Diagnostica molecolare delle sepsi: l'esperienza di Pordenone

P. Diamante, M. Avolio, S. Zamparo, S. Grosso, N. Tosoni, P. Zigante, M.L. Modolo, P. Stano, R. De Rosa, A. Camporese

SOC Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

***Premesse*. E' noto che in corso di sepsi la precocità della terapia è decisiva ai fini prognostici e che la rapidità di intervento è associata ad una concreta riduzione della mortalità.**
Sebbene confortata dall'isolamento emocolturale dell'agente eziologico, la diagnosi di sepsi resta tuttavia una diagnosi clinica, come dimostrato dai dati di letteratura che evidenziano come in circa il 15% di pazienti clinicamente considerati positivi per sepsi i risultati delle indagini colturali siano negativi. È importante pertanto che un laboratorio sia adeguatamente attrezzato per rispondere nel minor tempo possibile ad uno specifico quesito clinico riguardo i pazienti critici, e attualmente le nuove indagini molecolari sembrano rappresentare strategie diagnostiche molto promettenti in questo ambito.
Con queste premesse abbiamo inteso mettere a confronto il sistema *SeptiFast*, con la diagnostica tradizionale emocolturale studiando una coorte di pazienti comunitari giunti in Pronto Soccorso e selezionati clinicamente come possibili pazienti con sepsi.
***Metodi*. Sono stati esaminati 237 campioni: 155 (65%) hanno dato un risultato di negatività con entrambi i metodi; 82 (35%) sono risultati positivi con almeno uno dei due metodi utilizzati.**
***Risultati*. Tra i positivi, in 42 casi (51%) entrambi i metodi hanno identificato lo stesso organismo, in 23 casi (28%) solo l'emocoltura ha dato un risultato di positività, e in 17 casi (21%) solo il metodo *SeptiFast* ha rilevato una DNAemia che nella maggior parte dei casi si è dimostrata coerente con il quadro clinico dei pazienti osservati.**
***Conclusioni*. I risultati analitici ottenuti dimostrano come *SeptiFast* consenta un notevole miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia diagnostica, specie in un contesto clinico critico come quello della sepsi acquisita in comunità, con particolare riferimento al valore predittivo negativo e positivo rilevato, a cui si aggiunge la marcata riduzione del *turnaround time* (TAT) rispetto all'esame colturale.**

Summary

Molecular diagnosis of sepsis: the experience at the Pordenone hospital

Background. It is well known that during sepsis the precocity of therapy is decisive for the prognosis and that the speed of action is associated with a specific reduction of mortality.
Although blood cultures investigations is supported by the isolation of the microbiological agent, the diagnosis of sepsis remains a clinical diagnosis, as shown by literature data which show that about 15% of patients considered clinically positive for sepsis, the results blood cultures are negative. It is therefore important that a laboratory is adequately equipped to respond in the shortest possible time with a specific clinical question about the critically ill patients, and is currently investigating new molecular diagnostic strategies appear to be very promising in this respect.
With this background we aimed to compare the system SeptiFast with traditional diagnostic blood cultures studying a cohort of patients who came from community to Emergency room of our hospital and selected as clinically possible patients with sepsis.
Methods. 237 samples were examined: 155 (65%) gave a negative result by both methods, 82 (35%) were positive with at least one of two methods used.

Ricevuto: 16-03-2010 Accettato il 15-07-2010 Pubblicato on-line: 06-08-2010

Corrispondenza a: Dott.ssa Paola Diamante, SOC Microbiologia e Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", via Montereale n. 24, 33170 Pordenone. E-mail: paola.diamante@alice.it

Results. Among the positives, in 42 cases (51%) both methods identified the same organism in 23 cases (28%) only the blood culture gave a positive result, and in 17cases (21%) only the method SeptiFast detected a DNAemia that in most cases has proven consistent with the clinical picture of patients observed.
Conclusions. The analytical results obtained show that SeptiFast allow substantial gains in efficiency and effectiveness of diagnostics, especially in a clinical context as critical as that of community-acquired sepsis, with special reference to negative and positive predictive value found, to which is added marked reduction of turnaround time (TAT) than culture examination.
Key-words: SeptiFast, sepsi molecolare, emocoltura, TAT.

