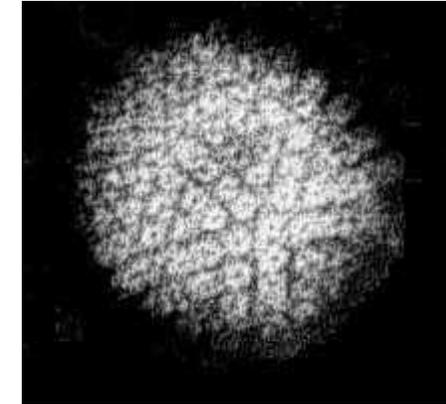
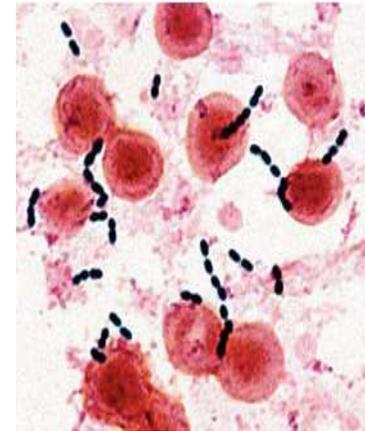


L3-L4 / L4-L5



Le tecniche molecolari nella diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale



dr.ssa Lucia Collini
Microbiologia e Virologia
Trento, 20 gennaio 2011

Infezioni del sistema nervoso centrale: manifestazioni cliniche

Meningiti

Encefaliti

e relative forme associate
(meningoencefaliti, ...)

Mieliti

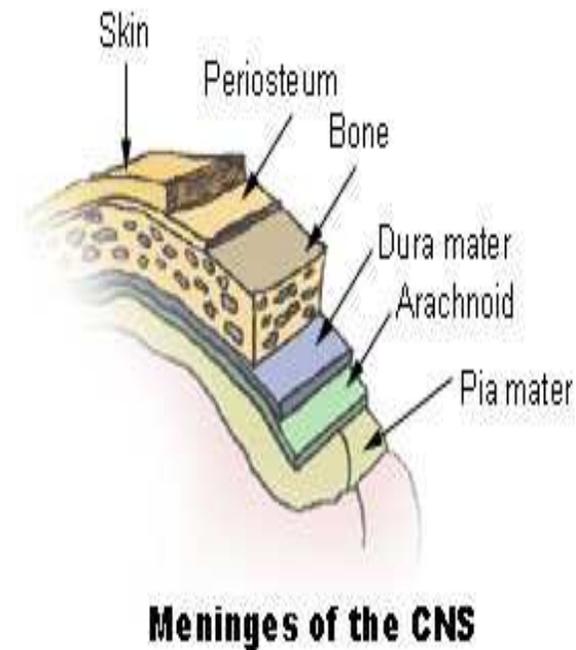
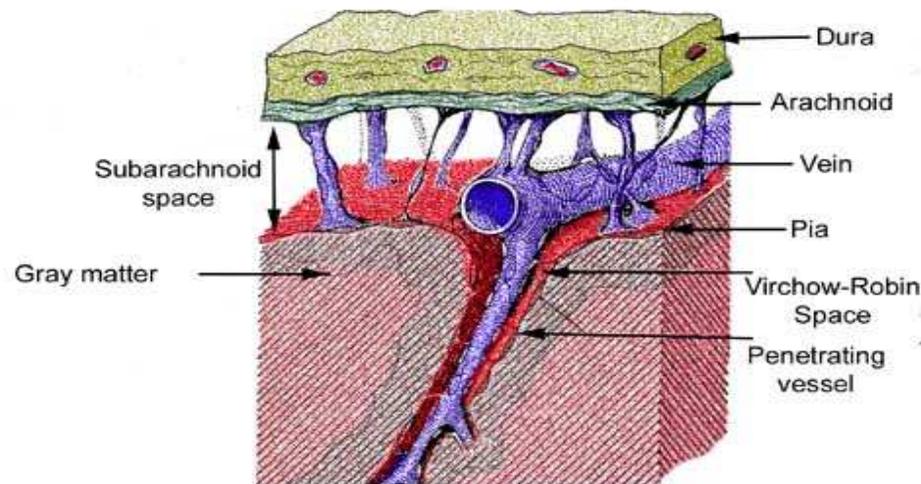
Ascessi



Infezioni del sistema nervoso centrale: manifestazioni cliniche

La **meningite** è un processo infiammatorio che interessa l'aracnoide, la pia madre e il liquido cerebrospinale

Il processo infiammatorio si estende attraverso lo spazio subaracnoideo all'encefalo e al midollo spinale e interessa regolarmente i ventricoli





Meningite batterica: specie di maggiore riscontro nelle diverse fasce d'età

0-1mese	2mesi-5anni	6-30anni	31-60anni	>60anni
<i>Escherichia coli</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> (b e c)	<i>Neisseria meningitidis</i> (A,B,C,X,Y,W135)	<i>Str. pneumoniae</i> (tutti i 90 sierotipi)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (tutti i 90 sierotipi)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (A,B,C,X,Y,W135)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (tutti i 90 sierotipi)	<i>Neisseria meningitidis</i> (A,B,C,X,Y,W135)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Str. pneumoniae</i> (tutti i 90 sierotipi)	<i>Haemophilus influenzae</i> (b e c)		<i>Enterobacteriaceae</i> spp.

Meningite virale

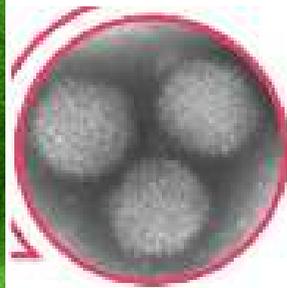
Virus a RNA

Picornaviridae	Paramyxoviridae	Retroviridae	Flaviviridae	Arenaviridae	Arbovirus
<i>Echovirus</i>	<i>Virus parotite</i>	<i>HIV-1</i>	<i>HCV</i>	<i>LCMV</i>	<i>Virus Toscana</i>
<i>Coxsackievirus</i>					<i>St.Louis</i>
<i>Poliovirus1,2,3</i>					<i>California</i>
<i>Enterovirus71</i>					<i>Colorado</i>
					<i>Louping-ill</i>

