

# Sepsis Tanısı İçin Moleküler Yöntemlerdeki Yenilikler

## Innovations in Molecular Methods for Diagnosing Sepsis

Yusuf Emre Özdemir<sup>1</sup>, Gökhan Aygün<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye; <sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

### ÖZET

Sepsis, infeksiyonlara bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Geleneksel kan kültürü yöntemleri, sepsis tanısında uzun zamandır altın standart referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, geleneksel yöntemlerde patojen mikroorganizmaların tanımlanma süresinin uzun olması, duyarlılığının düşük olması ve sık tekrarlanma ihtiyacı gibi birçok kısıtlılık vardır. Bu nedenle, moleküler yöntemler, sekanslama teknolojileri, nanopartiküller, mikroakışkan sistemler, biyosensörler ve yapay zekâ algoritmaları sepsis tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu derlemede özellikle tam kan numunesi üzerinden etken mikroorganizmanın hızlıca tanımlanmasına yönelik geliştirilen moleküler yöntemler ve bu yöntemlere dayalı olarak geliştirilen ticari testler ele alındı.

**Anahtar Kelimeler:** moleküler yöntemler, sepsis, tanı

### ABSTRACT

Sepsis is one of the leading causes of morbidity and mortality due to infections. Traditional blood culture methods have long been accepted as the gold standard reference method for diagnosing sepsis. However, conventional methods have many limitations, such as the long identification period of pathogenic microorganisms, low sensitivity, and the need for frequent repetition. Therefore, molecular methods, sequencing technologies, nanoparticles, microfluidic systems, biosensors, and artificial intelligence algorithms have been used to diagnose of sepsis. This review will discuss molecular techniques for rapidly identifying the causative microorganism, especially on whole blood samples, and commercial tests developed based on these molecular methods.

**Keywords:** diagnosis, molecular methods, sepsis

### GİRİŞ

Sepsis, infeksiyonlara karşı konak immün yanıtta disregülasyona bağlı gelişen organ fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır ve infeksiyonlara bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir (1). Hastaneye yatırılan hastalardaki sepsis prevalansı yaklaşık %6 iken mortalite oranları %10-20 arasındadır. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan bu infeksiyon acilinin prognozunda erken tanı ve tedavi kritik öneme sahiptir (2). Geleneksel kan kültürü yöntemleri sepsis tanısında uzun zamandır altın standart referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber; patojen mikroorganizmanın tanımlanma süresinin uzun olması, duyarlılığının düşük olması, sık tekrar edilme ihtiyacı, test için gerekli numune ihtiyacının fazla olması, antibiyoterapi sonrası yüksek oranlarda yalancı negatiflik saptanması ve antisepsi işlemi gibi preanalitik değişkenlerin fazla olması bu yöntemin başarısını düşüren önemli kısıtlılıklardır (3-5).

Sepsisin erken tanısı için geliştirilen “systemic inflammatory response syndrome” (SIRS), “sequential organ failure assessment” (SOFA), “quick sepsis-related organ failure assessment” (qSOFA), “national early warning score” (NEWS), “modified early warning scoring” (MEWS) gibi skorlama sistemleri sepsis prognozunu tahmin etmede faydalıyken erken teşhis konusunda katkıları yetersizdir (3). Günümüzde sepsis tanısı için C-reaktif protein (CRP), prokalsitonin, presepsin, interlökin-6, nötrofil CD64, kalprotektin, lipopolisakkarid bağlayıcı protein ve mikro ribonükleik asit (miRNA)’ler başta olmak üzere 250’den fazla serum sepsis biyobelirteci tanımlanmıştır. Ancak bu biyobelirteçlerden hiçbirisi geniş tabanlı olma ve hızlı tanımlama, minimal invazivlik ve yüksek duyarlılık ve özgüllük gibi ideal özelliklerin tümünü birlikte karşılayamamaktadır (5,6). Bu nedenle ideal sepsis tanı testinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Mikroakışkan sistemlerin optimize edilmesiyle hasta başında kolayca uygulanabilen “lab-on a chip” teknolojilerinin geliştirilmesi, biyosensörlerle hızlı ve özgül tanımlamaların yapılabilmesi, yeni sekanslama yöntemlerinin geliştirilerek farklı moleküler yöntemlerle birlikte kullanılması ve yapay zekâ algoritmalarının tanısallara entegre edilmesi sepsisin erken tanısında umut verici sonuçların elde edildiği alanların başında gelmektedir. Bu derlemede

Cite this article as: Özdemir YE, Aygün G. [Innovations in molecular methods for diagnosing sepsis]. Klimik Derg. 2024;37(2):76-82. Turkish.

Sorumlu Yazar / Correspondence: Yusuf Emre Özdemir, E-posta / E-mail: dryusufeozdemir@gmail.com, Geliş / Received: 19 Nisan / April 2023, Kabul / Accepted: 08 Nisan / April 2024, Yayın Tarihi / Published Date: 29 Haziran / June 2024, DOI: 10.36519/kd.2024.4622

ise özellikle tam kan numunesi üzerinden patojen mikroorganizmanın hızlıca tanımlanmasına yönelik geliştirilen moleküler yöntemler ile sepsis ve SIRS ayrımı için geliştirilen “-omic” teknolojileri ele alındı.

