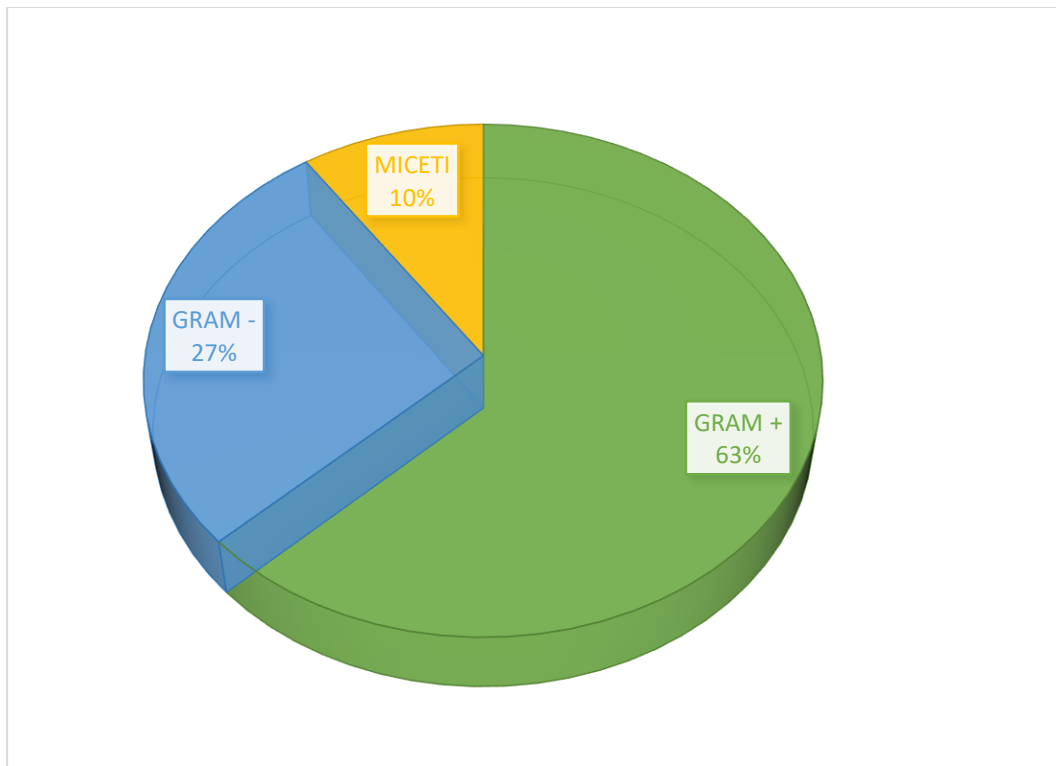
*Tabella 1 Rappresentazione tabellare della media, deviazione standard e significatività dei parametri in esame*



Sono stati valutati i microrganismi che hanno determinato la positività delle emocolture e le percentuali sono evidenziate nel grafico 2.



*Grafico 2 Suddivisione in percentuale dei microrganismi presenti nelle emocolture positive*



*Grafico 3 Suddivisione dei microrganismi per appartenenza*

Sono quindi state esaminate le emocolture la cui positività poteva essere determinata da un inquinamento accidentale del campione: sono state individuate 27 emocolture positive per stafilococchi coagulasi negativi ed in cui la crescita si è presentata in un unico flacone; sono batteri comunemente presenti sulla cute e la loro presenza in un unico flacone da emocoltura (in genere si prelevano almeno due coppie di flaconi in tempi diversi) depone per una falsa positività e sono quindi state eliminate dal gruppo dei positivi. Si è quindi rivalutata la differenza tra le medie dei due gruppi (negativi e veri positivi scremati dalle false positività dovute ad inquinamento); i risultati sono illustrati nella tabella 2.

