

Conferenza

28 febbraio 2023

La sepsi nel setting dell'emergenza-urgenza: ottimizzare la diagnosi per ridurre la mortalità

M. Covino, A. Piccioni, M.C. Santoro, F. Franceschi

Abstract

La sepsi è una condizione pericolosa per la vita che si verifica quando la risposta dell'organismo ad un'infezione provoca lesioni ai propri stessi tessuti e organi. È dei più rilevanti problemi di salute pubblica, e secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), colpisce oltre 30 milioni di persone in tutto il mondo ogni anno, con più di 6 milioni di morti.

Nel Dipartimento di Emergenza (DE), la sepsi è un'emergenza medica comune e grave che richiede un riconoscimento e un trattamento tempestivi per migliorare gli *outcome* clinici. Inoltre, lo sviluppo della resistenza ai farmaci antimicrobici (AMR) minaccia ulteriormente la salute umana a livello globale. L'unico modo per affrontare la diffusione e l'emergere dell'AMR è attraverso la rilevazione attiva e l'identificazione dei patogeni insieme alla rapida quantificazione dell'eventuale resistenza.

Per migliorare la gestione della sepsi è essenziale conoscere ed impiegare le principali tecniche diagnostiche, al fine di consentire la più efficace terapia antibiotica e l'eliminazione dei microorganismi patogeni.

Il gold-standard attuale per la diagnosi di sepsi è costituito dalla emocoltura su sangue periferico. Tuttavia tale metodo richiede un tempo elevato ed ha una ridotta sensibilità, con molti falsi negativi soprattutto in caso di batteri a crescita lenta o precedente terapia antibiotica.

Rispetto al metodo convenzionale, i metodi diagnostici più moderni sono in grado di analizzare i campioni di sangue, ottenendo risultati accurati in tempi brevi, e fornendo inoltre informazioni utili ad identificare i patogeni portatori di geni di resistenza antimicrobica.

Questa review ha lo scopo di evidenziare i limiti e le caratteristiche delle attuali tecniche diagnostiche per la sepsi, e descrivere i vantaggi e

le difficoltà poste dallo sviluppo delle nuove tecniche di diagnostica microbiologica.

Keywords: Sepsi; Esami microbiologici colturali; Antibiotico resistenza.

Introduzione

La sepsi è una condizione pericolosa per la vita che si verifica quando la risposta dell'organismo ad un'infezione provoca lesioni ai propri tessuti e organi. Secondo l'OMS la sepsi colpisce oltre 30 milioni di persone in tutto il mondo ogni anno, con oltre 6 milioni di morti. Nel ED, la sepsi è un'emergenza medica comune e grave che richiede un riconoscimento e un trattamento tempestivi per migliorare i risultati¹.

Tuttavia, la diagnosi di sepsi può essere difficile, conducendo ad un trattamento ritardato con un aumento altrimenti evitabile della morbilità e della mortalità². Le cause sottostanti questi ritardi, nei pazienti valutati in ED sono varie:

- **Presentazione atipica.** La sepsi può presentarsi con sintomi molto vari e molto frequenti nella popolazione valutata³. I sintomi più comuni sono la febbre, la tachicardia, la tachipnea, il disorientamento e l'ipotensione. Tuttavia i pazienti possono presentare sintomi totalmente aspecifici, rendendo difficile la diagnosi¹⁻³.
- **Valutazione tardiva.** I pazienti con sepsi possono non presentarsi all'ED fino alle fasi successive della malattia, il che può rendere più difficile la diagnosi e aumentare il rischio di esiti avversi.

Questo ritardo può essere dovuto a una mancanza di consapevolezza dei sintomi della sepsi, a un ritardo nella ricerca di cure mediche o alla presenza di condizioni mediche sottostanti che mascherano i sintomi della sepsi^{4,5}.

- *Dipendenza dai test di laboratorio.* La diagnosi di sepsi spesso si basa in gran parte su test di laboratorio, come emocolture e conta dei globuli bianchi. Tuttavia, questi test possono richiedere da diverse ore a giorni, il che può ritardare l'inizio del trattamento³⁻⁸.
- *Mancanza di un test diagnostico specifico.* Attualmente non esiste un singolo test in grado di diagnosticare definitivamente la sepsi, rendendo difficile per i medici effettuare una diagnosi accurata in modo tempestivo⁸.

Le soluzioni proposte per migliorare il riconoscimento ed il rapido trattamento della sepsi in ED sono varie. Tra le principali:

- *Riconoscimento e trattamento precoci:* per migliorare la diagnosi di sepsi nell'ED gli operatori sanitari dovrebbero concentrarsi sul riconoscimento e sul trattamento precoci della condizione. Ciò può essere ottenuto aumentando la consapevolezza dei sintomi della sepsi e implementando sistemi per indurre gli operatori a prendere in considerazione la sepsi nei pazienti con fattori di rischio o segni e sintomi precoci³⁻⁷.
- *Uso di strumenti di previsione clinica (early warning scores):* gli strumenti di previsione clinica, possono aiutare gli operatori sanitari a identificare i pazienti a rischio di sepsi e avviare un trattamento tempestivo⁸.
- *Test di laboratorio migliorati:* per accelerare la diagnosi di sepsi, gli operatori sanitari dovrebbero sforzarsi di migliorare i processi di test di laboratorio. Ciò può essere ottenuto attraverso l'uso di test diagnostici rapidi, come esami del sangue presso il punto di cura, o migliorando i tempi di risposta per i risultati di laboratorio⁹.

- *Approccio interdisciplinare:* un approccio interdisciplinare che coinvolga operatori sanitari di varie specialità, come medicina d'urgenza, malattie infettive e terapia intensiva, può migliorare l'accuratezza, la velocità della diagnosi, e migliorare la terapia della sepsi in ED⁵⁻¹⁰.

La sepsi rimane uno dei disturbi più ambigui in Medicina a causa della sua possibile rapida insorgenza, gravità clinica complessiva, e difficoltà diagnostica. Nel passato associata ai processi organici di decomposizione¹¹, è stata successivamente inquadrata come infezione sistemica e riconosciuta come risultato di organismi patogeni che proliferano all'interno della circolazione ematica e sfuggono al sistema immunitario dell'ospite¹². Infine, è stato riconosciuto che gli agenti patogeni interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite durante l'infezione, innescando una cascata infiammatoria progressiva (SIRS) che include citochine e altri mediatori, producendo infine immunosoppressione, che porta a vari tipi di insufficienza d'organo e alla successiva degenerazione clinica^{13,14}.

Inizialmente, a causa del ridotto utilizzo di antimicrobici efficaci e di adeguato supporto vitale, i pazienti con sepsi difficilmente sopravvivevano abbastanza a lungo prima di sviluppare una insufficienza d'organo multipla. In seguito, l'*American College of Chest Physicians (ACCP)* e la *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* hanno introdotto la definizione di SIRS e pubblicato nuovi criteri diagnostici per la diagnosi di sepsi (Sepsi-3) definita come una disfunzione d'organo mortale causata da una risposta dell'ospite disregolata a un'infezione¹³⁻¹⁵. Contestualmente è stato adottato il *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*, come criterio diagnostico per la sepsi. In particolare i pazienti con SOFA ≥ 2 venivano considerati a rischio di evoluzione fatale circa 10% in una popolazione standard con sospetto di infezione in ED¹⁶. Questa nuova e avanzata definizione si concentra sul potere

della risposta non omeostatica dell'ospite all'infezione, e sulla potenziale fatalità dell'infezione.

Secondo l'OMS negli ospedali la sepsi non è solo la condizione a più elevato impatto economico, ma è anche la principale causa di mortalità nei pazienti ricoverati. Attualmente, si stima che circa 30 milioni di persone in tutto il mondo possano essere colpite da sepsi durante il ricovero, con 6 milioni di morti annuali e tassi di mortalità compresi tra il 20% e il 50%¹⁷. La rilevanza della mortalità per sepsi è probabilmente ancora più elevata nei paesi a basso reddito¹⁸. In questi paesi, si stima che in età pediatrica la sepsi colpisca 3 milioni di neonati e 1,2 milioni di bambini, con un tasso di mortalità compreso tra il 11% e il 19%¹⁹. A questi numeri vanno aggiunti circa 75.000 decessi annuali nelle donne a causa di sepsi puerperale¹⁵. Dai dati diffusi dai *Centers for Disease Control* nei rapporti di prevenzione, tra i pazienti ricoverati con diagnosi di sepsi c'è un'incidenza di circa il 60% di shock settico e di circa il 36% di sepsi grave. Sempre tra i ricoverati, nel 31% dei casi la sepsi viene attribuita ad una specifica specie microbica isolata, mentre in circa il 27% dei casi è di origine sconosciuta²⁰. Tuttavia, le ultime stime documentano una diminuzione della mortalità intra-ospedaliera per sepsi dal 28% al 18%¹¹. Inoltre, l'evidenza epidemiologica dimostra che la sepsi grave sta diventando più comune mentre allo stesso tempo sta diventando meno fatale²².

