

UNIVERSITA' DEGLI STUDI "G. d'Annunzio"
Chieti-Pescara

SCUOLA SUPERIORE "G. d'Annunzio"

DOTTORATO DI RICERCA IN

Innovative Technologies in Clinical Medicine and Dentistry

CICLO XXXVII

***Analisi dei biomarcatori salivari mediante metodo
immunoenzimatico Pathfast: ruolo della presepsina
(sCD14-ST) nella diagnosi delle malattie parodontali e
orali***

Department of Innovative Technologies in Clinical Medicine and Dentistry

Scientific Disciplinary MED/28

Dottorando
Dott. Luigi Falconio

Coordinatore
Prof. Sergio Caputi

Tutor
Prof. Tonino Traini

Anni Accademici 2021/2024

INDICE

Chapter 1	Introduzione	5
Chapter 2	Valutazione della Presepsina nelle infezioni maxillo-facciali: nuovo biomarcatore precoce della sepsi?	18
Chapter 3	Effetto della temperatura sulla stabilità pre-analitica della Presepsina in fluidi biologici di neonati pretermine e a termine	29
Chapter 4	I livelli salivari di Presepsina nella malattia parodontale dipendono da sesso, profondità del sondaggio, sanguinamento e livello di attacco clinico negli adulti	48
Chapter 5	Discussione e conclusioni	71
	Prospettive future e impatto	74
	Ringraziamenti	76

ABBREVIAZIONI

- ☐ **P** – Parodontite
- ☐ **PD** – Malattia parodontale
- ☐ **ISS** – Istituto Superiore di Sanità
- ☐ **SIDP** – Società Italiana di Parodontologia e Implantologia
- ☐ **EFP** – European Federation of Periodontology
- ☐ **AAP** – American Academy of Periodontology
- ☐ **CRP** – Proteina C-reattiva
- ☐ **PCT** – Procalcitonina
- ☐ **PSEP** – Presepsina
- ☐ **FDA** – Food and Drug Administration
- ☐ **EMA** – European Medicines Agency
- ☐ **CLEIA** – Chemiluminescent Enzyme Immunoassay
- ☐ **ELISA** – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- ☐ **OCD** – Malattia della cavità orale
- ☐ **PD** – Malattia parodontale
- ☐ **BOP** – Sanguinamento al sondaggio
- ☐ **PI** – Indice di placca
- ☐ **BI** – Indice di sanguinamento
- ☐ **PPD** – Profondità del sondaggio parodontale
- ☐ **CAL** – Livello di attacco clinico

Alla mia famiglia

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1. Esiti delle malattie orali e parodontali

1.1 Malattie della cavità orale

1.2 Malattia parodontale

1.3 Diagnosi ed epidemiologia

1.4 Classificazione delle malattie parodontali e peri- implantari

1.5 Presepsina

2. Obiettivi e struttura della tesi

1. PATOLOGIE DEL CAVO ORALE E MALATTIA PARODONTALE

1. Risultati delle malattie orali e parodontali

1.1 Malattie della cavità orale (COM)

Le malattie della cavità orale (COM), tra cui la parodontite, la gengivite e altre condizioni infiammatorie, rappresentano una sfida diagnostica significativa. Molte di queste patologie si sviluppano in modo subdolo, spesso con sintomi aspecifici, rendendo difficile una diagnosi precoce e accurata. Identificare biomarcatori precoci per queste condizioni è quindi fondamentale, non solo per migliorare la prognosi, ma anche per prevenire complicazioni associate.

Le COM possono derivare da vari fattori eziologici, i più comuni sono:

- **Malattie di origine dentale**, come la carie dentale, che può progredire verso complicazioni più gravi.
- **Accumulo di placca e tartaro**, che porta a gengivite e parodontite, condizioni infiammatorie che possono compromettere l'integrità delle strutture di supporto dei denti.
- **Lesioni traumatiche e/o infiammatorie delle mucose**, comprese ferite e irritazioni causate da dispositivi protesici, nonché lo sviluppo di ulcere orali e lesioni aftose dovute a infezioni virali, come l'herpes.

Nei casi gravi, alcune di queste condizioni possono progredire verso lesioni precancerose o addirittura malignità della cavità orale (fonte: ISS). Una gestione tempestiva e mirata di queste malattie, supportata da strumenti diagnostici avanzati e biomarcatori affidabili, è essenziale per migliorare la salute orale e prevenire complicazioni gravi.

È importante notare che la combinazione di determinati fattori di rischio, come il consumo simultaneo di tabacco e alcol, può aumentare significativamente la probabilità di sviluppare malattie della cavità orale. Ad esempio, l'uso combinato di tabacco e alcol ha dimostrato di elevare il rischio fino a 50 volte. Pertanto, adottare uno stile di vita sano—caratterizzato dalla cessazione del fumo, consumo moderato di alcol, dieta equilibrata ricca di frutta e verdura e corretta igiene orale—è essenziale per la prevenzione di queste condizioni.

La **malattia parodontale** è una condizione infiammatoria cronica che interessa i tessuti di supporto dei denti, tra cui gengive, legamento parodontale e osso alveolare. È una delle principali cause di perdita dei denti negli adulti e si caratterizza per una distruzione progressiva di questi tessuti.

Tabella 1. Fattori di rischio della malattie

Fattori di rischio	Descrizione
Fumo	L'uso di sigarette, sigari o pipe è fortemente associato a un aumento del rischio di sviluppare malattie orali, comprese lesioni precancerose e tumori della cavità orale.
Alcol	Il consumo eccessivo di alcol è un noto fattore di rischio per le malattie della cavità orale, con effetti significativi su denti, gengive e mucose.
Scarsa igiene orale	Una pulizia inadeguata di denti e gengive può portare all'accumulo di placca e tartaro, aumentando il rischio di sviluppare gengiviti, parodontiti e altre infezioni orali. .
Trauma cronico	Un'irritazione persistente o lesioni nella mucosa orale, spesso causate da protesi mal adattate o denti scheggiati, possono predisporre gli individui a malattie orali..
Dieta inadeguata	Una dieta carente di vitamine e antiossidanti può compromettere la salute orale e aumentare la suscettibilità a infezioni e lesioni. .
Predisposizione genetica	Una storia familiare di malattie orali può indicare una maggiore suscettibilità individuale a tali condizioni.

La malattia parodontale (PD) è classificata in due categorie principali:

1. **Gengivite:** una forma precoce e reversibile della malattia, limitata all'infiammazione gengivale, caratterizzata da arrossamento, gonfiore e sanguinamento. È principalmente causata dall'accumulo di placca dentale e può progredire in parodontite se non trattata.
2. **Parodontite:** uno stadio più avanzato e irreversibile della malattia, in cui l'infiammazione si estende ai tessuti parodontali più profondi, portando a riassorbimento osseo alveolare e formazione di tasche parodontali.

Nel 2017 è stato introdotto un sistema di classificazione rivisitato per le malattie parodontali, definendo la gengivite come la presenza di sanguinamento al sondaggio (BOP) in più del 10% dei siti. In base alla percentuale di siti interessati, la gengivite può essere ulteriormente suddivisa in:

- **Gengivite localizzata:** quando il BOP è presente nel 10% al 30% dei siti.
- **Gengivite generalizzata:** quando il BOP interessa più del 30% dei siti.

Se non trattata, la gengivite può progredire in parodontite. Tuttavia, rimane una condizione completamente reversibile con una corretta igiene orale e un intervento professionale.

1.2.1 Parodontite

La parodontite (P) rappresenta uno stadio avanzato e irreversibile della malattia parodontale, caratterizzato dalla distruzione delle strutture di supporto del dente. I principali segni clinici includono:

- Perdita di attacco e osso alveolare,
- Formazione di tasche parodontali,
- In alcuni casi, recessione gengivale.

Il segno distintivo della P è la perdita di attacco, che riflette il danno strutturale ai tessuti parodontali. A differenza della gengivite, il danno causato dalla P è irreversibile, richiedendo interventi terapeutici mirati per fermare la progressione della malattia e prevenire ulteriori complicazioni.

Fattori di rischio per le malattie parodontali

Diversi fattori di rischio contribuiscono all'insorgenza e alla progressione delle malattie parodontali (PD), tra cui:

- Scarsa igiene orale, che favorisce l'accumulo di placca batterica,
- Fumo, noto per compromettere la risposta immunitaria e la guarigione dei tessuti,
- Diabete mellito, che aumenta la suscettibilità alle infezioni,
- Predisposizione genetica, che può influenzare la risposta infiammatoria,
- Stress, che influisce negativamente sul sistema immunitario,
- Squilibri ormonali, come quelli che si verificano durante la gravidanza o la menopausa, che possono aumentare la vulnerabilità gengivale.

1.2.2 Diagnosi e Implicazioni Sistemiche

Una diagnosi precoce della parodontite (PD) è essenziale per prevenire la sua progressione. Le valutazioni cliniche e radiografiche, insieme agli indici parodontali come la profondità di sondaggio e il livello di attacco clinico, sono fondamentali per determinare la gravità della malattia e formulare un piano di trattamento appropriato.

In conclusione, la malattia parodontale non è solo una condizione locale, ma è anche collegata a disturbi sistemici come le malattie cardiovascolari, il diabete e le complicazioni della gravidanza, sottolineando l'importanza di una gestione tempestiva e completa.

1.3 Diagnosi ed Epidemiologia

La diagnosi della PD si basa sui seguenti elementi chiave:

- Anamnesi medica,
- Esame clinico,
- Valutazione radiografica,
- Esami di laboratorio.

1.3.1 Anamnesi Medica

Un'accurata anamnesi medica e parodontale è essenziale per identificare i fattori che influenzano l'insorgenza e la progressione della parodontite. I principali fattori includono:

- **Esposizioni ambientali:** come il fumo e l'uso di farmaci (ad esempio, ciclosporina, nifedipina, fenitoina),
- **Malattie sistemiche:** condizioni come il diabete o altri disturbi ereditari/acquisiti che compromettono la risposta immunitaria,

- **Predisposizione genetica:** alcune forme di parodontite a insorgenza precoce mostrano tendenze familiari, e specifici polimorfismi genetici possono influenzare l'espressione clinica della malattia,
- **Cambiamenti ormonali:** associati alla pubertà, alla gravidanza e ad altre condizioni fisiologiche.

1.3.2 Esame Clinico

L'esame clinico consiste in:

- **Osservazione e ispezione:** una valutazione approfondita dei denti, dei tessuti gengivali e della mucosa peridontale, inclusa la formula dentale, la posizione dei denti, la condizione dei tessuti molli e altre caratteristiche rilevanti,
- **Valutazione dell'igiene orale:** essenziale per la diagnosi e la pianificazione del trattamento, considerando i livelli di placca batterica e la gravità delle lesioni parodontali,
- **Sondaggio parodontale:** una procedura clinica fondamentale per diagnosticare la malattia parodontale, che consente di:
 - misurare la profondità delle tasche parodontali e la recessione gengivale,
 - rilevare l'involuzione della forcazione,
 - identificare la presenza di sanguinamento al sondaggio, tartaro e restauri sovrastanti.

Il sondaggio parodontale aiuta anche a distinguere diverse forme di parodontite, come:

- Parodontite severa,
- Parodontite a insorgenza precoce,
- Parodontite associata a malattie sistemiche,
- Condizioni parodontali avanzate o rare.

1.3.3 Valutazione Radiografica

Gli esami radiografici forniscono informazioni dettagliate sulle strutture di supporto parodontale. La tecnica più comunemente utilizzata è la radiografia periapicale intraorale, eseguita utilizzando la tecnica del fascio parallelo per garantire una precisione diagnostica ottimale.

1.3.4 Esami di Laboratorio

Le indagini di laboratorio integrano il processo diagnostico e includono:

- **Esami microbiologici:** per identificare le specie batteriche responsabili della malattia parodontale,
- **Esami ematologici:** per valutare il numero e la funzionalità dei leucociti polimorfonucleati e dei linfociti,
- **Esami genetici:** per valutare la suscettibilità genetica alla parodontite analizzando specifici polimorfismi associati alla malattia.

Classificazione della PD

Secondo la classificazione del 2017 della European Federation of Periodontology (EFP), la parodontite è categorizzata in base alla gravità, complessità, distruzione tissutale e velocità di progressione. Questa classificazione include quattro stadi e tre gradi. La malattia è considerata generalizzata quando interessa più del 30% dei siti, mentre è classificata come localizzata se un numero minore di siti è coinvolto o se sono interessati solo incisivi e molari

Tabella 2. Classificazione della malattia parodontale (PD).

Stadio	Perdita di attacco(mm)	Rx Perdita ossea	Denti persi	Complessità
I	1 to 2	Terzo coronale (<15%)	Nessuna	PPD ≤4 mm, Perdita ossea orizzontale
II	3 to 4	Terzo coronale (15-33%)	Nessuna	PPD ≤5 mm, Perdita ossea orizzontale
III	≥5	Estensione al terzo medio e oltre	≤4 denti	PPD ≥6 mm, difetti ossei verticali ≤3 mm, coinvolgimento della forcazione (Classi II o III)
IV	≥6	Estensione al terzo medio e oltre	≤5 denti	PPD ≥6 mm, difetti ossei verticali ≤3 mm, coinvolgimento della forcazione (Classi II o III), necessità di riabilitazione

1.5 Presepsina

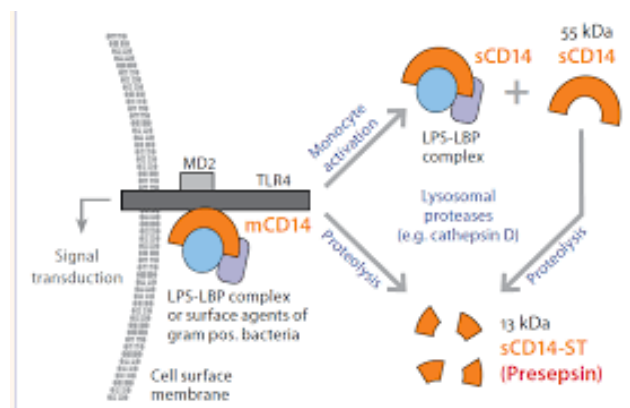
Negli ultimi anni, la ricerca clinica ha evidenziato l'importanza dei biomarcatori infiammatori nel migliorare la diagnosi differenziale di varie patologie, comprese quelle che interessano la cavità orale. Tra i biomarcatori emergenti per la diagnosi di sepsi, la presepsina (PSEP) ha mostrato un potenziale promettente.

La presepsina origina dal recettore di membrana mCD14, una glicoproteina espressa su monociti, macrofagi e neutrofili. Questo recettore svolge un ruolo cruciale nella risposta immunitaria legandosi ai lipopolisaccaridi batterici e formando un complesso che attiva la cascata infiammatoria tramite il recettore toll-like 4. Durante questo processo, mCD14 viene scisso e rilasciato in circolo nella sua forma solubile (sCD14), che successivamente subisce un ulteriore processamento proteolitico da parte della catepsina D, generando la presepsina. Questa molecola, composta da 64 residui di amminoacidi, è associata alla presenza di infezioni batteriche sia Gram-positive che Gram-negative.

Tabella 3; Caratteristiche della presepsina

Caratteristiche	Descrizione
Alta specificità	Infezioni batteriche e meno influenzata da processi infiammatori non infettivi.
Attivazione rapida	Entro 2 ore dall'insorgenza dell'infezione batterica o fungina, con concentrazione massima dopo 3 ore.
Peso molecolare e emivita	13 kDa con emivita di circa 4–5 ore, consentendo un monitoraggio tempestivo dei cambiamenti nello stato dell'infezione.
Versatilità analitica	Rilevabile in vari fluidi biologici come: sangue materno e periferico, liquido cerebrospinale, urine, saliva e latte. I risultati sono disponibili in meno di 15 minuti.