TBE

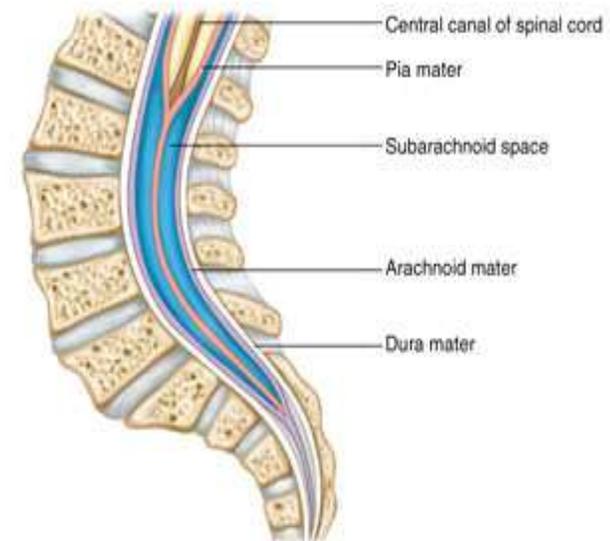
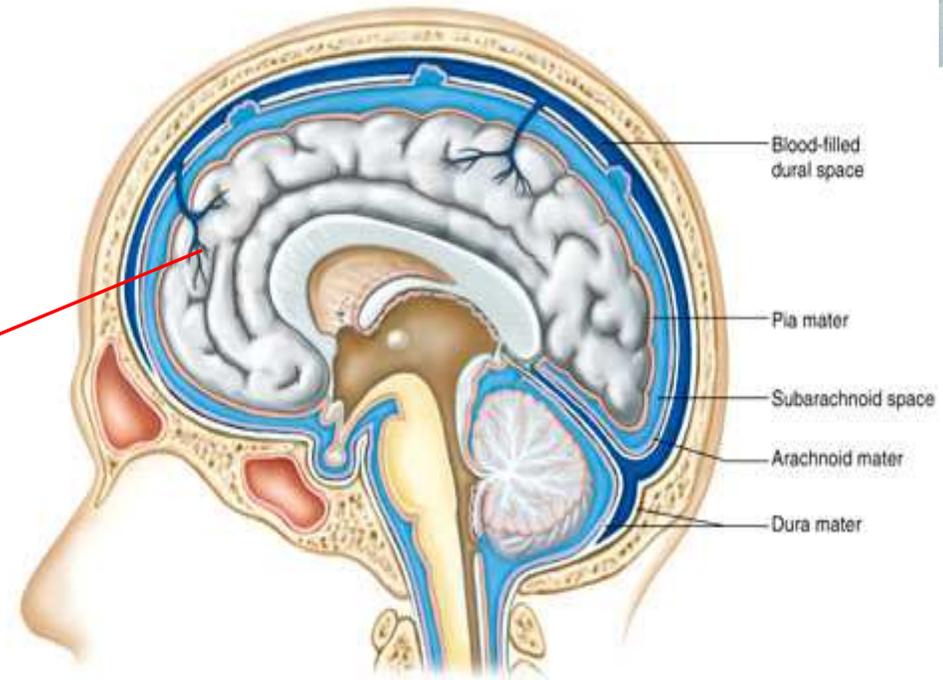
Virus a DNA

Herpesviridae	Adenoviridae	Parvoviridae
<i>HSV</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>B19</i>
<i>VZV</i>		
<i>EBV</i>		
<i>CMV</i>		
<i>HHV6</i>		





Encefalite :
infezione con
interessamento
del parenchima
cerebrale



Infezioni del sistema nervoso centrale: manifestazioni cliniche



Encefalite virale

Virus a RNA

Picornaviridae	Paramyxoviridae	Retroviridae	Arenaviridae	Orthomyxoviridae
<i>Coxsackievirus</i>	<i>V.parotite</i>	<i>HIV1</i>	<i>LCMV</i>	<i>Influenza A</i>
<i>Echovirus</i>	<i>V.morbillo</i>		<i>Lassa virus</i>	<i>Influenza B</i>
<i>Enterovirus</i>				
<i>Poliovirus</i>				
<i>HAV</i>				

Virus a DNA

Herpesviridae	Adenoviridae	Parvoviridae	Papovaviridae
<i>HSV</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>B19</i>	<i>Polioma JC</i>
<i>VZV</i>			
<i>EBV</i>			
<i>CMV</i>			
<i>HHV6</i>			

Arbovirus
 Prevalente
 espressione di
 patogenicità

Arbovirus



Togaviridae
Flaviviridae
Bunyaviridae

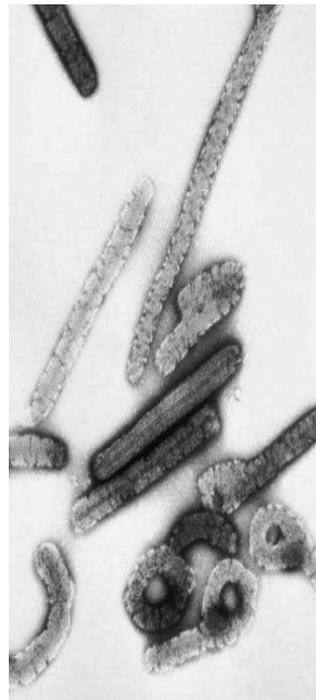
Distribuzione geografica delle principali encefaliti da arbovirus.

EEE, encefalite equina dell'EST; *JE*, encefalite giapponese; *LAC*, encefalite LaCrosse; *MVE*, encefalite Murray Valley; *POW*, encefalite Powassan; *SLE*, encefalite di St. Louis; *TBE*, encefalite trasmessa da zecche; *WEE*, encefalite equina dell'Ovest; *WN*, encefalite West Nile; *VEE*, encefalite equina del Venezuela (modificata da *Centers for Disease Control, Atlanta*)

Oltre 100 virus sono stati associati a infezioni acute del sistema nervoso centrale in tutto il mondo (importanti epidemie di virus "emergenti": virus West Nile, New York 1999; virus Nipah, Malesia 1998-99, Usutu - virus Emilia - Romagna, Agosto - settembre 2009)

West Nile Virus

Gli animali maggiormente recettivi sono:
Uccelli (reservoir)
Cavallo (ospite terminale)
Uomo (ospite terminale)

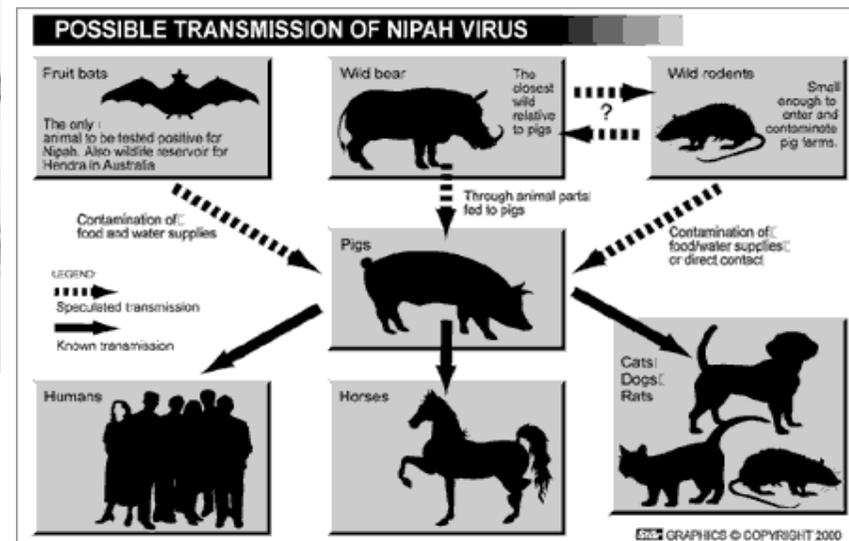
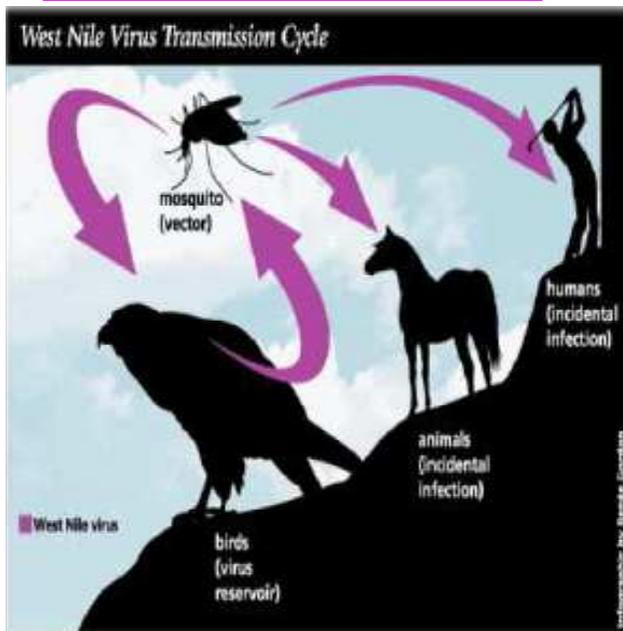