A causa della ristretta finestra temporale per il trattamento ideale, la diagnosi precoce della sepsi è un compito cruciale per il medico d'urgenza. Un riconoscimento ed un trattamento precoce possono infatti evitare il precipitare dell'insorgenza dello shock, della insufficienza d'organo e ridurre la mortalità. È stato stimato che ad ogni ora di ritardo nel trattamento dei pazienti settici può essere associata una diminuzione della sopravvivenza di circa il 7,6%²³. Per evitare la progressione in malattia grave è necessario somministrare terapia antibiotica empirica ad

ampio spettro immediatamente, in tutti i casi sospetti. Tuttavia, questo si traduce in possibili effetti collaterali per i singoli pazienti, e nello sviluppo della multi-resistenza (MDR) ai farmaci da parte dei batteri^{24, 25}. In definitiva, il metodo diagnostico ideale dovrebbe essere rapido, accurato, e applicabile per rilevare i patogeni e la possibile resistenza ai farmaci entro 3-5 ore dal ricovero del paziente^{26, 27}. Inoltre, il metodo dovrebbe essere sufficientemente accurato da distinguere le infezioni polimicrobiche ed identificare specie rare o emergenti. I risultati dovrebbero consentire decisioni cliniche rapide, idealmente entro una finestra temporale di alcune ore per limitare morbilità e mortalità²⁴.

I metodi di isolamento sensibili, specifici e rapidi per l'identificazione dei batteri, costituiscono il principale strumento per i ED per combattere la sepsi^{28, 29}.

Metodi convenzionali per l'identificazione delle specie microbiche e la gestione della sepsi

Metodi microbiologici

Il rilevamento di agenti patogeni utilizzando queste tecniche si basa sulla crescita di microrganismi su un terreno di coltura idoneo (agar solido e brodo). I metodi principali sono due: identificazione su coltura di sangue e colorazione gram; identificazione attraverso sistemi colturali automatizzati (Bactec Fx/ VITEK2).

- ***Identificazione con colture su sangue e colorazione Gram***

Per il rilevamento e l'identificazione di agenti patogeni causali, il campionamento di sangue/urina/liquido biologico dai pazienti, e la loro coltura di routine seguita dal test di colorazione di Gram rimane il metodo gold-standard di riferimento³⁰⁻³². Per migliorare la diagnosi, preferibilmente, il sangue deve essere prelevato per le emocolture da due distinti siti di prelievo venoso. La raccolta contemporanea di sangue da venoso centrale e periferico consente un rilevamento più

rapido della batteriemia rispetto al solo catetere periferico³³. Poiché alcune specie microbiche possono essere identificate solo nel sito di raccolta e non nel sangue, il monitoraggio continuo dei siti di raccolta può essere necessario quando viene rilevata una coltura positiva, per facilitare l'ulteriore elaborazione per identificazione del patogeno e la corretta valutazione della sepsi^{34, 35}. L'analisi della colorazione di Gram è rapida (<15 min), economica e fornisce informazioni sulla categorizzazione dell'agente infettivo.

- **Identificazione tramite sistemi colturali automatizzati**

I sistemi colturali automatizzati si basano su sensori che rilevano i cambiamenti di pressione all'interno del flacone per l'emocoltura o che rilevano la CO₂ emessa dalle specie che metabolizzano attivamente. Nel caso di germi Gram-negativi impiegano dalle 14 alle 24 ore per rilevare la crescita microbica, mentre per i batteri Gram-positivi sono necessarie dalle 24 alle 48 ore. Questi metodi consentono di eliminare i campioni negativi per selezionare quelli da sottoporre a normale crescita su piastra di agar per la diagnosi tradizionale^{38, 39}.

I flaconi per emocoltura standard vengono preparati, controllati e incubati per 5 giorni a 35°C con agitazione dello strumento ogni 10 minuti. In seguito, distribuendo 0,1 ml di una soluzione diluita 10 volte si procede al conteggio su piastra quantitativa. Per la fissazione microbica i campioni vengono testati dopo incubazione notturna a 35°C delle piastre contenenti le colonie⁴⁰.

I problemi principali nell'utilizzo di questo metodo colturale sono:

- I test microbiologici convenzionali richiedono 5 giorni per rilevare e identificare i patogeni coinvolti nella sepsi. Di conseguenza, la procedura non fornisce risultati tempestivi.
- In secondo luogo, l'analisi della coltura/colorazioni di Gram ha una

sensibilità ridotta. Solo dal 30% al 60% dei casi positivi viene identificato. Questo dato di sensibilità è indipendente dalla corretta esecuzione delle procedure colturali e dalla raccolta di un adeguato campione ematico³⁸⁻⁴¹. I risultati falsi negativi (dal 40% al 70% del totale) possono essere dovuti alla scarsità della specie microbica nel terreno di coltura, o dalla presenza di ceppi microbici simili. Inoltre, i falsi negativi sono spesso dovuti alla somministrazione di antibiotici prima del prelievo diagnostico⁴⁴.

- Infine, esiste la possibilità di falsi positivi dovuti ad una errata raccolta del campione con contaminazione. I pazienti in questo caso, possono ricevere terapia antibiotica non necessaria. L'uso improprio di antibiotici può condurre ad una esposizione prolungata non necessaria con insorgenza di reazioni allergiche, tossiche, sviluppo di MDR, oltre al prolungamento della degenza ospedaliera e dei costi associati⁴⁴⁻⁴⁶.

Test biochimici

I test biochimici includono il test del mannitolo, i test del citrato, il ferro a triplo zucchero (TSI) test, il test dell'indolo, il test del rosso metile e test enzimatici come test dell'ossidasi, test dell'ureasi e i test della coagulasi. Questi test possono essere utilizzati per distinguere gli organismi patogeni che dipendono da processi biochimici specifici di alcuni batteri. Questi test possono essere utilizzati per individuare specie sia intra che extracellulari, che vengono dunque identificate in base alla loro specifica attività biochimica⁴⁷.

Nuovi metodi per la diagnosi della sepsi

I metodi moderni costituiscono un cambio di paradigma rispetto alle colture convenzionali e ai test biochimici. I test moderni includono metodi di rilevamento molecolare con tempi di identificazione delle specie microbiche molto inferiori, da 20 minuti a 3 ore.

I progressi tecnologici derivanti dalla ricerca molecolare e dal progetto genoma umano hanno condotto allo sviluppo di numerose metodiche che possono non solo accelerare i tempi di individuazione dei batteri, ma anche comprendere meglio i meccanismi fisiopatologici della sepsi^{48, 49}.

Tecniche molecolari per l'identificazione dei patogeni

I test molecolari per il rilevamento basato su *polimerase chain reaction* (PCR) si basano sull'amplificazione di specifiche regioni target dell'acido nucleico dei batteri, utilizzando sonde o primers gene-specifici. A seconda del tipo batterico vengono utilizzati diversi target molecolari⁵⁰⁻⁵³.

PCR

Nel 1983 Kary Mullis⁴⁴ ha ideato la PCR standard, che consente di rilevare un singolo patogeno batterico identificando una specifica sequenza di DNA bersaglio⁴⁵. Un particolare set di primer-sonda può essere impiegato per rilevare in modo riproducibile i batteri dal DNA purificato dal sangue intero. L'analisi si è dimostrata efficace per rilevare tutti i ceppi batterici. Con questo metodo è possibile distinguere la presenza di DNA batterico da campioni di sangue intero inoculati con un minimo di 4 CFU/mL⁵⁶.

In condizioni ideali, la PCR può identificare anche una singola copia di una sequenza di DNA bersaglio in un dato campione. Pertanto, non è necessario un precedente arricchimento del campione. Di conseguenza i test diagnostici basati sulla PCR hanno prodotto un significativo avanzamento delle capacità di rilevamento degli agenti infettivi⁵⁷.

La tecnologia è stata successivamente migliorata utilizzando primers multipli nella stessa reazione di amplificazione. Questa tecnica, conosciuta come multiplex-PCR, consente di amplificare simultaneamente diverse sequenze di DNA nella stessa reazione^{58, 59}.

PCR Real-Time (RT-PCR)

Nonostante gli innegabili vantaggi, la PCR standard, inclusa la multiplex-PCR, può condurre ad un eccesso di contaminazione dei prodotti di amplificazione⁶⁰. Le nuove tecniche di RT-PCR sono più rapide, meno sensibili alla contaminazione e richiedono minori procedure di laboratorio^{61, 62}. Inoltre, questa tecnica consente una calibrazione fine delle sequenze desiderate, che può aumentare la specificità della ricerca di specie desiderate⁶³⁻⁶⁵.

La RT-PCR con fluorescenza, è basata sul rilevamento di segnali fluorescenti generati durante l'amplificazione del DNA. Dopo un numero specifico di cicli, il sistema genera una quantità target di DNA. Il sistema consente di valutare dopo quanti cicli la specifica fluorescenza derivata dal DNA target supera il rumore di sottofondo. Questo valore identifica il ciclo soglia per il rilevamento. Questo valore è inversamente proporzionale al numero di copie di DNA specifico nel campione⁶⁶.

SYBR Green, *TaqMan*, "molecular beacons", e "scorpion", sono i quattro tipi di Sonde DNA fluorescente attualmente disponibili per il rilevamento con RT-PCR⁶⁷. La capacità di quantificare il processo, e dunque la carica microbica, è una funzione chiave della RT-PCR⁶⁸⁻⁷⁰. La concentrazione dell'agente patogeno può essere valutata accuratamente utilizzando la nota iniziale concentrazione di calibrante. Per avere un effetto significativo sul rilevamento dei patogeni nella diagnostica microbiologia, la RT-PCR si concentra principalmente sul genotipo del patogeno⁷¹. La tecnica consente inoltre la differenziazione di varie forme di genotipi microbici in una singola provetta di reazione⁷².