Introduzione

La sepsi rappresenta oggi la causa più frequente di mortalità nel paziente critico[1]. Quanto più l'accertamento eziologico in corso di sepsi avviene rapidamente, tanto più è possibile intervenire terapeuticamente in tempi rapidi e nel modo più specifico possibile.

Ad oggi l'emocoltura, il metodo di laboratorio standard utilizzato per diagnosticare eziologicamente una sepsi, pur garantendo la possibilità di ottenere un dato finale di sensibilità ai chemioterapici, che con altri metodi non è ancora del tutto possibile ottenere, presenta almeno 2 grossi limiti: non garantisce la tempestività di risposta necessaria per la gestione dei pazienti critici e in una non trascurabile percentuale di casi genera risultati falsi-negativi[2].

È per questa ragione che negli ultimi anni la diagnostica microbiologica si è spinta verso la sperimentazione, nel delicato e critico ambito delle sepsi, di metodi molecolari che potessero garantire un elevato grado di sensibilità e specificità, rapidità di rilevazione di un vasto spettro di microrganismi, un'elevata sensibilità analitica anche in corso di terapia antibiotica, e tutto ciò con i più bassi costi possibili[3].

Il metodo molecolare SeptiFast, già disponibile in Europa per usi clinici, è stato recentemente usato per la diagnosi molecolare di sepsi in pazienti neutropenici[4], immunocompromessi[5] ed ospedalizzati[6]. Noi abbiamo deciso di studiare questo metodo confrontandolo all'emocoltura e applicandolo ad una popolazione eterogenea di pazienti ovvero pazienti comunitari afferenti al pronto soccorso con segni clinici e di laboratorio compatibili con un quadro si sepsi.

Materiali e metodi

Criteri di scelta dei pazienti

Sono stati valutati in questo studio 237 pazienti afferenti al Dipartimento di Medicina d'Urgenza dell'Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli di Pordenone nel periodo marzo 2008-dicembre 2009. I pazienti sono stati scelti tra quelli che presentavano all'ingresso due o più criteri di SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)[5]: temperatura >38 °C o <36 °C, fc >90, fr >20, PaCO2 <32 mm Hg, leucociti < 4.000/mm^3 o >12.000/mm^3.

Raccolta dei campioni

La raccolta dei campioni di sangue è stata eseguita durante l'episodio febbrile, previa disinfezione della cute con clorexidina digluconata in soluzione alcolica e formulazione spray (Citroclorex 2%, Esoform. Rovigo, Italia)[7,8]. Il sangue è stato prelevato da 3 venipunture periferiche diverse eseguite ad intervalli di 15-20 minuti, e raccolto in 2 flaconi Bact/Alert (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) per ciascuna venipuntura (6 flaconi in totale ciascuno con 8-10mL di sangue). Il primo prelievo per l'emocoltura è stato tempestivamente seguito dalla raccolta di ulteriori 1,5 mL di sangue in provetta sterile contenente K-EDTA (Sarstedt, Srl, Verona, Italy) per eseguire le indagini molecolari.

I campioni raccolti sono stati immediatamente inviati al laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli di Pordenone.

Esame colturale

Le emocolture sono state analizzate utilizzando il sistema automatico Bact/Alert 3D (BioMerieux). Dai flaconi positivi è stata eseguita la colorazione di Gram e la risemina nei terreni solidi di coltura posti in incubazione per altre 24-48 ore.

L'identificazione biochimica di specie dei microrganismi isolati è stata eseguita con il sistema Vitek 2 (BioMerieux,) o Api (BioMerieux), in accordo con le procedure standardizzate nel nostro laboratorio.

Per l'interpretazione e la refertazione delle positività dovute a Stafilococchi Coagulasi-Negativi (CoNs) è stato utilizzato come riferimento l'algoritmo di Weinstein et al[9].

