

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e

Scienze Materno-Infantili (DINOEMI)

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN PEDIATRIA



**L'ESAME AL CONGELATORE DELLA PLACENTA COME
SUPPORTO DIAGNOSTICO NELLA SEPSI NEONATALE A
ESORDIO PRECOCE**

Relatore:

Prof. Mohamad Maghnie

Correlatori:

Dott. Cesare Arioni

Dott.ssa Alessandra Allodi

Candidata: Gaia Spiandorello

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Introduzione	5
1. La sepsi neonatale a esordio precoce	5
1.1 Epidemiologia	6
1.2 Eziopatogenesi	6
1.3 Streptococco di Gruppo B e Profilassi Antibiotica Intrapartum	10
1.4 Manifestazioni cliniche	16
1.5 Diagnosi	19
1.6 Stratificazione del rischio infettivo per sepsi precoce nei neonati asintomatici	23
1.7 Terapia	29
1.8 Criticità dell'utilizzo precoce della terapia antibiotica	31
2. L'esame microscopico della placenta	34
2.1 Anatomia della placenta	34
2.2 Corioamnionite acuta	36
2.3 Funisite acuta	38
2.4 Lesioni istologiche infiammatorie acute della placenta	39
2.5 Classificazione istologica della corioamnionite acuta e della funisite – staging e grading	44
2.6 L'esame al congelatore della placenta	47
Obiettivo dello studio	50
Pazienti e metodi	51

Risultati	61
Discussione	80
Conclusioni	88
Bibliografia	89
Ringraziamenti	95

Introduzione

1. La Sepsì Neonatale a Esordio Precoce

La sepsì neonatale è una sindrome clinica caratterizzata da segni e sintomi di infezione sistemica nel neonato, associata a elevata mortalità e morbidità, con possibili esiti infausti a breve e a lungo termine.

La definizione di sepsì prevede la presenza di microrganismi patogeni (batteri, virus, funghi) in un fluido normalmente sterile, come il sangue o il liquor cefalorachidiano. Nella pratica clinica neonatologica, l'isolamento del patogeno nel sangue o nel liquor non è sempre possibile (1). A tal proposito, alcuni autori parlano di Sindrome da Risposta Infiammatoria Fetale (Fetal Inflammatory Response Syndrome, FIRS), ossia una condizione clinica causata da un elevato rilascio di citochine pro-infiammatorie causato da un'infezione o da una qualsiasi causa di stress cellulare, la cosiddetta infiammazione sterile; questa condizione si configura come la controparte fetale della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica dell'adulto (SIRS) (2).

In base al periodo di esordio, la sepsì neonatale viene classificata in sepsì neonatale a esordio precoce (Early-Onset Sepsis, EOS) e sepsì neonatale a esordio tardivo (Late-Onset Sepsis, LOS). La sepsì a esordio precoce si manifesta solitamente entro le prime 72 ore di vita del neonato ed è comunemente sostenuta da patogeni acquisiti per via ascendente verticale nel corso di un'infezione intra-amniotica oppure durante il passaggio attraverso il canale del parto. La forma tardiva, invece, insorge dopo i primi tre giorni di vita del neonato, si verifica più spesso nei neonati che richiedono una

prolungata ospedalizzazione e numerose procedure invasive, come i nati pretermine, ed è causata da patogeni tipicamente acquisiti nel setting ospedaliero (1).

1.1 Epidemiologia

La sepsi neonatale a esordio precoce (EOS) rappresenta una delle principali cause di mortalità e morbidità in epoca neonatale, in particolare nei neonati pretermine; costituisce la terza causa di mortalità neonatale a livello globale, rappresentando il 13% della mortalità neonatale complessiva (3).

L'incidenza di sepsi neonatale ha un'ampia variabilità geografica ed è notevolmente influenzata dal livello socioeconomico del paese. La sua incidenza si è notevolmente ridotta dall'introduzione della profilassi antibiotica contro lo Streptococco di gruppo B (GBS), che rappresenta il più comune agente eziologico; in Italia, attualmente, l'incidenza di EOS è di 0,61 ogni 1000 nati vivi (4), mentre risulta maggiore nei neonati di peso molto basso alla nascita (<1500 grammi, VLBW). La mortalità varia dal 3% al 50% ed è maggiore nelle sepsi provocate da batteri gram-negativi (5).

1.2 Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi della sepsi neonatale a esordio precoce è complessa e coinvolge diversi meccanismi. L'infezione viene contratta dal neonato nel periodo perinatale (infezione a trasmissione verticale), o per via ematica transplacentare, o per via ascendente a partire dall'apparato genito-urinario

materno o per via discendente mediante il contatto diretto con fluidi materni infetti durante il passaggio attraverso il canale del parto (1).

Il neonato presenta alla nascita uno stato di immunocompromissione in quanto diversi componenti del suo sistema immunitario non sono ancora completamente sviluppati, con una relazione inversamente proporzionale all'età gestazionale alla nascita: quanto più il neonato è pretermine, tanto più il suo sistema immunitario risulta immaturo con un elevato rischio di contrarre infezioni gravi.

Esistono numerosi fattori di rischio per EOS che possono essere distinti in materni e neonatali.

I fattori di rischio di origine materna sono:

- Febbre materna intrapartum $\geq 38^{\circ}\text{C}$, possibile espressione della risposta infiammatoria materna a un'infezione batterica intra-amniotica (corioamnionite), rappresenta un importante fattore di rischio predittivo di EOS;
- Infezioni del tratto genito-urinario materno;
- Rottura prolungata delle membrane amniotiche (PROM), in quanto promuove il processo di colonizzazione ascendente e di infezione del comparto uterino e, successivamente, del feto da parte di batteri provenienti dal tratto genito-urinario e intestinale materno;
- Rottura pretermine e precoce delle membrane (pPROM);
- Manovre ostetriche invasive (monitoraggio fetale invasivo, scollamento delle membrane, cerchiaggio cervicale), che possono favorire l'infezione batterica per via ascendente;

- Liquido amniotico maleodorante;
- Profilassi antibiotica intrapartum incompleta o assente;
- Precedente parto con sviluppo di complicanze settiche nel neonato.

I fattori di rischio neonatali, invece, comprendono:

- Prematurità, in quanto associata a più bassi livelli di anticorpi protettivi di origine materna e una minore efficacia delle difese immunitarie mediate dai leucociti neutrofili;
- Basso peso alla nascita (<2500 grammi);
- Tachicardia fetale;
- Sesso maschile;
- Gravidanza gemellare;
- Basso punteggio di Apgar alla nascita (<6 al 5° minuto di vita) (1).

Tra questi elementi, quello tradizionalmente considerato tra i più significativi nel predire il rischio di EOS neonatale è la febbre materna durante il travaglio, in quanto possibile espressione di infezione intra-amniotica (corioamnionite). Tuttavia, l'interpretazione della febbre materna intrapartum è resa più complessa dalla diffusione dell'analgesia epidurale durante il travaglio, che può determinare un rialzo termico anche nel 20% delle madri (7).

Oltre alle suddette condizioni mediche, sono associati allo sviluppo di sepsi neonatale anche alcuni fattori demografici, ad esempio il basso status socioeconomico, la malnutrizione o la tossicodipendenza (8).

La sepsi neonatale a esordio precoce è principalmente causata da agenti patogeni che colonizzano il tratto genitale materno, da cui si diffondono fino

a raggiungere il comparto uterino con successiva infezione invasiva del feto o del neonato durante il travaglio o il parto.

Nei paesi ad alto reddito gli agenti eziologici più comuni responsabili di EOS sono lo Streptococco di gruppo B (Streptococco Agalactiae, GBS) e l'Escherichia Coli; insieme costituiscono dal 62% al 72% di tutti i casi di EOS. In particolare, uno studio condotto negli Stati Uniti ha evidenziato che la maggior parte (73%) dei neonati con sepsi da GBS era a termine, al contrario la maggior parte (81%) dei neonati con infezione da E. Coli era pretermine, con età gestazionale inferiore a 35 settimane (9). Altri agenti eziologici prevalenti nella EOS sono *Listeria monocytogenes*, altre specie di Streptococco (*S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. pneumoniae*), enterococchi, stafilococchi, specie di *Bacillus* e *Haemophilus influenzae*. Nei paesi a basso e medio reddito, invece, prevalgono patogeni quali *Klebsiella* e *Staphylococcus aureus*. Le stime suggeriscono, infatti, che i batteri a forma di bastoncino Gram-negativi (più comunemente specie di *Klebsiella*) costituiscano circa il 60% delle emocolture positive in paesi a basso e medio reddito (6).

Per quanto riguarda le infezioni fungine, causate principalmente da diverse specie di *Candida*, esse costituiscono un problema rilevante nelle Terapie Intensive Neonatali e rappresentano una causa primaria di morbidità e mortalità specie per i neonati pretermine con peso alla nascita < 1500 grammi. L'incidenza delle infezioni da *Candida* ha subito negli ultimi due decenni un elevato incremento, rappresentando, attualmente, la terza causa più frequente di sepsi tardiva. I principali fattori di rischio che espongono questa

popolazione di neonati prematuri alle candidemie sono la colonizzazione da *Candida*, cicli ripetuti di terapie antibiotiche (soprattutto se con cefalosporine di III generazione), utilizzo prolungato di nutrizione parenterale totale, presenza di accessi venosi profondi e cateteri vascolari centrali (1).

1.3 Streptococco di Gruppo B e Profilassi Antibiotica Intrapartum

Lo Streptococco *Agalactiae* di gruppo B (GBS), batterio gram-positivo, è noto come la principale causa batterica di EOS a partire dagli anni '70; studi successivi hanno dimostrato che il principale fattore di rischio per la sepsi a esordio precoce da GBS (GBS-Early Onset Disease, GBS-EOD) è rappresentato dalla colonizzazione materna da GBS, sintomatica o asintomatica. Essa costituisce pertanto un prerequisito importante per lo sviluppo di questa sindrome infettiva neonatale potenzialmente fatale (10). Una recente metanalisi ha stimato che, a livello globale, la colonizzazione da GBS, rilevata mediante analisi del tampone colturale vaginale e/o rettale, è riscontrata nel 18% delle donne gravide, con variazioni regionali che vanno dall'11% al 35% (11). La prevalenza tra le donne in gravidanza è stata stimata del 10-30% negli Stati Uniti, 28% nel Regno Unito e, nell'area nord-orientale dell'Italia, pari al 18%. La colonizzazione da GBS può essere continua o intermittente tra le donne in gravidanza e le donne non in gravidanza (5).

Il più frequente meccanismo patogenetico della GBS EOD è proprio la colonizzazione ascendente del comparto uterino da parte dello Streptococco di gruppo B presente nel tratto genitourinario e intestinale materno. A ciò fa seguito la colonizzazione e l'infezione invasiva del feto e/o l'aspirazione

fetale di liquido amniotico infetto. Questo meccanismo si verifica prevalentemente durante il travaglio nei neonati a termine, ma la tempistica della colonizzazione fetale è meno chiara in caso di neonati prematuri, per i quali l'infezione intra-amniotica potrebbe essere la causa della rottura precoce e prematura delle membrane (pPROM) e/o del parto pretermine (10). A causa della significativa rilevanza dal punto di vista clinico dello Streptococco Agalactiae, nel corso degli anni sono state studiate numerose strategie per prevenire e ridurre il rischio di malattia invasiva neonatale da GBS.

La prevenzione della malattia invasiva neonatale da GBS prevede, innanzitutto, l'identificazione delle donne colonizzate. L'ultima versione del 2020 delle raccomandazioni ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) sulla gestione dei neonati a rischio di malattia invasiva da GBS conferma la necessità di sottoporre a screening prenatale per la colonizzazione da GBS tutte le donne in gravidanza mediante l'esecuzione di tampone vagino-rettale tra la 36+0 e la 37+6 settimana di età gestazionale. Lo screening con tampone vagino-rettale è raccomandato anche per quelle donne con travaglio pretermine o con rottura precoce e prematura delle membrane (pPROM). Al contrario, esso non è necessario nel caso in cui la colonizzazione da GBS sia già stata confermata dall'urinocoltura (12).

La strategia fondamentale nella prevenzione della malattia invasiva da GBS è il ricorso alla profilassi antibiotica intrapartum (PAI). In assenza di PAI, infatti, circa il 50% dei neonati nati da madri colonizzate da GBS diventa a sua volta colonizzato dal microrganismo e, di questi, circa l'1-2% sviluppa la

sindrome clinica. La malattia invasiva da GBS a esordio precoce si verifica in neonati nati da madre con screening negativo in circa l'8% dei casi (5).

L'introduzione della PAI risale agli anni '90, mentre le prime linee guida ufficiali sono state pubblicate dalla ACOG nel 1996, seguite da ulteriori revisioni, di cui l'ultima nel 2020. In Italia, il Ministero della Salute ha adottato raccomandazioni simili, basate sulle evidenze internazionali, stabilendo protocolli per lo screening e la profilassi a partire dagli anni 2000. Dall'introduzione della PAI associata allo screening sistemico per GBS di tutte le donne in gravidanza, si stima che vi sia stata una riduzione dell'incidenza della malattia invasiva nei neonati di circa il 70-80%. Si ipotizza che la somministrazione di antibiotici prima del parto interrompa la trasmissione verticale di GBS secondo tre differenti modalità: 1) la PAI riduce temporaneamente la carica batterica di GBS a livello vaginale; 2) previene la colonizzazione delle superfici mucose del feto/neonato; 3) permette il raggiungimento di livelli di antibiotico nel circolo sanguigno neonatale superiori alla minima concentrazione inibitoria (MIC) relativa a GBS (12).

Le indicazioni alla Profilassi Antibiotica Intrapartum sono elencate nella Tabella 1.

Profilassi intrapartum indicata	Profilassi intrapartum non indicata
Screening colturale vagino-rettale per GBS positivo (fino a 5 settimane prima del parto)	Screening colturale vagino-rettale per GBS negativo
Batteriuria da GBS in qualsiasi trimestre della gravidanza (anche in caso di TC elettivo)	Taglio cesareo elettivo <ul style="list-style-type: none"> - In assenza di travaglio - A membrane integre - Indipendentemente dallo screening colturale
Precedente figlio con malattia invasiva da GBS	Precedente colonizzazione da GBS in precedente gravidanza ma senza malattia invasiva del neonato
Stato colturale per GBS non noto e ≥ 1 dei seguenti: <ul style="list-style-type: none"> - EG <37 settimane - PROM ≥ 18 ore - Febbre materna intrapartum $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - Colonizzazione da GBS in una gravidanza precedente 	

Tabella 1. Indicazione alla Profilassi Antibiotica Intrapartum (PAI).

(GBS: Streptococco di Gruppo B; EG: età gestazionale; PROM: rottura prolungata delle membrane).

Lo Streptococco di gruppo B mantiene una buona sensibilità agli antibiotici β -lattamici; la penicillina G e l'ampicillina sono gli antibiotici più studiati per la prevenzione dell'infezione neonatale da GBS. Entrambe hanno una farmacocinetica e farmacodinamica simili, raggiungendo un picco di concentrazione nel sangue cordonale dopo 1 ora e dopo 30 minuti, rispettivamente, dalla somministrazione alla madre. La penicillina G e l'ampicillina continuano, pertanto, a essere gli antibiotici di prima scelta per la PAI (12, 13, 14). Nelle donne allergiche alla penicillina con un basso rischio di anafilassi è raccomandato, invece, l'utilizzo di cefazolina, che presenta una farmacocinetica e un meccanismo d'azione analoghi a quelli dell'ampicillina. Al contrario, l'antibiotico di scelta raccomandato è la clindamicina in caso di donne con allergia alla penicillina ma con un elevato rischio di sviluppare anafilassi e che siano colonizzate da GBS con noto profilo di sensibilità alla clindamicina, in quanto GBS risulta essere sempre più resistente alla clindamicina, così come ai macrolidi, per esempio l'eritromicina. In caso di colonizzazione da GBS resistente alla clindamicina e di donne allergiche alla penicillina con alto rischio di anafilassi, è suggerito l'utilizzo di vancomicina (12). Dati recenti supportano l'utilizzo di clindamicina e vancomicina quali antibiotici di seconda scelta per la PAI in grado di fornire un certo grado di protezione contro l'infezione da GBS sia per la madre sia per il neonato qualora sia stata verificata la sensibilità dello *S. Agalactiae* nei confronti di tali molecole (15).

Per quanto riguarda l'efficacia della PAI, la farmacocinetica e farmacodinamica di penicillina, ampicillina e cefazolina suggeriscono che

essa sia ottimale dalle due alle quattro ore dopo la somministrazione materna. L'efficacia clinica delle diverse durate della PAI è stata valutata attraverso un'analisi di un insieme di dati contenente 7691 nascite, raccolti nel periodo compreso tra il 2003 e il 2004. In questo studio sono state confrontate diverse durate di somministrazione di penicillina o ampicillina (≥ 4 ore; 2-4 ore; < 2 ore prima del parto) rispetto all'assenza di profilassi intrapartum; nonostante tutti i differenti regimi di somministrazione della PAI siano risultati più efficaci rispetto alla non esecuzione della profilassi, la somministrazione dell'antibiotico ≥ 4 ore prima del parto è risultata la strategia più efficace nella prevenzione della GBS EOD. Questo studio supporta l'efficacia, pertanto, di ampicillina e penicillina se somministrate almeno 4 ore prima del parto (16). Per quanto riguarda la cefazolina, non ci sono dati specifici a proposito della sua efficacia nella profilassi intrapartum, tuttavia, essa possiede una farmacocinetica e un meccanismo d'azione battericida molto simili a quelli dell'ampicillina, tanto che la somministrazione di cefazolina è anch'essa considerata come capace di fornire adeguata profilassi contro la malattia invasiva da GBS. In merito alla clindamicina e alla vancomicina, invece, l'evidenza riguardante la loro efficacia clinica è più limitata; di conseguenza, la somministrazione di qualsiasi durata di tali molecole come PAI deve essere considerata come una profilassi non completamente adeguata nel percorso di stratificazione del rischio infettivologico neonatale (9).