Il valore aggiunto della RT-PCR nel rilevamento della carica microbica è che questa tecnica rivela attivamente lo spettro di infezione in aumento, l'interazione ospite-patogeno, e l'efficacia dei farmaci antimicrobici. I test in tempo reale possono essere utili per distinguere i sierotipi

all'interno di una particolare popolazione microbica⁸³, la diagnosi di agenti patogeni in campioni clinici^{84, 85}, e la presenza di microorganismi (virus, batteri, funghi, protozoi o tossine da essi prodotte che causano malattie) in campioni ambientali⁸⁶.

Il principale svantaggio delle tecniche molecolari, inclusa la PCR e la RT-PCR, è che non forniscono alcuna informazione sulla resistenza antimicrobica dei patogeni⁸⁷.

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

La SERS, sta emergendo come tecnica di analisi microbiologica. La tecnica si basa sull'effetto *Raman*, che è dovuto alla diffusione anelastica di fotoni all'interno di un campione attraversato dalla luce. Questa tecnica consente l'identificazione dell'acido nucleico libero all'interno di campioni biologici⁸⁸⁻⁹³. La luminosità dispersa dall'effetto *Raman* viene confrontata con un profilo di riferimento di microrganismi consentendone l'identificazione⁹⁴⁻⁹⁷. La SERS può riconoscere in modo efficiente la presenza di cellule microbiche⁹⁸⁻¹⁰⁴. Oltre all'identificazione del patogeno, la SERS può essere utilizzata per valutare la suscettibilità agli antibiotici nell'urosepsi¹⁰¹. Il principale limite della SERS è la sua ridotta sensibilità e specificità, in particolare in caso di campioni polimicrobici¹⁰⁵.

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry)

Nel 2013 la Food and Drug Administration (FDA), ha autorizzato l'utilizzo della tecnologia MALDI TOF per l'identificazione dei microrganismi patogeni responsabili delle infezioni. Questa tecnica garantisce una rapida individuazione del batterio nelle emocolture positive, accelerando così il processo generale di valutazione dell'antibiotico-resistenza¹⁰⁶. La tecnica si basa sulla ionizzazione degli atomi all'interno di una matrice reticolare. Gli atomi ionizzati vengono identificati in modo dipendente dal loro rapporto massa/carica (m/z) in un tubo a vuoto¹⁰⁷.

In pratica la colonia batterica di interesse (ottenuta tramite esame colturale classico, quindi isolata in piastra dopo opportuna semina) viene disposta su di una matrice, la quale all'interno del macchinario, in presenza di condizioni di vuoto, viene irradiata con un fascio laser. Il risultato è la disgregazione del campione in numerosissimi frammenti, i quali vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano fino a raggiungere una membrana analizzatrice. Il tempo in cui questi frammenti raggiungono la membrana ("tempo di volo") dipenderà dalla loro grandezza molecolare. Ecco così che l'identificazione dei microrganismi avviene tramite l'ottenimento di spettri di assorbimento, i quali vengono confrontati in un database contenente quello di innumerevoli specie già note ed identificate: si realizza così un profilo proteico caratteristico per ciascun microorganismo¹⁰⁸.

I limiti della tecnica sono l'impossibilità di eseguire analisi direttamente su campioni di sangue o liquido biologico, e la necessità di utilizzare colture su sangue per amplificare le specie batteriche a livelli sufficienti per il rilevamento. Infine, i profili spettrali di riconoscimento possono essere non rilevabili in caso di campioni poli-microbici¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Rilevazione genomica ad ampio spettro della resistenza antimicrobica (AMR)

La tecnica attualmente impiegata per rilevare l'AMR richiede tempo (da 3 a 5 giorni), ostacola la gestione clinica della sepsi e può tradursi in un possibile esito sfavorevole per i pazienti. Con l'avvento delle tecniche di sequenziamento del genoma, l'AMR può essere rilevata sia in modo mirato (fusione ad alta risoluzione) che non mirato (sequenziamento) nei patogeni.

Tecnologia di analisi della fusione ad alta risoluzione (HRM)

L'HRM dipende dal rilevamento delle differenze nella temperatura di fusione dovuta alla presenza di una mutazione in un bersaglio precedentemente amplificato. La tecnica identifica profili di curva di fusione

specifici per i singoli patogeni. La dimensione e la sequenza dell'amplicone PCR, cioè del frammento di acido nucleico oggetto dell'amplificazione, rendono unica la curva di melting¹¹². La tecnica è così sensibile che può essere rilevata anche una singola mutazione puntiforme che produce uno spostamento della curva di temperatura di fusione¹¹³.

Pertanto, la tecnica consente il rilevamento molecolare rapido di geni resistenti e mutazioni ereditarie con un output più elevato dell'esame post-PCR che consente ai ricercatori di identificare e classificare le nuove mutazioni e variazioni ereditarie insieme ai polimorfismi a singolo nucleotide senza sequenziamento (scansione genica), o prima del sequenziamento in una popolazione¹¹⁴.

I diversi geni marcatori di resistenza agli antibiotici possono essere identificati in diverse specie batteriche in tempi rapidi, entro le 6,5 ore¹¹⁵⁻¹²³.

Sequenziamento (WGS)

L'utilizzo del sequenziamento genomico sia per il rilevamento delle specie batteriche che per il rilevamento dell'AMR è in crescita in campo diagnostico. Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) è eseguito con metodiche bioinformatiche dopo che un organismo è stato isolato per cultura¹²⁴. La tecnica WGS consente di tracciare tutti i geni coinvolti nella resistenza, permettendo di conoscere tutti i dati genomici dei fattori di resistenza presenti nella cellula batterica da analizzare. Il sistema di sequenziamento di prossima generazione (NGS) è un ulteriore strumento emergente. Il NGS rende il sequenziamento dell'intero genoma su larga scala accessibile anche per il ricercatore medio con la sua altissima produttività, versatilità e velocità. La tecnica NGS consente inoltre di sequenziare l'intero genoma umano in un singolo esperimento, permettendo lo studio dei processi biologici a un livello mai prima possibile. Inoltre, nell'epoca della scienza genomica, che richiede una più profonda comprensione dei dettagli al di fuori

dei confini della tecnologia del DNA convenzionale, sta diventando un metodo di ricerca routinario¹²⁵. La tecnica NGS combinata con gli approcci meta-genomici consente essenzialmente il sequenziamento del genoma di campioni biologici infettivi come sangue, urina e lavaggio senza coltivarli e fornisce il diverso profilo di tutte le specie comprese nel campione, incluse quelle mirate che le non mirate. Questo approccio ha rivoluzionato l'identificazione di tutti i batteri, compresi i nuovi geni di resistenza in singolo esemplare^{126, 127}. L'approccio meta-genomico basato sul sequenziamento è stato usato per valutare la cinetica del microbiota intestinale prima, durante e dopo il trattamento antibiotico¹²⁸. Inoltre, con l'aiuto dell'apprendimento automatico, è ora possibile prevedere la ricolonizzazione nella fase post-antibiotico del microbiota, con informazioni utili nel singolo paziente per identificare un trattamento altamente personalizzato.

Il principale svantaggio di questa tecnica è il costo che ne previene una diffusione più ampia¹²⁹.

Microarray di DNA

L'innovazione dell'analisi *microarray* DNA è utilizzata da più di 10 anni per l'identificazione di microrganismi aggiungendo alla nostra comprensione dei singoli patogeni i meccanismi, le reazioni microbiche ai miglioramenti ecologici e le associazioni ospite-microrganismo. Tutti questi elementi hanno comportato delle ricadute dirette sulla microbiologia diagnostica¹³⁰. I *microarray* sono metodi utili per il rilevamento e l'identificazione dei batteri a causa del loro forte parallelismo nello screening per l'espressione di un'ampia varietà di geni dopo specifica amplificazione genica mediante PCR ad ampio raggio o multiplex¹³¹. I *microarray* impiegano sonde di DNA e RNA immobilizzate in superficie per la raccolta e la classificazione di DNA/RNA di microrganismi tramite ibridazione complementare specifica per sequenza,

diminuendo il consumo e i costi di campioni e reagenti, consentendo al tempo stesso precisione e segregazione fino alla specie o al livello del ceppo. Uno studio ha utilizzato un *microarray* basato su oligonucleotidi (BactoChip) per il rilevamento indipendente dalla coltura batterica, consentendo la quantificazione e la differenziazione di 21 diversi generi batterici tra isolati clinici¹³². Inoltre, il test *Verigene* di *Luminex Corporation* può distinguere nove specie di batteri e tre geni AMR per la meticillina e vancomicina e cinque specie e sei geni AMR per carbapenemasi e gamma beta-lattamasi estese¹³³⁻¹³⁵. Essendo indipendente dalla coltura il rilevamento basato su *microarray* è rapido, acquisendo quindi importanza clinica in combinazione con la gestione antimicrobica^{136, 137}. Nonostante ciò, nessuna strumentazione di *microarray* attualmente commercializzata è in grado di riconoscere efficacemente tutti i microrganismi nelle malattie polimicrobiche¹³⁸.

