

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche



Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Anno Accademico 2019/2020

**“Batteriemie e micosi invasive in pazienti pediatrici affetti da leucemia acuta o sottoposti a trapianto di midollo allogenico. L’esperienza dell’Istituto G. Gaslini dal 2001 al 2019.”**

**“Bacteremias and invasive mycoses in pediatric patients with acute leukemia or receiving allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. The G. Gaslini Institute’s experience from 2001 to 2019.”**

**RELATORE:**

Chiar.mo Prof. Elio Castagnola

**CANDIDATA:**

Margherita Perucco

# Indice

1. Introduzione .....	3
1.1. Neutropenia .....	4
1.2. Mucosite e GvHD intestinale .....	5
1.3. Catetere venoso centrale (CVC) .....	8
1.4. Trapianto di cellule staminali emopoietiche .....	13
1.5. Definizioni: febbre e micosi invasive .....	15
1.6. Eziologia delle infezioni nel paziente emato-oncologico .....	19
1.6.1. Infezioni batteriche .....	19
1.6.2. Infezioni fungine .....	20
1.7. Siti di infezione .....	22
2. Materiali e metodi .....	24
3. Standard di cura .....	24
4. Analisi statistica .....	25
5. Risultati .....	26
6. Discussione .....	33
7. Ringraziamenti .....	36
8. Bibliografia .....	38

## Introduzione

I pazienti oncologici rappresentano probabilmente il miglior esempio di come una malattia e il suo trattamento possano compromettere la complessa rete immunologica che difende il nostro corpo dalle infezioni provenienti sia dall'ambiente esterno, sia da quello interno<sup>1</sup>.

Il trattamento “classico” delle neoplasie, soprattutto quelle ematologiche, prevede l'uso di chemioterapia che riduce la conta delle cellule leucemiche, ma che ha come grave effetto collaterale il blocco di tutte le cellule in rapida replicazione (per es. cellule “sane” del midollo osseo, cellule delle mucose). Da decenni sappiamo che un numero di granulociti inferiore a 500 cellule/mm<sup>3</sup> (e in particolare <100 cellule/mm<sup>3</sup>) è associato ad un aumento del rischio di gravi infezioni batteriche e fungine. Vi sono anche prove che i pazienti con una conta granulocitica tra 500 e 1000 cellule/mm<sup>3</sup>, soprattutto se in rapida diminuzione, sono ad alto rischio di complicazioni, perché la neutropenia non è un concetto statico ma dinamico.<sup>1</sup> Infatti, un'indagine sulla febbre in corso di neutropenia in bambini sottoposti a chemioterapia antineoplastica ha mostrato la presenza di gravi complicanze infettive (ad esempio, batteriemia o micosi invasiva) in soggetti con un conteggio dei granulociti tra 500 e 1000 cellule/mm<sup>3</sup>, suggerendo la presenza di una "zona grigia" che dovrebbe essere attentamente monitorata<sup>1</sup>.

Il rischio di complicanze infettive nei pazienti ematologici è sostenuto da vari fattori: dalla malattia oncologica sottostante che può causare di per sé modificazioni nei meccanismi di difesa (ad esempio, assenza di leucociti normali nel sangue a causa dell'infiltrazione leucemica del midollo osseo), dai danni alle barriere anatomiche, cute e mucose, dall'alterazione del microbiota, da procedure invasive come il posizionamento dell'accesso venoso, dalla tossicità della chemioterapia (neutropenia, linfocitopenia, mucosite) e forse anche dalla presenza di una qualche compromissione dell'immunità innata (ad esempio, livelli della “mannose-binding lectine” o polimorfismi dei “toll like receptors”). Neutropenia e mucosite sono di solito legate al tipo e all'intensità della chemioterapia tradizionale, mentre l'alterazione del microbiota è di origine multifattoriale.<sup>1</sup> Molti, se non tutti questi fattori possono essere presenti contemporaneamente e/o in sequenza nel corso della chemioterapia antineoplastica e quindi potrebbe essere difficile pesare il ruolo svolto da ogni singolo elemento nel determinare il rischio di una complicanza infettiva in un dato paziente e in un dato momento del trattamento antineoplastico<sup>2</sup>.

## Neutropenia

I fagociti sono una componente critica delle difese immunitarie innate dell'ospite contro i microrganismi<sup>3</sup>. Pertanto, qualsiasi alterazione della funzione o del numero di queste cellule, in particolare dei neutrofili, si tradurrà in un aumento del rischio di infezione. La neutropenia è definita dall'Infectious Diseases Society of America come un conteggio dei neutrofili  $<0,5 \times 10^9$  cellule/L o  $<1.0 \times 10^9$ /L con riduzione attesa a  $<0,5 \times 10^9$ /L entro 48 ore, mentre l'Organizzazione Mondiale della Sanità identifica quattro livelli di granulocitopenia: livello 0 (senza granulocitopenia) con più di 2.000 cellule, livello 1 (1.500-1.900 cellule), livello 2 (1.000-1.400), livello 3 (500-900) e livello 4 (inferiore a 500 cellule)<sup>3,4,5</sup>.

Il rischio di gravi complicanze infettive è maggiore durante agranulocitosi, cioè quando il numero di neutrofili scende al di sotto di  $0,1 \times 10^9$  cellule/L. Più lunga è la durata della neutropenia e maggiore è il rischio di infezione<sup>3,5</sup>. Una neutropenia profonda e prolungata (cioè neutropenia  $<0,5 \times 10^9$  cellule /L per più di 10 giorni) è considerata fattore di rischio maggiore sia per l'infezione batterica primaria e secondaria sia per le infezioni fungine.<sup>2</sup> Ad ulteriore prova di ciò i pazienti con neutropenia di durata inferiore a 7-10 giorni risultano a basso rischio di infezioni complicate<sup>1</sup>. Infatti, il 95% dei pazienti con neutropenia di durata inferiore a 1 settimana risponde alla terapia antibiotica empirica iniziale, mentre i due terzi di quelli con neutropenia per più di 2 settimane possono richiedere modifiche nel trattamento; anche il rischio di recidiva di febbre è sostanzialmente inferiore ( $<1\%$  contro  $38\%$ , rispettivamente)<sup>3</sup>.

Durante la neutropenia, la febbre si sviluppa praticamente in tutti i pazienti con tumori maligni ematologici e in circa la metà di quelli con tumori solidi. È probabile che più di due terzi degli episodi febbrili siano causati da infezione, che può verificarsi con o senza sintomi e segni focali. A causa della risposta infiammatoria compromessa, i classici segni di infezione (ad esempio dolore, calore, arrossamento e gonfiore) risultano spesso ridotti o addirittura assenti. Pertanto, la febbre è generalmente il primo e spesso l'unico segno di infezione<sup>3</sup>.

La febbre che si verifica durante la neutropenia probabilmente è il risultato del rilascio di citochine da parte delle cellule immunitarie e stromali residue, ad esempio cellule epiteliali, che percepiscono i microrganismi e i loro profili molecolari attraverso i recettori PRR (Pattern Recognition Receptors)<sup>6</sup>. Anche altri meccanismi fisiopatologici sono stati suggeriti e sono probabilmente implicati nella febbre durante la neutropenia. Una di queste ipotesi suggerisce che un sottoinsieme di neutrofili agisca da antiinfiammatorio, aumentando

i livelli di interleuchina IL-10, mentre altri neutrofili producono normalmente potenti molecole anti-infiammatorie come peptidi antimicrobici e antagonisti citochinici tra cui l'antagonista del recettore IL1 (IL1RN), che può attenuare l'infiammazione<sup>6</sup>.

## **Mucosite e GvHD intestinale**

L'invasione microbica nei pazienti pediatrici oncologici è facilitata dalla presenza di comorbilità, immunosoppressione e danni alle barriere anatomiche causati dal tumore stesso o indotti dalla chemioterapia, o conseguenti a forme intestinali di GvHD acuta (Graft versus Host Disease, la malattia del trapianto contro l'ospite)<sup>3,7</sup>.

La chemioterapia citotossica danneggia il rivestimento tissutale con perdita di integrità della barriera mucosale<sup>8</sup>; lo sviluppo della mucosite facilita quindi l'infezione da parte della flora commensale endogena<sup>3</sup>. Il danno alla barriera mucosale indotto dalla chemioterapia e dalle radiazioni è probabilmente la prima e più sostanziale violazione nelle difese dell'ospite<sup>9</sup>. Il processo è più complesso del solo effetto diretto della terapia citotossica su cellule con un alto indice mitotico e dell'effetto indiretto delle infezioni locali associate a peggioramento della neutropenia. Secondo alcuni studiosi la fisiopatologia della mucosite prevede cinque fasi sequenziali, ma sovrapposte, che culminano in danni ai tessuti e si manifestano clinicamente come mucosite. La fase iniziale comporta la generazione di radicali liberi e l'induzione di apoptosi cellulare epiteliale, che procede con un'up-regolazione di diversi geni con conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie (fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], IL-1 $\beta$  e IL-6) e culmina in un'amplificazione del segnale<sup>9</sup>. Il risultato netto è la fase di ulcerazione, in cui microrganismi e i loro pattern-molecolari-associati come il peptidoglicano e il lipopolisaccaride possono traslocare più facilmente attraverso la barriera fisica danneggiata e sono in grado di attivare i macrofagi tissutali nel produrre più citochine proinfiammatorie, esacerbando così i danni mucosali<sup>9</sup>.

La mucosite orale e gastrointestinale è quindi la manifestazione clinica della lesione della barriera mucosale, e la sua durata può definire meglio, rispetto alla neutropenia, il periodo a rischio di infezione, soprattutto in alcuni contesti (HSCT)<sup>10,7</sup>. La mucosite orale è caratterizzata da disturbi, come dolore e difficoltà nella deglutizione (disfagia), e da modificazioni anatomiche, come edema, eritema, ulcerazione, pseudomembrane e alterazioni della consistenza del muco con cambiamenti nella produzione di saliva (xerostomia). La mucosite gastrointestinale è accompagnata da nausea e vomito, diarrea, intolleranza all'alimentazione enterale e dolore addominale. Questo quadro clinico si traduce in una morbilità significativa e abbassa la qualità di vita per diverse

settimane dopo la chemioterapia citotossica<sup>10</sup>. La moderna chemioterapia citostatica e i regimi di condizionamento pre-HSCT contenenti metotrexato spesso provocano lesioni sostanziali alla mucosa e i regimi di condizionamento ad intensità ridotta (RIC) potrebbero non bastare nella riduzione del rischio<sup>3</sup>.

Diversi studi hanno dimostrato che il verificarsi di un danno alla barriera mucosale (MBI) ha un impatto preponderante nelle complicanze della terapia oncologica e, anche se indirettamente, illustrano l'influenza del danno mucosale sull'insorgenza di febbre<sup>6</sup>. Sonis et al. (2001) hanno dimostrato che in pazienti riceventi HSCT il numero di giorni con febbre e le infezioni precoci aumentano proporzionalmente con gradi più severi di mucosite<sup>6</sup>.

I microbi intestinali raggiungono il flusso sanguigno attraversando la mucosa dell'intestino che mostra segni di iper-permeabilità in questi pazienti<sup>6,8</sup>. Altri fattori, tra cui la composizione della flora microbica, la sovra crescita batterica e la concomitante disfunzione immunitaria, sembrano essere coinvolti. Tuttavia, a seguito della terapia citotossica, la relazione tra permeabilità intestinale e traslocazione batterica è abbastanza coerente, probabilmente perché la maggior parte dei pazienti è neutropenica al momento dell'insorgenza dell'MBI, e quindi la seconda linea di difesa costituita da cellule fagocitiche non è più in grado di impedire la traslocazione<sup>6</sup>.

La relazione tra MBI, risposta infiammatoria e febbre nei pazienti che ricevono un HSCT autologo ha dimostrato che l'infiammazione coincideva chiaramente con l'insorgenza e progressione della mucosite orale e intestinale. La febbre si è verificata 12 giorni dopo l'inizio del trattamento di condizionamento e ha coinciso con la presenza di gravi danni intestinali indipendentemente dalla presenza o assenza di batteriemia. Questo modello era simile a quello che si è visto tra i pazienti che ricevono chemioterapia per AML (Leucemia Mieloide Acuta)<sup>6</sup>.

Queste osservazioni sono state confermate in uno studio successivo con sei diversi regimi di condizionamento (Van Der Velden et al., 2010). Ancora una volta è stato osservato un chiaro pattern di infiammazione e febbre che ha coinciso con la progressione dell'MBI<sup>6</sup>.