LightCycler SeptiFast PCR

Il LightCycler SeptiFast Test M Grade (Roche Diagnostics, Milano, Italia) è un metodo basato sulla tecnologia PCR real-time, in grado di rilevare contemporaneamente il genoma di 25 diversi microrganismi direttamente da un singolo campione di sangue periferico[10].

Una seduta analitica necessita in media di circa 7 ore dall'arrivo del campione in laboratorio fino alla generazione del referto finale. Durante questo studio nel nostro laboratorio abbiamo eseguito una seduta analitica al giorno, per 7 giorni consecutivi processando tutti i campioni giunti in laboratorio nelle 24 ore precedenti.

Il sangue raccolto in provetta contenente K-EDTA è stato processato seguendo le procedure previste (Li-

ghtCycler SeptiFast Test M Grade). L'estrazione del DNA è stata eseguita in locali *DNA-free* dedicati, per prevenire le contaminazioni.

Un *software* di elaborazione dei risultati dedicato (SeptiFast Identification Software) è in grado di generare il report finale della seduta analitica eseguita.

Risultati

Sono stati analizzati 237 campioni: 155 (65%) negativi con entrambi i metodi e 82 (35%) positivi con almeno uno dei due metodi utilizzati. Tra i positivi: in 42 casi (51%) entrambi i metodi hanno identificato lo stesso organismo(SeptiFast+/BactAlert+); in 23 casi (28%) l'identificazione è stata ottenuta solo dall'emocoltura (SeptiFast-/BactAlert+) ed infine, in 17 casi (21%) l'identificazione è stata ottenuta solo dal metodo *SeptiFast* (SeptiFast+/BactAlert-) (Fig. 1).

La Figura 2 riporta in maniera dettagliata, rispetto a tutti i germi identificati/rilevati, i risultati ottenuti in questo studio. Nel gruppo dei 23 risultati SeptiFast-/BactAlert+, dalle emocolture positive sono stati ottenuti 7 isolamenti di Staphylococcus coagulase negative (CoNs). In tutti i 7 casi la crescita colturale ha riguardato solo 1 dei 6 flaconi ottenuti dallo stesso paziente e

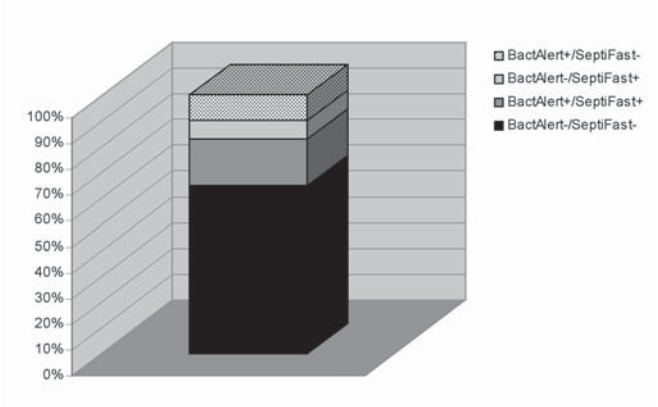

Figura 1. Il grafico mostra le percentuali dei risultati in termini di concordanza e discordanza tra i 2 metodi testati.

quindi i CoNs isolati sono stati considerati e refertati come contaminazioni avvenute durante il prelievo, in accordo con le procedure standard definite dal laboratorio[9]. In altri 7 casi SeptiFast-/BactAlert+, SeptiFast non ha confermato gli isolati in quanto i microrganismi identificati non sono inclusi nel SeptiFast test menu.