Metodi avanzati per la diagnosi della sepsi

Gli ulteriori sviluppi della ricerca in ambito diagnostico microbiologico si basano sull'aumento di sensibilità e specificità della tecnologia corrente, con lo sviluppo di capacità analitiche in tempi ridotti, assieme alla identificazione della sensibilità ai farmaci, idealmente entro un'ora¹³⁹.

Biosensori

In un biosensore, il biorecettore è progettato per interagire con l'analita specifico di interesse per produrre un effetto misurabile dal trasduttore. Un'elevata selettività per l'analita rispetto a una matrice composta da altri componenti chimici o biologici è un requisito chiave del biorecettore. Sebbene il tipo di biomolecola utilizzata possa variare ampiamente, i biosensori possono essere classificati in base a tipi comuni di interazioni dei biorecettori che coinvolgono: anticorpi/antigene, enzimi/ligandi, acidi nucleici/DNA, strutture cellulari/cellule o materiali biomimetici.

I biosensori hanno una capacità diagnostica elevata e sono molto promettenti nell'ambito della ricerca sulla sepsi¹⁴⁰. Le sonde o gli anticorpi specie-specifici danno un segnale elettrico dopo essersi legati ai loro bersagli e l'intensità del segnale è correlata al bersaglio-specifico totale legato. Il metodo elettrochimico è il criterio primario su cui si basa la diagnostica mediante biosensori. Questi non solo distinguono i batteri con una specificità incredibile in tempi ridotti, ma forniscono anche dati in merito alla sensibilità ai farmaci¹⁴¹. Al momento attuale, la maggior parte dei biosensori disponibili è limitata nella soglia di riconoscimento e nell'ampiezza delle specie rilevate¹⁴¹⁻¹⁴². Tuttavia hanno potenzialmente caratteristiche in grado di consentire il riconoscimento di infezioni specifiche su campioni biologici molto piccoli¹⁴¹.

La ricerca sui biosensori si focalizza al momento sul miglioramento della sensibilità e specificità e nella riduzione dei costi, che attualmente sono ancora molto elevati.

Point of Care test (POCT)

La persistente elevata mortalità per sepsi, ha stimolato notevolmente la ricerca sull'argomento. Al momento la principale strategia terapeutica si basa sulla somministrazione di farmaci antimicrobici, sulla rianimazione basata sul riempimento volemico e sui vasopressori¹⁴³. Numerosi studi hanno dimostrato che l'identificazione precoce della sepsi e la diagnosi precoce dell'agente eziologico migliorano il trattamento ed i risultati terapeutici¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Tuttavia, molti altri studi hanno anche dimostrato che il trattamento antibiotico precoce ha un effetto meno significativo dell'atteso rispetto alla coorte di pazienti di controllo, dimostrando la variabilità della malattia e la necessità di test ripetuti e variazione del trattamento conseguente¹⁴⁸⁻¹⁴⁹. Come risultato di questa analisi, sono stati sviluppati numerosi apparecchi diagnostici POCT, per la rapida esecuzione, e ripetizione di test diagnostici sul paziente, consentendo al

contempo un contenimento dei costi sanitari^{150, 151}.

I POCT possono inoltre fornire informazioni sui patogeni e sulla risposta dell'ospite praticamente ovunque e con un breve periodo di elaborazione. L'utilizzo di dispositivi POCT nei ED potrebbe ridurre i tempi di trattamento e migliorare le eventuali modifiche terapeutiche necessarie. Tali dati potrebbero contribuire ad accelerare l'identificazione dei pazienti che richiedono un upgrade della terapia¹⁴⁴. Inoltre i POCT possono essere utili a valutare diversi biomarcatori (IL-6, IL-10, TNF- α , PCT e CRP) per la sepsi acuta o lo shock settico nei pazienti in ED e Terapia Intensiva¹⁵². Tuttavia, alcuni parametri dei POCT, come la regolazione della temperatura e la lettura del segnale ottico, richiedono anche strumenti ad alta intensità di risorse, e necessità di calibrazione continua.

Al momento attuale inoltre, non esistono POCT commerciali efficienti in grado di fornire una diagnostica rapida polimicrobica¹⁵³.

CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Il CRISPR è il nome attribuito a una famiglia di segmenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute rinvenibili in batteri e archei¹⁵⁴. CRISPR è l'acronimo di *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, lett. "sequenze ripetute palindrome brevi raggruppate a intervalli regolari". Queste brevi ripetizioni sono sfruttate dal batterio per riconoscere e distruggere il genoma proveniente da virus simili a quelli che hanno originato le CRISPR: costituiscono dunque una forma di immunità acquisita dei procarioti¹⁵⁴. Le CRISPR costituiscono uno degli elementi di base del sistema CRISPR/Cas, anch'esso coinvolto nell'immunità acquisita dei procarioti. Una versione semplificata di questo sistema (detta CRISPR-Cas9) è stata modificata per fornire un potentissimo e precisissimo strumento di modifica genetica che risulta di impiego molto più facile, e al contempo più economico, rispetto alle

tecnologie preesistenti. Grazie al sistema CRISPR/Cas9 è stato possibile modificare permanentemente i geni di molteplici organismi¹⁵⁵.

Tale metodo sta gradualmente trovando applicazioni in numerosi domini della ricerca biomedica, compresa la sepsi, come nuovo modo di indagare e curare le malattie. Cas9 è un'endonucleasi associata a CRISPR che utilizza il leader duplex dell'RNA sequenza tracrRNA:crRNA con una sequenza target del DNA, inducendo rotture sito-specifiche del doppio filamento nel DNA¹⁵⁶⁻¹⁵⁹.

L'unico meccanismo di scissione del DNA, le numerose capacità di riconoscimento del bersaglio e la presenza di molte varietà del sistema CRISPR-Cas hanno consentito enormi miglioramenti nell'utilizzo di questa tecnologia di sistema poco costosa e semplice da utilizzare. I loci genomici possono essere identificati con precisione, alterati, modificati, regolati e contrassegnati in una varietà di cellule e organismi¹⁶⁰⁻¹⁶².

Tuttavia, la tecnologia CRISPR a causa di limitazioni insite nei target genetici, e della instabilità tecnica, richiede ancora notevoli progressi per avere ricadute pratiche nel trattamento e nella diagnosi della sepsi^{163, 164}.

Limiti per lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche nella sepsi

I problemi significativi che limitano la ricerca di nuove strategie diagnostiche per la sepsi sono la necessità di informazioni considerevoli, il tempo di ricerca necessari per ottenere i risultati, problemi industriali di concorrenza, e la complessità tecnica stessa dei metodi in evoluzione. Inoltre, vista le complessità tecniche e la necessità di expertise specifica, i nuovi test possono essere difficili da implementare nei normali laboratori di microbiologia¹⁶⁵. Inoltre, la situazione attuale di concentrazione di laboratori attrezzati di microbiologia clinica, necessita del trasporto dei campioni al laboratorio di analisi, aumentando il tempo tra raccolta del campione nei diversi ospedali

e referto. Questo approccio è particolarmente negativo per gli ED dove la prontezza della diagnosi è più necessaria.

Per quanto riguarda i test con approccio molecolare, la principale carenza è la loro dipendenza da target-specifici, per cui possono identificare solo le specie che sono effettivamente testate. Ancora una volta questo approccio può essere non efficace in Pronto Soccorso dove le condizioni predisponenti, e la storia clinica del paziente, possono essere sconosciute. Di conseguenza, questi test possono essere utili per confermare diagnosi già sospettate o per studiare pazienti con pregressa sepsi identificata^{166, 167}.

In ultimo, quando si analizzano i dati dei test di nuova generazione basati sul riconoscimento di DNA batterico, è importante ricordare che la presenza di batteri sospetti o la semplice DNAemia, cioè il rilevamento di DNA microbico circolante responsabile di una specifica malattia, non sempre suggerisce l'esistenza di microbi vitali in circolo. Infatti, i test possono rilevare DNA ambientale, o contaminazioni in soggetti portatori sani, e potrebbero potenzialmente aumentare il numero di falsi positivi. La DNAemia infatti è una condizione correlata all'infezione che può essere causata da falsa setticemia^{168, 169} o da DNA circolante che persiste dopo molti giorni di terapia antinfettiva di successo¹⁷⁰.

Un altro svantaggio significativo dei test più moderni, è che non possono fornire alcun dettaglio sull'AMR. Se la rapidità di rilevazione può essere un vantaggio notevole, l'assenza di informazioni sullo spettro di suscettibilità alla terapia può infatti limitare l'uso clinico di questi test¹⁷¹⁻¹⁷⁷.

Conclusioni e nuove direzioni di sviluppo

L'evoluzione delle tecniche di indagine microbiologica sta conducendo ad una rivoluzione nella diagnostica della sepsi. Tuttavia le nuove e numerose tecniche di analisi molecolare richiedono una nuova

consapevolezza da parte del clinico, per riconoscerne i limiti e le possibilità.