## SEPSİS TANISINDA PATOJEN MİKROORGANİZMALARIN TESPİTİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER

### Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS)

Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), mikroorganizmalar tarafından üretilen türe özgü benzersiz protein profilini tanımlamaya yönelik geliştirilen bir yöntemdir. Peptit kütle parmak izi tanımlaması olarak da bilinen MALDI-TOF MS'in bakteri ve mantarların tanımlanmasında kullanımı Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration - FDA) tarafından onaylanmıştır (7). Bu yöntem ile kültürde üretilen bakteri kolonisi, molekülleri iyonize eden kimyasal bir matriks ile karıştırılır ve sonrasında lazer ışınlarıyla buharlaştırılır. Havalanan bu moleküllerin, saptayıcıya kadar uçuğu sürede geçen zamanın tespit edilmesiyle moleküllerin kütle parmak izi tanımlanır (8). Mikroorganizmaları %95-98 oranıyla doğru bir şekilde tanımlayabilmektedir. Bununla beraber; *Escherichia coli* ile *Shigella* spp. ve de *Acinetobacter baumannii* ile *Acinetobacter calcoaceticus* ayrımını doğru şekilde yapamamaktadır. En önemli dezavantajı ise mikroorganizmaların kültürde üretilme gereksinimidir. Bununla beraber, geleneksel kan kültürü yöntemleriyle karşılaştırıldığında etken tanımlama süresini 6-12 saat kadar kısaltabilmektedir (9,10). MALDI-TOF MS ile enzimatik mekanizmalarla ilişkili spektral piklerin değerlendirilerek antimikrobiyal direncin tespitine yönelik yapılan bazı çalışmalar olsa da direnç tespiti standardize edilmediği için henüz rutin kullanıma girmemiştir (11,12). Bu konuda yapılan bir derlemede ise MALDI-TOF MS yönteminin *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncini genotipik olarak saptamada oldukça yüksek tanısal doğruluğa sahip olduğu bildirilmiştir (13).

### Direkt MALDI-TOF MS

Bu yöntemde, mikroorganizma tanımlama süresini kısaltabilmek için etkenin besiyerinde üretilmesini beklemeden, pozitif sinyal veren kan kültürü sıvılarından doğrudan MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılır.

## ÖNE ÇIKANLAR

- Proteomik (MeMed BV®) ve transkriptomik (Septicyte Rapid, Triverity™) yaklaşımlardaki gelişmelerle, sepsis ile SIRS ayrımı az miktarda numuneye (0.1-2.5 ml kan), hızlı (15-60 dk) ve başarılı bir şekilde sağlanabilmektedir.
- Mikroorganizmalara ait mikrobiyal hücresiz DNA'nın tam kandan “shotgun” metagenomik sekanslama yoluyla tespiti (Karius Test®), standart kan kültürü yöntemleriyle üretilmeyen veya zor üretilen patojenlerin hızlı (24-48 saat) bir şekilde kantitatif olarak tanımlanmasını sağlar.
- Dijital PCR ile yüksek çözünürlüklü erime analizinin mikroakışkan sistemde birleştirildiği yöntem (U-dHRM) ile yenidoğan sepsisi ilişkili 37 bakteri, <0.1 ml periferik kandan dört saat içerisinde %99.9 duyarlılıkla kantitatif olarak tespit edilebilir.
- Yüksek verimli 3D partikül sayma sisteminin mikroakışkan çip üzerinde kullanıldığı yöntemde (IC-3D), tanımlanan mikroorganizmalardan bir saat içerisinde, tek hücre hassasiyeti ile (%100 duyarlılık ve özgüllük) direnç geni tespiti yapılabilir.

Tanısal duyarlılığı, insan hücre proteinlerinin varlığı nedeniyle düşüktür (7). Bu sebeple, insan hücre proteinlerini ortadan kaldıran kitler geliştirilmiştir. Bu sayede Gram-negatif bakterilerde başarılı (%66-100) bir tanımlama yapılabilirken; Gram-pozitif bakteriler ve mayalarda yeterli (%17-100) düzeyde tanımlama sağlanamamıştır. Ek olarak, polimikrobiyal infeksiyonları tanımlamada da yetersiz performansa sahiptir ve FDA onayı yoktur (7,14,15).

### Kısa İnkübasyonlu MALDI-TOF MS (si-MALDI-TOF)

Direkt MALDI-TOF MS yöntemi ile ortaya çıkan düşük tanısal performansı artırabilmek için mikroorganizma kolonilerinin 3-6 saat içerisinde izole edildiği ve sonrasında MALDI-TOF MS ile tanımlandığı bir yöntemdir (7). Mikroorganizmaları tanımlamadaki duyarlılığı %73 ile %100 arasındadır (16). Bu yöntem de polimikrobiyal infeksiyonları tanımlamada yetersizdir ve FDA tarafından henüz onaylanmamıştır (17).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)/MALDI-TOF MS

PCR uygulaması sonrasında kütle spektrometrisi tespitini içeren yeni yöntemlerle bakteri ve maya türlerinin tanımlanma süresi 6-8 saate kadar düşürülmüştür. *Mycoplasma pneumoniae*, *Nocardia* spp., *Legionella pneumophila* ve *Rickettsia typhi* gibi standart kan kültürü yöntemleriyle üretilmesi zor olan mikroorganizmalar bu yöntemle tanımlanabilir (10). Ayrıca, antimikrobiyal tedavi altında alınan kan kültürü numunelerinde patojen mikroorganizmayı tanımlama oranları geleneksel yöntemlere göre oldukça yüksek (%83'e karşın %42) olmakla birlikte FDA onayı bulunmamaktadır (10,18).

## YENİ NESİL SEKANSLAMA YÖNTEMLERİ

İlk olarak Fredric Sanger ve arkadaşlarının zincir sonlandırma yöntemi geliştirmesiyle beraber deoksiribonükleik asit (DNA) dizileri kolay ve güvenilir bir şekilde elde edilmeye başlanmıştır (19). Takibinde ise birçok yeni sekanslama yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntemler kullanım alanı, kolaylığı, hızı gibi farklı özelliklerine göre üç sınıfa ayrılmıştır (20). Birinci nesil sekanslama yöntemlerinde nükleotid dizisini belirlemek için radyo-etiketli veya floresan etiketli nükleotidler kullanılırken, yeni nesil sekanslama yöntemlerinde (2. ve 3. nesil) çok farklı teknikler kullanılmıştır. İkinci nesil sekanslama yöntemlerinde en başarılı sonuçlar köprü amplifikasyonu tekniği ile illumina sekanslama yönteminde elde edilmiştir (21). Üçüncü nesil sekanslama teknolojilerinde ise DNA amplifikasyon adımları gerekmediği için; daha yüksek verimle, daha hızlı tanımlama ve daha uzun okuma uzunlukları elde edilmiştir. Tüm bu gelişmelerin sonucunda, yeni nesil sekanslama (“next-generation sequencing” - NGS) teknolojileri, milyonlarca DNA parçasının yüksek verimle büyük ölçüde paralel olarak dizilenmesine olanak sağlamıştır (22).

