

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA



**L'Esame Estemporaneo della Placenta al Microtomo
Congelatore: dalle Indicazioni alle Conseguenze
Cliniche**

Relatore:

Prof. Valerio Gaetano Vellone

Candidata:

Michela Pittaluga

Anno accademico 2020-2021

INDICE

Introduzione	3
Premessa:	3
Obiettivi:	4
Materiali e metodi:	4
Risultati:	4
Conclusioni:	6
L'ESAME ISTOPATOLOGICO DELLA PLACENTA.....	7
Macroscopia:	10
Microscopia:.....	11
CORIONAMNIONITE E FUNISITE	14
Risposta infiammatoria materna:	15
STAGING (progressione ed estensione della flogosi):	16
GRADING (intensità della flogosi):	16
Risposta infiammatoria fetale:	16
STAGING (progressione ed estensione della flogosi):	17
GRADING (intensità della flogosi):	17
SEPSI NEONATALE	19
Epidemiologia:	20
Clinica:.....	23
Diagnosi:	24
Terapia e Management:	27
Mortalità e morbilità:.....	29
Nati pretermine:.....	30
Nati a termine:.....	30
Criticità nell'utilizzo precoce della terapia antibiotica	32
Patologie Allergiche:	34
Obesità:	35
Disturbi stress-correlati e Disturbi dello Spettro Autistico (ASD):	36
Malattie infiammatorie intestinali croniche (MICI):	36

Scopo dello studio	38
Materiali e Metodi.....	39
<i>Valutazione anatomopatologica:</i>	40
<i>Valutazione neonatologica:</i>	43
Risultati.....	45
<i>Caratteristiche materne:</i>	45
<i>Caratteristiche neonatali:</i>	47
<i>Indicazioni all'esame estemporaneo al congelatore:</i>	51
<i>Risultati esame estemporaneo al congelatore:</i>	52
<i>Risultati definitivo:</i>	56
<i>Caratteristiche neonatologiche:</i>	59
Discussione	67
<i>Conclusioni:</i>	73
Indice delle figure:	74
Indice Dei grafici:	74
Indice delle tabelle:	74
Bibliografia	76

INTRODUZIONE

Premessa:

La sepsi neonatale precoce insorge nelle prime 72 ore di vita del bambino; riconosce una trasmissione verticale nel contesto di una infezione intra-amniotica oppure durante il passaggio attraverso il canale del parto. Questa rappresenta ancora oggi, nonostante l'adozione di efficaci misure preventive ed il miglioramento delle cure perinatali, una importante causa di morbilità e mortalità neonatale. La diagnosi è spesso ardua poiché le manifestazioni cliniche sono aspecifiche e gli esami di laboratorio attualmente disponibili sono poco affidabili.

Il timore di una evoluzione rapidamente sfavorevole della sepsi e di sequele a distanza, portano spesso il clinico ad intraprendere una terapia antibiotica non necessaria, talvolta basata solo sulla presenza di fattori di rischio, favorendo in tal modo l'aumento del fenomeno dell'antibioticoresistenza ed ostacolando lo sviluppo di un normale ecosistema intestinale. Tali alterazioni sono state messe in correlazione con la genesi di importanti condizioni patologiche sia a breve sia a lungo termine come l'obesità, le malattie allergiche e le malattie infiammatorie intestinali croniche.

La reazione fetale ad un'infezione si manifesta istologicamente con la funisite, ossia la presenza di infiltrato infiammatorio nel cordone ombelicale. L'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore permette di identificare la presenza di funisite acuta e, conseguentemente, di porre un forte sospetto diagnostico di sepsi perinatale, potendo quindi rappresentare un tempestivo ausilio diagnostico per il clinico e potendo fornire rapidamente delle indicazioni per la scelta terapeutica.

Obiettivi:

Verificare l'utilità dell'esame estemporaneo al congelatore della placenta per la diagnosi delle sepsi neonatali precoci e per la riduzione del ricorso a terapia antibiotica non necessaria nel neonato.

Materiali e metodi:

Si tratta di uno studio retrospettivo che raccoglie e analizza i dati dei neonati sottoposti ad esame estemporaneo della placenta nel triennio 2019-2021 presso l'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino di Genova.

Risultati:

La popolazione in studio è composta da 59 neonati di età gestazionale media di 38 settimane (32-42).

Le indicazioni all'esecuzione dell'esame estemporaneo della placenta sono state distinte in:

- Indicazioni assolute: PROM (35), tamponi vagino-rettali per *GBS* positivi o assenti (16), febbre materna (2);
- Indicazioni relative: liquido amniotico tinto o maleodorante (10), Preeclampsia/DMG (6), alterazioni CTG (6), Altro (34).

In molti casi sono presenti più di una indicazione all'esecuzione della metodica.

I risultati dell'Esame al Congelatore hanno individuato: 5 casi di Funisite acuta e 18 di Corionamnionite.

Sulla base dell'esito dell'esame al congelatore abbiamo suddiviso la popolazione in studio in tre diverse categorie di rischio di sepsi neonatale precoce:

- 5 High Risk (Funisite \pm Corionamnionite)
- 1 Intermediate Risk (No Funisite, Corionamnionite S2)
- 53 Low Risk (No Funisite, No Corionamnionite/S1)

Ad ognuna di queste categorie corrisponde una gestione clinica diversa:

- High Risk \rightarrow Terapia antibiotica
- Intermediate Risk \rightarrow Attesa vigile
- Low Risk \rightarrow No Terapia antibiotica

Confrontando i risultati dell'esame estemporaneo con quelli del definitivo, abbiamo riscontrato una elevata concordanza tra le due metodiche, sia per la Funisite sia per la Corionamnionite: Funisite (K=0,88), Corionamnionite Stadio (K=0,69) Grado (K=0,55).

Dei 53 Low Risk solo 11 hanno necessitato di successiva terapia antibiotica e ricovero in terapia neonatale e di questi 4 hanno mostrato una successiva sintomatologia compatibile con una sepsi perinatale, 4 una sintomatologia che entra in diagnosi differenziale con sepsi e 3 altra sintomatologia.

L'Intermediate Risk non ha necessitato né di terapia antibiotica né di ricovero in patologia neonatale ma, trattandosi di un solo neonato, il dato non può essere considerato significativo.

Tutti gli High Risk hanno subito terapia antibiotica prolungata (almeno 7 giorni) e sono stati ricoverati in patologia neonatale, soltanto uno è risultato sintomatico per sepsi (distress respiratorio persistente).

Tutti i neonati sono stati dimessi in buone condizioni cliniche generali, solo una neonata è stata trasferita all'Ospedale Pediatrico G. Gaslini per l'insorgenza di complicanze correlate ad una cardiopatia congenita. Complessivamente i neonati Low Risk hanno necessitato di terapia antibiotica significativamente meno degli High Risk (p=0,0006).

Conclusioni:

L'esame estemporaneo della placenta è risultato un esame semplice, affidabile e di sicuro utilizzo per la gestione del neonato con sospetta sepsi precoce e, integrato con l'osservazione clinica, consente di ridurre significativamente il ricorso a terapia antibiotica inappropriata.

L'ESAME ISTOPATOLOGICO DELLA PLACENTA

La placenta è stata denominata, in maniera estremamente appropriata, “il diario della vita gestazionale”. Questa, infatti, non rappresenta soltanto una cartina tornasole dell’ambiente intrauterino, ma può anche fornire rilevanti informazioni riguardo alle eventuali complicanze insorte nel post-partum e alle ripercussioni di queste sul neonato. Pertanto, l’esame istologico della placenta ha una valenza fondamentale nel monitoraggio e nella gestione del neonato a rischio. [1] [2]

Comprensibilmente non è possibile esaminare ogni placenta, perciò è importante chiarire quali siano le circostanze che rendono l’esame istologico indispensabile.

Nel 1997 il *College of American Pathologist* ha stilato un preciso elenco di indicazioni all’esecuzione dell’esame anatomopatologico della placenta al fine di aiutare i clinici a richiederlo appropriatamente. Tuttavia, l’esame non è ancora entrato a tutti gli effetti nella pratica clinica routinaria. [3]

Indicazioni Materne per l’esame della placenta

- Patologie sistemiche con implicazioni cliniche per la madre o il neonato (per esempio diabete grave, alterazioni del metabolismo del glucosio, disordini ipertensivi, patologie del collagene, convulsioni, anemia grave [Hb <9g])
- Parto prematuro ≤ 34 settimane di gestazione
- Febbre o infezione peri-partum

- Sanguinamento nel terzo trimestre inspiegato o sanguinamento eccessivo > 500 cm³
- Implicazioni cliniche per infezioni durante la gravidanza in corso (ad es., *virus dell'immunodeficienza, sifilide, CMV, herpes simplex, toxoplasma, rosolia*)
- Oligoidramnios grave
- Complicazioni della gravidanza inspiegate o ricorrenti (ad es., ritardo di crescita intrauterino, natimortalità, aborto spontaneo, nascita prematura)
- Procedure invasive con sospetta lesione placentare
- Abruptio placentae
- Interruzione non elettiva di gravidanza
- Meconio denso o viscido

Altre indicazioni materne:

- Parto prematuro da > 34 a 37 settimane di gestazione
- Polidramnios grave o inspiegato
- Storia di abuso di sostanze stupefacenti
- Età gestazionale > 42 settimane
- Grave trauma materno
- Prolungata rottura delle membrane (>24 h)

Indicazioni feto-neonatali

- Ammissione o trasferimento in nursery di livello diverso da 1
- Natimortalità o morte perinatale
- Condizioni cliniche compromesse definite come segue: sangue dal cordone pH<7.0; indice di APGAR ≤ 6 al 5° minuto; assistenza ventilatoria per > 10 minuti; anemia grave; o ematocrito < 35%

<ul style="list-style-type: none"> – Idrope fetale – Peso alla nascita < 10° percentile – Convulsioni – Infezione o sepsi – Importanti anomalie congenite, fenotipo dismorfico o cariotipo anormale – Crescita gemellare discordante con differenza ponderale superiore al 20% – Gravidanze multiple con neonati dello stesso sesso e placentate fuse
<p>Altre indicazioni feto neonatali</p> <ul style="list-style-type: none"> – Peso alla nascita > 95° percentile – Crescita asimmetrica – Gravidanze multiple senza altre indicazioni – Gemello “vanishing” oltre il primo trimestre
<p>Indicazioni placentari</p> <ul style="list-style-type: none"> – Anormalità fisiche (ad es., infarto, trombosi vascolare, ematoma retroplacentare, amnion nodosum, colorazione anormale o opacizzazione) – Dimensioni o peso bassi per l’età gestazionale – Lesioni del cordone ombelicale (ad es., trombosi, torsione, nodi veri, arteria singola, assenza di gelatina di Wharton) – Lunghezza totale del cordone ombelicale < 32 cm a termine
<p>Altre indicazioni placentari</p> <ul style="list-style-type: none"> – Anormalità della forma della placenta – Eccessiva lunghezza (>100 cm) del cordone ombelicale – Inserzione del cordone ombelicale marginale o velamentosa

Tabella 1 Raccomandazioni materne e feto-neonatali per l'esame della placenta. [3]

Macroscopia:

La placenta umana a termine è un organo discoidale di circa 20-22 cm di diametro, lo spessore massimo è di circa 2,5 cm e il peso medio è di circa 470 g. Ci sono variazioni considerevoli tra una placenta e l'altra, ad esempio, in relazione alla modalità di espletamento del parto. Classicamente l'organo è distinto in due versanti:

- *Versante fetale:* è costituito dal piatto coriale. Questo è rivestito dall'amnios, ossia una struttura formata da un epitelio monostratificato e uno strato di tessuto connettivo mesenchimale. Sul versante fetale si trova il cordone ombelicale, solitamente si inserisce sul piatto coriale in una posizione leggermente eccentrica ed è anch'esso ricoperto dall'amnios. Ha una lunghezza media compresa tra 55 e 65 cm e un colore bianco traslucido, quasi madreperlaceo. Al suo interno decorrono i tre vasi ombelicali: due arterie, che drenano il sangue venoso refluo dalla circolazione fetale, e la vena che trasporta il sangue arterioso dalla placenta al feto. Le tre strutture vascolari sono immerse in uno spesso strato di tessuto connettivo lasso ricco di glicosaminoglicani (GAG) e acido ialuronico che conferisce loro un'importante protezione meccanica, questo strato prende il nome di gelatina di Wharton.
- *Versante materno:* ha una superficie irregolare, presenta in media 15-20 bugnature che prendono il nome di cotiledoni. Questi si trovano in corrispondenza dei lobuli fetali che si spingono dal piatto coriale nello spazio intervillare. In una placenta a termine sono presenti circa 60-70 lobuli fetali, perciò ogni cotiledone materno contiene da 1 a 4 lobuli. Di fatto, il versante materno è una superficie virtuale che si forma

realmente solo dopo la nascita, quando la placenta si distacca dall'utero.

Al margine placentare l'amnios e il corion si fondono formando le membrane amniocoriali libere. [4]

Microscopia:

L'anatomia microscopica placentare è molto complessa poiché si tratta di un organo unico nel suo genere. Ha una durata straordinariamente limitata nel tempo ma, in questo breve periodo, subisce numerosi processi di crescita e adattamento; ad un occhio inesperto alcune modificazioni fisiologiche possono sembrare patologiche. Inoltre, non bisogna dimenticare che l'interesse nei confronti della placenta si è acceso in tempi oltremodo recenti e, di conseguenza, le conoscenze su di essa sono più limitate rispetto a quelle su qualsiasi altro organo.

La struttura principale della placenta è l'albero villare, la cui descrizione risale al 2000 e si deve a Kaufmann. Egli ha identificato e descritto i diversi tipi di villi [5]:

- *Villi staminali maggiori* (I ordine): originano dal piatto amniocoriale e si dividono in villi staminali di calibro minore (di II e III ordine).
- *Villi intermedi immaturi*: originano dai villi staminali e possono dare origine ad altri villi staminali o differenziare in villi intermedi maturi.
- *Villi intermedi maturi*: originano dai precedenti o dai villi staminali.