Rispetto alla PCR tradizionale, la PCR-RT è in grado di fornire rapidamente numerose informazioni ed ha potenzialmente un impatto notevole sulle capacità diagnostiche complessive. Di conseguenza, i metodi molecolari nel loro complesso possono essere una delle metodologie più efficaci per l'individuazione rapida delle specie microbiche nei campioni biologici¹⁷⁷. Tuttavia, tale innovazione richiede dei miglioramenti sia nella fase pre-analitica, sia nella valutazione post-analitica a livello clinico¹⁷⁸. Inoltre, le questioni riguardanti la resistenza antimicrobica sono sempre più rilevanti sia per la salute pubblica e che per il trattamento dei singoli pazienti con sepsi. Lo sviluppo e la diffusione dell'AMR richiede dunque una valutazione più accurata dell'uso degli antibiotici sia in termini di somministrazione che di durata di terapia, che di dosaggio¹⁷⁹.

Con l'introduzione di nuove tecniche come la gestione dei liquidi biologici a basso costo e ad alta capacità, e dei sistemi ed estrazione dell'acido nucleico, è sempre più necessario trovare approcci moderni alla sepsi nell'attività clinica di routine¹⁸⁰⁻¹⁸⁶.

Gli avanzamenti tecnologici hanno reso affidabile e allo stesso tempo relativamente facile sia l'identificazione che la genotipizzazione di singoli patogeni¹⁸⁷. Tali progressi ragionevolmente consentiranno anche nuovi approcci alla gestione dell'AMR.

Tuttavia, nonostante i progressi e i miglioramenti tecnici e clinici, rimangono ancora molte domande senza risposta nello studio della sepsi. Questi interrogativi, richiedono la collaborazione non solo dei clinici, ma anche degli enti regolatori e finanziatori, dell'industria della diagnostica, e delle agenzie di sanità pubblica. Solo la collaborazione di tutti questi attori permetterà l'implementazione a livello dei singoli pazienti degli avanzamenti tecnologici disponibili, rendendoli accessibile a tutti¹⁷⁹.

L'introduzione delle nuove tecniche diagnostiche, in associazione allo sviluppo dei biomarcatori, ed al miglioramento della consapevolezza clinica nell'ambito della sepsi possono costituire la chiave per la svolta nel trattamento di questa condizione che rappresenta al momento attuale una delle principali sfide cliniche a livello mondiale.

L'impatto delle nuove tecniche diagnostiche deve tuttavia essere ancora valutato in studi randomizzati prospettici, per definire se le nuove e promettenti capacità diagnostiche renderanno realmente possibile un miglioramento degli *outcome* clinici misurabili a livello dei pazienti¹⁷⁹⁻¹⁸⁷.

BIBLIOGRAFIA

- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395: 200-11.
- Vincent JL, Sakr Y, Singer M, et al. Prevalence and outcomes of infection among patients in intensive care units in 2017. *JAMA* 2020; 324: 846-57.
- Covino M, Manno A, De Matteis G, et al. Prognostic Role of Serum Procalcitonin Measurement in Adult Patients Admitted to the Emergency Department with Fever. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10: 788.
- Harpenau TL, Bhatti SN, Hoffman BM, Kirsch WB. Impact of extended emergency department stay on antibiotic re-dosing delays and outcomes in sepsis. *Am J Emerg Med* 2022; 55: 32-7.
- Yang J, Ong WJ, Piragasam R, Allen JC, Lee JH, Chong SL. Delays in Time-To-Antibiotics for Young Febrile Infants With Serious Bacterial Infections: A Prospective Single-Center Study. *Front Pediatr* 2022; 10: 873043.
- Rees CA, Lim J, Westbrook AL, et al. Systematic review and meta-analysis of the diagnostic value of four biomarkers in detecting neonatal sepsis in low- and middle-income countries. *BMJ Paediatr Open* 2023; 7: e001627.
- Gao RY, Jia HM, Han YZ, et al. Calprotectin as a diagnostic marker for sepsis: A meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 1045636.
- Sparks R, Harada A, Chavada R, Trethewey C. Comparison of different sepsis scoring systems and pathways: qSOFA, SIRS, Shapiro criteria and CEC SEPSIS KILLS pathway in bacteraemic and non-bacteraemic patients presenting to the emergency department. *BMC Infect Dis* 2022; 22: 76.
- Póvoa P, Coelho L, Dal-Pizzol F, et al. How to use biomarkers of infection or sepsis at the bedside: guide to clinicians. *Intensive Care Med* 2023; 2: 1-12.
- Gupta E, Saxena J, Kumar S, et al. Fast Track Diagnostic Tools for Clinical Management of Sepsis: Paradigm Shift from Conventional to Advanced Methods. *Diagnostics (Basel)* 2023; 13: 277.
- Kumar S, Payal N, Srivastava VK, Kaushik S, Saxena J, Jyoti A. Neutrophil extracellular traps and organ dysfunction in sepsis. *Clin Chim Acta* 2021; 523: 152-62.
- Guirgis F, Black LP, DeVos EL. Updates and controversies in the early management of sepsis and septic shock. *Emerg Med Pract* 2018; 20: 1-28.
- Kumar S, Gupta E, Srivastava VK, et al. Nitrosative stress and cytokines are linked with the severity of sepsis and organ dysfunction. *Br J Biomed Sci* 2019; 76: 29-34.
- Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med* 2019; 7: 2050312119835043.
- Kempker JA, Martin GS. A global accounting of sepsis. *Lancet* 2020; 395: 168-170.
- Rudnov VA, Kulabukhov VV. Sepsis-3: Updated main definitions, potential problems and next practical steps. *Messenger Anesthesiol Resusc* 2018; 13: 4-11.
- Masoudifar M, Gouya MM, Pezeshki Z, et al. Health care-associated infections, including device-associated infections, and antimicrobial resistance in Iran: The national update for 2018. *J Prev Med Hyg* 2021 62, E943.
- Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: Results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2020; 46: 1552-62.

19. Makic MBF, Bridges E. CE: Managing Sepsis and Septic Shock: Current Guidelines and Definitions. *Am J Nurs* 2018; 118: 34-9.
20. Buchman TG, Simpson SQ, Sciarretta KL, et al. Sepsis among medicare beneficiaries: 1. The burdens of sepsis, 2012–2018. *Crit Car Med* 2020; 48: 276.
21. García-Rodríguez JF, Mariño-Callejo A. The factors associated with the trend in incidence of Bacteraemia and associated mortality over 30 years. *BMC Infect Dis* 2023; 23: 69.
22. Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, et al. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: Secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med* 2018; 44: 1826-35.
23. Abe T, Ogura H, Kushimoto S, et al. Variations in infection sites and mortality rates among patients in intensive care units with severe sepsis and septic shock in Japan. *J Intensive Care* 2019; 7: 28.
24. Gajdács, M. The concept of an ideal antibiotic: Implications for drug design. *Molecules* 2019; 24: 892.
25. van Belkum A, Burnham CAD, Rossen JW, Mallard F, Rochas O, Dunne WM. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 299-311.
26. Kethireddy S, Bilgili B, Sees A, et al. Culture-negative septic shock compared with culture-positive septic shock: A retrospective cohort study. *Crit Care Med* 2018; 46: 506-12.
27. Falcone M, Bassetti M, Tiseo G, et al. Time to appropriate antibiotic therapy is a predictor of outcome in patients with bloodstream infection caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Crit Care* 2020; 24: 24.
28. Nath P, Kabir A, Khoubarfarin Doust S, Kreais ZJ, Ray A. Detection of bacterial and viral pathogens using photonic point-of-care devices. *Diagnostics* 2020; 10: 841.
29. Choi JA, Bae SM, Kim JW, Lee KJ. Development of a Two Triplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Rapid Detection of Six Carbapenemase Genes in Enterobacteriaceae. *Osong Public Health Res Perspect* 2020; 11 53.
30. Mejia-Chew C, O'Halloran JA, Olsen MA, et al. Effect of infectious disease consultation on mortality and treatment of patients with candida bloodstream infections: A retrospective, cohort study. *Lancet Infect Dis* 2019; 19: 1336-44.
31. Edmiston CE, Garcia R, Barnden M, DeBaun B, Johnson HB Rapid diagnostics for bloodstream infections: A primer for infection preventionists. *Am J Infect Control* 2018; 46: 1060-8.
32. Sato H, Nakao A, Sato K, Otomo Y, Nijima S, Shimizu T. Comparison of time to positivity of pediatric blood cultures obtained within the first year of life and in later years. *J. Infect Chemother* 2020; 26: 813-7.
33. Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, Leiva-Salinas C. Current Practice and Regional Variability in Recommendations for Patient Preparation for Laboratory Testing in Primary Care. *Lab Med* 2020; 51: e32-e37.
34. Zelellw DA, Dessie G, Worku Mengesha E, Balew Shiferaw M, Mela Merhaba M, Emishaw SA. Systemic Review and Meta-analysis of the Leading Pathogens Causing Neonatal Sepsis in Developing Countries. *BioMed Res Int* 2021; 2021: 6626983.
35. Özenci V, Strålin K. Clinical implementation of molecular methods in detection of microorganisms from blood with a special focus on PCR electrospray ionization mass spectrometry. *Expert Rev Mol Diagn* 2019; 19: 389-95.
36. Quirino A, Marascio N, Peronace C, et al. Direct antimicrobial susceptibility testing (AST) from positive blood cultures using Microscan system for early detection of bacterial resistance phenotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021; 101: 115485.
37. Butler-Laporte G, Yansouni CP, Paquette K, et al. September. Real-word time-to-positivity of two widely used commercial blood culture systems in patients with severe manifestations of sepsis: An analysis of the FABLED study. *Open Forum Infect Dis* 2020; 7: ofaa371.
38. Rule R, Paruk F, Becker P, Neuhoff M, Chausse J, Said M. Diagnostic accuracy of the BioFire FilmArray blood culture identification panel when used in critically ill patients with sepsis. *J Microbiol Methods* 2021; 189: 106303.
39. Rodrigues C, Siciliano RF, Charbel CE, et al. The effect of a rapid molecular blood test on the use of antibiotics for nosocomial sepsis: A randomized clinical trial. *J Intensive Care* 2019; 7: 37.