Si è notata, infine, una forte correlazione tra l'entità della mucosite intestinale e l'evoluzione della proteina C-reattiva, un biomarcatore di infiammazione che è correlato con citochine pro-infiammatorie come IL8<sup>6</sup>.

La malattia acuta da rigetto di trapianto (aGVHD) è stata riportata fin dal 70% dei pazienti entro 100 giorni in seguito al trapianto (HSCT)<sup>11</sup>. Studi recenti hanno teso a confermare una convinzione longeva, ovvero che l'aGvHD sia associata a un aumento del rischio di infezione. Infezioni batteriche causate da organismi enterici risultano particolarmente pericolose, con un tasso di mortalità del 24-40%, nei trapiantati con allo-HSCT.

Nei modelli murini si è osservato che aGvHD provoca uno shift verso la predominanza di organismi Gram-negativi, con un associato elevato rischio di sepsi e un aumento della morbilità e della mortalità. Recentemente alterazioni del microbioma intestinale umano sono state identificate in pazienti affetti da aGvHD, anche se non è stato determinato se questi fattori aumentino il rischio di EB-BSI (Enteric Bacterial-Bloodstream Infection) e di mortalità, come ci si potrebbe aspettare<sup>11</sup>.

Evidenze simili sono state presentate da Tuar et al., che hanno esaminato il microbiota fecale di 94 pazienti prima e dopo allo-HSCT. Questi hanno dimostrato che c'è stata perdita di biodiversità e stabilità della flora intestinale durante il trapianto e ciò ha portato, in alcuni pazienti, al dominio intestinale di batteri patogeni (*Enterococcus* spp.) con successiva batteriemia<sup>11</sup>.

Tuttavia, rimane una scarsa letteratura che documenta che i pazienti con aGvHD sono, in realtà, soggetti ad aumento del rischio di batteriemia enterica. L'idea che il danno mucosale e la distruzione della flora intestinale osservata in casi di aGvHD faciliti la traslocazione batterica nel flusso sanguigno è ancora in corso di accertamento.

La neutropenia prolungata è un forte indicatore della precoce EB-BSI durante il periodo pre-trapianto. È stato osservato, al contrario, che l'elevato rischio di EB-BSI associati all'aGvHD persiste ben oltre a questa fase iniziale<sup>11</sup>.

Infine, è stato osservato che la mortalità trapianto-correlata a un anno (1 year-Transplant Related Mortality) era quasi due volte più alta in pazienti affetti da aGvHD che hanno sviluppato EB-BSI rispetto a quelli senza EB-BSI<sup>11</sup>.

Si suppone che aGvHD contribuisca alla TRM, in parte a causa del successivo aumento dell'EB-BSI che è stato documentato.

Sta diventando quindi chiaro che aGvHD peggiora l'outcome dei pazienti in parte anche alterando il microbioma intestinale. A causa dell'elevata morbilità e mortalità associata all'EB-BSI, efficaci strategie di prevenzione per i pazienti con rischio di infezione sarebbero

auspicabili. Strategie profilattiche come i probiotici che potrebbero prevenire l'EB-BSI nei pazienti dopo lo sviluppo dell'aGvHD dovrebbero essere studiate in prospettiva.

### **Catetere venoso centrale (cvc)**

I cateteri e i dispositivi intravascolari sono sempre più utilizzati per la somministrazione di fluidi, medicazioni, farmaci, emoderivati, nutrizione, per il monitoraggio dell'emodinamica e per l'emodialisi<sup>12</sup>. Tutti i tipi di cateteri intravascolari comportano un rischio di infezione. L'infezione del flusso sanguigno correlata al catetere (CRBSI) è diventata una delle principali cause di batteriemia e fungemia. La presenza di un catetere a lunga permanenza è stata identificata come un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di batteriemie<sup>13</sup>. Circa 3 pazienti su 1000 pazienti ricoverati nei reparti di terapia intensiva andranno incontro a batteriemia, e quasi un terzo di questi sono CRBSI<sup>12</sup>. Le CRBSI sono causa di infezioni associate all'assistenza sanitaria. L'attuazione di protocolli per la prevenzione può ridurre il 60-75% di queste infezioni; le strategie di prevenzione devono concentrarsi su colonizzazioni extraluminale ed endoluminale da parte di agenti patogeni<sup>11</sup>. Il rischio di infezione associato a dispositivi intravascolari varia con il dispositivo utilizzato. Cannule periferiche, di solito in posizione per un massimo di 72 ore, costituiscono un basso rischio di infezione del flusso sanguigno, anche se la frequenza del loro uso implica ancora una morbilità significativa. La maggior parte delle infezioni gravi correlate ai dispositivi intravascolari (CRBSI) sono associate ai cateteri venosi centrali (CVC). Cateteri tunnellizzati (che percorrono un tragitto sottocutaneo prima dell'accesso in vena) o impiantati chirurgicamente hanno tassi di infezione più bassi rispetto ai CVC non tunnellizzati<sup>12</sup>. Oltre al tipo di catetere utilizzato sono implicati nel rischio altri fattori, quali: la modalità di inserimento e le condizioni del paziente. I microrganismi tipici che causano la CRBSI sono stafilococchi coagulasi-negativi e *Staphylococcus aureus*, ma ne possono essere implicati molti altri tra cui *Candida* e altri funghi, nonché bacilli Gram-negativi e *Pseudomonas aeruginosa*<sup>12</sup>. La colonizzazione dei dispositivi intravascolari può avvenire per due vie. La prima è la colonizzazione extraluminale, originata dall'inserimento nel sito cutaneo e migrante lungo la superficie extraluminale. Questo è il meccanismo prevalente nei cateteri tenuti per brevi periodi come i CVC non tunnellizzati utilizzati più frequentemente nelle unità di terapia intensiva. La seconda via è la colonizzazione intraluminale, originata dalla colonizzazione del raccordo del catetere (hub), o da infusato contaminato, che è il meccanismo predominante nei dispositivi a più lungo termine, compresi i CVC tunnellizzati utilizzati per chemioterapia oncologica o nutrizione parenterale<sup>12</sup>. Meno comunemente i dispositivi si colonizzano attraverso la corrente sanguigna da un sito di infezione lontano. È

importante conoscere la probabilità relativa di ciascuna delle due vie principali di infezione per stabilire le misure preventive e la diagnosi in ogni particolare contesto clinico. La capacità dei microrganismi di formare un biofilm sulla superficie di un catetere intravascolare è utile per spiegare lo sviluppo e la persistenza della CRBSI. Le proteine superficiali delle cellule batteriche interagiscono con componenti della matrice extracellulare dell'ospite e successivamente producono polisaccaridi che fungono da adesine intercellulari. Il biofilm risultante comprende proteine ospiti, microcolonie degli organismi infettivi e la matrice extracellulare da loro prodotta, DNA extracellulare, e spesso componenti della matrice microbica accessoria che consente non solo la persistenza degli organismi in un ambiente relativamente protetto, ma anche qualche dispersione di organismi nell'ambiente circostante e nel flusso sanguigno. Gli antibiotici, anche a dosi molto alte, possono risultare insufficienti ad eliminare i batteri sessili all'interno di un biofilm.

Questo spiega perché gli antibiotici sistemici da soli spesso non risolvono l'infezione fino a quando il catetere non viene rimosso. La capacità di formazione del biofilm è una caratteristica di molti microrganismi e non si limita agli stafilococchi, che sono tra le specie dominanti nelle CRBSI. Diverse proprietà, oltre alla produzione di polisaccaridi extracellulari collegati alla superficie cellulare, facilitano la formazione di biofilm, a seconda delle proprietà superficiali, della capacità di attacco, dei nutrienti disponibili e dell'interazione con l'ambiente molecolare circostante. Le infezioni localizzate del catetere includono l'infezione del sito di ingresso, l'infezione del tunnel e l'infezione del reservoir o serbatoio che viene alloggiato in una "tasca" cutanea<sup>14</sup>. Queste infezioni possono presentarsi con segni di infiammazione, formazione di pus o cellulite franca. L'infezione locale può coesistere con l'infezione sistemica (la purulenza franca può essere predittiva di CRBSI), ma può anche esistere in modo indipendente. La stragrande maggioranza di CRBSI si verifica senza segni locali ma spesso si presentano febbre e brividi, con o senza sepsi grave o shock settico. Quindi la CRBSI deve essere sospettata in un paziente senza ovvia fonte alternativa di infezione. Colture di sangue che rivelano presenza di *Staphylococcus aureus*, stafilococchi coagulasi-negativi o specie *Candida* suggeriscono la diagnosi<sup>14</sup>. Le infezioni correlate al catetere sono prevenibili. Le strategie di prevenzione sono molteplici e si rivolgono sia alla colonizzazione extraluminale che a quella endoluminale. Possono includere l'uso di cateteri tunnellizzati o cateteri totalmente impiantati, soluzioni con ALT (antibiotici ad alta concentrazione che riempiono il lume) e cateteri rivestiti con antibiotici. I cateteri rivestiti di antimicrobici sono un'opzione aggiuntiva per la prevenzione delle infezioni se il tasso di CRBSI in un dato ospedale rimane elevato. L'ALT (Antibiotic Lock Therapy) rappresenta un'ulteriore opzione in individui in cui altri tentativi di prevenzione dell'infezione hanno

fallito. Prevede l'instillazione di antibiotici ad alta concentrazione (>100 volte la concentrazione minima inibitoria [MIC] dell'organismo) nel volume del lume del catetere. Questi vengono lasciati in loco per un periodo di diverse ore o addirittura giorni, mentre il catetere non è in uso<sup>12</sup>. Per la gestione pratica dei dispositivi intravascolari sono disponibili recenti linee guida prodotte da molte istituzioni nazionali e sovranazionali (quali ad esempio US Centers for Disease Control and Prevention Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)). Sono anche efficaci le implementazioni di linee guida locali, l'istruzione e la formazione del personale sulle misure chiave<sup>12</sup>. Da queste linee guida risulta, ad esempio, sicura ed economicamente sostenibile la sostituzione dei set di somministrazione endovenosa ogni 96 ore, viceversa la sostituzione del set per l'alimentazione parenterale dovrebbe avvenire ogni 24 ore, mentre i set impiegati per gli emoderivati devono essere smaltiti dopo l'infusione o dopo 12 ore<sup>12</sup>.

Per la diagnosi di infezione da CRBSI i parametri clinici del paziente risultano spesso inaffidabili. Febbre e brividi hanno scarsa specificità, mentre i classici locali segni di infiammazione nel sito del catetere sono specifici, ma hanno una scarsa sensibilità. La rimozione di un catetere in risposta al solo sospetto clinico in un paziente con febbre si traduce in una rimozione non necessaria nel 70-80% dei casi. Risulta quindi preferibile fare una diagnosi microbiologica legata al catetere, idealmente mentre il catetere stesso rimane in posizione<sup>12</sup>.

In assenza di shock settico è stato adottato un approccio di "attesa vigile" (senza rimozione del catetere) che, in uno studio randomizzato, si è dimostrato un'alternativa sicura alla rimozione immediata del CVC in pazienti in terapia intensiva<sup>12</sup>. La sua sicurezza è stata confermata in uno studio osservazionale multicentrico effettuato in 18 reparti di terapia intensiva spagnoli. Un'eccezione a questo approccio si verifica in quei pazienti in cui le conseguenze della mancata diagnosi di un'infezione legata al catetere sono potenzialmente più gravi<sup>12</sup>. Per escludere il catetere come fonte di febbre inspiegabile sono richieste tecniche diagnostiche con un elevato valore predittivo negativo.

Colture microbiologiche di sorveglianza della cute intorno al sito di inserimento del catetere e tamponi dei raccordi del catetere non sono in grado di prevedere l'infezione e pertanto, in assenza di sospetto clinico, questi metodi risultano inutili.

La coltura semiquantitativa della punta del catetere (tip) è il metodo più usato. Il segmento distale del catetere viene strisciato sulla superficie di una piastra di agar e incubato per 24-48 ore; la presenza di >15 CFU (unità formanti colonie) correla con segni locali di infiammazione nei pazienti studiati, la maggior parte dei quali aveva cateteri periferici a

breve termine piuttosto che CVC. Un significativo limite di questo metodo è il fatto che analizza solo la porzione extraluminale del catetere. L'accuratezza di questa tecnica nella diagnosi della CRBSI in CVC a lungo termine, per i quali la colonizzazione intraluminale è più importante, ha una sensibilità solo del 45%<sup>12</sup>.