Nipah-virus



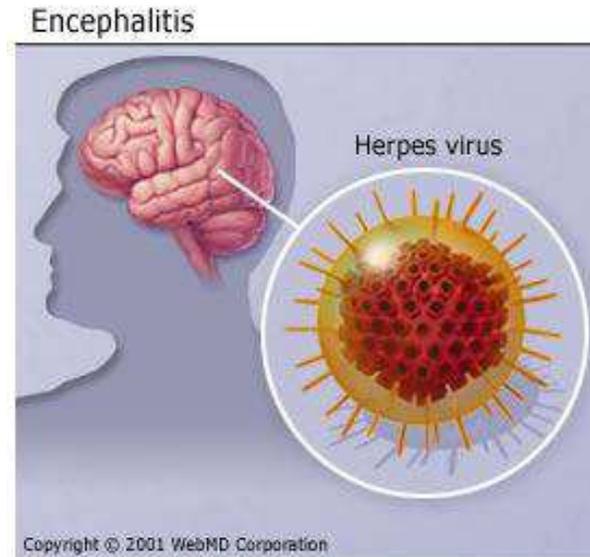
Usutu-Virus

Isolato da varie specie di uccelli migratori (merli, rondini allocchi ecc.), polli (in provincia di Ravenna)



Incidenza media encefaliti virali

150-3000 casi annui



L'encefalite erpetica
è la forma più frequente di encefalite virale nel mondo occidentale



Cause non virali di encefalite

Batteri

Bartonella henselae
Bartonella quintana
Borrelia burgdorferi
Brucella species
Leptospira interrogans
Listeria monocytogenes
Mycobacterium tuberculosis
Mycoplasma pneumoniae
Rickettsia rickettsii
Treponema pallidum

Protozoi

Naegleria fowleri
Acanthamoeba species
Cysticercosis
Echinococcus species
Plasmodium falciparum
Trypanosoma species
Toxoplasma gondii

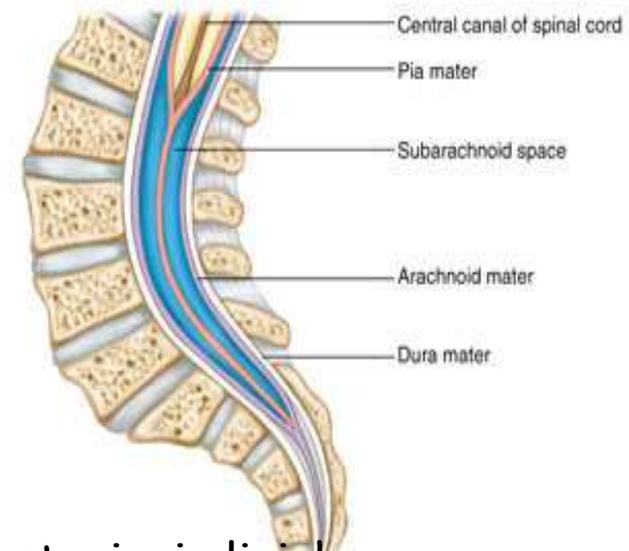
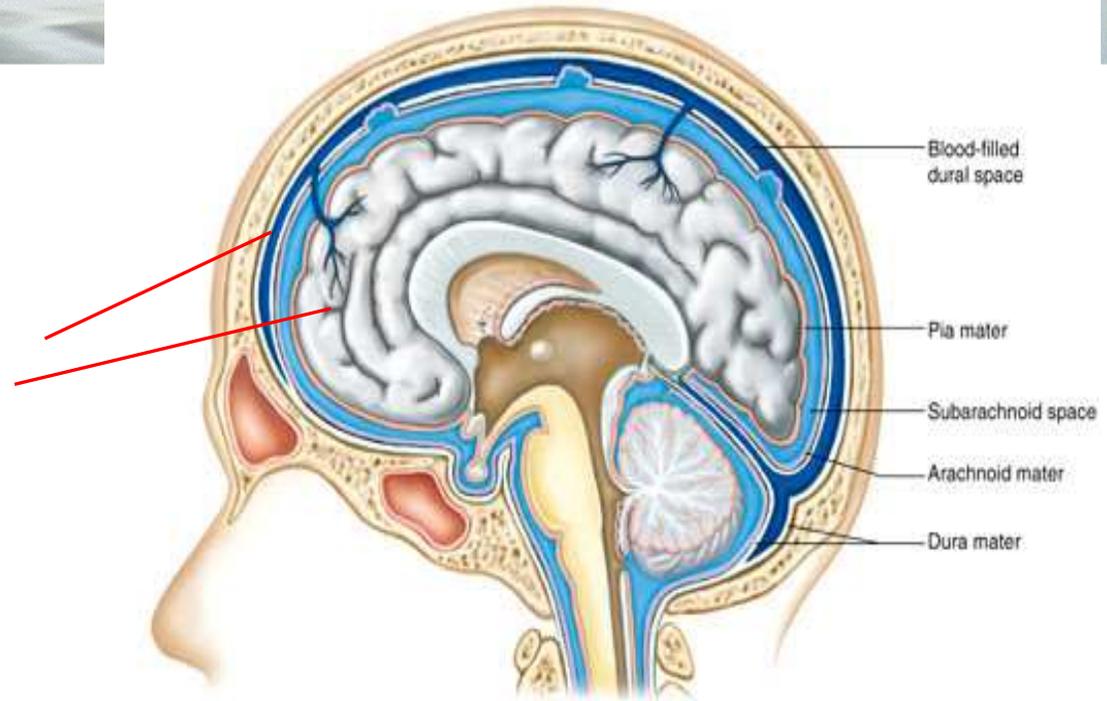
Funghi