In definitiva, 9 casi sui 23 SeptiFast-/BactAlert+ sono da considerare veri falsi negativi del metodo SeptiFast,

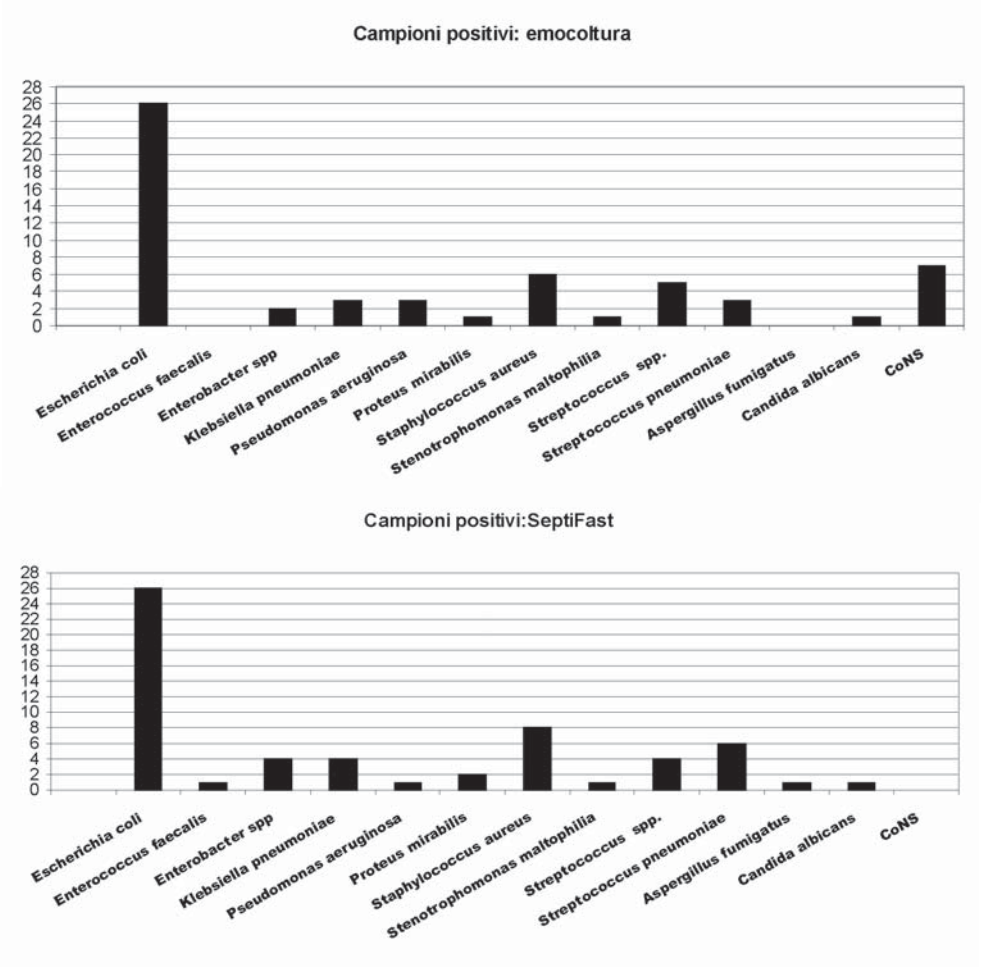

Figura 2. I due grafici mostrano, rispettivamente ai due metodi utilizzati, i risultati ottenuti. Sull'asse delle ordinate il numero dei microrganismi/DNA rilevati.

così ripartiti: 4 Escherichia coli, 2 Pseudomonas aeruginosa, 1 Staphylococcus aureus, 1 Streptococcus pyogenes, 1 Streptococcus bovis.

Tra i 17 casi SeptiFast+/BactAlert-, il risultato ottenuto con SeptiFast è stato avvalorato o dal concomitante isolamento dello stesso germe su campioni provenienti da altri siti di prelievo, o dall'evidenza che il paziente era giunto in Pronto Soccorso dopo avere già iniziato una terapia antibiotica domiciliare, o dalle notizie cliniche ottenute. In particolare, il DNA microbico rilevato in questi casi era riferibile a Klebsiella pneumoniae (1 caso), Proteus mirabilis (1 caso), Streptococcus pneumoniae (3 casi), Aspergillus fumigatus (1 caso), E. coli (4 casi), Enterococcus faecalis (1 caso), Enterobacter spp. (2 casi), S. aureus (3 casi), Streptococcus spp. (1 caso).