- *Villi terminali di scambio*: presentano una struttura glomeruloide adibita allo scambio materno-fetale.
- *Villi mesenchimali*: costituiscono la riserva funzionale di crescita della placenta.
- *Villi di ancoraggio*: ancorano l'albero villare alla stria fibrinosa che separa i cotiledoni dalla decidua.

Dal punto di vista pratico, la placenta può essere esaminata a fresco o dopo fissazione in formalina, le due tipologie di esame hanno scopi molto differenti.

L'esame definitivo convenzionale della placenta richiede un minimo di 3-4 giorni per motivi tecnici legati al processo di fissazione in formalina e rappresenta un esame estremamente accurato che ha lo scopo di fornire informazioni precise su ogni aspetto delle membrane e del funicolo ed è sulla base di questo che il patologo formula la diagnosi definitiva. Tuttavia, le tempistiche prolungate lo rendono poco utile nella gestione tempestiva delle possibili complicanze infettive della madre e del feto.

L'esame a fresco al microtomo congelatore ovvia a questo problema garantendo un esito in 20-40 minuti. Per l'esecuzione della metodica, tipicamente vengono prelevati tre campioni di funicolo da tre diversi punti del cordone e un campione di membrane; l'osservazione delle sezioni congelate ha lo scopo precipuo di individuare e stadiare la flogosi per la valutazione e la gestione del rischio infettivo. Le indicazioni all'esecuzione dell'esame estemporaneo al congelatore si distinguono in assolute e relative:

- Indicazioni assolute:
 - PROM

- Tamponi vaginali e/o rettali positivi per *GBS*
- Febbre materna durante il travaglio
- Indicazioni relative:
 - Alterazioni cardiotocografiche
 - Taglio cesareo urgente
 - Dismissione di meconio
 - Induzione di parto
 - Sofferenza neonatale
 - Rialzo pressorio materno

CORIONAMNIONITE E FUNISITE

La corionamnionite acuta è la diagnosi più comune nell'ambito della patologia placentare e, tradizionalmente, si ritiene rappresenti la risposta infiammatoria acuta materna a microorganismi penetrati nel sacco gestazionale. [6]

Tuttavia, può essere riscontrata istologicamente anche nel contesto di una cosiddetta infiammazione sterile, ossia in assenza di microorganismi ed indotta da segnali di stress cellulare. Per questa ragione alcuni autori e il *National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)* hanno proposto di sostituire il termine corionamnionite acuta con il concetto di "Intrauterine Inflammation or Infection or both" abbreviabile in "Tripla I". [7]

Se il processo flogistico coinvolge anche il cordone ombelicale si parla di funisite acuta che rappresenta la controparte fetale della risposta infiammatoria.

Questi due fenomeni sono strettamente correlati: innanzitutto si instaura la risposta infiammatoria materna con lo sviluppo della corionamnionite e, successivamente, se l'infezione persiste, si scatena anche la risposta infiammatoria fetale.

Individuare istologicamente la flogosi delle membrane e del funicolo è essenziale poiché le ripercussioni neonatali possono essere severe. Sono state dimostrate correlazioni con conseguenze a breve termine, in particolare la sepsi neonatale early-onset [8], e a lungo termine, ad esempio, le paralisi cerebrali e il deficit cognitivo [9].

Un interessante studio del 2007 correla fortemente la presenza di funisite acuta con lo sviluppo di outcomes neonatali scadenti. Il lavoro dimostra come l'intensità della risposta infiammatoria fetale e l'incidenza della sindrome della risposta infiammatoria fetale aumentino in base all'entità dell'infiammazione nel cordone ombelicale e come la frequenza delle sepsi neonatali early-onset aumenti in maniera sequenziale all'incremento dell'infiammazione nel funicolo. [10]

Quindi, visto il loro rilievo, le dinamiche della risposta infiammatoria, l'aspetto istologico delle lesioni e la nuova classificazione per la refertazione anatomopatologica fornita dall'*Amsterdam Consensus Conference* del 2016 meritano una menzione particolare.

Risposta infiammatoria materna:

Si instaura circa 6-12 h dopo l'infezione. I neutrofili materni, provenienti dallo spazio intervilloso, invadono la superficie inferiore del piatto corionico e progressivamente, dopo circa 12-36 h, coinvolgono il tessuto connettivo amniotico (corionamnionite acuta). Dopo 36-48 ore hanno inizio i processi di apoptosi e carioressi dei polimorfonucleati, e, se l'infezione persiste, gli amniociti vanno incontro a necrosi. I detriti cellulari si riversano nel liquido amniotico andando a configurare il quadro di corionamnionite acuta necrotizzante. [11]

Dal punto di vista macroscopico le membrane possono apparire ispessite, edematose ed opache. Mentre, per quanto riguarda la refertazione dell'aspetto microscopico, bisogna rifarsi al sistema di staging e grading proposto da Redline et al. nel 2003 e successivamente recepito dall'*Amsterdam Consensus Conference* del 2016. [12] [13]

STAGING (progressione ed estensione della flogosi):

- *Stadio 1 (subcorionite o corionite acuta)*: accumuli di neutrofili a chiazze nella fibrina subcorionica e/o nel trofoblasto membranoso.
- *Stadio 2 (corionamnionite acuta)*: i polimorfonucleati si estendono nel corion fibroso e/o nell'amnion.
- *Stadio 3 (corionamnionite necrotizzante)*: carioressi dei leucociti neutrofili, necrosi degli amniociti e/o ipereosinofilia della membrana basale dell'amnion.

Secondo l'*Amsterdam Consensus Group* lo Stadio 1 rappresenta un indicatore precoce e sensibile di infezione, mentre gli Stadi 2-3 si riferiscono alla corionamnionite vera e propria.

GRADING (intensità della flogosi):

- *Grado 1 (lieve-moderato)*: piccoli cluster di neutrofili materni infiltranti diffusamente l'amnion, il piatto coriale, il corion laevae e/o la fibrina subcorionica.
- *Grado 2 (grave)*: tre o più microascessi corionici.

Risposta infiammatoria fetale:

La qualità e l'intensità della risposta infiammatoria fetale dipendono dall'età gestazionale e dall'efficienza del sistema immunitario fetale; al di sotto delle 19-20 settimane di gestazione e, in generale, nei feti di peso inferiore a 500g la risposta immunitaria è scarsa o completamente assente.

Il pattern di progressione dell'infiammazione fetale è meno stereotipato rispetto a quello materno, tuttavia, nella maggior parte dei casi, la prima manifestazione è l'invasione della vena ombelicale (flebite del funicolo) da parte dei neutrofili fetali, negli stadi successivi si ha l'interessamento delle arterie ombelicali e, in ultimo, quello della gelatina di Wharton. [14] Col

passare del tempo i neutrofili vanno in necrosi e creano delle bande necrotiche attorno ai vasi ombelicali. L'inflammatione del funicolo è spesso segmentaria e viene riscontrata solo in alcune sezioni, tipicamente quelle più in prossimità del feto.

Anche la refertazione microscopica della funisite acuta deve attenersi allo stesso sistema di staging e grading utilizzato per la corionamnionite. [12]
[13]

STAGING (progressione ed estensione della flogosi):

- *Stadio 1 (vasculite cronica/flebite ombelicale):* coinvolgimento della vena ombelicale.
- *Stadio 2 (vasculite ombelicale):* coinvolgimento della vena ombelicale e di una o due arterie ombelicali.
- *Stadio 3 (funisite necrotizzante):* neutrofili, detriti cellulari e precipitati eosinofili organizzati a banda o ad anello attorno ai vasi del cordone.

GRADING (intensità della flogosi):

- *Grado 1 (lieve-moderata):* pochi neutrofili sparsi in sede subendoteliale o intramurale dei vasi ombelicali.
- *Grado 2 (grave):* aggregati di neutrofili confluenti associati a degenerazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi ombelicali.

La prevalenza di corionamnionite diminuisce all'aumentare dell'età gestazionale, raggiunge approssimativamente il 50-70% nei neonati extremely low birth weight, mentre scende al 10-15% nei nati a termine. Benché in una piccola percentuale di casi la corionamnionite sembri una conseguenza della rottura prematura delle membrane, nella maggior parte

dei preparati istologici l'intensità e la diffusione dell'inflammazione suggeriscono che questa sia antecedente alla rottura e, anzi, si ritiene possa esserne la causa. [11]

Basandosi sulla tipologia di germi identificati alla coltura e sui fattori di rischio, si presume che le infezioni siano per lo più causate da patogeni che risalgono il tratto cervico-vaginale; nondimeno l'infezione intra-amniotica può anche conseguire a diffusione ematogena o per contiguità da organi pelvici adiacenti come vescica, appendice, intestino o tube di Falloppio. È interessante riportare come secondo alcuni autori esista una peculiare possibile correlazione tra la nascita pretermine e le infezioni parodontali, testimoniata dall'isolamento del *Fusobacterium Nucleatum* (e altri germi tipici della flora orale come il *Capnocytophaga Sputigena*) nel liquido amniotico. [15]

A scanso di equivoci, è importante specificare che il termine corionamnionite acuta viene utilizzato anche dai ginecologi-ostetrici per identificare una sindrome clinica caratterizzata da: febbre, tachicardia materna o fetale, utero teso alla palpazione e liquido amniotico maleodorante. Questa sindrome materna è spesso accompagnata dal riscontro istologico di corionamnionite acuta.

SEPSI NEONATALE

La sepsi neonatale è un'infezione sistemica batterica, virale o fungina che colpisce il neonato nei primi giorni di vita e può avere esiti infausti in termini di mortalità e morbilità. Tradizionalmente la definizione di sepsi prevede l'isolamento di un patogeno da un fluido corporeo normalmente sterile, principalmente sangue o liquor; nella pratica clinica neonatale questo difficilmente è possibile. [16] A tal proposito alcuni autori parlano di Sindrome da Risposta Infiammatoria Fetale (Fetal Inflammatory Response Syndrome, FIRS), ovvero una condizione clinica causata da un abnorme rilascio di citochine pro-infiammatorie dovuto ad un'infezione o ad una qualsiasi causa di stress cellulare, la cosiddetta infiammazione sterile. In pratica si tratta della controparte fetale della Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica dell'adulto (SIRS). [17]

La sepsi neonatale viene classificata in due categorie in funzione delle tempistiche di insorgenza:

- Sepsi neonatale precoce o early-onset
- Sepsi neonatale tardiva o late-onset

La sepsi a comparsa precoce si manifesta generalmente entro le prime 72 h di vita ed è solitamente sostenuta da patogeni acquisiti per via verticale nel corso di un'infezione intra-amniotica oppure durante il passaggio attraverso il canale del parto, tipicamente il batterio responsabile è lo *Streptococco di gruppo B (GBS)*.

Le sepsi a insorgenza tardiva, invece, sorgono tra le 72 h e i 7 giorni di vita. In questo caso l'infezione viene acquisita dall'ambiente esterno ed è più

comune nei neonati di bassa età gestazionale che richiedono assistenza intensiva e prolungata. [16]

Epidemiologia:

L'incidenza di sepsi neonatale ha un'ampia variabilità geografica e risente moltissimo del livello socioeconomico del paese. I dati epidemiologici sono difficilmente comparabili tra loro, anche considerando solo i paesi occidentali, poiché non esiste un'uniformità di calcolo: in alcuni casi l'incidenza viene calcolata in rapporto al numero di nati vivi, mentre in altri si prende come riferimento solo il numero di neonati ricoverati in Patologia Neonatale.

Tuttavia, l'incidenza di sepsi neonatale in Italia è diminuita grazie all'introduzione dello screening universale per *GBS* a 35-37 settimane di gestazione e grazie alla profilassi antibiotica intra-partum, ad oggi è stimata essere di 0,61 su 1000 nati vivi. [18]

Negli USA, invece, il tasso complessivo di sepsi neonatale precoce, definita dalla positività dell'emocoltura e/o della coltura del liquor, è di circa 0.98 su 1000 nati vivi, con una frequenza inversamente proporzionale al peso alla nascita e all'età gestazionale. [16] Nei neonati very-low birth weight l'incidenza è nettamente maggiore: 20/1000 per quanto riguarda la sepsi precoce e 200/1000 per la tardiva. [19]

Nonostante il miglioramento delle misure preventive e delle cure perinatali, tra il 30 e il 50% dei decessi al di sotto dei 5 anni di età si verifica nel 1° mese di vita e, in questo gruppo, la sepsi neonatale rappresenta ancora la terza causa di morte. [20]

Esistono numerosi fattori di rischio associati allo sviluppo di sepsi neonatale a insorgenza precoce e devono essere distinti tra fattori materni e fattori fetali. [16] [21]

- Fattori materni:
 - Immuno-compromissione
 - Esecuzione di procedure invasive durante la gravidanza, ad esempio il cerchiaggio cervicale o l'amniocentesi
 - Precedente parto con sviluppo di complicanze settiche nel neonato
 - Rottura prolungata delle membrane (PROM)
 - Rialzo febbrile durante il travaglio
 - Tamponi vaginali e/o rettali positivi per *GBS*
 - Batteriuria
 - Sviluppo di Corionamnionite clinica
- Fattori fetali
 - Prematurità
 - Basso peso alla nascita
 - Anomalie congenite
 - Parto operativo
 - Basso punteggio APGAR (< 6 al 5° min.)