Variabile del risultato del test:	MEDIA ± DS POSITIVI	MEDIA ± DS VERI POSITIVI	MEDIA ± DS NEGATIVI	SIGNIFICATIVITÀ POS/NEG	SIGNIFICATIVITÀ VERI POS/NEG
NE-WX	326,63 ± 28,61	334,50 ± 27,13	319,76 ± 33,71	0,001	0,0008
NE-WY	775,82 ± 202,87	798,50 ± 189,43	693,97 ± 147,84	0,0005	0,006
RELYMP#	0,11 ± 0,14	0,13 ± 0,17	0,07 ± 0,08	0,03	0,01
MOY	114,53 ± 10,74	117,45 ± 10,51	111,89 ± 10,63	0,06	0,01
ASLYMP%	0,17 ± 0,78	0,10 ± 0,24	0,03 ± 0,10	0,06	0,03
IG%	2,79 ± 4,80	3,84 ± 5,71	1,34 ± 1,81	0,004	0,04
IG#	0,54 ± 1,79	0,77 ± 2,20	0,20 ± 0,38	0,006	0,04
NEUT-RI/SFL	52,07 ± 6,44	53 ± 6,30	50,36 ± 7,42	0,12	0,05
ASLYMP#	0,01 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0 ± 0,01	0,01	0,05
PCR	15,29 ± 11,83	15,94 ± 8,90	20,08 ± 9,32	0,10	0,05
NEUT%	83,49 ± 11,96	84,23 ± 12,22	78,55 ± 13,65	0,38	0,08
PCT	17,76 ± 32,16	22,83 ± 35,31	9,10 ± 12,41	0,30	0,10
RELYMP%	0,95 ± 1,38	1,03 ± 1,01	0,74 ± 0,89	0,11	0,13
MOWY	725,27 ± 196,87	686,39 ± 212,30	718,31 ± 139,90	0,40	0,20
MOWZ	690,62 ± 95,14	689,92 ± 107,55	687,17 ± 96,67	0,20	0,20
MOX	126,87 ± 4,92	124,24 ± 5,52	125,73 ± 3,92	0,15	0,22
NEUT#	12,01 ± 9,69	13,28 ± 11,39	10,16 ± 7,13	0,26	0,30
NE-FSC	88,71 ± 10,80	88,46 ± 12,84	88,79 ± 5,92	0,20	0,30
MOZ	68,47 ± 4,29	68,51 ± 4,60	67,62 ± 6,93	0,30	0,30
NEUT-GI	155,96 ± 5,24	155,32 ± 4,84	156,16 ± 5,75	0,26	0,31
WBC	13,97 ± 10,46	14,46 ± 12,31	12,39 ± 7,40	0,30	0,32
MOWX	259,86 ± 50,68	258,24 ± 61,09	256,64 ± 36,81	0,20	0,40

Tabella 2 Differenze di significatività tra il gruppo positivi totali e negativi e il gruppo veri positivi e negativi

Si evidenzia che una differenza significativa tra medie si ha per 6 parametri quando il confronto è fatto tra negativi e positivi totali e su 10 parametri (NE-WX, NE-WY, RELYMP#, MO-Y, ASLYMP%, IG%, IG#, NEUT-RI, ASLYMP#, PCR) se riguarda i positivi privati delle emocolture probabilmente inquinate.

Abbiamo quindi effettuato l'analisi ROC su tutti i parametri: si tratta di una analisi statistica che permette di calcolare il CUT-OFF con le migliori performance di sensibilità e specificità per un determinato test diagnostico.

I dati sono presenti nella tabella 3.

Variabile/i del risultato del test:	cut-off	Sensibilità	1 - Specificità	Indice di Youden	AUC
IG#	0,117	0,696	0,377	0,318	0,635
IG%	1,050	0,652	0,334	0,318	0,641
MOX	126,750	0,652	0,364	0,288	0,607
NE-WY	684,500	0,717	0,434	0,284	0,644
NEUT-RI	49,350	0,696	0,434	0,262	0,605
NE-SFL	49,350	0,696	0,435	0,260	0,610
NEUT%	76,250	0,891	0,649	0,242	0,627
PCT	0,465	0,870	0,634	0,235	0,550
NE-WX	313,500	0,804	0,579	0,225	0,566
MOY	117,150	0,478	0,262	0,217	0,592
RELYMP#	0,055	0,703	0,497	0,206	0,527
PCR	10,795	0,667	0,488	0,179	0,561
MOZ	67,950	0,609	0,447	0,162	0,568
ASLYMP%	0,150	0,216	0,063	0,153	0,552
ASLYMP#	0,025	0,216	0,063	0,153	0,548
NEUT#	13,000	0,391	0,238	0,153	0,586
RELYMP%	1,450	0,243	0,112	0,131	0,552
WBC	16,515	0,326	0,212	0,114	0,557
MOWY	839,000	0,239	0,146	0,093	0,518
MOWX	285,500	0,261	0,169	0,092	0,515
MOWZ	741,000	0,326	0,238	0,088	0,502
NEUT-GI	147,250	1,000	0,921	0,079	0,461
NE-FSC	100,350	0,043	0,020	0,024	0,434