Figura 1. Attivazione della Presepsina e processo di rilascio



L'applicazione clinica della presepsina ha ricevuto validazione e approvazione regolatoria da parte di autorità come la Food and Drug Administration (FDA) e l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA). Grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, la presepsina facilita la rilevazione precoce della sepsi e consente un monitoraggio efficace della progressione della malattia. Inoltre, la sua rilevazione è possibile tramite kit disponibili in commercio, facili da usare e che permettono un'analisi riproducibile in fluidi biologici non invasivi, riducendo lo stress associato ai prelievi frequenti di sangue.

La presepsina può essere misurata quantitativamente utilizzando due metodi principali: il saggio immunoenzimatico legato a enzimi (ELISA) e il saggio immunoenzimatico chemiluminescente non competitivo (CLEIA). Il saggio ELISA (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) è un metodo basato su piastre progettato per rilevare e quantificare la presepsina nei campioni di plasma attraverso un'interazione altamente specifica antigene-anticorpo per la rilevazione colorimetrica. Tuttavia, questa tecnica ha bassa linearità ed è suscettibile a interferenze da fattori endogeni (come il fattore reumatoide e il complemento) e fattori esogeni (inclusi emolisi del campione, contaminazione batterica e contaminanti iatrogeni). Al contrario, il metodo CLEIA (Mitsubishi PATHFAST® di LSI Medience Corporation) è la tecnica più ampiamente adottata per la quantificazione della presepsina. Questo saggio point-of-care analizza sia il plasma che il sangue intero utilizzando una micro-tecnologia, richiedendo volumi di campione che vanno da 50 microlitri a 5 millilitri. Il metodo CLEIA ha svolto un ruolo cruciale nell'affermare la presepsina come biomarcatore quantificabile.

Nonostante questi progressi, alcuni aspetti chiave della presepsina richiedono ancora ulteriori indagini. I range di riferimento in diversi fluidi biologici devono ancora essere stabiliti e potenziali bias che influenzano l'affidabilità delle misurazioni della presepsina devono essere chiariti dalla comunità scientifica.

2. OBIETTIVI E STRUTTURA DELLA TESI

Sulla base delle evidenze precedentemente riportate, questa tesi si propone di indagare il ruolo della presepsina (PSEP) in relazione a:

- Alla sua potenziale applicazione nella diagnosi delle infezioni della cavità orale, in particolare nei pazienti con malattia parodontale.
- Alle differenze nei livelli di PSEP nella saliva tra individui sani e quelli con stadi avanzati di parodontite, nonché alle variazioni prima e dopo la terapia di mantenimento non chirurgica.
- Alla stabilità termica della PSEP.

Come descritto nel Capitolo 1, l'uso di biomarcatori nei fluidi biologici può facilitare la rilevazione di condizioni sistemiche di sepsi. La PSEP viene quindi introdotta come un potenziale nuovo biomarcatore, con l'obiettivo di valutarne l'utilità nella diagnosi delle infezioni odontogene. Il valore diagnostico della PSEP nei casi di sepsi derivanti da un'infezione odontogena e la sua valutazione nel contesto della valutazione prognostica degli interventi chirurgici eseguiti nella regione maxillo-facciale.

Nel Capitolo 2, viene descritto l'uso della PSEP come strumento diagnostico per la sepsi derivante da un'infezione odontogena, insieme a una valutazione del suo ruolo nella valutazione prognostica degli interventi chirurgici eseguiti nella regione maxillo-facciale. Inoltre, è stata condotta una comparazione con i dati della letteratura esistente su altri biomarcatori diagnostici per la sepsi sistemica.

Nel Capitolo 3, abbiamo indagato la termostabilità della PSEP, concentrandoci sulla sua stabilità e affidabilità in condizioni di conservazione specifiche che differiscono da quelle raccomandate come sicure dal produttore (PATHFAST™).

Nel Capitolo 4, abbiamo esplorato la relazione tra i livelli di PSEP e la malattia parodontale. L'obiettivo era determinare se la PSEP potesse fungere da biomarcatore affidabile per la malattia parodontale in una coorte di pazienti adulti, confrontando i suoi valori con i parametri clinici comunemente utilizzati per la diagnosi (PI, BI, PPD, CAL).

Infine, nel Capitolo 5, sono riportati il riassunto e le conclusioni della tesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: A multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2014;20:30–34.
2. Maddaloni C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Caoci S, Bersani I, Ronchetti MP, Auriti C. The Emerging Role of Presepsin (P-SEP) in the Diagnosis of Sepsis in the Critically Ill Infant: A Literature Review. *Int J Mol Sci* 2021;22:12154.
3. Galliera, E., Massaccesi, L., 2019. Clinical application of presepsin as diagnostic biomarker of infection: overview and updates. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 58, 11–17. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0643>
4. Aliu-Bejta A, Atelj A, Kurshumliu M, Dreshaj S, Baršić B. Presepsin values as markers of severity of sepsis. *Int J Infect Dis.* 2020;95:1-7.
5. . Yaegashi, Y., Sato, N., 2005. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 11, 234–238. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0400-4>
7. Pietrasanta C, Ronchi A, Vener C, Poggi C, Ballerini C, Testa L et al. Presepsin (Soluble CD14 Subtype) as an Early Marker of Neonatal Sepsis and Septic Shock: A Prospective Diagnostic Trial. *Antibiotics* 2021;10:580
8. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: A multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2014;20:30–34.
9. Memar, M.Y., Baghi, 2019. Presepsin: A promising biomarker for the detection of bacterial infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.124>
10. . Yoon, S.H., Kim, 2019. Presepsin as a diagnostic marker of sepsis in children and adolescents: a systemic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 19, 760. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4397-1>
11. 3. Novelli, G., Morabito, 2013. Pathfast Presepsin Assay for Early Diagnosis of Bacterial Infections in Surgical Patients: Preliminary Study. *Transplantation Proceedings* 45, 2750–2753. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.07.021>
12. Ulla, M., Pizzolato, 2013. Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Crit Care* 17, R168. <https://doi.org/10.1186/cc12847>
13. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-33

14. Wu, C.-C., Lan, 2017. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intensive Care* 7, 91. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0316-z>
15. Zhang, X., Liu, 2015. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. *Crit Care* 19, 323. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1032-4>
16. Liu, B., Chen, 2013. Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department. *Crit Care* 17, R244. <https://doi.org/10.1186/cc13070>
17. Fikri B, Tani Y, Nagai K, Sahara M, Mitsuishi C, Togawa Y, et al. Soluble CD14 in Breast Milk and Its Relation to Atopic Manifestations in Early Infancy. *Nutrients* 2019;11:2118.
18. Özdemir, Eda Çetin, Meral Uzunkaya, Hasan Gündoğar, and Ergül Belge Kurutaş. 2024. 'Association between Raftlin and Presepsin Levels with Periodontal Healthy and Disease Conditions'. *Archives of Oral Biology* 160 (April):105880. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.105880>.
19. Rakic, Mia, Aleksandra Petkovic-Curcin, Xavier Struillou, Smiljana Matic, Novak Stamatovic, and Danilo Vojvodic. 2015. 'CD14 and TNF α Single Nucleotide Polymorphisms Are Candidates for Genetic Biomarkers of Peri-Implantitis'. *Clinical Oral Investigations* 19 (4): 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1313-3>.
20. Vijaya Kumar, K., Mohamed Faizuddin, Neevan Dr DSouza, and Anupama Rao. 2020. 'Estimation of Soluble CD14 Levels in Gingival Crevicular Fluid and Serum in Diseased and Healthy Periodontium'. *Journal of Oral Biosciences* 62 (3): 289–95. <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.07.002>.
21. Wu, Jiayuan, Liren Hu, Gaohua Zhang, Fenping Wu, and Taiping He. 2015. 'Accuracy of Presepsin in Sepsis Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *PloS One* 10 (7): e0133057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133057>.
22. Abdulkareem, Ali A., Firas B. Al-Taweel, Ali J. B. Al-Sharqi, Sarhang S. Gul, Aram Sha, and Iain L. C. Chapple. 2023. 'Current Concepts in the Pathogenesis of Periodontitis: From Symbiosis to Dysbiosis'. *Journal of Oral Microbiology* 15 (1): 2197779. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>.
23. Ahmad, Paras, Andrea Escalante-Herrera, Lina M. Marin, and Walter L. Siqueira. 2024. 'Progression from Healthy Periodontium to Gingivitis and Periodontitis: Insights from Bioinformatics-Driven Proteomics - A Systematic Review with Meta-Analysis'. *Journal of Periodontal Research*, June. <https://doi.org/10.1111/jre.13313>.
24. Arslan, Rana, Meltem Karsiyaka Hendek, Ucler Kisa, and Ebru Olgun. 2021. 'The Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid Periostin Levels in Patients with Gingivitis and Periodontitis'. *Oral Diseases* 27 (6): 1478–86. <https://doi.org/10.1111/odi.13664>.
25. Li, Jie, Xiao Qiao, and Jin Shang. 2024. 'Association Analysis between CD14 Gene Polymorphisms and Peri-Implantitis Susceptibility in a Chinese Population'. *Immunity, Inflammation and Disease* 12 (4): e1230. <https://doi.org/10.1002/iid3.1230>.

CAPITOLO II

Presepsin Assessment in Maxillo-facial Infections: A New Early Biomarker of Sepsis?

Luigi Falconio^{1*}, Oriana Trubiani¹, Diego Gazzolo², Francesco Valente¹, Tonino Traini¹

¹Department of Innovative Technologies in Medicine & Dentistry - University "G. d'Annunzio" Chieti, Italy.

²Neonatal Intensive Care Unit, G. d'Annunzio University, Chieti, Italy.

SOMMARIO

Le infezioni odontogene possono causare gravi problemi infiammatori dei tessuti molli e duri nell'area maxillo-facciale, fino al coinvolgimento, sebbene in circostanze piuttosto remote, dei tessuti cerebrali. Negli ultimi anni, è stato sviluppato un approccio diagnostico-terapeutico olistico nella gestione delle infezioni odontogene, attraverso un'attenta anamnesi sistemica del paziente con una condizione infettiva nella cavità orale.

La rilevazione precoce delle condizioni di sepsi sistemica è stata facilitata utilizzando biomarcatori sierici come la Proteina C-Reattiva (PCR), la Procalcitonina (PCT) e la Presepsina (PSEP) nei pronto soccorso ospedalieri. Tuttavia, anche se utilizzati in combinazione, la loro accuratezza diagnostica è tale da suggerire l'importanza di ricercare nuovi biomarcatori più specifici e sensibili. È stato analizzato un totale di 9 articoli per indagare l'uso della PSEP come biomarcatore nelle infezioni della regione maxillo-facciale, includendo solo articoli in lingua inglese e la ricerca elettronica di pubblicazioni dal 1° gennaio 2017 al 31 dicembre 2021.

Questo studio ha avuto l'obiettivo di determinare il valore diagnostico della presepsina nelle condizioni di sepsi derivanti da un'infezione odontogena e di valutarne l'uso nella fase di valutazione prognostica degli interventi chirurgici eseguiti nell'area maxillo-facciale.

Parole chiave: Sepsì, Odontoiatria, Presepsina, Infezione odontologica.

1. INTRODUZIONE

L'infezione odontogena è un tipo di infezione batterica che può manifestarsi nella regione maxillo-facciale (1). Quando coinvolge gli spazi fasciali, può causare trombosi del seno cavernoso e sepsi, inclusi fasciti necrotizzanti facciali e cervicali (2). La sepsi (S) può portare a danni tissutali sistemici, insufficienza d'organo e morte. Pertanto, una diagnosi precoce di S può avere un impatto significativo sulla gestione e sulla prognosi del paziente. In questo contesto, la valutazione in fluidi biologici di nuovi biomarcatori della S può essere utile per determinare la gravità delle condizioni infiammatorie e infettive del paziente (3).

Più recentemente, la presepsina (PSEP) è stata proposta come biomarcatore precoce della S in pazienti adulti, pediatrici e neonatali (4,5). La PSEP o sottotipo solubile del CD14 (sCD14-ST) è un frammento da 13 kDa derivante dalla scissione del CD14, una proteina marcatore del cluster dell'antigene di superficie espressa nel midollo osseo e ancorata alla membrana di monociti, macrofagi e neutrofili polimorfonucleati (6,7). Il CD14 funge da recettore per i complessi di lipopolisaccaridi (LPS) e per la proteina di legame specifica degli LPS (LBP); può legarsi a peptidoglicani e altre strutture di superficie presenti sia in batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Una volta legato, il complesso LPS-LBP attiva la risposta infiammatoria intracellulare del recettore Toll-Like 4 (TLR4), avviando la cascata infiammatoria dell'ospite contro il patogeno infettivo; la fagocitosi e l'attività delle proteasi plasmatiche portano alla formazione del frammento sottotipo del sCD14 (8,9).

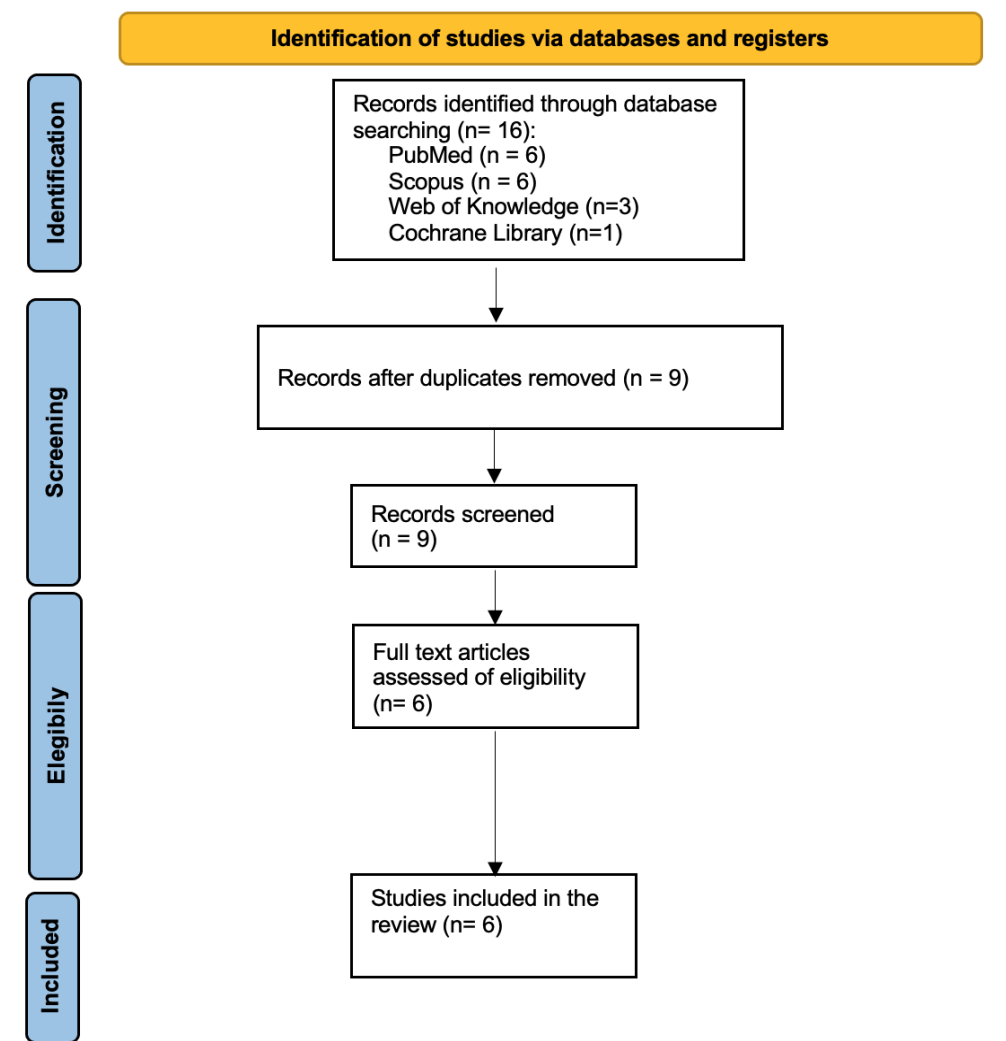
La risposta immunitaria si verifica quando vari pattern molecolari associati ai patogeni entrano in contatto con il patogeno, dove il sCD14 agisce come co-recettore ubiquitario, ma lo stesso sCD14 non è un fattore specifico per la sepsi causata da infezione batterica. Tuttavia, è stato dimostrato che i livelli di PSEP, a differenza di altri biomarcatori infiammatori, aumentano molto rapidamente (2-4 h) in presenza di infezioni sistemiche in adulti, bambini e neonati, determinando così velocità diagnostica e possibilità terapeutiche (10,11). OAJournals

In accordo con i risultati precedenti, è stato dimostrato che la PSEP gioca un ruolo chiave nella diagnosi di sepsi causata da varie infezioni d'organo (12). Lo scopo della presente mini-rassegna era offrire un aggiornamento sul potenziale ruolo della PSEP come biomarcatore precoce della S in pazienti che richiedono interventi chirurgici maxillo-facciali e/o cure odontostomatologiche (13,14)

1. MATERIALI E METODI

"Nella revisione, la raccolta dei dati è stata effettuata in conformità con la dichiarazione PRISMA (Revisioni sistematiche e meta-analisi), come illustrato nella Figura 1.