Tra questi fattori, uno tradizionalmente ritenuto tra i più suggestivi di sepsi neonatale è la febbre materna durante il travaglio, oggi giorno però, l'interpretazione di questo evento è resa più complessa dalla diffusione dell'analgia epidurale durante il parto che può causare un rialzo termico anche nel 20% delle madri. [22]

Oltre alle suddette condizioni mediche, anche alcuni fattori demografici sono associati allo sviluppo di sepsi neonatale, ad esempio il basso status socioeconomico, la malnutrizione o la tossicodipendenza. [21]

Gli organismi più frequentemente responsabili di sepsi neonatale a insorgenza precoce sono lo *Streptococco Agalactiae (GBS)* e l'*Escherichia Coli*, che insieme provocano approssimativamente il 70% delle infezioni. Nei neonati a termine è più frequente l'isolamento del *GBS*, mentre, se si considera la popolazione dei pretermine e dei very-low birth weight (VLBW), il patogeno più comunemente individuato è l'*Escherichia Coli* e, in generale, sono più frequenti i Gram negativi. Tuttavia, molti casi di sepsi neonatale vengono trattati empiricamente senza che si riesca mai a isolare il germe causale. [16] [21] [23]

Gli attuali trend epidemiologici mostrano, rispetto al passato, una riduzione della frequenza di sepsi neonatali direttamente correlate a *GBS* grazie all'introduzione dello screening universale a 35-37 settimane e grazie alla profilassi antibiotica intra-partum [24]. Eppure, il fatto che lo *Streptococco di gruppo B* continui ad essere il principale responsabile delle sepsi nei neonati a termine, sottolinea quanto si sia ancora lontani dalla risoluzione del problema. [21] [23]

Altri batteri meno comunemente isolati sono: *Listeria Monocytogenes* (solitamente l'infezione è acquisita per via transplacentare), *Haemophilus Influenzae* non tipizzabile e altri bacilli enterici Gram-negativi. Le infezioni fungine sono piuttosto rare e tra di esse le più frequenti sono da *Candida spp*, soprattutto nei nati pretermine e VLBW. Seppur inconsueta, è importante ricordare la possibilità di sepsi neonatale dovuta a infezione virale. La trasmissione può essere verticale, come nel caso dell'*Herpes Simplex Virus (HSV)*, del *Cytomegalovirus (CMV)* o del *Rubeo virus*; oppure orizzontale

come nel caso di alcuni virus stagionali quali il *virus dell'influenza*, il *virus respiratorio sinciziale (RSV)* e gli *adenovirus*. [16] [21]

Clinica:

I segni e i sintomi clinici di sepsi neonatale sono spesso insidiosi e aspecifici. Però, l'infezione, soprattutto nei casi sostenuti da *GBS*, può evolvere rapidamente dalla scarsità di sintomi al decesso in poche ore. [25]

In uno studio del 2015 Verstraete et al. hanno cercato di individuare i segni clinici più suggestivi di sepsi neonatale. L'analisi di statistica descrittiva degli Odds Ratio ha dimostrato la massima correlazione con:

- Letargia
- Pallore
- Apnea e/o bradicardia
- Ipoperfusione periferica

Si tratta di segni estremamente aspecifici e questo conferma la considerevole complessità diagnostica e la necessità di un monitoraggio attento nei bambini con fattori di rischio. [26]

Predictor	Pooled OR	95% CI	P	Heterogeneity (I^2), %	Studies/ Neonates, n
Apnea/bradycardia	1.66	1.06–2.61	.028	0.0	2/319
Feeding intolerance	1.15	0.70–1.89	.59	0.0	2/319
Grunting	0.88	0.43–1.80	.72	0.0	2/319
Irritability	0.88	0.38–2.04	.77	0.0	2/319
Lethargy	4.25	2.50–7.21	<.001	0.0	2/319
Pallor	2.04	1.31–3.20	.002	0.0	2/319
Poor peripheral perfusion	2.68	1.54–4.66	<.001	0.0	2/319
Tachycardia	1.33	0.48–3.70	.58	50.0	2/319
Tachypnea	1.58	0.93–2.68	.09	0.0	2/319

Figura 1 Risultati Odds Ratio segni clinici e sepsi neonatale precoce. [26]

Talvolta è possibile che ci siano segni suggestivi d'interessamento d'organo che possono permettere di identificare la sede di partenza dell'infezione.

- Distress respiratorio, è la manifestazione tipica della polmonite da *Streptococco di gruppo B* (si tratta di un quadro clinico comune anche in corso di infezione da *Listeria Monocytogenes*).
Dal punto di vista clinico è indistinguibile dalla sindrome da distress respiratorio per deficit di surfattante.
- Eritema periombelicale, secrezione o sanguinamento pongono il sospetto di un'onfalite.
- Coma, convulsioni o protrusione delle fontanelle suggeriscono una prima localizzazione meningea.
- La distensione addominale, in ultimo, può suggerire la presenza di una peritonite o una enterocolite necrotizzante. [27]

Diagnosi:

L'emocoltura continua ad essere considerata il gold standard per la diagnosi di sepsi neonatale nonostante abbia dimostrato una bassa sensibilità. L'elevato numero di falsi negativi è dovuto a diversi fattori tra cui:

- Terapia antibiotica materna
- Scarso volume di sangue prelevabile
- Bassa o intermittente batteriemia
- Pretrattamento con antibiotici

Se la batteriemia è bassa si stima che più del 60% delle emocolture possa risultare falsamente negativa. [28] [19]

In virtù di questo, da molti anni la ricerca scientifica sta cercando un marcatore attendibile che possa permettere l'individuazione di tutti i neonati settici, ma che sia anche sufficientemente specifico da evitare di utilizzare la terapia antibiotica ove non necessario.

Attualmente il marker più utilizzato è la PCR, si tratta di una proteina di fase acuta la cui sintesi epatica è stimolata da IL-6, IL-1 β e TNF- α . La PCR non è considerata un marcatore molto specifico poiché la sua concentrazione nel sangue aumenta anche per condizioni prenatali non infettive come in caso di febbre materna durante il travaglio, sofferenza fetale intra-partum o parto operativo con ventosa [29]. In uno studio del 2003, Chiesa et al. valutano gli effetti di alcune frequenti circostanze perinatali sulla concentrazione ematica della PCR nell'immediato periodo postnatale. Dai loro dati risulta, in maniera statisticamente significativa, che la PCR aumenta dello 0,4% per ora di rottura delle membrane, del 14,5% per ora di travaglio, del 40% in caso di somministrazione antenatale di steroidi e del 28% in caso di profilassi antimicrobica intra-partum. [30]

Un marcatore che secondo alcuni studi sembrerebbe essere più accurato è la Procalcitonina (PCT), un pro-ormone di sintesi epatica. La sua produzione è stimolata dalle stesse citochine della PCR (IL-6, IL-1 β e TNF- α), ma può anche essere direttamente indotta dal Lipopolisaccaride (LPS). Per contro, viene down-regolata dall'IFN- γ , normalmente prodotto in corso di infezioni virali, conseguentemente potrebbe essere più precisa nel differenziare tra infezioni virali e batteriche. La funzione fisiologica della PCT in corso di sepsi è sostanzialmente sconosciuta, forse svolge un'azione chemotattica sui monociti. [19] Ciononostante, anche questo marker ha dei limiti. Nello stesso studio del 2003 già citato, Chiesa et al. dimostrano che anche la concentrazione ematica della PCT è influenzata da alcune variabili perinatali come la rottura prolungata delle membrane. [30]

Inoltre, il valore basale di PCR e PCT è altresì influenzato da variabili fisiologiche come il peso alla nascita, l'età gestazionale e le ore di vita

(entrambi i marcatori raggiungono il picco di concentrazione ematica in prima giornata).

Per tutte queste ragioni definire i normali valori di riferimento per i nati a termine e i pretermine è arduo ma imprescindibile per poter individuare il cut-off oltre cui parlare di sepsi. Questo è particolarmente vero nei casi di sepsi neonatale early-onset in cui la gravità della situazione impone un trattamento tempestivo ma le concentrazioni ematiche dei marcatori si trovano nella fase di massima variabilità e inaffidabilità. [19] [29]

Per la diagnosi di sepsi neonatale vengono considerate altresì la conta dei globuli bianchi e il valore assoluto dei neutrofili. La concentrazione dei polimorfonucleati varia molto nelle prime ore di vita e raggiunge il picco nelle prime 24 h. La neutropenia avrebbe una specificità maggiore della neutrofilia, ma risente di alcune variabili come l'età gestazionale, le modalità di espletamento del parto e l'altitudine.

Esiste anche la possibilità di eseguire la puntura lombare per l'analisi del liquido cefalorachidiano, tuttavia il suo utilizzo routinario è dibattuto. [21]

Recentemente, vista la mancanza di un reale gold standard diagnostico, è stato proposto il ricorso ad algoritmi diagnostici di stratificazione quantitativa del rischio. Si tratta di calcolatori online che, mediante l'inserimento di parametri epidemiologici, clinici (materni e neonatali) e in alcuni casi anche parametri di laboratorio, calcolano la probabilità di sepsi neonatale precoce e suggeriscono il management corretto.

Ad esempio, il <https://neonatalesepsiscalculator.kaiserpermanente.org/> prende in considerazione:

- Incidenza di sepsi neonatale precoce nel territorio
- Età gestazionale
- Ore di rottura delle membrane prima del parto

- Status materno per *GBS*
- Tipo di profilassi antibiotica intra-partum

Sulla base di questi parametri calcola la probabilità che si verifichi una sepsi neonatale precoce e suggerisce il management più appropriato sulla base dell'aspetto clinico del neonato: buono, equivoco o sintomatico.

Please enter details below.

Predictor	Scenario
Incidence of Early-Onset Sepsis	0.6/1000 live births
Gestational age	35 weeks 1 days
Highest maternal antepartum temperature	37.4 Celsius
ROM (Hours)	12
Maternal GBS status	<input type="radio"/> Negative <input type="radio"/> Positive <input checked="" type="radio"/> Unknown
Type of intrapartum antibiotics	<input type="radio"/> Broad spectrum antibiotics > 4 hrs prior to birth <input checked="" type="radio"/> Broad spectrum antibiotics 2-3.9 hrs prior to birth <input type="radio"/> GBS specific antibiotics > 2 hrs prior to birth <input type="radio"/> No antibiotics or any antibiotics < 2 hrs prior to birth

Calculate » Clear

Risk per 1000/births			
EOS Risk @ Birth	0.65		
EOS Risk after Clinical Exam	Risk per 1000/births	Clinical Recommendation	Vitals
Well Appearing	0.26	No culture, no antibiotics	Routine Vitals
Equivocal	3.22	Empiric antibiotics	Vitals per NICU
Clinical Illness	13.50	Empiric antibiotics	Vitals per NICU

Classification of Infant's Clinical Presentation [Clinical Illness](#) [Equivocal](#) [Well Appearing](#)

Figura 2 Infection Probability Calculator, Kaiser Permanente Research.

In conclusione, l'esperienza clinica insegna che la diagnosi precoce di sepsi neonatale, basandosi solamente su segni clini e parametri di laboratorio, è insoddisfacente. [31]

Terapia e Management:

Il gold standard per la terapia empirica della sepsi neonatale early-onset consiste nell'associazione di Amoxicillina e Gentamicina.

Generalmente il neonato risponde alla terapia antibiotica in 24-48 h e i parametri di laboratorio tendono a normalizzarsi entro 72 h.

La terapia deve essere somministrata per almeno 10-14 giorni nei neonati con colture positive, mentre sono sufficienti 10 giorni di trattamento se queste hanno esito negativo. Se il neonato presenta buone condizioni cliniche generali è consigliato interrompere la somministrazione dopo 48 h, continuare la terapia antibiotica con il solo scopo di normalizzare i parametri di laboratorio non è mai una strategia suggerita.

I due terzi degli *Escherichia Coli* e la maggior parte dei Gram-negativi isolati nelle sepsi neonatali precoci sono resistenti all'Amoxicillina, ma rimangono sensibili alla Gentamicina. Per questo motivo il ricorso routinario ad antibiotici ad ampio spettro non è giustificato e, anzi, potrebbe essere dannoso. In tutti i casi sostenuti da patogeni atipici, particolarmente resistenti o con sede primaria di difficile eradicazione, è altresì consigliato il consulto con uno specialista infettivologo. [21] [16] [32]

Il successo della terapia antibiotica dipende da molti fattori tra cui la tempestività dell'intervento, le condizioni cliniche del neonato, la durata della positività delle emocolture e l'estensione della malattia. Uno dei fattori prognostici negativi più importanti è il riscontro di neutropenia. Conseguentemente sono stati effettuati numerosi studi sull'utilizzo come terapia di supporto di: trasfusioni di granulociti, infusioni di Fattore di Crescita Granulocitario (G-CSF) o Immunoglobuline endovena. In realtà i risultati di questi lavori sono stati più deludenti del previsto, solo il trattamento con Immunoglobuline endovena ha dimostrato un incremento dei neutrofili circolanti (probabilmente derivante da un aumento della mobilizzazione di questi dal midollo osseo). Tuttavia, studi cospicui condotti sia dall'*International Neonatal Immunology Study Group (INIS Collaborative Group)* sia dalla *Cochrane Review* hanno dimostrato che la

somministrazione di Immunoglobuline endovena nei neonati settici non ha sostanziali effetti positivi né immediati né a lungo termine. [16] [33] [34]

Un altro farmaco proposto come terapia di supporto nei neonati con sepsi conclamata è la Pentossifillina, una molecola che migliora il microcircolo e riduce la concentrazione di TNF- α . Una metanalisi condotta dalla *Cochrane Review* sembra dimostrarne l'efficacia in termini di riduzione della mortalità e in assenza di effetti collaterali. Tuttavia, le evidenze degli studi di partenza sono deboli, perciò gli stessi autori della metanalisi consigliano prudenza nell'interpretazione dei risultati. [35]

Mortalità e morbilità:

La sepsi rappresenta ancora oggi un'importante causa di exitus nei neonati. Nei paesi ad alto reddito la mortalità è stimata essere del 30%, mentre nei paesi in via di sviluppo raggiunge addirittura il 60%. [36]

La mortalità aumenta all'aumentare del grado di prematurità e al numero di comorbidità associate. Tra i neonati very-low birth weight il rischio relativo di exitus (corretto per sesso, età gestazionale e comorbidità) è tre volte maggiore nei bambini con sepsi. Nei nati a termine, invece, l'esito infausto è più raro; la mortalità risulta elevata nei neonati con comorbidità quali l'aspirazione di meconio, la galattosemia e anomalie polmonari o cardiache congenite. [21]

Il timore di una evoluzione rapidamente sfavorevole della sepsi è accompagnato (dal rischio di sviluppo di gravose sequele a distanza. Tali condizioni devono essere distinte tra quelle che si verificano più comunemente nei neonati pretermine e quelle caratteristiche dei neonati a termine.