In assenza di un metodo di laboratorio che possa essere ad oggi considerato un vero gold standard per la diagnosi di sepsi, abbiamo confrontato i due metodi assumendo che: (a) i risultati delle emocolture siano accurati al 100%; (b) i risultati del SeptiFast siano accurati al 100%; (c) nel calcolo percentuale di accuratezza dei due metodi devono essere esclusi i contaminanti isolati e/o il DNA non rilevabile dal test menu di SeptiFast[11].

Sulla base di queste definizioni, se si considera l'emocoltura come gold standard, la sensibilità ed il Valore Predittivo Positivo (PPV) di SeptiFast sono rispettivamente 82 % e 71.9 %; la specificità ed il Valore Predittivo Negativo (NPV) di SeptiFast, invece, sono 90.7 % e 94.5 %.

Se si considera, viceversa, il metodo SeptiFast come gold standard per la diagnosi eziologica di sepsi, sensibilità e Valore Predittivo Positivo (PPV) delle emocolture sono rispettivamente 71.9% e l'82%; specificità e Valore Predittivo Negativo (NPV), invece, sono 94.5 % e 90.7%.

Il turnaround time (TAT) per l'identificazione finale dei patogeni isolati con l'esame colturale è stato, poi, confrontato con il tempo necessario per rilevare il DNA dei microrganismi con SeptiFast, premesso che il nostro laboratorio è ormai da anni organizzato per produrre un flusso di lavoro continuativo di sette giorni alla settimana[12,13].

Come dimostrato in Tabella I con il metodo SeptiFast è stato prodotto un risultato di positività o negatività mediamente in 15 ore. Per quanto riguarda i risultati positivi e senza avvalersi di test diretti, il metodo emocolturale, confermando i dati di letteratura, è stato in grado di fornire un'indicazione microscopica al Gram mediamente in 36 ore, e di generare un'identificazione biochimica di specie in 96 ore. Per quanto riguarda invece i risultati negativi, con l'emocoltura è necessario attendere almeno 5 giorni per ottenere un risultato definitivo[14,15.]

Discussione

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare dal punto di vista strettamente analitico il tradizionale metodo emocolturale con il test molecolare SeptiFast, valutando la concordanza/discordanza tra i risultati ottenuti con i due sistemi diagnostici e misurandone il TAT in pazienti giunti in Pronto Soccorso con sospetto di sepsi, e arruolati nello studio in accordo con i criteri descritti nei "Materiali e Metodi".

Numerosi studi hanno sottolineato le limitazioni sia del metodo colturale standard che del metodo molecolare[6]. Sotto questo profilo, i risultati del nostro studio non si discostano da quanto riportato già da altri autori. Per quanto riguarda i 9 risultati falsi negativi ottenuti con il SeptiFast, essi possono essere spiegati dalla limitatezza del test menu, dalla specificità dei primers e probes, dalla variabilità genetica dei siti target. In 4 casi SeptiFast ha evidenziato problemi in termini di sensibilità, peraltro riferibili a batteriemie transitorie in corso di urosepsi da E.coli. Su questo aspetto c'è da rilevare che è già in corso una valutazione per determinare anche la correlazione tra livelli di ridotta sensibilità e "momento del prelievo", in quanto i prelievi dell'emocoltura e di SeptiFast eseguiti in momenti diversi potrebbero giustificare un risultato dissociato tra i due metodi.

I 17 risultati falsi negativi ottenuti dalle emocolture ricalcano le percentuali riportate dalla letteratura[2] e possono essere inquadrabili come risultati potenzialmente inficiati da un inadeguato volume di sangue prelevato, dall'eventuale inizio della terapia antimicrobica prima dell'esecuzione del prelievo, e dal numero stesso dei prelievi ottenuti.

In particolare, da un punto di vista analitico, per quanto riguarda il confronto tra i due metodi, sono emersi diversi elementi di estremo interesse.