Yeni nesil sekanslama teknolojileri ile kültürde üretilen mikroorganizmalardan tüm genom analizinin yapılmasının yanı sıra kültür sonuçlarını beklemeden doğrudan klinik numune üzerinden olası patojenik mikroorganizmaların saptanmasına yönelik metagenomik sekanslama da yapılabilmektedir (23). Tüm genom sekanslama; salgın analizlerinde, genotipik direnç profilinin tanımlanmasında ve henüz tanımlanmamış yeni genlerin veya mekanizmaların saptanmasında kullanılabilmektedir (24). Üretilmesi yavaş ve duyarlılık testi yapılmasının zor olduğu mikroorganizmaların (mikobakteriler, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*) direnç profilini belirlemede ve *Salmonella* serotiplendirilmesinde başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (25,26). Fungal patojenlerin tanımlanmasında validasyonu yetersiz iken *Candida auris*'i başarılı bir şekilde tanımlayabilmektedir (27). Metagenomik sekanslama; hedefe yönelik ve “shotgun” metagenomik sekanslama olarak iki farklı yöntemle yapılabilmektedir. Hedefe yönelik metagenomik sekanslamada PCR amplifikasyonu ya da

prob hibridizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle belirlenen bir patojen ya da patojen grubu seçilerek tanısal duyarlılık artırılırken, hedeflenen patojen sayısı kısıtlanır. “Shotgun” metagenomik sekanslamada ise potansiyel patojeni belirlemek için bir klinik numuneden çıkarılan tüm DNA veya RNA’lar biyoinformatik boru hattı içerisinde sekanslanır (23). Patojen mikroorganizmalar dışında insan DNA’sı ve insan mikrobiyomu da tespit edilir (28). “Shotgun” metagenomik sekanslamanın beyin omurilik sıvısında kullanımı için validasyon sağlanmıştır (29). Tam kan numunesi ve diğer vücut sıvılarındaki standardizasyonu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (23). Bununla beraber, yapılan meta-analiz ve derlemelerde yeni nesil sekanslama yöntemlerinin mikroorganizmaları tespit etmede altın standart referans yöntemden daha üstün olduğu, bu nedenle de bu yöntemlerin tanısal performanslarını doğru bir şekilde değerlendirmenin zor olduğu bildirilmiştir (30).

### “Oxford Nanopore” Sekanslama Teknolojisi (Oxford Nanopore Inc., Oxford, İngiltere)

DNA, RNA, miRNA ve proteinleri tanımlayabilen 3. nesil bir sekanslama cihazıdır. Bu yöntemin MinION platformu; küçük boyutlu, taşınabilir, hızlı ve düşük maliyetlidir. Tüm bu özellikler MinION platformunu diğer NGS teknolojilerinden ayıran önemli farklılıklardır. Mikroorganizmalar, 16S hızlı ampikon sekanslama kiti kullanılarak dört saatte tanımlanabilir (4,31). Ayrıca, 40 dk içerisinde virüsleri %100 duyarlılık ve özgüllükle tanımlayabilen kitler geliştirilmiştir (32). Bakteriyel patojenleri tanımlamada idrar ve dışkı örneklerinde validasyon sağlanmışken, tam kan tahlili örneklerinde henüz validasyon tamamlanmamıştır (33).

### Explify™ (ARUP Laboratories & IDbyDNA, Inc., ABD)

İllumina sekanslama yönteminin kullanıldığı bu ticari testte bronkoalveolar lavaj sıvısında 900’den fazla bakteriyel, viral ve fungal patojen semikantitatif veri ile tanımlanmaktadır. Henüz tam kan numunesinde direkt olarak patojen tanımlanmasa da idrarda 190’dan fazla üriner patojen ve 2000’den fazla antimikrobiyal direnç belirtecini saptayan yöntemler de geliştirilmiştir (23).

### iDTECT® Dx Blood (PathoQuest, Fransa)

Mikrobiyal hücresiz DNA (“microbial cell-free DNA” - mcfDNA) nın illumina cihazı ile “shotgun” metagenomik sekanslama yöntemine dayanır; 1200’den fazla patojeni, 5 ml tam kandan 48 saat içerisinde tanımlayabilmektedir. Ancak, bu yöntem ile fungal patojenler tanımlanamamaktadır (34). İmmünsüprese hastalarda yapılan konvansiyonel metotlarla karşılaştırıldığı bir çalışmada, klinik ile ilişkili olabilecek virüsleri yüksek oranda saptayabildiği (%36 vs. %11) ve negatif prediktif değerinin %98 olduğu bildirilmiştir (35).

### Karius Plazma Testi (Karius Inc., ABD)

Non-invazif likit biyopsi olarak da tanımlanan bu test, mcfDNA’nın illumina cihazı ile “shotgun” metagenomik sekanslanması ve yapay zekâ algoritmaları ile tanımlanması prensibine dayanır; 1250’den fazla patojeni, 5 ml tam kan örneğinden 24-48 saat içerisinde tanımlayabilmektedir. Bu yöntem ile fungal patojenler tanımlanabilirken, RNA virüsleri tespit edilememektedir (36). Karius plazma testinin konvansiyonel metotlarla karşılaştırıldığı çalışmalarda duyarlılığının %70 ila %93 arasında, özgüllüğünün %63 ile %88 arasında olduğu bildirilmiştir (37). Bununla beraber, sepsis şüphesi olan hastalarda ise kan kültürü sonuçları ile korelasyonu %97’dir (36). Karius plazma testinde, antibiyotik tedavisi alan kişilerde patojen mikroorganizmaları tanımlama oranı kan kültürü yöntemine göre oldukça yüksektir (%20’ye karşın %48) (38). Antimikrobiyal direnç tespitine yönelik çalışmalar ise devam etmektedir. Bu yöntemin en önemli

dezavantajı ise yüksek cihaz (>600 000 ABD doları) ve test (2000 ABD doları) maliyetidir (37).