1.4 Manifestazioni cliniche

L'esordio clinico della sepsi precoce è spesso subdolo e aspecifico, manifestandosi con una serie di segni e sintomi presenti in numerose e differenti condizioni cliniche. La malattia, tuttavia, può rapidamente evolvere dalla scarsità dei sintomi a una grave compromissione delle condizioni generali fino al decesso (1, 9).

I segni e sintomi della sepsi precoce insorgono, usualmente, entro le prime ore di vita; il 90% dei neonati affetti diventa sintomatico entro le prime 24 ore di vita. La EOS si può manifestare come batteriemia asintomatica, sepsi generalizzata, oppure come polmonite e/o meningite, associata ad alterazioni a carico della cute e della termoregolazione, disturbi metabolici, neurologici, respiratori, cardiocircolatori e gastrointestinali (**Tabella 2**).

Il più comune sintomo d'esordio è il distress respiratorio, la cui gravità può variare da una modesta tachipnea con gemito espiratorio, con o senza necessità di supplementazione di ossigeno, fino a un quadro di insufficienza respiratoria. Inoltre, l'esordio di EOS può essere accompagnato, talvolta, anche da ipertensione polmonare persistente (PPHN). Altri segni e sintomi, meno specifici, che possono essere presenti durante l'esordio di EOS sono irritabilità, iporeattività e letargia, scarsa perfusione periferica e ipotensione arteriosa, instabilità termica. Nei casi più gravi di sepsi precoce può, inoltre, instaurarsi un quadro di coagulazione intravascolare disseminata (CID) con comparsa di porpora e petecchie diffuse. L'esordio di EOS può accompagnarsi a sintomi gastrointestinali aspecifici, quali vomito, intolleranza alimentare, ileo paralitico. Infine, il coinvolgimento meningeo

può determinare la comparsa di sintomi neurologici quali letargia, iporeattività e convulsioni, ma potrebbe anche complicare un quadro di sepsi generalizzata in assenza di una evidente sintomatologia neurologica (1, 17).

Uno studio del 2015 ha descritto i segni clinici più suggestivi di esordio di sepsi. L'analisi di statistica descrittiva degli odds ratio (OR) ha dimostrato la massima correlazione con:

- Letargia;
- Pallore;
- Apnea e/o bradicardia;
- Iperperfusion periferica.

Si tratta di segni estremamente aspecifici e questo conferma la considerevole complessità diagnostica e la necessità di un monitoraggio attento nei neonati con fattori di rischio (18).

Alterazioni a carico della cute	<ul style="list-style-type: none"> • Colorito pallido/grigio • Ittero • Petecchie, porpora
Alterazioni della termoregolazione	<ul style="list-style-type: none"> • Febbre ($T \geq 38^{\circ}\text{C}$ per almeno 4 ore) o ipotermia ($T < 35^{\circ}\text{C}$) • Instabilità della temperatura corporea
Alterazioni del metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> • Ipoglicemia/iperglicemia • Acidosi metabolica
Disturbi del sistema nervoso centrale	<ul style="list-style-type: none"> • Ipotonia, iporeattività, torpore, letargia • Convulsioni • Fontanella anteriore tesa
Disturbi respiratori	<ul style="list-style-type: none"> • Apnea • Tachipnea ($\text{FR} \geq 60$ atti/min) • Dispnea
Disturbi cardiocircolatori	<ul style="list-style-type: none"> • Bradicardia ($\text{FC} < 100$ bpm) • Tachicardia ($\text{FC} \geq 160$ bpm) • Ipotensione arteriosa • Oliguria (diuresi $< 0,8$ ml/kg/h) • Capillary refill time ≥ 3 sec
Disturbi gastrointestinali	<ul style="list-style-type: none"> • Intolleranza alimentare, vomito • Ristagno gastrico biliare • Sanguinamento gastrointestinale • Distensione addominale

Tabella 2. Possibili manifestazioni cliniche d'esordio di EOS.

1.5 Diagnosi

La diagnosi di EOS è spesso difficoltosa, in quanto i segni e i sintomi clinici sono generalmente aspecifici e presenti anche in altre condizioni cliniche, sia patologiche sia parafisiologiche, che possono manifestarsi dopo la nascita. Inoltre, i test di laboratorio disponibili non sono sufficientemente sensibili e specifici per poter porre una diagnosi di certezza in tempi rapidi (17, 19).

L'emocoltura continua a essere considerata il gold standard per la conferma diagnostica di EOS e dovrebbe essere sempre eseguita prima di avviare il trattamento antibiotico empirico. L'emocoltura, tuttavia, pur rappresentando il gold standard per la diagnosi di EOS, presenta una percentuale di falsi negativi non trascurabile. L'elevato numero di falsi negativi è dovuto a diversi fattori, tra cui terapia antibiotica materna, scarso volume di sangue prelevabile, bassa o intermittente batteriemia, pretrattamento con antibiotici in particolare in quei neonati la cui madre ha ricevuto terapia antibiotica prima del parto. Se la batteriemia è bassa, si stima che più del 60% delle emocolture possa risultare falsamente negativa (1, 17, 19). L'esecuzione di due emocolture a tempi ravvicinati da due siti differenti prima di iniziare la terapia antibiotica aumenta la probabilità di identificare il microrganismo responsabile; tuttavia, ciò non è sempre possibile data la necessità di avviare tempestivamente un trattamento antimicrobico empirico in un neonato con sospetta sepsi. Dal punto di vista procedurale, l'emocoltura richiede una precisa e corretta modalità di esecuzione mediante la raccolta di un adeguato volume ematico, non inferiore a 1 ml, necessario proprio per ridurre la possibilità di falsi negativi in modo significativo. Infine, uno dei maggiori

limiti dell'emocoltura è rappresentato dai lunghi tempi di risposta; anche con i più moderni sistemi di coltura computerizzati, sono necessarie, infatti, almeno 48-72 ore per rilevare la positività della coltura (1, 17, 20).

Il neonato con sospetta EOS dovrebbe essere sottoposto a esami ematochimici, quali esame emocromocitometrico completo e markers infiammatori; la negatività di questi, tuttavia, non deve condizionare la decisione di avviare o meno la terapia antibiotica empirica quando vi è un forte sospetto clinico di sepsi, in quanto tali esami non sono sufficientemente sensibili e specifici.

Per quanto riguarda l'emocromo, la conta dei globuli bianchi (GB) totali e differenziali è comunemente utilizzata come parametro per valutare il neonato con sospetta EOS. Tuttavia, l'interpretazione dei valori di GB nel neonato è resa difficoltosa a causa delle variazioni dovute all'età gestazionale, l'età postnatale, la modalità del parto e le condizioni materne. Inoltre, la febbre materna, l'asfissia peripartum, la sindrome da aspirazione di meconio, lo pneumotorace e la malattia emolitica del neonato sono tutte condizioni associate a neutrofilia; al contrario, l'ipertensione gestazionale materna e la pre-eclampsia sono associate a neutropenia e trombocitopenia neonatale. A causa di tali elementi, l'interpretazione ottimale dei valori di GB nel predire il rischio di EOS deve tenere conto di tutte queste possibili fluttuazioni; inoltre, studi recenti suggeriscono l'esecuzione dell'emocromo solo dopo le prime ore di vita e la sua interpretazione deve essere inserita all'interno di un appropriato contesto clinico. Gli elementi dell'emocromo più predittivi del rischio di EOS sono la conta totale dei GB e la conta assoluta dei neutrofili

(absolut neutrophil count, ANC) quando bassi: un valore di GB totali inferiore a 5000/uL è considerato patologico, così come un valore di ANC <1000/uL. Al contrario, un numero di GB totali elevato (>20.000) nel neonato non è né preoccupante né rassicurante. Il rapporto neutrofili immaturi/neutrofili totali (rapporto I/T) >0,2 risulta maggiormente associato a EOS, specialmente se misurato da 1 a 4 ore dopo la nascita. Il riscontro di bassi valori di ANC associati a valori elevati di I/T risulta la combinazione dei componenti dei GB maggiormente predittiva di EOS (17, 21).

Le proteine di fase acuta, noti marcatori di infiammazione, come la proteina C-reattiva (PCR) e la procalcitonina (PCT), sono state valutate in numerosi studi come strumenti diagnostici da utilizzare nella valutazione del neonato con sospetta EOS.

La PCR rappresenta il marker sierologico di infezione più utilizzato; tuttavia, esistono numerose condizioni non infettive, quali la sindrome da aspirazione di meconio, insulti tissutali di natura ischemica o traumatica, febbre materna durante il travaglio, sofferenza fetale intra-partum o parto operativo con ventosa, che possono determinare un incremento dei valori di PCR. Un altro importante limite di tale test di laboratorio è dato dall'intervallo di tempo che intercorre tra l'esordio clinico della sepsi e l'elevazione dei livelli sierici di PCR; questi, infatti, tendono ad aumentare non prima di 6-8 ore dopo l'insorgenza dell'infezione. Di conseguenza, se la PCR risulta negativa all'esordio dei sintomi, essa deve essere ricontrollata a distanza di 12 ore e non deve costituire una controindicazione all'avvio della terapia antibiotica. Al contrario, un modesto rialzo dei valori di PCR, in assenza di segni clinici

di infezione, non rappresenta un fattore sufficiente per iniziare il trattamento antibiotico (1, 17, 19).

In uno studio riguardante l'utilità del dosaggio di un singolo valore di PCR a 18 ore di vita in neonati con sospetta sepsi, la sensibilità di un singolo valore di PCR per sepsi comprovata era del 64% (IC 95% 53-59) con un valore predittivo positivo di solo il 14% (IC 95% 11-17) (22). Tuttavia, se i valori di PCR misurati in modo seriato rimangono negativi, vi è una bassa probabilità di infezione con un valore predittivo negativo quasi del 100% (23).

Alla luce di queste considerazioni, il dosaggio precoce della PCR risulta poco utile nel processo decisionale relativo all'avvio della terapia antibiotica in caso di sospetta sepsi. Le linee guida britanniche NICE (National Institute for Health and Care Excellence) del 2021 raccomandano l'utilizzo del dosaggio seriato della PCR per determinare la durata dell'antibioticoterapia, mentre le linee guida dell'American Academy of Pediatrics (AAP) non suggeriscono questo atteggiamento (19).

Un altro marcatore infiammatorio studiato quale possibile marker affidabile e specifico per la sepsi precoce è la procalcitonina (PCT). Analogamente alla PCR, tuttavia, i livelli ematici di PCT iniziano ad aumentare circa 4-6 ore dopo l'esordio dell'infezione, possono continuare a incrementare fino a 48 ore dopo la nascita e possono alterarsi in molteplici condizioni cliniche. In uno studio multicentrico volto a valutare se l'iter diagnostico-terapeutico guidato dalla PCT potesse ridurre il ricorso a terapia antibiotica nei neonati con sospetta sepsi, gli autori hanno riscontrato una significativa riduzione della durata della terapia antibiotica e della degenza ospedaliera quando si

utilizzava la PCT come fattore decisivo per la sospensione degli antibiotici (24).

Questi studi suggeriscono che, se il neonatologo decide di valutare i livelli ematici dei markers infiammatori, questi dovrebbero essere misurati in modo seriato e a una tempistica più tardiva rispetto all'esordio dell'infezione (6-12 ore dopo). Inoltre, mentre la persistenza di valori di PCR e PCT nella norma risulta capace di fornire un certo grado di rassicurazione circa la sospensione dell'antibioticoterapia, esistono poche evidenze a sostegno della prosecuzione del trattamento antibiotico basata esclusivamente sulla presenza di livelli elevati di PCR e PCT, quando l'emocoltura risulta negativa e le condizioni cliniche del neonato migliorano (25, 26).

La puntura lombare per l'analisi chimico-fisica e colturale del liquor andrebbe presa in considerazione in ogni neonato con sospetta sepsi, in quanto la meningite accompagna la sepsi fino al 15% dei casi. L'esecuzione di altre indagini colturali, per esempio l'urinocoltura, non è indicata nel percorso diagnostico della EOS (17).

1.6 Stratificazione del rischio infettivo per sepsi precoce nei neonati asintomatici

Una delle principali sfide nella gestione della sepsi a esordio precoce riguarda i neonati asintomatici con fattori di rischio infettivologici. In tali casi, la preoccupazione per un possibile rapido deterioramento delle condizioni cliniche e per le conseguenze a lungo termine spesso spinge il clinico a somministrare terapie antibiotiche che non sono sempre necessarie. A questo

proposito, sono state sviluppate diverse strategie mirate a identificare con maggiore precisione i neonati con un effettivo ed elevato rischio infettivologico, per i quali è imprescindibile avviare il trattamento antimicrobico.

Ad oggi esistono fondamentalmente tre strategie per la stratificazione dei neonati asintomatici a rischio, ciascuna con vantaggi e svantaggi.

La strategia raccomandata dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC) del 2010 si basa su una valutazione categorica del rischio infettivo, secondo la quale è necessario avviare terapia antibiotica in tutti i neonati con segni clinici di sepsi o nati da madre con corioamnionite, anche solo sospetta, con temperatura materna intrapartum $\geq 38^{\circ}\text{C}$. Questa strategia, inoltre, raccomanda l'esecuzione di esami ematici di controllo nei neonati nati da madri che hanno ricevuto PAI incompleta e PROM ≥ 18 ore e/o EG < 37 settimane, mentre viene raccomandato un monitoraggio clinico di 48 ore nei neonati la cui madre ha ricevuto PAI incompleta senza ulteriori fattori di rischio. I limiti di questo approccio includono la mancanza di definizioni chiare per la clinica neonatale, la difficoltà nella diagnosi clinica di corioamnionite, una scarsa chiarezza sugli antibiotici intrapartum e l'assenza di chiare indicazioni su come agire in caso di alterazione degli esami di laboratorio del neonato.

Una seconda strategia considera un approccio multivariato mediante un modello matematico chiamato Neonatal Early-Onset Sepsis Calculator. Questo calcolatore, disponibile online (<https://neonatalespsiscalculator.kaiserpermanente.org/>), permette di stimare,

in base a sei fattori di rischio (incidenza locale di EOS, età gestazionale, temperatura materna intrapartum, durata della rottura delle membrane, tamponi vagino-rettali materni, tipo e durata della profilassi antibiotica intrapartum) e in base alla clinica neonatale, suddivisa in tre categorie (Figura 1 e 2); il rischio di sviluppare sepsi precoce e, dunque, la necessità di effettuare esami ematici e di iniziare il trattamento antibiotico empirico. Questa strategia viene raccomandata per neonati con EG ≥ 35 settimane e consente di stimare, attraverso dati oggettivi, il reale rischio di sviluppare EOS, indirizzando il clinico verso la gestione più appropriata. Gli svantaggi principali di questo sistema comprendono la necessità di aumentare la sorveglianza clinica del neonato e il fatto che la classificazione clinica del neonato in una delle tre categorie richiede, per essere indicata con precisione, un'osservazione clinica prolungata e continua dalla nascita di almeno 12 ore (12).

Predictor	Scenario
Incidence of Early-Onset Sepsis ⁺	<input type="text"/>
Gestational age ⁺	<input type="text"/> weeks <input type="text"/> days
Highest maternal antepartum temperature ⁺	<input type="text"/> Fahrenheit <input type="text"/>
ROM (Hours) ⁺	<input type="text"/>
Maternal GBS status ⁺	<input type="radio"/> Negative <input type="radio"/> Positive <input type="radio"/> Unknown
Type of intrapartum antibiotics ⁺	<input type="radio"/> Broad spectrum antibiotics > 4 hrs prior to birth <input type="radio"/> Broad spectrum antibiotics 2-3.9 hrs prior to birth <input type="radio"/> GBS specific antibiotics > 2 hrs prior to birth <input type="radio"/> No antibiotics or any antibiotics < 2 hrs prior to birth

Risk per 1000/births			
EOS Risk @ Birth	0.18		
EOS Risk after Clinical Exam	Risk per 1000/births	Clinical Recommendation	Vitals
Well Appearing	0.07	No culture, no antibiotics	Routine Vitals
Equivocal	0.88	No culture, no antibiotics	Routine Vitals
Clinical Illness	3.72	Empiric antibiotics	Vitals per NICU

Figura 1. I sei fattori di rischio considerati dal Neonatal Early-Onset Sepsis Calculator per la stima del rischio infettivologico.

Classification of Infant's Clinical Presentation	
Clinical Exam	Description
Clinical Illness	<ol style="list-style-type: none"> Persistent need for NCPAP / HFNC / mechanical ventilation (outside of the delivery room) Hemodynamic instability requiring vasoactive drugs Neonatal encephalopathy /Perinatal depression <ul style="list-style-type: none"> Seizure Apgar Score @ 5 minutes < 5 Need for supplemental O₂ ≥ 2 hours to maintain oxygen saturations > 90% (outside of the delivery room)
Equivocal	<ol style="list-style-type: none"> Persistent physiologic abnormality ≥ 4 hrs <ul style="list-style-type: none"> Tachycardia (HR ≥ 160) Tachypnea (RR ≥ 60) Temperature instability (≥ 100.4°F or < 97.5°F) Respiratory distress (grunting, flaring, or retracting) not requiring supplemental O₂ Two or more physiologic abnormalities lasting for ≥ 2 hrs <ul style="list-style-type: none"> Tachycardia (HR ≥ 160) Tachypnea (RR ≥ 60) Temperature instability (≥ 100.4°F or < 97.5°F) Respiratory distress (grunting, flaring, or retracting) not requiring supplemental O₂ <p>Note: abnormality can be intermittent</p>
Well Appearing	No persistent physiologic abnormalities

Figura 2. Clinica neonatale suddivisa nelle tre categorie in base all'esame obiettivo secondo il Neonatal Early-Onset Sepsis Calculator.