40. Lin JF, Ge MC, Liu TP, Chang SC, Lu J. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect* 2018; 51: 659-65.
41. Wu Y, Yao YM, Ke HL et al. Mdivi-1 protects CD4+ T cells against apoptosis via balancing mitochondrial fusion-fission and preventing the induction of endoplasmic reticulum stress in sepsis. *Mediators Inflamm* 2019; 2019: 7329131.
42. Ransom EM, Alipour Z, Wallace MA, Burnham CAD. Evaluation of optimal blood culture incubation time to maximize clinically relevant results from a contemporary blood culture instrument and media system. *J Clin Microbiol* 2021; 59: e02459-20.
43. Du Plessis A. Influence of Blood Culture Results on Antimicrobial Prescribing in a Private Hospital in North West, South Africa. Ph.D. Thesis, North-West University, Potchefstroom, South Africa, 2020.
44. Chou WK, Vaikunthan M, Schröder HV, Link AJ, Kim H, Brynildsen MP. Synergy screening identifies a compound that selectively enhances the antibacterial activity of nitric oxide. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 1001.
45. Kaczor A, Witek K, Podlewska S, et al. Molecular insights into an antibiotic enhancer action of new morpholine-containing 5-arylideneimidazolones in the fight against MDR bacteria. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 2062.
46. Bakhit M. Antibiotic Resistance: Patient-Clinician Communication and Decision-Making about Antibiotic Use in Primary Care. Ph. D. Thesis, Bond University, Gold Coast, Australia, 2018.
47. Mehta Y, Paul R, Rabbani R, Acharya SP, Withanaarachchi UK. Sepsis Management in Southeast Asia: A Review and Clinical Experience. *J Clin Med* 2022; 11: 3635.
48. Nguyen M, Brettin T, Long S, et al. Developing an in silico minimum inhibitory concentration panel test for *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 2018; 8: 421.
49. Kharb S. Biochemical Tests in Clinical Medicine. In *Mind Maps in Clinical Chemistry (Part I)*; Bentham Science Publishers: Sharjah, United Arab Emirates, 2021; p. 15.
50. Tavassoly I, Goldfarb J, Iyengar R. Systems biology primer: The basic methods and approaches. *Essays Biochem* 2018; 62: 487-500.
51. Pilecky M, Schildberger A, Orth-Höller D, Weber V. Pathogen enrichment from human whole blood for the diagnosis of bloodstream infection: Prospects and limitations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 94: 7-14.
52. Cheung S, Bi W. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18: 531-42.
53. Iregbu K, Dramowski A, Milton R, et al. Global health systems' data science approach for precision diagnosis of sepsis in early life. *Lancet Infect Dis* 2021; 22: e143-e152.
54. Philips CA, Ahamed R, Rajesh S, George T, Mohanan M, Augustine P. Update on diagnosis and management of sepsis in cirrhosis: Current advances. *World J Hepatol* 2020; 2: 451.
55. Sune D, Rydberg H, Augustinsson ÅN, Serrander L, Jungeström MB. Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service. *J Microbiol Methods* 2020; 170: 105854.
56. Llerena JP, Araujo P, Mazzafera P. Optimization of RT-PCR reactions in studies with genes of lignin biosynthetic route in *Saccharum spontaneum*. *An Acad Bras Cienc* 2018; 90: 509-19.
57. Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, Dao DV, Nguyen NT. Digital polymerase chain reaction technology—recent advances and future perspectives. *Lab Chip* 2018; 18: 3717-32.
58. Manzano M. Labelled and unlabelled probes for pathogen detection with molecular biology methods and biosensors. *Methods Microbiol* 2021; 48: 79-225.
59. Ferguson J, Duran J, Killinen W, et al. A Field-Deployable and Low-Cost PCR (FLC-PCR) Thermocycler for the Rapid Detection of Environmental *E. coli*. In *Proceedings of the 2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, Montreal, QC, Canada, 20–24 July 2020; IEEE: Piscataway, NJ, USA, 2020; pp. 2209-12.
60. Dayarathne MC, Mridha AU, Wang Y. Diagnosis of Fungal Plant Pathogens Using Conventional and Molecular Approaches. In *Diagnostics of Plant Diseases*; IntechOpen: London, UK, 2020.

61. Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosens Bioelectron* 2020; 169: 112592.
62. Kumar SS, Ghosh AR. Assessment of bacterial viability: A comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiology* 2019; 165: 593-610.
63. Jiang XW, Huang TS, Xie L, et al. Development of a diagnostic assay by three-tube multiplex real-time PCR for simultaneous detection of nine microorganisms causing acute respiratory infections. *Sci Rep* 2022; 12: 13306.
64. Mota FA, Pereira SA, Araújo AR, Passos ML, Saraiva MLM. Biomarkers in the diagnosis of wounds infection: An analytical perspective. *Trends Anal Chem* 2021; 143: 116405.
65. Saha O, Islam MR, Rahman MS, Hoque MN, Hossain MA, Sultana M. Genome-wide diversity and differentiation of two novel multidrug-resistant populations of *Pasteurella multocida* type B: 2 from fowl cholera. Doi: 10.1101/2020.08.24.262618.
66. Gunsolus IL, Sweeney TE, Liesenfeld O, Ledebor NA. Diagnosing and managing sepsis by probing the host response to infection: Advances, opportunities, and challenges. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e00425-19.
67. Mishra D, Satpathy G, Chawla R, Venkatesh P, Ahmed NH, Panda SK. Utility of broad-range 16S rRNA PCR assay versus conventional methods for laboratory diagnosis of bacterial endophthalmitis in a tertiary care hospital. *Br J Ophthalmol* 2019; 103: 152-6.
68. Verbakel JY, Matheussen V, Loens K, et al. Performance and ease of use of a molecular point-of-care test for influenza A/B and RSV in patients presenting to primary care. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39: 1453-60.
69. Reta DH, Tessema TS, Ashenef AS, et al. Molecular and immunological diagnostic techniques of medical viruses. *Int J Microbiol* 2020; 2020: 8832728.
70. Nik Zuraina NMN, Mohamad S, Hasan H, Goni MD, Suraiya S. Diagnostic performance of an in-house multiplex PCR assay and the retrospective surveillance of bacterial respiratory pathogens at a teaching hospital, Kelantan, Malaysia. *Pathog Glob Health* 2022, 1-13.
71. Davidson KR, Ha DM, Schwarz MI, Chan ED. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: A review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *J Thorac Dis* 2020; 12: 4991.
72. Cao X, Zhao L, Zhang J, et al. Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods. *Food Control* 2019; 103: 145-52.
73. Yang W, Zhang J, Ma R. The prediction of infectious diseases: A bibliometric analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 7: 6218.
74. Pan Z, Lu J, Wang N, al. Development of a TaqMan-probe-based multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of emerging and reemerging swine coronaviruses. *Virulence* 2020; 11: 707-18.
75. Kadri K. Polymerase chain reaction (PCR): Principle and applications. In *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*; IntechOpen: London, UK, 2019.
76. Pumford EA, Lu J, Spaczai I, et al. Developments in integrating nucleic acid isothermal amplification and detection systems for point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2020; 170: 112674.
77. Miotto BA, Hora ASD, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipI32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Braz J Microbiol* 2018; 49: 584-90.
78. Barkallah M, Elleuch J, Smith KF, et al. Development and application of a real-time PCR assay for the sensitive detection of diarrheic toxin producer *Prorocentrum lima*. *J Microbiol Methods* 2020; 178: 106081.
79. Marras SA, Tyagi S, Antson DO, Kramer FR. Color-coded molecular beacons for multiplex PCR screening assays. *PLoS ONE* 2019; 14: 0213906.
80. Inchingolo R, Pierandrei C, Montemurro G, Smargiassi A, Lohmeyer FM, Rizzi A. Antimicrobial resistance in common respiratory pathogens of chronic bronchiectasis patients: A literature review. *Antibiotics* 2021; 10: 326.
81. Candel FJ, Sá MB, Belda S, et al. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Span J Psychol* 2018; 31: 298.