Figure 1. Diagramma di flusso dello studio.



3. RISULTATI

La strategia di ricerca ha prodotto i seguenti record, inclusi i duplicati: 6 da PubMed, 6 da Scopus, 3 da Web of Knowledge, 1 dalla Cochrane Library. I duplicati sono stati eliminati, pertanto tutte le banche dati selezionate hanno prodotto 9 record. I dati ottenuti riguardano l'uso della PSEP come marcatore diagnostico nelle infezioni maxillo-facciali (Tabella 1).

Tabella 1. Rischio associato alla localizzazione anatomica.

Risk	Low	Moderate	High	Extreme
Spaces	Vestibular	Submandibular	Lateral pharyngeal	Mediastinum
	Infraorbital	Submental	Retropharyngeal	
	Buccal	Sublingual	Pretracheal	
		Pterygomandibular		
		Submasseteric		
		Temporal		

4. DISCUSSIONE

Le infezioni odontogene, causa più comune di infezioni batteriche nella regione maxillo-facciale, raramente progrediscono verso la sepsi. Tuttavia, la possibilità di progressione verso la sepsi non può essere esclusa in caso di infezioni moderate o gravi che interessano gli spazi fasciali (15).

Secondo Kang et al., la PSEP può essere utile anche nel determinare la gravità dell'infezione odontogena e della sepsi; se combinata con i metodi diagnostici esistenti, si prevede che migliori la valutazione della prognosi del paziente. In effetti, secondo questo studio, un livello di PSEP pari o superiore a 671,5 pg/ml per l'infezione odontogena può essere considerato un livello anomalo (16). Le infezioni odontogene possono indurre la condizione di sepsi, causata dalla risposta anomala del sistema immunitario del nostro corpo a seguito dell'insorgenza di danni tissutali che compromettono la funzionalità degli organi e possono portare alla morte. Inoltre, la pandemia da COVID-19 ha imposto nuove difficoltà e sfide; ad esempio, l'uso della teleodontoiatria, modificando così il rapporto tra professionista odontoiatra e paziente. Pertanto, sarebbe utile, nella pratica odontoiatrica, introdurre l'uso di marcatori che possano valutare il reale rischio di sepsi durante le procedure chirurgiche odontoiatriche.

Diversi parametri clinici sono stati utilizzati come indicatori prognostici per la gravità dell'infezione. La proteina C-reattiva (CRP), la procalcitonina (PCT), la febbre e le localizzazioni anatomiche sono stati studiati per la valutazione dell'estensione delle infezioni odontogene (17). Recentemente, la PSEP è stata identificata come marcatore di sepsi; infatti, sulla base dei dati raccolti precedentemente, la sensibilità e la specificità della PSEP erano rispettivamente del 78,95% e del 70,83%. È ragionevole pensare che ulteriori studi dovrebbero indagare l'uso della PSEP come marcatore diagnostico precoce delle infezioni dentali e come strumento prognostico nei processi di guarigione dei tessuti orali dopo l'intervento chirurgico, analizzando la sua concentrazione non solo nel siero, ma anche in altri fluidi orali come la saliva, per ridurre lo stress emotivo dei pazienti che devono sottoporsi al prelievo (18).

5. CONCLUSIONI

Le infezioni odontogene persistenti possono essere una causa comune di sepsi nella testa e nel collo. L'infezione si diffonde frequentemente in un pattern prevedibile all'interno degli spazi fasciali del collo e può compromettere le vie aeree.

Il focolaio di infezione era mandibolare nel 70,1% e mascellare nel 29,9%. Ulteriori risultati riguardanti i biomarcatori, inclusa la PSEP, sarebbero auspicabili nella diagnosi di questa condizione e nella prognosi delle malattie infiammatorie orali, come la malattia parodontale, che può portare a compromissioni sistemiche (19,20) .

DICHIARAZIONE DI INTERESSE

Le organizzazioni finanziatrici non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella raccolta, analisi e interpretazione dei dati; nella stesura del rapporto o nella decisione di sottoporre il rapporto per la pubblicazione.

RICONOSCIMENTI

Questo lavoro fa parte del Programma Internazionale di Dottorato gestito dal Dipartimento di Tecnologie Innovative in Medicina e Odontoiatria.

BIBLIOGRAFIA

1. Kang, E.-S., Lee, J.-H., 2022. Diagnostic value of presepsin in odontogenic infection: a retrospective study. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 44, 22. <https://doi.org/10.1186/s40902-022-00353-7>
2. Abudeev, S.A., Kiselev, K.V., 2018. Cerebrospinal Fluid Presepsin as a Marker of Nosocomial Infections of the Central Nervous System: A Prospective Observational Study. *Front. Neurol.* 9, 58. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00058>
3. Aliu-Bejta, A., Atelj, 2020. Presepsin values as markers of severity of sepsis. *International Journal of Infectious Diseases* 95, 1–7. <https://doi.org/10.1016>
4. Galliera, E., Massaccesi, L., 2019. Clinical application of presepsin as diagnostic biomarker of infection: overview and updates. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 58, 11–17. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0643>
5. Botondi, V., D'Adamo, E., Plebani, M., 2022. Perinatal presepsin assessment: a new sepsis diagnostic tool? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 60, 1136–1144. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0277>
6. Wu, J., Hu, 2015. Accuracy of Presepsin in Sepsis Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 10, e0133057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133057>
7. Yaegashi, Y., Sato, N., 2005. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 11, 234–238. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0400-4>
8. Chenevier-Gobeaux, C., Borderie, 2015. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clinica Chimica Acta* 450, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.026>
9. Memar, M.Y., Baghi, 2019. Presepsin: A promising biomarker for the detection of bacterial infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.124>

10. De Guadiana Romualdo, L.G., Torrella, 2017. Diagnostic accuracy of presepsin (sCD14-ST) as a biomarker of infection and sepsis in the emergency department. *Clinica Chimica Acta* 464, 6–11.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.11.003>
11. Yoon, S.H., Kim, 2019. Presepsin as a diagnostic marker of sepsis in children and adolescents: a systemic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 19, 760. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4397-1>
12. Koizumi, Y., Sakanashi, 2020. Can presepsin uniformly respond to various pathogens? - an in vitro assay of new sepsis marker -. *BMC Immunol* 21, 33. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00362-z>
13. Novelli, G., Morabito, 2013. Pathfast Presepsin Assay for Early Diagnosis of Bacterial Infections in Surgical Patients: Preliminary Study. *Transplantation Proceedings* 45, 2750–2753.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.07.021>
14. Ulla, M., Pizzolato, 2013. Diagnostic and prognostic value of presepsin in the management of sepsis in the emergency department: a multicenter prospective study. *Crit Care* 17, R168.
<https://doi.org/10.1186/cc12847>
15. Marazzi, M.G., Randelli, 2018. Presepsin: A potential biomarker of PJI? A comparative analysis with known and new infection biomarkers. *Int J Immunopathol Pharmacol* 31, 039463201774935.
<https://doi.org/10.1177/0394632017749356>
16. Yang, H.S., Hur, 2018. Prognostic value of presepsin in adult patients with sepsis: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 13, e0191486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191486>
17. Wu, C.-C., Lan, 2017. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intensive Care* 7, 91. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0316-z>
18. Handke, J., Piazza, 2020. Presepsin as a biomarker in perioperative medicine. *Minerva Anestesiol* 86. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.20.14169-5>

19. Zhang, X., Liu, 2015. The accuracy of presepsin (sCD14-ST) for the diagnosis of sepsis in adults: a meta-analysis. Crit Care 19, 323. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1032-4>
20. Liu, B., Chen, 2013. Diagnostic value and prognostic evaluation of Presepsin for sepsis in an emergency department. Crit Care 17, R244. <https://doi.org/10.1186/cc13070>

CAPITOLO III

EFFECT OF TEMPERATURE ON PRESEPSIN PRE-ANALYTICAL STABILITY IN BIOLOGICAL FLUIDS ON PRETERM AND TERM NEWBORNS

Ebe D'Adamo¹, Valentina Botondi¹, Luigi Falconio², Giardinelli Giustina¹, Patrizia Di Gregorio³, Sergio Caputi², Bruna Sinjari², Oriana Trubiani², Tonino Traini², Francesca Gazzolo⁴, Chiara Strozzi⁵, Antonio Maconi⁵ and Diego Gazzolo¹

¹Neonatal Intensive Care Unit, G. d'Annunzio University, 65100 Chieti, Italy.

²Department of Innovative Technologies in Medicine and Dentistry, University "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, 65100 Chieti, Italy.

³Immunohematology and Transfusional Medicine Service, "SS. Annunziata" Hospital, 65100 Chieti, Italy.

⁴Pediatric Unit, Department of Medical and Surgical Sciences, Magna Graecia University, Catanzaro, 88100 Italy.

⁵Department of Maternal Fetal and Neonatal Medicine, C. Arrigo Children's Hospital Alessandria, 15100 Alessandria, Italy.

ABSTRACT

La termostabilità è uno dei prerequisiti per l'affidabilità degli analiti nella pratica clinica e nella ricerca biomedica. Sebbene la presepsina rappresenti un promettente nuovo biomarcatore per la diagnosi precoce della sepsi nei neonati, mancano dati sulla sua stabilità in diverse condizioni di conservazione. Abbiamo voluto indagare la termostabilità della presepsina in campioni di sangue, urina e saliva dopo scongelamento in 4 punti temporali prestabiliti in una coorte di neonati pretermine e a termine.

Abbiamo condotto uno studio osservazionale, in cui ogni caso ha funzionato come proprio controllo, su 24 neonati pretermine e a termine. I campioni di sangue, urina e saliva sono stati conservati a -80°C per 18 mesi e la presepsina è stata misurata nei diversi fluidi biologici allo scongelamento (T0), a 24 (T1), 48 (T2) e a 72 (T3) ore dallo scongelamento.

Non sono state osservate differenze significative ($P>0,05$ per tutti) nei livelli di presepsina da T0 a T3 nei diversi fluidi biologici. Inoltre, non sono state osservate differenze nei livelli di presepsina tra sangue e saliva da T0 a T3, mentre i livelli nelle urine erano significativamente più elevati ($P<0,05$ per tutti) rispetto a sangue e saliva da T0 a T3.

I risultati sulla termostabilità pre-analitica della presepsina in diversi fluidi biologici dopo refrigerazione a lungo termine supportano l'affidabilità di questo biomarcatore nella diagnosi e nel monitoraggio della sepsi perinatale.

1. INTRODUZIONE

Tutti i neonati ad alto rischio sono stati sottoposti alle procedure diagnostiche "cosiddette" standard di cura, tra cui la valutazione di laboratorio e la misurazione di una serie di analiti, che costituiscono la principale attività diagnostica [1]. Ciò è di massima rilevanza, soprattutto nei neonati pretermine (PI) e a termine (TI), che richiedono un attento monitoraggio per la diagnosi precoce di una delle principali cause di mortalità/morbilità perinatale: l'insorgenza di sepsi precoce/tardiva (EOS, LOS) [2,3].

In questo scenario, l'affidabilità degli analiti in termini di raccolta, elaborazione e conservazione dei campioni è di fondamentale importanza [4]. La questione è cruciale non solo nella pratica clinica quotidiana, ma anche nella ricerca biomedica [4]. Tra i parametri che consentono la classificazione di un parametro di laboratorio come affidabile o non affidabile in fase pre-analitica, la termostabilità è un requisito fondamentale per garantire la qualità e la riproducibilità del campione e, quindi, l'applicabilità degli analiti per scopi clinici [5]. Ciò si applica ai campioni sottoposti a congelamento e scongelamento ripetuti, che potrebbero portare alla perdita funzionale della struttura proteica [6]. Pertanto, la conoscenza sulla stabilità degli analiti è un prerequisito per la loro corretta conservazione, evitando errori clinici e di laboratorio.

Recentemente, i noti bias dei parametri standard di cura per la diagnosi della sepsi hanno aperto la strada alla necessità di nuovi marcatori precoci di EOS/LOS, tra cui la Presepsina (P-SEP) sembra essere particolarmente promettente [3,7]. La P-SEP è una proteina originata dalla scissione del recettore CD14, espresso sulla membrana delle cellule monocitarie, macrofagiche e neutrofile, rilasciata in risposta a infezioni batteriche [7].

La P-SEP ha dimostrato di essere un marcatore affidabile di sepsi negli adulti, nei bambini e nei neonati grazie alla sua misurabilità in diversi fluidi biologici (cioè sangue, urina, saliva), alla sua rapida attivazione e ai risultati rapidi [8-11]. Sebbene siano state fornite informazioni sulla

refrigerazione a lungo termine della P-SEP, secondo le raccomandazioni del produttore (PATHFAST™), i dati sulla sua stabilità pre-analitica a temperatura ambiente a breve/lungo termine nel periodo perinatale sono, ad oggi, mancanti.

Pertanto, nel presente studio abbiamo indagato la stabilità della P-SEP a temperatura ambiente fino a 72 ore dallo scongelamento, in campioni di sangue, urina e saliva provenienti da una coorte di neonati PI/TI.

2. MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto uno studio osservazionale, in cui ogni caso ha funzionato come proprio controllo, presso i nostri centri di riferimento di terzo livello per la terapia intensiva neonatale. I comitati etici locali (Presap.ASO.Neonat.19.02/23.05.19) hanno approvato lo studio e il consenso informato è stato ottenuto da tutti i genitori dei soggetti prima dell'inclusione nello studio.

Per il calcolo della dimensione del campione, abbiamo utilizzato le variazioni dei livelli di P-SEP come parametro principale. Abbiamo ipotizzato un aumento di 0,5 deviazioni standard (SD) nei livelli di P-SEP come clinicamente significativo, secondo osservazioni precedenti nei neonati [11,12]. Considerando un $\alpha=0,05$ e utilizzando un test a due code, abbiamo stimato una potenza di 0,95, reclutando 18 neonati PI/TI. Abbiamo aggiunto $n=6$ casi per gruppo per consentire eventuali abbandoni e ritiri del consenso. Pertanto, la popolazione studiata era composta da 24 neonati (TI $n=16$; PI $n=8$) da cui sono stati raccolti campioni di sangue, urina e saliva entro le prime 24 ore dalla nascita, conservati a -80°C (intervallo medio 16 mesi) e infine misurati per P-SEP in 4 punti temporali predefiniti: allo scongelamento (tempo 0, T0), a 24 ore (tempo 1, T1), a 48 ore (tempo 2, T2) e a 72 ore dopo lo scongelamento (tempo 3, T3).

I neonati TI e PI sono stati classificati secondo i criteri dell'American Academy of Pediatrics [13]. L'asfissia perinatale (PA), le complicanze materne come il diabete gestazionale (GDM), l'ipertensione indotta dalla gravidanza (PIH) e la preeclampsia (PE), e la restrizione della crescita intrauterina (IUGR), sono state classificate secondo i criteri dell'American College of Obstetrics and Gynecology [14-17].