Tabella 3 Cut-off dei parametri ottenuto tramite l'utilizzo dell'analisi ROC

Le migliori performance con questo tipo di analisi non corrispondono esattamente a quelle del t di Student delle medie. I migliori parametri si sono rivelati i seguenti: IG#, IG%, MO-X (complessità dei monociti), NE-WY (ampiezza di dispersione della fluorescenza dei neutrofili), NEUT-RI/NE-SFL (Neutrofil Reactive Intensity/intensità di fluorescenza dei neutrofili).

Per aumentare la potenziale utilità clinica di questi parametri abbiamo utilizzato quello che abbiamo definito “SCORE di SEPSI”, dove la positività ad uno dei cinque parametri più significativi corrisponde a ‘un punto; il punteggio, quindi, può andare da 5 (massima probabilità che ci sia una sepsi) a 0 (minima probabilità).

Score	Emo pos	Emo pos %	Emo neg	Emo neg%	Sensibilità	Specificità	valore predittivo negativo
5	11	23%	15	5%	24%	95%	
4	13	28%	27	9%	52%	85%	
3	9	19%	60	21%	72%	63%	
2	9	19%	45	16%	91%	47%	
1	4	8%	68	24%	100%	22%	
0	0	0%	60	21%	100%	0%	100%

*Tabella 4 Score di sepsi*

## 2.4 DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati ottenuti ha dimostrato la potenziale utilità di questi parametri dell'esame emocromocitometrico, anche se nessuno di quelli da noi studiati ha dimostrato, se preso singolarmente, di poter essere decisivo nella diagnosi precoce di sepsi.

Questo ci ha indotto a pensare all'utilizzo combinato di quelli con le performance più significative, lo "score di sepsi" dove ad un punteggio più alto corrisponde una più alta probabilità essere di fronte ad una sepsi. I primi due dei cinque parametri che abbiamo utilizzato per questo score sono dati dai **granulociti immaturi**, in percentuale ed in valore assoluto; questi diversamente dagli altri sono approvati FDA e quindi refertabili. Sono costituiti dai precursori immaturi dei granulociti neutrofili (metamielociti, mielociti, promielociti) che normalmente non passano il filtro midollare; le infezioni sono una delle cause che possono stimolare il midollo ad immetterli in circolo e questo giustifica il loro significativo aumento nei pazienti con sepsi.

Il terzo parametro in ordine di significatività è l'**MO-X**, indice della **complessità dei monociti** e che aumenta in presenza di maggiori quantità di granuli, vacuoli e altre inclusioni citoplasmatiche; quindi, un suo aumento è giustificato dalla presenza di microrganismi nel circolo ematico.

Al quarto posto di questa ideale classifica c'è l'**NE-WY** indice della **ampiezza della distribuzione dell'intensità della fluorescenza nei neutrofili**.

La fluorescenza è determinata dalla quantità di acidi nucleici (DNA e RNA) all'interno della cellula, come per esempio nei granulociti immaturi e giovani (a banda); l'aumento di questo indice si spiega quindi con la presenza di granulociti immaturi accanto alle forme normali dei neutrofili. L'ultimo parametro preso in considerazione nello "score sepsi" è quello dei **NEUT-RI** o **NE-SFL** indice della **intensità di fluorescenza**, che risulta aumentata nelle forme immature e/o attivate a causa della maggiore quantità di acidi nucleici.

Dei vari parametri studiati singolarmente il migliore risulta essere il conteggio assoluto dei granulociti immaturi, con una sensibilità del 70% e specificità del 63%; sono valori buoni, ma non eccezionali, anche se nella nostra casistica superiori a quelli di procalcitonina e PCR.

Analizzando il grafico che descrive lo "score sepsi" si nota la elevata specificità (85% per uno score di 4 e 95% per uno score di 5). Ma più utile è la capacità di individuare i veri negativi con uno score di 0, con un valore predittivo negativo del 100%.