Nati pretermine:

- Morbidità a breve termine:
 - Scompensi endocrini (ipo- o iperglicemia)
 - Ipotensione
 - Insufficienza respiratoria
 - Trombocitopenia
 - Coagulazione intravascolare disseminata (CID)

In aggiunta, la somministrazione di terapia antibiotica ad ampio spettro può predisporre allo sviluppo di successive infezioni da *Candida spp* invasive, come la meningite, o locali, come il mugugno.

- Morbidità a lungo termine:
 - Displasia broncopolmonare, si tratta di una patologia polmonare cronica che aumenta il rischio di riospedalizzazione nel 1° anno di vita e predispone allo sviluppo di asma.
 - Danni neurologici, in particolare: leucomalacia periventricolare, ritardi nel neurosviluppo e paralisi cerebrali.

Queste associazioni sono spesso difficili da determinare poiché ci sono multipli fattori confondenti, in primis il grado di prematurità. Tuttavia, le analisi di regressione statistica dimostrano quanto la sepsi neonatale sia strettamente connessa a questi eventi. [21] [37]

Nati a termine:

- Morbidità a breve termine:
 - Endocardite
 - Trombosi ed embolia polmonare
- Morbidità a lungo termine:

- Sequele neurologiche, si verificano in più del 50% dei casi correlati a *GBS*. In particolare: convulsioni, cecità, sordità e problematiche cognitive.

CRITICITÀ NELL'UTILIZZO PRECOCE DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA

La terapia antibiotica empirica nei neonati a rischio o con sospetta sepsi neonatale early-onset rappresenta la principale causa dell'utilizzo di antibiotici in età precoce. La percentuale di neonati che va incontro a terapia antimicrobica si stima oscillare intorno al 32-45%. [38] [32] In particolare, alcuni studi condotti nell'Unione Europea stimano che circa l'8% dei neonati venga trattato inappropriatamente con antibiotici. [36]

La somministrazione di antibiotici ha rischi e benefici, ma, se impiegati in neonati non infetti, il loro utilizzo comporta soltanto il rischio di sviluppare conseguenze avverse come l'enterocolite necrotizzante, le infezioni fungine o l'exitus. Inoltre, l'estensiva somministrazione di antibiotici esita in multiresistenze e incide fortemente sui costi sanitari. [38] [39]

Il frequente ricorso a terapia antibiotica empirica con Ampicillina e Gentamicina nel sospetto di sepsi neonatale ha fatto sì che un numero sempre crescente di *GBS* ed *Escherichia Coli* sviluppasse resistenze nei confronti di queste classi di antibiotici; questo evento minaccia l'efficacia della terapia antibiotica tradizionale e aumenta i rischi correlati allo sviluppo della sepsi. Inoltre, la diffusione a livello mondiale di *Enterobacteriaceae ESBL-produttrici* rappresenta una sfida emergente per il management delle sepsi neonatali.

Globalmente, si stima che ogni anno circa 200.000 decessi neonatali siano da attribuire a patogeni resistenti. [40]

Ma, al di là dell'annosa questione delle multiresistenze, negli ultimi anni molti studi hanno evidenziato le alterazioni che la terapia antibiotica precoce provoca nella formazione del microbiota.

Il microbiota umano consiste nell'insieme dei microrganismi che convivono con l'organismo umano senza danneggiarlo, almeno in condizioni di normale funzionamento del sistema immunitario; la maggior parte di questi risiede nell'intestino ed è fondamentale per il corretto funzionamento del sistema digerente.

La formazione del microbiota è un evento dinamico e delicato che ha luogo nei primi 1000 giorni di vita, ossia dal concepimento ai 2 anni d'età. Gli avvenimenti che si verificano in questo periodo si stanno rivelando essere cruciali nel plasmare lo stato di salute futuro di ogni individuo.

Le origini del microbiota non sono del tutto note, ma sono molti i fattori che ne influenzano la formazione: l'età gestazionale, le modalità di espletamento del parto, il tipo di alimentazione, l'ambiente esterno e, ovviamente, la terapia antibiotica.

Quest'ultima, in particolare, è responsabile di una riduzione nella biodiversità del microbiota, tale fenomeno prende il nome di dismicrobismo.

Tali alterazioni dell'ecosistema intestinale sono state correlate con lo sviluppo di disparate condizioni patologiche il cui filo conduttore sembrerebbe essere rappresentato da una perturbazione nella maturazione del sistema immunitario. [40] [41] [42]

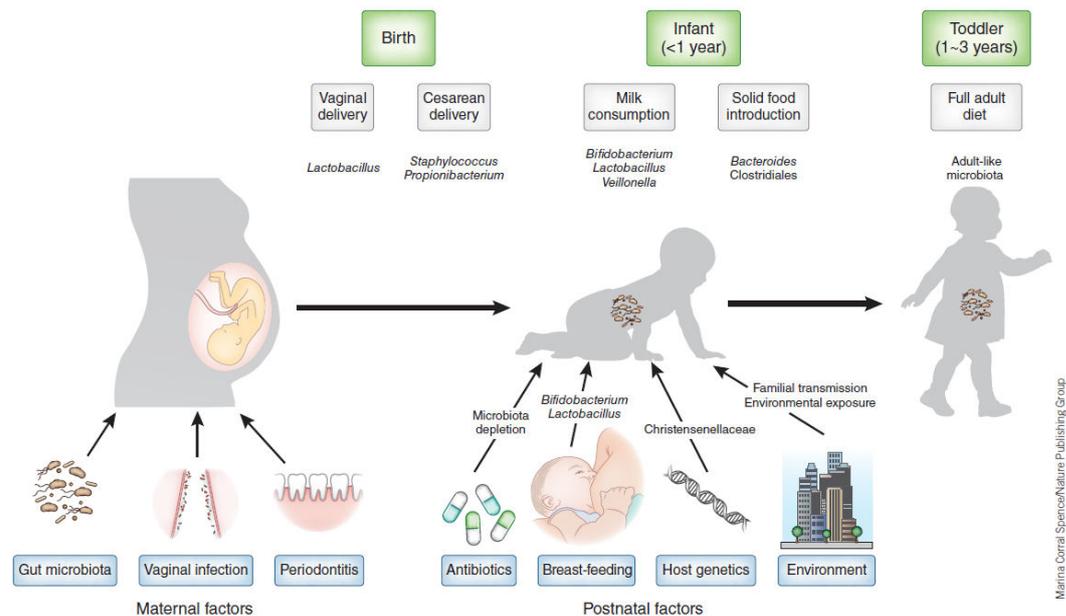


Figura 3 Fattori influenzati la formazione del microbiota neonatale. [41]

Patologie Allergiche:

La prevalenza di malattie allergiche è aumentata esponenzialmente negli ultimi 50 anni. Questo incremento è stato correlato ai sostanziali cambiamenti del lifestyle che si sono susseguiti negli ultimi decenni. In particolare, si sono dimostrati determinanti il miglioramento delle condizioni igieniche, i cambiamenti nella dieta e l'aumento della vita in spazi chiusi.

Recentemente è stato altresì messo in luce il ruolo chiave del microbiota nella predisposizione allo sviluppo di malattie allergiche.

Fisiologicamente il sistema immunitario neonatale è immaturo e presenta una prevalenza Th2. Le funzioni della barriera intestinale, delle cellule T regolatrici e l'equilibrio tra risposta Th1 e Th2 si sviluppano e maturano grazie all'interazione con l'ambiente esterno e con il microbiota stesso. Inoltre, sembra che lo sviluppo del sistema immunitario neonatale venga

regolato dal microbiota durante un arco di tempo ristretto e molto precoce e che subisca influenze anche da parte del microbiota materno.

Alcuni studi dimostrano che la terapia antibiotica precoce, e il conseguente dismicrobismo, sono particolarmente correlati allo sviluppo di asma, eczema e rinite allergica. [42] [43] [44] [45] [46]

Obesità:

Così come è accaduto per le malattie allergiche, anche la prevalenza dell'obesità è aumentata vertiginosamente nelle ultime 5 decadi.

È ormai ben nota la trasmissione genetica del rischio di sovrappeso e obesità, ma ultimamente sono stati messi in risalto altri fattori predisponenti, tra cui il dismicrobismo precoce. [42]

Un interessante studio del 2011 dimostra che la terapia antibiotica aumenta il rischio di sovrappeso infantile nei bambini nati da madri normopeso e non nei figli di donne sovrappeso od obese. [47]

Esistono anche dei modelli murini sperimentali che confermano che un basso dosaggio di Penicillina limitato al periodo postnatale aumenta il rischio di obesità indotta dalla dieta e che, in generale, le perturbazioni del microbiota durante una finestra in età precoce portano ad una aumentata adiposità nel lungo termine e ad effetti a lungo termine sul metabolismo. [48]

In particolare, uno studio individua come principali responsabili dell'aumento di peso in età infantile gli antibiotici ad ampio spettro, pertanto gli autori ritengono che mirare adeguatamente il trattamento delle infezioni più comuni del bambino da 0 a 23 mesi possa essere considerato un fattore preventivo modificabile dell'obesità infantile. [49]

Disturbi stress-correlati e Disturbi dello Spettro Autistico (ASD):

Il concetto di asse intestino-cervello, inteso come canale di comunicazione bidirezionale tra il sistema nervoso centrale e il sistema nervoso enterico è noto e universalmente accettato da tempo. Negli ultimi anni il microbiota intestinale si è rivelato essere un altro interlocutore importante, pertanto alcuni autori hanno proposto di modificare la terminologia in asse microbiota-intestino-cervello.

Attualmente numerose evidenze suggeriscono che l'ecosistema intestinale abbia un ruolo decisivo nello sviluppo di disturbi stress correlati, come il disturbo d'ansia e la depressione, ma anche nell'eziopatogenesi di disturbi neuropsichiatrici complessi.

In particolare, sempre più studi suggeriscono che il dismicrobismo prenda parte alla patogenesi dei Disturbi dello Spettro Autistico (ASD) a cui sono, infatti, spesso associate problematiche gastrointestinali. Questo contributo nocivo del microbiota intestinale è suggerito anche clinicamente dal miglioramento dei sintomi di ASD in seguito a terapia antibiotica.

Tuttavia, tali interazioni sono oltremodo complesse e necessitano di numerosi studi di approfondimento. [42] [50] [51]

Malattie infiammatorie intestinali croniche (MICI):

La flora batterica intestinale è intimamente connessa con lo sviluppo del sistema immunitario enterico ed è stato proposto un suo ruolo come fautrice e mediatrice nel processo infiammatorio cronico alla base delle MICI.

La terapia antibiotica precoce può alterare il processo di formazione del microbiota intestinale in misura dipendente dallo spettro d'azione del farmaco, dalla farmacocinetica, dalla dose e dalla durata del trattamento. In

molti casi le alterazioni conseguenti alla somministrazione di antibiotici sono temporanee, ma più è precoce la terapia maggiore è la probabilità che abbia effetti duraturi nel tempo.

Alcuni studi caso-controllo hanno dimostrato che tra i pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali croniche è consistentemente più frequente l'uso precoce di antibiotici. Inoltre, uno studio prospettico danese dimostra una forte associazione tra la terapia antibiotica precoce e lo sviluppo di Malattia di Crohn (R.R. 1,84). [52] [53]

In conclusione, è imprescindibile migliorare le misure preventive ed affinare le capacità diagnostiche al fine di ridurre il ricorso a terapia antibiotica non necessaria nei neonati e ottimizzare il trattamento ove indicato.

SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro lavoro si inserisce nel delicato contesto della diagnosi di sepsi neonatale precoce con il fine di proporre ai clinici neonatologi l'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore come ausilio alla decisione terapeutica.

La presenza di funisite acuta rappresenta il cardine delle nostre valutazioni poiché questa costituisce la manifestazione istologica della reazione infiammatoria fetale e perciò comporta un forte sospetto diagnostico di sepsi neonatale precoce.

Lo scopo primario del nostro studio è stato valutare la affidabilità del riscontro di funisite acuta nell'ambito dell'esame al congelatore per stratificare il rischio di sepsi neonatale precoce e, conseguentemente, stabilire la necessità di terapia antibiotica.

Valutare la validità delle indicazioni all'esecuzione dell'esame estemporaneo al congelatore e l'affidabilità di tale metodica rispetto all'esame istologico definitivo sono stati i nostri obiettivi secondari.

MATERIALI E METODI

Il presente lavoro consiste in uno studio retrospettivo basato sull'archivio computerizzato dell'Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologica Ospedaliera ed Universitaria dell'IRCCS Policlinico San Martino-IST di Genova e sulle cartelle cliniche digitali della U.O. di Neonatologia della stessa struttura.

Sono stati utilizzati i referti dell'esame estemporaneo della placenta al congelatore, quelli dell'esame istologico definitivo e le cartelle cliniche dei corrispettivi neonati, visionate sul programma TrakCare, risalenti al triennio 2019-2021.

Lo scopo dell'elaborato è quello di valutare l'affidabilità dell'esame estemporaneo della placenta al congelatore rispetto all'esame istologico definitivo e la valenza del riscontro di funisite e/o corionamnionite all'esame estemporaneo nella gestione del neonato con sospetta sepsi al fine di ridurre la somministrazione empirica di antibiotici.

I criteri di inclusione sono stati: placenti sottoposte ad esame macro e microscopico, prima al microtomo congelatore e poi tramite esame definitivo con processazione tradizionale.

I criteri di esclusione sono stati: non esecuzione dell'esame estemporaneo al congelatore e mancata disponibilità del referto.

Le indicazioni all'esecuzione dell'esame estemporaneo della placenta sono essenzialmente le condizioni associate ad un aumento del rischio infettivo e sono distinte in assolute e relative.