Blastomycosis
Coccidioidomycosis
Cryptococcosis
Histoplasmosis

Agenti eziologici di meningite che per estensione dell'infezione danno encefalite o localizzazione encefalica di agenti infettivi responsabili di patologie in altre sedi



Molto spesso il
microrganismo
colpisce
simultaneamente sia
le meningi che il
parenchima
cerebrale:
meningoencefaliti



Infezioni del sistema nervoso centrale: manifestazioni cliniche

Processo infiammatorio di natura infettiva che colpisce il midollo spinale: **mielite**

Virus

HSV, VZV, EBV, CMV

JC virus

Poliovirus

Enterovirus

Parotite

Morbillo

Rosolia

V.influenzali

Coriomeningite linfocitaria

HIV

HTLV I, II

**Agenti
eziologici
di mielite**

**Protozoi
T.gondi
*T.brucei***

Batteri

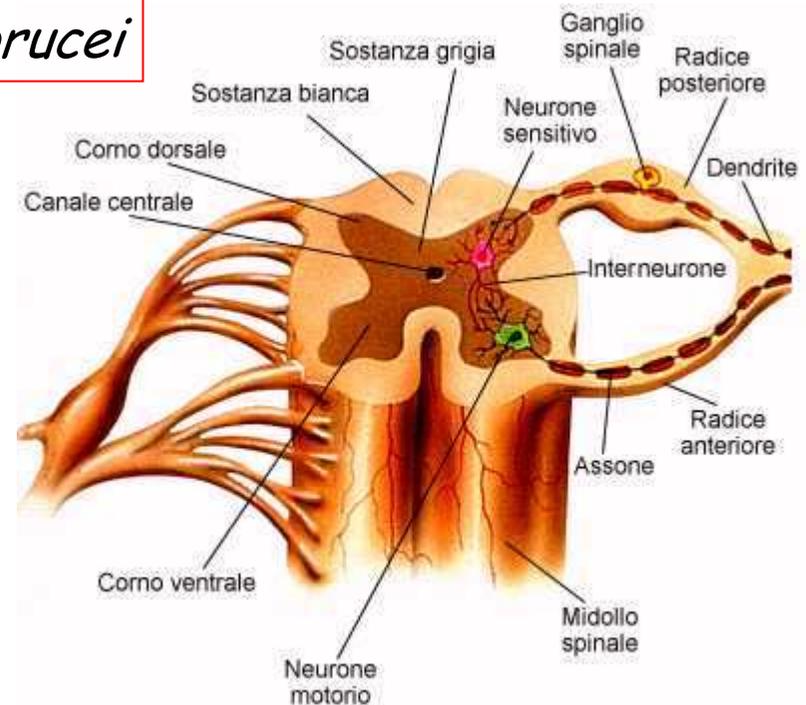
M.tuberculosis

T.pallidum

B. burgdorferi

C.psittaci

M.pneumoniae





Diagnosi di meningite

E' sempre **un'emergenza medica**

- Alto rischio di mortalità
- Elevata morbilità'

se terapia non è adeguata ed instaurata con rapidità



ORIGINAL ARTICLE

Clinical Features and Prognostic Factors in Adults with Bacterial Meningitis

Diederik van de Beek, M.D., Ph.D., Jan de Gans, M.D., Ph.D.,
Lodewijk Spanjaard, M.D., Ph.D., Martijn Weisfelt, M.D.,
Johannes B. Reitsma, M.D., Ph.D., and Marinus Vermeulen, M.D., Ph.D.



Il **liquor** si accetta **24 ore su 24**

- deve essere inviato immediatamente
- deve essere esaminato nel minor tempo possibile

Livello di emergenza è in rapporto alla cellularità: il liquor è ipotonico e gli eritrociti e i leucociti potrebbero lisarsi

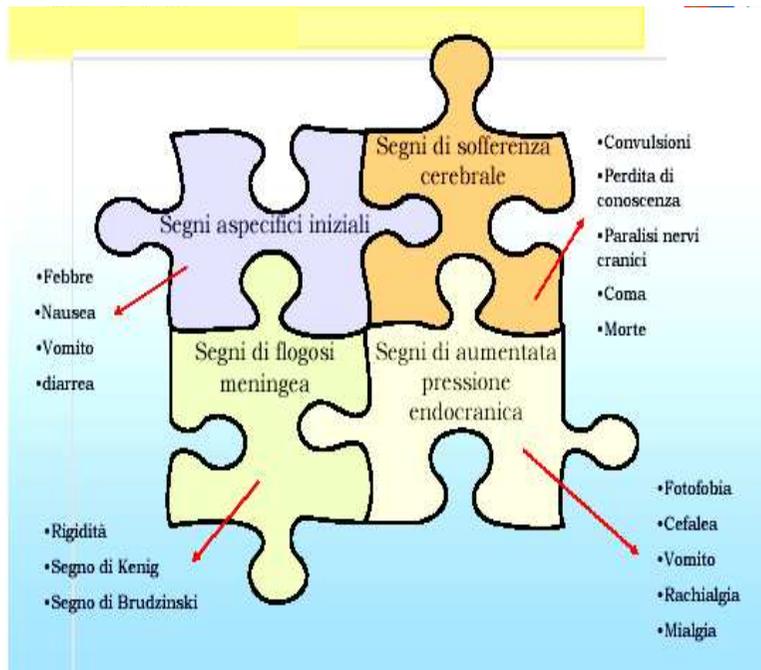
-Conta degli elementi figurati diminuisce:-del 30% dopo 1 ora-del 50% dopo 24 ore



Rapidità della diagnosi di meningite e prognosi del paziente

Meningite batterica

Gravi postumi (ritardo mentale, cecità, sordità)

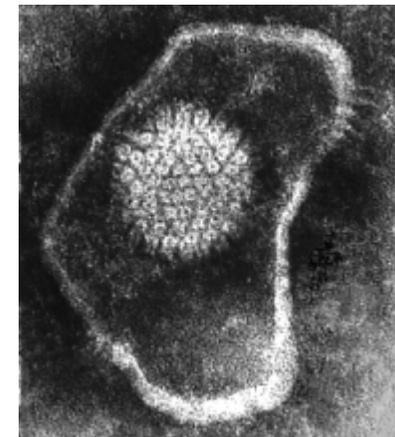
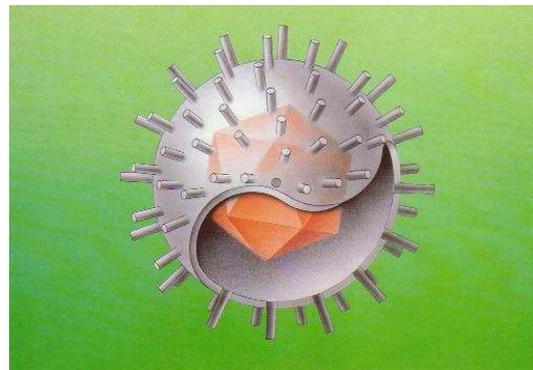