La terza strategia per la stratificazione del rischio è basata unicamente sulle condizioni cliniche del neonato e si attua mediante l'esecuzione di esami fisici seriatati ogni 6-8 ore nelle prime 48 ore di vita del bambino (Serial Physical Examination – PSE). La presenza di buone condizioni cliniche alla nascita in un neonato a termine riduce il rischio di sviluppare EOS del 60-70% (27). La terapia antibiotica dovrebbe essere somministrata ai neonati che manifestano sintomi di infezione già alla nascita o che li sviluppano entro le prime 48 ore di vita. Secondo questa strategia, i bambini nati da madri con PAI incompleta, inadeguata o assente o con temperatura intrapartum $\geq 38^{\circ}\text{C}$ dovrebbero essere strettamente monitorati clinicamente per 36-48 ore, al fine di individuare precocemente possibili segni clinici di malattia. Questa raccomandazione è valida per i neonati con EG ≥ 35 settimane (12). Questo approccio sembra essere quello in grado di ridurre maggiormente il ricorso a esami di

laboratorio e a terapie antibiotiche non necessari; tuttavia, gli svantaggi sono la difficoltà a garantire valutazioni cliniche neonatali seriate, strutturate e documentate e la necessità di sviluppare criteri chiari per la definizione di sintomi patologici. Inoltre, le frequenti valutazioni mediche del neonato possono essere variamente accettate dalla famiglia e aumentare il costo assistenziale dei neonati sani (4).

Per quanto riguarda i neonati nati con EG <35 settimane, le linee guida dell'AAP del 2020 distinguono pazienti ad alto rischio e neonati a basso rischio.

I neonati con EG <35 settimane ad alto rischio infettivo comprendono quelli nati pretermine a causa di insufficienza cervicale, avvio di travaglio prematuro, rottura prematura delle membrane, infezione intra-amniotica, e insorgenza improvvisa o inspiegata di uno stato fetale non rassicurante. In questi casi viene raccomandata alla nascita l'esecuzione di esami ematici ed emocoltura e l'avvio di terapia antibiotica, nonostante una PAI completa e adeguata. Inoltre, se il sospetto di EOS è molto forte, dovrebbe essere effettuata anche una puntura lombare per l'analisi chimico-fisica e colturale del liquor cefalorachidiano.

Il basso rischio infettivologico per i neonati pretermine <35 settimane si configura, invece, in caso di parto prematuro per motivi materni o fetali (es. pre-eclampsia, ritardo/arresto di crescita fetale intrauterina), parto mediante taglio cesareo in assenza di travaglio, e la rottura delle membrane prima del parto. In questi casi, se non è stata somministrata adeguatamente la profilassi antibiotica intrapartum, dovranno essere eseguiti esami ematici e il neonato

dovrà ricevere terapia antibiotica empirica. Al contrario, se la PAI è stata completa, il neonato non dovrebbe essere trattato in assenza di segni e sintomi clinici di sepsi o di febbre materna intrapartum (12).

1.7 Terapia della Sepsi Neonatale a Esordio Precoce

In caso di sospetto clinico di sepsi precoce, deve essere tempestivamente avviata, previa esecuzione di esami ematici ed emocoltura, una terapia antibiotica empirica endovenosa. Nel caso della EOS, è necessario utilizzare molecole antimicrobiche che siano attive contro i cocchi gram-positivi, specialmente il GBS, altri streptococchi, la *Listeria monocytogenes* ed enterobatteri gram-negativi come l'*Escherichia Coli*.

È raccomandato l'utilizzo di una combinazione di due antibiotici: la terapia di scelta è l'associazione di ampicillina + aminoglicoside (usualmente, gentamicina). La combinazione di tre antibiotici (ampicillina + aminoglicoside + cefalosporina di III generazione) è raccomandato nel caso di meningite o di grave peggioramento delle condizioni cliniche.

Le cefalosporine di III generazione (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) sono efficaci contro il GBS, l'*Escherichia Coli* e altri enterobatteri gram-negativi, mentre nessuna di esse è attiva contro la *Listeria* (sensibile ad ampicillina) e gli enterococchi (sensibili ad ampicillina e vancomicina). Queste molecole non devono essere utilizzate come terapia antibiotica empirica, se non in caso di meningite, poiché il loro utilizzo favorisce lo sviluppo di ceppi gram-negativi multiresistenti nelle Neonatologie e nelle

Terapie Intensive Neonatali (TIN); inoltre, è stata dimostrata anche una correlazione tra il loro utilizzo e infezioni sistemiche da Candida nelle TIN.

Dopo l'avvio della terapia antibiotica empirica, il neonato migliora dal punto di vista clinico generalmente nell'arco di 24-48 ore e i parametri di laboratorio tendono a normalizzarsi entro 72 ore.

La terapia antibiotica deve essere proseguita per almeno 10-14 giorni in caso di sepsi con emocoltura positiva e in assenza di localizzazioni d'organo, scegliendo l'antibiotico più adatto in base all'antibiogramma; in caso di meningite, invece, la durata dell'antibioticoterapia deve essere di almeno 21 giorni.

In caso di negatività delle colture (emocoltura, liquorcoltura), la terapia antimicrobica viene proseguita in base alle condizioni cliniche del neonato e in base alla persistenza di segni/sintomi di sepsi, con o senza alterazione degli indici di flogosi. Se il neonato presenta buone condizioni cliniche generali, infatti, è consigliato interrompere la somministrazione della terapia, evitandone la prosecuzione con il solo scopo di normalizzare i parametri di laboratorio. Infatti, se il sospetto di sepsi non è confermato dai dati clinici e dagli esami colturali e di laboratorio, è ragionevole sospendere il trattamento antimicrobico dopo 48-72 ore dal suo avvio.

In tutti i casi di EOS sostenuti da patogeni atipici, particolarmente resistenti o con sede primaria di difficile eradicazione, è consigliato il consulto con uno specialista infettivologo (1, 9, 17).

Il successo della terapia antibiotica dipende da molti fattori, tra cui la tempestività dell'intervento, le condizioni cliniche del neonato, la durata della positività delle emocolture e l'estensione della malattia.

1.8 Criticità dell'utilizzo precoce della terapia antibiotica

La terapia antibiotica empirica nei neonati a rischio o con sospetta EOS rappresenta la principale causa dell'utilizzo di antibiotici in età precoce. La percentuale di neonati che riceve terapia antimicrobica è stimata intorno al 32-45% (9, 28). In particolare, alcuni studi condotti nell'Unione Europea stimano che circa l'8% dei neonati venga trattato inappropriatamente con antibiotici (29). La somministrazione di antibiotici possiede sicuramente dei benefici, ma, se impiegati in neonati non infetti, può comportare anche dei rischi, come il possibile sviluppo di conseguenze avverse come l'enterocolite necrotizzante, le infezioni fungine o l'exitus. Inoltre, l'estensiva somministrazione di antibiotici esita nell'emergenza di patogeni multiresistenti e incide fortemente sulla spesa sanitaria (28, 30). In particolare, il frequente ricorso a terapia antibiotica empirica con ampicillina e gentamicina nel sospetto di EOS ha fatto sì che un numero crescente di GBS e soprattutto di Escherichia Coli sviluppasse resistenze nei confronti di queste classi di antibiotici; questo evento minaccia l'efficacia della terapia antibiotica tradizionale e aumenta i rischi correlati allo sviluppo della sepsi. Inoltre, la diffusione a livello mondiale di Enterobacteriaceae ESBL-produttrici rappresenta una sfida emergente per il management delle sepsi

neonatali. Globalmente, si stima che ogni anno circa 200.000 decessi neonatali siano da attribuire a patogeni resistenti (31).

Oltre al fenomeno delle crescenti resistenze microbiche, negli ultimi anni molti studi hanno sottolineato come la terapia antibiotica precoce possa alterare il corretto sviluppo del microbiota.

Il microbiota umano consiste nell'insieme dei microrganismi che convivono con l'organismo umano senza danneggiarlo, in condizioni di normale funzionamento del sistema immunitario; la maggior parte di questi microrganismi risiede nell'intestino ed è fondamentale per il corretto funzionamento del sistema digerente. La formazione del microbiota è un evento dinamico e delicato che ha luogo nei primi mille giorni di vita, ossia dal concepimento fino ai due anni d'età. Gli avvenimenti che si verificano in questo periodo stanno emergendo come fattori cruciali nel plasmare lo stato di salute futuro di ciascun individuo.

Le origini del microbiota non sono del tutto note, ma sono molti gli elementi che influenzano la sua formazione: l'età gestazionale, le modalità di espletamento del parto, il tipo di alimentazione, l'ambiente esterno e la terapia antibiotica. (Figura 3). Quest'ultima, in particolare, è responsabile di una riduzione della biodiversità del microbiota, fenomeno che prende il nome di dismicrobismo. Queste alterazioni dell'ecosistema intestinale sono state correlate con lo sviluppo di varie condizioni patologiche il cui filo conduttore sembrerebbe essere la perturbazione nella maturazione del sistema immunitario (32, 33, 34, 35).

In particolare, il dismicrobismo intestinale secondario alla somministrazione di terapia antibiotica precoce è risultato correlato allo sviluppo in età pediatrica di patologie allergiche (asma, eczema e rinite allergica), malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), obesità, disturbi stress-correlati e disturbi dello spettro autistico (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

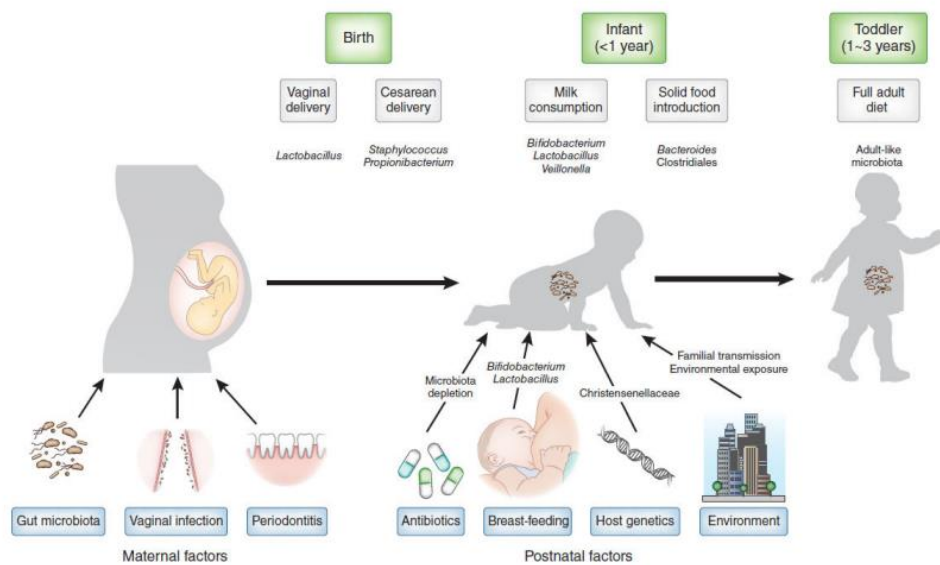


Figura 3. Fattori influenzanti la formazione del microbiota neonatale (34).

2. L'esame microscopico della placenta

2.1 Anatomia della placenta

La placenta è stata denominata, in maniera estremamente appropriata, “il diario della vita gestazionale”. Questa, infatti, non rappresenta soltanto una cartina tornasole dell'ambiente intrauterino, ma può anche fornire rilevanti informazioni riguardo alle eventuali complicanze insorte nel post-partum e alle ripercussioni di queste sul neonato. Pertanto, l'esame istologico della placenta ha una valenza fondamentale nel monitoraggio e nella gestione del neonato a rischio. Comprensibilmente, non è possibile esaminare ogni placenta; perciò, è importante chiarire quali siano le circostanze che rendono l'esame istologico indispensabile. Nel 1997 il College of American Pathologist ha stilato un preciso elenco di indicazioni all'esecuzione dell'esame anatomopatologico della placenta al fine di aiutare i clinici a richiederlo in maniera appropriata. Tuttavia, l'esame non è ancora entrato a tutti gli effetti nella pratica clinica routinaria. Tra le numerose indicazioni, ritroviamo quelle condizioni che si configurano come rilevanti fattori di rischio infettivologico, di pertinenza sia materna sia fetale/neonatale (42).

La placenta è un organo vitale che si sviluppa durante la gravidanza e funge da interfaccia tra madre e feto. Anatomicamente, è composta da due principali componenti, una di origine materna e una di origine fetale.

La parte materna è chiamata decidua, deriva dalla mucosa uterina (endometrio secretorio), adiacente al miometrio, e costituisce la porzione basale della placenta, attraversata dalle arterie spiraliformi che trasportano il sangue materno verso lo spazio intervilloso.

La parte fetale è costituita dal piatto coriale. Questo è rivestito dall'amnios, ossia una membrana sottile e trasparente formata da un epitelio monostratificato e uno strato di tessuto connettivo mesenchimale; che l'amnios avvolge l'embrione e il feto durante la gravidanza, formando il sacco amniotico contenente il liquido amniotico. Un'altra membrana presente è il corion, che origina dalle cellule trofoblastiche e dal mesoderma extraembrionale e che risulta fondamentale per l'ancoraggio della placenta all'utero e per il suo sviluppo; esso, inoltre, presenta le villosità coriali, estensioni che penetrano nella decidua attraverso lo spazio intervilloso e che permettono, aumentando la superficie di contatto tra la placenta e la decidua materna, lo scambio di nutrienti, gas e prodotti di scarto tra il sangue materno e quello fetale. Al margine placentare l'amnios e il corion si fondono formando le membrane amniocoriali libere (43).

Sul versante fetale del piatto coriale si trova il cordone ombelicale: esso si inserisce usualmente sul piatto coriale in una posizione leggermente eccentrica, anch'esso ricoperto dall'amnios. Ha una lunghezza media compresa tra 55 e 65 cm e un colore bianco traslucido, quasi madreperlaceo. Al suo interno decorrono i tre vasi ombelicali: due arterie, che drenano il sangue venoso refluo dalla circolazione fetale, e la vena che trasporta il sangue arterioso dalla placenta al feto. Le tre strutture vascolari sono immerse in uno spesso strato di tessuto connettivo lasso, ricco di glicosaminoglicani (GAG) e acido ialuronico che conferisce loro un'importante protezione meccanica, denominato gelatina di Wharton. (Figura 4).

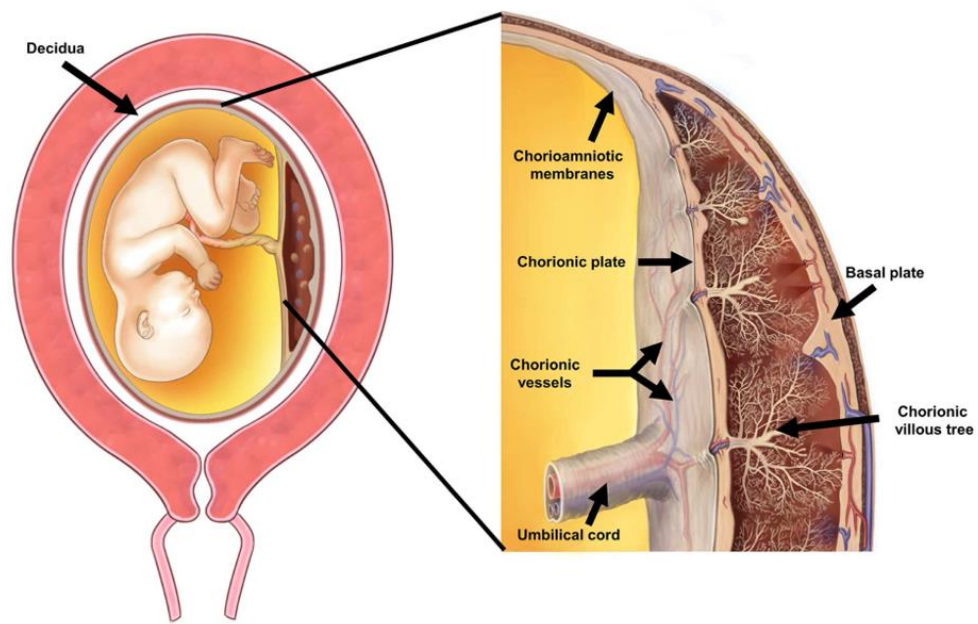


Figura 4. Anatomia dell'utero durante la gestazione e anatomia della placenta (44).

2.2 Corioamnionite acuta

La corioamnionite acuta è un'infezione delle membrane amniotiche e del liquido amniotico. Essa rappresenta una delle più frequenti diagnosi istologiche nei referti di patologia placentare ed è solitamente considerata espressione di un'infezione intra-amniotica in atto. L'infezione viene solitamente acquisita per via ascendente ed è causata da microrganismi che colonizzano il tratto genito-urinario materno e che invadono la cervice uterina e l'utero. Altre potenziali sedi di origine dell'infezione intra-uterina includono l'endometrio e una diffusione per contiguità dalle tube di Falloppio, dalla vescica, dall'appendice o dall'intestino. Dati sperimentali ed epidemiologici suggeriscono che i batteri, in alcuni rari casi, possano raggiungere la decidua per via ematogena.

Tuttavia, la corioamnionite acuta può essere riscontrata istologicamente anche nel contesto di una cosiddetta infiammazione intra-amniotica “sterile”, ossia in assenza di microrganismi identificabili; in questi casi, lo stato infiammatorio viene indotto da segnali di pericolo rilasciati durante condizioni di stress, danno o morte cellulare (45, 46). Di conseguenza, la corioamnionite acuta non è necessariamente espressione di infezione intra-amniotica, ma piuttosto la manifestazione di una infiammazione intra-amniotica, che costituisce la risposta materna a stimoli infiammatori di diversa natura. Nonostante siano due terminologie frequentemente utilizzate in modo intercambiabile, l'infezione intra-amniotica e la corioamnionite acuta rappresentano due condizioni distinte. Per questa ragione alcuni autori e il National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) hanno proposto di sostituire il termine corioamnionite acuta con il concetto di “Intrauterine Inflammation or Infection or both” abbreviabile in “Tripla I” (47).

Il termine corioamnionite acuta, inoltre, viene comunemente utilizzato da ginecologi e ostetrici per descrivere una sindrome clinica, caratterizzata dalla combinazione di febbre materna ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), tachicardia materna e/o fetale, dolore uterino, liquido amniotico torbido e/o maleodorante, spesso associata all'evidenza di “corioamnionite acuta” all'esame microscopico della placenta. Per distinguere le due condizioni, alcuni autori preferiscono utilizzare il termine "corioamnionite clinica" per riferirsi alla sindrome clinica, riservando l'espressione "corioamnionite acuta" per indicare la diagnosi istologica relativa alla placenta (44).