Indicazioni Assolute
PROM > 18 h
Tamponi vaginali e/o rettali per <i>GBS</i> positivi o non eseguiti
Febbre materna
Indicazioni Relative
Liquido Amniotico tinto o maleodorante
Preeclampsia o diabete mellito gestazionale
Alterazioni Cardiotocografiche
Altro

Tabella 2 Indicazioni assolute e relative all'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore

In molti casi sono presenti più di una indicazione all'esecuzione della metodica.

Valutazione anatomopatologica:

Le placente sono state esaminate macroscopicamente e microscopicamente attenendosi ad un protocollo aziendale basato su check-list.

L'esame estemporaneo prevede il prelievo di tre campioni da tre differenti livelli del funicolo e un campione di membrane. Quest'ultimo viene prelevato con la tecnica dello Swiss Roll che consiste nell'avvolgere le membrane fetali su loro stesse in modo da ottenere un'ampia superficie amniocoriale. Il materiale così raccolto viene congelato a fresco a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Da ogni prelievo sono state ottenute almeno due sezioni istologiche spesse 5 micrometri e successivamente colorate con ematossilina ed eosina.

Dopo la formulazione della diagnosi estemporanea, l'intero disco placentare e il materiale rimasto dei campioni sottoposti ad esame al microtomo congelatore sono stati fissati in formalina tamponata al 10% per almeno 12 h.

Il rimanente dei campioni criostatati ed ulteriori prelievi eseguiti sulla placenta, sul funicolo e sulle membrane sono stati processati con la metodica convenzionale. Una volta inclusi in paraffina, sono stati tagliati al microtomo per ottenere delle sezioni di 3 micrometri di spessore e successivamente sono state colorate con ematossilina ed eosina per ottenere delle sezioni istologiche definitive.

I dati morfologici macro e microscopici ottenuti mediante l'osservazione delle sezioni sono stati utilizzati per formulare una diagnosi istopatologica definitiva.

Per la refertazione dei processi flogistici di membrane e funicolo sono state seguite le indicazioni proposte dall'*Amsterdam Consensus Conference* del 2016.

Corionamnionite Acuta	
Stadio	1 (<i>subcorionite o corionite acuta</i>): accumuli di neutrofili a chiazze nella fibrina subcorionica e/o nel trofoblasto membranoso.
	2 (<i>corionamnionite acuta</i>): i polimorfonucleati si estendono nel corion fibroso e/o nell'amnion.
	3 (<i>corionamnionite necrotizzante</i>): carioressi dei leucociti neutrofili, necrosi degli amniociti e/o

	ipereosinofilia della membrana basale dell'ammion.
Grado	1 (<i>lieve-moderato</i>): piccoli cluster di neutrofili materni infiltranti diffusamente l'ammion, il piatto coriale, il corion laevae e/o la fibrina subcorionica.
	2 (<i>grave</i>): tre o più microascessi corionici.
Funisite acuta	
Stadio	1 (<i>vasculite cronica/flebite ombelicale</i>): coinvolgimento della vena ombelicale.
	2 (<i>vasculite ombelicale</i>): coinvolgimento della vena ombelicale e di una o due arterie ombelicali.
	3 (<i>funisite necrotizzante</i>): neutrofili, detriti cellulari e precipitati eosinofili organizzati a banda o ad anello attorno ai vasi del cordone.
Grado	1 (<i>lieve-moderata</i>): pochi neutrofili sparsi in sede subendoteliale o intramurale dei vasi ombelicali.
	2 (<i>grave</i>): aggregati di neutrofili confluenti associati a degenerazione

	delle cellule della muscolatura liscia dei vasi ombelicali.
--	---

Tabella 3 Staging e Grading della Corionamnionite e della Funisite acuta secondo l'Amsterdam Consensus Conference del 2016.

Da ciascun referto dell'esame estemporaneo sono stati estrapolati i seguenti dati:

- Indicazioni all'esecuzione della metodica
- Presenza di funisite
- Presenza, stadio e grado della corionamnionite

Invece, dai referti dell'esame istologico definitivo sono stati ricavati i seguenti dati:

- Presenza di funisite
- Presenza, stadio e grado della corionamnionite
- Presenza di sofferenza ipossica
- Presenza di modificazioni adattative a stato ipossico cronico
- Presenza di modificazioni suggestive di stati dismetabolici e/o ipertensivi materni

Valutazione neonatologica:

Per quanto riguarda gli aspetti clinici dello studio, in collaborazione con l'U.O. di Neonatologia dell'IRCCS Policlinico San Martino di Genova, sono state visionate le cartelle cliniche digitalizzate dei neonati le cui placenti erano state esaminate al criostato.

Da queste sono stati estrapolati dati riguardanti la madre e il neonato.

- La madre: età, età gestazionale, numero di gravidanze e parità, decorso della gravidanza, modalità di espletamento del parto, presenza di fattori di rischio infettivo per il neonato.
- Il neonato: sesso, peso, punteggio APGAR al 1° e al 5° minuto, presenza e caratteristiche dei sintomi, necessità di ricovero in patologia neonatale, motivo del ricovero, esito dell'emocoltura (se eseguita), conta dei globuli bianchi, conta dei neutrofili, valori PCR, trattamento e durata.

Le informazioni anatomopatologiche e cliniche sono state organizzate in un database creato con il programma Microsoft Excel©. Invece, per l'analisi statistica dei dati, è stato utilizzato il software MedCalc.

RISULTATI

Il presente studio comprende una popolazione di 59 neonati provenienti dall'IRCCS Policlinico San Martino di Genova nel triennio 2019-2021.

Caratteristiche materne:

L'età materna ha il picco a 32,4 anni di età; questo rispecchia l'aumento dell'età in cui si cerca il primo figlio in Italia. La media è abbassata dalla tendenza della popolazione immigrata ad avere gravidanze più precocemente rispetto alla popolazione italiana.

	Media	Mediana	Deviazione standard	Minimo	Massimo
Età materna	32,424	32	4,8679	22	43

Tabella 4 Età materna

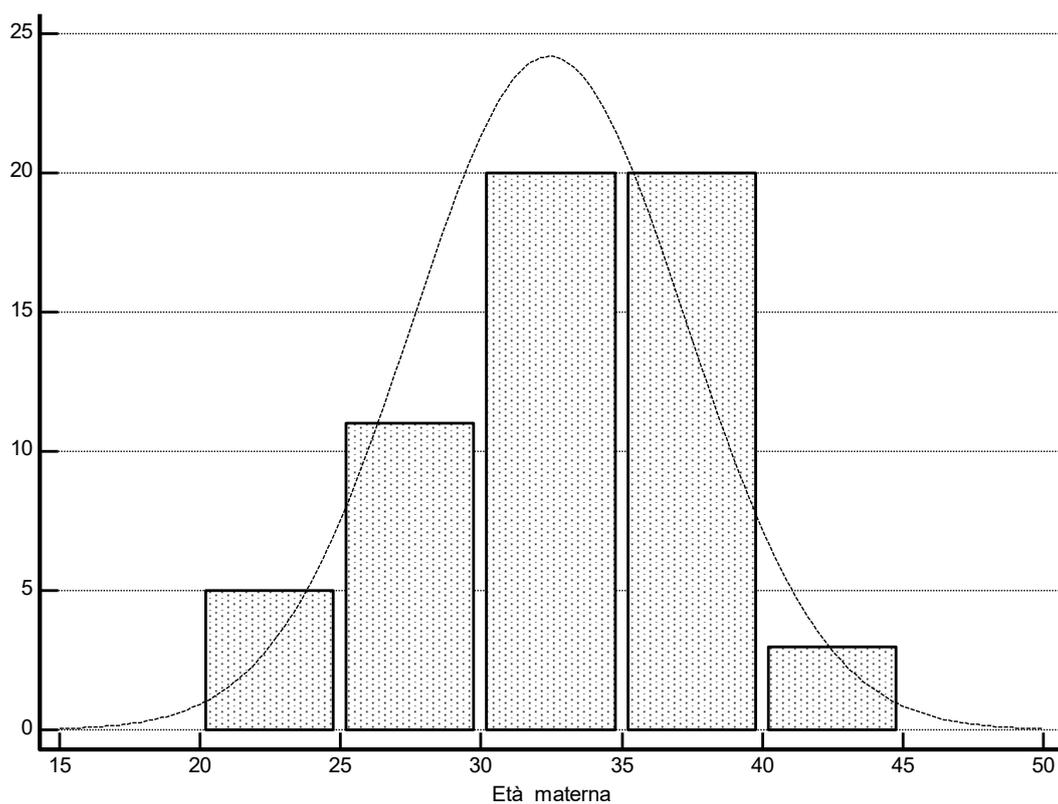


Grafico 1 Andamento età materna nella popolazione in studio.

Analizzando i dati della popolazione in studio si nota che circa la metà delle donne esaminate si attesta alla prima gravidanza e al primo parto.

Parità	Numero	Percentuale (%)	Gravida	Numero	Percentuale (%)
1	24	40,68	1	34	57,63
2	19	32,20	2	16	27,12
3	7	11,86	3	6	10,17
4	4	6,78	4	1	1,69
5	1	1,69	8	2	3,39
6	1	1,69			
7	1	1,69			
11	2	3,39			

Tabella 5 Caratteristiche parità e gravida.

Caratteristiche neonatali:

Tra i 59 neonati è compresa una coppia di gemelli, questo dato è concorde con il tasso di gemellarità in Italia (1-2% delle gravidanze).

L'età gestazionale media rientra nei limiti del parto a termine. L'incidenza di parto pretermine a <35 settimane è 8,47%, il 3,39% di questi è correlato a rottura prematura delle membrane, che spesso è una conseguenza della corionamnionite.

	Media	Mediana	Deviazione standard	Minimo	Massimo
Età gestazionale	38,017	38,000	2,4175	31	42

Tabella 6 Età gestazionale

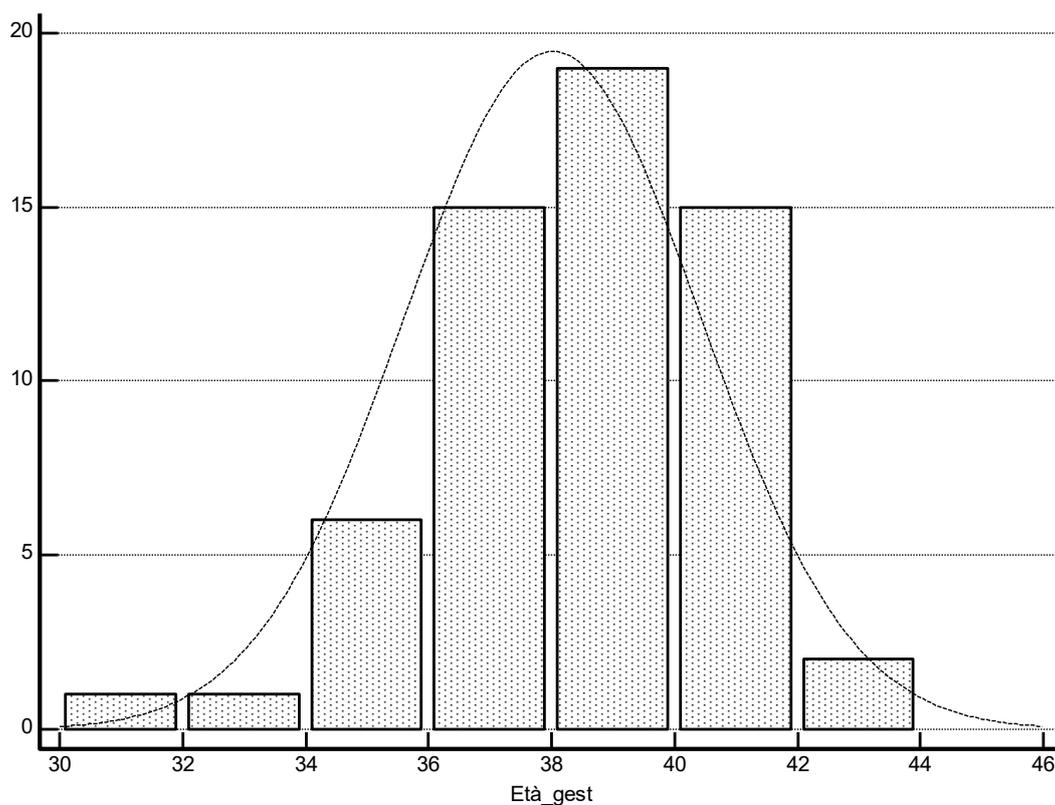


Grafico 2 Andamento età gestazionale nella popolazione in studio.

I due sessi sono equamente distribuiti nella popolazione: femmine 50,85%, maschi 49,15%.

Sesso	Numero	Percentuale (%)
Femmine	30	50,85
Maschi	29	49,15
Totale	59	100,00

Tabella 7 Distribuzione sesso nella popolazione in studio.

Il peso alla nascita, pur essendo un parametro utile per la valutazione anatomopatologica, è un dato mancante in numerose richieste di esame estemporaneo della placenta. Tuttavia, grazie alla visione delle cartelle cliniche neonatologiche, si è riusciti a reperire l'informazione per tutti i neonati inclusi nella popolazione in studio.

	Media	Mediana	Deviazione standard	Minimo	Massimo
Peso alla nascita (grammi)	2915,627	3060,000	662,3061	1440	4060

Tabella 8 Peso alla nascita (grammi).