Meningite virale

Decorso acuto con risoluzione

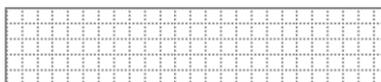
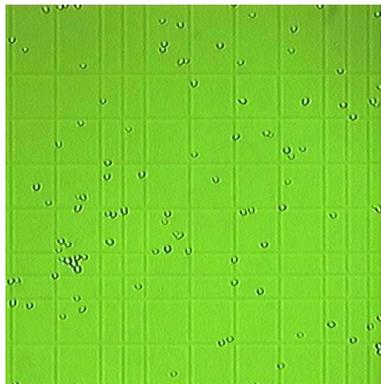
In genere a liquor limpido

Importante la diagnosi differenziale



La diagnosi di laboratorio effettuata su LCR prevede:

- esame chimico-fisico
- esame microbiologico
- esame biochimico
- Indagini di supporto
(emoculture, esami sierologici, etc)



esame chimico-fisico

Liquor
Limpido e incolore → *Valori normali*
Proteine: < 45 mg/dl
Glucosio: 40-80 mg/dl (60% della glicemia)
Cellule: 0-5 leucociti/mm³ (linfociti)

MENINGITE BATTERICA

Liquor torbido
Proteine: >220 mg/dl
Glucosio: <34 mg/dl
Cellule: 1000-5000
leucociti/mm³ (neutrofili >80%)

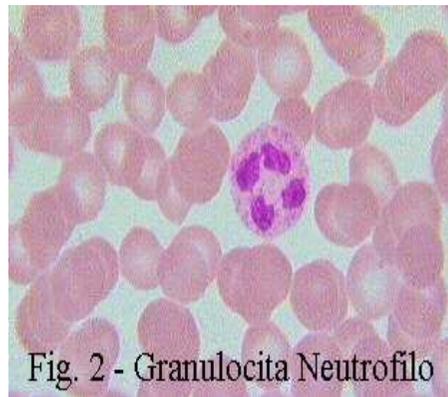
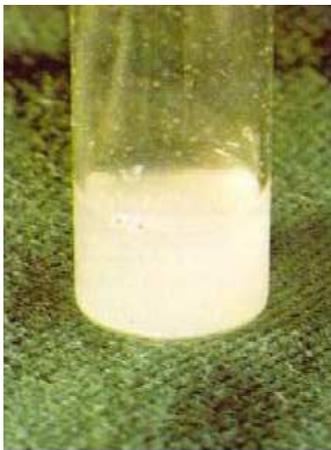


Fig. 2 - Granulocita Neutrofilo

MENINGITE VIRALE

Liquor limpido
Proteine: <150 mg/dl
Glucosio: 40-80 mg/dl
Cellule: 100-1000
leucociti/mm³ (linfociti)

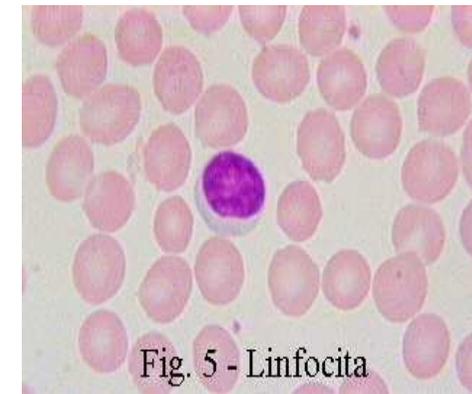
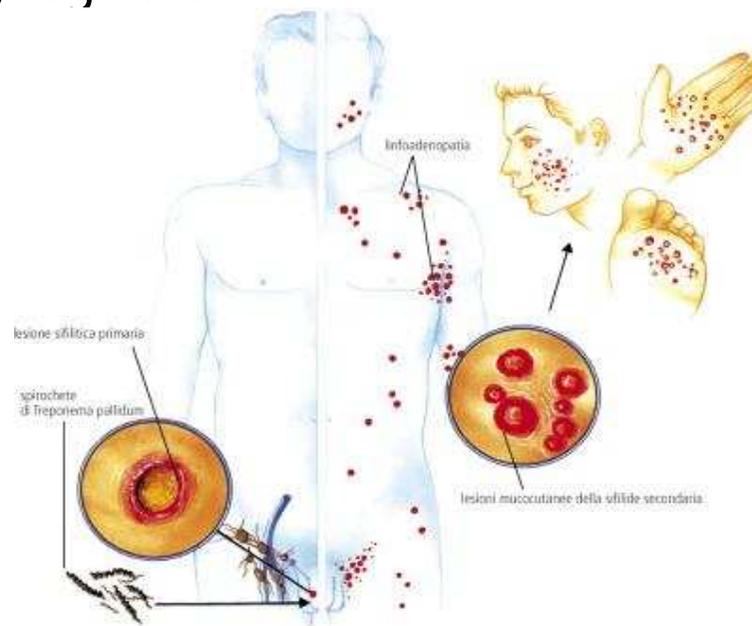
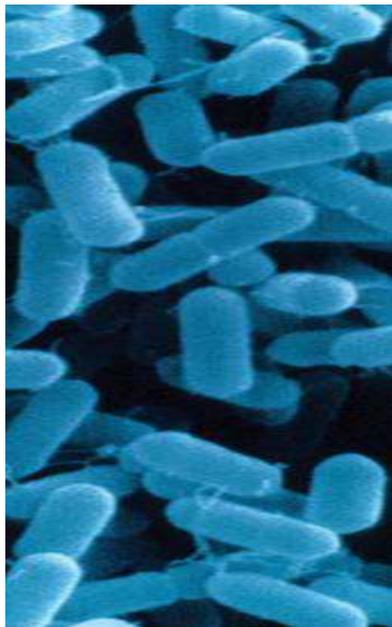


Fig. 5 - Linfocita

esame chimico-fisico

Nota

Pleiocitosi linfocitaria anche nelle meningiti:
da *Mycobacterium*
da *Borrelia burgdorferi*
da *Treponema pallidum*
da *Listeria monocytogenes*



PMN anche all'inizio di una meningite virale (5-15 cellule / μ l)

esame microbiologico

ESAME MICROSCOPICO

Preparazione di vetrini dopo centrifugazione per concentrare la parte corpuscolata (cellule, batteri)