2.1 Raccolta e misurazione dei campioni di P-SEP

I campioni di sangue (0,5 mL) sono stati raccolti entro le prime 24 ore dalla nascita, secondo i protocolli clinici locali, immediatamente centrifugati a 2500 g per 14 minuti e il plasma conservato a -80°C . I campioni di urina e saliva (0,5 mL) sono stati raccolti entro le prime 24 ore dalla nascita

come per il sangue e conservati a -80°C. I livelli di P-SEP sono stati misurati utilizzando un immunoassay enzimatico chemiluminescente con l'analizzatore automatizzato point-of-care PATHFAST-TM (Mitsubishi, Tokyo, Giappone), che fornisce risultati in 15 minuti [11].

2.2 Parametri clinici e di laboratorio

I parametri clinici e di laboratorio (conteggio dei globuli rossi RBC; concentrazioni ematiche di emoglobina, Hb; tasso di ematocrito, Ht; pH del sangue venoso; pressione parziale venosa di anidride carbonica, pCO₂; pressione parziale venosa di ossigeno, pO₂; eccesso di base, BE; livelli di glucosio e creatinina) sono stati registrati in tutti i neonati durante le prime 24 ore.

2.3 Esiti perinatali

Sono stati registrati i seguenti principali esiti perinatali e neonatali nei gruppi studiati: età materna; età gestazionale (GA); peso alla nascita (BW); modalità di parto; sesso; punteggi di Apgar al 1° e 5° minuto; incidenza di rottura prematura delle membrane (PROM), corioamnionite, GDM, PIH e PE, IUGR; supplementazione di glucocorticoidi antenatali (GC); incidenza di gravidanze gemellari; insorgenza di sindrome da distress respiratorio (RDS); necessità di supporto respiratorio non invasivo (NIV); incidenza di pneumotorace (PNX); displasia broncopolmonare (BPD); ittero; persistenza del dotto arterioso pervio (PDA); emorragia intraventricolare (IVH); leucomalacia periventricolare (PVL); necessità di nutrizione parenterale totale; incidenza di enterocolite necrotizzante (NEC); retinopatia del prematuro (ROP) (superiore al secondo grado); EOS e LOS; morte perinatale. L'IVH è stata classificata secondo Papile et al. [18], la BPD moderata/grave secondo Bancalari [19] e la ROP secondo i criteri del Comitato Internazionale ROP [20].

4. RISULTATI

4.1 Popolazione

Le caratteristiche perinatali e i parametri di laboratorio sono riportati nella Tabella 1. L'età materna variava tra 29 e 37 anni; l'età gestazionale (EG) era superiore a 32 settimane in tutti i neonati reclutati; 10 su 24 neonati pesavano meno di 2.500 g; il 33,3% e il 66,6% dei neonati sono stati partoriti per via vaginale e mediante cesareo, rispettivamente. Non sono state osservate differenze ($P>0,05$) nella distribuzione di genere. Un punteggio APGAR inferiore a 7 al primo e al quinto minuto è stato osservato nel 25% e nell'8,3% dei neonati, rispettivamente. La rottura prematura delle membrane (PROM) e la corioamnionite si sono verificate nel 50% e nel 25% dei neonati reclutati, rispettivamente. Non si sono verificati casi di gravidanza gemellare né complicazioni da pneumotorace (PNX), displasia broncopolmonare (BPD), enterocolite necrotizzante (NEC), retinopatia del prematuro (ROP) e morte perinatale nei neonati PI/TI. Tra i principali esiti perinatali, l'asfissia perinatale (PA) si è verificata in 3 su 24 neonati a termine (TI), la combinazione diabete gestazionale-ipertensione indotta dalla gravidanza (GDM-PIH) in 4 (TI: $n=1$; PI: $n=3$), solo GDM in 1 TI, solo PIH in 3 PI, PE-IUGR in 2 PI e solo IUGR in 2 PI, rispettivamente. La somministrazione di corticosteroidi antenatali e di nutrizione parenterale postnatale ha riguardato il 29,2% e il 12,5% dei neonati reclutati, mentre il 20,8% ha richiesto supporto respiratorio non invasivo (NIV) per la sindrome da distress respiratorio (RDS). L'ittero è stato osservato nel 54% dei casi, mentre il dotto arterioso pervio (PDA) ha riguardato l'8,3%. L'emorragia intraventricolare (IVH) e la leucomalacia periventricolare (PVL) hanno complicato rispettivamente il 16,7% e il 4,2% dei casi. Infine, l'incidenza di sepsi neonatale precoce (EOS) e tardiva (LOS) è stata rispettivamente del 16,7% e del 25%. I parametri di laboratorio registrati all'ingresso nello studio (conteggio dei globuli rossi, emoglobina, ematocrito, pH venoso, pCO_2 , pO_2 , eccesso di base, glucosio e creatinina) erano nei limiti normali.

4.2 Misurazione di P-SEP

I livelli di P-SEP sono stati misurabili in diversi fluidi biologici nei punti di monitoraggio predefiniti. Non sono state osservate differenze significative ($P > 0,05$) nei livelli di P-SEP tra i diversi fluidi biologici a ciascun punto temporale (T0-T3). Inoltre, non sono state osservate differenze nei livelli di P-SEP tra sangue e saliva, mentre i livelli urinari erano significativamente più elevati ($P < 0,05$) rispetto a sangue e saliva a tutti i punti temporali. Questi risultati supportano l'affidabilità di P-SEP come biomarcatore nella diagnosi e nel monitoraggio della sepsi perinatale.

Tabella 1. Caratteristiche perinatali e parametri di laboratorio registrati all'ammissione. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD).

Parameter	Study group (n=24)
Maternal Age (yrs)	33 $\pm$ 4
GA (wks)	37 $\pm$ 3
BW <2.500 g (n/tot)	10/24
<i>Mode of delivery (n/tot)</i>	
Cesarean	8/24
Vaginal	16/24
Gender (male/female)	12/12
<i>Apgar score >7 (n/tot)</i>	
At 1 min	18/24
At 5 min	22/24
<i>Main Outcomes (n/tot)</i>	
PROM	12/24
Chorioamnionitis	4/24
PA	3/24
GDM	5/24
PIH	6/24
PE	2/24
IUGR	4/24
GC	7/24
Twins	0/24
RDS	5/24
NIV	5/24
PNX	0/24
BPD	0/24
Jaundice	13/24
PDA	2/24
IVH	4/24
PVL	1/24
Parenteral nutrition	3/24
NEC	0/24
ROP	0/24
EOS	4/24
LOS	6/24
Perinatal death	0/24
<i>Laboratory parameters</i>	
RBC count, ($10^{12}/L$)	3.9 $\pm$ 0.2
Hb (g/L)	14.0 $\pm$ 0.01
Ht (%)	41.9 $\pm$ 0.04
Venous blood pH	7.27 $\pm$ 0.02
pCO ₂ (mmHg)	49.1 $\pm$ 1.5
pO ₂ (mmHg)	53.1 $\pm$ 1.2
BE	-4.0 $\pm$ 0.9
Plasma glucose (mmol/L)	6.1 $\pm$ 0.1
Creatinine (mmol/L)	0.08 $\pm$ 0.01

Abbreviations: yrs, years; GA, gestational age; wks, weeks; PROM, premature rupture of membrane; PA; perinatal asphyxia; GDM, gestational diabetes mellitus; PIH, pregnancy induced hypertension; PE, pre-eclampsia; IUGR, intrauterine growth retardation; GC, antenatal glucocorticoids supplementation; BW, birth weight; RDS, respiratory distress syndrome; NIV, non-invasive respiratory support; PNX, pneumothorax; BPD, bronchopulmonary dysplasia; PDA, persistent patent ductus arteriosus; IVH, intraventricular hemorrhage; PVL, periventricular leukomalacia; NEC, necrotizing enterocolitis; ROP, retinopathy of prematurity; EOS, early onset sepsis; LOS, late onset sepsis; RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; pCO₂, partial venous pressure of carbon dioxide; pO₂, partial venous pressure of oxygen; BE, base excess.

Pattern di P-SEP nel sangue: è stato caratterizzato da una tendenza stabile che variava da 328 ng/L (T0) a 415 ng/L (T3), senza differenze significative ($P>0,05$, per tutti) tra i diversi punti temporali di monitoraggio.

Pattern di P-SEP nelle urine: ha mostrato una tendenza che variava da 704 ng/L (T0) a 1010 ng/L (T3), senza differenze significative ($P>0,05$, per tutti) tra i diversi punti temporali di monitoraggio.

Pattern di P-SEP nella saliva: è stato caratterizzato da una tendenza stabile che variava da 232 ng/L (T0) a 285 ng/L (T3), senza differenze significative ($P>0,05$, per tutti) tra i diversi punti temporali di monitoraggio (Tabella 2).

Tabella 2: Livelli di Presepsina (P-SEP) (ng/L) misurati al momento dello scongelamento (T0), a 24 ore (T1), 48 ore (T2) e a 72 ore dopo lo scongelamento (T3) nei fluidi plasmatici, urinari e salivari. I dati sono riportati come mediana e intervallo interquartile. * $p<0,05$ urine vs sangue; $p\leq 0,05$ urine vs saliva.

4.3

Parameters	Blood (n=24)			Urine (n=24)			Saliva (n=24)		
P-SEP (ng/L)	median	25°	75°	median	25°	75°	median	25°	75°
T0	328*	236	481	704*§	499	2062	232§	126	727
T1	363*	247	477	835*§	685	2192	246§	87	1147
T2	340*	232	426	985*§	787	2924	249§	105	1081
T3	415*	233	653	1010*§	796	2740	285§	127	658

Misurazioni di P-SEP tra diversi fluidi biologici

I livelli di P-SEP nei diversi fluidi biologici a T0-T3 sono riportati nella Tabella 2. Quando i livelli di P-SEP sono stati confrontati tra i diversi fluidi biologici a T0-T3, abbiamo osservato:

i) livelli di P-SEP più elevati ($P<0,05$, per tutti) nelle urine rispetto al sangue e alla saliva;

ii) nessuna differenza significativa ($P < 0,05$, per tutti) tra i campioni di sangue e saliva.

5. DISCUSSIONE

Nella medicina perinatale, la scoperta di una serie di analiti che consentano una diagnosi precoce e un monitoraggio affidabile della sepsi è attesa con impazienza [21]. Questo fatto è degno di nota considerando che oggi, dei 2,4 milioni di decessi tra i bambini sotto i 5 anni, il 47% si verifica durante i primi 28 giorni di vita [22]. Pertanto, la parola chiave "prevenzione" può essere raggiunta solo con l'inclusione dei biomarcatori nella pratica clinica in accordo con i recenti criteri della Food and Drug Administration, dell'Agenzia Europea dei Medicinali e del National Institute of Health [23]. In questa luce, sono necessari ulteriori progressi nella fase pre-analitica in termini di raccolta, conservazione (ad esempio congelamento, scongelamento) e procedure di misurazione, tra cui la termostabilità degli analiti gioca un ruolo fondamentale [4,5,24].

Nel presente studio abbiamo riscontrato che il P-SEP, un promettente marcatore precoce della sepsi, è termostabile fino a 72 ore dallo scongelamento in diversi fluidi biologici. In particolare, è stata osservata una tendenza piatta del P-SEP, a partire dalle prime 24 ore dopo la nascita, nei campioni di sangue, urine e saliva di TI e PI. Inoltre, non è stata osservata alcuna differenza nei livelli di P-SEP nei diversi punti di monitoraggio tra sangue e saliva, mentre livelli più elevati e stabili di P-SEP sono stati rilevati in tutte le urine rispetto a sangue e saliva.

Il riscontro della termostabilità a breve/lungo termine del P-SEP in diversi fluidi biologici in TI e PI è utile in vista del dibattito in corso sugli effetti delle procedure di conservazione. In questo contesto, per quanto ne sappiamo, i dati attuali in diversi fluidi biologici costituiscono la prima osservazione di questo tipo. Tenendo presente che il P-SEP è il sottotipo solubile del cluster di differenziazione CD14, i dati della letteratura sulle sue procedure di conservazione in cellule, cellule staminali ematopoietiche (HSC), tessuti e gestione del sangue (raccolta, congelamento, scongelamento) non hanno fornito conclusioni definitive. Si sapeva che, da un lato: i) il congelamento e lo scongelamento influenzano l'immunomodulazione nel trattamento delle malattie infiammatorie acute [25], ii) la crioconservazione delle HSC sembra indurre l'apoptosi attraverso l'attivazione di una via della caspasi

[26], iii) il trattamento pre-analitico della conservazione, come il tempo e la temperatura tra il prelievo del sangue e la gestione dell'RNA da cellule mononucleate del sangue periferico, ha un grande impatto sull'espressione dei trascritti da sangue raccolto in provette EDTA [27], e iv) la crioconservazione delle cellule immunitarie influisce negativamente sull'espressione dei marcatori di superficie come CD14 [28]. D'altro lato, è stata osservata la termostabilità del CD14 a temperatura ambiente fino a 24 ore dopo lo scongelamento in coltura cellulare [29]. In ogni caso, la termostabilità del P-SEP nel periodo perinatale è supportata anche dalle caratteristiche di altri biomarcatori neuroinfiammatori. In particolare: i) le proteine leganti il calcio sono stabili nei fluidi biologici sia a diverse temperature di congelamento (-20°C , -80°C) sia dopo scongelamento fino a 72 ore, mentre sono instabili nel latte umano e artificiale dopo le procedure di pastorizzazione [30-32], ii) l'attivina A è stabile in coltura cellulare, nei fluidi biologici e nei tessuti dopo congelamento, scongelamento e procedure di pastorizzazione [33-35], e iii) la melatonina esercita effetti positivi sulle procedure di conservazione, migliorando l'efficienza del trapianto [36].

Complessivamente, è ragionevole sostenere che i risultati attuali aprono la porta a ulteriori indagini volte a chiarire il ruolo delle procedure di conservazione su diversi analiti, incluso il P-SEP, che sono potenzialmente utili nella pratica perinatale quotidiana. Il fatto che tutti i campioni raccolti in diversi fluidi biologici siano stati conservati a -80°C per un periodo di tempo superiore a quello previsto dalle raccomandazioni del produttore (18 contro 9 mesi) fornisce ulteriore supporto all'affidabilità del P-SEP per future ricerche sia in modelli animali che negli esseri umani.

Nel presente studio abbiamo anche riscontrato che i livelli di P-SEP erano identici nei fluidi di sangue e saliva, mentre sono stati osservati livelli urinari più elevati rispetto a sangue e saliva. I risultati hanno mostrato che la misurazione del P-SEP nei cosiddetti fluidi biologici non invasivi sta diventando fattibile. Questo vale in particolare per il fluido salivare che può essere raccolto in neonati ad alto rischio in qualsiasi momento, con basso o nullo stress da prelievo. Naturalmente, sono necessari ulteriori studi volti a indagare il P-SEP in neonati sani e ad alto rischio, in particolare nei

casi di PA sottoposti a ipotermia, al fine di fornire ulteriore supporto alla sua inclusione nella pratica clinica quotidiana.

Il riscontro di livelli più elevati di P-SEP nelle urine rispetto a sangue e saliva merita ulteriori considerazioni. Le principali spiegazioni possono risiedere in: i) la presenza di una ampia eterogeneità dei neonati reclutati, ii) la presenza in TI di casi di PA noti per influenzare parzialmente i livelli di P-SEP nel sangue e nelle urine [11], iii) la presenza di casi di ipossia cronica che scatenano uno stato infiammatorio che può costituire un potenziale bias che influisce sull'affidabilità del P-SEP come marcatore precoce della sepsi. Complessivamente, è possibile argomentare sulla necessità di ulteriori studi multicentrici su una popolazione più ampia volti a chiarire le problematiche.