La corioamnionite acuta o infiammazione intra-uterina, pertanto, implica la presenza di un disordine infiammatorio o infettivo che coinvolge il corion, l'amnion o entrambi. Questa condizione espone sia la madre sia il feto a un rischio aumentato di sviluppare gravi conseguenze e complicanze cliniche. In particolare, la corioamnionite acuta è spesso associata a una rottura prematura delle membrane. Essa, infatti, è responsabile di circa il 40-70% delle nascite pretermine, con un'incidenza maggiore quanto più è bassa l'età gestazionale. In uno studio condotto sull'analisi di 7505 placenti da gravidanze singole con parto dopo la 20^a settimana di gestazione, la frequenza di corioamnionite acuta nelle pazienti con parto prematuro tra la 21^a e la 24^a settimana era del 94.4% (48).

2.3 Funisite acuta

Il processo infiammatorio può estendersi dalle membrane corioamniotiche al cordone ombelicale; in questo caso, si parla di funisite acuta, che rappresenta la controparte fetale della risposta infiammatoria intra-amniotica.

La risposta infiammatoria materna e quella fetale sono due fenomeni strettamente correlati: dapprima si instaura la risposta infiammatoria materna con lo sviluppo della corionamnionite; successivamente, se l'infezione persiste, si scatena anche la risposta infiammatoria fetale (FIR). È noto che la funisite rappresenta il segno istologico distintivo di uno stato infiammatorio sistemico fetale, detto sindrome da risposta infiammatoria fetale (FIRS). La FIRS è una condizione patologica che può verificarsi durante la gravidanza, generalmente proprio in seguito a infezioni o infiammazioni materne.

L'individuazione istologica della flogosi delle membrane e del funicolo è, pertanto, essenziale poiché le ripercussioni neonatali possono essere gravi (49).

Un interessante studio del 2019 correla fortemente la presenza di funisite acuta con lo sviluppo di outcomes neonatali scadenti. Questo lavoro dimostra come l'intensità della risposta infiammatoria fetale (FIR) e l'incidenza della sindrome da risposta infiammatoria fetale (FIRS) aumentino in base all'entità dell'infiammazione nel cordone ombelicale e come la frequenza delle sepsi neonatali a esordi precoce (EOS) aumenti in maniera proporzionale all'incremento dell'infiammazione nel cordone ombelicale. La principale implicazione clinica di questo aspetto è data dal fatto che lo sviluppo di EOS è molto più probabile quando è presente, a livello istologico, una funisite acuta avanzata con estesa infiltrazione leucocitaria (50).

2.4 Lesioni istologiche infiammatorie acute della placenta

Le lesioni infiammatorie acute della placenta sono caratterizzate, a livello microscopico, dall'infiltrazione di leucociti neutrofilici nel disco placentare, nelle membrane amniotiche e nel cordone ombelicale. In particolare, quando l'infiammazione coinvolge l'amnion e il corion si parla di corioamnionite acuta; al contrario, se coinvolge i villi coriali, si definisce villite acuta (44).

Dal punto di vista istologico, esistono una risposta infiammatoria materna e una risposta infiammatoria fetale. Poiché la decidua è di origine materna, mentre le membrane amniotiche e i villi coriali sono di derivazione fetale, la precisa origine del processo infiammatorio placentare (materno o fetale) può

essere determinata in base alla provenienza dei neutrofili che invadono la placenta stessa.

I leucociti neutrofili non sono normalmente presenti nelle membrane amniotiche e coriali; si ritiene che essi migrino dalla decidua verso le membrane fetali nei casi di corioamnionite. D'altra parte, i neutrofili sono generalmente presenti nella circolazione sanguigna materna fetale a livello dello spazio intervilloso (Figura 5; Figura 6); in seguito al rilascio di agenti chemiotattici da parte dell'agente infettivo o del processo infiammatorio, i neutrofili vengono attratti verso la cavità amniotica e migrano progressivamente dallo spazio intervilloso attraverso gli strati connettivi del corion e dell'amnios e nel liquido amniotico. Di conseguenza, l'infiammazione del disco corionico esprime la risposta infiammatoria materna. Infatti, i leucociti neutrofili riscontrati nei casi di corioamnionite acuta sono di origine materna.

L'infiammazione del cordone ombelicale e dei vasi sanguigni del disco corionico della placenta è, al contrario, di origine fetale. La prima manifestazione della risposta infiammatoria fetale è la migrazione di neutrofili fetali verso la vena ombelicale (flebite del funicolo) e dei vasi corionici; successivamente, l'infiammazione e la migrazione dei neutrofili si estendono verso le arterie ombelicali (arterite ombelicale). Negli stadi più avanzati, infine, l'infiltrazione neutrofila si estende anche alla gelatina di Wharton. Con il progredire del danno infiammatorio, i neutrofili vanno incontro a necrosi, determinando la formazione di bande necrotiche lungo i vasi del funicolo. L'infiammazione del cordone ombelicale è spesso

segmentaria e, solitamente, viene riscontrata solamente in alcune sezioni, spesso in prossimità del feto. L'intensità della risposta infiammatoria ha un'importante associazione con i possibili esiti avversi sul feto (44) (Figura 7). Nella corioamnionite, gli infiltrati infiammatori sono solitamente confinati nelle membrane fetali e nel cordone ombelicale. Il parenchima placentare non è, invece, coinvolto, a meno che dalla setticemia fetale non derivi secondariamente una villite.

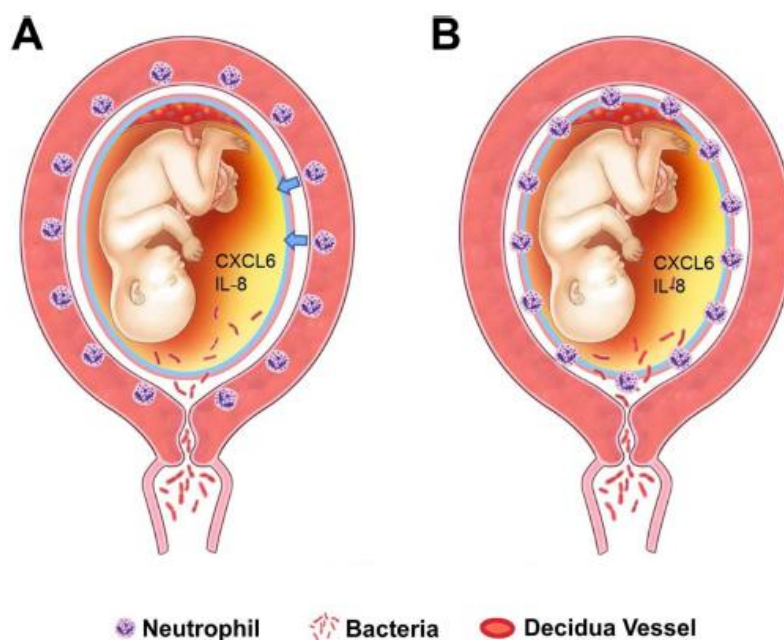


Figura 5. Differenti stimoli chemiotattici guidano la migrazione dei neutrofili. (A) In seguito all'incremento della concentrazione intra-amniotica di chemochine, quali IL-8 e CXCL6, i neutrofili migrano con tropismo per il tessuto amniotico. (B) Conseguentemente, i neutrofili materni infiltrano le membrane corioamniotiche partendo dai vasi sanguigni della decidua (44).

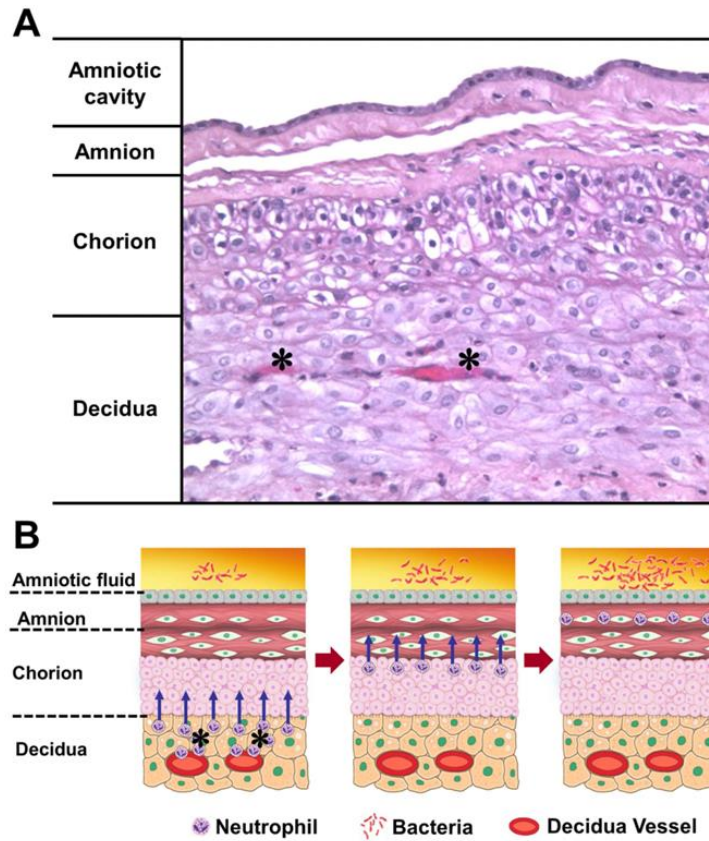


Figura 6. Migrazione dei neutrofili dai vasi sanguigni della decidua verso le membrane amniotiche. (A) Normale istologia delle membrane amniotiche, costituite da amnion e corion. La decidua è adiacente al corion e contiene capillari materni (asterisco nero). I neutrofili migrano dalla circolazione sanguigna materna in risposta a stimoli chemiotattici (aumentata concentrazione di chemochine nel liquido amniotico). (B) Progressione dei neutrofili dai vasi sanguigni della decidua (in rosso) verso l'amnion. All'inizio i leucociti si accumulano a livello dell'interfaccia decidua-corion (B; sinistra); in seguito, invadono il corion (B, centro) e l'amnion (B, destra) (44).

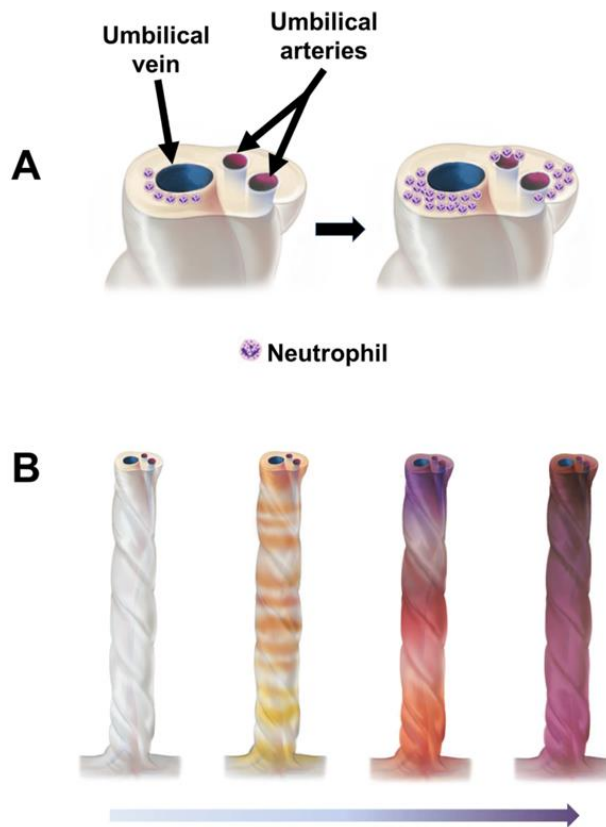


Figura 7. Progressione del processo infiammatorio nel cordone ombelicale. (A) Usualmente, la funisite acuta inizia come infiammazione della vena ombelicale (flebite ombelicale), seguita da coinvolgimento delle arterie ombelicali (arterite ombelicale). (B) Progressione dell'infiammazione attraverso la lunghezza del funicolo ombelicale. La fase iniziale è multifocale, come dimostrato dalle righe gialle/arancioni nella seconda immagine da sinistra. Successivamente, le aree di infiammazione confluiscono sempre più, e la funisite coinvolge l'intero cordone ombelicale (44).

2.5 Classificazione istologica della corioamnionite acuta e della funisite

– staging e grading

Numerosi sistemi di classificazione per la definizione dello stadio e del grado della corioamnionite acuta sono stati proposti negli anni. Il sistema più utilizzato è quello proposto da Redline et al. nel 2003 e successivamente recepito dall'Amsterdam Consensus Conference del 2016 (51, 52).

Questa classificazione prevede la determinazione di stadio e grado. Il termine “stadio” descrive la progressione e l'estensione della flogosi in base alla regione anatomica infiltrata dai leucociti neutrofili. Il “grado”, invece, esprime l'intensità della risposta infiammatoria acuta in una particolare area. Questo sistema classificativo si applica sia alla corioamnionite sia alla funisite, come descritto nelle Tabelle 3 e 4.

Per quanto riguarda la corioamnionite, secondo l'Amsterdam Consensus Group, lo stadio 1 rappresenta un indicatore precoce e sensibile di infezione, mentre gli stadi 2-3 si riferiscono alla corionamnionite vera e propria. Nella corioamnionite di grado 2, i microascessi si localizzano generalmente tra il corion e la decidua, e/o al di sotto del disco corionico (52).

CORIOAMNIONITE - STADIO	
<p><u>STADIO 1</u></p> <p><i>Subcorionite o corionite acuta</i></p>	<p>Accumuli di neutrofili a chiazze nella fibrina subcorionica e/o nel trofoblasto membranoso</p>
<p>STADIO 2</p> <p><i>Corioamnionite acuta</i></p>	<p>Estensione dei neutrofili nel corion fibroso e/o nell'amnion</p>
<p>STADIO 3</p> <p><i>Corioamnionite necrotizzante</i></p>	<p>Carioressi dei leucociti neutrofili, necrosi degli amniociti e/o ipereosinofilia della membrana basale dell'amnion</p>
CORIOAMNIONITE - GRADO	
<p>GRADO 1</p> <p><i>Corioamnionite lieve-moderata</i></p>	<p>Presenza di piccoli cluster di neutrofili materni, infiltranti in maniera diffusa il foglietto corionico, il piatto corionico, o l'amnion</p>
<p>GRADO 2</p> <p><i>Corioamnionite grave</i></p>	<p>Presenza di tre o più microascessi subcorionici, definiti dalla confluenza di neutrofili con una dimensione di almeno 10x20 cellule</p>

Tabella 3. Classificazione istologica della corioamnionite acuta.

FUNISITE - STADIO	
<p><u>STADIO 1</u></p> <p><i>Vasculite cronica/flebite ombelicale</i></p>	<p>L'infiltrato infiammatorio di neutrofili coinvolge la vena ombelicale</p>
<p>STADIO 2</p> <p><i>Vasculite ombelicale</i></p>	<p>L'infiltrato infiammatorio coinvolge la vena ombelicale e una o entrambe le arterie ombelicali</p>
<p>STADIO 3</p> <p><i>Funisite necrotizzante</i></p>	<p>Neutrofili, detriti cellulari e precipitati eosinofili organizzati a banda o ad anello attorno ai vasi del cordone e infiltranti anche la gelatina di Wharton</p>
FUNISITE - GRADO	
<p>GRADO 1</p> <p><i>Funisite lieve-moderata</i></p>	<p>Pochi neutrofili sparsi in sede subendoteliale o intramurale dei vasi ombelicali</p>
<p>GRADO 2</p> <p><i>Funisite grave</i></p>	<p>Aggregati di neutrofili confluenti associati a degenerazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi ombelicali.</p>

Tabella 4. Classificazione istologica della funisite acuta.

2.6 L'esame al congelatore della placenta

L'esame al congelatore è una tecnica diagnostica utilizzata in ambito anatomopatologico per preservare e analizzare campioni biologici, in particolare tessuti, a basse temperature. Questa metodologia consente di mantenere intatte le caratteristiche cellulari e molecolari del campione, facilitando studi istologici e biologici. La congelazione rapida, infatti, riduce al minimo i danni cellulari, permettendo un'analisi accurata delle strutture tissutali e delle eventuali alterazioni patologiche. Utilizzato in vari ambiti, dalla ricerca alla diagnostica clinica, l'esame al congelatore è fondamentale per identificare condizioni patologiche e valutare risposte terapeutiche, offrendo un'importante risorsa nella medicina moderna.

L'esame macroscopico e microscopico della placenta è in grado di fornire importanti informazioni circa lo stato di salute sia della madre sia del neonato, con un conseguente rilevante impatto sul percorso diagnostico-terapeutico di entrambi. Nell'ambito delle sepsi a esordio precoce, può aiutare a valutare il reale rischio infettivo perinatale del neonato e la necessità di effettuare una terapia antibiotica empirica precoce. L'esame microscopico, infatti, analizzando il tessuto placentare, consente di identificare i segni di infezione e infiammazione, in particolare la presenza di funisite (espressione di una risposta infiammatoria fetale attiva), che possono indicare una trasmissione verticale di patogeni dalla madre al neonato.

L'esame microscopico convenzionale della placenta fornisce numerose importanti informazioni cliniche; tuttavia, il suo limite principale è costituito dai lunghi tempi di esecuzione, necessari e non accorciabili per motivi tecnici:

esso, infatti, non è generalmente disponibile prima di 3-4 giorni; pertanto, non risulta utile nell'obiettivo di aiutare nelle scelte terapeutiche in caso di sospetta infezione perinatale.

L'esame microscopico al congelatore della placenta supera questo problema, in quanto garantisce una risposta rapida entro poche ore. Analizzando campioni costituiti da sottili sezioni delle membrane extraplacentari (corion e amnion) e del cordone ombelicale, congelati a fresco, permette di stabilire la presenza e l'intensità della risposta infiammatoria fetale in maniera oggettiva, contribuendo così a comprendere meglio le dinamiche patologiche che precedono l'insorgenza della sepsi (53). In questo modo, potrebbe fornire utili indicazioni aggiuntive per la gestione clinica dei neonati a rischio di EOS, soprattutto nella popolazione di neonati asintomatici/paucisintomatici, aiutando nella stratificazione dei neonati a rischio di infezione perinatale. Come conseguenza, potrebbe aiutare identificare meglio i neonati con un reale e maggiore rischio infettivo, con il possibile vantaggio di ridurre la quantità di esami di laboratorio, risparmiando, quindi, procedure dolorose e invasive al neonato, e il ricorso a terapie antibiotiche precoci spesso non necessarie. Come conseguenza, questo consentirebbe, inoltre, di contenere i costi sanitari della struttura ospedaliera.