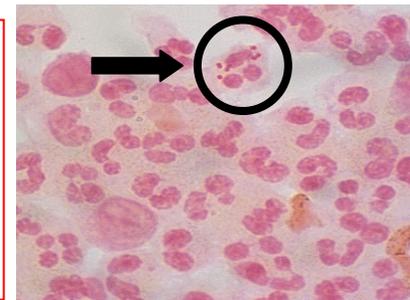
COLORAZIONI

Gram
Blu di metilene
Arancio di acridina
Grunwald-giemsa



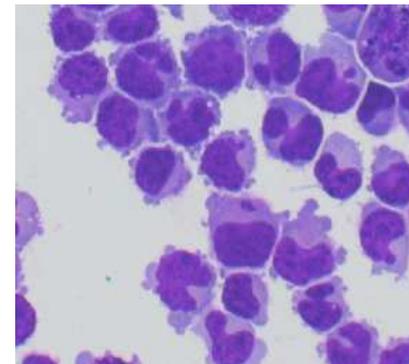
MENINGITE BATTERICA

dopo colorazione di Gram:
positivo nel 75% dei pazienti
non trattati



MENINGITE VIRALE

dopo colorazione di Gram:
negativo



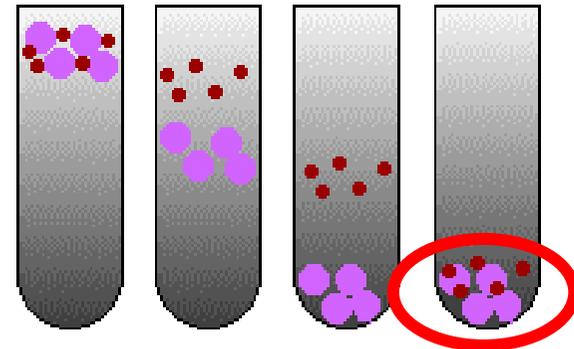
esame microbiologico

ESAME COLTURALE

Il campione viene centrifugato per 10 minuti a 2000 rpm e il sedimento è seminato su terreni selettivi e differenziali

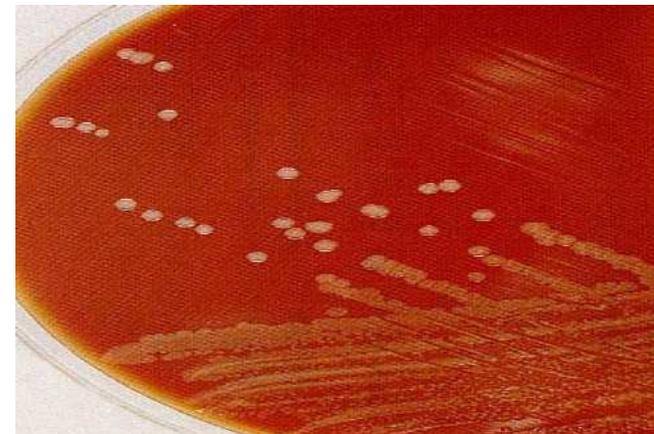
MENINGITE BATTERICA

Coltura del liquor: positiva
nel 70-80% dei pazienti non trattati.
N.B.: emocoltura positiva nel 40-60% dei casi



MENINGITE VIRALE

Coltura del liquor su terreni per batteriologia: negativa
(ovviamente!)
Emocoltura: negativa
Colture cellulari e ricerca di antigeni virali: spesso positiva



RICERCA DI ANTIGENI BATTERICI NEL LIQUOR

S. agalactiae

H. influenzae tipo b

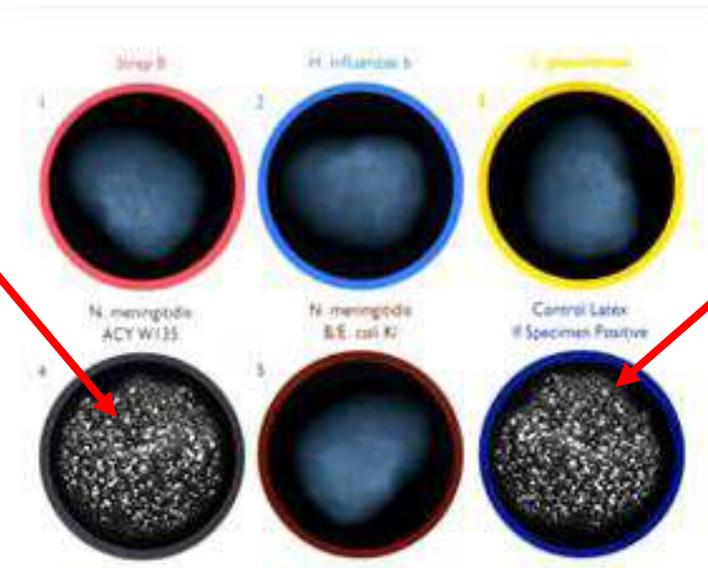
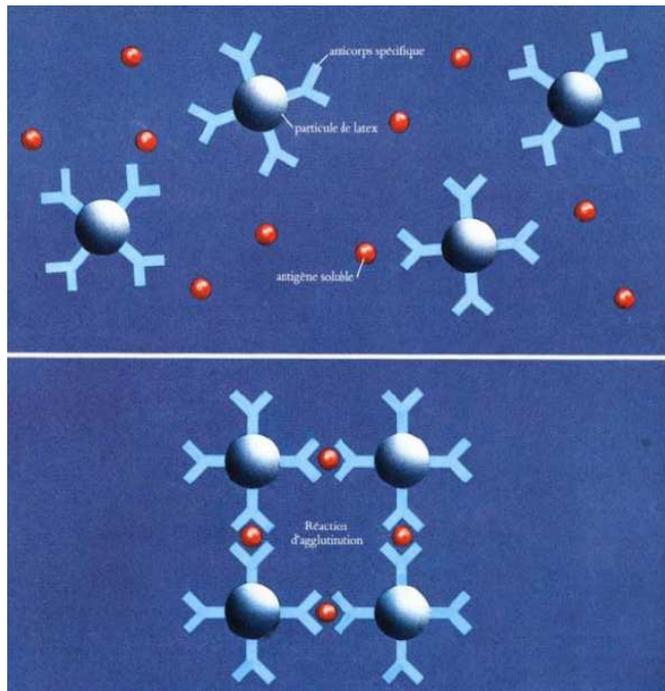
S. pneumoniae