82. Pashchenko O, Shelby T, Banerjee T, Santra S. A comparison of optical, electrochemical, magnetic, and colorimetric point-of-care biosensors for infectious disease diagnosis. *ACS Infect Dis* 2018; 4: 1162-78.
83. Han H, Sohn B, Choi J, Jeon S. Recent advances in magnetic nanoparticle-based microfluidic devices for the pretreatment of pathogenic bacteria. *Biomed Eng Lett* 2021; 11: 297-307.
84. Schmitz JE, Stratton CW, Persing DH, Tang YW. Forty Years of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases. *J Clin Microbiol* 2022; 60: e02446-21.
85. Bronder TS, Jessing MP, Poghossian A, Keusgen M, Schöning MJ. Detection of PCR-amplified tuberculosis DNA fragments with polyelectrolyte-modified field-effect sensors. *Anal Chem* 2018; 90: 7747-53.
86. Wang, J, Yang J, Gao S, et al. Rapid detection and differentiation of *Theileria annulata*, *T. orientalis* and *T. sinensis* using high-resolution melting analysis. *Ticks Tick Borne Dis* 2020; 11: 101312.
87. Kurbakov KA, Konorov EA, Minaev MY, Kuznetsova OA. Multiplex real-time PCR with HRM for detection of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in Food Samples. *Food Technol Biotechnol* 2019; 57: 97-104.
88. Pohanka M. Current trends in the biosensors for biological warfare agents assay. *Materials* 2019; 12: 2303.
89. Zheng W, Jiang L, Lei Q, et al. Development and validation of quantitative real-time PCR for the detection of residual CHO host cell DNA and optimization of sample pretreatment method in biopharmaceutical products. *Biol Proced Online* 2019; 21: 17.
90. Chen X, Tang M, Liu Y, et al. Surface-enhanced Raman scattering method for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using positively charged silver nanoparticles. *Mikrochim Acta* 2019; 186: 1-8.
91. Jeong K, Stanwix PL, May EF, Aman ZM. Surface-Enhanced Raman Scattering Imaging of Cetylpyridinium Chloride Adsorption to a Solid Surface. *Anal Chem* 2022; 94: 14169-76.
92. Xu G, Guo N, Zhang Q, Wang T, Song P, Xia L. An ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering sensor for the detection of hydrazine via the Schiff base reaction. *J Hazard Mater* 2022; 424: 127303.
93. Ge M, Li P, Zhou G, et al. General surface-enhanced Raman spectroscopy method for actively capturing target molecules in small gaps. *J Am Chem Soc* 2021; 143: 7769-76.
94. Sun Y, Chen X, Zheng Y, Song Y, Zhang H, Zhang S. Surface-enhanced Raman scattering trace-detection platform based on continuous-rolling-assisted evaporation on superhydrophobic surfaces. *ACS Appl Nano Mater* 2020; 3: 4767-76.
95. Pérez-Jiménez AI, Lyu D, Lu Z, Liu G, Ren B. Surface-enhanced Raman spectroscopy: Benefits, trade-offs and future developments. *Chem Sci* 2020; 11: 4563-77.
96. Shvalya V, Filipič G, Zavašnik J, Abdulhalim I, Cvelbar U. Surface-enhanced Raman spectroscopy for chemical and biological sensing using nanoplasmonics: The relevance of interparticle spacing and surface morphology. *Appl Phys Rev* 2020; 7: 031307.
97. Zong C, Xu M, Xu LJ, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis: Reliability and challenges. *Chem Rev* 2018; 118: 4946-80.
98. Li P, Long F, Chen W, Chen J, Chu PK, Wang H. Fundamentals and applications of surface-enhanced Raman spectroscopy-based biosensors. *Curr Opin Biomed Eng* 2020; 13: 51-9.
99. Sun J, Gong L, Wang W, Gong Z, Wang D, Fan M. Surface-enhanced Raman spectroscopy for on-site analysis: A review of recent developments. *Luminescence* 2020; 35: 808-20.
100. Liu S, Hu Q, Li C, et al. Wide-range, rapid, and specific identification of pathogenic bacteria by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Sens* 2021; 6: 2911-9.
101. Pyrak E, Krajczewski J, Kowalik A, Kudelski A, Jaworska A. Surface enhanced Raman spectroscopy for DNA biosensors— How far are we? *Molecules* 2019; 24: 4423.
102. Kim J, Jang Y, Kim NJ, et al. Study of chemical enhancement mechanism in non-plasmonic surface enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Front Chem* 2019; 7: 582.
103. Han YY, Lin, Cheng WC, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing of bacteria from patients' blood via assaying bacterial metabolic response with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2020; 10: 12538.

104. Wang K, Li S, Petersen M, Wang S, Lu X. Detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nanomaterials* 2018; 8: 762.
105. Tahir MA, Dina N, Cheng H, Valev VK, Zhang L. Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis and diagnosis. *Nanoscale* 2021; 13: 11593-634.
106. Dizaji AN, Ozek NS, Aysin F, Calis A, Yilmaz A, Yilmaz M. Combining vancomycin-modified gold nanorod arrays and colloidal nanoparticles as a sandwich model for the discrimination of Gram-positive bacteria and their detection via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Analyst* 2021; 146: 3642-53.
107. Ahmad W, Wang J, Li H, Jiao T, Chen Q. Trends in the bacterial recognition patterns used in surface enhanced Raman spectroscopy. *Trends Anal Chem* 2021; 142: 116310.
108. Kumar M, Shergill SPS, Tandel K, Sahai K, Gupta RM. Direct antimicrobial susceptibility testing from positive blood culture bottles in laboratories lacking automated antimicrobial susceptibility testing systems. *Med J Armed Forces India* 2019; 75: 450-7.
109. Wang Y, Jin Y, Bai Y, et al. Rapid method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Exp Ther Med* 2020; 20: 235.
110. Dai Y, Xu X, Yan X, et al. Evaluation of a rapid and simplified protocol for direct identification of microorganisms from positive blood cultures by using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 632679.
111. Kayin M, Mert B, Aydemir S, Özenci V. Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38: 2133-43.
112. Homolová R, Bogdanová K, Bardoň J, Kolář M. Direct identification of bacteria in blood cultures by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26: 45-50.
113. Tsuchida S, Nakayama T. MALDI-Based Mass Spectrometry in Clinical Testing: Focus on Bacterial Identification. *Appl Sci* 2022; 12: 2814.
114. Perini M, Batisti Biffignandi G, Di Carlo D, et al. MeltingPlot, a user-friendly online tool for epidemiological investigation using High Resolution Melting data. *BMC Bioinform* 2021; 22: 76.
115. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microb Drug Resist* 2018; 24: 590-606.
116. Li Y, Xiu L, Wang L, Zhang L, Wang F, Peng J. Rapid Detection of Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma genitalium* by High-Resolution Melting Analysis with Unlabeled Probes. *Microbiol Spectr* 2022; 10: e01014-22.
117. Dehshiri M, Khoramrooz SS, Zoladl M, et al. The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2018; 17: 4.
118. Shalmashi H, Farajnia S, Sadeghi M, et al. Detection of ESBLs types blaCTX-M, blaSHV and blaTEM resistance genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Rep* 2022; 28: 101637.
119. Zarabadi-Pour M, Peymani A, Habibollah-Pourzereshki N, Sarookhani MR, Karami AA, Javadi A. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Hospitals of Qazvin, Iran. *Ethiop J Health Sci* 2021; 31: 229-36.
120. Abdar MH, Taheri-Kalani M, Taheri K, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from nosocomial infections in Tehran, Iran. *GMS Hyg Infect Control* 2019; 14: 318.
121. Jordt H, Stalder T, Kosterlitz O, Ponciano JM, Top EM, Kerr B. Coevolution of host-plasmid pairs facilitates the emergence of novel multidrug resistance. *Nat Ecol Evol* 2020; 4: 863-69.
122. Maharjan M, Sah AK, Pyakurel S, et al. Molecular Confirmation of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* with vanA Gene from a Hospital in Kathmandu. *Int J Microbiol* 2021; 2021: 3847347.
123. Fisher JF, Mobashery S. β -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium. *Chem Rev* 2020; 121: 3412-63.

124. Leonard H, Colodner R, Halachmi S, Segal E. Recent advances in the race to design a rapid diagnostic test for antimicrobial resistance. *ACS Sens* 2018; 3: 2202-17.
125. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJJ, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 350-4.
126. Fujii H, Kakiuchi S, Tsuji M, et al. Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol Methods* 2018; 251: 123-8.
127. Yan Q, Wi YM, Thoendel MJ, et al. Evaluation of the CosmosID bioinformatics platform for prosthetic joint-associated sonicate fluid shotgun metagenomic data analysis. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e01182-18.
128. Friães A, Mamede R, Ferreira M, Melo-Cristino J, Ramirez M. Annotated Whole-Genome Multilocus Sequence Typing Schema for Scalable High-Resolution Typing of *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2022; 60: e00315-22.
129. Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* 2018; 3: 1255-65.
130. Rahman SF, Olm MR, Morowitz MJ, Banfield JF. Machine learning leveraging genomes from metagenomes identifies influential antibiotic resistance genes in the infant gut microbiome. *MSystems* 2018; 3: e00123-17.
131. Sturaro LL, Gonoï T, Busso-Lopes AF, et al. Visible DNA microarray system as an adjunctive molecular test in identification of pathogenic fungi directly from a blood culture bottle. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01908-17.
132. Dhanjal DS, Chopra C, Chopra RS. Metagenomic DNA sequencing: Technological advances and applications. In *Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities*. Berlin/Heidelberg, Germany, Springer 2020; pp. 37-53.
133. Schaack D, Siegler BH, Tamulyte S, Weigand MA, Uhle F. The immunosuppressive face of sepsis early on intensive care unit—A large-scale microarray meta-analysis. *PLoS ONE* 2018; 13: 0198555.
134. Carroll KC, Reid JL, Thornberg A, et al. Clinical performance of the novel GenMark Dx ePlex blood culture ID Gram-positive panel. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01730-19.
135. Li Y, Zhang F, Cong Y, Zhao Y. Identification of potential genes and miRNAs associated with sepsis based on microarray analysis. *Mol Med Rep* 2018; 17: 6227-34.
136. Kuchibiro T, Hirano A, Ogasawara S, Nakamura T. The microcolony detection method (MCD), a simple and rapid screening test for antimicrobial resistance bacteria on positive blood cultures. *Heliyon* 2020; 6: 05494.
137. She RC, Bender JM. Advances in rapid molecular blood culture diagnostics: Healthcare impact, laboratory implications, and multiplex technologies. *J Appl Lab Med* 2019; 3: 617-30.
138. Huang TD, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex blood culture identification panels for detection of pathogens in bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e01597-18.
139. Zukowska ME. Advanced methods of bacteriological identification in a clinical microbiology laboratory. *J Pre Clin Clin Res* 2021; 15: 68-72.
140. Fournier C, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. Occurrence of CTX-M-15-and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105802.
141. Kumar S, Tripathy S, Jyoti A, Singh S.G. Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis: A comprehensive review. *Biosens Bioelectron* 2019; 124: 205-15.
142. Kundu S, Tabassum S, Kumar R. A perspective on sepsis pathogenesis, biomarkers and diagnosis: A concise survey. *Med Devices Sens* 2020; 3: 10089.
143. Min J, Nothing M, Coble B, et al. Integrated biosensor for rapid and point-of-care sepsis diagnosis. *ACS Nano* 2018; 12: 3378-84.