L'esame microscopico al congelatore della placenta ha dimostrato una buona specificità e sensibilità e un buon tasso di concordanza con l'esame istologico definitivo della placenta. In uno studio condotto su 59 neonati, non si è verificato nessun caso di falso negativo riguardo l'identificazione della

funisite; infatti, l'esame al congelatore non ha mancato nessuna diagnosi di funisite quando confrontato con l'esame microscopico definitivo (54).

Uno dei limiti della metodica è dato dalla possibile presenza di artefatti dovuti al congelamento e al taglio dei campioni di tessuto congelato. In questo studio, infatti, l'unico caso di discordanza tra il risultato dell'esame al criostato e l'esame definitivo è derivato da un errore di valutazione istologica dovuto ad artefatti da congelamento, per cui la presenza di funisite non è stata confermata alla valutazione istologica definitiva.

Dal punto di vista tecnico e pratico, l'analisi dei campioni prevede l'identificazione di leucociti neutrofili nelle membrane amniotiche e nel cordone ombelicale. L'identificazione della risposta infiammatoria in queste strutture non risulta, pertanto, particolarmente complessa e può essere effettuata anche al di fuori di centri specializzati. È sufficiente, infatti, la conoscenza dei criteri classificativi istologici per la definizione di corioamnionite e funisite per permettere l'interpretazione dell'esame anche da parte di anatomopatologi non specializzati nella patologia feto-placentare (54).

Tutte queste caratteristiche fanno sì che l'esame istologico al congelatore della placenta possa costituire un valido ausilio diagnostico che, insieme alla valutazione dei fattori rischio infettivi, all'esame clinico e al risultato degli esami di laboratorio, consente di guidare meglio il neonatologo nel percorso diagnostico-terapeutico dei neonati con sospetta sepsi precoce.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è la valutazione dell'esame al congelatore della placenta come ausilio diagnostico nella gestione dei neonati con fattori di rischio per sepsi neonatale a esordio precoce.

Pazienti e metodi

Criteri di inclusione

Sono stati inclusi nello studio i neonati nati nel periodo compreso tra gennaio 2022 e agosto 2024 presso la U.O. Neonatologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova con fattori di rischio infettivologico per i quali è stato richiesto l'esame al microtomo congelatore della placenta come strumento diagnostico aggiuntivo nella valutazione del rischio di sviluppo di sepsi a esordio precoce (EOS).

Le indicazioni per la richiesta e l'invio dell'esame urgente al congelatore della placenta considerate nello studio sono quelle descritte nella relativa Istruzione Operativa "Criostato urgente placentare", attualmente in vigore presso il Dipartimento Ginecologico e Percorso Nascita dell'Ospedale Policlinico San Martino (55). Le indicazioni riportate nell'Istruzione Operativa comprendono:

- Corioamnionite o febbre materna peripartum (temperatura materna febbrile $\geq 38^{\circ}\text{C}$ nelle 48 ore precedenti e seguono il parto);
- Rottura prolungata delle membrane (PROM) ≥ 18 ore associata a Profilassi Antibiotica Intrapartum (PAI) incompleta, inadeguata o assente;
- Rottura prematura delle membrane amniotiche (pPROM, EG >37 settimane), in particolare quando inspiegata;
- Tampone vagino-rettale materno positivo per agenti infettanti patogeni per il feto e il neonato (es. Streptococco Agalactiae)

associato a Profilassi Antibiotica Intrapartum (PAI) incompleta, inadeguata o assente;

- Infezione genito-urinaria materna in gravidanza non sottoposta a trattamento antibiotico o di cui non si disponga di un controllo negativo dopo il trattamento;
- Copresenza di due o più fattori di rischio soprariportati;
- Altro eventuale fattore di rischio infettivologico emergente in singoli casi (es.: clinica positiva in un neonato senza chiara diagnosi, neonato in apparente benessere alla nascita che sviluppa sintomi nei giorni successivi, patologia materna emergente nei giorni immediatamente successivi al parto, fattori di rischio minimi o non valutabili al momento del parto);
- Liquido amniotico tinto di meconio e/o maleodorante

L'Istruzione Operativa, inoltre, suggerisce la conservazione della placenta fino a due giorni dopo il parto, in quanto eventuali sintomi clinici di infezione perinatale possono insorgere entro le prime 48 ore di vita del neonato. La placenta, infatti, non subisce danni significativi se conservata sino a tre giorni in frigorifero dedicato a 5-6°C, posta in contenitore ermetico a tenuta debitamente contrassegnato, in modo tale da evitare l'ossidazione e la disidratazione.

La gestione del neonato con sospetta EOS segue, invece, l'attuale Istruzione Operativa "Sepsi Neonatali Precoci" in vigore presso la U.O. Neonatologia dell'Ospedale Policlinico San Martino (56), illustrate nelle seguenti flow-charts (Figura 8, 9 e 10).

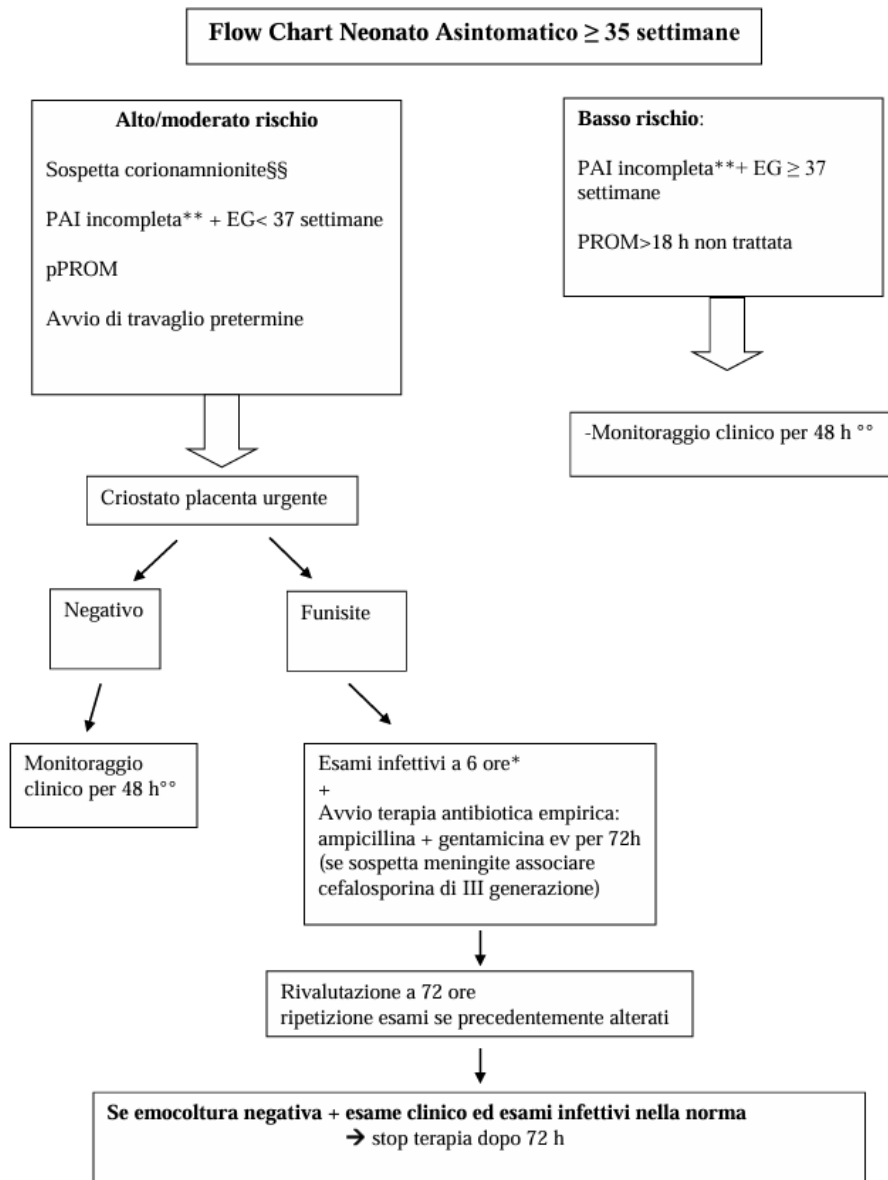


Figura 8. Flow-chart per la gestione del neonato asintomatico ≥ 35 settimane con sospetta Sepsis a Esordio Precoce (EOS).

Flow Chart Neonato Asintomatico < 35 settimane

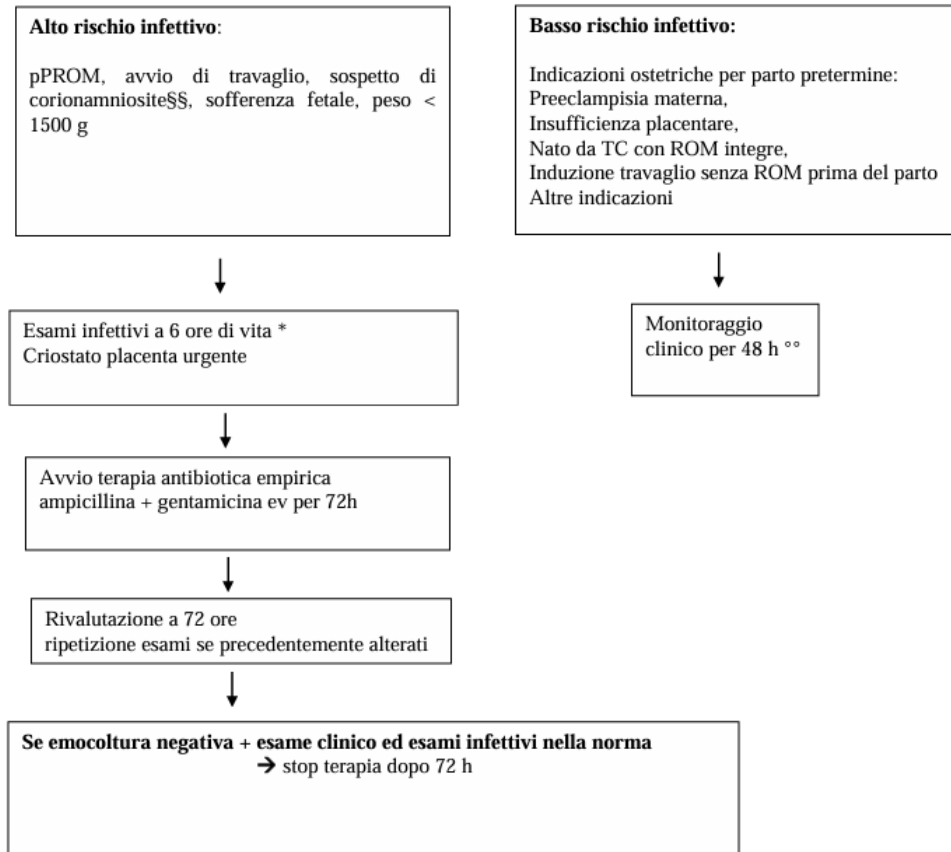


Figura 9. Flow-chart per la gestione del neonato asintomatico <35 settimane con sospetta EOS.

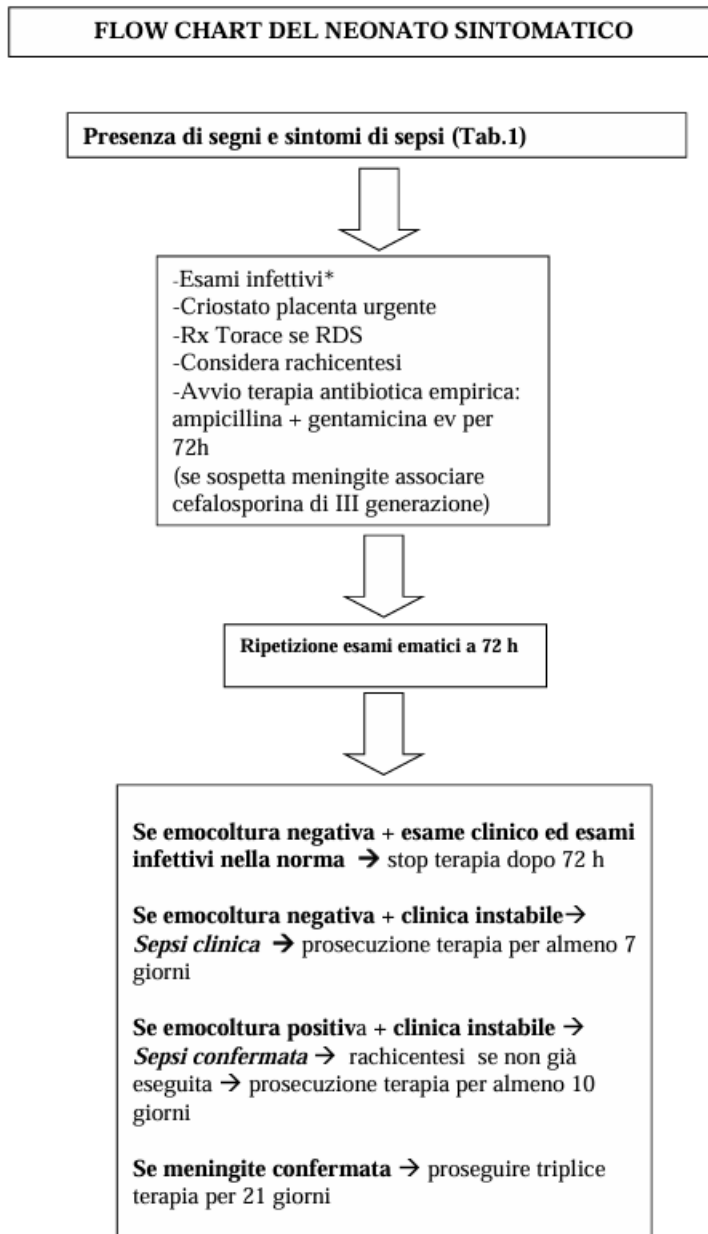


Figura 10. Flow-chart per la gestione del neonato sintomatico per EOS.

Note.

§§ Sospetta corioamnionite: febbre materna (un picco $>39^{\circ}\text{C}$ o $38^{\circ}\text{C} < T < 39^{\circ}\text{C}$ che dura per più di 30 minuti) + uno o più tra:

- Leucocitosi materna (GB $>15000/\text{mmc}$);

- Tachicardia materna (FC >100 bpm);
- Tachicardia fetale (FC >160 bpm);
- Liquido amniotico maleodorante;
- Dolore uterino.

°° Monitoraggio clinico: valutazioni cliniche seriate del neonato da eseguirsi ogni 6-8 ore con rilevazione dei parametri vitali (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, temperatura).

*Esami infettivi: da eseguire tra 6-24 ore di vita del neonato; comprendono: emocoltura (da sangue periferico e da catetere venoso ombelicale o catetere venoso centrale se presenti), emocromo con formula leucocitaria, PCR, rachicentesi (in caso di neonato sintomatico e/o emocoltura positiva), RX torace (in presenza di distress respiratorio).

** Indicazioni alla Profilassi Antibiotica Intrapartum (PAI):

- Tampone vagino-rettale positivo per GBS (Streptococco di gruppo B), effettuato fino a cinque settimane prima del parto;
- Batteriuria da GBS durante qualsiasi trimestre della gravidanza;
- Precedente figlio con sepsi da GBS;
- Tampone vagino-rettale non noto in caso di:
 - EG <37 settimane;
 - PROM ≥18 ore;
 - Temperatura materna ≥38°C;
 - Tampone vagino-rettale positivo nella precedente gravidanza.

Dati demografici e clinici della popolazione inclusa nello studio

I dati demografici e clinici perinatali dei neonati e delle rispettive madri inclusi nello studio sono stati ottenuti mediante ricerca retrospettiva nelle cartelle cliniche e nel database elettronico della U.O. Neonatologia e della U.O. Ostetricia e Ginecologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova. Sono state selezionate ed analizzate le caratteristiche demografiche dei neonati (età gestazionale alla nascita; peso alla nascita; genere; parto vaginale o taglio cesareo) e delle rispettive madri (età al momento del parto, numero di parità). Sono stati analizzati fattori di rischio infettivologico materni/pre-partum e fattori di rischio neonatali della popolazione inclusa nello studio. I fattori di rischio infettivologico di origine materna che sono stati selezionati sono sospetta corioamnionite, PROM ≥ 18 ore, pPROM, tampone vagino-rettale negativo/positivo/non noto, indicazione alla profilassi antibiotica intrapartum, esecuzione di profilassi antibiotica intrapartum completa, infezione delle vie urinarie durante qualsiasi trimestre della gravidanza, liquido amniotico tinto e/o maleodorante. Tra i fattori di rischio neonatali sono stati, invece, considerati la prematurità, alterazioni del tracciato tococardiografico durante il travaglio e il parto (tachicardia e/o bradicardia fetale), la necessità di rianimazione alla nascita e il punteggio di Apgar al 1° minuto e al 5° minuto.

È stata valutata, per ciascun neonato, la presenza di segni e sintomi post-natali compatibili con sepsi a esordio precoce (EOS) nelle prime 24 ore di vita e nelle prime 48 ore di vita. I segni e sintomi considerati come suggestivi per EOS sono stati suddivisi in alterazioni della termoregolazione, alterazioni

cutanee, sintomi respiratori, sintomi cardiocircolatori, alterazioni del metabolismo, sintomi neurologici e sintomi gastrointestinali (Tabella 2).

Esame istologico estemporaneo al congelatore della placenta

L'esame istologico urgente al criostato della placenta è stato eseguito presso la U.O. Anatomia Patologica dell'Ospedale Policlinico San Martino. Per ciascuna analisi sono stati raccolti quattro campioni di tessuto: tre sezioni provenienti da zone differenti del cordone ombelicale (zona centrale, il punto di inserzione del cordone sul disco placentare e l'estremità opposta verso il feto) e una sezione proveniente dalle membrane amniotiche (detto "membrane roll", ottenuto tagliando una striscia di tessuto dal punto di rottura fino all'inserzione placentare. I campioni di tessuto così ottenuti sono stati rapidamente congelati a fresco a -20°C . Per ciascun campione, due sezioni istologiche dello spessore di 5 micrometri sono state tagliate utilizzando un microtomo da congelamento e sono state colorate con ematossilina e eosina (H&E) e con blu di toluidina.