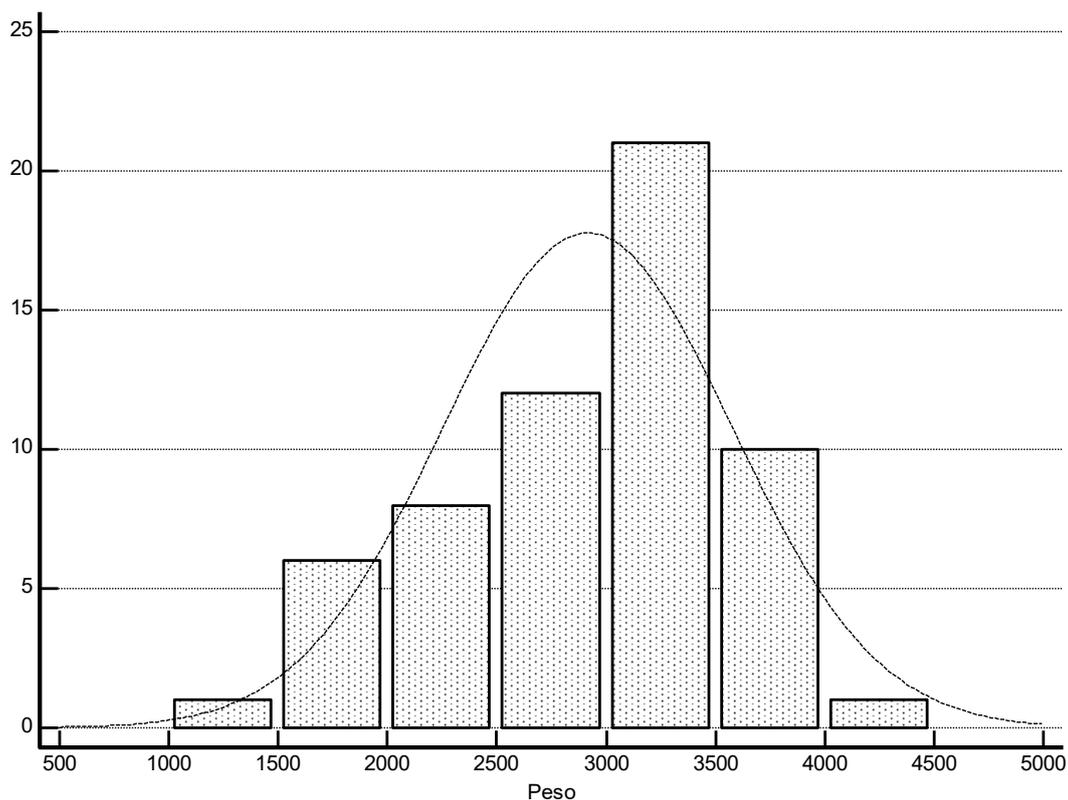


Grafico 3 Andamento del peso alla nascita nella popolazione in studio.

Il punteggio di APGAR viene valutato al 1° e al 5° e, se anormale, al 10° minuto. È un indice dello stato di salute del neonato e, come si evince dalla tabella, nella nostra popolazione in studio tutti i neonati, anche i casi con punteggio ridotto al 1° minuto, raggiungono un valore di APGAR normale al 5° minuto (≥ 7).

In due casi non è stato possibile reperire il risultato dell'APGAR né al 1° né al 5° minuto ("NP" in tabella).

APGAR 1° min.	Numero	Percentuale (%)	APGAR 5° min.	Numero	Percentuale (%)
0	0	0,00	0	0	0,00
1	0	0,00	1	0	0,00
2	0	0,00	2	0	0,00
3	1	1,69	3	0	0,00
4	0	0,00	4	0	0,00
5	2	3,39	5	0	0,00
6	4	6,78	6	0	0,00
7	3	5,08	7	4	6,78
8	8	13,56	8	5	8,47
9	39	66,10	9	10	16,95
10	0	0,00	10	38	64,41
NP	2	3,39	NP	2	3,39
Totale	59	100,00	Totale	59	100,00

Tabella 9 Punteggio di APGAR al 1° e 5° min. nella popolazione in studio.

Indicazioni all'esame estemporaneo al congelatore:

Le indicazioni per l'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore sono state distinte in assolute e relative. La tabella riporta la frequenza con cui le indicazioni erano presenti nella popolazione, le pazienti potevano avere anche più di una indicazione contemporaneamente.

Indicazione Assoluta	Numero	Percentuale (%)
Rottura prematura delle membrane (PROM)	35	59,32
Tamponi vaginali e/o rettali positivi per <i>GBS</i>	12	20,34
Tamponi vaginali e/o rettali per <i>GBS</i> non eseguiti	6	10,17
Febbre materna	2	3,39
Indicazione relativa	Numero	Percentuale (%)
Liquido amniotico tinto o maleodorante	10	16,95
Preeclampsia o Diabete mellito gestazionale	6	10,17
Alterazioni CTG	6	10,17
Altro	34	57,63

Tabella 10 Distribuzione Indicazioni Assolute e Relative all'esame al congelatore nella popolazione in studio.

La maggior parte delle pazienti (72,88%) presentava almeno una indicazione assoluta all'esecuzione dell'esame al criostato. Tra queste, la più frequente è risultata essere la rottura prematura delle membrane che, infatti, rappresenta una eventualità piuttosto comune in ostetricia (circa 10% delle gravidanze).

Indicazione Assoluta	Numero	Percentuale (%)
Si	43	72,88
Relativa	7	11,86
No	9	15,25
Totale	59	100,00

Tabella 11 Frequenza Indicazioni Assolute, Relative o altro nella popolazione in studio.

Risultati esame estemporaneo al congelatore:

In particolare, è stata valutata la presenza di infiltrato infiammatorio nelle membrane e nel funicolo. La funisite acuta rappresenta la manifestazione istologica della risposta infiammatoria fetale, pertanto, è più indicativa di sepsi neonatale precoce rispetto alla sola corionamnionite.

La funisite è stata valutata semplicemente in termini di presenza, mentre la corionamnionite è stata stadiata e graduata secondo la classificazione proposta dall'*Amsterdam Consensus Conference* del 2016.

Funisite CG	Numero	Percentuale (%)
Si	5	8,47
No	54	91,53
Totale	59	100,00
Corionamnionite GRADO CG	Numero	Percentuale (%)
G1	15	25,42
G2	3	5,08
No	41	69,49
Totale	59	100,00
Corionamnionite STADIO CG	Numero	Percentuale (%)
S1	11	18,64
S2	5	8,47
No	43	72,88
Totale	59	100,00

Tabella 12 Risultati esame estemporaneo al congelatore.

Secondo la letteratura, nel contesto di un'infezione intra-amniotica, lo sviluppo di corionamnionite precede quello della funisite. I nostri dati confermano questo pattern di progressione: in nessun caso è presente funisite in assenza di corionamnionite.

Inoltre, i nostri dati confermano che la corionamnionite di alto grado è maggiormente correlata alla presenza di funisite rispetto a quella di basso grado.

Corionamnionite STADIO CG				
Funisite CG	No	S1	S2	
No	43	10	1	54 (91,5%)
Si	0	1	4	5 (8,5%)
Totale	43 (72,9%)	11 (18,6%)	5 (8,5%)	59 (100%)
Chi-squared				36,965
DF				2
Significance level				P < 0,0001

Tabella 13 Correlazione presenza Funisite e Stadio Corionamnionite al congelatore.

Corionamnionite GRADO CG				
Funisite CG	No	G1	G2	
No	41	12	1	54 (91,5%)
Si	0	3	2	5 (8,5%)
Totale	41 (69,5%)	15 (25,4%)	3 (5,1%)	59 (100%)
Chi-squared				19,463
DF				2
Significance level				P = 0,0001

Tabella 14 Correlazione presenza Funisite e Grado Corionamnionite al Congelatore.

Sulla base dell'esito dell'esame al congelatore, abbiamo suddiviso la popolazione in studio in tre diverse classi di rischio di sepsi neonatale precoce:

- High Risk: Funisite ± Corionamnionite

- Intermediate Risk: No Funisite, Corionamnionite S2
- Low Risk: No Funisite, no Corionamnionite/S1

La tabella mostra la distribuzione delle tre categorie nella nostra popolazione in studio.

Classe di rischio	Numero	Percentuale (%)
High	5	8,47
Intermediate	1	1,69
Low	53	89,83
Totale	59	100,00

Tabella 15 Distribuzione Classi di Rischio nella popolazione in studio.

Le tre categorie di rischio corrispondono a tre diversi management clinici:

- High Risk: Terapia antibiotica
- Intermediate Risk: Osservazione attenta
- Low Risk: No terapia antibiotica.

Risultati definitivo:

I risultati dell'esame definitivo ricalcano piuttosto fedelmente quelli dell'esame al congelatore. Quest'ultimo, in alcuni casi, ha sovrastimato la presenza di infiammazione.

Funisite I	Numero	Percentuale (%)
No	55	93,22
Si (G1 S1)	3	5,08
Si (G1 S2)	1	1,69
Totale	59	100,00
Corionamnionite GRADO I	Numero	Percentuale (%)
G1	15	25,42
G2	2	3,39
No	42	71,19
Totale	59	100,00
Corionamnionite STADIO I	Numero	Percentuale (%)
S1	13	22,03
S2	4	6,78
No	42	71,19
Totale	59	100,00

Tabella 16 Risultati esame istologico definitivo.

Sono stati valutati i tassi di concordanza per la funisite e per la corionamnionite (sia per lo stadio sia per il grado). Tali parametri sono

risultati soddisfacenti considerando la presenza di limiti intrinseci all'esame al congelatore; tra questi i principali sono: ridotte quantità di materiale rispetto all'esame definitivo, presenza di inevitabili artefatti da congelamento e osservazione da parte dell'anatomopatologo di turno, non sempre esperto di patologia feto-placentare.

- Funisite K = 0,87984
- Corionamnionite Stadio K = 0,68849
- Corionamnionite Grado K = 0,55319

		Funisite I			
Funisite CG	No	Si (G1 S1)	Si (G1 S2)		
No	54	0	0		54 (91,5%)
Si	1	3	1		5 (8,5%)
Totale	55 (93,2%)	3 (5,1%)	1 (1,7%)		59 (100%)
Chi-squared					46,342
DF					2
Significance level					P < 0,0001
Weighted Kappa					0,87984
Standard error					0,11828
95% CI					0,64801 to 1

Tabella 17 Concordezza tra congelatore e definitivo per la Funisite.

Corionamnionite STADIO I				
STADIO CG	No	S1	S2	
No	38	5	0	43 (72,9%)
S1	4	7	0	11 (18,6%)
S2	0	1	4	5 (8,5%)
Totale	42 (71,2%)	13 (22,0%)	4 (6,8%)	59 (100%)
Chi-squared				61,180
DF				4
Significance level				P < 0,0001
Weighted Kappa				0,68849
Standard error				0,097720
95% CI				0,49696 to 0,88002

Tabella 18 Concordezza tra congelatore e definitivo per Stadio Corionamnionite.

Corionamnionite GRADO I				
GRADO CG	G1	G2	No	
G1	9	1	5	15 (25,4%)
G2	2	1	0	3 (5,1%)
No	4	0	37	41 (69,5%)
Totale	15 (25,4%)	2 (3,4%)	42 (71,2%)	59 (100%)
Chi-squared				30,066
DF				4
Significance level				P < 0,0001
Weighted Kappa				0,55319
Standard error				0,11325
95% CI				0,33121 to 0,77517

Tabella 19 Concordezza tra congelatore e definitivo per Grado Corionamnionite.

Caratteristiche neonatologiche:

Consultando le cartelle cliniche digitali su TrakCare con l'ausilio dei medici del reparto di Neonatologia dell'IRCCS San Martino, abbiamo individuato i neonati sintomatici e, in particolare, abbiamo distinto tra neonati in cui erano presenti sintomi compatibili con sepsi neonatale precoce, sintomi che potevano entrare in diagnosi differenziale con sepsi e altre condizioni.

Inoltre, abbiamo individuato i neonati che hanno avuto bisogno di un ricovero in Patologia Neonatale, distinguendo tra ricovero immediato, ricovero successivo per altre condizioni (nella nostra popolazione in studio si sono rivelati essere tutti per ittero) e osservazione stretta per la presenza

di importanti fattori di rischio infettivo o per condizioni particolari (ad esempio, la positività degli anticorpi materni per COVID-19).

Sintomatico infezione	Numero	Percentuale (%)
Asintomatico	43	72,88
Altri sintomi	5	8,47
Si	5	8,47
Si, dd altra condizione	6	10,17
Totale	59	100,00
Ricovero in patologia	Numero	Percentuale (%)
No	18	30,51
Successivo (per ittero)	2	3,39
Osservazione stretta	4	6,78
Si	35	59,32
Totale	59	100,00

Tabella 20 Distribuzione caratteristiche neonatologiche nella popolazione in studio.

In seguito, sono stati valutati i risultati degli esami ematici. In particolare, si è posta l'attenzione sull'esito dell'emocoltura perché, nonostante la scarsa sensibilità, è ancora considerata il gold standard per la diagnosi di sepsi neonatale. I limiti dell'emocoltura sono molteplici, tra cui ricordiamo: lo scarso volume di sangue prelevabile, la batteriemia incostante e la frequente profilassi antibiotica intra-partum. I nostri dati confermano ciò che è riportato in letteratura: 1 sola emocoltura, su 24 eseguite, è risultata positiva.

Emocoltura	Numero	Percentuale (%)
Negativa	23	38,98
Non eseguita	35	59,32
Positiva	1	1,69
Totale	59	100,00
Germe	Numero	Percentuale (%)
Negativa	23	38,98
Non eseguita	35	59,32
<i>Stafilococco Epidermidis</i>	1	1,69
Totale	59	100,00

Tabella 21 Risultati emocolture nella popolazione in studio.

Successivamente abbiamo valutato quanti neonati hanno necessitato di trattamento antibiotico (Ampicillina + Gentamicina) e per quanto tempo.

Trattamento antibiotico	Numero	Percentuale (%)
No	43	72,88
Si	16	27,12
2gg	1	1,69
3gg	2	3,39
4gg	2	3,39
5gg	5	8,47
6gg	2	3,39
7gg	1	1,69
8gg	1	1,69
Trasferita	1	1,69
Totale	59	100,00

Tabella 22 Distribuzione trattamento antibiotico nella popolazione in studio.