Infine, il presente studio ha avuto una serie di limitazioni, come la mancanza di dati: i) sulla stabilità del P-SEP quando misurato dopo ripetuti cicli di congelamento e scongelamento, ii) sulla stabilità del P-SEP quando il congelamento è stato effettuato

Abbreviazioni

- **Preterm infant (PI)** – Neonato pretermine
- **Term infant (TI)** – Neonato a termine
- **Early onset sepsis (EOS)** – Sepsi neonatale precoce
- **Late onset sepsis (LOS)** – Sepsi neonatale tardiva
- **Presepsin (P-SEP)** – Presepsina
- **Standard deviation (SD)** – Deviazione standard
- **Perinatal asphyxia (PA)** – Asfissia perinatale
- **Gestational diabetes mellitus (GDM)** – Diabete gestazionale
- **Pregnancy induced hypertension (PIH)** – Ipertensione indotta dalla gravidanza
- **Pre-eclampsia (PE)** – Pre-eclampsia
- **Intrauterine growth retardation (IUGR)** – Ritardo di crescita intrauterino
- **Red blood cell count (RBC)** – Conteggio dei globuli rossi
- **Hemoglobin blood concentrations (Hb)** – Concentrazione di emoglobina nel sangue
- **Hematocrit rate (Ht)** – Ematocrito
- **Partial venous pressure of carbon dioxide (pCO₂)** – Pressione parziale venosa di anidride carbonica
- **Partial venous pressure of oxygen (pO₂)** – Pressione parziale venosa di ossigeno
- **Base excess (BE)** – Eccesso di base
- **Gestational age (GA)** – Età gestazionale
- **Birthweight (BW)** – Peso alla nascita
- **Premature rupture of membrane (PROM)** – Rottura prematura delle membrane
- **Antenatal glucocorticoids supplementation (GC)** – Supplementazione di glucocorticoidi antenatali
- **Respiratory distress syndrome (RDS)** – Sindrome da distress respiratorio
- **Non-invasive ventilation (NIV)** – Ventilazione non invasiva
- **Pneumothorax (PNX)** – Pneumotorace
- **Bronchopulmonary dysplasia (BPD)** – Displasia broncopolmonare
- **Patent ductus arteriosus (PDA)** – Dotto arterioso pervio
- **Intraventricular hemorrhage (IVH)** – Emorragia intraventricolare
- **Periventricular leukomalacia (PVL)** – Leucomalacia periventricolare
- **Necrotizing enterocolitis (NEC)** – Enterocolite necrotizzante
- **Retinopathy of prematurity (ROP)** – Retinopatia del prematuro
- **Hematopoietic stem cells (HSC)** – Cellule staminali ematopoietiche

DICHIARAZIONE DI INTERESSE

Le organizzazioni finanziatrici non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella raccolta, analisi e interpretazione dei dati; nella redazione del rapporto o nella decisione di sottoporre il rapporto per la pubblicazione.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro fa parte del programma di dottorato internazionale I.O., sotto gli auspici della Società Italiana di Neonatologia, ed è stato parzialmente supportato da sovvenzioni a DG dalla “Fondazione I Colori della Vita” (3/2020) e da “L’Insieme” (4/2019) in Italia. Ringraziamo Gepa S.r.l., Italia, per aver fornito i kit per le analisi.

BIBLIOGRAFIA

1. Fell DB, Hawken S, Wong CA, Wilson LA, Murphy MSQ, Chakraborty P, et al. Using newborn screening analytes to identify cases of neonatal sepsis. *Sci Rep* 2017;7:18020.
2. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet* 2017;14:1770-80.
3. Van Maldeghem I, Nusman CM, Visser DH. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) as biomarker in neonatal early-onset sepsis and late-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Immunol* 2019;20:17-28.
4. Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC Sci Publ* 2011;163:23-42.
5. He X. Thermostability of biological systems: fundamentals, challenges, and quantification. *Open Biomed Eng J* 2011;5:47-73.
6. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochem Med* 2013;23:70-7.
7. Wu J, Hu L, Zhang G, Wu F, He F. Accuracy of presepsin in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0133057.
8. Aliu-Bejta A, Kurshumliu M, Namani S, Dreshaj S, Baršić B. Ability of presepsin concentrations to predict mortality in adult patients with sepsis. *J Clin Transl Sci* 2023;7:e121-8.
9. Nishana E, Bhat SS, Sahana KS, Hegde SK, Bhat V, Kalal BS. Estimation of salivary sCD14 in children with early childhood caries in association with pneumonia. *Rep Biochem Mol Biol* 2019;8:132-8.
10. Topcuoglu S, Arslanbuga C, Gursoy T, Aktas A, Karatekin G, Uluhan R, et al. Role of presepsin in the diagnosis of late-onset neonatal sepsis in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:1834-9.
11. Botondi V, Pirra A, Strozzi M, Perrotta M, Gavilanes DAW, Di Ricco L, et al. Perinatal asphyxia partly affects presepsin urine levels in non-infected term infants. *Clin Chem Lab Med*

2022;60:793-9.

12. Koh JH, Lee S, Kim HS, Lee K, Lee CS, Yoo SA, et al. Development of monitoring system for assessing rheumatoid arthritis within 5 minutes using a drop of biofluids. *J Clin Med* 2020;9:3499-06.
13. Stewart DL, Barfield WD, Cummings JJ, Adams-Chapman IA, Aucott SW et al. Updates on an at-risk population: late-preterm and early-term infants. *Pediatrics* 2019;144:e1-10.
14. American College of Obstetrics and Gynecology. Executive summary: Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy. *Obstet Gynecol* 2014;123:896–01.
15. American College of Obstetrics and Gynecology. Gestational Diabetes Mellitus. *Gestational Diabetes Mellitus ACOG Practice Bulletin* 2018;131:e49–64.
16. American College Obstetrics and Gynecology. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. *Obstet Gynecol* 2020;135:e237-e260.
17. American College of Obstetrics and Gynecology. Fetal Growth Restriction. *Fetal Growth Restriction ACOG Practice Bulletin*. 2021;1:e16–28.
18. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr* 1978;92:529-34.
19. Bancalari E, Jain D. Bronchopulmonary Dysplasia: Can we agree on a definition? *Am J Perinatol* 2018;35:537-40.
20. Chiang MF, Quinn GE, Fielder AR, Ostmo SR, Paul Chan RV, Berrocal A, et al. International Classification of Retinopathy of Prematurity, Third Edition. *Ophthalmology* 2021;128:e51-68.
21. Botondi V, D'Adamo E, Plebani M, Trubiani O, Perrotta M, Di Ricco L, et al. Perinatal presepsin assessment: a new sepsis diagnostic tool? *Clin Chem Lab Med* 2022;60:1136-44.

22. Fleiss N, Polin RA. Sequential organ failure assessment scores to predict outcomes: from adults to neonates. *Curr Opin Pediatr* 2023;35:218-22.
23. Rysavy MA, Horbar JD, Bell EF, Li L, Greenberg LT, Tyson JE. Assessment of an Updated Neonatal Research Network Extremely Preterm Birth Outcome Model in the Vermont Oxford Network. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network and Vermont Oxford Network. *JAMA Pediatr* 2020;174:e1-9.
24. Hunter DJ, Losina E, Guermazi A, Burstein D, Lasserre MN, Kraus V. A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. *Curr Drug Targets* 2010;11:536-45.
25. Sadeghi B, Witkamp M, Schefferberger D, Arbman A, Ringdén O. Immunomodulation by placenta-derived decidual stromal cells. Role of histocompatibility, accessory cells and freeze-thawing. *Cytotherapy* 2023;25:68-75.
26. Desoutter J, Ossart C, Lacassagne MN, Regnier A, Marolleau JP, Harrivel V. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy* 2019;21:612-8.
27. Martire S, Valentino P, Marnetto F, Mirabile L, Capobianco M, Bertolotto A. The impact of pre-freezing storage time and temperature on gene expression of blood collected in EDTA tubes. *Mol Biol Rep* 2022;49:4709-18.
28. Kadić E, Moniz RJ, Huo Y, Chi A, Kariv I. Effect of cryopreservation on delineation of immune cell subpopulations in tumor specimens as determined by multiparametric single cell mass cytometry analysis. *BMC Immunol* 2017;18:6-21.
29. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther* 2020;11:540-55.
30. Gazzolo D, Frulio R, Bruschetti PL, Lituania M, Michetti F. Effects of temperature on pre-analytical stability of S100B protein concentrations in urine of healthy full-term infants. *Clin Chim*

Acta 2004;350:231-2.

31. Nigro F, Gagliardi L, Ciotti S, Galvano F, Pietri A, Tina GL, et al. S100B Protein concentration in milk-formulas for preterm and term infants. Correlation with industrial preparation procedures. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:609-13.
32. Peila C, Coscia A, Bertino E, Livolti G, Galvano F, Visser GHA, et al. Holder pasteurization affects S100B concentrations in human milk. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018;31:513-7.
33. Klocke S, Bündgen N, Köster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015;291:419-26.
34. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A Review. *Nutrients* 2016;8:477-96.
35. Peila C, Coscia A, Bertino E, Li Volti G, Galvano F, Barbagallo I, et al. The effect of holder pasteurization on Activin A levels in human milk. *Breastfeed Med* 2016;11:469-73.
36. Kazemzadeh S, Mohammadpour S, Madadi S, Babakhani A, Shabani M, Khanehzad M. Melatonin in cryopreservation media improves transplantation efficiency of frozen-thawed spermatogonial stem cells into testes of azoospermic mice. *Stem Cell Res Ther* 2022;13:346-61.

CAPITOLO IV

Presepsin Saliva Levels in Periodontal Disease are Gender, Probing Pocket, Bleeding and Clinical Attachment Level Dependent in Adults

Luigi Falconio¹, Sara De Sanctis², Sergio Caputi¹, Bruna Sinjari¹, Oriana Trubiani¹, Tonino Traini¹,
Valentina Botondi², Ebe D'Adamo², Diego Gazzolo².

¹Neonatal Intensive Care Unit, G. d'Annunzio University, 65100 Chieti, Italy.

²Department of Innovative Technologies in Medicine and Dentistry, University "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, 66100 Chieti, Italy.

ABSTRACT

La presepsina (PSEP) è un promettente marcatore di sepsi e/o stato infiammatorio. Tuttavia, non sono disponibili dati sulle variazioni della PSEP nei fluidi biologici negli adulti con malattia parodontale (PD). Gli obiettivi del presente studio erano indagare se, in una coorte di pazienti adulti, la PSEP fosse un marcatore affidabile della PD. Abbiamo condotto uno studio prospettico caso-controllo su 50 pazienti adulti (PD: N=25, non-PD: N=25). La PSEP è stata misurata all'ingresso nello studio (T0) e a 4-6 settimane da una procedura non chirurgica. Sono state registrate anche le principali caratteristiche dei pazienti: sesso, indice di placca, sanguinamento, profondità di sondaggio (PPD) e livello di attacco clinico (CAL). La PSEP era più alta ($P<0,05$) nel gruppo PD rispetto al gruppo non-PD a T0, mentre non sono state osservate differenze ($P>0,05$) tra i gruppi a T1. Quando i gruppi studiati sono stati corretti per i principali esiti, abbiamo trovato livelli più elevati ($P<0,05$, per tutti) di PSEP nei sottogruppi femminili, complicati o meno da placca, PPD, sanguinamento e CAL. L'analisi di regressione lineare ha mostrato che la PSEP correlava positivamente con PPD ($R=0,38$; $P<0,01$) e CAL ($R=0,29$; $P<0,05$), rispettivamente. I risultati attuali, che mostrano livelli più elevati di PSEP nella PD e nei suoi principali esiti, aprono la strada a ulteriori indagini fornendo monitoraggio longitudinale della PSEP e curve di riferimento negli adulti.

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, circa il 60% della popolazione mondiale è affetta da gengivite e malattia parodontale (PD), la principale complicanza che rappresenta circa il 60% [1]. La PD, nelle sue diverse forme di gravità, è nota per colpire le strutture di supporto dei denti causando la loro progressiva distruzione [2]. La sepsi e i fattori locali/sistemici sono le principali cause della PD che richiedono una diagnosi precoce, un monitoraggio attento e strategie terapeutiche per consentire il mantenimento dei denti [3].

La gestione della PD si basa attualmente su: i) una valutazione clinica parodontale mirata ad analizzare la profondità della tasca, il livello di perdita di attacco e la recessione gengivale in ogni sito (sondaggio parodontale) [4], ii) esame radiografico per valutare i picchi ossei interdentali e la riassorbimento osseo orizzontale e verticale [5], iii) test di laboratorio diagnostici come l'analisi microbiologica e il conteggio dei polimorfonucleati/linfociti [6-7], iv) rimozione domiciliare precoce del biofilm dentale prima di procedere con il trattamento non chirurgico (scaling e levigatura radicolare) in combinazione con terapia antibiotica sistemica, e v) rivalutazione a 4-6 settimane dall'inizio e, nei casi di non risposta o gravi, chirurgia resezione o rigenerativa per recuperare i tessuti sani [8]. In questo scenario, è possibile affermare che la diagnosi precoce della PD è ancora una questione irrisolta, essendo la sepsi/processo infiammatorio in una fase subclinica e le procedure di laboratorio standard silenziose o influenzate dalla storia clinica dei pazienti [9]. In questo contesto, la possibilità di misurare un marcatore affidabile di sepsi e/o infiammazione che offra anche un monitoraggio longitudinale è fortemente richiesta.

Tra una serie di biomarcatori di sepsi, oggi ancora oggetto di indagine, la presepsina (PSEP) costituisce un nuovo marcatore affidabile negli adulti e nei bambini grazie alla sua misurabilità in diversi fluidi biologici (ad esempio sangue, saliva, urine), rapida attivazione e risultati veloci. È importante notare che non sono stati riscontrati bias come età, malattie respiratorie e renali, così come la temperatura, che influenzano l'affidabilità della PSEP come biomarcatore di sepsi [10-12]. Tuttavia, i dati sulla misurazione longitudinale della PSEP nella saliva degli adulti complicati da PD

prima e dopo il trattamento non chirurgico sono attualmente assenti.

Pertanto, nel presente studio, l'obiettivo era indagare se i livelli di PSEP nella saliva cambiassero in una coorte di pazienti con PD e non-PD sottoposti a trattamento non chirurgico parodontale.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Disegno dello studio

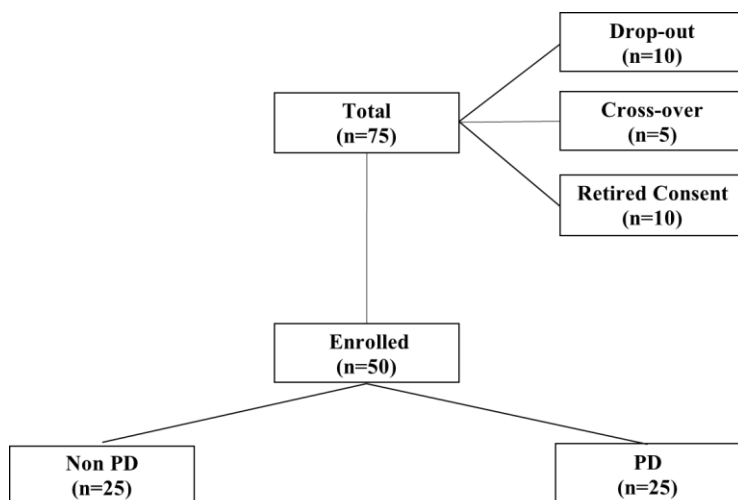
Abbiamo condotto uno studio osservazionale pretesto-test, dove ogni caso ha servito come suo stesso controllo, presso il Dipartimento delle Tecnologie Innovative in Medicina Clinica e Odontoiatria dell'Università G. d'Annunzio, Chieti, Italia.

Lo studio è stato approvato dai comitati etici locali (Università Albanese di Tirana) e i soggetti ammessi nello studio hanno fornito consenso informato e firmato (n° prot. 278/3/21).

Per il calcolo della dimensione del campione, abbiamo utilizzato le variazioni di PSEP come parametro principale. Poiché non sono disponibili dati di base per la popolazione studiata, abbiamo supposto un aumento di 0,5 deviazione standard (SD) in PSEP come clinicamente significativo [13-14]. Infatti, considerando un $\alpha=0,05$ e utilizzando un test a due code, abbiamo stimato una potenza di 0,90, reclutando 23 casi di PD e non-PD. Abbiamo aggiunto $n=2$ casi per gruppo per consentire eventuali abbandoni o ritiri del consenso.