Nella stessa sessione, tre campioni di tessuto dal disco corionico vengono prelevati (entro i due terzi centrali del disco, di cui uno comprendente il punto d'inserzione del cordone ombelicale) per il successivo esame istologico placentare definitivo. Dopo la diagnosi estemporanea, anche i campioni di tessuto rimanenti dall'esame al congelatore vengono utilizzati per l'analisi istologica definitiva: dopo lo scongelamento, questi prelievi vengono fissati con formalina tamponata al 10% per 12 ore, processati, incorporati in

paraffina, tagliati in sezioni dello spessore di tre micrometri e, infine, colorati con ematossilina e eosina.

Il referto dell'esame della placenta al criostato descrive la presenza, lo stadio e il grado di corioamnionite e funisite secondo la classificazione stilata dall'Amsterdam Consensus Conference del 2016 (Tabella 3 e 4).

Analisi dei dati

È stata effettuata una analisi descrittiva dei fattori di rischio infettivo prepartum e neonatali, dei risultati dell'esame al congelatore della placenta e del ricorso a esami invasivi e a terapia antibiotica.

Inoltre, è stata effettuata un'analisi statistica per valutare la capacità predittiva di tre metodi diagnostici per identificare i neonati con elevato rischio di infezioni post-partum: (1) esame al criostato, (2) fattori di rischio prepartum e (3) risultati degli esami invasivi. I risultati di ciascun test sono stati confrontati con i dati clinici post-natali che indicavano l'effettiva insorgenza di sintomi di infezione neonatale.

Procedura di Analisi

La popolazione di studio è stata suddivisa in due gruppi: neonati che hanno sviluppato sintomi suggestivi di infezione perinatale e neonati asintomatici. Per ciascun metodo diagnostico, abbiamo costruito tabelle di contingenza (o tabelle di frequenza) per valutare la distribuzione dei neonati classificati a rischio in base all'effettiva presenza o assenza di infezione. Questa

suddivisione ha permesso di osservare la frequenza con cui ciascun test ha individuato correttamente i casi a rischio rispetto a quelli non a rischio.

Indicatori di Accuratezza Diagnostica

Per valutare l'accuratezza dei tre metodi diagnostici, sono stati calcolati il Valore Predittivo Positivo (VPP) e il Valore Predittivo Negativo (VPN) per ciascun test. Il VPP rappresenta la probabilità che un neonato classificato come "a rischio" sviluppi effettivamente sintomi di infezione, mentre il VPN indica la probabilità che un neonato classificato come "non a rischio" non manifesti sintomi.

Analisi Supplementari

Ove necessario, abbiamo valutato la significatività statistica delle differenze nelle capacità predittive tra i tre metodi utilizzando test statistici (es. test di chi-quadrato) per determinare se vi fossero differenze significative nelle capacità diagnostiche tra i metodi.

Risultati

Tra i neonati ricoverati alla nascita presso la U.O. Neonatologia dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova nel periodo compreso tra gennaio 2022 e settembre 2024, sono stati retrospettivamente identificati e inclusi nello studio 60 neonati con fattori di rischio infettivologico per lo sviluppo di sepsi precoce. Per tutti e 60 i neonati è stato richiesto ed eseguito l'esame al congelatore della placenta.

Di questi 60 neonati, 37 erano maschi (61,7%) e 23 femmine (38,3%). Questo dato è coerente con il fatto che il sesso maschile viene inserito in letteratura tra i fattori di rischio per lo sviluppo di sepsi precoce (1, 17). L'età gestazionale media alla nascita risulta pari a $38,9 \pm 2,1$ settimane. Nella nostra popolazione, 7 neonati erano prematuri (11,7%), con un'età gestazionale minima di 31 settimane. Il peso medio alla nascita era $3263,6 \pm 546,7$ grammi. Nella popolazione è inclusa una coppia di gemelli, questo dato è concorde con il tasso di gemellarità in Italia (1-2% delle gravidanze). Nella maggior parte dei casi, la modalità di nascita è stata mediante parto vaginale (65%), mentre il 35% dei neonati è nato tramite taglio cesareo, in linea con gli attuali tassi in Italia. Per quanto riguarda le caratteristiche demografiche della popolazione di neonati, esse sono riassunte nella Tabella I.

L'età media materna al momento del parto era di $33,3 \pm 5,3$ anni. Nella maggior parte dei casi, si trattava di donne al primo parto (73,3%) (Tabella II).

Popolazione dello studio (N=60)		
Età gestazionale (settimane)	media \pm SD	38,9 \pm 2,1
Peso (g)	media \pm SD	3263,6 \pm 546,7
Genere		
Maschi	N (%)	37 (61,7%)
Femmine	N (%)	23 (38,3%)
Gemellarità	N (%)	1 (1,6%)
Parto		
Vaginale		39 (65%)
Taglio cesareo		21 (35%)

Tabella I. Caratteristiche demografiche nella popolazione dello studio.

Popolazione dello studio (N=60)		
Età materna (anni)	media \pm SD	33,3 \pm 5,3
Parità		
1	N (%)	44 (73,3)
2		9 (15)
3		1 (1,7)
4		4 (6,7)
5		2 (3,3)

Tabella II. Caratteristiche demografiche materna.

Tutti i neonati inclusi nella popolazione avevano fattori di rischio infettivologico, distinti in materni (ante partum) e neonatali. Le Tabelle III e IV mostrano, rispettivamente, i fattori di rischio materni e quelli neonatali. I

fattori materni più frequenti nella nostra popolazione sono risultati la positività dello screening vagino-rettale per GBS, riscontrata nel 26,7% delle donne, in linea con gli attuali tassi di colonizzazione in Italia (5), e la PROM ≥ 18 ore (26,7% dei casi), seguiti dalla presenza di febbre materna peripartum (21,7%). Tutti questi elementi sono noti come rilevanti potenziali fattori che aumentano notevolmente il rischio di infezione perinatale (57, 58). Tra i fattori di rischio neonatale, invece, sono risultati più spesso presenti il sesso maschile, le alterazioni della frequenza cardiaca fetale e la prematurità (1).

		Popolazione dello studio (N=60)
Febbre materna peripartum	N (%)	13 (21,7%)
Tampone vagino-rettale positivo per GBS	N (%)	16 (26,7%)
PROM ≥ 18	N (%)	16 (26,7%)
Infezione delle vie urinarie	N (%)	5 (8,3%)
pPROM	N (%)	8 (13,3%)
Liquido amniotico maleodorante	N (%)	3 (5%)

Tabella III. Fattori di rischio infettivo materni antepartum. (GBS: Streptococco di gruppo B; PROM: rottura prolungata delle membrane; pPROM: rotture precoce e prematura delle membrane).

		Popolazione dello studio (N=60)
Sesso maschile	N (%)	37 (61,77%)
Alterazioni CTG	N (%)	18 (30%)
Prematurità	N (%)	7 (11,7%)
Basso peso alla nascita (<2500 g)	N (%)	5 (8,3%)
Basso punteggio di Apgar alla nascita (≤ 6 al 5° minuto)	N (%)	5 (8,3%)
Gravidanza gemellare	N (%)	1 (1,7%)

Tabella IV. Fattori di rischio infettivo neonatali.

Per tutti i neonati della popolazione è stato richiesto ed effettuato l'esame istologico al congelatore della placenta a causa della presenza di fattori di rischio infettivologico per identificare microscopicamente la presenza di corioamnionite e, soprattutto, di funisite. La corioamnionite a livello istologico è stata riscontrata nel 70% dei casi, mentre la funisite nel 65%. Il risultato dell'esame al criostato è stato definito positivo in caso di presenza di funisite di qualsiasi stadio e grado. Questi dati sono riassunti nelle Tabelle V e VII.

		Popolazione dello studio
		(N=60)
Corioamnionite	N (%)	
Sì		42 (70%)
No		18 (30%)
Corioamnionite – Stadio	N (%)	
Stadio 1		12 (20%)
Stadio 2		27 (45%)
Stadio 3		3 (5%)
No corioamnionite		18 (30%)
Corioamnionite – Grado	N (%)	
Grado 1		16 (26,7%)
Grado 2		23 (38,3%)
Non specificato		3 (5%)
No corioamnionite		18 (30%)

Tabella V. Presenza di corioamnionite all'esame al congelatore della placenta.

		Popolazione dello studio
		(N=60)
Funisite	N (%)	
Sì		39 (65%)
No		21 (35%)
Funisite – Stadio	N (%)	
Stadio 1		28 (46,6%)
Stadio 2		10 (16,7%)
Stadio 3		1 (1,7%)
No funisite		21 (35%)
Funisite – Grado	N (%)	
Grado 1		30 (50%)
Grado 2		4 (6,7%)
Non specificato		35 (8,3%)
No funisite		21 (35%)

Tabella VI. Riscontro di funisite all’esame al congelatore della placenta.

Secondo la letteratura, nel contesto di un’infezione intra-amniotica lo sviluppo di corionamnionite precede quello della funisite. I nostri dati confermano questo pattern di progressione: in tutti i casi la presenza di funisite è associata al riscontro di corioamnionite, soprattutto se di alto grado (44, 49).

Nella Tabella VII sono riportate le frequenze di funisite in relazione ai singoli fattori di rischio per sepsi neonatale precoce (EOS). Da questi dati emerge

che in tutte le madri con febbre peripartum e sospetta corioamniosite è stata documentata la presenza di funisite. La febbre materna peripartum, infatti, è unanimamente riconosciuta nelle principali linee guida internazionali come uno dei fattori predittivi più rilevanti per lo sviluppo di EOS (1, 17, 57).

	Funisite presente	Funisite assente	Totale
	N (%)	N (%)	N
Febbre materna peripartum	13 (100%)	0	13
Tampone vagino-rettale positivo per GBS	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16
PAI completa	3 (50%)	3 (50%)	6
PAI incompleta	7 (70%)	3 (30%)	10
IVU	3 (60%)	2 (40%)	5
PROM \geq 18 ore	11 (68,8%)	5 (31,2%)	16
pPROM	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8
EG <37 settimane	4 (57%)	3 (43%)	7
Liquido amniotico tinto e/o maleodorante	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15
Alterazioni CTG	12 (66,7%)	6 (33,3%)	18
\geq 2 FdR infettivi	18 (82%)	6 (18%)	22

Tabella VII. Riscontro di funisite in base ai singoli fattori di rischio infettivo.

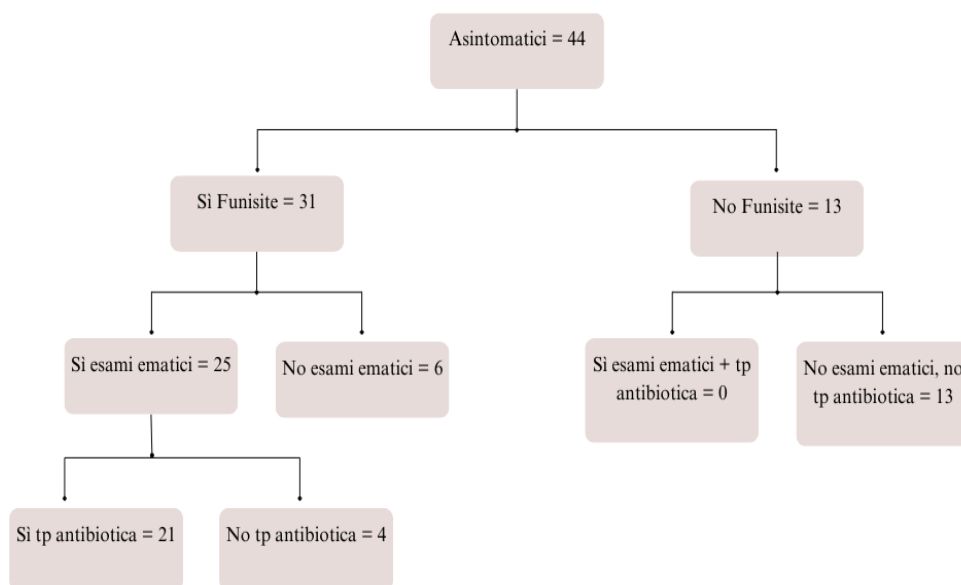
I neonati della popolazione sono stati suddivisi in base alla presenza o assenza di sintomi clinici suggestivi per sepsi precoce (segni e sintomi nelle prime 24 ore di vita, segni e sintomi nelle prime 48 ore di vita, necessità di rianimazione alla nascita con punteggio Apgar \leq 6 a 5 minuti) (Tabella 2).

I neonati asintomatici sono risultati la maggioranza (73,3%) rispetto ai neonati sintomatici (26,7%). Tra i neonati asintomatici, la funisite è stata riscontrata in 31 casi (70%), mentre essa era assente in 13 bambini (30%), come mostrato nella Tabella VIII. Il congelatore della placenta è risultato positivo nel 50% dei neonati sintomatici.

	Asintomatici (N=44)	Sintomatici (N=16)
Funisite presente	31 (70%)	8 (50%)
Funisite assente	13 (30%)	8 (50%)

Tabella VIII. Riscontro di funisite nei pazienti suddivisi in base alla presenza di sintomi suggestivi di EOS.

La nostra attenzione si è focalizzata prevalentemente sul gruppo di neonati asintomatici. Di questi neonati sono stati descritti il risultato dell'esame placentare al congelatore, il ricorso a esami invasivi (esami ematici, emocoltura) e a terapia antibiotica. Questi dati sono riassunti nello schema 1.



Schema 1. Gestione dei neonati asintomatici con rischio infettivo in base all'esito dell'esame al congelatore della placenta.

Tra i 44 neonati asintomatici, 13 hanno evidenziato un esame al congelatore negativo per funisite. Sulla base dei fattori di rischio infettivo peripartum, la gestione di questi neonati prevedeva, secondo le indicazioni stabilite nell'Istruzione Operativa (Figura 8), un monitoraggio clinico per le prime 48 ore di vita. Il risultato negativo dell'esame al congelatore ha fornito un ulteriore supporto alla decisione di adottare un approccio di osservazione clinica seriata dei pazienti.

Nel gruppo di 31 pazienti asintomatici con esame al congelatore positivo, la diagnosi di funisite ha determinato la necessità di eseguire esami ematici ed emocoltura, come previsto nell'Istruzione Operativa (Figura 8), in 25 neonati. In 6 casi, tuttavia, è stata presa la decisione di non procedere con il prelievo venoso. In questi sei neonati, la richiesta dell'esame al congelatore era stata

motivata dalla presenza di informazioni cliniche pre-peripartum relativamente poco chiare riguardo al rischio infettivo e/o da indicazioni che non erano completamente in linea con quanto stabilito nell'Istruzione Operativa (riferimento tabella/figura), talvolta influenzate da variabili legate alla valutazione del singolo operatore. In questi casi, l'esame al congelatore ha evidenziato una funisite lieve (stadio 1, grado 1). Alla luce di tali considerazioni, e soprattutto data l'assenza di sintomi clinici suggestivi di sepsi, è stata adottata la strategia di un monitoraggio clinico stretto, evitando l'esecuzione di esami invasivi e il ricorso alla terapia antibiotica.

Nel gruppo di 25 neonati asintomatici con esame al congelatore positivo che hanno effettuato esami invasivi, è stata avviata terapia antibiotica in 21 casi, in base alle alterazioni del criostato placentare e degli esami di laboratorio. Questo gruppo include 4 neonati in cui il criostato ha evidenziato una funisite severa di stadio 2 e grado 2. In questo gruppo di pazienti, l'esame al congelatore è stato di supporto nell'identificare i neonati con maggior rischio di sviluppare sepsi perinatale. Tra questi pazienti, si è verificato un caso di sepsi precoce da *Escherichia Coli* isolato all'emocoltura.

Nei restanti quattro casi, invece, la decisione di non iniziare la terapia antibiotica si è basata sul buon stato clinico dei neonati, sulla negatività degli esami ematici e sul riscontro di una funisite lieve al criostato, in associazione con un rischio infettivo pre-peripartum medio-basso.

Lo Schema 2 illustra la gestione dei neonati sintomatici con segni suggestivi di sepsi, sottoposti all'esame istologico al congelatore della placenta. In Tabella IX sono riportati i segni e sintomi clinici riscontrati in questi pazienti.

Nel 50% dei neonati sintomatici, l'esame istologico ha evidenziato la presenza di funisite. Tutti questi neonati sono stati sottoposti a esami ematochimici, che hanno documentato incremento dei marcatori infiammatori, e sono stati trattati con terapia antibiotica empirica. La diagnosi istologica di funisite ha supportato il sospetto diagnostico di sepsi precoce.

Tra i neonati del gruppo, uno di essi ha sviluppato sepsi precoce causata da *Listeria monocytogenes*, isolata sia nell'emocoltura sia nella liquorcoltura. Nei restanti casi, non sono stati ottenuti isolamenti colturali e la terapia antibiotica è stata interrotta dopo il miglioramento clinico dei pazienti e la riduzione degli indici di flogosi.