Soltanto una neonata è stata trasferita all'Ospedale Pediatrico G. Gaslini per la presenza di una cardiopatia congenita, tutti gli altri sono stati dimessi in buone condizioni cliniche generali.

Successivamente, riferendoci alle categorie di rischio individuate grazie all'esame estemporaneo al congelatore, abbiamo valutato il decorso clinico dei neonati, la necessità di ricovero e, soprattutto, la necessità di trattamento antibiotico.

Classe di rischio CG	Sintomatico infezione				
	No	No, altro	Si	Si, dd	
High	4	0	1	0	5 (8,5%)
Intermediate	1	0	0	0	1 (1,7%)
Low	40	3	4	6	53 (89,8%)
Totale	45 (76,3%)	3 (5,1%)	5 (8,5%)	6 (10,2%)	59 (100%)
Chi-squared					2,029
DF					6
Significance level					P = 0,9171

Tabella 23 Correlazione classe di rischio al congelatore e sviluppo sintomi compatibili con infezione.

Classe di rischio CG	Ricovero in patologia				
	No	Succ	Osservazion e	Si	
High	0	0	0	5	5 (8,5%)
Intermediate	1	0	0	0	1 (1,7%)
Low	17	2	4	30	53 (89,8%)
Totale	18 (30,5 %)	2 (3,4%)	4 (6,8%)	35 (59,3 %)	59
Chi-squared					5,884
DF					6
Significance level					P = 0,4363

Tabella 24 Correlazione classe di rischio al congelatore e ricovero in Patologia Neonatale.

Classe di rischio CG	Trattamento		
	No	Si	
High	0	5	5 (8,5%)
Intermediate	1	0	1 (1,7%)
Low	42	11	53 (89,8%)
Totale	43 (72,9%)	16 (27,1%)	59
Chi-squared			14,896
DF			2
Significance level			P = 0,0006
Relative risk			4,8182
95% CI			2,8472 to 8,1537
Z Statistic			5,858
Significance level	P < 0,0001		

Tabella 25 Correlazione classe di rischio al congelatore e necessità di trattamento antibiotico.

I neonati classificati come Low Risk nella maggioranza dei casi (42) non hanno necessitato di trattamento antibiotico. Solo 11 hanno necessitato di terapia antibiotica:

- 4 perché hanno sviluppato una sintomatologia compatibile con sepsi neonatale precoce
- 4 perché hanno sviluppato una sintomatologia che entra in diagnosi differenziale con sepsi

- 3 perché hanno sviluppato una sintomatologia diversa che ha richiesto una copertura antibiotica.

Il neonato classificato come Intermediate Risk non ha necessitato né di ricovero in Patologia Neonatale né di trattamento antibiotico, tuttavia, trattandosi di un solo caso, il dato non è significativo.

Tutti i neonati High Risk sono stati sottoposti a terapia antibiotica prolungata (almeno 7 giorni) e solo un bambino ha mostrato una sintomatologia compatibile con sepsi neonatale.

DISCUSSIONE

L'incidenza di sepsi neonatale precoce in Italia è diminuita grazie all'introduzione dello screening universale per *GBS* a 35-37 settimane di gestazione e grazie alla profilassi antibiotica intra-partum, ad oggi è stimata essere di 0,61/1000 nati vivi. [18] Ciononostante, rappresenta ancora un rilevante problema clinico poiché è gravata da una considerevole mortalità e morbilità: i neonati sopravvissuti possono sviluppare importanti reliquati sia motori sia cognitivi. Pertanto, la diagnosi e il trattamento tempestivo rappresentano una sfida giornaliera per i neonatologi.

La sepsi neonatale early-onset si manifesta entro le prime 72 h di vita ed è solitamente sostenuta da patogeni acquisiti per via verticale nel corso di un'infezione intra-amniotica oppure durante il passaggio attraverso il canale del parto.

La diagnosi precoce è ardua perché la clinica è aspecifica e gli esami ematochimici non sono affidabili.

Le emocolture, benché siano ancora considerate il gold standard per la diagnosi, hanno diverse criticità. Innanzitutto, si tratta di test di laboratorio che richiedono dei tempi tecnici di 48-72 h, troppo prolungati per poter essere utili nel decidere se iniziare o meno la terapia antibiotica. In secondo luogo, hanno una scarsa sensibilità. L'alto numero di falsi negativi è dovuto a molteplici fattori, tra cui lo scarso volume di sangue prelevabile, la batteriemia incostante e la frequente esecuzione di profilassi antibiotica intra-partum. Cosicché, nella pratica clinica, vengono utilizzate principalmente per decidere quando sospendere il trattamento anziché quando iniziarlo.

Nella nostra popolazione in studio sono state eseguite 24 emocolture e solo 1 ha dato esito positivo, tra i 23 neonati con coltura negativa, però, 15 hanno necessitato comunque di terapia antibiotica.

Anche le concentrazioni ematiche degli indici di flogosi non sono un efficace strumento diagnostico. Nelle prime ore di vita i livelli di PCR e Procalcitonina (PCT) risentono di numerose variabili fisiologiche, come l'età gestazionale e il peso alla nascita, e di alcune circostanze perinatali come la rottura prematura delle membrane o il parto operativo; pertanto, ad oggi, non sussistono dei valori di riferimento universali.

Inoltre, il monitoraggio di tali valori necessita di prelievi seriati che non solo sono dispendiosi per la struttura ospedaliera, ma rappresentano anche un'esperienza invasiva e traumatica per il neonato.

Negli ultimi anni è stato proposto anche il ricorso ad algoritmi diagnostici che raggruppano i rilievi clinici e i parametri di laboratorio, ma si tratta di strumenti perfettibili che non risolvono la questione diagnostica.

La mancanza di un consenso su come trattare i neonati a rischio e di una diagnostica sensibile e specifica, porta i pediatri ad intraprendere spesso una terapia antibiotica non necessaria per scongiurare i rischi legati allo sviluppo della sepsi neonatale precoce. Questo accade perché nei neonati asintomatici la decisione terapeutica viene spesso basata sulla presenza o meno di fattori di rischio infettivo. Tra questi, uno tradizionalmente ritenuto tra i più suggestivi di sepsi è la febbre materna durante il travaglio, oggi giorno però, l'interpretazione di questo evento è resa più complessa dalla diffusione dell'analgesia epidurale durante il parto che può causare un rialzo termico anche nel 20% delle madri. [22]

Secondo alcuni studi condotti nell'Unione Europea almeno l'8% dei neonati viene trattato inappropriatamente con antibiotici. [36]

La necessità di limitare il ricorso a terapia antibiotica si pone perché questa esita in multi resistenze e, più recentemente, alcuni autori hanno messo in rilievo anche l'alterazione che tale trattamento provoca nella formazione del microbiota neonatale.

Il microbiota umano è l'insieme di microorganismi simbiotici che convivono con l'organismo umano; le sue alterazioni sono state correlate con lo sviluppo di numerose e disparate condizioni patologiche come l'obesità, le malattie allergiche e le malattie infiammatorie croniche intestinali.

Il nostro lavoro si inserisce in questo complicato contesto con il fine di proporre come strumento di supporto tempestivo alla difficile decisione terapeutica l'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore.

In generale, l'esame microscopico e macroscopico della placenta è una rilevante fonte di informazioni cliniche sia per la madre sia per il feto. L'esame definitivo tradizionale, però, richiede dei tempi tecnici che non lo rendono fruibile per la decisione terapeutica del neonato con sospetta infezione perché ritarderebbe eccessivamente la somministrazione di antibiotici.

L'esame estemporaneo al congelatore ovvia a questa problematica garantendo una risposta in 20-40 minuti. Lo scopo dell'esame è l'individuazione e stadiazione della flogosi sia nelle membrane, corionamnionite, sia nel cordone ombelicale, funisite. Quest'ultima costituisce il rilievo più suggestivo di sepsi neonatale precoce poiché rappresenta la manifestazione istologica della risposta infiammatoria fetale.

Le indicazioni all'esecuzione dell'esame al congelatore della placenta sono state distinte in:

- Indicazioni assolute: PROM, tamponi vagino-rettali per *GBS* positivi o mancanti, febbre materna;

- Indicazioni relative: liquido amniotico tinto o maleodorante, preeclampsia o diabete gestazionale, alterazioni cardiotocografiche, altro.

Indicazione Assoluta	Numero	Percentuale (%)
Rottura prematura delle membrane (PROM)	35	59,32
Tamponi vaginali e/o rettali positivi per <i>GBS</i>	12	20,34
Tamponi vaginali e/o rettali per <i>GBS</i> non eseguiti	6	10,17
Febbre materna	2	3,39
Indicazione relativa	Numero	Percentuale (%)
Liquido amniotico tinto o maleodorante	10	16,95
Preeclampsia o Diabete mellito gestazionale	6	10,17
Alterazioni CTG	6	10,17
Altro	34	57,63

Tabella 26 Distribuzione Indicazioni Assolute e Relative all'esame al congelatore nella popolazione in studio.

Talvolta possono essere presenti più indicazioni contemporaneamente.

Nel nostro lavoro, l'analisi al congelatore si è dimostrata uno strumento semplice e affidabile rispetto all'esame definitivo nell'individuare sia la corionamnionite sia la funisite.

I tassi di concordanza tra le due metodiche si sono rivelati ottimi sia per lo stadio sia per il grado:

- Funisite $K = 0,87984$;

- Corionamnionite Stadio K = 0,68849;
- Corionamnionite Grado K = 0,55319.

La concordanza non è perfetta per diversi motivi. In primo luogo, perché al congelatore viene osservata una quantità di materiale minore rispetto a quella che si utilizza per l'esame definitivo e, inoltre, la qualità morfologica non è ottimale in quanto il congelamento rapido comporta inevitabilmente la formazione di artefatti.

In ultimo, per motivi organizzativi, l'esame estemporaneo viene refertato dall'anatomopatologo disponibile, non sempre esperto di patologia fetoplacentare.

Dunque, una volta appurata l'affidabilità delle osservazioni fatte all'esame estemporaneo, sulla base dell'esito di questo abbiamo suddiviso la nostra popolazione in studio in tre differenti categorie di rischio di sepsi neonatale precoce con tre diversi management clinici:

- High Risk: Funisite ± Corionamnionite → Terapia antibiotica
- Intermediate Risk: No Funisite, Corionamnionite Stadio 2 → Attesa vigile
- Low Risk: No Funisite, Corionamnionite Stadio 1 o assente → No terapia antibiotica

Classe di rischio	Numero	Percentuale (%)
High	5	8,47
Intermediate	1	1,69
Low	53	89,83
Totale	59	100,00

Tabella 27 Distribuzione classi di rischio nella popolazione in studio.

Tra i 53 neonati Low Risk solo 11 hanno necessitato di successiva terapia antibiotica e ricovero in patologia neonatale; 4 di questi hanno sviluppato una sintomatologia compatibile con la sepsi neonatale precoce, 4 una sintomatologia che entra in diagnosi differenziale con sepsi e i 3 rimanenti hanno necessitato di terapia antibiotica per motivi diversi dalla sepsi neonatale.

L'Intermediate Risk non ha necessitato né di terapia antibiotica né di ricovero in patologia neonatale, ma, trattandosi di un solo neonato, questo dato non può essere considerato significativo.

Tutti e 5 i neonati appartenenti alla categoria High Risk hanno subito terapia antibiotica prolungata (almeno 7 giorni) e sono stati ricoverati in patologia neonatale, solo uno ha mostrato dei sintomi compatibili con sepsi neonatale precoce (distress respiratorio persistente).

Tutti i neonati sono stati dimessi in buone condizioni cliniche generali, solo una bambina è stata trasferita all'Ospedale Pediatrico G. Gaslini per il riscontro di una complessa cardiopatia congenita.

L'analisi statistica dei dati ha dimostrato che i neonati classificati come Low Risk hanno necessitato di terapia antibiotica significativamente meno degli High Risk ($p=0,0006$).

In definitiva, l'esame estemporaneo della placenta ha permesso di risparmiare la terapia antibiotica a 42 neonati Low Risk che presentavano almeno un fattore di rischio infettivo e, di conseguenza, un'indicazione alla somministrazione di terapia antibiotica.

Conclusioni:

L'esame estemporaneo della placenta si è dimostrato essere un ausilio semplice, valido e di sicuro utilizzo per la diagnosi e la gestione tempestiva del neonato con sospetta sepsi precoce; e, pur sottolineando l'indiscusso primato della valutazione clinica, consente di ridurre significativamente il ricorso a terapia antibiotica non necessaria nei neonati.