Nel gruppo dei positivi nessun paziente ha uno score 0. Gli score zero corrispondono a circa il 20% dei negativi e quindi se questi dati verranno confermati ci sarebbe la certezza teorica che circa 2 pazienti su dieci non svilupperanno sepsi; questo potrebbe portare come conseguenza l'inutilità di eseguire il prelievo per l'emocoltura, con conseguente riduzione dei costi e l'inutilità di eseguire

una terapia antibiotica empirica, con un vantaggio oltre che economico anche di salute pubblica, nel senso di contrasto al fenomeno della antibiotico resistenza.

Il confronto con i dati presenti in letteratura conferma le migliori performance dei parametri che abbiamo individuato essere i migliori.

## 2.5 CONCLUSIONI

Per concludere possiamo dire che l'utilizzo di questi parametri, che attualmente sono solo in parte refertabili, messi insieme in uno score di sepsi, potrebbe rappresentare un vantaggio tangibile sia per la rapidità con cui si può avere il risultato, sia per il costo in pratica inesistente poiché sono prodotti automaticamente insieme agli altri dati dell'emocromo.

Il VPN pari al 100% dello score zero, se sarà confermato da altri studi analoghi, potrebbe essere di grande aiuto per escludere dalle indagini diagnostiche e terapeutiche della sepsi una grossa fetta di pazienti (20%).

Rimane da svolgere in questo campo un lavoro da parte delle ditte produttrici degli analizzatori ematologici, che dovranno mettere a punto se non standard, poiché sono parametri metodo dipendente, almeno dei controlli da cui si possa valutare la bontà del dato. Rimaniamo in attesa che questi strumenti possano darci rapidamente uno score, come quello a cui siamo arrivati alla fine di questo lavoro, che predica con sufficiente accuratezza la presenza di sepsi.

## Bibliografia

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)* (2016).
2. Nedeva C., Menassa J., Puthalakath H. *Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. Front. Cell Dev. Biol.* (2019)
3. Brady J., Horie S., Laffey JG *Role of the adaptive immune response in sepsis* (2020)
4. Bone RC. *Sepsis, the sepsis syndrome, multiorgan failure: a plea for comparable definitions. Ann Intern Med* (1991)
5. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G et al. *Septic shock, current pathogenetic concepts from a clinical perspective.* (2005)
6. Movat HZ, Cybulsky MI, Colditz IG et al. *Acute inflammation in Gram negative infection: endotoxin, IL1, TNF and neutrophils. Fed Proc* (1987 e 97)
7. Vincent JL, Zhang H, Szabo C et al. *Effects of NO in septic shock. Am J Respir Crit Care Med* (2000)
8. Fink MP. *Cytopatic hypoxia: is the oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration?* (2002)
9. van Gestel A., Bakker J., Veraart C.P., van Hout B.A. *Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. Crit Care.* (2004)
10. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. *Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med.* (2002)
11. Sganga G. *Sepsi chirurgica. Giornale di Urologia.* (2015)
12. Akira S, Takeda K: *Toll-like receptor.* (2004)
13. Takeda K: *Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. J Endotoxin Res.* (2005)
14. van der Poll T, Opal SM: *Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis.* (2008)
15. Beutler B: *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. Nature.* (2004)