N. meningitidis ACY W135

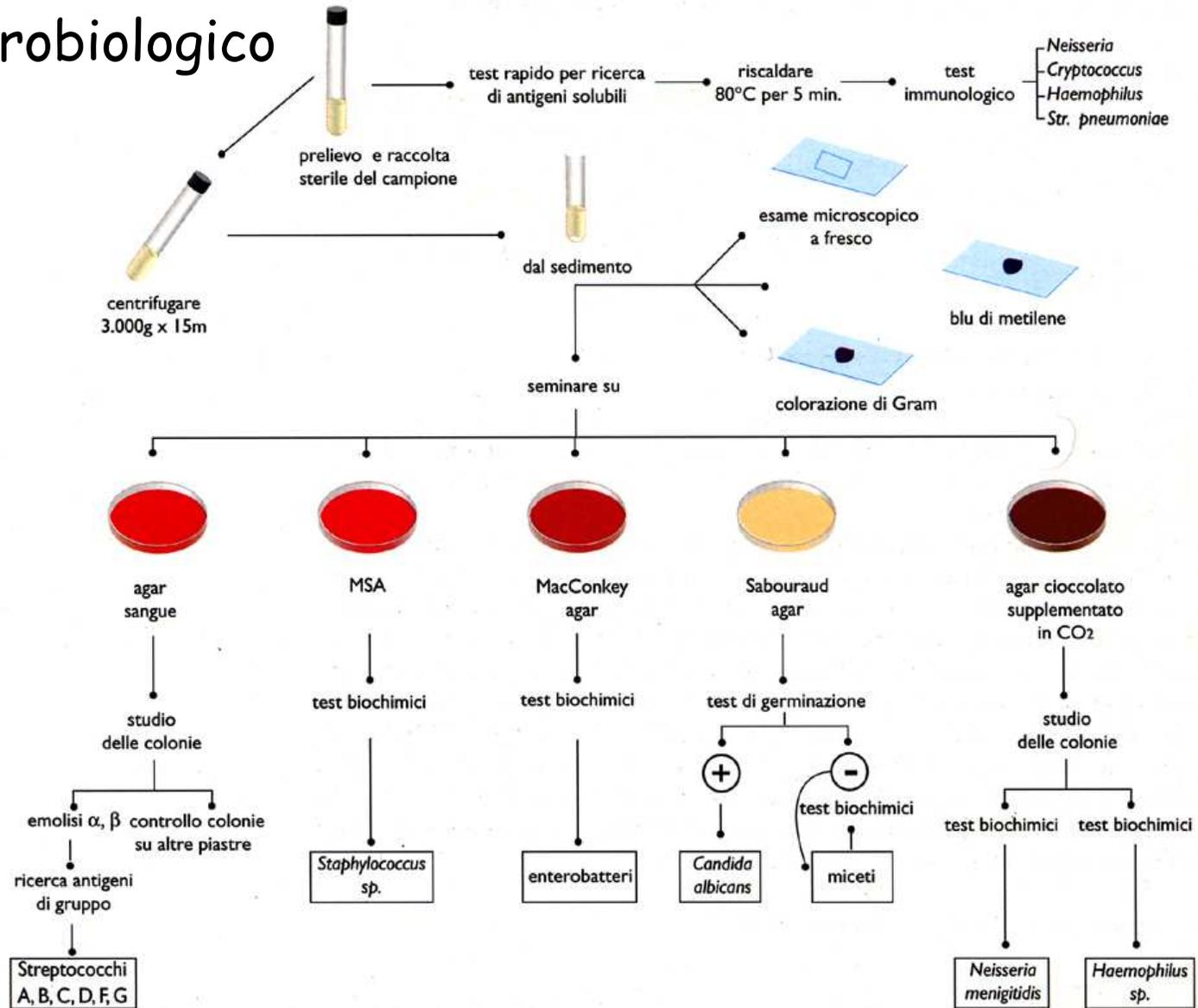
N. meningitidis B / *E. coli* K1



Anticorpi coniugati
con lattice verso antigeni
batterici:
l'agglutinazione indica un
risultato positivo



esame microbiologico



Condizioni richieste per ottenere un corretto risultato di un esame colturale o di biologia molecolare



Coltura

Germe vivo

Non terapia antibiotica
precedente

Terreni di coltura adeguati

Trasporto rapido (poche ore)

Laboratorio microbiologia

Tecnica molecolare (PCR)

Germe anche morto

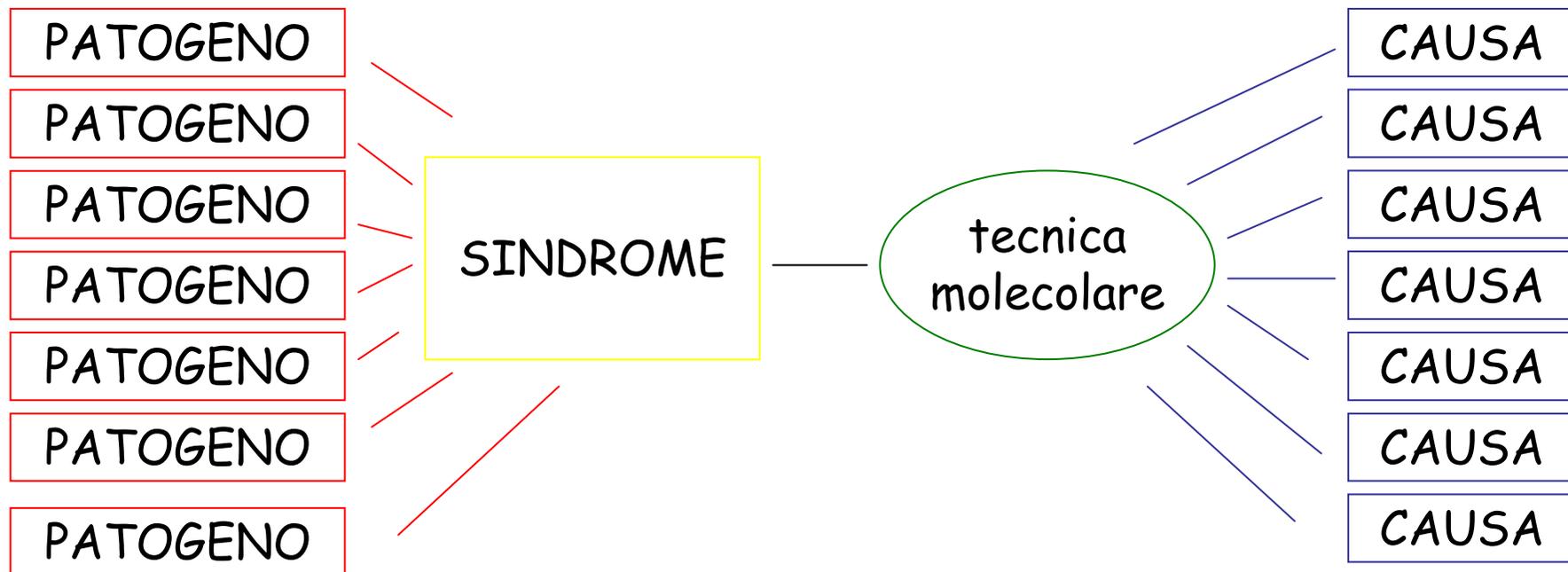
OK se terapia antibiotica
precedente

Anche in fisiologica

A t.a. anche 72 h

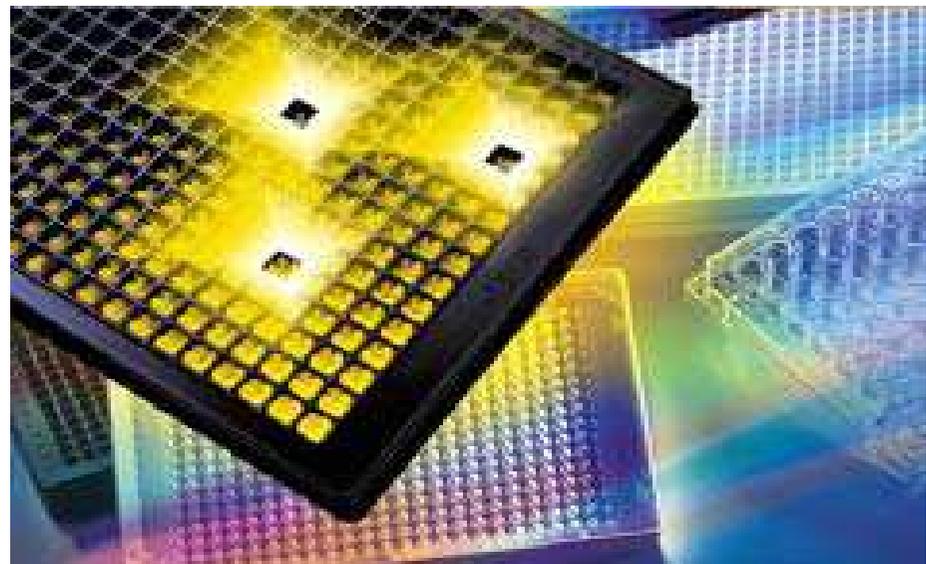
Metodologie semplici

Le tecniche molecolari



**Più patogeni danno la stessa sindrome clinica,
1 sola tecnica molecolare per la causa reale**

Cosa chiediamo noi ai metodi molecolari ?