Pertanto, abbiamo reclutato un totale di 50 casi, comprendenti pazienti con PD ($n=25$) e non-PD ($n=25$) (1 caso di PD vs 1 caso di non-PD), sottoposti alla seguente strategia terapeutica: rimozione domiciliare precoce del biofilm dentale prima di procedere con il trattamento non chirurgico (scaling e levigatura radicolare) (Figura 2).

Figure 2. Patient's characteristics admitted into the study.



Abbreviations: PD, periodontal disease

I soggetti sono stati classificati secondo i criteri della European Federation of Periodontology dopo aver effettuato un'anamnesi sistemica e l'esame clinico per la compilazione della cartella parodontale con le relative indagini radiografiche [6].

2.2. Classificazione della malattia parodontale

Nel 2018 è stata proposta una revisione della classificazione della malattia parodontale dalla European Federation of Periodontology (EFP) e dalla American Academy of Periodontology (AAP) (15).

La classificazione comprende 4 stadi di complessità e 3 gradi di gravità, definendo la patologia come generalizzata se interessa >30% dei siti o localizzata se interessa un numero inferiore, o se solo gli elementi incisivi-molari sono interessati.

La malattia parodontale è la perdita dei tessuti di supporto per gli elementi dentali. Una volta che è stato completato il processo diagnostico per determinare la patologia (storia clinica, esame obiettivo, esami radiografici), viene definito lo stadio. Quando la perdita di attacco clinico (CAL) è >5 mm in più di due denti adiacenti, la diagnosi è stadio avanzato 3-4; quando c'è una profondità di tasca >5 mm in due o più denti adiacenti, la diagnosi è stadio 3-4. Pertanto, abbiamo incluso nello studio pazienti con PD di grado III-IV e pazienti non-PD in cui si è verificato l'indice di placca (PI)

e sanguinamento (Tabella 1).

I criteri di esclusione erano: donne in gravidanza, diabete, fumatori, malattie sistemiche, infezione delle ghiandole salivari, sinusite, osteomielite, osteonecrosi indotta da farmaci, tumori, traumi e infezioni secondarie dovute a tumori.

2.3. Raccolta e misurazione del campione di PSEP

I livelli di PSEP nella saliva sono stati misurati nei due gruppi di studio prima (tempo 0, T0) e dopo (tempo 1, T1) il trattamento parodontale non chirurgico. I campioni di saliva (1 mL) sono stati raccolti prima di effettuare una sessione di igiene professionale e senza risciacquare con collutorio a base di clorexidina. Successivamente, i prelievi sono stati effettuati utilizzando pipette da laboratorio dopo aver masticato un rotolo di cotone sterile per 30 secondi nelle prime ore del mattino e conservati a -80°C.

I livelli di P-SEP sono stati misurati utilizzando un immunoassay enzimatico chemiluminescente con l'analizzatore automatizzato point-of-care PATHFAST-TM (Mitsubishi, Tokyo, Giappone), che fornisce risultati in 15 minuti [14-16].

2.4. Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media e deviazione standard (SD). I risultati sono stati analizzati per differenze statisticamente significative tra i gruppi mediante un test t di Student e un test U di Mann–Whitney a due code quando i dati non erano distribuiti normalmente. Il confronto tra le proporzioni è stato effettuato utilizzando il test esatto di Fisher. La correlazione tra PSEP e i principali esiti è stata valutata mediante analisi di regressione lineare. I dati sono stati analizzati utilizzando Sigma-Stat 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significatività statistica è stata fissata a $P < 0.05$.

3. RISULTATI

2.1. Popolazione

Nella Tabella 1 sono riportati i principali parametri nei gruppi PD e non-PD. Non sono state osservate differenze significative ($P>0,05$ per tutti) riguardo a peso, età e sesso tra i gruppi. Come previsto, lo stadio e l'estensione della PD erano significativamente più elevati ($P<0,001$ per entrambi) nel gruppo PD rispetto al gruppo non-PD. L'incidenza dell'indice di placca non differiva ($P>0,05$) tra i gruppi, mentre l'indice di sanguinamento era significativamente più elevato ($P<0,05$) nel gruppo PD. La profondità della tasca parodontale (PPD) al T0 e T1 era significativamente più elevata ($P<0,001$ per entrambi) nel gruppo PD rispetto al gruppo non-PD. Come previsto, il livello di attacco clinico (CAL) era significativamente più elevato nel gruppo PD rispetto ai controlli (dati non mostrati).

Table 1. Clinical characteristics in patients complicated or not (non-PD) by periodontal disease (PD). Values are expressed as mean $\pm$ SD. *Fisher-exact test; **Student t-test.

	PD (n=25)	Non-PD (n=25)	P
<i>Demographic characteristics</i>			
Weight (Kg)	63 $\pm$ 12	65 $\pm$ 10	NS
Age (y)	48 $\pm$ 16	49 $\pm$ 15	NS
Gender (M/F)	11/13	13/12	NS
<i>Main characteristics</i>			
Periodontitis stage (III/IV)	15/10	0/0	<0.001*
Periodontitis (localized/generalized)	8/17	0/0	<0.001*
Plaque Index (n/total)	14/25	19/25	NS
Bleeding Index (n/total)	19/25	8/25	0.004**
Periodontal Pocket Depth T0 (mm)	7.3 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.1	<0.001*
Periodontal Pocket Depth T1 (mm)	6.3 $\pm$ 1.5	3.0 $\pm$ 0.1	<0.001*
Clinical Attachment Level T0 (mm)	6.6 $\pm$ 1.2	0	NP
Clinical Attachment Level T1 (mm)	5.6 $\pm$ 1.9	0	NP

2.2. PSEP Misurazione

La presepsina è risultata misurabile in tutti i campioni di saliva raccolti nei tempi T0 e T1. I livelli più alti di PSEP sono stati osservati nei soggetti con parodontite in stadio IV rispetto ai sottogruppi in stadio III (dati non mostrati).

Nel gruppo senza parodontite (non-PD), l'andamento della concentrazione di PSEP è stato caratterizzato da un trend stabile e non sono emerse differenze significative ($P>0,05$) nei livelli di PSEP tra T0 (mediana: 1067 pg/mL; 25° percentile: 574 pg/mL; 75° percentile: 2370 pg/mL) e T1 (mediana: 1400 pg/mL; 25° percentile: 273 pg/mL; 75° percentile: 4632 pg/mL).

Nel gruppo con parodontite (PD), l'andamento della concentrazione di PSEP ha mostrato una riduzione significativa ($P<0,05$) da T0 (mediana: 3176 pg/mL; 25° percentile: 1664 pg/mL; 75° percentile: 6286 pg/mL) a T1 (mediana: 1211 pg/mL; 25° percentile: 563 pg/mL; 75° percentile: 3437 pg/mL).

Confrontando i livelli di PSEP tra i gruppi PD e non-PD, abbiamo riscontrato livelli significativamente più elevati ($P<0,05$) nel gruppo PD al tempo T0, mentre non sono emerse differenze significative ($P>0,05$) tra i gruppi al tempo T1 (Figura 1). Inoltre, lo stesso andamento ($P<0,05$) è stato osservato nei livelli di PSEP confrontando l'intera popolazione studiata (T0, T1) (dati non mostrati).

Dopo aver corretto i gruppi in studio per il sesso, abbiamo riscontrato nelle donne: i) livelli più elevati ($P<0,05$, in entrambi i casi) di PSEP nella popolazione PD rispetto a quella non-PD nell'intero periodo considerato (T0, T1) (PD: mediana: 2743 pg/mL; 25° percentile: 695 pg/mL; 75° percentile: 8957 pg/mL; non-PD: mediana: 1192 pg/mL; 25° percentile: 406 pg/mL; 75° percentile: 3808 pg/mL), ii) livelli di PSEP significativamente più elevati ($P<0,05$) al tempo T0 nel sottogruppo PD rispetto al sottogruppo non-PD (PD: mediana: 4392 pg/mL; 25° percentile: 1680 pg/mL; 75° percentile: 9052 pg/mL; non-PD: mediana: 724 pg/mL; 25° percentile: 568 pg/mL; 75° percentile: 1453 pg/mL), e iii) nessuna differenza significativa nei livelli di PSEP al tempo T1 ($P>0,05$) tra i sottogruppi PD e non-PD. Al contrario, nei soggetti di sesso maschile non sono state riscontrate differenze significative ($P>0,05$, in tutti i casi) né confrontando l'intera popolazione studiata (T0, T1), né tra i tempi T0 e T1.

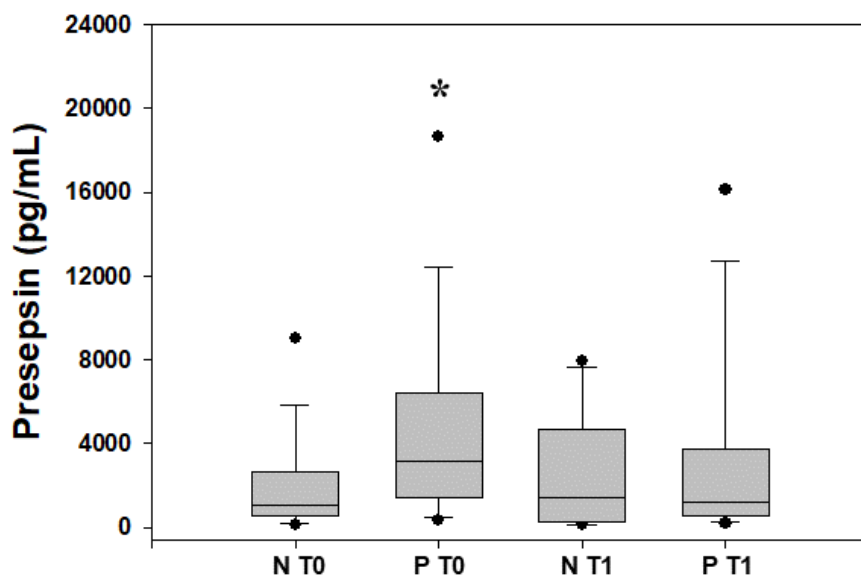


Figure 1. Prepsin saliva levels (pg/mL) measured before (T0) and after (T1) non-surgical treatment in adults complicated (P) or not (N) by periodontal diseases. Values are expressed as median and interquartile ranges. * $P < 0.05$ vs. controls.

In Figura 2 sono riportate le variazioni dei livelli di Prepsina (PSEP) dopo correzione per l'indice di performance (PI). In particolare, a T0 si è osservato un livello di PSEP significativamente più elevato ($P < 0,05$) nel sottogruppo PD rispetto al sottogruppo non-PD. Tuttavia, a T1 non sono state riscontrate differenze significative ($P > 0,05$) tra i sottogruppi.

Quando i sottogruppi PI sono stati corretti per sesso, non sono emerse differenze significative nei livelli di PSEP ($P > 0,05$) sia considerando l'intera popolazione studiata (T0, T1) sia tra i diversi punti temporali di monitoraggio nei sottogruppi maschili e femminili. È importante notare che, a T0, i livelli di PSEP erano significativamente più elevati ($P < 0,05$) nel sottogruppo femminile PD con PI rispetto al sottogruppo femminile non-PD con PI (PD: mediana: 4162 pg/mL; 25° percentile: 1576 pg/mL; 75° percentile: 8980 pg/mL; non-PD: mediana: 815 pg/mL; 25° percentile: 499 pg/mL; 75° percentile: 1313 pg/mL).

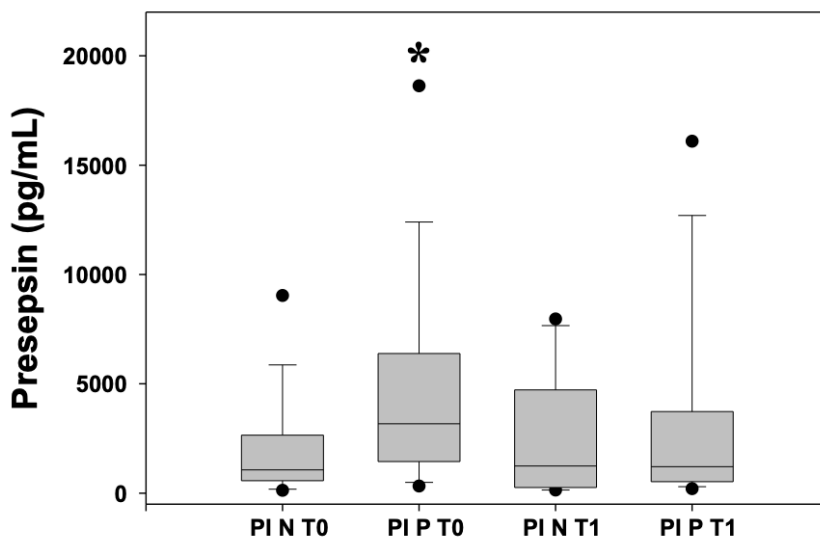


Figure 2. Presepsin saliva levels (pg/mL) measured before (T0) and after (T1) non-surgical treatment in adults complicated (P) or not (N) by periodontal diseases and plaque index (PI). Values are expressed as median and interquartile ranges.

* $P < 0.05$ vs. controls

Infine, non sono state osservate differenze significative nei livelli di Presepsina (PSEP) dopo correzione per sanguinamento ($P > 0,05$, per tutti) quando abbiamo confrontato sia l'intera popolazione studiata (T0, T1) sia i gruppi PD e non-PD ai punti temporali T0 e T1.

È interessante notare che, quando i sottogruppi di PD e non-PD con sanguinamento sono stati corretti per sesso, non sono emerse differenze significative ($P > 0,05$, per tutti) tra i sottogruppi maschili e femminili sia a T0 che a T1, ad eccezione di una differenza significativa ($P < 0,05$) tra le femmine con PD e i maschi con PD a T1. Inoltre, sono stati riscontrati livelli più elevati di PSEP tra i sottogruppi maschili con PD e non-PD che presentavano sanguinamento.

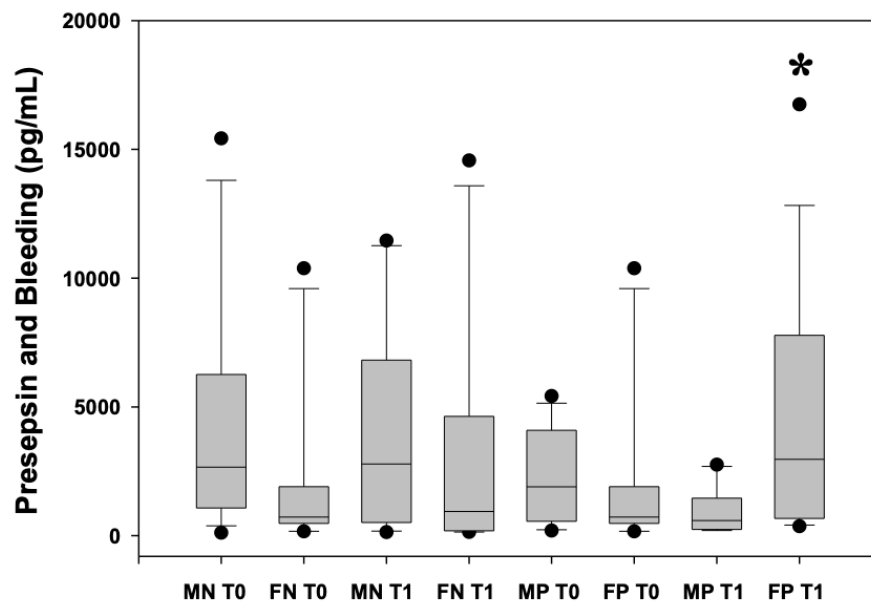


Figure 3. Prepsin saliva levels (pg/mL) measured before (T0) and after (T1) non-surgical treatment in adults complicated (P) or not (N) by periodontal diseases. Values are expressed as median and interquartile ranges. * $P < 0.05$ vs. controls.

Sono state osservate correlazioni positive e significative tra la PSEP e la PPD ($R=0,38$; $P < 0,01$) e tra la PSEP e la CAL ($R=0,29$; $P < 0,05$), rispettivamente (Figure 4a, 4b).