Innanzitutto, tra gli elementi a favore del test molecolare, è chiaramente evidente che SeptiFast non sembra essere affatto influenzato (come invece le emocolture) dalle possibili contaminazioni dovute a stafilo-

Tabella I. *Turnaround time* tra emocoltura e SeptiFast a confronto rispetto ai microrganismi isolati.

Microrganismi	Rilevazione molecolare(range)	Colorazione di GRAM	Identificazione biochimica
FUNGHI	15 (6>30)	36±12	96±12
BACILLI GRAM-	15 (6>30)	36±12	84±12
COCCHI GRAM+	15 (6>30)	36±12	84±12

cocchi coagulasi negativi.

Inoltre, tra i 17 casi risultati SeptiFast+/BactAlert-, SeptiFast ha permesso di individuare gli agenti eziologici di altrettante sepsi in contesti clinici di elevata criticità. In tutti questi casi è stato possibile correlare l'agente eziologico con le patologie sottese. Tra queste: 1 sepsi in paziente neutropenico (Aspergillus fumigatus), 4 sepsi post-chirurgiche (E. faecalis, K. Pneumoniae, S. aureus, Enterobacter spp), 3 urosepsi (E.coli), 1 sepsi catetere-correlata (P.mirabilis), 2 sepsi in corso di polmonite (S. pneumoniae, E.coli), 3 in corso di endocardite (Streptococcus spp., S. aureus), 1 in corso di colecistite (Enterobacter spp). Inoltre SeptiFast ha consentito di individuare 2 casi di meningite batterica (S. pneumoniae) rilevando l'agente eziologico sia da sangue periferico che da liquido cerebrospinale. A nostra conoscenza, tra l'altro, è la prima volta che il test viene utilizzato con successo su liquor.

Per quanto riguarda, invece, gli elementi a sfavore del test, si può invece evidenziare quanto segue:

SeptiFast non ha consentito (perché non sono disponibili i rispettivi target) di identificare 7 microrganismi (2 Morganella morganii, 1 Providencia stuartii, 1 Escherichia fergusonii, 1 Bacteroides capillosus, 1 Corynebacterium urealyticum, 1 Fusobacterium nucleatum).

Tra questi, M. morganii e P. stuartii rappresentano una discreta rilevanza nel contesto epidemiologico di comunità, soprattutto come agenti eziologici di infezione delle vie urinarie.

Tra gli aspetti clinicamente più rilevanti del nostro studio vale la pena sottolineare che, sulla base dei microrganismi rilevati con SeptiFast, nel 56% dei casi SeptiFast+/BactAlert- è stato possibile suggerire una terapia antibiotica mirata in media dopo solo 15 ore dall'arrivo del campione in laboratorio, mentre contestualmente è stato possibile sfruttare l'elevato valore predittivo negativo del test, decidendo di intraprendere una de-escalation therapy nella maggior parte dei casi SeptiFast-/BactAlert-.

Premesso che ad oggi non è possibile pensare di sostituire l'esame colturale con la diagnostica molecolare, tuttavia i valori di PPV e NPV riscontrati con SeptiFast rispetto all'emocoltura, oltre al notevole vantaggio in termini di TAT ottenibile con il metodo molecolare, possono rappresentare elementi importanti a supporto dell'utilità di disporre anche di questo presidio diagnostico soprattutto in contesti clinici ad elevata criticità, quali la sepsi grave e lo shock settico, nei quali, il tempo di risposta rappresenta un elemento di primaria importanza, anche se l'utilizzo e l'interpretazione del test richiedono elevata esperienza tecnica e una stretta collaborazione tra microbiologi e clinici.

Tra i limiti del metodo molecolare si può invece rilevare, oltre alla necessità di spazi dedicati, l'elevata esperienza e l'impegno di personale richiesti per la sua gestione, oltre alla necessità di un'efficiente organizzazione atta a garantirne la continuità analitica.