## PCR TEMELLİ HIZLI TESTLER

### Iridica / Plex ID (Abbott Molecular, ABD)

Bu platformlar, multipleks ve “broad range” PCR yöntemi ile çoğaltılan patojen genomlarının elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (“electrosprey ionization mass spectrometry” - ESI-MS) yöntemi ile tanımlanması prensibine dayanır. Plex ID platformu ile yapılan çalışmalarda tanısal duyarlılığın düşük olması üzerine Iridica platformu geliştirilmiştir. Bu yöntemle, 780 bakteri ve *Candida* türü 5 ml tam kan numunesinden tanımlanabilir (39). Altı numunelik bir kitin sonuç verme süresi altı saattir. Ayrıca, mecA, vanA, vanB ve blaKPC olmak üzere toplam dört direnç geni de bu yöntemle tespit edilebilmektedir (4). Klinik çalışmalarda testin duyarlılığı %44 ila %82, özgüllüğü %69 ila %94 arasında bulunmuşken kontaminantların hariç tutulduğu klinik çalışmalarda ise testin duyarlılığı %88-91, özgüllüğü %87-99 olarak bildirilmiştir (39-41). Bununla beraber, polimikrobiyal infeksiyonları tanımlamada yetersiz bulunmuştur ve 5 ml kan ihtiyacı olduğu için pediatrik hastalarda bu yöntem rutin olarak kullanılamamaktadır. “Conformité Européene” (CE) sertifikası olan ve Avrupa’da kullanılabilen bu testin henüz FDA onayı yoktur (4,42).

### SeptiFast (Roche Diagnostics, İsviçre)

Bu testte, multipleks gerçek zamanlı PCR sonrasında DNA dizilerine ait erime dereceleri ve erime eğrilerinin analizini yapan “yüksek çözünürlüklü erime analizi” yönteminin kombinasyonu kullanılmaktadır (43). Bu yöntem ile 1.5 ml’lik bir tam kan numunesinden 16’dan fazla bakteri, beş *Candida* türü ve *Aspergillus fumigatus* tanımlanabilmektedir. Sekiz örnek aynı anda çalışılabilir ve altı saat içerisinde sonuç elde edilir (4). Bununla beraber, otomatikleştirilmiş DNA ekstraksiyonuyla bu süre dört saate kadar düşürülebilmektedir (44). Antibiyotik direnç geni olarak ise sadece mecA’yı (100 dk) saptayabilmektedir. SepsisFast testinin tanısal doğruluğuyla ilgili birçok klinik çalışma yapılmıştır. Dark ve arkadaşlarının (45) SepsisFast testinin tanısal doğruluğuna yönelik 41 faz III çalışmasının sonuçlarını değerlendirdikleri meta-analizde, testin duyarlılığı %68, özgüllüğü %86 olarak bulunmuştur. Chang ve arkadaşlarının (46) 34 çalışmadan 6012 sepsis şüpheli hastayı değerlendirdikleri derlemede ise SepsisFast testinin duyarlılığının %75, özgüllüğünün %92 olduğu bildirilmiştir. Yine bu derlemede, söz konusu testin bakteriyel infeksiyonları fungal infeksiyonlara göre daha doğru tanımladığı ve de polimikrobiyal infeksiyonlarda kan kültürlerine göre daha yüksek tanısal performansına sahip olduğu belirtilmiştir (46). SepsisFast testi 1.5 ml kan ile patojen mikroorganizmayı tanımlayabildiği için pediatrik hastalarda kullanılabilmektedir. Ancak, yenidoğan sepsisi ile ilişkili olan bazı patojenler bu test ile tespit edilemediği için yenidoğanlarda kullanımı uygun değildir; FDA onayı henüz olmayan bu testin CE sertifikası bulunmaktadır (4).

### SepsiTest (Molzyme GmbH&Co., Almanya)

Bu yöntemde tanısal duyarlılığı artırabilmek için seçici lizis ve insan DNA degradasyonunu sağlayan detaylı bir örnek hazırlama işlemi uygulanır. Sonrasında ise multipleks ve “broad range” PCR’i takiben birinci nesil Sanger sekanslama yöntemi ile hedefe yönelik metagenomik sekanslama gerçekleştirilir (47). SepsisTest ile 303 bakteri ve 40 fungal patojen, 1 ml’lik tam kan örneğinden tanımlanabilmektedir. On iki test aynı anda çalışılabilir ve dört saat içerisinde patojen mikroorganizmanın varlığı tespit edilebilir. Ancak, tür düzeyinde tanımlama için ise yaklaşık 4-6 saatlik ek süreye daha ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal direnç tespiti ise bu test ile yapılamamaktadır. Toplam patojen tanımlama süresi 8-10 saat arasında olmakla birlikte gelecekte yeni nesil sekanslama yöntemleriyle bu sürenin azaltılabileceği ve

direnç genlerinin de saptanabileceği düşünülmektedir (4). Klinik çalışmalarında testin duyarlılığı %11-87, özgüllüğü %85-96 arasında bulunmuşken, kontaminantların hariç tutulduğu klinik çalışmalarda duyarlılık %38-79, özgüllük %87-95 arasında bildirilmiştir (48-50). Pediatrik hastalarda 1 ml kan ile patojen mikroorganizmayı tanımlayabildiği için kullanılabilir. Bununla beraber, SepsisTest'te birden fazla büyük tanısız cihaz kullanıldığı için başlangıç maliyeti fazladır. Ayrıca, birden fazla örnek transfer adımını içerdiği için de kontaminasyon riski diğer hızlı testlere göre daha yüksektir; FDA onayı bulunmamakla beraber CE onayı vardır (4).