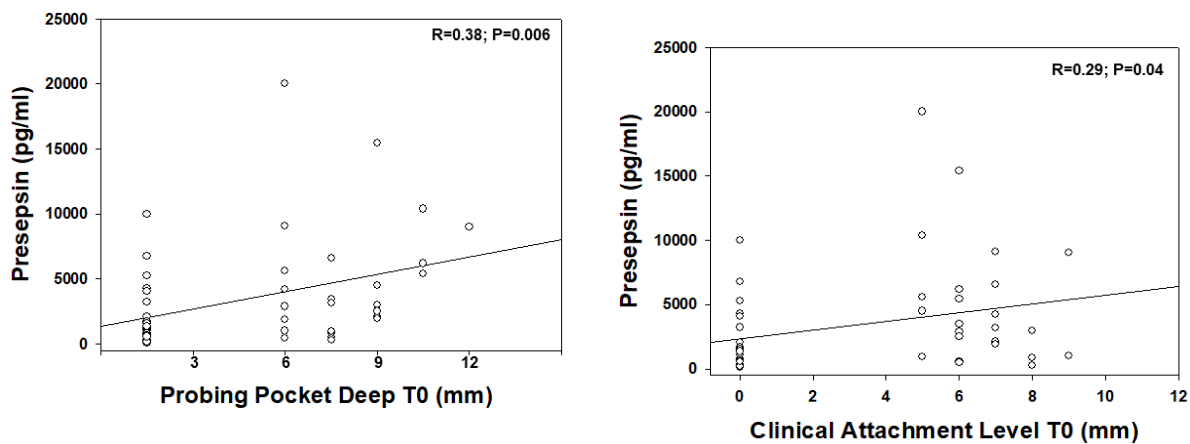


Figure 4. (a) Linear regression analysis results showing a positive correlation between Prepsin saliva levels (pg/ml) and probing pocket depth (mm) measured at admission into the study in patients complicated or not by periodontal disease. (b) Linear regression analysis results showing a positive correlation between Prepsin saliva levels (pg/ml) and clinical attachment level (mm) measured at admission into the study in patients complicated or not by periodontal disease.

4. DISCUSSIONE

La parodontite è una malattia infiammatoria multifattoriale positivamente correlata all'età, mentre, ad oggi, non è stata riportata una prevalenza di genere [17]. I fattori più studiati associati alla parodontite sono l'interazione tra la risposta dell'ospite ai microrganismi, l'ambiente e lo stile di vita [18-20]. Tuttavia, l'argomento è ancora controverso e oggetto di dibattito. Pertanto, la diagnosi e la gestione della parodontite si basano principalmente su una valutazione clinica accurata e su esami di laboratorio standardizzati, con le loro ben note limitazioni [18-21]. In sintesi, c'è una forte richiesta nella pratica clinica quotidiana di un parametro affidabile e non invasivo indicativo di sepsi o di uno stato infiammatorio che porti alla parodontite.

Nel presente studio, abbiamo riscontrato che i livelli salivari di un promettente biomarcatore di sepsi e malattia infiammatoria, la presepsina (PSEP), sono cambiati significativamente nei pazienti con parodontite rispetto ai soggetti non affetti, sia prima che dopo (4-6 settimane) una procedura non chirurgica parodontale. In particolare, i livelli di PSEP erano dipendenti dal sesso, dalla profondità della tasca parodontale (PPD), dalla presenza di sanguinamento e dalla perdita di attacco clinico (CAL). Inoltre, i livelli di PSEP erano più elevati nei pazienti con parodontite complicata dallo stadio IV.

La presenza di PSEP nella saliva di pazienti adulti, sebbene confermi dati precedenti in neonati, rappresenta la prima osservazione in una popolazione così selezionata [14,22-23]. Studi recenti sulla fisiologia delle ghiandole salivari hanno riportato che i fluidi del sangue sistemico e della saliva sono isotoni e contengono le stesse concentrazioni di diversi analiti nello stesso rapporto, mostrando uno scambio continuo di ioni e proteine tra sangue e saliva [23]. Infatti, i cambiamenti nel volume di saliva rilasciato sono un fenomeno dipendente dalla circolazione sistemica, mediato dall'attivazione orto/parasimpatiche [18-24]. Pertanto, la possibilità che le concentrazioni di PSEP rilevate nella saliva dei pazienti con parodontite derivino dalla circolazione sistemica è ragionevolmente consistente. Questo è supportato dal fatto che i livelli di PSEP nella saliva e nel

sangue sono risultati sostanzialmente identici e in accordo con quelli misurati in altri fluidi biologici (ad esempio, sangue cordonale e periferico) e in altri biomarcatori nel periodo perinatale [25-27]. Naturalmente, sono giustificati ulteriori studi per confermare questi risultati.

Il pattern di PSEP nei gruppi con parodontite rispetto ai gruppi non affetti a T0 e T1 merita ulteriori considerazioni. In particolare: i) il livello più elevato di PSEP a T0 nei pazienti con parodontite suggerisce uno stato di sepsi o infiammazione a uno stadio subclinico, quando le procedure di laboratorio standard potrebbero essere silenti e/o non disponibili. La principale spiegazione risiede nelle proprietà di PSEP. Essa origina dalla CD14 legata alla membrana (mCD14), una glicoproteina espressa su monociti, macrofagi e neutrofili [28]. Al legame di mCD14 con il complesso lipopolisaccaride-LBP, viene attivata la cascata proinfiammatoria mediata da TLR4. Durante questo processo, mCD14 viene scisso, rilasciando la sua forma solubile (sCD14), che viene ulteriormente processata dalla catepsina D, generando un peptide di 64 aminoacidi noto come PSEP [29]. Un'altra spiegazione risiede nella breve emivita di PSEP (6 ore) rispetto ad altri analiti standard come la proteina C-reattiva (24 ore) e la procalcitonina (12 ore), e nell'assenza di bias che influenzano l'affidabilità di PSEP come marker di sepsi/infiammazione (età, ipossia acuta/cronica, distress respiratorio) [30-33]. ii) l'assenza di differenze proteiche a T1 tra i gruppi studiati a breve/lungo termine suggerisce l'efficacia della procedura non chirurgica eseguita. Questo è rilevante, aprendo la strada alla misurazione longitudinale di PSEP nei casi a rischio di parodontite e offrendo al contempo un attento monitoraggio delle strategie terapeutiche adottate. In sintesi, è ragionevole sostenere l'affidabilità di PSEP come marker precoce di sepsi e/o stato infiammatorio. Sono pertanto giustificati ulteriori studi multicentrici su una popolazione più ampia.

Nel presente studio, abbiamo anche riscontrato che PSEP era dipendente dal sesso nei casi complicati o meno dalla presenza di una tasca parodontale e sanguinamento, con livelli più elevati di PSEP nei sottogruppi femminili. A nostra conoscenza, questa è la prima osservazione in questo contesto, offrendo ulteriore supporto alle differenze legate al sesso non solo nei periodi perinatale e

pediatrico, ma anche nell'età adulta. Questi aspetti meritano ulteriori considerazioni. In particolare, i) PSEP era più elevata nelle femmine indipendentemente dalla presenza o meno di parodontite, tasca parodontale e sanguinamento, suggerendo un pattern di PSEP legato al sesso. La spiegazione risiede nelle differenze basate sul sesso nell'immunità innata, evidenziando che le donne tendono a sviluppare risposte immunitarie più forti rispetto agli uomini, rendendole meno suscettibili a molte infezioni ma più inclini a malattie autoimmuni [34,35].

ABBREVIAZIONI

- Periodontal Disease (PD) – Malattia Parodontale
- Presepsin (PSEP) – Presepsina
- Standard Deviation (SD) – Deviazione Standard
- Periodontal Pocket Depth (PPD) – Profondità della Tasca Parodontale
- Clinical Attachment Level (CAL) – Livello di Attacco Clinico
- Time 0 (T0) – Tempo 0
- Time 1 (T1) – Tempo 1

DICHIARAZIONE DI INTERESSE

Le organizzazioni finanziatrici non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella raccolta, analisi e interpretazione dei dati; nella redazione del rapporto o nella decisione di sottoporre il rapporto per la pubblicazione.

CONTRIBUZIONI DEGLI AUTORI

LF, SDS, SC, BS, OT, TT, VB, ED'A hanno contribuito al reclutamento dei pazienti, alla concettualizzazione, all'indagine e alla stesura della bozza originale. DG ha contribuito all'amministrazione del progetto, alla concettualizzazione, all'indagine, alla supervisione e alla stesura, revisione e modifica. Tutti gli autori hanno accettato la responsabilità per l'intero contenuto di questo manoscritto sottoposto e hanno approvato la sottomissione. Tutti gli autori hanno letto e concordato la versione pubblicata del manoscritto.

RICONOSCIMENTI

Questo lavoro fa parte del Programma Internazionale di Dottorato gestito dal Dipartimento di Tecnologie Innovative in Medicina Clinica e Odontoiatria.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdulkareem, Ali A., Firas B. Al-Taweel, Ali J. B. Al-Sharqi, Sarhang S. Gul, Aram Sha, and Iain L. C. Chapple. 2023. 'Current Concepts in the Pathogenesis of Periodontitis: From Symbiosis to Dysbiosis'. *Journal of Oral Microbiology* 15 (1): 2197779.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>. Afacan, Beral, Veli Özgen Öztürk, Çiğdem Paşalı, Emir Bozkurt, Timur Köse, and Gülnur Emingil. 2019. 'Gingival Crevicular Fluid and Salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α Levels in Periodontal Health and Disease'. *Journal of Periodontology* 90 (7): 788–97. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0412>.
2. Ahmad, Paras, Andrea Escalante-Herrera, Lina M. Marin, and Walter L. Siqueira. 2024. 'Progression from Healthy Periodontium to Gingivitis and Periodontitis: Insights from Bioinformatics-Driven Proteomics - A Systematic Review with Meta-Analysis'. *Journal of Periodontal Research*, June. <https://doi.org/10.1111/jre.13313>.
3. Arslan, Rana, Meltem Karsiyaka Hendek, Ucler Kisa, and Ebru Olgun. 2021. 'The Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid Periostin Levels in Patients with Gingivitis and Periodontitis'. *Oral Diseases* 27 (6): 1478–86.
<https://doi.org/10.1111/odi.13664>.
4. Baima, Giacomo, Matteo Corana, Giovanni Iaderosa, Federica Romano, Filippo Citterio, Gaia Meoni, Leonardo Tenori, and Mario Aimetti. 2021. 'Metabolomics of Gingival Crevicular Fluid to Identify Biomarkers for Periodontitis: A Systematic Review with Meta-Analysis'. *Journal of Periodontal Research* 56 (4): 633–45.
<https://doi.org/10.1111/jre.12872>.
5. Botondi, Valentina, Ebe D'Adamo, Mario Plebani, Oriana Trubiani, Marika Perrotta, Laura Di Ricco, Cynzia Spagnuolo, et al. 2022. 'Perinatal Presepsin Assessment: A New Sepsis Diagnostic Tool?' *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 60 (8): 1136–44.
<https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0277>.

6. Chenevier-Gobeaux, Camille, Didier Borderie, Nicolas Weiss, Thomas Mallet-Coste, and Yann-Erick Claessens. 2015. 'Presepsin (sCD14-ST), an Innate Immune Response Marker in Sepsis'. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 450 (October):97–103. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.026>.
7. Pugni, Lorenza, Carlo Pietrasanta, Silvano Milani, Claudia Vener, Andrea Ronchi, Mariella Falbo, Milena Arghittu, and Fabio Mosca. 2015. 'Presepsin (Soluble CD14 Subtype): Reference Ranges of a New Sepsis Marker in Term and Preterm Neonates'. *PloS One* 10 (12): e0146020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146020>.
8. D'Adamo, Ebe, Valentina Botondi, Luigi Falconio, Giustina Giardinelli, Patrizia Di Gregorio, Sergio Caputi, Bruna Sinjari, et al. 2024. 'Effect of Temperature on Presepsin Pre-Analytical Stability in Biological Fluids of Preterm and Term Newborns'. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 62 (5): 1011–16. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1282>.
9. D'Adamo, Ebe, Gabriella Levantini, Michela Librandi, Valentina Botondi, Laura Di Ricco, Sara De Sanctis, Cynzia Spagnuolo, et al. 2024. 'Fetal Chronic Hypoxia Does Not Affect Urinary Presepsin Levels in Newborns at Birth'. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 62 (8): 1643–48. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1308>.
10. D'Adamo, Ebe, Chiara Peila, Mariachiara Strozzi, Roberta Barolo, Antonio Maconi, Arianna Nanni, Valentina Botondi, et al. 2024. 'Presepsin in Human Milk Is Delivery Mode and Gender Dependent'. *Nutrients* 16 (15): 2554. <https://doi.org/10.3390/nu16152554>.
11. Di Stefano, Mattia, Alessandro Polizzi, Simona Santonocito, Alessandra Romano, Teresa Lombardi, and Gaetano Isola. 2022. 'Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment'. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (9): 5142. <https://doi.org/10.3390/ijms23095142>.
12. Yaegashi, Yasunori, Kamon Shirakawa, Nobuhiro Sato, Yasushi Suzuki, Masahiro Kojika, Satoko Imai, Gaku Takahashi, Michiko Miyata, Shoji Furusako, and Shigeatsu Endo. 2005.

- ‘Evaluation of a Newly Identified Soluble CD14 Subtype as a Marker for Sepsis’. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 11 (5): 234–38. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0400-4>.
13. Humphrey, S. P., and R. T. Williamson. 2001. ‘A Review of Saliva: Normal Composition, Flow, and Function’. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85 (2): 162–69. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>.
14. Ishaan, Dilshi, Harinath Parthasarathy, Deepa Ponnaiyan, and Anupama Tadepalli. 2017. ‘The CD14 Rs2569190 TT Genotype Is Associated with Chronic Periodontitis’. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 21 (9): 560–64. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0029>.
15. Tonetti, Maurizio S., Henry Greenwell, and Kenneth S. Kornman. 2018. ‘Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a New Classification and Case Definition’. *Journal of Periodontology* 89 Suppl 1 (June):S159–72. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>.
- Aliu-Bejta, Ajete, Mentor Kurshumliu, Sadie Namani, Shemsedin Dreshaj, and Bruno Baršić. 2023. ‘Ability of Presepsin Concentrations to Predict Mortality in Adult Patients with Sepsis’. *Journal of Clinical and Translational Science* 7 (1): e121. <https://doi.org/10.1017/cts.2023.538>.
16. Jayaprakash, Deepika, Suchetha Aghanashini, Ranganatha Rao Vijayendra, Anirban Chatterjee, Radhika Mohan Rosh, and Ashit Bharwani. 2014. ‘Effect of Periodontal Therapy on C-Reactive Protein Levels in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinical and Biochemical Study’. *Journal of Indian Society of Periodontology* 18 (4): 456–60. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.138688>.
17. Kwon, TaeHyun, Ira B. Lamster, and Liran Levin. 2021. ‘Current Concepts in the Management of Periodontitis’. *International Dental Journal* 71 (6): 462–76. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>.