16. *Opal SM, Scannon P, Vincent J-L, Carroll S, White M, Palardy JE, Parejo N, Pribble JP, Lemke Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock lipopolysaccharide (LPS). (1999)*
17. *Opal SM, Marra MN, McKelligan B, Fisher CJ, Palardy JE, Scott R: Relative concentrations of endogenous endotoxin binding proteins in infected body fluids. Lancet (1994).*
18. *Beutler B: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. Nature (2004).*
19. *Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. Cell (2006).*
20. *Cristofaro P, Opal SM: Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. Drugs (2006).*
21. *Reitsma PH, Branger J, Van Den Blink B, Weijer S, van der Poll T, Meijers JC: Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia. J Thromb Haemost (2003).*
22. *yo J.Y., Park J.S., Park Y.B., Lee S.K., Ha Y.J., Lee S.W. Delta neutrophil index as a marker for differential diagnosis between flare and infection in febrile systemic lupus erythematosus patients. Lupus. (2013).*
23. *Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper Smith C.M., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) JAMA. (2016).*
24. *Jarczak D., Kluge S., Nierhaus A. Sepsis-fisiopatologia e concetti terapeutici. Davanti. Med. (2021).*
25. *Hotchkiss R.S., Tinsley K.W., Karl I.E. Role of apoptotic cell death in sepsis. Scand. J. Infect. Dis. (2003).*
26. *Radzyukevich Y.V., Kosyakova N.I., Prokhorenko I.R. Participation of Monocyte Subpopulations in Progression of Experimental Endotoxemia (EE) and Systemic Inflammation. J. Immunol. Res. (2021).*
27. *Hortová-Kohoutková M., Lázničková P., Bendíčková K., De Zuani M., Andrejčinová I., Tomášková V., Suk P., Šrámek V., Helán M., Frič J. Differences in monocyte subsets are associated with short-term survival in patients with septic shock. J. Cell. Mol. Med. (2020)*



28. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., et al. *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood.* (2010).
29. Ożańska A., Szymczak D., Rybka J. *Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. Scand. J. Immunol.* (2020).
30. Ferreira da Mota N.V., Brunialti M., Santos S.S., Machado F.R., Assuncao M., Azevedo L., Salomao R. *Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment inAntigen Presentation:(2020).*
31. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee.* (1992).
32. Goyette RE, Key NS, Ely EW. *Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. Semin Respir Crit Care Med* 25 6:645–659, (2004).
33. Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. *Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality.* (2014).
34. Shi C, Pamer EG. *Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol.* (2011).
35. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. *The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol Res.* (2012).
36. Chung H., Lee J.H., Jo Y.H., Hwang J.E., Kim J. *Circulating Monocyte Counts and its Impact on Outcomes in Patients With Severe Sepsis Including Septic Shock. Shock.* (2019).
37. Witter A.R., Okunnu B.M., Berg R.E. *The Essential Role of Neutrophils during Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen Listeria monocytogenes. J. Immunol.* (2016).
38. Resende C.B., Borges I., Gonçalves W.A., Carneiro R., Rezende B.M., Pinho V., Nobre V., Teixeira M.M. *Neutrophil activity in sepsis: A systematic review. Braz. J. Med. Biol. Res.* (2020).
39. Gao L., Shi Q., Li H., Guo Q., Yan J., Zhou L. *Prognostic value of the combined variability of mean platelet volume and neutrophil percentage for short-term clinical outcomes of sepsis patients. Postgrad. Med.* (2021).
40. Nakata A. *Psychosocial job stress and immunity: A systematic review. Methods Mol. Biol.* (2012).

41. Belok S.H., Bosch N.A., Klings E.S., Walkey A.J. *Evaluation of leukopenia during sepsis as a marker of sepsis-defining organ dysfunction. PLoS ONE. (2021).*
42. Nagata M., Nakagome K., Soma T. *Mechanisms of eosinophilic inflammation. Asia Pac. Allergy. (2020).*
43. Lavoignet C.E., Le Borgne P., Chabrier S., Bidoire J., Slimani H., Chevrolet-Lavoignet J., Lefebvre F., Jebri R., Sengler L., Bilbault P. *White blood cell count and eosinopenia as valuable tools for the diagnosis of bacterial infections in the ED.(2019).*
44. Abidi K., Khoudri I., Belayachi J., Madani N., Zekraoui A., Zeggwagh A.A., Abouqal R. *Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. Crit. Care. (2008).*
45. Shaaban H., Daniel S., Sison R., Slim J., Perez G. *Eosinopenia: Is it a good marker of sepsis in comparison to procalcitonin and C-reactive protein levels for patients admitted to a critical care unit in an urban hospital? J. Crit. Care. (2010).*
46. Anand D., Ray S., Bhargava S., Srivastava L.M., Garg A., Gafoor I., Singh R., Dhar D. *Exploration of eosinopenia as a diagnostic parameter to differentiate sepsis from systemic inflammatory response syndrome: Results from an observational study. (2016).*
47. Tinoco-Sánchez M., Suárez-Cuenca J.A., Rubio-Guerra A.F. *Usefulness of eosinopenia as prognostic marker of severity in sepsis. Med. Interna Mex. (2017).*
48. Varghese J., Devadas K., Cyriac R., Vinayakumar N., Hareendran A., Iqbal A. *Low eosinophil count, a predictor of 28-day mortality in a cohort of cirrhosis patients with sepsis. J. Gastroenterol. Hepatol. (2019).*
49. Galli SJ. *Mastociti e basofili. Curr Opin Hematol. (2000).*
50. Anderson H.L., Brodsky I.E., Mangalmurti N.S. *The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. J. Immunol. (2018).*
51. Minasyan H. *Erythrocyte and blood antibacterial defense. Eur. J. Microbiol. Immuno (2014) 1.*
52. Minasyan H. *Sepsis: Mechanisms of bacterial injury to the patient. Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med (2019).*
53. Effenberger-Neidnicht K., Hartmann M. *Mechanisms of Hemolysis During Sepsis. Inflammation. (2018).*