144. Levy MM, Gesten FC, Phillips GS, et al. Mortality changes associated with mandated public reporting for sepsis. The results of the New York state initiative. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198: 1406-12.
145. Alam N, Oskam E, Stassen PM, et al. Prehospital antibiotics in the ambulance for sepsis: A multicentre, open label, randomised trial. *Lancet Respir Med* 2018; 6: 40-50.
146. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, et al. Blood culture results before and after antimicrobial administration in patients with severe manifestations of sepsis: A diagnostic study. *Ann Intern Med* 2019; 171: 547-54.
147. Peltan ID, Mitchell KH, Rudd KE, et al. Prehospital care and emergency department door-to-antibiotic time in sepsis. *Ann Am Thorac Soc* 2018; 15: 1443-50.
148. Rello J, Van Engelen TSR, Alp E, et al. Towards precision medicine in sepsis: A position paper from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1264-72.
149. Kumar V. Targeting macrophage immunometabolism: Dawn in the darkness of sepsis. *Int Immunopharmacol* 2018; 58: 173-85.
150. Antonioli L, Blandizzi C, Fornai M, Pacher P, Lee HT, Haskó G. P2X4 receptors, immunity, and sepsis. *Curr Opin Pharmacol* 2019; 47: 65-74.
151. Mirasoli M, Bonvicini F, Lovecchio N, et al. On-chip LAMP-BART reaction for viral DNA real-time bioluminescence detection. *Sens Actuators B Chem* 2018; 262: 1024-33.
152. Nasser B, Soleimani N, Rabiee N, Kalbasi A, Karimi M, Hamblin MR. Point-of-care microfluidic devices for pathogen detection. *Biosens Bioelectron* 2018; 117: 112-28.
153. Reddy B, Hassan U, Seymour C, et al. Point-of-care sensors for the management of sepsis. *Nat Biomed Eng* 2018; 2: 640-8.
154. Zhang Y, Hu A, Andini N, Yang S. A culture'shift: Application of molecular techniques for diagnosing polymicrobial infections. *Biotechnol Adv* 2019; 37: 476-90.
155. Thurtle-Schmidt DM, Lo TW. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochem Mol Biol Educ* 2018; 46: 195-205.
156. Butiuc-Keul A, Farkas A, Carpa R, Iordache D. CRISPR-Cas system: The powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes. *Microb Physiol* 2022; 32: 2-17.
157. Mohamadi S, Bostanabad SZ, Mirnejad R. CRISPR arrays: A review on its mechanism. *J Appl Biotechnol Rep* 2020; 7: 81-6.
158. Majumdar S, Terns MP. CRISPR RNA-guided DNA cleavage by reconstituted Type IA immune effector complexes. *Extremophiles* 2020; 23: 19-33.
159. Gouw AM. Challenging the therapy/enhancement distinction in CRISPR gene Editing. In: *The Palgrave Handbook of Philosophy and Public Policy*. Cham, Switzerland; Palgrave Macmillan 2018; pp. 493-508.
160. Koonin EV. CRISPR: A new principle of genome engineering linked to conceptual shifts in evolutionary biology. *Biol Philos* 2018; 34: 9.
161. Ewart DT, Peterson EJ, Steer CJ. Gene editing for inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 6-15.
162. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science* 2018; 361: 866-9.
163. Khan SH. Genome-editing technologies: Concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 16: 326-34.
164. Chew WL. Immunity to CRISPR Cas9 and Cas12a therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev Syst Biol Med* 2018; 10: 1408.
165. Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science* 2019; 363: 88-91.
166. Gupta Y, Ghrera AS. Recent advances in gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of bacterial infection. *Arch Microbiol* 2021; 203: 3767-84.
167. Costa SP, Carvalho CM. Burden of bacterial bloodstream infections and recent advances for diagnosis. *Pathog Dis* 2022; 80: ftac027.

168. Di Gaudio F, Indelicato S, Indelicato S, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J Microbiol Methods* 2018; 155: 1-7.
169. Mirza FH, Baig FA, Syed S, Kumar A, Shahid MA. Role of Presepsin and Comparison with Conventional Markers for Early Diagnosis and Differentiation of Sepsis. *J Hunan Univ Nat Sci* 2021; 48: 72-7.
170. Scerbo MH, Kaplan HB, Dua A, et al. Beyond blood culture and Gram stain analysis: A review of molecular techniques for the early detection of bacteremia in surgical patients. *Surg Infect* 2016; 17: 294-302.
171. Schenz J, Weigand MA, Uhl F. Molecular and biomarker-based diagnostics in early sepsis: Current challenges and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn* 2019; 19: 1069-78.
172. Behera B, Vishnu GA, Chatterjee S, et al. Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing. *Biosens Bioelectron* 2019; 142: 111552.
173. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: Recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 944-55.
174. Tabak YP, Vankeepuram L, Ye G, Jeffers K, Gupta V, Murray PR. Blood culture turnaround time in US acute care hospitals and implications for laboratory process optimization. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e00500-18.
175. Green MR, Sambrook J. Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018: 095000.
176. Dailey PJ, Elbeik T, Holodniy M. Companion and complementary diagnostics for infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2020; 20: 619-36.
177. Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021; 99: 115219.
178. Nathwani D, Varghese D, Stephens J, Ansari W, Martin S, Charbonneau C. Value of hospital antimicrobial stewardship programs [ASPs]: A systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8: 35.
179. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque AC. Identification and antibiotic-susceptibility profiling of infectious bacterial agents: A review of current and future trends. *Biotechnol J* 2019; 14: 1700750.
180. Yang CY, Lee CH, Hsieh CC, Hong MY, Chen MJ, Lee CC. Differential effects of inappropriate empirical antibiotic therapy in adults with community-onset gram-positive and gram-negative aerobic bacteremia. *J Infect Chemother* 2020; 26: 222-9.
181. Wang W, Kang S, Vikesland PJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacterial metabolites for bacterial growth monitoring and diagnosis of viral infection. *Environ Sci Technol* 2021; 55: 9119-28.
182. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* 2020; 25: 4775.
183. Tjandra KC, Ram-Mohan N, Abe R, et al. Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing. *Antibiotics* 2022; 11: 511.
184. Brenner T, Decker SO, Grumaz S, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSiS-Trial): Study protocol of a prospective, observational, noninterventional, multicenter, clinical trial. *Medicine* 2018; 97: 9868.
185. Gopal A, Yan L, Kashif S, et al. Biosensors and Point-of-Care Devices for Bacterial Detection: Rapid Diagnostics Informing Antibiotic Therapy. *Adv Healthc Mater* 2022; 11: 2101546.
186. Gholizadeh P, Köse S, Dao S, et al. How CRISPR-Cas system could be used to combat antimicrobial resistance. *Infect Drug Resist* 2020; 13: 1111.
187. Legenza L, Barnett S, Lacy JP, et al. Geographic mapping of *Escherichia coli* susceptibility to develop a novel clinical decision support tool. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: 19.

Prof. Marcello Covino, Medicina d'Urgenza,
Fondazione Policlinico Universitario A.
Gemelli, IRCCS; Università Cattolica del Sacro
Cuore, Roma

Dott. Andrea Piccioni, Medicina d'Urgenza,
Fondazione Policlinico Universitario A.
Gemelli, IRCCS

Prof. Michele Cosimo Santoro, Medicina
d'Urgenza, Fondazione Policlinico
Universitario A. Gemelli, IRCCS

Prof. Francesco Franceschi, Medicina
d'Urgenza, Fondazione Policlinico Universitario
A. Gemelli, IRCCS; Università Cattolica del
Sacro Cuore, Roma

Per la corrispondenza:
marcello.covino@policlinicogemelli.it