Risultati migliori si ottengono vortexando la punta del catetere in 1 ml di acqua sterile. Ciò consente il rilascio di microrganismi da entrambe le superfici interne ed esterne del catetere. Una soglia di 103 CFU/ml è correlata a segni sistemici di infezione e presenta l'88% di specificità e il 97% sensibilità nei pazienti gravemente malati<sup>12</sup>.

La coltura quantitativa dei segmenti di catetere è un metodo ancora più preciso dei precedenti. Una meta-analisi ha mostrato sensibilità e specificità dell'82% e dell'89%, e dell'83% e il 97%, rispettivamente per i cateteri a breve e lungo termine. Sono affidabili anche le colture ematiche quantitative accoppiate al tempo differenziale di positività. Queste comportano il prelievo e la coltura contemporanea di sangue periferico e di sangue dal catetere.

Una coltura di sangue positiva del catetere con conta di colonie molte volte superiore a quello della coltura periferica è predittivo di CRBSI<sup>12</sup>. Si tratta di un test piuttosto accurato che richiede però molto lavoro e molto tempo e per questo spesso sostituito da una tecnica che utilizza un concetto analogo di tempo differenziale di positività (DTP), ma sfrutta delle macchine automatiche per la coltura del sangue che rilevano continuamente la "time to positivity" che risulta essere inversamente proporzionale all'inoculo. In definitiva si tratta di un metodo di stima delle differenze di carica batterica tra i due campioni; quando una coltura di sangue prelevata dal CVC diventa positiva almeno 2 ore prima di quella del sangue si ottiene una alta predittività di CRBSI<sup>12</sup>. Il DTP è stato convalidato in oncologia, ematologia e pediatria; esso dimostra una sensibilità dell'89% e una specificità dell'87% in cateteri a breve termine e rispettivamente il 90% e il 72%, per cateteri a lungo termine. Nella pratica quotidiana la sensibilità e la specificità tendono ad essere inferiori, ma il DTP rimane una tecnica semplice con costi aggiuntivi minimi<sup>12</sup>.

La rimozione del catetere, oltre alla terapia antimicrobica, rimane una componente terapeutica importante nei pazienti con shock settico e dove la linea del catetere è la più probabile fonte di infezione, oltre che nei pazienti con infezione profonda localizzata<sup>14</sup>.

Le infezioni causate da *Staphylococcus aureus* o *Candida* spp. hanno il più alto tasso di insuccesso con i cateteri lasciati in posizione, quindi anche in questi casi viene consigliata la loro rimozione. Lo stesso vale probabilmente per *Pseudomonas* e per altri Gram-negativi

aerobici. Anche infezioni da catetere complicate da trombosi settica, endocardite o osteomielite, richiedono la rimozione del catetere.

Nel caso di Stafilococchi coagulasi-negativi i trattamenti prolungati con antibiotici e antibiotic lock therapy possono avere successo senza rimozione della linea. Gli Stafilococchi coagulasi-negativi sono la causa più comune di CRBSI, ma anche i contaminanti più comuni. Per confermare la diagnosi di infezione (CRBSI) da Stafilococco coagulasi-negativo sono necessarie almeno due colture di sangue positive, di cui una dovrebbe essere da sangue periferico. Se il catetere è stato rimosso, il paziente risponde clinicamente bene e non presenta fattori di rischio specifici, una terapia antibiotica di 5-7 giorni è probabile che sia sufficiente. Se si preferisce mantenere il catetere e il paziente non presenta complicanze, è ragionevole e accettabile cercare di trattarlo con il catetere in situ. Le linee guida IDSA (Infectious Diseases Society of America) raccomandano 10-14 giorni di terapia antibiotica sistemica e lock therapy per cateteri non tunnellizzati o 7 giorni di antibiotico sistemico seguito da 14 giorni di lock therapy per i cateteri tunnellizzati<sup>12</sup>.

*Staphylococcus aureus* è associato ad infezioni, come la trombosi settica o l'endocardite. La durata del trattamento dipenderà dalla probabilità di tali complicazioni. La persistenza di febbre e/o batteriemia 72 ore dopo la rimozione del catetere e un adeguato trattamento antibiotico sono indice di complicanze. Per il trattamento di una batteriemia da *Staphylococcus aureus* non complicata si raccomandano non meno di 14 giorni di trattamento dopo la rimozione del catetere. Nei casi in cui è richiesto il mantenimento di un catetere tunnellizzato, in assenza di complicazioni e con un TEE negativo, le linee guida IDSA suggeriscono 14 giorni di antibiotici sistemici più la lock therapy<sup>12</sup>.

L'incidenza delle CRBSI da Gram-negativi è in aumento. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. sono i più comuni<sup>12</sup>.

L'aumento può essere in parte correlato alla crescita del numero di pazienti immunocompromessi con cateteri tunnellizzati a lungo termine. Studi prospettici hanno dimostrato alti tassi di ricaduta se il catetere non viene rimosso<sup>14</sup>. La presenza del catetere a lunga permanenza di tipo Broviac è stata identificata come un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di batteriemie.

Tutti i casi di infezione da *Candida* spp. correlata al catetere devono essere trattati con antifungini per evitare la pericolosa endoftalmite da candida o altre infezioni metastatiche. Gli studi prospettici hanno identificato il catetere come rischio di candidemia persistente o aumento della mortalità. La mancata rimozione del catetere è stata associata a scarsa risposta

agli antifungini in pazienti con tumore, a condizione che la candidemia fosse correlata al catetere<sup>12</sup>.

## **Trapianto di cellule staminali emopoietiche**

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è sempre più utilizzato per curare le neoplasie ematologiche e non ematologiche e le immunodeficienze primitive<sup>15</sup>, ma rappresenta una situazione peculiare per il rischio di infezione.

Molteplici pratiche, tra cui i diversi regimi di condizionamento, le diverse origini delle cellule staminali (donatore) e le strategie di assistenza e di supporto, impattano sulla gravità e la durata dei rischi infettivi, principali determinanti dell'*outcome*.

L'HSCT prevede la somministrazione di cellule staminali ematopoietiche in un ospite il cui sistema ematopoietico e immunitario siano stati sostanzialmente azzerati o fortemente ridotti da un regime preparativo citotossico e immunosoppressivo, regime di condizionamento somministrato in genere tra i 4-10 giorni prima del trapianto<sup>16</sup>. Le cellule staminali ematopoietiche sono ottenute dal paziente stesso (HSCT autologo) o da altri individui (HSCT allogenico).

L'HSCT autologo viene utilizzato con intento curativo o di prolungamento della sopravvivenza nel trattamento del mieloma multiplo, dei linfomi, di alcune leucemie, alcuni tumori solidi ad alto rischio (ad esempio, neuroblastoma, tumori delle cellule germinali). La sua efficacia dipende esclusivamente sia da intensità del regime condizionante che da sensibilità della malattia al regime di condizionamento<sup>13</sup>.

Nell'HSCT allogenico l'obiettivo primario è di eliminare le malattie maligne (o ricostituire un sistema immunitario o metabolico normale), i regimi convenzionali di condizionamento mirano ad essere altamente mieloablativi impiegando potenzialmente l'irradiazione totale del corpo (TBI) e la chemioterapia ad alte dosi. Inoltre è necessario sopprimere le cellule T del destinatario, che potrebbero in ultimo essere mediatrici del rigetto<sup>15</sup>. In questo contesto la grave e protratta neutropenia e le tossicità sugli organi direttamente correlate al regime di condizionamento, contribuiscono alle complicanze infettive<sup>15</sup>.

Nuovi regimi alternativi, a intensità ridotta o non mieloablativi sono sempre più impiegati. Il loro possibile successo si basa sul potenziale terapeutico degli effetti del GVHD, che sono prodotti quando le cellule immunitarie del donatore riconoscono e distruggono cellule tumorali dell'ospite, a volte in misura tale da portare ad una remissione completa. Sulla scia

di questi elementi sono stati sviluppati regimi di condizionamento alternativi che hanno meno tossicità e periodi neutropenici più corti.

L'HSCT allogenico presenta un rischio più elevato di fallimento rispetto all' HSCT autologo o l'insorgenza di GVHD (graft versus host disease, malattia da trapianto contro l'ospite) dovuta alla infusione delle cellule immunitarie di un altro soggetto<sup>16,17,18</sup>.

Tipo di donatore, regime immunosoppressivo post-trapianto e tipo diverso di cellule staminali hanno quindi un impatto sulla ricostituzione immunitaria e sui rischi di GVHD<sup>18,19,20</sup>. Il donatore e il livello di corrispondenza HLA del trapianto impattano sul rischio infettivo, primariamente stabilendo la probabilità e la gravità del quadro di GVHD, e di conseguenza la necessità e l'intensità della terapia immunosoppressiva<sup>17,18,21</sup>.

La composizione cellulare del trapianto allo stesso modo influisce sul rischio di infezione, con una quota variabile di successo dell'attecchimento dovuta alle diverse fonti di cellule staminali adottate (midollo osseo, sangue periferico, cellule staminali o sangue del cordone ombelicale) e alla eventuale manipolazione ex vivo delle stesse.

Uno studio multicentrico ha confrontato l'epidemiologia delle infezioni batteriche, virali e fungine nei bambini sottoposti a HSCT e nei bambini che hanno ricevuto terapia antineoplastica convenzionale per un periodo di 24 mesi consecutivi: rispetto al gruppo trattato con terapia convenzionale, il rischio nei pazienti post-HSCT era significativamente più elevato per tutte le infezioni batteriche, fungine e virali<sup>22</sup> ed era inoltre più alto nell'allo-HSCT rispetto all'auto-HSCT. Inoltre uno studio multicentrico su pazienti adulti ha suggerito che la maggior incidenza di infezioni batteriche nei riceventi HSCT dipende dal tipo di donatore ed è più alto nei pazienti dopo AD-HSCT (alternative-donor HSCT) rispetto a MRD-HSCT (matched related donor-HSCT) e più basso in auto-HSCT<sup>23</sup>. Risultati simili sono emersi da uno studio condotto all'Istituto Gaslini, nel quale più del 45% di AD-HSCT e meno del 25% di MRD-HSCT, sono stati complicati da un episodio infettivo. Ciò ha dimostrato che anche nei bambini il tipo di donatore è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di gravi infezioni<sup>21,24</sup>. Si noti per altro che l'incidenza di batteriemia è stata maggiore durante i primi 30 giorni dopo HSCT e soprattutto durante i primi 20, quando tutti gli episodi si sono verificati in presenza di neutropenia<sup>25</sup>.

Il fatto che i destinatari di AD-HSCT abbiano un rischio più elevato non è sorprendente ed è probabilmente dovuto alla più aggressiva profilassi GVHD, all'immunosoppressione determinata dal trapianto di per sé e alla presenza, all'estensione e alla gestione del GVHD<sup>20,23,26,27</sup>.

Nel periodo post-trapianto, la batteriemia rappresenta un problema principalmente per i destinatari del trapianto allogenico, a causa della presenza di molti altri fattori di rischio. La presenza e gravità di GVHD e la sua gestione, la neutropenia causata dalla scarsa mobilizzazione dal midollo osseo o dal rigetto del trapianto, la somministrazione di farmaci per il trattamento delle complicanze, la presenza di asplenia funzionale sono tutti fattori che possono essere presenti allo stesso tempo o in sequenza nello stesso paziente, e che possono aumentare ulteriormente il rischio di batteriemie ad esordio tardivo.

È presumibile che l'utilizzo di nuovi donatori alternativi (trapianto aploidentico) con o senza immunosoppressione concomitante possa ulteriormente modificare questo contesto, specie nelle fasi post-attecchimento.

### **Definizioni: episodi di infezione/febbre e micosi invasive**

Il problema più recente nell'ambito della gestione delle infezioni nel paziente sottoposto a chemioterapia o HSCT è rappresentato dalla crescente resistenza batterica agli antibiotici, questione che ha il potenziale per cambiare sostanzialmente la profilassi e i protocolli di trattamento. Agenti patogeni resistenti agli antibiotici come i Gram negativi in particolare *Enterobacteriales* e *P. aeruginosa* resistenti ai fluorochinoloni e ai carbapenemi, *Pseudomonas* resistente alle cefalosporine di terza generazione, *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* resistente alla meticillina, *S. aureus* e enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), si stanno diffondendo nei pazienti oncologici, come casi sporadici o epidemie che si verificano quasi ovunque nel mondo<sup>1</sup>.