54. Vincent J.L., Baron J.F., Reinhart K., Gattinoni L., Thijs L., Webb A., Meier-Hellmann A., Nollet G., Peres-Bota D., ABC (Anemia and Blood Transfusion in Critical Care) Investigators. *Anemia and blood transfusion in critically ill patients. JAMA. (2002).*
55. Bateman R.M., Sharpe M.D., Singer M., Ellis C.G. *The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. Int. J. Mol. Sci. (2017).*
56. Jiang N, Tan NS, Ho B, Ding JL. *Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. Nat Immunol. (2007).*
57. Van Beest P.A., Hofstra J.J., Schultz M.J., Boerma E.C., Spronk P.E., Kuiper M.A. *The incidence of low venous oxygen saturation on admission to the intensive care unit: A multi-center observational study in The Netherlands. Crit. Care. (2008).*
58. Krishna V., Pillai G., Velickakathu Sukumaran S. *Red Cell Distribution Width as a Predictor of Mortality in Patients With Sepsis. Cureus. (2021).*
59. *Elevated red cell distribution width as a prognostic marker in severe sepsis: a prospective observational study. Jandial A, Kumar S, Bhalla A, Sharma N, Varma N, Varma S. Indian J Crit Care Med. (2017).*
60. Zhang H.B., Chen J., Lan Q.F., Ma X.J., Zhang S.Y. *Diagnostic values of red cell distribution width, platelet distribution width and neutrophil-lymphocyte count ratio for sepsis. Exp. Ther. Med. (2016).*
61. Park S.H., Park C.J., Lee B.R., Nam K.S., Kim M.J., Han M.Y., Kim Y.J., Cho Y.U., Jang S. *Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer (2015).*
62. Laukemann S., Kasper N., Kulkarni P., Steiner D., Rast A.C., Kutz A., Felder S., Haubitz S., Faessler L., Huber A., et al. *Can We Reduce Negative Blood Cultures with Clinical Scores and Blood Markers? Results From an Observational Cohort Study. (2015).*
63. Smith-Erichsen N. *Serial determinations of platelets, leucocytes and coagulation parameters in surgical septicemia. Scand J Clin Lab Invest Suppl. (1985).*
64. Thiery-Antier N, Binquet C, Vinault S, Meziani F, Boisramé-Helms J, Quenot J-P. *EPIde miology of septic shock group. is thrombocytopenia an early prognostic marker in septic shock? Crit Care Med. (2016).*