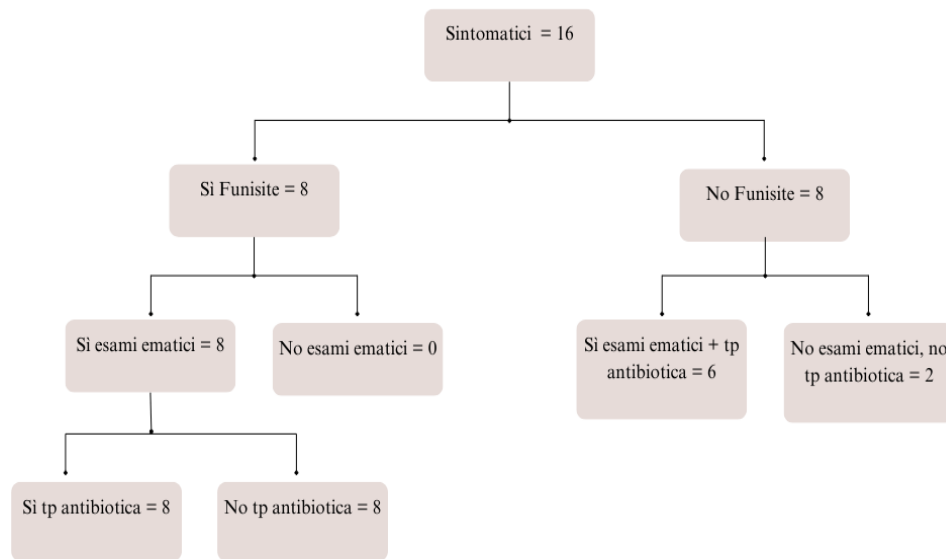
Nel restante 50% dei neonati sintomatici, l'esame al criostato della placenta è risultato negativo, non evidenziando la presenza di funisite. Di questi 8 pazienti, 6 sono stati sottoposti a esami ematici e a terapia antibiotica precoce. Tra questi ultimi, 4 neonati sono stati trasferiti all'Istituto G. Gaslini e la decisione di eseguire esami ematici e di avviare il trattamento antibiotico è stata motivata dalla presenza di altre condizioni cliniche che giustificavano una copertura antibiotica, trattandosi di due neonati con encefalopatia ipossico-ischemica sottoposti a ipotermia terapeutica e di due neonati pretermine, nati da gravidanza gemellare alla 35^a settimana di gestazione.

I restanti due neonati sintomatici con esame al criostato negativo non sono stati sottoposti né a esami ematici né a terapia antibiotica. In entrambi i casi l'esame al congelatore della placenta era stato richiesto a seguito dello sviluppo di una sintomatologia post-natale non chiaramente definita, per la quale la sepsi precoce rientrava nel sospetto diagnostico differenziale. Nel

primo caso, il neonato, nato a termine, presentava come fattori di rischio prepartum una PROM >18 ore trattata con adeguata profilassi antibiotica. Alla nascita aveva necessitato di rianimazione e, successivamente, di supporto respiratorio non invasivo per alcune ore.

Nel secondo caso, la neonata, anch'essa a termine, era nata da taglio cesareo urgente per tachicardia fetale. Alla nascita, presentava buone condizioni generali e non aveva richiesto alcun tipo di assistenza. Nelle prime ore di vita, tuttavia, ha sviluppato un distress respiratorio, che ha reso necessario l'avvio di supporto respiratorio non invasivo, protratto per alcune ore.

In entrambi i casi, l'esame al congelatore della placenta negativo, unito alla stretta osservazione clinica e all'evidenza di un quadro respiratorio rapidamente migliorativo, ha permesso di ritenere meno probabile la diagnosi di infezione perinatale, considerando il quadro più compatibile con una condizione di maladattamento respiratorio. Questa diagnosi si è poi rivelata corretta dato il benessere mantenuto da entrambi i bambini per tutto il tempo della degenza.



Schema 2. Gestione dei neonati sintomatici a rischio infettivo in base all'esito dell'esame al congelatore della placenta.

		Neonati sintomatici (N=16)
Rianimazione alla nascita	N (%)	11 (69%)
Apgar <7 al 1° minuto		7 (44%)
Apgar <7 al 5° minuto		5 (31%)
Distress respiratorio	N (%)	9 (56%)
Alterazioni cardiocircolatorie	N (%)	3 (19%)
Alterazioni della cute	N (%)	2 (12,5%)
Alterazioni della termoregolazione	N (%)	2 (12,5%)
Sintomi neurologici	N (%)	4 (25%)
Alterazioni del metabolismo	N (%)	6 (37,5)
Sintomi gastrointestinali	N (%)	1 (6%)

Tabella IX. Segni e sintomi clinici di presentazione nei neonati con sospetta sepsi a esordio precoce.

Per quanto riguarda la diagnosi di sepsi precoce, nel nostro gruppo di neonati è stata identificata in due casi, dato che risulta in linea con l'attuale incidenza di sepsi neonatale precoce (EOS) nel nostro Paese (1). I patogeni identificati tramite emocoltura sono stati l'Escherichia Coli nel primo caso e la Listeria Monocytogenes nel secondo.

Nel caso della sepsi da Escherichia coli, la neonata era nata a termine (39 settimane + 5 giorni) mediante taglio cesareo, con un buon adattamento alla vita extrauterina (Apgar al 1° minuto 9, Apgar al 5° minuto 10) e senza sintomi clinici. Tra i fattori di rischio infettivo, presentava PROM >18 ore e un tampone vagino-rettale positivo per Streptococcus agalactiae (GBS), con profilassi antibiotica intrapartum adeguata e completa. L'esame al congelatore della placenta ha evidenziato una funisite severa di stadio 2 e grado 2. Sono stati eseguiti, pertanto, esami ematici, che hanno mostrato un incremento degli indici infiammatori, e la neonata è stata sottoposta a terapia antibiotica empirica ad ampio spettro con ampicillina e gentamicina. L'emocoltura ha identificato la crescita di Escherichia coli, permettendo la modifica del trattamento sulla base dell'antibiogramma, con passaggio a cefotaxime. In questo caso, l'esame al congelatore ha permesso di identificare il maggiore rischio infettivo del neonato e di avviare un corretto trattamento antimicrobico prima dello sviluppo di sintomi potenzialmente rapidamente ingravescenti.

Nel caso di sepsi da Listeria monocytogenes, il neonato era nato a termine (38 settimane + 1 giorno) da parto eutocico. In anamnesi non erano presenti

fattori di rischio infettivologico noti. Alla nascita, il neonato aveva necessitato di rianimazione, motivo per cui è stato richiesto l'esame al congelatore della placenta. Nelle ore successive alla nascita, persistendo un distress respiratorio non migliorativo nonostante il supporto non invasivo adeguato e in seguito alla comparsa di ipertermia e sintomi neurologici (ipertono appendicolare e nistagmo), nel forte sospetto clinico di sepsi perinatale precoce sono stati richiesti esami ematici, che hanno rilevato importante rialzo degli indici di flogosi, ed è stata avviata terapia antibiotica ad ampio spettro. L'esame al criostato della placenta ha evidenziato la presenza di corioamnionite severa (stadio 3, grado 2) e funisite (stadio 1, grado 1), supportando ulteriormente la diagnosi di sepsi precoce. Il neonato è stato successivamente trasferito presso l'Istituto G. Gaslini in seguito al peggioramento delle condizioni cliniche (comparsa di grave distensione addominale da ileo paralitico e idrocele ingravescente). L'esame chimico-fisico del liquor, eseguito presso il centro di trasferimento, ha rivelato una significativa pleiocitosi. Sia l'emocoltura che la liquorcoltura sono risultate positive per *Listeria monocytogenes* e la terapia antibiotica è stata successivamente ottimizzata sulla base dell'antibiogramma, proseguendo per un totale di 21 giorni.

Per quanto riguarda l'analisi statistica volta a valutare la capacità predittiva di tre metodi per identificare i neonati con elevato rischio di infezioni post-partum (esame al criostato, fattori di rischio prepartum e risultati degli esami invasivi), essa ha evidenziato differenze nei valori predittivi positivi (VPP) e negativi (VPN), tuttavia, i risultati sono stati influenzati dalla numerosità

campionaria limitata, che ha ridotto la potenza statistica dell'analisi. I risultati sono mostrati nelle Tabelle X e XI.

Valutazione del rischio in base al profilo materno

- Madri ad alto rischio: per le madri classificate ad alto rischio di avere un figlio con infezione post-partum, il VPP è stato pari a 0,5 e il VPN a 0,7, con un p-value del test chi-quadro di 0,229. Questa differenza non significativa può essere attribuita in parte alla bassa numerosità campionaria, che limita la capacità di rilevare differenze sottili.
- Madri a basso rischio: il gruppo di madri a basso rischio ha ottenuto un VPP di 0,19 e un VPN di 0,48, con un p-value di 0,02, suggerendo una differenza statisticamente significativa. Tuttavia, anche in questo caso, la numerosità limitata può aver influito sul risultato, rendendo la significatività sensibile a piccoli cambiamenti nei dati.
- Madri a rischio molto basso: per le madri a rischio molto basso, i valori sono stati VPP 0,53 e VPN 0,7, con un p-value di 0,2, non significativo. Anche in questo caso, la dimensione campionaria ridotta può aver limitato la capacità di individuare differenze potenzialmente rilevanti.

Valutazione del rischio in base ai metodi diagnostici

- Esame al congelatore della placenta: l'esame istologico al congelatore ha riportato un VPP di 0,31 e un VPN di 0,571, con un p-value di 0,514, indicante una differenza non significativa. La ridotta numerosità campionaria può aver contribuito a diluire la capacità predittiva del test.

- Esami invasivi: i test invasivi hanno prodotto un VPP di 0,538 e un VPN di 0,7, con un p-value di 0,2, anch'esso non significativo. Come per gli altri metodi, la bassa numerosità ha probabilmente inciso sui risultati.

In sintesi, la numerosità campionaria limitata dello studio rappresenta una criticità metodologica importante, riducendo la potenza statistica e la precisione delle stime dei valori predittivi e rendendo più difficile ottenere differenze statisticamente significative. Tale limitazione implica che i risultati osservati devono essere interpretati con cautela e richiedono ulteriori conferme in studi con campioni più ampi.

Variabile	Frequenza (%)	p-value*
<u>Sintomatici</u>		
No	39 (65%)	ref
Si	21 (35%)	
<u>Alto/moderato rischio</u>		
<u>prepartum</u>		
Negativo	44 (73.33%)	0,2449
Positivo	16 (26.67%)	
<u>Basso rischio prepartum</u>		
Negativo	29 (48.33%)	0,018
Positivo	31 (51.67%)	
<u>Rischio prepartum molto basso</u>		
Negativo	47 (78.33%)	0,2001
Positivo	13 (21.67%)	
<u>Esame al congelatore della</u>		
<u>placenta</u>		
Negativo	21 (35%)	0,514
Positivo	39 (65%)	
<u>Esami invasivi</u>		
Negativo	47 (78.33%)	0,2001
Positivo	13 (21.67%)	

*p-value dal test del chi-quadrato**

Tabella X. Analisi dei tre metodi diagnostici.

Metodi diagnostici	VPP	VPN
Alto/moderato rischio prepartum	0,5	0,7
Basso rischio prepartum	0,19	0,48
Rischio prepartum molto basso	0,54	0,7
Esame al congelatore della placenta	0,31	0,57
Esami invasivi	0,54	0,7

Tabella XI. Valore predittivo positivo e negativo per i diversi metodi diagnostici.

Discussione

La sepsi neonatale a esordio precoce (EOS) è una sindrome clinica caratterizzata da segni e sintomi di infezione sistemica nel neonato che esordiscono nelle prime 72 ore di vita del neonato (1).

L'incidenza di EOS è notevolmente diminuita negli ultimi anni grazie all'introduzione di diverse strategie preventive ed è attualmente stimata di circa 0,6-0,7 casi ogni 1000 nati vivi. La modalità di prevenzione che ha permesso la maggiore riduzione dei casi di infezione perinatale è rappresentata dalla prevenzione della malattia invasiva da Streptococco di gruppo B (*Streptococcus Agalactiae*, GBS), l'agente eziologico più frequentemente coinvolto, ed è basata sullo screening universale per GBS di tutte le donne in gravidanza e sull'esecuzione di profilassi antibiotica intrapartum nelle donne colonizzate (1, 5, 10, 17).

Nonostante la notevole riduzione della sua incidenza, la sepsi precoce continua a essere una delle principali cause di mortalità e morbidità in epoca neonatale. Essa è gravata, infatti, da una mortalità variabile dal 3% al 50% dei casi, costituendo la terza causa di mortalità neonatale a livello globale e rappresentando il 13% della mortalità neonatale complessiva (3). Nei pazienti che sopravvivono, inoltre, la EOS è associata al frequente sviluppo di gravi conseguenze cliniche sia a breve sia a lungo termine. Di conseguenza, risultano di fondamentale importanza la diagnosi e il trattamento precoce.

La sepsi neonatale a esordio precoce si manifesta, generalmente, entro le prime 72 ore di vita del neonato ed è solitamente sostenuta da patogeni che colonizzano il tratto genito-urinario materno e che vengono trasmessi al feto

o neonato per via verticale nel corso di un'infezione intra-amniotica oppure durante il passaggio attraverso il canale del parto. Nella maggior parte dei casi, i neonati infetti diventano sintomatici nelle prime 24 ore di vita (17).

La diagnosi precoce di infezione perinatale è molto difficile a causa di diversi fattori. Innanzitutto, i segni e i sintomi clinici sono molto aspecifici e comuni ad altre condizioni, sia patologiche sia parafisiologiche.

L'emocoltura, nonostante sia ancora considerata il gold standard per la diagnosi di sepsi, è gravata da una bassa sensibilità con un alto tasso di falsi negativi, dovuti a molteplici fattori, tra cui lo scarso volume di sangue prelevabile, la batteriemia incostante e la frequente esecuzione di profilassi antibiotica intrapartum che può ridurre la carica batterica circolante; l'emocoltura, inoltre, richiede dei tempi di esecuzione tecnici di almeno 48-72 ore, troppo prolungati affinché essa possa risultare utile nella decisione se avviare tempestivamente o meno il trattamento antibiotico. Nella nostra popolazione di neonati, sono state eseguite 38 emocolture e soltanto due sono risultate positive (1, 17, 20).

Gli esami ematochimici ad oggi disponibili, come la valutazione dell'emocromo e degli indici infiammatori, sono anch'essi poco specifici e poco affidabili. In particolare, sia la proteina C reattiva sia la procalcitonina possono elevarsi in numerosi e differenti quadri clinici, non sempre infettivi, e sono influenzati da numerose variabili. In caso di infezione, inoltre, l'incremento dei loro livelli ematici è più tardivo rispetto all'esordio della sintomatologia. Di conseguenza, la negatività degli indici di flogosi non deve ritardare l'inizio della terapia antimicrobica in caso di forte sospetto clinico

di sepsi. Inoltre, il monitoraggio dei markers infiammatori necessita di prelievi ematici seriati che non solo sono dispendiosi per la struttura ospedaliera, ma costituiscono un'esperienza invasiva e dolorosa per il neonato (20, 22, 23).

Nel corso degli anni sono state proposte diverse strategie basate sull'identificazione dei fattori di rischio, materni e neonatali, con l'obiettivo di stratificare i neonati e identificare quelli con maggiore pericolo di sviluppare EOS. Uno degli elementi antepartum tradizionalmente ritenuto tra i più suggestivi e predittivi di sepsi neonatale è la febbre materna peripartum, considerata espressione di infezione intra-amniotica (9, 25). Nella nostra popolazione di neonati, in tutti casi di febbre materna peripartum è stata riscontrata la presenza di corioamnionite e funisiti a livello microscopico, confermando la rilevanza di questo fattore di rischio prepartum.

Sono stati proposti anche alcuni algoritmi diagnostici che calcolano il rischio di EOS sulla base del quadro clinico e dei parametri di laboratorio. Tuttavia, si tratta ancora di strumenti non completamente infallibili che non risolvono la difficoltà diagnostica (12).

Come conseguenza di tutte queste criticità, la mancanza di un consenso sulla gestione dei neonati a rischio e di una diagnostica sensibile e specifica porta spesso il neonatologo, a causa del timore di un'evoluzione rapidamente sfavorevole della sepsi, ad avviare una terapia antibiotica empirica precoce spesso non necessaria. L'ampio uso di antibiotici, tuttavia, non è privo di conseguenze: nel corso degli ultimi anni sono aumentati notevolmente i tassi di antibiotico-resistenza e, più recentemente, è stata posta l'attenzione sulle

alterazioni del microbiota intestinale provocate dalle terapie antimicrobiche (33, 35).

È in questo contesto che si inserisce la possibilità di individuare uno strumento diagnostico capace di identificare in maniera più oggettiva i neonati con un reale e maggiore rischio di sviluppare sepsi precoce. L'esame istologico al congelatore della placenta è un esame non invasivo, rapido, che permette di ottenere importanti informazioni sullo stato di salute materno e fetale e che, nell'ambito delle EOS, può aiutare a valutare il reale rischio infettivo perinatale del neonato. Esso, infatti, analizzando il tessuto placentare, consente di identificare i segni microscopici di infezione e infiammazione, in particolare la presenza di funisite (espressione di una risposta infiammatoria fetale attiva), che possono indicare una trasmissione verticale di patogeni dalla madre al neonato e che si sono dimostrati associati allo sviluppo di sepsi (44).

Nella nostra popolazione, tutti i neonati avevano fattori di rischio infettivo perinatale e sono stati sottoposti all'esame al congelatore della placenta.

La nostra attenzione si è concentrata soprattutto sui neonati asintomatici. In questo gruppo di 44 neonati, l'esame istologico al criostato è risultato negativo per funisite in 13 casi. In base ai fattori di rischio prepartum, la gestione di questi pazienti ha previsto un monitoraggio clinico nelle prime 48 ore di vita. Il risultato negativo dell'esame al congelatore ha fornito un ulteriore supporto alla decisione di adottare un approccio di osservazione clinica seriata per questi neonati. Al contrario, l'esame al criostato ha rilevato funisite in 31 pazienti, di cui 25 sono stati sottoposti a esami ematochimici.

Nei restanti sei casi, non è stato effettuato il prelievo venoso in quanto i neonati si presentavano in ottime condizioni generali e l'esame al criostato, eseguito peraltro in assenza di indicazioni codificate ma per presenza di informazioni poco chiare circa i fattori di rischio prepartum, dimostrava una funisite lieve. In altri quattro casi, invece, gli esami ematochimici risultavano nella norma e il criostato evidenziava una funisite lieve; pertanto, anche in questi neonati la decisione di non avviare la terapia antibiotica è stata supportata dalle buone condizioni cliniche. Questi risultati possono essere interpretati tenendo conto del fatto che, sebbene l'esame al congelatore della placenta abbia mostrato una concordanza molto buona con l'esame istologico definitivo, può essere soggetto a falsi positivi, derivanti da artefatti associati al processo di congelamento e al taglio dei campioni di tessuto congelato (54). Nel gruppo di pazienti asintomatici con esame al criostato positivo, la presenza di funisite severa (stadio 2, grado2) ha permesso di identificare un elevato rischio infettivo in una neonata, nata a termine e con un profilo di basso rischio prenatale, che ha successivamente sviluppato una sepsi da Escherichia Coli, isolato all'emocoltura. La diagnosi istologica di funisite ha supportato la decisione di effettuare esami ematochimici, risultati alterati con significativo incremento degli indici di flogosi. Questo ha consentito l'avvio tempestivo di una terapia antimicrobica, prevenendo l'insorgenza di sintomi clinici potenzialmente evolutivi in modo rapido e sfavorevole.