Episodi febbrili in corso di chemioterapia, specialmente nei periodi di neutropenia, devono essere considerati di origine infettiva fino a prova contraria e sono generalmente classificati in base alla presenza o assenza di documentazione microbiologica o clinica in: (1) infezioni microbiologicamente documentate (MDI) con batteriemia (tabella 1), (2) MDI senza batteriemia (isolamento di un patogeno definito in un sito di infezione ben identificato e diverso dal sangue), (3) infezioni clinicamente documentate (CDI), in presenza di un quadro clinico chiaramente infettivo, ma senza dimostrazione microbiologica e (4) febbre di origine sconosciuta o inspiegabile (FUO), quando mancano prove microbiologiche ma il corso clinico è compatibile con un'infezione<sup>2</sup>. Analoghe classificazioni sono state effettuate per quanto riguarda le micosi invasive (IFD) che rappresentano una sfida importante nei pazienti oncologici, ma che sono spesso di difficile diagnosi a causa di segni clinici e sintomi aspecifici. Per le micosi è stata proposta una definizione basata su tre livelli: "certa",

"probabile" e "possibile" IFD, utilizzabile negli studi epidemiologici e interventistici che è diventata linguaggio comune anche nella pratica clinica quotidiana. I fattori considerati per definire i tre livelli sono: a) criteri relativi al paziente (*host factors*), cioè caratteristiche di base del paziente, in particolare relative al tipo e grado di immuno-compromissione, b) criteri clinici (*clinical features*), cioè caratteristiche cliniche e radiologiche di presentazione della malattia, c) criteri microbiologici (*mycological evidence*), cioè test diretti (microscopia diretta, coltura) e indiretti (antigeni, costituenti della parete fungina). Si definisce "certa" (o documentata) la situazione in cui si dimostra la presenza di elementi fungini all'interno del tessuto infetto attraverso analisi microscopica (esami istologici, citologici o microscopici diretti), coltura (in sito sterile), emocoltura, presenza di acido nucleico del tessuto tramite PCR. La micosi si definisce "probabile" in presenza di almeno un criterio relativo al paziente, un criterio clinico e un criterio microbiologico non compreso nella definizione precedente (per es. presenza di antigeni fungini nel sangue o nel broncolavaggio, ma con coltura negativa). Si definisce "possibile" l'infezione in presenza di almeno un criterio relativo al paziente e un criterio clinico, in assenza di criteri microbiologici. La categoria di IFD "certa" può essere applicata a qualsiasi paziente, indipendentemente dal fatto che il paziente sia immunocompromesso. Le categorie "probabile" e "possibile" sono proposte solo per i pazienti immunocompromessi, ad eccezione delle micosi endemiche<sup>24</sup>. Come criterio microbiologico per la diagnosi di aspergillosi invasiva nei pazienti oncologici viene ora ampiamente utilizzato il test ELISA per la ricerca di galattomannano (antigene aspergillare solubile)<sup>2</sup>. La figura 1 riporta la definizione di infezioni batteriche e fungine.

Type of infection	Definition
<b>Bacterial infections</b>	
Bacteremia	Isolation of a bacterial or fungal pathogen from at least one blood culture, in the presence of clinical signs of infection, including at least one of the following conditions: Fever (>38 °C) Systolic blood pressure <60 mmHg Signs of localized infection (inflammation) in a major organ/system. For coagulase-negative staphylococci, corynebacteria other than <i>Corynebacterium jeikeium</i> , and other common skin contaminants, at least two sets of positive blood cultures (at least one bottle for each set) are required, unless the same pathogen is concomitantly isolated from another site of infection.
Polymicrobial bacteremia	Isolation of two or more pathogens in a single blood culture or in at least two separate blood cultures obtained 24 h apart
<b>CVC-related infections</b>	
Infection of the "emergence"	Cellulitis from the cuff to the skin emergence of the partially tunneled CVC*
Infection of the tunnel or pocket	Cellulitis or abscess around the tunnel (Hickman-Broviac type etc.) or involving the port pocket*
CVC-related bacteremia	CVC-associated bacteremia without any evidence of skin and soft tissue infection
<b>Fungal infections</b>	
<b>Invasive fungal disease (IFD)</b>	
Proven IFD	Positive culture from a sterile site and/or histopathological evidence Only for disseminated cryptococcosis – the presence of cryptococcal antigen in the cerebrospinal fluid
Probable IFD	Presence of 1 host factor + 1 clinical criterion + 1 mycological criterion
Possible IFD	Presence of 1 host factor + 1 clinical criterion
Host factors	Neutropenia temporally related to the onset of IFD Prolonged use of corticosteroids at a mean minimum dose of 0.3 mg/kg/day of prednisone equivalent for >3 weeks Allogeneic hemopoietic stem cell transplant Treatment with other recognized T cell immunosuppressants, such as cyclosporine, TNF- $\alpha$ blockers, specific monoclonal antibodies such as alemtuzumab, or nucleoside analogues during the past 90 days Inherited severe immunodeficiency
Clinical criteria	For pulmonary aspergillosis, presence of one of the following lesions on the CT scan: Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign Air-crescent sign Cavity NB. Fever is not a predisposing condition but a clinical feature that is nonspecific for IFD.
Mycological criteria	Presence of molds in sputum or bronchoalveolar lavage Indirect tests for detection of antigens or cell-wall constituents like galactomannan (in serum, bronchoalveolar lavage or cerebrospinal fluid) or 1-3- $\beta$ -D-glucan in serum.

\*All pocket or tunnel infections can subsequently be a cause of bacteremia

Figura 1: Definizione di infezioni batteriche e fungine in pazienti pediatrici post chemioterapia antineoplastica<sup>2</sup>.

La conoscenza dell'incidenza della febbre e delle infezioni documentate nei pazienti oncologici in base al tipo di malattia e alla chemioterapia è necessaria per l'implementazione di efficaci strategie di gestione e di profilassi<sup>1</sup>. Tuttavia, la stragrande maggioranza dei dati epidemiologici su questi pazienti proviene da studi su terapia antibiotica o profilassi, in cui i pazienti sono stati selezionati secondo criteri di inclusione ed esclusione<sup>1</sup>. Quindi questo approccio potrebbe non essere adeguato a descrivere la situazione epidemiologica in contesti reali. Inoltre, poche informazioni sono disponibili sui pazienti non-neutropenici. I dati epidemiologici sull'incidenza delle infezioni sono solitamente riportati come percentuali di eventi su un determinato numero di pazienti o trattamenti, senza tener conto del periodo di rischio. Ciò è probabilmente non corretto perché la durata dell'esposizione è fondamentale per comprendere l'impatto clinico di un determinato fenomeno. Probabilmente sarebbe più appropriato parlare di tassi di incidenza, cioè del numero di eventi durante un determinato periodo di rischio (di solito 1000 giorni). Per esempio, i dati sui tassi di complicanze infettive che rappresentano il numero di giorni a rischio, consentirebbero una corretta valutazione della fattibilità della profilassi antimicrobica e il confronto del rischio infettivo tra diversi coorti o diversi regimi di trattamento. Sfortunatamente, tali studi sono stati fatti solo raramente. Studi pediatrici hanno riportato tassi di infezione o episodi febbrili che vanno da 12 a 31,1 ogni 1000 giorni a rischio, essendo i valori più elevati registrati in caso di trattamento aggressivo per la leucemia acuta e nelle fasi di neutropenia dei trapianti autologhi. Il tasso di batteriemia variava, rispettivamente, da 3,2 a 18,9 negli adulti e da 0,9 a 5,1 nei bambini. Il tasso di IFD negli studi pediatrici variava da 0,1 a 0,84, ed era 2,4 in uno studio che includeva sia bambini che adulti. Questi dati dimostravano che il tasso di incidenza e la percentuale di complicanze infettive erano principalmente legate all'intensità della chemioterapia antineoplastica<sup>1</sup>.

L'aggressività del trattamento ha un ruolo significativo per lo sviluppo di neutropenia febbrile nei bambini con AL/NHL (leucemia acuta/linfoma non hodgkin), mentre la conta dei neutrofili all'esordio dell'episodio febbrile è il principale fattore di rischio nei bambini con tumore solido<sup>22</sup>. Il tasso di complicanze infettive gravi nei bambini leucemici è strettamente correlato con il tipo di leucemia con un tasso più alto in pazienti con AML (leucemia mieloide acuta) rispetto a pazienti con ALL (leucemia linfoblastica acuta) e il tasso di infezione aumenta con l'aumentare dell'intensità di trattamento<sup>1,27,28,29</sup>.

Un nuovo problema in rapida crescita è rappresentato da pazienti (di solito con leucemia cronica o mieloma multiplo) che sono trattati con nuove terapie biologiche come imatinib,

dasatinib, ibutrinib, rituximab, ruxolitinib, e altri<sup>1</sup>. Questi nuovi farmaci hanno il potenziale per modificare il profilo di rischio dell'infezione, con un pericolo crescente per infezioni causate da patogeni rari, come *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium tuberculosis*, o miceti<sup>1</sup>.

## **Eziologia delle infezioni nel paziente emato-oncologico**

Studi di sorveglianza sugli agenti patogeni che causano infezioni nei pazienti oncologici sono della massima importanza per l'attuazione delle strategie di gestione. Gli studi su larga scala sono ovviamente cruciali perché possono fornire informazioni sulle tendenze mondiali, ma i rapporti di sorveglianza sui singoli centri (ospedali) possono essere ancora più importanti, perché ogni regione, paese o singoli ospedali hanno peculiarità legate al tipo di paziente, tipo di cura, precedenti politiche antibiotiche locali e resistenze agli antibiotici riscontrate. La maggior parte delle informazioni disponibili riguarda agenti patogeni batterici e funghi isolati in emocoltura, mentre il ruolo delle infezioni profonde e l'impatto delle infezioni virali risultano meno noti<sup>1</sup>.

## **Infezioni batteriche**

Negli ultimi 30 anni i batteri Gram-positivi sono stati gli agenti patogeni che più frequentemente hanno causato infezioni del flusso sanguigno nei pazienti oncologici<sup>3</sup>. Tuttavia più recentemente è stato riportato un aumento delle batteriemie causate da agenti Gram-negativi che sono diventati predominanti, o almeno altrettanto frequenti, rispetto ai Gram-positivi<sup>3</sup>. Questa tendenza è stata osservata anche in studi di sorveglianza eseguiti nel 2011 in 39 centri ematologici europei provenienti da 18 paesi appartenenti alla rete della Conferenza Europea delle Infezioni Leucemiche (ECIL)<sup>1</sup>. Questo studio ha rilevato che patogeni Gram-negativi e Gram-positivi sono isolati con frequenze simili, rispettivamente del 60%/40% nelle infezioni del flusso sanguigno, e del 55%/45% nella sorveglianza dell'ECIL e in analisi della letteratura<sup>1</sup>. Questi cambiamenti nell'eziologia sembravano essere associati a un importante e allarmante aumento della percentuale di agenti patogeni resistenti<sup>9</sup>. I batteri anaerobi sono stati isolati in meno dell'1% delle emocolture positive nei pazienti oncologici, ma la percentuale può aumentare al 3% tra quelli sottoposti a chirurgia addominale. Gli anaerobi sono di solito isolati in batteriemie polimicrobiche, specialmente insieme a batteri Gram-negativi aerobi, con un tasso che sembra essere superiore a quello osservato in pazienti non oncologici sottoposti a chirurgia simile (rispettivamente 0,597 vs. 0,033 per 1000 giorni di ospedalizzazione)<sup>1</sup>. Sono state anche riportate differenze nell'eziologia dell'infezione batterica tra pazienti oncologici neutropenici e non-neutropenici<sup>1</sup>.

Le batteriemie correlate al CVC (Catetere Venoso Centrale) sono generalmente causate da cocchi Gram-positivi (in particolare stafilococchi coagulasi-negativi), che sono stati isolati in oltre il 50% degli episodi<sup>1</sup>.

Non sono rare le infezioni polimicrobiche con una predominanza di batteri Gram-negativi. Nella tabella 1 sono riportati i patogeni più comuni nei pazienti neutropenici.