65. Rose SR, Petersen NJ, Gardner TJ, Hamill RJ, Trautner BW. Etiology of thrombocytosis in a general medicine population: analysis of 801 cases with emphasis on infectious causes. *J Clin Med Res.* (2012).
66. McDonald B., Dunbar M. Platelets and Intravascular Immunity: Guardians of the Vascular Space During Bloodstream Infections and Sepsis. *Front. Immunol.* (2019).
67. Vardon-Bounes F., Gratacap M.P., Groyer S., Ruiz S., Georges B., Seguin T., Garcia C., Payrastra B., Conil J.M., Minville V. Kinetics of mean platelet volume predicts mortality in patients with septic shock. *PLoS ONE.* (2019).
68. Vardon-Bounes F., Ruiz S., Gratacap M.P., Garcia C., Payrastra B., Minville V. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. (2019).
69. Giustozzi M., Ehrlinder H., Bongiovanni D., Borovac J.A., Guerreiro R.A., Gqsecka A., Papakonstantinou P.E., Parker W. Coagulopathy and sepsis: Pathophysiology, clinical manifestations and treatment. *Blood Rev.* (2021).
70. Liberski P.S., Szewczyk M., Krzych Ł.J. Haemogram-Derived Indices for Screening and Prognostication in Critically Ill Septic Shock Patients: A Case-Control Study. *Diagnostics.* (2020).
71. Resende C.B., Borges I., Gonçalves W.A., Carneiro R., Rezende B.M., Pinho V., Nobre V., Teixeira M.M. Neutrophil activity in sepsis: A systematic review. *Braz. J. Med. Biol. Res.*(2020).
72. Levi M. Platelets in critical illness. *Semin Thromb Hemost* (2016).
73. E. Urrechaga, O. Bóveda, U. Aguirre Improvement in detecting sepsis using leukocyte cell population data (CPD) (2019).
74. S.H. Park, C.J. Park, B.R. Lee, et al. Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis (2015).
75. S. Buoro, M. Seghezzi, M. Vavassori, et al. Clinical significance of cell population data (CPD) on Sysmex XN-9000 in septic patients with or without liver impairment (2016).
76. E. Urrechaga, O. Bóveda, U. Aguirre Role of leucocytes cell population data in the early detection of sepsis (2018).

77. L. Lemkus, D. Lawrie, J. Vaughan *The utility of extended differential parameters as a biomarker of bacteremia at a tertiary academic hospital in persons with and without HIV infection in South Africa* (2022).
78. A. Uranga, E. Urrechaga, U. Aguirre, M. Intxausti, C. Ruiz-Martinez, M.J. Lopez de Goicoechea, et al. *Utility of differential white cell count and cell population data for ruling out COVID-19 infection in patients with community-acquired pneumonia* (2022).
79. S. Mishra, G. Chhabra, S. Padhi, S. Mohapatra, A. Panigrahi, M.N. Sable, et al. *Usefulness of leucocyte cell population data by Sysmex XN1000 Hematology Analyzer in rapid identification of acute leukemia* (2022).
80. H. Kim, E. Han, H.K. Lee, Y. Kim, K. Han *Screening of myelodysplastic syndrome using cell population data obtained from an automatic hematology analyzer* (2021).
81. Green R. *Development, History, and Future of Automated Cell Counters*. (2015).
82. Chabot-Richards DS, George TI. *White blood cell counts: reference methodology*. (2015).
83. Urrechaga E, Boveda O, Aguirre U, Garcia S, Pulido E. *Neutrophil Cell Population Data Biomarkers for Acute Bacterial Infection*. *J Pathol Infect Dis* (2018).
84. Farkas J.D. *The complete blood count to diagnose septic shock*. *J. Thorac.* (2020).
85. Ayres L.S., Sgnaolin V., Munhoz T.P. *Immature granulocytes index as early marker of sepsis*. *Int. J. Lab. Hematol.* (2019).
86. Pekelharing JM et al: *Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults*. (2010).
87. Zonneveld R et. al., *Analyzing Neutrophil Morphology, Mechanics and Motility in Sepsis: Options and Challenges for Novel Bedside Technologies*. (2016).
88. Tommaso Mecca et. al *Analytical evaluation of the measurement of new hemocytometric parameters of the Sysmex XN-9000 analyzer*. (2016).
89. Y.-J. LIU, P. DU, J. RAO *Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker for sepsis caused by intestinal infection: a case report*. (2013).
90. [www.serviziagnostici.com/it/prodotti/microbiologia/10902/3226/bd-bactec/strumenti2/bactec-fx-bottom-unit-detail.html](http://www.serviziagnostici.com/it/prodotti/microbiologia/10902/3226/bd-bactec/strumenti2/bactec-fx-bottom-unit-detail.html).

**91. <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmexparameters/neutrophil-activation/>**

**92. <https://www.med4.care/pcr-proteina-c-reattiva-esame-laboratorio/>**

**93. <https://www.sifweb.org/sif-magazine/voci-di-supporto/proteina-c-reattiva>**

**94. <https://dossetti.it/convegni/2018/Sepsi36413092018/relazioni/MINIERI.pdf>**