INDICE DELLE FIGURE:

<i>Figura 1 Risultati Odds Ratio segni clinici e sepsi neonatale precoce.</i> [26]	23
<i>Figura 2 Infection Probability Calculator, Kaiser Permanente Research.</i>	27
<i>Figura 3 Fattori influenzati la formazione del microbiota neonatale.</i> [41]	34

INDICE DEI GRAFICI:

<i>Grafico 1 Andamento età materna nella popolazione in studio.</i>	46
<i>Grafico 2 Andamento età gestazionale nella popolazione in studio.</i>	47
<i>Grafico 3 Andamento del peso alla nascita nella popolazione in studio.</i> ..	49

INDICE DELLE TABELLE:

<i>Tabella 1 Raccomandazioni materne e feto-neonatali per l'esame della placenta.</i> [3].....	9
<i>Tabella 2 Indicazioni assolute e relative all'esame estemporaneo della placenta al microtomo congelatore</i>	40
<i>Tabella 3 Staging e Grading della Corionamnionite e della Funisite acuta secondo l'Amsterdam Consensus Conference del 2016.</i>	43
<i>Tabella 4 Età materna</i>	45
<i>Tabella 5 Caratteristiche parità e gravida.</i>	46
<i>Tabella 6 Età gestazionale</i>	47
<i>Tabella 7 Distribuzione sesso nella popolazione in studio.</i>	48
<i>Tabella 8 Peso alla nascita (grammi).</i>	48
<i>Tabella 9 Punteggio di APGAR al 1° e 5° min. nella popolazione in studio.</i>	50
<i>Tabella 10 Distribuzione Indicazioni Assolute e Relative all'esame al congelatore nella popolazione in studio.</i>	51
<i>Tabella 11 Frequenza Indicazioni Assolute, Relative o altro nella popolazione in studio.</i>	52
<i>Tabella 12 Risultati esame estemporaneo al congelatore.</i>	53
<i>Tabella 13 Correlazione presenza Funisite e Stadio Corionamnionite al congelatore.</i>	54
<i>Tabella 14 Correlazione presenza Funisite e Grado Corionamnionite al Congelatore.</i>	54

<i>Tabella 15 Distribuzione Classi di Rischio nella popolazione in studio....</i>	55
<i>Tabella 16 Risultati esame istologico definitivo.</i>	56
<i>Tabella 17 Concordanza tra congelatore e definitivo per la Funisite.</i>	57
<i>Tabella 18 Concordanza tra congelatore e definitivo per Stadio Corionamnionite.</i>	58
<i>Tabella 19 Concordanza tra congelatore e definitivo per Grado Corionamnionite.</i>	59
<i>Tabella 20 Distribuzione caratteristiche neonatologiche nella popolazione in studio.</i>	60
<i>Tabella 21 Risultati emocolture nella popolazione in studio.</i>	61
<i>Tabella 22 Distribuzione trattamento antibiotico nella popolazione in studio.</i>	62
<i>Tabella 23 Correlazione classe di rischio al congelatore e sviluppo sintomi compatibili con infezione.</i>	63
<i>Tabella 24 Correlazione classe di rischio al congelatore e ricovero in Patologia Neonatale.</i>	64
<i>Tabella 25 Correlazione classe di rischio al congelatore e necessità di trattamento antibiotico.</i>	65
<i>Tabella 26 Distribuzione Indicazioni Assolute e Relative all'esame al congelatore nella popolazione in studio.</i>	70
<i>Tabella 27 Distribuzione classi di rischio nella popolazione in studio.</i>	71

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Resta e S. Sblano, «Dal trofoblasto alla placenta matura: aspetti morfo-strutturali,» *Rivista Italiana Ostetricia e Ginecologia*, n. 7, pp. 407-414, 2005.
- [2] G. Altshuler, «Some Placental Considerations in Alleged Obstetrical and Neonatology Malpractice,» *Legal Medicine*, pp. 27-47, 1994.
- [3] C. Langston, C. Kaplan, T. Macpherson, E. Mancini, K. Peevy, B. Clark, C. Murtagh, S. Cox e G. Glenn, «Practice guidelines for examination of the placenta: developed by the Placental Pathology Practice Guidelines Development Task Force of the College of American Pathologists,» *Arch Pathol Lab Med.*, 1997.
- [4] B. Huppertz, «The anatomy of the normal placenta,» *Journal of Clinical Pathology*, 2008.
- [5] K. Benirschke e P. Kaufmann, *Pathology of the Human Placenta*, Springer, 2000.
- [6] C. J. Kim, R. Romero, P. Chaemsaihong, N. Chaiyasit, B. H. Yoon e Y. M. Kim, «Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015.
- [7] C.-C. Peng, J.-H. Chang, H.-Y. Lin, P.-J. Cheng e B.-H. Su, «Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis,» *Pediatrics and Neonatology*, 2017.
- [8] B. H. Yoon, R. Romero, J. S. Park, M. Kim, S.-Y. Oh, C. J. Kim e J. K. Jun, «The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 183, n. 5, 2000.
- [9] R. W. Redline, N. Minich, H. G. Taylor e M. Hack, «Placental Lesions as Predictors of Cerebral Palsy and Abnormal Neurocognitive Function at School Age in Extremely Low Birth Weight Infants (<1 kg),» *Pediatric and Developmental Pathology*, 2007.
- [10] J.-W. Oh, C.-W. Park, K. C. Moon, J. S. Park e J. K. Jun, «The relationship among the progression of inflammation in umbilical cord,

fetal inflammatory response, early-onset neonatal sepsis, and chorioamnionitis,» *PLOS ONE*, 2019.

- [11] R. W. Redline, «Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord,» *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2006.
- [12] R. W. Redline, O. Faye-Petersen, D. Heller, F. Quereshi, V. Savell e C. Vogler, «Amniotic Infection Syndrome: Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns,» *Pediatric and Developmental Pathology*, 2003.
- [13] «Sampling and Definitions of Placental Lesions,» *Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement*, 2016.
- [14] C. J. Kim, B. H. Yoon, R. Romero, J. B. Moon, M. Kim, S.-S. Park e J. G. Chi, «Umbilical arteritis and phlebitis mark different stages of the fetal inflammatory response,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 185, n. 2, 2001.
- [15] G. B. Hill, «Preterm Birth: Associations With Genital and Possibly Oral Microflora,» *Annals of Periodontology*, 1998.
- [16] A. L. Shane, P. J. Sanchez e B. J. Stoll, «Neonatal sepsis,» *The Lancet Online*, 2017.
- [17] E. Jung, R. Romero, L. Yeo, R. Diaz-Primera, J. Marin-Concha, R. Para, A. M. Lopez, P. Pacora, N. Gomez-Lopez, B. H. Yoon, C. J. Kim, S. M. Berry e C.-D. Hsu, «The fetal inflammatory response syndrome: the origins of a concept, pathophysiology, diagnosis, and obstetrical implications,» *Elsevier-Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2020.
- [18] A. Berardi, M. M. Ciccia, C. Spada, G. Brusa, M. Capretti, F. Sandri, E. Balestri, L. Rocca, L. Gambini, M. Azzalli, V. Rizzo, G. Piccinini, E. Vaccina e L. Lucaccioni, «Osservazione nel neonato a rischio di sepsi precoce: L'approccio della regione Emilia-Romagna,» *Medico e Bambino*, 2019.
- [19] S. Eschborn e J.-H. Weitkamp, «Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis,» *Journal of Perinatology*, 2019.
- [20] L. Downie, R. Armiento, R. Subhi, J. Kelly e V. Clifford, «Community-acquired neonatal and infant sepsis in developing countries: efficacy of WHO's currently recommended antibiotics—

systematic review and meta-analysis,» *Archives of Disease in Childhood*, vol. 98, pp. 146-154, 2013.

- [21] K. A. Simonsen, A. L. Anderson-Berry, S. F. Delair e H. D. Davies, «Early-Onset Neonatal Sepsis,» *Clinical Microbiology Reviews*, 2014.
- [22] E. Lieberman, J. M. Lang, F. Frigoletto, D. K. Richardson, S. A. Ringer e A. Cohen, «Epidural Analgesia, Intrapartum Fever, and Neonatal Sepsis Evaluation,» *PEDIATRICS*, vol. 99, n. 3, 1997.
- [23] B. J. Stoll, K. M. Puopolo, N. I. Hansen, P. J. Sánchez, E. F. Bell, W. A. Carlo, C. M. Cotten, C. T. D'Angio, S. N. J. Kazzi, B. B. Poindexter, K. P. V. Meurs, E. C. Hale e M. V. C. e. al., «Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies,» *JAMA Pediatrics*, 2020.
- [24] C. R. Phares, R. Lynfield, M. M. Farley, J. Mohle-Boetani, L. H. Harrison, S. Petit, A. S. Craig, W. Schaffner, S. M. Zansky, K. Gershman, K. R. Stefonek, B. A. Albanese, E. R. Zell, A. Schuchat e S. J. Schrag, «Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005,» *JAMA*, vol. 299, n. 17, 2008.
- [25] W. E. Benitz e S. S. Long, «The Holy Grail of Ascertainment of Early-Onset Neonatal Sepsis,» *The Journal of Pediatrics*, 2019.
- [26] E. H. Verstraete, K. Blot, L. Mahieu, D. Vogelaers e S. Blot, «Prediction Models for Neonatal Health Care–Associated Sepsis: A Meta-analysis,» *PEDIATRICS*, vol. 135, n. 4, 2015.
- [27] «Manuale MSD- Versione per professionisti,» Merck & Co., [Online]. Available: https://www.msdmanuals.com/it-it/professionale/pediatria/infezioni-neonatali/sepsi-neonatale#v1092221_it. [Consultato il giorno 23 Maggio 2021].
- [28] C. Tzialla, P. Manzoni, C. Achille, L. Bollani, M. Stronati e A. Borghesi, «New Diagnostic Possibilities for Neonatal Sepsis,» *American Journal of Perinatology*, vol. 35, n. 6, 2018.
- [29] S. Arnona e I. Litmanovitz, «Diagnostic tests in neonatal sepsis,» *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2008.
- [30] C. Chiesa, G. Pellegrini, A. Panero, J. F. Osborn, F. Signore, M. Assumma e L. Pacifico, «C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Procalcitonin in the Immediate Postnatal Period: Influence of Illness Severity, Risk Status, Antenatal and Perinatal Complications, and Infection,» *Clinical Chemistry*, vol. 49, n. 1, 2003.

- [31] M. P. Griffin, D. E. Lake, T. M. O'Shea e J. R. Moorman, «Heart Rate Characteristics and Clinical Signs in Neonatal Sepsis,» *PEDIATRIC RESEARCH*, vol. 61, n. 2, 2007.
- [32] K. M. Puopolo, W. E. Benitz e T. E. Zaoutis, «Management of Neonates Born at ≥ 35 0/7 Weeks' Gestation With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis,» *PEDIATRICS*, vol. 142, n. 6, 2018.
- [33] A. Ohlsson e J. B. Lacy, «Intravenous immunoglobulin for suspected or proven infection in neonates,» *The Cochrane Collaboration*, 2013.
- [34] T. I. C. Group, «Treatment of Neonatal Sepsis with Intravenous Immune Globulin,» *The New England Journal of Medicine*, 2011.
- [35] H. K. Pammi M, «Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates,» *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015.
- [36] W. v. Herk, M. Stocker e A. M. v. Rossum, «Recognising early onset neonatal sepsis: an essential step in appropriate antimicrobial use,» *Journal of Infection*, 2016.
- [37] I. Adams-Chapman, «Long-Term Impact of Infection on the Preterm Neonate,» *Seminars in Perinatology*, 2012.
- [38] N. B. Achten, C. Klingenberg, W. E. Benitz, M. Stocker, L. J. Schlapbach, E. Giannoni, R. Bokelaar, G. J. A. Driessen, P. Brodin, S. Uthaya, A. M. C. v. Rossum e F. B. Plötz, «Association of Use of the Neonatal Early-Onset Sepsis Calculator With Reduction in Antibiotic Therapy and Safety A Systematic Review and Meta-analysis,» *JAMA Pediatrics*, 2019.
- [39] M. Kuzniewicz, K. M. Puopolo, A. Fischer, E. M. Walsh, S. Li, T. B. Newman, P. Kipnis e G. J. Escobar, «A Quantitative, Risk-Based Approach to the Management of Neonatal Early-Onset Sepsis,» *JAMA Pediatrics*, 2017.
- [40] J. W. Fjalstad, E. Esaiassen, L. K. Juvet, J. N. v. d. Anker e C. Klingenberg, «Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017.
- [41] S. Tamburini, N. Shen, H. C. Wu e J. C. Clemente, «The microbiome in early life: implications for health outcomes,» *Nature Medicine*, vol. 22, n. 7, 2016.

- [42] M.-J. Butel, A.-J. Waligora-Dupriet e S. Wydau-Dematteis, «The developing gut microbiota and its consequences for health,» *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2018.
- [43] S. Foliaki, N. Pearce, B. Björkstén, J. Mallof, S. Montefort, E. v. Mutius e ISAAC, «Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old,» *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 124, n. 5, 2009.
- [44] G. Pitter, J. F. Ludvigsson, P. Romor, L. Zanier, R. Zanotti, L. Simonato e C. Canova, «Antibiotic exposure in the first year of life and later treated asthma, a population based birth cohort study of 143,000 children,» *European Journal of Epidemiology*, 2015.
- [45] T. Tsakok, T. McKeever, L. Yeo e C. Flohr, «Does early life exposure to antibiotics increase the risk of eczema? A systematic review,» *British Journal of Dermatology*, vol. 169, 2013.
- [46] B. Alm, E. Goksor, R. Pettersson, P. Mollborg, L. Erdes, P. Loid, N. Aberg e G. Wennergren, «Antibiotics in the first week of life is a risk factor for allergic rhinitis at school age,» *Pediatric Allergy and Immunology*, pp. 468-472, 2014.
- [47] T. Ajslev, C. Andersen, M. Gamborg e T. S. a. T. Jess, «Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics,» *International Journal of Obesity*, n. 35, pp. 522-529, 2011.
- [48] L. M. Cox, S. Yamanishi, J. Sohn, A. V. Alekseyenko, J. M. Leung, I. Cho, S. G. Kim, H. Li, Z. Gao, D. Mahana, J. G. Z. Rodriguez, A. B. Rogers, N. Robine, P. Loke e M. J. Blaser, «Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences,» *Cell*, vol. 158, pp. 705-721, 2014.
- [49] L. C. Bailey, C. B. Forres, P. Zhang, T. M. Richards, A. Livshits e P. A. DeRusso, «Association of Antibiotics in Infancy With Early Childhood Obesity,» *JAMA Pediatrics*, 2014.
- [50] A. I. Petra, S. Panagiotidou, E. Hatziagelaki, J. M. Stewart, P. Conti e T. C. Theoharides, «Gut-Microbiota-BrainAxis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation,» *Clinical Therapeutics*, vol. 37, n. 5, 2015.
- [51] H. E. Vuong e E. Y. Hsiao, «Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder,» *Biological Psychiatry*, vol. 81, n. 5, pp. 411-423, 2017.

- [52] A. Hviid, H. Svanstro e M. Frisch, «Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood,» *Gut-British Society of Gastroenterology*, vol. 60, pp. 49-54, 2010.
- [53] T. Card, R. F. A. Logan, L. C. Rodrigues e J. G. Wheeler, «Antibiotic use and the development of Crohn's disease,» *Gut-British Society of Gastroenterology*, vol. 43, pp. 246-250, 2004.