## **Infezioni fungine**

Si tratta per lo più di infezioni secondarie in pazienti con neutropenia prolungata e profonda<sup>30</sup>. Rappresentano il 5% di episodi infettivi, specialmente nei pazienti con midollo osseo malfunzionante<sup>3</sup>. Inoltre i funghi spesso non crescono in cultura e quindi, in base all'esame istologico e morfologico, è spesso possibile solo una diagnosi descrittiva (ad esempio, "infezione dovuta a funghi filamentosi")<sup>2</sup>. Oltre il 90% di tutte le micosi invasive sono causate da *Candida* spp. (principalmente *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. kefyr*) e *Aspergillus* spp. (principalmente *A. fumigatus* e *A. flavus*), che rappresentano rispettivamente il 30-80% e il 10-60% degli episodi<sup>3</sup>. Tra le muffe, *Aspergillus* spp. rappresenta l'organismo più frequentemente isolato o sospetto. La maggior parte degli episodi sono causati da *Aspergillus fumigatus*, anche se alcuni centri segnalano una predominanza di infezioni causate da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus terreus*<sup>6</sup>. Negli individui sani i conidi di *Aspergillus* sono intrappolati nelle vie respiratorie superiori e solo una piccola parte di essi nelle vie aeree inferiori dove questo fungo può diventare un allergene<sup>1</sup>. Nei pazienti immuno-compromessi, in particolare quelli con neoplasie maligne o a seguito di trapianto di midollo allogenico (HSCT), le spore possono germinare e la malattia diventare invasiva. Quindi l'aspergillosi invasiva in pazienti oncologici o trapiantati (HSCT) è una malattia endemica che di solito viene acquisita in comunità, anche se possono comunque verificarsi infezioni esogene associate a massicce esposizioni ambientali dentro e fuori l'ospedale<sup>1</sup>.

L'incidenza dell'aspergillosi invasiva dipende dall'età del paziente (è minore nei bambini con meno di 10 anni), si presenta nelle forme più gravi nei pazienti oncologici con neutropenia prolungata, seguiti da quelli che sono stati sottoposti a terapia steroidea<sup>1</sup>.

Altri agenti patogeni fungini includono *Pneumocystis jirovecii*, criptococchi e muffe come *Mucorales* o *Fusarium*<sup>1</sup>. Nella tabella 1 sono riportati i patogeni fungini più frequenti nei pazienti neutropenici.

<b>GRAM-POSITIVE AEROBIC BACTERIA</b>
<b>Coagulase-negative staphylococci</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Viridans streptococci</b>
<b>Other streptococci (<i>Strep. pneumoniae</i>, <i>Strep. pyogenes</i>)</b>
<b>Enterococcus species</b>
<b><i>Corynebacterium</i> spp. (<i>C. jeikeium</i>)</b>
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>
<b>GRAM-NEGATIVE AEROBIC BACTERIA</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>
<b><i>Klebsiella</i> spp.</b>
<b><i>Pseudomonas</i> spp.</b>
<b>Other Enterobacteriaceae (<i>Proteus</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i>, <i>Citrobacter</i> spp.)</b>
<b>ANAEROBIC BACTERIA</b>
<b><i>Bacteroides</i> spp.</b>
<b><i>Clostridium</i> spp.</b>
<b><i>Fusobacterium</i> spp.</b>
<b><i>Propionibacterium</i> spp.</b>
<b>FUNGI</b>
<b><i>Candida</i> spp.</b>
<b><i>Aspergillus</i> spp.</b>
<b>Other molds (<i>Fusarium</i>, <i>Pseudallescheria boydii</i>, <i>Scedosporium</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Mucor</i> spp.)</b>
<b><i>Pneumocystis jirovecii</i></b>
<b>VIRUSES</b>
<b>Herpes simplex virus</b>
<b>Varicella-zoster virus</b>
<b>Respiratory viruses (influenza, respiratory syncytial virus)</b>
<b>PARASITES</b>
<b><i>Strongyloides stercoralis</i></b>
<b>Other parasites in endemic areas (e.g. <i>Leishmania</i>)</b>

Tabella 1: Gli agenti infettivi più frequenti nei pazienti neutropenici<sup>3</sup>.

## Siti di infezione

I primi siti di infezione che si osservano nei pazienti neutropenici alla comparsa di febbre sono il flusso sanguigno, il cavo orale e il rinofaringe, la cute e i tessuti molli, le vie respiratorie, il tratto gastrointestinale e le vie urinarie. Le infezioni del flusso sanguigno rappresentano l'80-90% delle MDI<sup>3</sup>. Nelle infezioni primarie del flusso sanguigno la fonte rimane sconosciuta, ma le barriere fisiologiche interrotte (le membrane mucose del tratto gastrointestinale e della cute) sono i più probabili portali di ingresso. I batteri rappresentano oltre il 90% delle infezioni del flusso sanguigno<sup>3</sup>. Un singolo microrganismo è implicato nella maggior parte delle infezioni del sangue; le infezioni polimicrobiche si verificano in circa il 5-10% dei casi. Con la rapida somministrazione di antibiotici empirici appropriati all'insorgenza della febbre (cosiddetta terapia empirica) oggi si verificano raramente gravi complicazioni e i tassi di mortalità variano tra l'1% e il 3%. Tuttavia, è stata osservata una mortalità fino al 60% nei pazienti con infezioni da Gram-negativi multifarmaco-resistenti a causa del ritardo nell'inizio di una terapia appropriata, basata sull'antibiogramma<sup>3</sup>.

La frequenza e la gravità delle infezioni del cavo orale e della faringe sono correlate al grado di danno alle mucose indotto dalla chemioterapia citotossica. Mucose di bocca e faringe sono fortemente colonizzate con streptococchi viridanti, bacilli Gram-positivi, e bacilli aerobi e anaerobi Gram-negativi. La perdita di integrità della barriera mucosa è un importante sito di ingresso per l'infezione<sup>16</sup>.

Le infezioni primarie della cute e dei tessuti molli spesso risultano dalla rottura dell'integrità della barriera cutanea per mezzo di punture di aghi o dispositivi intravascolari<sup>16</sup>. I cateteri endovenosi, soprattutto quelli inseriti per periodi prolungati, sono le principali fonti di infezione, che più comunemente insorgono nel sito di entrata, ma possono anche occasionalmente interessare la sezione tunnellata del dispositivo (cateteri parzialmente - Hickman Broviac- o totalmente impiantabili -port). Le manifestazioni cliniche includono dolore ed eritema. I microbi della flora cutanea sono i patogeni più frequenti.

Una delle infezioni più gravi nei pazienti oncologici, soprattutto in presenza di neutropenia, è la polmonite. A causa della ridotta risposta infiammatoria, i classici sintomi e segni della polmonite (febbre, tosse, dispnea, dolore toracico, espettorato e infiltrazioni radiologiche) sono spesso attenuati o ritardati. Le polmoniti ad esordio precoce sono sovente di origine batterica, mentre le polmoniti ad esordio tardivo sono più probabilmente causate da funghi o da altri agenti patogeni opportunisti<sup>31</sup>. La sindrome da distress respiratorio dopo la batteriemia da streptococchi viridanti è una classica complicanza polmonare nei pazienti neutropenici con febbre<sup>3</sup>. Questa sindrome si verifica nonostante un'adeguata terapia

antibiotica ed è associata ad un'insufficienza respiratoria tale da richiedere ventilazione meccanica<sup>3</sup>. L'osservazione di una lesione polmonare cavitaria in un paziente neutropenico deve sollevare il sospetto di un'eziologia batterica, soprattutto in presenza di emocolture positive (ad esempio, *S. aureus* o Gram-negativi, principalmente gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (KES) o *Pseudomonas*)<sup>2</sup>. Al contrario, i funghi causano la maggior parte di focolai infiltranti: le lesioni fungine precoci in un paziente neutropenico possono presentare un macronodulo, circondato da un perimetro di opacità di vetro smerigliato di natura emorragica (cosiddetto halo-sign). Queste caratteristiche radiologiche suggeriscono la presenza di una micosi da funghi filamentosi<sup>2</sup>. Infiltrazioni alveolari o interstiziali con ridotta saturazione di ossigeno nel sangue in pazienti non neutropenici sono tipiche della infezione da *Pneumocystis jiroveci* che causa diffusione e malattia polmonare ipossiémica nei pazienti oncologici<sup>3</sup>. Il quadro clinico è caratterizzato dall'insorgenza subacuta di febbre, tosse e dispnea.

Il tratto gastrointestinale è il più grande serbatoio di microrganismi del corpo umano: la flora gastrointestinale endogena gioca un ruolo cruciale nella patogenesi dell'infezione nei pazienti neutropenici.<sup>3</sup> I danni alle mucose indotti dalla chemioterapia sono un importante sito di ingresso delle infezioni sistemiche. La mucosite intestinale si suppone che sia il primo passo della traslocazione batterica, meccanismo attraverso il quale i batteri intestinali migrano nel sistema linfatico mesenterico e possono invadere il flusso sanguigno<sup>2</sup>. Di conseguenza, oltre alla febbre, i pazienti neutropenici possono presentare segni e sintomi gastrointestinali come dolore addominale, nausea, vomito o diarrea, con un'incidenza complessiva di infezioni addominali vicina al 20%<sup>2</sup>. L'esofagite e l'enterocolite sono i due siti di infezione più frequenti.

Le infezioni delle vie urinarie non sono frequenti nei pazienti neutropenici e sono principalmente dovute a comuni uropatogeni, come le *Enterobacteriales*<sup>3</sup>.

Le infezioni del sistema nervoso centrale, dell'occhio, del cuore, dei vasi sanguigni e delle ossa sono piuttosto rare nei pazienti neutropenici. Esse comprendono le meningiti batteriche e le lesioni cerebrali focali fungine o parassitarie.

Scopo della presente tesi di laurea è stato quello di valutare le caratteristiche delle batteriemie e delle IFD osservate nei bambini sottoposti a chemioterapia per malattia ematologica maligna o linfoma non-Hodgkin o a HSCT presso l'Istituto Giannina Gaslini, Genova.

## **Materiali e Metodi**

I dati sull'eziologia delle batteriemie e delle IFD nei bambini sottoposti a chemioterapia o a HSCT all'Istituto Giannina Gaslini (IGG) sono disponibili dal 1982 e sono stati registrati, in forma anonima, su un apposito database fino al 2019.

Per lo studio oggetto della presente tesi di laurea sono stati considerati gli episodi registrati nel periodo 2001-2019 in pazienti sottoposti a chemioterapia per leucemia acuta (mieloide o linfoblastica), linfoma non-Hodgkin o sottoposti a HSCT autologo o allogenico.

Per ogni singolo episodio, oltre all'anno di osservazione, sono stati estratti i dati riguardanti malattia di base (raggruppata in base al tipo di trattamento in ALL e NHL per farmaci e protocolli simili, e AML), tipo di eventuale HSCT (in base al tipo di donatore stratificato in autologo, allogenico MRD, AD da cordone o aploidentico), presenza GvHD nei soggetti allo-trapiantati, presenza di neutropenia all'episodio<sup>24</sup>, correlazione della batteriemia o della IFD con il CVC<sup>23</sup>. È stata quindi valutata l'eziologia delle batteriemie e delle IFD e per queste ultime il grado di documentazione (stratificato in documentate/probabili e possibili)<sup>14</sup>.

Per ogni episodio è stato quindi valutato l'esito finale (vivo, morto) entro 15 giorni dalla diagnosi di batteriemia o entro 3 mesi dalla diagnosi di IFD.

È stata analizzata, per anno di osservazione, la frequenza degli episodi di batteriemia e IFD, associati a neutropenia o presenza di CVC e rapportandoli al numero di dimissioni dal dipartimento di emato-oncologia, esprimendo il risultato come tasso di episodi/100 ricoveri. Infine, è stato valutato l'andamento della mortalità in rapporto all'anno di osservazione e al tipo di infezione.

### **Standard di cura**

Nel corso del periodo di studio sono state effettuate diverse modifiche dell'approccio di profilassi delle infezioni in corso di neutropenia o nel periodo post HSCT.

In particolare, per quanto riguarda le infezioni batteriche

- nel periodo dal 2004 al 2010, è stata introdotta la profilassi con amoxicillina-clavulanato per via orale o ampicillina-sulbactam endovena per la prevenzione della febbre nei pazienti sottoposti a chemioterapia aggressiva per leucemia acuta/linfoma e nei pazienti sottoposti a regimi di condizionamento per l'HSCT. Dal 2011 al 2019, questa profilassi è stata somministrata solo ai pazienti riceventi HSCT.

Per le infezioni micotiche, invece,

- la profilassi con fluconazolo è stata effettuata nei pazienti HSCT per tutto il periodo, fino al 2019,
- dal 2002 pazienti emato-oncologici o sottoposti a HSCT erano ricoverati in reparti con aria condizionata e filtrata con filtri ad alta efficienza (HEPA).

La terapia empirica iniziale della neutropenia febbrile è stata l'associazione di amikacina con ceftriaxone o ceftazidime fino al 2005 mentre la monoterapia con piperacillina-tazobactam ha rappresentato lo standard per la terapia empirica iniziale della neutropenia febbrile dal 2006 al 2010 ed è poi stata sostituita dalla terapia di combinazione piperacillina-tazobactam + amikacina dal 2011 a seguito di valutazioni epidemiologiche riguardo alla sensibilità dei patogeni isolati nelle batteriemie.