Tra i pazienti sintomatici, invece, in due neonati nati a termine che hanno manifestato nelle prime ore dopo il parto una sintomatologia respiratoria compatibile anche con possibile esordio di sepsi, l'assenza di segni di funisite

all'esame istologico al congelatore ha contribuito a orientare la diagnosi verso una condizione di maladattamento, piuttosto che un'infezione perinatale. Il quadro clinico, caratterizzato da distress respiratorio e necessità di supporto non invasivo, è stato strettamente monitorato insieme alla attenta sorveglianza clinica, che ha evidenziato un rapido miglioramento delle condizioni respiratorie, e alla presenza di fattori di rischio prenatali minimi, rafforzando ulteriormente l'ipotesi diagnostica.

Nel caso, invece, della sepsi da *Listeria monocytogenes*, la presenza di corioamnionite severa e di funisite all'esame al criostato ha supportato l'orientamento diagnostico verso un quadro di sepsi in un neonato a termine che non presentava fattori di rischio prenatali di tipo infettivo, ma che ha necessitato dapprima di rianimazione alla nascita e che, successivamente, ha sviluppato una sintomatologia progressivamente ingravescente, con sintomi di tipo respiratorio, neurologico, gastrointestinali e ipertermia.

Per quanto riguarda l'analisi statistica volta a valutare la capacità predittiva di tre metodi nell'identificazione dei neonati con elevato rischio di infezione peripartum (esame al criostato, fattori di rischio prepartum e risultati degli esami invasivi), essa ha evidenziato differenze nei valori predittivi positivi (VPP) e negativi (VPN). Tuttavia, i risultati sono apparsi non significativi. Ciò è stato sicuramente influenzato dalla numerosità limitata della nostra popolazione, che costituisce una criticità metodologica rilevante, in quanto ha ridotto la potenza statistica dell'analisi e la precisione delle stime dei valori predittivi, rendendo inoltre più difficile ottenere differenze statisticamente significative. Tale limitazione implica che i risultati osservati devono essere

interpretati con cautela e richiedono ulteriori conferme in studi con campioni più ampi.

La limitata numerosità della nostra popolazione rappresenta, infatti, uno dei principali limiti del nostro studio, che non ha permesso di eseguire analisi statistiche aggiuntive volte a dimostrare l'utilità dell'esame al congelatore della placenta nei pazienti ad alto rischio di sepsi precoce. A tale proposito, un altro grande limite del nostro studio è stata l'assenza di un gruppo di neonati di controllo, ossia un insieme di pazienti che, a parità di fattori di rischio materni e neonatali, non abbiano effettuato l'esame istologico placentare e che siano stati gestiti secondo le linee guida condivise a livello internazionale.

Alla luce di queste criticità, al momento con il nostro studio non è stato possibile stabilire in maniera significativa l'utilità di questa metodica diagnostica nel risparmiare procedure invasive e terapie antibiotiche non necessarie nei neonati asintomatici a rischio infettivo. Tuttavia, nella nostra esperienza, se integrato con la valutazione dei fattori di rischio prepartum e delle condizioni cliniche neonatali e con i risultati degli esami ematochimici, l'esame al congelatore della placenta ha fornito un supporto diagnostico nelle decisioni gestionali di questa categoria di neonati. Di conseguenza, queste considerazioni rappresentano il punto di partenza per la costruzione di un futuro studio che comprenda una maggiore numerosità campionaria e un gruppo di controllo con l'obiettivo di definire l'utilità dell'esame al congelatore della placenta come valido ausilio nella diagnosi di sepsi neonatale precoce, unitamente alla capacità di permettere un minor numero

di procedure invasive e di terapia antibiotica nei neonati, soprattutto asintomatici, con fattori di rischio infettivo.

Conclusioni

In questo studio, a causa della limitata numerosità campionaria e dell'assenza di un gruppo di controllo, non è stato possibile, al momento, dimostrare in modo statisticamente significativo l'utilità dell'esame al congelatore della placenta nel percorso diagnostico-terapeutico della sepsi a esordio precoce. Tuttavia, nella nostra esperienza, tale esame ha fornito un supporto diagnostico, che, integrato sempre con la valutazione clinica del neonato e i risultati degli esami di laboratorio, ha contribuito a orientare le decisioni terapeutiche nei neonati con fattori di rischio infettivo.

Le riflessioni proposte in questo studio costituiscono, pertanto, un punto di partenza per la progettazione di uno studio futuro, che preveda un campione più ampio e un gruppo di controllo, al fine di chiarire l'utilità dell'esame al congelatore della placenta come strumento diagnostico valido nella sepsi neonatale precoce. L'obiettivo finale sarà anche quello di valutarne l'efficacia nel ridurre il numero di procedure invasive e l'impiego di terapia antibiotica nei neonati, in particolare quelli asintomatici, ma a rischio infettivo.

Bibliografia

1. L. Bollani, I Stolfi, R Pedicino et al: Manuale di infettivologia neonatale II edizione, Società Italiana di Neonatologia (2016, giugno)
2. Jung E, Romero R, et al. The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2020 Aug;25(4):101146. doi: 10.1016/j.siny.2020.101146.
3. Deshmukh M, Mehta S, Patole S. Sepsis calculator for neonatal early onset sepsis - a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021 Jun;34(11):1832-1840. doi: 10.1080/14767058.2019.1649650.
4. Berardi A., Ciccina M. M., Spada C., et al. Osservazione nel neonato a rischio di sepsi precoce: L'approccio della regione Emilia-Romagna. *Medico e Bambino*, 2019.
5. Sicilia C., Garofalo M., Forte A., Bilotti A., Pirillo P., Lucente M., Giraldi C. Percorso clinico-diagnostico-terapeutico per la prevenzione dell'infezione neonatale precoce da streptococco B. Ministero della Salute, 2014.
6. Korang SK, Safi S, Nava C, et al. Antibiotic regimens for early-onset neonatal sepsis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 May 17;5(5):CD013837. doi: 10.1002/14651858.CD013837.pub2.
7. Jansen S, Lopriore E, Naaktgeboren C, et al. Epidural-Related Fever and Maternal and Neonatal Morbidity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neonatology.* 2020;117(3):259-270. doi: 10.1159/000504805.
8. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jan;27(1):21-47. doi: 10.1128/CMR.00031-13.
9. Puopolo KM, Benitz WE, Zaoutis TE. Committee on fetus and newborn; Committee on infectious diseases. Management of Neonates Born at ≥ 35 0/7 Weeks' Gestation With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. *Pediatrics.* 2018 Dec;142(6):e20182894. doi: 10.1542/peds.2018-2894.
10. Puopolo KM, Lynfield R, Cummings JJ. Committee on fetus and newborn; Committee on infectious diseases. Management of Infants at Risk for Group B Streptococcal Disease. *Pediatrics.* 2019 Aug;144(2):e20191881. doi: 10.1542/peds.2019-1881.

11. Russell NJ, Seale AC, et al. GBS Maternal Colonization Investigator Group. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 6;65(suppl_2):S100-S111. doi: 10.1093/cid/cix658.
12. Hoover LE. Group B Streptococcus Disease: AAP Updates Guidelines for the Management of At-Risk Infants. *Am Fam Physician*. 2020 Mar 15;101(6):378-380.
13. Yow MD, Mason EO, Leeds LJ, et al. Ampicillin prevents intrapartum transmission of group B streptococcus. *JAMA*. 1979 Mar 23;241(12):1245-7.
14. Barber EL, Zhao G, et al. Duration of intrapartum prophylaxis and concentration of penicillin G in fetal serum at delivery. *Obstet Gynecol*. 2008 Aug;112(2 Pt 1):265-70. doi: 10.1097/AOG.0b013e31817d0246.
15. Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797. *Obstet Gynecol*. 2020 Feb; 135(2):e51-e72. doi: 10.1097/AOG.0000000000003668. Erratum in: *Obstet Gynecol*. 2020 Apr;135(4):978-979. doi: 10.1097/AOG.0000000000003824.
16. Fairlie T, Zell ER, Schrag S. Effectiveness of intrapartum antibiotic prophylaxis for prevention of early-onset group B streptococcal disease. *Obstet Gynecol*. 2013 Mar;121(3):570-577. doi: 10.1097/AOG.0b013e318280d4f6.
17. Eichenwald E. C., Hansen A. R., Martin C. R., Stark A. R. Cloherty and Stark's Manual of Neonatal Care. 8th edition. 2016.
18. Verstraete EH, Blot K, et al. Prediction models for neonatal health care-associated sepsis: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2015 Apr;135(4):e1002-14. doi: 10.1542/peds.2014-3226.
19. Fleiss N, Schwabenbauer K, et al. What's new in the management of neonatal early-onset sepsis? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2023 Jan;108(1):10-14. doi: 10.1136/archdischild-2021-323532.
20. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017 Oct 14;390(10104):1770-1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.
21. Procianoy RS, Silveira RC. The challenges of neonatal sepsis management. *J Pediatr (Rio J)*. 2020 Mar-Apr;96 Suppl 1(Suppl 1):80-86. doi: 10.1016/j.jpmed.2019.10.004.

22. Lacaze-Masmonteil T, Rosychuk RJ, et al. Value of a single C-reactive protein measurement at 18 h of age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014 Jan;99(1):F76-9. doi: 10.1136/archdischild-2013-303984.
23. Benitz WE, Han MY, et al. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics.* 1998 Oct;102(4):E41. doi: 10.1542/peds.102.4.e41.
24. Stocker M, Van Herk W, et al. Procalcitonin-guided decision making for duration of antibiotic therapy in neonates with suspected early-onset sepsis: a multicentre, randomised controlled trial (NeoPIIns). *Lancet.* 2017 Aug 26;390(10097):871-881. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31444-7.
25. Puopolo KM, Mukhopadhyay S, et al. The Term Newborn: Early-Onset Sepsis. *Clin Perinatol.* 2021 Aug;48(3):471-484. doi: 10.1016/j.clp.2021.05.003.
26. Benitz WE. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010 Jun;37(2):421-38. doi: 10.1016/j.clp.2009.12.001.
27. Berardi A, Buffagni AM, et al. Serial physical examinations, a simple and reliable tool for managing neonates at risk for early-onset sepsis. *World J Clin Pediatr.* 2016 Nov 8;5(4):358-364. doi: 10.5409/wjcp.v5.i4.358.
28. Achten NB, et al. Association of Use of the Neonatal Early-Onset Sepsis Calculator With Reduction in Antibiotic Therapy and Safety: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2019 Nov 1;173(11):1032-1040. doi: 10.1001/jamapediatrics.2019.2825.
29. van Herk W, et al. Recognising early onset neonatal sepsis: an essential step in appropriate antimicrobial use. *J Infect.* 2016 Jul 5;72 Suppl:S77-82. doi: 10.1016/j.jinf.2016.04.026.
30. Kuzniewicz MW, Puopolo KM, et al. A Quantitative, Risk-Based Approach to the Management of Neonatal Early-Onset Sepsis. *JAMA Pediatr.* 2017 Apr 1;171(4):365-371. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.4678.
31. Fjalstad JW, Esaiassen E, et al. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Mar 1;73(3):569-580. doi: 10.1093/jac/dkx426.

32. Reyman M, van Houten MA, et al. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun.* 2022 Feb 16;13(1):893. doi: 10.1038/s41467-022-28525-z.
33. Fjalstad JW, Esaiassen E, et al. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Mar 1;73(3):569-580. doi: 10.1093/jac/dkx426.
34. Tamburini S, Shen N, et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016 Jul 7;22(7):713-22. doi: 10.1038/nm.4142.
35. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis.* 2018 Dec;9(6):590-597. doi: 10.1017/S2040174418000119.
36. Foliaki S, Pearce N, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III Study Group. Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old: International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Nov;124(5):982-9. doi: 10.1016/j.jaci.2009.08.017.
37. Pitter G, Ludvigsson JF, et al. Antibiotic exposure in the first year of life and later treated asthma, a population based birth cohort study of 143,000 children. *Eur J Epidemiol.* 2016 Jan;31(1):85-94. doi: 10.1007/s10654-015-0038-1.
38. Cox LM, Yamanishi S, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell.* 2014 Aug 14;158(4):705-721. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.052.
39. Bailey LC, Forrest CB, et al. Association of antibiotics in infancy with early childhood obesity. *JAMA Pediatr.* 2014 Nov;168(11):1063-9. doi: 10.1001/jamapediatrics.2014.1539.
40. Petra AI, Panagiotidou S, et al. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther.* 2015 May 1;37(5):984-95. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.04.002.
41. Reyman M, van Houten MA, et al. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun.* 2022 Feb 16;13(1):893. doi: 10.1038/s41467-022-28525-z.

42. Langston C, Kaplan C, et al. Practice guideline for examination of the placenta: developed by the Placental Pathology Practice Guideline Development Task Force of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 1997 May;121(5):449-76. PMID: 9167599.
43. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008 Dec;61(12):1296-302. doi: 10.1136/jcp.2008.055277.
44. Kim CJ, Romero R, et al. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Oct;213(4 Suppl):S29-52. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.040.
45. Romero R, Miranda J, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Aug;28(12):1394-409. doi: 10.3109/14767058.2014.958463.
46. Romero R, Miranda J, et al. Sterile intra-amniotic inflammation in asymptomatic patients with a sonographic short cervix: prevalence and clinical significance. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Jul;28(11):1343-1359. doi: 10.3109/14767058.2014.954243. Epub 2014 Sep 24. Erratum in: *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020 Jul;33(14):2506. doi: 10.1080/14767058.2018.1545527.
47. Peng CC, Chang JH, et al. Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol.* 2018 Jun;59(3):231-237. doi: 10.1016/j.pedneo.2017.09.001.
48. Jain VG, Willis KA, et al. Chorioamnionitis and neonatal outcomes. *Pediatr Res.* 2022 Jan;91(2):289-296. doi: 10.1038/s41390-021-01633-0.
49. Yoon BH, Romero R, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Nov;183(5):1124-9. doi: 10.1067/mob.2000.109035.
50. Oh JW, Park CW, et al. The relationship among the progression of inflammation in umbilical cord, fetal inflammatory response, early-onset neonatal sepsis, and chorioamnionitis. *PLoS One.* 2019 Nov 19;14(11):e0225328. doi: 10.1371/journal.pone.0225328.
51. Redline RW, Faye-Petersen O, et al; Society for Pediatric Pathology, Perinatal Section, Amniotic Fluid Infection Nosology Committee. Amniotic infection syndrome: nosology and reproducibility of placental reaction

- patterns. *Pediatr Dev Pathol.* 2003 Sep-Oct;6(5):435-48. doi: 10.1007/s10024-003-7070-y.
52. Khong TY, Mooney EE, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Jul;140(7):698-713. doi: 10.5858/arpa.2015-0225-CC.
53. Mahe E, Hamid J, et al. Frozen section of placental membranes and umbilical cord: an aid to early postpartum diagnosis of intra-amniotic infection. *Am J Clin Pathol.* 2014 Aug;142(2):202-8. doi: 10.1309/AJCPYN70DLUFFDVP.
54. Parrella V, Paudice M, et al. Frozen Section of Placental Membranes and Umbilical Cord: A Valid Diagnostic Tool for Early-Onset Neonatal Sepsis Management. *Diagnostics (Basel).* 2024 May 31;14(11):1157. doi: 10.3390/diagnostics14111157.
55. Istruzione Operativa Ospedale Policlinico San Martino – U.O. Neonatologia: Criostato Urgente Placenta (2021 Aprile).
56. Istruzione Operativa Ospedale Policlinico San Martino – U.O. Neonatologia: Sepsi Neonatali Precoci (2023 Aprile).
57. Moftian N, Samad Soltani T, et al. Clinical Risk Factors for Early-Onset Sepsis in Neonates: An International Delphi Study. *Iran J Med Sci.* 2023 Jan;48(1):57-69. doi: 10.30476/IJMS.2022.92284.2352.
58. Guo L, Han W, et al. Perinatal risk factors for neonatal early-onset sepsis: a meta-analysis of observational studies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2023 Dec;36(2):2259049. doi: 10.1080/14767058.2023.2259049.

Ringraziamenti

Ringrazio il dott. Arioni e la dott.ssa Allodi per avermi accolta presso il Reparto della U.O. Neonatologia dell'Ospedale Policlinico San Martino e per avermi supportata nella stesura della tesi.

Ringrazio tutto il personale medico e infermieristico della U.O. Terapia Intensiva Neonatale e Patologia Neonatale dell'Istituto G. Gaslini per avermi dato la possibilità di trascorrere insieme numerosi mesi molto intensi, ma sicuramente molto formativi.

Grazie alla mia famiglia, sempre presente in ogni passo del mio percorso. Mamma, papà, Aurora, Renzo, Alba, i nonni. Siamo una famiglia allargata, ma quanto amore che ci circonda.

Grazie al mio compagno di vita, Lorenzo. Sono dieci anni che stiamo insieme e non potrei chiedere di più. Sei sempre il mio rifugio, il mio posto sicuro quando torno a casa.

Grazie alle mie amiche e colleghe, Clelia, Chiara, Alice e Simona. Clelia e Chiara, una conferma, Alice e Simona, una scoperta. Affrontare con voi questi cinque anni di specialità è stato molto più divertente. È un po' strano pensare che siamo arrivate alla fine. Siamo tutte diverse, ma in fondo simili. Un po' sciachele.

E infine, anche se non direttamente coinvolti in questo percorso di specializzazione, grazie agli amici di sempre, ai Tutti un po', a voi che ci siamo scelti e non ci siamo persi, che ogni volta che ci incontriamo è come se non fosse trascorso neanche un attimo dal giorno della laurea.