### “Universal Digital High-Resolution Melt” (U-dHRM) Yöntemi

Dijital PCR, geniş tabanlı amplifikasyon ve yüksek çözünürlüklü erime analizi (“universal digital high-resolution melt” – U-dHRM) yönteminin mikroakışkan çip üzerinde birleştirildiği ve bir numune içerisindeki bakterilerin türü ve miktarının prob kullanmadan belirlenebildiği bir testtir; 1 ml'den az tam kan numunesinde özellikle yenidoğan sepsisi ile ilişkili olan 37 bakteriyel patojeni tanımlamaya yönelik geliştirilmiştir. Her testte sadece bir numune çalışılabilir ve dört saat içerisinde sonuç elde edilir. Kantitatif bir yöntem kullanıldığı için tek bir örnekten sepsise neden olan tüm mikroorganizmaların saptanabilmesine imkân sağlar (51). Tek organizma ve tek genom duyarlılığı ile 37 bakteriyel patojeni tanımlamadaki doğruluğu %99.9 olarak bildirilmiştir. Bununla beraber, bu testin duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemeye yönelik daha fazla çalışma gerektiği için henüz ticari olarak kullanılmamaktadır (52). U-dHRM teknolojisi, kolay ve hızlı tanımlama yapabilmesi, direnç geni saptanabilmesine olanak sağlaması ve yapay zekâ ile geniş bilgi bankasına sahip olması nedeniyle taşınabilir bir hasta başı testi (“point-of-care testing” - POCT) olarak umut vaat edici görülmektedir (4).

### “Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection” (IC 3D) (Velox Biosystems, ABD)

Dijital PCR ile yüksek verimli 3D partikül sayma sisteminin mikroakışkan çip üzerinde birleştirildiği bir yöntemdir. Örnek hazırlama ve saflaştırma olmaksızın hedef bakterilerin tam kandan doğrudan saptanmasını mümkün kılar. Tek adımlı, kültür ve amplifikasyon gerektirmeyen IC 3D yöntemi, 1-3 saat içerisinde tek hücre hassasiyetiyle kantitatif veri sunar. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, analiz başına sadece seçilmiş olan bir bakteri türünün (örn. *E. coli*) araştırılmasıdır (53,54). Bununla beraber, çoklu dalga boyu algılama sistemi kullanılarak birden fazla patojenin araştırılabileceği fakat bu sayının az sayıdaki floresan kanal nedeniyle, sınırlı olabileceği bildirilmiştir (4). Yine bu yöntemle antimikrobiyal direnç genlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise oldukça düşük saptama limiti ile bir saat içerisinde %100 duyarlı ve özgül sonuçlar elde edilmiştir (55).

## MANYETİK REZONANS

### T2Dx® (T2Biosystems, Inc., ABD)

Manyetik alan içerisindeki su moleküllerinin davranışını saptayan manyetik rezonans (MR) teknolojisidir. T2Dx® testinde, PCR amplifikasyonu sonrasında replike olan DNA, MR sinyalinde büyük değişikliklere neden olan nanopartiküller ile hibridize edilerek tespit edilir. FDA izini alan bu yöntemde sadece önceden belirlenmiş olan mikroorganizmaların varlığı araştırılabilir. Sonuçlar 4 ml tam kan örneği ile 3-5 saat içerisinde elde edilir (56,57). Bu yöntemin T2Bacteria®, T2Candida® ve T2 Direnç paneli olmak üzere üç farklı ticari kiti mevcuttur. T2Bacteria® panelinde; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli* türleri tanımlanmaktadır. Klinik çalışmalarda bu panelin duyarlılığı %90, özgüllüğü %98 olarak tespit edilmiştir (57). T2Candida® panelinde ise; *Candida albicans*, *Can-*

*didia tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* ve *Candida parapsilosis* türleri tanımlanmaktadır. Bu panelin duyarlılığı %91 ve özgüllüğü %99 olarak bildirilmiştir (58).

## SEPSİS/SIRS AYRIMININ TESPİTİ İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER

### “OMIC” Teknolojileri

“Omic” yaklaşımı, birden fazla farklı teknolojinin bir araya getirilerek moleküller arasındaki ilişkileri, moleküllerin rollerini ve bir organizmayı yapan tüm hücrelerin etkilerini araştırmayı amaçlar (59). Yapılan genomik çalışmalarda, konağın genetik profilinin kişinin infeksiyonlara duyarlılığı, tedaviye yanıtı ve klinik sonuçlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (60,61). Ancak, genomik araştırmalar tarafından sağlanan statik bilgi, sepsisin heterojenliği ve dinamik seyrine ayak uydurmadığı için, tanısız iş akışına dahil edilememektedir. Bu nedenle de sepsis tanısında DNA genotipini araştırmaya yönelik yaklaşımlar yerine fenotipe yönelik araştırmalar (proteomik ve transkriptomik) öne çıkmıştır (62). Proteomik (proteinlerin tespiti) ve transkriptomik (mRNA belirteçleri) yaklaşımlardaki gelişmeler, patojen mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik katkı sağlamasa da sepsis ile SIRS ayrımının oldukça az numune ile hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır (63).