La gestione delle micosi invasive ha previsto l'utilizzo di una terapia empirica antifungina fino al 2005 con somministrazione di farmaci antifungini nel paziente persistentemente febbrile e neutropenico, mentre dal 2006 si è attuato un approccio guidato dalla diagnostica (per immagini e indiretta con ricerca di antigeni micotici).

Infine a partire dal 2015 si è progressivamente ridotto l'utilizzo di CVC tipo Hickman-Broviac in silicone, che sono stati sostituiti con cateteri tipo PICC (cateteri centrali ad inserzione periferica) in poliuretano, che presentano un minor rischio di infezione.

### **Analisi statistica**

I dati sono stati raggruppati su fogli di calcolo Microsoft Excel (Redmond, WA, USA).

Le variabili categoriche sono state analizzate attraverso il test del chi-quadro o test esatto di Fisher, in rapporto alla numerosità del campione analizzato. Le variazioni dei tassi nel corso dello studio sono state valutate utilizzando il test non parametrico di Spearman ( $r_s$ ).

L'analisi statistica è stata effettuata attraverso l'utilizzo della piattaforma web "socstatistics.com".

Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati significativi, i test eseguiti sono stati "a due code".

## Risultati

Durante il periodo in studio, sono stati osservati 741 episodi: 586 (79%) batteriemie e 155 (21%) IFD.

La tabella seguente (1) riporta i dati riguardanti l'età dei pazienti alla diagnosi dell'episodio infettivo.

	Batteriemie	Micosi invasive
Eventi (n=741)	586 (79%)	155 (21%)
Età mediana in anni (IQR)	6,83 (3,58-12,83)	9,98 (5,18-14,14)
Range (min-max)	0,3-25,5	0,6-20,7

**Tabella 1**

Nelle 586 batteriemie sono stati isolati 602 ceppi batterici; queste sono risultate nel 49% dovute a un singolo patogeno Gram-positivo (n=287), nel 46% a un singolo patogeno Gram-negativo (n=270), mentre nel 5% (n=29) si è trattato di infezioni miste, con isolamento di 64 patogeni totali. I patogeni più frequentemente isolati sono risultati, nell'ordine, gli stafilococchi coagulasi negativi (n=133, 22%), *E.coli* (n=97, 16,1%), gli streptococchi viridanti (n=78, 13%), *P.aeruginosa* (n=58, 9,6%), *K.pneumoniae* (n=36, 6%), *S.aureus* (n=35, 5,8%), *Enterococcus* spp. (n=25, 4,1%), *E.cloacae* (n=18, 3%), *S. maltophilia* e *K.oxytoca* (n=8, 1,3% per entrambi).

Per le IFD le forme probabili/documentate sono state 101 (65%) e le forme possibili sono state 54 (35%). Le prime sono risultate nel 36,4% (n=36) dovute ad *Aspergillus*, nel 18,2% (n=18) dovute a funghi filamentosi, nel 10,1% dovute a *Candida parapsilosis* (n=10), nel 8,1% (n=8) dovute a *Candida albicans* e nel 20,2% (n=20) dovute ad altre candide.

Il coinvolgimento di uno o più organi è stato individuato nel 77% dei casi (n=120), mentre il sangue è stato l'unico sito coinvolto nel 23% (n=35). Nelle micosi probabili/documentate la localizzazione più comune è stata il polmone, coinvolto nel 40,4% dei casi (n=40). Anche nelle IFD possibili la localizzazione più frequente è risultata essere il polmone coinvolto nel 88,9% dei casi (n=48).

È stata quindi analizzata la frequenza degli episodi in rapporto alla malattia di base e al tipo di trattamento ricevuto (**tabella 2**).

	Batteriemia	Micosi invasiva	Totale
In corso di chemioterapia			
LLA-NHL	243 (81)	56 (19)	299
LMA	83 (71)	33 (29)	116
<b>Totale</b>	<b>326 (78)</b>	<b>89 (22)</b>	<b>415</b>
Post trapianto di midollo			
Autologo	7 (78)	2 (22)	9
Allogeneico	253 (80)	64 (20)	317
Familiare identico	35 (81)	8 (19)	43
Donatore alternativo	218 (79)	56 (21)	274
<b>Totale</b>	<b>260 (80)</b>	<b>66 (20)</b>	<b>326</b>
<b>Totale eventi</b>	<b>586 (79)</b>	<b>155 (21)</b>	<b>741</b>

**Tabella 2**

I numeri in parentesi sono percentuali sul totale per riga

Si noti come in tutte le situazioni la proporzione delle batteriemie sia circa 2,5-4 volte quella delle IFD, che rappresentano quindi una complicanza meno frequente.

Tuttavia, analizzando la mortalità (a 15 giorni per le batteriemie e a 3 mesi per le IFD) (**tabella 3**), si noti come la proporzione della mortalità in corso di IFD sia 4-6 volte quella osservata nelle batteriemie, indicando che le IFD, per quanto meno frequenti rispetto alle batteriemie, rappresentano un problema clinico molto più grave in quanto associato ad una maggiore mortalità, che è statisticamente significativa ( $p < 0,001$ , chi quadro).

Facendo poi un'analisi per tipologia di paziente, si noti come la mortalità per batteriemia in corso di chemioterapia sia simile fra LLA/NHL e LMA, mentre sia molto più alta nelle LMA in caso di IFD, anche se questa differenza non è statisticamente significativa ( $p=0.056$ , chi-quadro). La mortalità nei trapianti di midollo allogenico è simile a quella delle LMA, ma è più elevata in caso di utilizzo di un donatore alternativo. Anche in questo caso la differenza non è statisticamente significativa ( $p=0.29$ , chi quadro).

	Batteriemie	Deceduti a 15 giorni	Micosi invasive	Deceduti a 3 mesi
Totale episodi	586	46 (8)	155	55 (35)
In corso di chemioterapia				
LLA/NHL	243	16 (6)	56	13 (23)
LMA	83	6 (7)	33	14 (42)
Post trapianto di midollo				
Autologo	7	1 (14)	2	1 (50)
Allogenico	253	23 (9)	64	27 (42)
Familiare identico	35	1 (3)	8	2 (25)
Donatore alternativo	218	22 (10)	56	25 (45)

**Tabella 3**

I numeri in parentesi sono percentuali sul totale degli eventi (batteriemia o micosi invasiva) per riga

Successivamente abbiamo analizzato l'associazione tra episodi infettivi e la presenza di alcuni noti fattori di rischio quali neutropenia e la presenza di un CVC (**tabella 4**).

	Totale episodi		Presenza di neutropenia		Infezioni CVC correlate	
	Batteriemia	Micosi invasiva	Batteriemia	Micosi invasiva	Batteriemia	Micosi invasiva
In corso di chemioterapia						
LLA-NHL	243	56	187 (77)	39 (70)	68 (28)	8 (14)
LMA	83	33	68 (82)	25 (76)	7 (8)	1 (3)
<b>Totale</b>	<b>326</b>	<b>89</b>	<b>255 (78)</b>	<b>64 (72)</b>	<b>75 (23)</b>	<b>9 (10)</b>
Post trapianto di midollo						
Autologo	7	2	5 (71)	2 (100)	4 (57)	0 (0)
Allogeneico	253	64	147 (58)	35 (55)	70 (28)	14 (22)
<b>Totale</b>	<b>260</b>	<b>66</b>	<b>152 (58)</b>	<b>37 (56)</b>	<b>74 (28)</b>	<b>14 (21)</b>
<b>Totale eventi</b>	<b>586</b>	<b>155</b>	<b>407 (69)</b>	<b>101 (65)</b>	<b>149 (25)</b>	<b>23 (15)</b>

**Tabella 4**

I numeri in parentesi sono percentuali sul totale degli eventi (batteriemia o micosi invasiva) per riga

La *neutropenia* è un fattore presente nella maggioranza degli episodi in corso di chemioterapia, sia per le batteriemie sia per le IFD.

Tuttavia vi è una diversa distribuzione degli episodi di batteriemia in corso di neutropenia tra le chemioterapie e i trapianti di midollo ( $p < 0,001$ , chi-quadro), dovuto soprattutto alla minore frequenza post allo HSCT (58%); analoga situazione si può osservare anche per le IFD ( $p = 0,04$ ). Questi dati suggeriscono che il paziente post allo-HSCT ha un maggior rischio di infezioni gravi anche in presenza di una conta normale di neutrofili.

L'altro fattore analizzato è la correlazione con il CVC, per la quale non si osservano differenze statisticamente significative tra gli episodi osservati in corso di chemioterapia e quelli post HSCT. Tuttavia, all'interno del gruppo di pazienti con leucemia acuta/NHL, le infezioni CVC-correlate sono significativamente più frequenti nei pazienti con LLA-NHL

( $p < 0.001$ , chi quadro) e questo è verosimilmente da correlarsi con la durata del trattamento delle LLA (2 anni) e quindi ad una maggior lunghezza del periodo in cui il CVC viene tenuto in situ. Dato il basso numero di eventi in corso di HSCT autologo il calcolo della differenza statistica (per altro non presente,  $p = 0.10$ , test esatto di Fisher) perde ogni significato clinico, al di fuori dell'affermare che il paziente sottoposto a HSCT allogenico necessita di un maggior periodo di cure e spesso di un CVC bilume che presenta un rischio maggiore di questa complicanza.

Per i pazienti sottoposti a HSCT allogenico è stato infine analizzato il ruolo della GvHD e della sua tipologia e gravità nello sviluppo di batteriemie e IFD (**tabella 5**).

Donatore	Familiare identico		Alternativo		Totale	
	Batteriemia	Micosi invasiva	Batteriemia	Micosi invasiva	Batteriemia	Micosi invasiva
Rigetto/mancato attecchimento	0 (0)	1 (50)	3 (100)	1 (50)	3	2
aGvHD 0-I	20 (11)	2 (6)	167 (89)	32 (94)	187	34
aGvHD II-IV	5 (23)	2 (12)	17 (77)	15 (88)	22	17
cGvHD localizzata	1 (25)	0 (0)	3 (75)	1 (100)	4	1
cGvHD estesa	9 (24)	3 (30)	28 (76)	7 (70)	37	10
<b>Totale</b>	<b>35 (14)</b>	<b>8 (13)</b>	<b>218 (86)</b>	<b>56 (87)</b>	<b>253</b>	<b>64</b>

**Tabella 5**

I numeri in parentesi sono percentuali sul totale degli eventi (batteriemia o micosi invasiva) per riga

Una volta escluso il rigetto o il mancato attecchimento del trapianto si osserva che soggetti che hanno ricevuto HSCT da donatore alternativo presentano in generale una maggiore frequenza di eventi rispetto al familiare identico, anche se le distribuzioni non sono statisticamente significative (batteriemie,  $p = 0,080$ ), (IFD  $p = 0,083$ , test chi-quadro).

La parte finale della tesi ha analizzato la frequenza per anno di osservazione degli episodi di batteriemia e IFD, associati a neutropenia o alla presenza di CVC, e rapportati al numero di dimissioni dal dipartimento di emato-oncologia (reparti di ematologia, oncologia e unità di trapianto di midollo osseo) (**tabella 6**). Inoltre, è stato valutato l'andamento della mortalità in rapporto al tipo di infezione e all'anno di osservazione.

La tabella 6 riporta i dati assoluti e i valori percentuali in rapporto al numero di eventi in ciascun anno.