Considerato l'ambito di applicazione clinica nel quale si configura questo test molecolare, l'aspetto dell'efficienza e della continuità analitica rappresentano, infatti, due aspetti che non possono essere sottovalutati, se si intende raggiungere un'adeguata efficacia diagnostica.

L'organizzazione del nostro laboratorio, già da tempo operativo 7 giorni su 7, consentendo di gestire, se necessario, una seduta analitica al giorno, ci ha messo nelle condizioni ideali per sperimentare il notevole risparmio sul TAT rispetto all'emocoltura e il vantaggio che, rispetto all'emocoltura, questo analytical improvement può rappresentare sull'outcome clinico.

In conclusione, i risultati analitici ottenuti con SeptiFast consentono di ritenere prospetticamente utile lo sfruttamento del metodo nell'ottica di migliorare efficienza ed efficacia diagnostica in un contesto clinico critico, quale, quello della sepsi, anche quando proveniente dalla comunità, se si considera il valore predittivo negativo e positivo rilevato, a cui si aggiunge la marcata riduzione del TAT rispetto all'esame colturale.

In questa ottica, un più ampio panel di microrganismi identificabili migliorerebbe ulteriormente la performance analitica, permettendo di aumentare ulteriormente il valore predittivo positivo del metodo rispetto all'emocoltura.

I risultati di SeptiFast, disponibili mediamente in 15 ore dall'arrivo in laboratorio, consentono, infatti, di ottenere un notevole clinical outcome improvement rispetto alla diagnostica tradizionale, migliorando al tempo stesso i tempi di intervento terapeutico e la scelta del farmaco più appropriato.

Da un punto di vista economico, infine, a fronte di un costo analitico per seduta relativamente elevato rispetto alla diagnostica colturale tradizionale, è importante sottolineare che esso è certamente compatibile, se rapportato all'outcome, con la spesa prevista per la terapia e la degenza di un paziente con sepsi[16].

Bibliografia

1. Peters RP, Mohammadi T, Vandenbroucke-Grauls CM, Danner SA, van Agtmael MA, Savelkoul PH. Detection of bacterial DNA in blood samples from febrile patients: underestimated infection or emerging contamination? FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 42:249-53.
2. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). JAMA 1992; 268:3452-5.
3. von Landenberg P, Shoenfeld Y. New approaches in the diagnosis of sepsis. Isr Med Assoc J 2001; 3:439-42.
4. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. J Med Microbiol 2008; 57:601-4.
5. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, et al. Diagnosis of bloodstream infections in immuno-compromised patients by real-time PCR. J Infect 2009; 58:346-51.
6. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection

enhancement of bacteremia and fungemia. Crit Care Med 2008; 36:1487-92.
7. Chaiyakunapruk N, Veenstra DL, Lipsky BA, Saint S. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. Ann Intern Med 2002; 136:792-801.
8. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? J Clin Microbiol 2007; 45:3546-8.
9. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. J Clin Microbiol 2003; 41:2275-8.
10. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. Med Microbiol Immunol 2008; 197:313-24.
11. Westh H, Lisby G, Breysse F, Böddinghaus B, Chomarat M, Gant V, at al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. Clin Microbiol Infect 2009; 15:544-51.
12. Grosso S, Bruschetta G, De Rosa R, Avolio M, Camporese A. Improving the efficiency and efficacy of pre-analytical and analytical work-flow of urine cultures with urinary flow cytometry. New Microbiol 2008; 31:501-5.
13. Avolio M, Grosso S, Bruschetta G, De Rosa R, Camporese A. Direct antifungal susceptibility testing of positive Candida blood cultures by Sensititre YeastOne. New Microbiol 2009; 32:179-84.
14. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis 2005; 41: 1677-80.
15. Bouza E, Sousa D, Munoz P, Rodriguez-Creixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. Clin Infect Dis 2004; 39:1161-9.
16. Camporese A. Esperienze tecnico-organizzative per gestire la diagnostica molecolare delle sepsi. RIMeL / IJLaM 2008; 4 (Suppl.):45-9.