### MeMed BV® (MeMed Diagnostics, Ltd., İsrail)

C-reaktif protein, interferon gamma kaynaklı protein-10 (IP-10) ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (“tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand” -TRAIL) proteinlerinin immünoassay metoduyla tanımlanması ve yapay zekâ algoritmalarıyla yorumlanması prensibine dayanır. Bu test ile 0.1 ml kan ile 15 dakika içerisinde sonuç alınabilmekte olup FDA tarafından kullanımına izin verilmiştir. Klinik çalışmalarda, bakteriyel-viral infeksiyonların ayırımında duyarlılığı %87-93, özgüllüğü %93-94, negatif prediktif değeri ise %98.3 olarak bildirilmiştir (64,65)

### SeptiCytte Lab/Rapid (Immunexpress Inc., ABD)

Doğal immün yanıtta yer alan dört RNA biyobelirtecinin (LAMP1, PLAC8, PLA2G7, CEACAM4) ters transkripsiyon kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi ile tespit edilmesi prensibine dayanır. Bu yöntem, spesifik olarak insan inflamatuvar belirteçlerini hedefleyen ilk transkriptomik yöntemdir (66). SeptiCytte Lab testi 2.5 ml tam kan numunesi ile 4-6 saat içerisinde sonuç verebilirken, bu platformun optimizasyonu ile geliştirilen bir POCT olan SeptiCytte Rapid ile 0.25 ml tam kan numunesinden bir saat içerisinde sonuç elde edilmektedir (67). Heterojen grupların değerlendirildiği farklı klinik çalışmalarda SeptiCytte platformunun sepsis ile SIRS ayırımında oldukça iyi bir performans gösterdiği bildirilmiş ve bu nedenle FDA tarafından da kullanımına izin verilmiştir (68). Gelecekte, mikroorganizmaların tanımlanmasına yönelik geliştirilen yeni hızlı tanısız testlerle beraber kullanıldığında akılcı antibiyotik kullanımı üzerine önemli katkıların olacağı düşünülmektedir (69).

### InSep™ (IMX-BVN-2) (Inflammatix Inc., ABD)

Host Dx™ testinin (“inflammatix”-bakteriyel, viral, noninfeksiyöz-1 -IMX-BVN-1) yapay zekâ algoritmaları ile geliştirilmiş formudur. Sepsis ile ilişkili 11 mRNA (sepsis MetaScore), bakteriyel/viral infeksiyon ayırımıyla ilişkili yedi mRNA (bakteriyel/viral MetaScore) ve 30 günlük mortalite prediktörüyle ilişkili 11 mRNA belirtecinin (Stanford mortalite skoru) kantitatif ters transkripsiyon döngü aracılı izotermal amplifikasyon (qRT-LAMP) yöntemi ile değerlendirildiği bir testtir (70). Bu testte 2.5 ml tam kan numunesi ile sepsis varlığı, hastalık şiddeti ve muhtemel

etiyojoloji hakkındaki bilgi 30 dk'dan kısa bir süre içerisinde elde edilmektedir. Farklı popülasyonların dahil edildiği klinik çalışmalarda tanısal doğruluğunun (AUROC=0.85-0.95) oldukça yüksek olduğu ve bakteriyel/viral enfeksiyon ayırımında da yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (71,72).

Şu an ticari olarak piyasada kullanılan Triverity™ (IMX-BVN-3) ise In-Sep™ (IMX-BVN-2) testinin yapay zekâ ile daha da geliştirilmiş versiyonudur. Klinik çalışmalarda Triverity™ testinin bakteriyel enfeksiyonları ayırt etmede prokalsitonine eş değer, 30 günlük mortalite riskini öngörmeye ise prokalsitoninden belirgin üstün olduğu bildirilmiştir. Ayrıca seri takiplerde IMX-BVN-3 skorunda azalmanın klinik iyileşme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (73). Farklı bir klinik çalışmada ise bu testin COVID-19 tanısındaki duyarlılığının %93.8 olduğu ve COVID-19 tanılı hastalarda bakteriyel koinfeksiyonu tanımlamadaki duyarlılığının %100, özgüllüğünün %99.4 olduğu bildirilmiştir (74). Yine bu teknoloji ile geliştirilen parmak ucu kan örneğinden bakteriyel-viral-non enfeksiyöz süreçleri ayırabilen BacVerity™ isimli ticari testte bir POCT olarak kullanılmaktadır (73).

Sonuç olarak; bir enfeksiyon acili olan sepsisin erken ve doğru tanımlanmasına yönelik çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Moleküler teknolojilerdeki ilerlemelerle beraber yarım saat içerisinde sepsis ile SIRS ayırımını %95'in üzerinde duyarlılıkla tespit edebilen ve 4-6 saat içerisinde patojen mikroorganizmaları saptayabilen umut verici yöntemler geliştirilmiştir. Gelecekte, bu testlerin tanısal duyarlılıklarının daha da artırılması ve maliyetlerinin düşürülebilmesi halinde sepsis, kolay tanımlanabilen ancak artan antimikrobiyal direnç nedeniyle tedavisi zor bir durum olarak karşımıza çıkabilir.

### Danışman Değerlendirmesi

Bağımsız dış danışman.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram – G.A.; Tasarım – Y.E.Ö., G.A.; Denetleme – G.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme – Y.E.Ö.; Analiz ve/veya Yorum – Y.E.Ö., G.A.; Literatür Taraması – Y.E.Ö.; Makale Yazımı – Y.E.Ö.; Eleştirel İnceleme – G.A.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

### Finansal Destek

Yazar finansal destek beyan etmemiştir.