	BATTERIEMIE				MICOSI INVASIVE				DIMISSIONI
	Totali	Presenza di neutropenia	CVC-correlate	Decessi	Totali	Possibili	Documentate /probabili	Decessi	
2001	37	26 (76)	15 (41)	6 (16)	16	9 (56)	7 (44)	11 (69)	748
2002	21	11 (52)	11 (52)	2 (10)	5	3 (60)	2 (40)	3 (60)	659
2003	31	19 (61)	16 (52)	1 (3)	10	2 (20)	8 (80)	3 (30)	784
2004	28	22 (79)	8 (29)	4 (14)	4	0 (0)	4 (100)	1 (25)	775
2005	21	15 (71)	4 (19)	1 (5)	8	5 (63)	3 (37)	1 (13)	762
2006	31	23 (74)	9 (29)	1 (3)	2	1 (50)	1 (50)	1 (50)	783
2007	33	24 (73)	10 (30)	2 (6)	10	4 (40)	6 (60)	3 (30)	743
2008	37	30 (81)	8 (22)	2 (5)	11	2 (18)	9 (82)	2 (18)	308
2009	28	22 (79)	6 (21)	1 (4)	6	1 (17)	5 (83)	4 (67)	657
2010	37	25 (68)	8 (22)	3 (8)	11	6 (55)	5 (45)	4 (36)	693
2011	29	20 (69)	9 (31)	2 (7)	9	2 (22)	7 (78)	2 (22)	782
2012	42	28 (67)	9 (21)	2 (5)	5	2 (40)	3 (60)	4 (80)	761
2013	28	18 (64)	4 (14)	7 (25)	12	4 (33)	8 (67)	6 (50)	685
2014	18	12 (67)	4 (22)	1 (6)	7	2 (29)	5 (71)	3 (43)	805
2015	37	28 (76)	3 (8)	4 (11)	9	4 (44)	5 (56)	5 (44)	827
2016	22	16 (73)	1 (5)	1 (5)	11	3 (27)	8 (73)	1 (9)	781
2017	47	32 (68)	5 (11)	4 (9)	8	3 (38)	5 (62)	0 (0)	835
2018	40	24 (60)	13 (33)	1 (3)	10	1 (10)	9 (90)	2 (20)	692
2019	19	12 (63)	6 (32)	1 (5)	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	833
<b>total e</b>	58	407 (69)	149 (25)	46 (8)	155	54 (35)	101 (65)	55 (35)	-

**Tabella 6** CVC=catetere venoso centrale

I numeri in parentesi sono percentuali sul totale per riga

In questa tabella (7), invece, sono stati riportati i tassi di episodi normalizzati a 100 dimissioni e il risultato del test di Spearman effettuato per analizzare la presenza di una possibile relazione tra l'anno di osservazione e il tasso dell'evento studiato.

	BATTERIEMIE			MICOSI INVASIVE		
	Totali	Presenza di neutropenia	CVC-correlate	Totali	Possibili	Documentate/probabili
2001	4,95	3,48	2,01	2,14	1,20	0,94
2002	3,19	1,67	1,67	0,76	0,46	0,30
2003	3,95	2,42	2,04	1,28	0,26	1,02
2004	3,61	2,84	1,03	0,52	0,00	0,52
2005	2,76	1,97	0,52	1,05	0,66	0,39
2006	3,96	2,94	1,15	0,26	0,13	0,13
2007	4,44	3,23	1,35	1,35	0,54	0,81
2008	12,01	9,74	2,60	3,57	0,65	2,92
2009	4,26	3,35	0,91	0,91	0,15	0,76
2010	5,34	3,61	1,15	1,59	0,87	0,72
2011	3,71	2,56	1,15	1,15	0,26	0,90
2012	5,52	3,68	1,18	0,66	0,26	0,39
2013	4,09	2,63	0,58	1,75	0,58	1,17
2014	2,24	1,49	0,50	0,87	0,25	0,62
2015	4,47	3,39	0,36	1,09	0,48	0,60
2016	2,82	2,05	0,13	1,41	0,38	1,02
2017	5,63	3,83	0,60	0,96	0,36	0,60
2018	5,78	3,47	1,88	1,45	0,14	1,30
2019	2,28	1,44	0,72	0,12	0,00	0,12
<b>Rs</b>	0,085	0,030	-0,513	-0,049	-0,296	0,061
<b>P</b>	0,72	0,90	0,024	0,56	0,22	0,80

Tabella 7

Per le batteriemie si osserva una tendenza non significativa all'aumento del tasso degli episodi nel corso degli anni, con un aumento anch'esso non significativo degli episodi in presenza di neutropenia, mentre invece si è osservata una moderata, ma significativa riduzione del tasso di episodi correlati con il CVC ( $p=0,024$ ). Il tasso di mortalità per batteriemia si è modestamente ridotto nel tempo ( $r_s -0,156$ ), ma in modo non statisticamente significativo ( $p=0,52$ ) (dati non presentati).

Per le micosi invasive, si è osservata una modesta riduzione, non statisticamente significativa, del tasso totale degli episodi ( $r_s -0,049$ ) soprattutto per le forme possibili ( $r_s -0,296$ ), mentre sono modestamente aumentate le forme documentate/probabili ( $r_s 0,061$ ). Il tasso di mortalità per IFD si è ridotto ( $r_s -0,433$ ), ma in modo non statisticamente significativo ( $p=0,06$ ).

## Discussione

Le infezioni rappresentano una complicanza importante della chemioterapia antineoplastica in pediatria, soprattutto per le leucemie acute e i linfomi non-Hodgkin, e dei trapianti di cellule staminali emopoietiche.<sup>1</sup> La conoscenza della loro frequenza globale, delle eziologie e delle localizzazioni (per le micosi invasive), è alla base delle scelte di profilassi e terapia<sup>1</sup>.

In questa tesi di laurea è stata effettuata una analisi epidemiologica (frequenza, eziologia, correlazione con specifici fattori di rischio, sopravvivenza e variazioni nel corso degli anni) delle batteriemie e delle micosi invasive osservate in bambini sottoposti a chemioterapia per leucemia acuta/NHL o a HSCT autologo o allogenico. Da un punto di vista epidemiologico si è osservato che le batteriemie sono di gran lunga più frequenti delle IFD (rapporto batteriemie/IFD circa 3,7), ma con una mortalità decisamente minore (8% vs. 35%), anche se valutata con tempistiche diverse (15 vs. 90 giorni). In uno studio retrospettivo precedente, sempre condotto al Gaslini, in cui si è studiata l'incidenza di batteriemie e micosi in pazienti sottoposti a trapianto allogenico, la tendenza era simile, con un rischio di batteriemia 5 volte più alto rispetto a quello di micosi<sup>26</sup>. Tuttavia, esistono variazioni all'interno delle popolazioni studiate: la mortalità per batteriemia in corso di chemioterapia è simile tra LLA/NHL e LMA, mentre è più alta nelle LMA in caso di IFD, anche se non statisticamente significativa ( $p=0.056$ , chi-quadro). La mortalità negli allo-HSCT è simile a quella delle LMA, ma più elevata in caso di donatore alternativo, anche qui la differenza non è statisticamente significativa ( $p=0.29$ , chi quadro). Questi dati sono sostanzialmente in linea con quanto osservato in altre casistiche pediatriche; diversi studi retrospettivi multicentrici mostrano che i pazienti pediatrici onco-ematologici a più alto rischio di sviluppo di IFD e con più alta mortalità sono quelli sottoposti a HSCT allogenico, (a causa della neutropenia e dell'alterazione dell'immunità dovuta al GvHD) e i pazienti con AML trattati con chemioterapia, (a causa della neutropenia prolungata e severa)<sup>27,28</sup>.

Un aspetto interessante è dato dall'eziologia delle infezioni. Negli anni precedenti il 2000 i batteri Gram-positivi rappresentavano la stragrande maggioranza dei patogeni isolati in corso di batteriemia monomicrobica nei pazienti emato-oncologici<sup>1</sup>. Più recentemente è stato però segnalato un incremento delle infezioni da Gram-negativi, spesso resistenti anche agli antibiotici<sup>31</sup>. Nel nostro studio abbiamo osservato che il 49% delle batteriemie è stato causato da Gram-positivi e il 46% da Gram-negativi, con proporzioni ben più vicine rispetto al passato, come del resto già osservato<sup>31</sup>. Questo aspetto è stato spesso associato ad un aumento delle resistenze agli antibiotici<sup>32</sup>, ma non è stato analizzato specificamente in questa

trattamento, anche se è stato dimostrato in passato almeno in una parte della casistica presa in esame<sup>33</sup>.

Per quanto riguarda le IFD, ottenere una diagnosi certa risulta ancora complicato in una porzione non trascurabile di casi: in questo studio le forme probabili/documentate sono state 101 (65%) e le forme possibili sono state 54 (35%), anche se nel corso degli anni si è osservata una tendenza (non statisticamente significativa) ad una riduzione delle forme possibili e ad un aumento di quelle probabili/documentate, confermando una tendenza già osservata in passato<sup>34</sup>. Per quanto riguarda l'eziologia delle IFD, questa è molto simile a quella delle altre casistiche pediatriche in emato-oncologia<sup>13,20,26</sup>, mentre è interessante sottolineare la prevalenza di *Candida non albicans* rispetto a *Candida albicans*, a differenza di quanto accade in altre popolazioni pediatriche<sup>35,36</sup>, anche all'interno dello stesso Gaslini<sup>37</sup>, e negli adulti<sup>38</sup>.

L'analisi della frequenza di episodi in presenza di neutropenia e la correlazione con il CVC ha confermato l'importanza di questi 2 fattori. La neutropenia è risultata presente nel 78% di batteriemie e nel 72% delle micosi in corso di chemioterapia e nel 58% di batteriemie e nel 56% di micosi in corso di trapianto di midollo. Gli episodi di batteriemia in corso di neutropenia in pazienti trattati con chemioterapia sono di più rispetto a quelli trattati con trapianti di midollo ( $p < 0.001$ , chi-quadro), la stessa cosa succede per le IFD ( $p = 0.04$ ). Negli allo HSCT ci sono molti episodi anche in pazienti non neutropenici, verosimilmente per diversi fattori: una potente immunosoppressione da GvHD che include l'utilizzo di alte dosi di steroidi per il suo trattamento, asplenia funzionale, uso maggiore di cvc, confermando osservazioni precedenti<sup>18,26</sup>.

La presenza del CVC è risultata associata soprattutto a batteriemie in pazienti leucemici (in corso di LLA/NHL il 28% degli episodi) o trattati con allo-trapianto (il 28% degli episodi). Le differenze tra pazienti leucemici e post HSCT non sono statisticamente significative. Tra i pazienti con leucemia acuta/NHL, le infezioni CVC-correlate sono significativamente più frequenti nei pazienti con LLA-NHL ( $p < 0.001$ , chi quadro). I motivi di questa osservazione sono verosimilmente da ricercarsi nella durata del trattamento delle LLA (2 anni) pediatriche e in una maggior permanenza del CVC in situ. Per i pazienti sottoposti a HSCT allogenico è verosimile che la durata delle cure per le complicanze trapiantologiche e l'uso di CVC bilume rappresentino le cause di questa osservazione<sup>39</sup>.

La presenza di GvHD sia acuta che cronica è stata osservata principalmente post allo ad-HSCT sia per quanto riguarda le micosi che le batteriemie. Si è notato che soggetti che hanno ricevuto HSCT da donatore alternativo presentano una maggiore frequenza di GvHD rispetto

ad HSCT da donatore familiare identico, anche se le distribuzioni non sono statisticamente significative (batteriemie,  $p=0,080$ ), (IFD  $p=0,083$ , test chi-quadro). In generale il paziente sottoposto a HSCT da donatore alternativo ha molto più rischio di complicanze rispetto a quello sottoposto a trapianto allogenico familiare identico; nonostante ciò, una volta che la GvHD è presente, la gravità delle infezioni è simile<sup>18</sup>.

Nel corso degli anni non si sono osservate variazioni significative dei tassi di infezione in corso di neutropenia a significare che l'eliminazione della profilassi antibatterica (standard di cura) non ha portato ad un peggioramento dell'incidenza di questa complicanza, ma invece ad una riduzione delle resistenze agli antibiotici come dimostrato in un altro studio<sup>40</sup>. Inoltre, le modifiche alla terapia empirica hanno consentito di mantenere la mortalità entro i limiti osservati in letteratura per le infezioni in questi pazienti.

L'unica riduzione significativa osservata nel corso degli anni dello studio è quella delle infezioni da CVC, alla quale ha sicuramente contribuito l'utilizzo dei nuovi dispositivi, soprattutto cateteri tipo PICC (cateteri centrali ad inserzione periferica) in poliuretano, che presentano un minor rischio di infezione, oltre ad una sempre attenta gestione.

Una ultima osservazione riguarda l'outcome finale di queste complicanze. Infatti, malgrado la "riduzione" dell'aggressività terapeutica (sospensione profilassi antibatterica, accorciamento della durata della terapia empirica con aminoglicoside, non utilizzo della terapia empirica antifungina) non si è osservato un aumento della mortalità dovuta agli episodi infettivi più gravi, parametro importante perché indica che il paziente è stato "restituito" all'ematologo/trapiantologo per continuare il trattamento della malattia di base. E questo è sicuramente il successo maggiore della cooperazione tra ematologi ed infettivologi che da quasi 40 anni si effettua all'Istituto Gaslini.

Il limite di questa tesi è il non aver valutato il numero totale dei pazienti leucemici (lla/lma/nhl). Questo è da ascrivere alla diversità che li caratterizza, sia per quanto riguarda la durata del periodo a rischio, sia per il trattamento (le leucemie hanno tempi diversi di chemioterapia), sia per l'eventuale presenza di GvHD e la differente terapia per tipo di GvHD.