18. Kang, Eun-Sung, and Jae-Hoon Lee. 2022. 'Diagnostic Value of Presepsin in Odontogenic Infection: A Retrospective Study'. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* 44 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s40902-022-00353-7>.
19. Hendek, Meltem Karsiyaka, Ebru Olgun Erdemir, Ucler Kisa, and Gonen Ozcan. 2015. 'Effect of Initial Periodontal Therapy on Oxidative Stress Markers in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum in Smokers and Non-Smokers with Chronic Periodontitis'. *Journal of Periodontology* 86 (2): 273–82. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140338>.
20. Jin, Lijian, and Richard P. Darveau. 2001. 'Soluble CD 14 Levels in Gingival Crevicular Fluid of Subjects With Untreated Adult Periodontitis'. *Journal of Periodontology* 72 (5): 634–40. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.5.634>.
21. Peng, Xian, Lei Cheng, Yong You, Chengwei Tang, Biao Ren, Yuqing Li, Xin Xu, and Xuedong Zhou. 2022. 'Oral Microbiota in Human Systematic Diseases'. *International Journal of Oral Science* 14 (1): 14. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>.
22. Memar, Mohammad Yousef, and Hossein Bannazadeh Baghi. 2019. 'Presepsin: A Promising Biomarker for the Detection of Bacterial Infections'. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 111 (March):649–56. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.124>.
23. Nishana, Eranthodika, Sham Subraya Bhat, Kaup Sathish Sahana, Sundeep Kuloor Hegde, Vidya Bhat, and Bhuvanesh Sukhlal Kalal. 2019. 'Estimation of Salivary sCD14 in Children with Early Childhood Caries in Association with Pneumonia'. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* 8 (2): 132–38.
24. Selvadurai, Kalairasi, Karthikeyan Bangalore Varadhan, and Prabhuji Munivenkatappa Venkatesh. 2019. 'Effects of Non-Surgical Periodontal Therapy on Procalcitonin Levels of Gingival Crevicular Fluid and Serum in Subjects with Different Periodontal Conditions'. *Journal of the International Academy of Periodontology* 21 (3): 111–17.

25. Novelli, G., V. Morabito, G. Ferretti, F. Pugliese, F. Ruberto, F. Venuta, L. Poli, M. Rossi, and P. B. Berloco. 2013. 'Pathfast Presepsin Assay for Early Diagnosis of Bacterial Infections in Surgical Patients: Preliminary Study'. *Transplantation Proceedings* 45 (7): 2750–53. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.07.021>.
26. O'Driscoll, David N., Matthew McGovern, Catherine M. Greene, and Eleanor J. Molloy. 2018. 'Gender Disparities in Preterm Neonatal Outcomes'. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 107 (9): 1494–99. <https://doi.org/10.1111/apa.14390>.
27. Patel, Swati Pradeep, Nishanth S. Rao, and A. R. Pradeep. 2012. 'Effect of Nonsurgical Periodontal Therapy on Crevicular Fluid and Serum Glutathione Peroxidase Levels'. *Disease Markers* 32 (1): 1–7. <https://doi.org/10.3233/DMA-2012-0855>.
28. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431–3.
29. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart* 2004;90:983–8.
30. Önder, Canan, Şivge Kurgan, S. Merve Altıngöz, Nilsun Bağış, Metin Uyanık, Muhittin A. Serdar, Alpdoğan Kantarcı, and Meral Günhan. 2017. 'Impact of Non-Surgical Periodontal Therapy on Saliva and Serum Levels of Markers of Oxidative Stress'. *Clinical Oral Investigations* 21 (6): 1961–69. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1984-z>.
31. Arnold, John C., Christopher R. Cannavino, Mindy K. Ross, Ben Westley, Thomas C. Miller, Robert H. Riffenburgh, and John Bradley. 2012. 'Acute Bacterial Osteoarticular Infections: Eight-Year Analysis of C-Reactive Protein for Oral Step-down Therapy'. *Pediatrics* 130 (4): e821-828. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0220>.
32. Meisner, M., T. Lohs, E. Huettemann, J. Schmidt, M. Hueller, and K. Reinhart. 2001. 'The Plasma Elimination Rate and Urinary Secretion of Procalcitonin in Patients with Normal and Impaired Renal Function'. *European Journal of Anaesthesiology* 18 (2): 79–87. <https://doi.org/10.1046/j.0265-0215.2000.00783.x>.

33. Bashiryan, B. A., O. A. Gadzhieva, L. A. Satanin, E. A. Lavrenyuk, V. A. Tere, N. A. Mazerkina, A. V. Sakharov, I. V. Getmanova, and V. V. Roginsky. 2024. '[Prospective analysis of inflammatory markers and perioperative clinical data in children with craniosynostosis undergoing reconstructive surgery]'. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N. N. Burdenko* 88 (1): 70–78. <https://doi.org/10.17116/neiro20248801170>.
34. Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Title: Sex differences in immune responses Journal: *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638.
35. Jaillon, S., Berthenet, K., & Garlanda, C. (2019). Titolo: Sexual dimorphism in innate immunity Rivista: *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(3), 308–321. DOI: 10.1007/s12016-017-8648-x
36. Picone S, Ritieni A, Fabiano A, Troise AD, Graziani G, Paolillo P, et al. Arterial cord blood lutein levels in preterm and term healthy newborns are sex and gestational age dependent. *Clin Biochem* 2012;45:1558–63.
37. Perrotta M, D'Adamo E, Strozzi C, D'Egidio C, Del Rosso F, Maconi A, Picone S, Giardinelli G, Cepelli L, Cicolini I, Conte M, Bellinaso M, Negri R, Gazzolo F, Cassinari M, Abella L, Abdelhameed AS, Mangifesta R, Gazzolo D. Capillary blood parameters are gestational age, birthweight, delivery mode and gender dependent in healthy preterm and term infants. *Clin Chem Lab Med*. 2024 Aug 23;63(1):177-183. doi: 10.1515/cclm-2024-0821. PMID: 39191205.
38. Serpero LD, Bianchi V, Pluchinotta F, Conforti E, Baryshnikova E, Guaschino R, Cassinari M, Trifoglio O, Calevo MG, Gazzolo D. S100B maternal blood levels are gestational age- and gender-dependent in healthy pregnancies. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Oct 26;55(11):1770-1776. doi: 10.1515/cclm-2016-1127. PMID: 28282292.
39. Abella L, D'Adamo E, Strozzi M, Sanchez-de-Toledo J, Perez-Cruz M, Gómez O, Abella E, Cassinari M, Guaschino R, Mazzucco L, Maconi A, Testa S, Zanelli C, Perrotta M, Roberta P, Renata NC, Gasparroni G, Vitacolonna E, Chiarelli F, Gazzolo D. S100B Maternal Blood

- Levels in Gestational Diabetes Mellitus Are Birthweight, Gender and Delivery Mode Dependent. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 18;19(3):1028. doi: 10.3390/ijerph19031028. PMID: 35162052; PMCID: PMC8834559.
40. Gazzolo D, Michetti F, Bruschettini M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, Pedrazzi E, Bruschettini P. Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age- and sex-related changes. *Clin Chem*. 2003 Jun;49(6 Pt 1):967-70. doi: 10.1373/49.6.967. PMID: 12765999.
 41. D'Adamo E, Peila C, Strozzi M, Barolo R, Maconi A, Nanni A, Botondi V, Coscia A, Bertino E, Gazzolo F, Abdelhameed AS, Conte M, Picone S, D'Andrea M, Lizzi M, Quarta MT, Gazzolo D. Presepsin in Human Milk Is Delivery Mode and Gender Dependent. *Nutrients*. 2024 Aug 3;16(15):2554. doi: 10.3390/nu16152554. PMID: 39125434; PMCID: PMC11313726.
 42. Shames RS. Gender differences in the development and function of the immune system. *J Adolesc Health*. 2002 Apr;30(4 Suppl):59-70. doi: 10.1016/s1054-139x(01)00382-2. PMID: 11943576.
 43. Özdemir, Eda Çetin, Meral Uzunkaya, Hasan Gündoğar, and Ergül Belge Kurutaş. 2024. 'Association between Raftlin and Presepsin Levels with Periodontal Healthy and Disease Conditions'. *Archives of Oral Biology* 160 (April):105880.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.105880>.
 44. Vijaya Kumar, K., Mohamed Faizuddin, Neevan Dr DSouza, and Anupama Rao. 2020. 'Estimation of Soluble CD14 Levels in Gingival Crevicular Fluid and Serum in Diseased and Healthy Periodontium'. *Journal of Oral Biosciences* 62 (3): 289–95.
<https://doi.org/10.1016/j.job.2020.07.002>.

CAPITOLO V

DISCUSSIONE & CONCLUSIONE

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel Capitolo 1, abbiamo fornito una panoramica sull'implementazione potenziale di procedure diagnostiche cliniche per le infezioni della cavità orale mediante test di laboratorio. La necessità di nuovi biomarcatori, analizzabili attraverso test non invasivi su fluidi biologici come la saliva, potrebbe facilitare la diagnosi precoce delle malattie orali.

L'obiettivo era valutare la presenza di dati in letteratura riguardanti potenziali biomarcatori e identificare uno capace di dimostrare alta accuratezza diagnostica in termini di sensibilità, specificità, misurazione e conservazione. Una caratteristica chiave ricercata era la capacità di facilitare la diagnosi delle malattie orali, con particolare attenzione alla malattia parodontale, per indirizzare tempestivamente il paziente verso la strategia terapeutica più appropriata e prevenire potenziali complicazioni.

Pertanto, nel Capitolo 2, abbiamo condotto una revisione della letteratura sullo stato attuale dei test di laboratorio per la diagnosi delle infezioni odontogeniche e per il monitoraggio del processo di guarigione senza complicazioni. In particolare, l'obiettivo era determinare l'uso della presepsina in condizioni di sepsi derivanti da un'infezione odontogenica e valutarne l'applicazione nella fase di valutazione prognostica degli interventi chirurgici eseguiti nell'area maxillo-facciale. La PSEP è stata selezionata come oggetto dello studio per le sue promettenti proprietà. Tuttavia, nonostante alcuni risultati incoraggianti nel determinare la progressione e la gravità delle infezioni odontogeniche, diversi aspetti richiedono ulteriori indagini. I recentemente riportati bassi livelli di sensibilità e specificità della PSEP, insieme alla necessità di stabilire curve di riferimento nella saliva, evidenziano la necessità di future ricerche e studi più approfonditi.

Nel Capitolo 3, è stato condotto uno studio osservazionale in cui ogni caso ha servito come proprio controllo, con l'obiettivo di valutare la stabilità termica della PSEP su periodi brevi e lunghi a temperatura ambiente in vari fluidi biologici raccolti da neonati sani e ad alto rischio. Questo aspetto è particolarmente rilevante, poiché le linee guida del produttore specificano la stabilità della PSEP

solo in campioni di plasma, con una durata massima di conservazione di 3 giorni a +2/+8 °C e fino a 9 mesi a -20 °C o temperature inferiori. Per affrontare questo, sono stati raccolti campioni di sangue, urina e saliva entro le prime 24 ore dalla nascita, conservati a -80 °C (durata media: 16 mesi) e successivamente analizzati in quattro punti temporali prestabiliti entro 72 ore dopo lo scongelamento. I risultati hanno dimostrato che la PSEP rimane termicamente stabile fino a 72 ore dopo lo scongelamento in diversi fluidi biologici, rafforzando la sua potenziale affidabilità come biomarcatore di sepsi per la pratica clinica e le applicazioni di ricerca.

Nel Capitolo 4, abbiamo investigato la relazione tra stadi avanzati della malattia parodontale (PD) e livelli di PSEP, con l'obiettivo di valutare se la PSEP potesse fungere da biomarcatore affidabile per la PD in una coorte di pazienti adulti. È stato condotto uno studio caso-controllo che ha coinvolto 50 pazienti adulti, tra cui 25 individui diagnosticati con PD in stadio avanzato e 25 controlli sani. I livelli di PSEP sono stati confrontati con i parametri clinici registrati nella cartella parodontale (PI, BI, PPD, CAL) in due distinti punti temporali (T0-T1).

I risultati hanno mostrato una correlazione diretta tra i livelli di PSEP e i parametri PPD e CAL. In sintesi, a T0, i livelli di PSEP erano significativamente più alti nel gruppo PD rispetto al gruppo di controllo, mentre non sono state osservate differenze statisticamente significative al follow-up di sei settimane. Inoltre, i livelli di PSEP sono risultati essere dipendenti dal sesso, con valori più alti rilevati nei sottogruppi femminili, indipendentemente dalla presenza di tasche parodontali e sanguinamento gengivale.

Questi risultati hanno confermato la presenza di elevati livelli di PSEP nella saliva dei pazienti con PD a T0. Le corrette pratiche di igiene orale quotidiana, combinate con controlli dentali regolari, giocano un ruolo cruciale nel controllo dell'infiammazione sia negli individui sani che in quelli affetti da malattia parodontale. In futuro, l'analisi della PSEP potrebbe rappresentare uno strumento prezioso per monitorare e gestire più efficacemente le condizioni parodontali.

Prospettive Future e Impatto

La presente tesi è stata condotta con l'obiettivo di identificare e valutare uno strumento diagnostico potenziale per le malattie orali. In particolare, l'attenzione si è concentrata sulla valutazione dell'uso della presepsina (PSEP) nella saliva come biomarcatore complementare alle procedure cliniche standard, con l'intento di migliorare la diagnosi precoce e il monitoraggio terapeutico delle infezioni odontogeniche.

I risultati suggeriscono che la PSEP è un biomarcatore promettente per la patologia orale, mostrando livelli significativamente più elevati nella saliva dei pazienti con malattia parodontale, sia prima che dopo la terapia parodontale non chirurgica. Inoltre, i livelli di PSEP sono risultati associati a diversi fattori, tra cui sesso, profondità della tasca parodontale (PPD), sanguinamento e livello di attacco clinico (CAL), con livelli elevati nei pazienti con malattia parodontale di stadio IV.

Complessivamente, la necessità di un parametro affidabile e non invasivo in grado di indicare precocemente uno stato infiammatorio o il rischio di sepsi nel campo odontoiatrico rimane una questione critica nella pratica clinica quotidiana. Tuttavia, affinché la PSEP possa essere stabilita come biomarcatore affidabile in odontoiatria, è necessaria ulteriore ricerca. A tal proposito, studi multicentrici dovrebbero fornire curve di riferimento longitudinali per la PSEP in fluidi biologici non invasivi, considerando non solo la sua breve emivita (6 ore) ma anche potenziali fattori confondenti come la dieta, che potrebbero influenzare i suoi livelli.

Questi risultati aprono la strada a nuove opportunità di ricerca, offrendo uno strumento diagnostico innovativo per migliorare la prevenzione e la gestione delle malattie orali.

BIBLIOGRAFIA

1. Yaegashi, Yasunori, Kamon Shirakawa, Nobuhiro Sato, Yasushi Suzuki, Masahiro Kojika, Satoko Imai, Gaku Takahashi, Michiko Miyata, Shoji Furusako, and Shigeatsu Endo. 2005. 'Evaluation of a Newly Identified Soluble CD14 Subtype as a Marker for Sepsis'. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy* 11 (5): 234–38. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0400-4>.
2. Rakic, Mia, Aleksandra Petkovic-Curcin, Xavier Struillou, Smiljana Matic, Novak Stamatovic, and Danilo Vojvodic. 2015. 'CD14 and TNF α Single Nucleotide Polymorphisms Are Candidates for Genetic Biomarkers of Peri-Implantitis'. *Clinical Oral Investigations* 19 (4): 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1313-3>.
3. U.S Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Biomarker qualification: evidentiary framework guidance for industry and FDA staff. Rockville, MD: Department of Health and Human Services; 2018.
4. Arslan, Rana, Meltem Karsiyaka Hendek, Ucler Kisa, and Ebru Olgun. 2021. 'The Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid Periostin Levels in Patients with Gingivitis and Periodontitis'. *Oral Diseases* 27 (6): 1478–86. <https://doi.org/10.1111/odi.13664>.
5. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: A multicenter prospective study. *J Infect Chemother* 2014;20:30–34.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia sincera gratitudine al Coordinatore del Dottorato, Prof. Sergio Caputi, per avermi permesso di intraprendere questo importante e stimolante percorso accademico.

Un sentito ringraziamento va anche all'Unità di Terapia Intensiva Neonatale, con particolare riconoscimento al Prof. Diego Gazzolo, la cui guida preziosa, il costante supporto e la generosa dedizione di tempo sono stati fondamentali per il raggiungimento di questo significativo traguardo. La sua esperienza e il suo mentore sono stati una fonte inesauribile di ispirazione lungo tutto questo cammino.

Un ringraziamento speciale al mio Tutor, Prof. Tonino Traini, per la sua competenza e per il continuo sostegno ricevuto.

Sono profondamente grato alla mia amata Valeria, per aver sempre creduto in me e per essere stata al mio fianco in ogni passo di questo percorso.