## KAYNAKLAR

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-10. [\[CrossRef\]](#)
- Rhee C, Dantes R, Epstein L, et al; CDC Prevention Epicenter Program. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. *JAMA*. 2017;318(13):1241-9. [\[CrossRef\]](#)
- Lippi G, Montagnana M, Balboni F, et al. Academy of Emergency Medicine and Care-Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology consensus recommendations for clinical use of sepsis biomarkers in the emergency department. *Emerg Care J*. 2017;13(2):6877. [\[CrossRef\]](#)
- Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(2):e00089-17. [\[CrossRef\]](#)
- Da Rin G, Zoppelletto M, Lippi G. Integration of diagnostic microbiology in a model of total laboratory automation. *Lab Med*. 2016;47(1):73-82. [\[CrossRef\]](#)
- Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care*. 2020;24(1):287. [\[CrossRef\]](#)
- Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99(1):115219. [\[CrossRef\]](#)
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):100-11. [\[CrossRef\]](#)
- Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. *Microorganisms*. 2021;9(7):1539. [\[CrossRef\]](#)
- Duncan CF, Youngstein T, Kirrane MD, Lonsdale DO. Diagnostic challenges in sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2021;23(12):22. [\[CrossRef\]](#)
- Jeon YD, Seong H, Kim D, et al. Impact of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometric evaluation on the clinical outcomes of patients with bacteremia and fungemia in clinical settings lacking an antimicrobial stewardship program: a pre-post quasi experimental study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):385. [\[CrossRef\]](#)
- Cavalieri SJ, Kwon S, Vivekanandan R, et al. Effect of antimicrobial stewardship with rapid MALDI-TOF identification and Vitek 2 antimicrobial susceptibility testing on hospitalization outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):208-11. [\[CrossRef\]](#)
- Zhong H, Wu ML, Feng WJ, Huang SF, Yang P. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;21:138-47. [\[CrossRef\]](#)
- Huang YL, Sun QL, Li JP, Hu YY, Zhou HW, Zhang R. Evaluation of an in-house MALDI-TOF MS rapid diagnostic method for direct identification of microorganisms from blood cultures. *J Med Microbiol*. 2019;68(1):41-7. [\[CrossRef\]](#)
- Wu S, Xu J, Qiu C, Xu L, Chen Q, Wang X. Direct antimicrobial susceptibility tests of bacteria and yeasts from positive blood cultures by using serum separator gel tubes and MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*. 2019;157:16-20. [\[CrossRef\]](#)
- Cherkaoui A, Renzi G, Azam N, Schorderet D, Vuilleumier N, Schrenzel J. Rapid identification by MALDI-TOF/MS and antimicrobial disk diffusion susceptibility testing for positive blood cultures after a short incubation on the WASPLab. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(6):1063-70. [\[CrossRef\]](#)
- Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O, et al. Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156299. Erratum in: *PLoS One*. 2016;11(9):e0160537. [\[CrossRef\]](#)
- Makristathis A, Harrison N, Ratzinger F, et al. Substantial diagnostic impact of blood culture independent molecular methods in bloodstream infections: Superior performance of PCR/ESI-MS. *Sci Rep*. 2018;8(1):16024. [\[CrossRef\]](#)
- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8. [\[CrossRef\]](#)
- Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 Jan;107(1):1-8. [\[CrossRef\]](#)
- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012;30(5):434-9. Erratum in: *Nat Biotechnol*. 2012;30(6):562. [\[CrossRef\]](#)
- Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB, Snyder MP, Barron AE. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem*. 2011;83(12):4327-41. [\[CrossRef\]](#)
- Hilt EE, Ferrieri P. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases. *Genes (Basel)*. 2022;13(9):1566. [\[CrossRef\]](#)
- Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002824. [\[CrossRef\]](#)
- Gygli SM, Keller PM, Ballif M, et al. Whole-genome sequencing for drug resistance profile prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(4):e02175-18. [\[CrossRef\]](#)
- Leekitcharoenphon P, Nielsen EM, Kaas RS, Lund O, Aarestrup FM. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One*. 2014;9(2):e87991. [\[CrossRef\]](#)

27. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134-40. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2018;67(6):987. [\[CrossRef\]](#)
28. Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. *Genome Res*. 2019;29(5):831-42. [\[CrossRef\]](#)
29. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2327-40. [\[CrossRef\]](#)
30. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet*. 2019;20(6):341-55. [\[CrossRef\]](#)
31. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet*. 2015;5:449. [\[CrossRef\]](#)
32. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):104-14. [\[CrossRef\]](#)
33. Quick J, Ashton P, Calus S, et al. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of Salmonella. *Genome Biol*. 2015;16:114. [\[CrossRef\]](#)
34. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(9):944-55. [\[CrossRef\]](#)
35. Parize P, Muth E, Richaud C, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multicentre, blinded, prospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(8):574.e1-574.e6. [\[CrossRef\]](#)
36. Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat Microbiol*. 2019;4(4):663-74. [\[CrossRef\]](#)
37. Han D, Li R, Shi J, Tan P, Zhang R, Li J. Liquid biopsy for infectious diseases: a focus on microbial cell-free DNA sequencing. *Theranostics*. 2020;10(12):5501-13. [\[CrossRef\]](#)
38. Eichenberger EM, de Vries CR, Ruffin F, et al. Microbial cell-free DNA identifies etiology of bloodstream infections, persists longer than conventional blood cultures, and its duration of detection is associated with metastatic infection in patients with *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2022;74(11):2020-7. [\[CrossRef\]](#)
39. Jordana-Lluch E, Giménez M, Quesada MD, et al. Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology in blood specimens for the molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140865. [\[CrossRef\]](#)
40. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, et al. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3164-74. [\[CrossRef\]](#)
41. Vincent JL, Brealey D, Libert N, et al; Rapid Diagnosis of Infections in the Critically Ill Team. Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. *Crit Care Med*. 2015;43(11):2283-91. [\[CrossRef\]](#)
42. Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4):323-31. [\[CrossRef\]](#)
43. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2252-8. [\[CrossRef\]](#)
44. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, et al. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PLoS One*. 2010;5(10):e13387. [\[CrossRef\]](#)
45. Dark P, Blackwood B, Gates S, et al. Accuracy of LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2015;41(1):21-33. [\[CrossRef\]](#)
46. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(5):e62323. [\[CrossRef\]](#)
47. Horz HP, Scheer S, Vianna ME, Conrads G. New methods for selective isolation of bacterial DNA from human clinical specimens. *Anaerobe*. 2010;16(1):47-53. [\[CrossRef\]](#)
48. Nieman AE, Savelkoul PHM, Beishuizen A, et al. A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infect Dis*. 2016;16:314. [\[CrossRef\]](#)
49. Orszag P, Disqué C, Keim S, et al. Monitoring of patients supported by extracorporeal membrane oxygenation for systemic infections by broad-range rRNA gene PCR amplification and sequence analysis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):307-11. [\[CrossRef\]](#)
50. Leitner E, Kessler HH, Spindelboeck W, et al. Comparison of two molecular assays with conventional blood culture for diagnosis of sepsis. *J Microbiol Methods*. 2013;92(3):253-5. [\[CrossRef\]](#)
51. Fraley SI, Hardick J, Masek BJ, et al. Universal digital high-resolution melt: a novel approach to broad-based profiling of heterogeneous biological samples. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(18):e175. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2016;44(1):508. [\[CrossRef\]](#)
52. Velez DO, Mack H, Jupe J, et al. Massively parallel digital high resolution melt for rapid and absolutely quantitative sequence profiling. *Sci Rep*. 2017;7:42326. [\[CrossRef\]](#)
53. Kang DK, Ali MM, Zhang K, et al. Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nat Commun*. 2014;5:5427. [\[CrossRef\]](#)
54. Skinner JP, Swift KM, Ruan Q, Perfetto S, Gratton E, Tetin SY. Simplified confocal microscope for counting particles at low concentrations. *Rev Sci Instrum*. 2013;84(7):074301. [\[CrossRef\]](#)
55. Abram TJ, Cherukury H, Ou CY, et al. Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood digital PCR. *Lab Chip*. 2020;20(3):477-89. [\[CrossRef\]](#)
56. Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol*. 2016;11(1):103-17. [\[CrossRef\]](#)
57. De Angelis G, Posteraro B, De Carolis E, et al. T2Bacteria magnetic resonance assay for the rapid detection of ESKAPEc pathogens directly in whole blood. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(suppl\_4):20-6. [\[CrossRef\]](#)
58. Neely LA, Audeh M, Phung NA, et al. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Sci Transl Med*. 2013;5(182):182ra54. [\[CrossRef\]](#)
59. Itenov TS, Murray DD, Jensen JUS. Sepsis: Personalized medicine utilizing 'omic' technologies-a paradigm shift? *Healthcare (Basel)*. 2018;6(3):111. [\[CrossRef\]](#)
60. Lu H, Wen D, Wang X, et al. Host genetic variants in sepsis risk: a field synopsis and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23(1):26. [\[CrossRef\]](#)
61. Taudien S, Lausser L, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Genetic factors of the disease course after sepsis: Rare deleterious variants are predictive. *EBioMedicine*. 2016;12:227-38. [\[CrossRef\]](#)
62. Langley RJ, Wong HR. Early diagnosis of sepsis: Is an integrated omics approach the way forward? *Mol Diagn Ther*. 2017;21(5):525-37. [\[CrossRef\]](#)
63. Mangioni D, Peri AM, Rossolini GM, et al. Toward rapid sepsis diagnosis and patient stratification: What's new from microbiology and omics science. *J Infect Dis*. 2020;221(7):1039-47. [\[CrossRef\]](#)
64. Ashkenazi-Hoffnung L, Oved K, Navon R, et al. A host-protein signature is superior to other biomarkers for differentiating between bacterial and viral disease in patients with respiratory infection and fever without source: a prospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(7):1361-71. [\[CrossRef\]](#)
65. van Houten CB, de Groot JAH, Klein A, et al. A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(4):431-40. [\[CrossRef\]](#)
66. McHugh L, Seldon TA, Brandon RA, et al. A molecular host response assay to discriminate between sepsis and infection-negative systemic inflammation in

- critically ill patients: Discovery and validation in independent cohorts. *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001916. [\[CrossRef\]](#)
67. Gravrand V, Mellot F, Ackermann F, et al. Stratification of COVID-19 severity using SeptiCyte RAPID, a novel host immune response test. *Viruses.* 2023;15(2):419. [\[CrossRef\]](#)
68. Zimmerman JJ, Sullivan E, Yager TD, et al. Diagnostic accuracy of a host gene expression signature that discriminates clinical severe sepsis syndrome and infection-negative systemic inflammation among critically ill children. *Crit Care Med.* 2017;45(4):418-25. [\[CrossRef\]](#)
69. Miller RR 3rd, Lopansri BK, Burke JP, et al. Validation of a host response assay, SeptiCyte LAB, for discriminating sepsis from systemic inflammatory response syndrome in the ICU. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(7):903-13. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(1):155. [\[CrossRef\]](#)
70. Mayhew MB, Buturovic L, Luethy R, et al. A generalizable 29-mRNA neural-network classifier for acute bacterial and viral infections. *Nat Commun.* 2020;11(1):1177. [\[CrossRef\]](#)
71. Atallah J, Mansour MK. Implications of using host response-based molecular diagnostics on the management of bacterial and viral infections: A review. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:805107. [\[CrossRef\]](#)
72. Safarika A, Wacker JW, Katsaros K, et al. A 29-mRNA host response test from blood accurately distinguishes bacterial and viral infections among emergency department patients. *Intensive Care Med Exp.* 2021;9(1):31. [\[CrossRef\]](#)
73. Brakenridge SC, Chen UI, Loftus T, et al. Evaluation of a multivalent transcriptomic metric for diagnosing surgical sepsis and estimating mortality among critically ill patients. *JAMA Netw Open.* 2022;5(7):e2221520. [\[CrossRef\]](#)
74. Ram-Mohan N, Rogers AJ, Blish CA, et al; Stanford COVID-19 Biobank Study Group. Using a 29-mRNA host response classifier to detect bacterial coinfections and predict outcomes in COVID-19 patients presenting to the emergency department. *Microbiol Spectr.* 2022;10(6):e0230522. [\[CrossRef\]](#)