## **Ringraziamenti**

Il primo ringraziamento va al mio relatore, Professor Castagnola per la sua disponibilità, il suo sostegno e la sua guida che mi hanno accompagnato nella stesura di questa tesi.

Ringrazio i miei genitori per avermi sostenuta e per aver fatto il tifo dall'inizio alla fine di questo lungo percorso. Grazie per aver creduto in me.

Ringrazio mia mamma Elena, donna combattente e inarrestabile. In lei ho trovato conforto e riparo ogni volta che ne ho avuto bisogno. Grazie per essere, oltre che la mamma, una preziosa confidente.

Ringrazio mio papà Ezio, con lui il mio percorso a medicina è iniziato ancor prima di arrivare a Genova, dalle sue lezioni di chimica alla sera per preparare il faticoso test, a quelle di statistica una settimana prima della discussione. Grazie per la sapienza, dedizione e soprattutto per la pazienza che hai avuto con me.

Ringrazio mia sorella, Frenci e mio fratello, Gio, grazie per avermi fatto da guida in questi anni, vi stimo e vi ammiro e aspiro a diventare un bravo medico e una brava persona come lo siete voi.

Ringrazio Frenci, sorella e amica, grazie per avermi sempre inclusa nella tua vita e per avermi fatta sentire grande, nonostante fossi la sorella piccola.

Ringrazio mio fratello, Gio, anche se i tempi delle barzellone sono finiti, so che ci sei sempre in quel modo dolce e premuroso che ti caratterizza.

Ringrazio il mio fidanzato, Marco, che c'è stato dall'inizio alla fine di questo percorso. Grazie per avermi fatto compagnia nei giorni e nelle notti di studio e per aver viaggiato mille chilometri per vedermi; per avermi sostenuta e supportata ma anche sopportata, so che a tratti non è stato facile. Grazie per i momenti belli ma anche per quelli brutti, mi hanno fatta diventare la persona che sono. Grazie per essere così temerario, con te ogni giorno è un'avventura. E infine grazie perché con te non mi sono mai sentita sola.

Ringrazio Giugi, per il numero infinito di giornate passate a studiare insieme tra Genova, Pavia, Doccia, Cellio e altri mille posti. Con la quale ho condiviso studiate folli ma anche super divertenti. Grazie per quell'entusiasmo travolgente che rende belle anche le cose più noiose e grazie per essere un'amica così speciale.

Ringrazio Ceci, la mia amica letterata di cui ammiro la passione e la forza d'animo. Grazie a quella lontana route scout per averci fatte conoscere.

Ringrazio Ila, ci siamo avvicinate tardi ma sono molto contenta di questa riscoperta.

Ringrazio Chicca e Alberto che sono stati in questi anni una fonte d'ispirazione e a tutti gli effetti una seconda famiglia, grazie per avermi accolta e per avermi fatta sentire sempre amata.

Grazie ai miei amici dell'Erasmus Vale, Cozzi e Tizi, è stato un periodo stupendo quello a Madrid, senza di voi non sarebbe stato lo stesso, grazie per quei mesi di spensieratezza e divertimento che mi hanno dato una bella boccata d'aria.

Grazie Marti e Fra, amiche e compagne dal primo tirocinio, con voi ne ho vissute di tutti i colori. Grazie per esserci sempre state.

Ringrazio i miei nuovi amici valesiani che conosco "da poco" ma che mi sembra di conoscere da una vita, con voi vorrei che fosse sempre weekend.

Grazie Sari, Ali Rosi e Ali Pinna, ci siamo perse e ritrovate, ma nonostante ciò, con voi mi sento sempre la Marghi che mi piace essere.

## Bibliografia

1. E. Castagnola, C. Viscoli and M. Mikulska. Prophylaxis and Empirical Therapy of Infection in Cancer Patients. In Mandell, Douglas e Bennett *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2020; pages 3628-3653.
2. E. Castagnola, M. Mikulska, F. Ginocchio and C. Viscoli. Infectious Complications of Antineoplastic Chemotherapy in Children with Acute Leukemia or Solid Tumors. In M. A. Hayat, *Pediatric Cancer*. 2013; pages 121-138.
3. Oscar Marchetti, Frederic Tissot, Thierry Calandra. Infectious in the Cancer Patient. In Jonathan Cohen et al. *Infectious Diseases*, 4<sup>th</sup> edition. 2017; 79(4):723-738.
4. E. Castagnola, S. Dallorso, C. Dufour, A. Garaventa, et al. How to Implement Management Strategies for Febrile Neutropenia: Lessons from the Experience of a Tertiary Care Center. *Journal of Pediatric Oncology*. 2013. 1(1):23-31.
5. Muayad Alali, Michael Z. David, Lara A. Danziger-Isakov, et al. Association Between Depth of Neutropenia and Clinical Outcomes in Febrile Pediatric Cancer and/or Patients Undergoing Hematopoietic Stem-cell Transplantation. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2020; 39(7):628-633.
6. Walter J. F. M. van der Velden, Alexandra H. E. Herbers, Mihai G. Netea, et al. Mucosal barrier injury, fever and infection in neutropenic patients with cancer: introducing the paradigm febrile mucositis. *British Journal of Haematology*. 2014; 167(4):441-452.
7. L. Facchini, R. Martino, A. Ferrari, et al. Degree of mucositis and duration of neutropenia are the major risk factors for early post-transplant febrile neutropenia and severe bacterial infections after reduced-intensity conditioning: Major risk factors for early post-transplant febrile neutropenia. *European Journal of Haematology*. 2011; 88(1):46-51.
8. Prakash Satwani, Jason L. Freedman, Sonali Chaudhury, et al. A Multicenter Study of Bacterial Blood Stream Infections in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: The Role of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2017; 23(4):642-647.
9. Nicole M.A. Blijlevens and Walter J.F.M. van der Velden. Infections in the Immunocompromised Host: General Principles. In Mandell, Douglas e Bennett *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2020; pages 3617-3627.
10. Stephen T. Sonis. The pathobiology of mucositis. *Nature reviews*. 2004; 4:277-283.

11. A. Levinson, K. Pinkney, Zhezhen Jin, et al. Acute Gastrointestinal Graft-vs-Host Disease Is Associated With Increased Enteric Bacterial Bloodstream Infection Density in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2015; 61(3):350-357.
12. Winfried V. Kern. Infectious Associated with Intravascular Lines and Grafts. In Jonathan Cohen et al. *Infectious Diseases*, 4<sup>th</sup> edition. 2017; 48(2):427-438.
13. R. A. Ammann, H. J. Laws, D. Schrey, et al. Bloodstream infection in paediatric cancer centres--leukaemia and relapsed malignancies are independent risk factors. *Eur J Pediatr*. 2015; 174(5):675-686.
14. Susan E. Beekmann and David K. Henderson. Infections Caused by Percutaneous Intravascular Devices. In Mandell, Douglas e Bennett *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2020; pages 3560-3575.
15. Kieren A. Marr. Infectious in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. In Jonathan Cohen et al. *Infectious Diseases*, 4<sup>th</sup> edition. 2017; 80(4):739-745.
16. Jo-Anne H. Young and Celalettin Ustun. Infections in Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplants. In Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2020; pages 3654-3671.
17. E. Castagnola, F. Bagnasco, S. Menoni, et al. Risk factors associated with development and mortality by invasive fungal diseases in pediatric allogeneic stem cell transplantation. A pediatric subgroup analysis of data from a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Bone Marrow Transplantation*. 2018; 53(9):1193-1197.
18. E. Castagnola, F. Bagnasco, R. Bandettini, et al. Role of Acute Graft-Versus-Host Disease in the Risk of Bacteremia and Invasive Fungal Disease after Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplantation in Children. Results from a Single-Center Observational Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014; 20(7):1068-1073.
19. Brian T. Fisher, Paula D. Robinson, Thomas Lehrnbecher, et al. Risk Factors for Invasive Fungal Disease in Pediatric Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2017; 7(3):191-198.
20. E. Castagnola, M. Faraci, C. Moroni, et al. Invasive mycoses in children receiving hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 41(2):107-111.

21. Annelise M. Zwitterloot, Annelies M. C. Mavinkurve-Groothuis, Joep M. Galama, et al. Importance of neutropenia for development of invasive infections at various phases of treatment for hemato-oncological diseases in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2012; 44(5):355-362.
22. Francesca Bagnasco, Riccardo Haupt, Vincenzo Fontana, Elio Castagnola, et al. Risk of repeated febrile episodes during chemotherapy-induced granulocytopenia in children with cancer: a prospective single center study. *Journal of Chemotherapy*. 2012; 24(3):155-160.
23. O. Zając-Spychała, J. Wachowiak, A. Pieczonka, et al. Bacterial infections in pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipients: incidence, epidemiology, and spectrum of pathogens: report of the Polish Pediatric Group for Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplantation Infectious Diseases*. 2016; 18(5):690-698.
24. J. Peter Donnelly, Sharon C. Chen, Carol A. Kauffman, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71(6):1367-1376.
25. E. Castagnola, M. Faraci, C. Moroni, et al. Bacteremias in children receiving hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 41(2):104-106.
26. E. Castagnola, F. Bagnasco, M. Faraci, et al. Incidence of bacteremias and invasive mycoses in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 41(4):339-347.
27. S. Cesaro, G. Tridello, E. Castagnola, et al. Retrospective study on the incidence and outcome of proven and probable invasive fungal infections in high-risk pediatric onco-hematological patients. *European Journal of Haematology*. 2017; 99(3):240-248.
28. J. Styczynski, K. Czyzewski, M. Wysocki, et al. Increased risk of infections and infection-related mortality in children undergoing haematopoietic stem cell transplantation compared to conventional anticancer therapy: a multicentre nationwide study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016; 22(2):1-10.
29. E. Castagnola, I. Caviglia, A. Pistorio, et al. Bloodstream infections and invasive mycoses in children undergoing acute leukaemia treatment: A 13-year experience at a single Italian institution. *European Journal of Cancer*. 2005; 41(10):1439-1445.
30. Blaji Pathakumari, Guanzhao Liang, Weida Liu. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 130:1-17.

31. M. Mikulska, C. Viscoli, C. Orasch, et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *Journal of Infection*. 2014; 68(4):321-331.
32. Corrado Girmenia, Alice Bertaina, Alfonso Piciocchi et al. Incidence, Risk Factors and Outcome of Pre-engraftment Gram-Negative Bacteremia After Allogeneic and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Italian Prospective Multicenter Survey. *Clinical Infectious Disease*. 2017; 65(11):1884-1896.
33. E. Castagnola, I. Caviglia, L. Pescetto et al. Antibiotic susceptibility of Gram-negatives isolated from bacteremia in children with cancer: implications for empirical therapy of febrile neutropenia. *Future Microbiology*. 2015; 10(3):357–364.
34. E. Castagnola, F. Bagnasco, L. Amoroso. Role of Management Strategies in Reducing Mortality From Invasive Fungal Disease in Children With Cancer or Receiving Hemopoietic Stem Cell Transplant A Single Center 30-year Experience. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2014; 33(3):233-237.
35. Steinbach, J. William, Roilides et al. Results From a Prospective, International, Epidemiologic Study of Invasive Candidiasis in Children and Neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012; 31(12):1252-1257.
36. A. Warris, Z. D. Pana, A. Oletto. Etiology and Outcome of Candidemia in Neonates and Children in Europe. An 11-year Multinational Retrospective Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2020; 39(2): 114–120.
37. Alessio Mesini, Roberto Bandettini, Ilaria Caviglia et al. Candida infections in paediatrics: Results from a prospective single-centre study in a tertiary care children's hospital. *Mycoses*. 2017; 60(2): 118-123.
38. O. A. Cornely, B. Gachot, H. Akan, et al. Epidemiology and outcome of fungemia in a cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Clinical Infectious Diseases*. 2015; 61:324-331.
39. G. Fratino, A.C. Molinari, S. Parodi, S. Longo, P. Saracco, E. Castagnola, R. Haupt. Central venous catheter-related complications in children with oncological/hematological diseases: an observational study of 418 devices. *Annals of Oncoogy*. 2005; 16(4):648-54.
40. F. Landi, R. Bandettini, G. A. Rotulo, A. Mesini, C. Saffioti, L. Amoroso, F. Pierri, D. Guardo, E. Castagnola. Resistance to antibiotics of uropathogen bacteria isolated from urine

and blood in Pediatric Cancer Patients: A Single Center, 12-year Study. *Pediatric Infectious Diseases*. 2020; 39(12):1106-1110.