Velocità



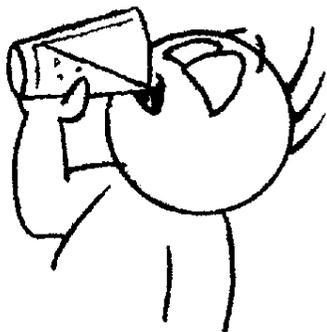
Capacità multiple



Specificità



Sensibilità



Costo contenuto

Semplicità di esecuzione



Affidabilità

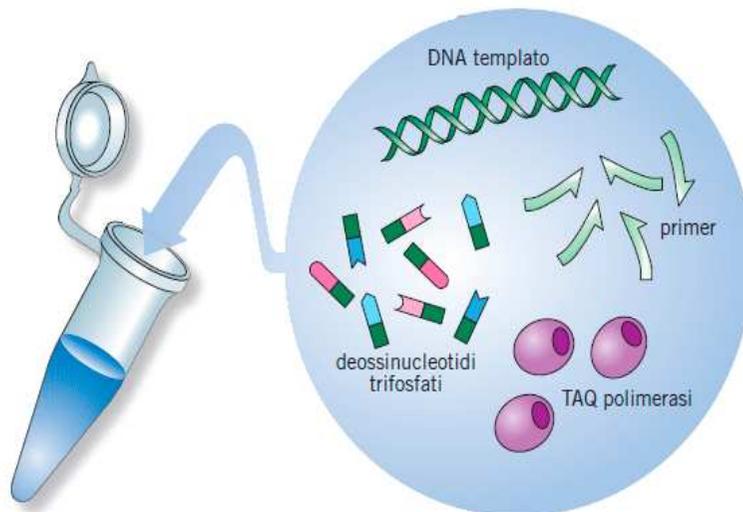
Tecniche molecolari

test molecolari fondamentali per la diagnosi

richiesta "a tappeto" è
finanziariamente
onerosa e
produce, di solito,
risultati negativi



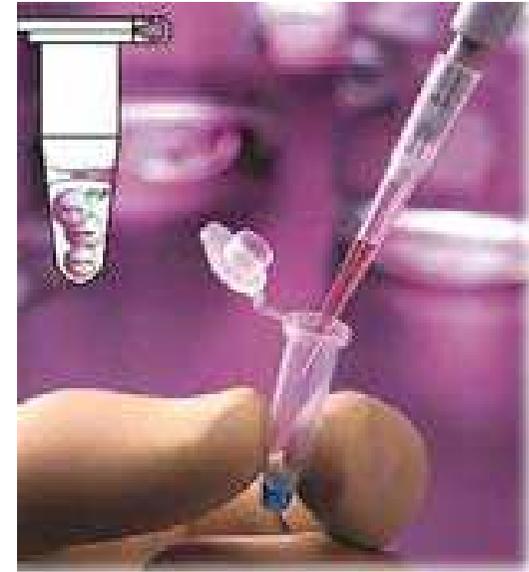
clinico e laboratorista
interagiscono per
formulare
ipotesi diagnostiche
che orientino le
richieste



Quando la PCR può essere utile ?

Con LIQUOR

- Aspetto: limpido
- Colore: incolore
- Lieve e moderata pleiocitosi: 5-200 globuli bianchi/ mm³
- Prevalenza di PMN o numero di PMN < 100 (pannello batterico e virale)
- PMN > 100 pannello batterico (prima) e pannello virale o altro (successivamente) in base al sospetto diagnostico
- Prevalenza linfociti (pannello virale)



Quali agenti infettivi ricercare e perché?

PANNELLO ADULTI

- *Neisseria meningitidis* (A, B, C, X, Y, W135)
- *Streptococcus pneumoniae* (tutti i 90 sierotipi)
- *Haemophilus influenzae* (sierotipi b e c)

75-80% di tutte le meningiti batteriche

Meningite batterica

- **Adenovirus**: necessità clinica di diagnostica differenziale
- **B-globina**: controllo di estrazione e assenza di inibitori dell'amplificazione

Klebsiella pneumoniae

• *Escherichia Coli*

• *Streptococcus agalactiae*

• *Listeria monocytogenes*

• B-globina

90% delle meningiti batteriche dei lattanti

PANNELLO LATTANTI



Meningite virale

PANNELLO

Enterovirus appartenenti ai seguenti sierotipi:

- Enterovirus A:** Coxsackievirus A4, A6, A7, A8, A10, A14, A16, A16V, Enterovirus 71, 76.
- Enterovirus B:** Coxsackievirus A9, B1, B2, B3, B4, B5, B6, Echovirus da 1 a 7, 9, da 11 a 21, da 24 a 27, da 29 a 33, Enterovirus 69, 74, 75, 77, 78, 93.
- Enterovirus C:** Coxsackievirus A11, A13, A17, A20, A21, A24, A24V, Poliovirus 1,2,3
- Enterovirus D:** Enterovirus 68, 70, 94

Herpes simplex 1 (4%)

Herpes simplex 2 (31%)

Varicella Zoster (11%)

EBV

CMV

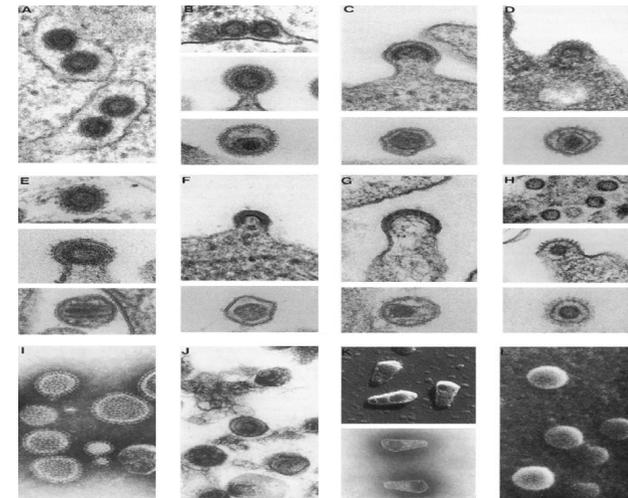
HHV-6

HHV-7

HHV-8

46% di tutte le meningiti virali

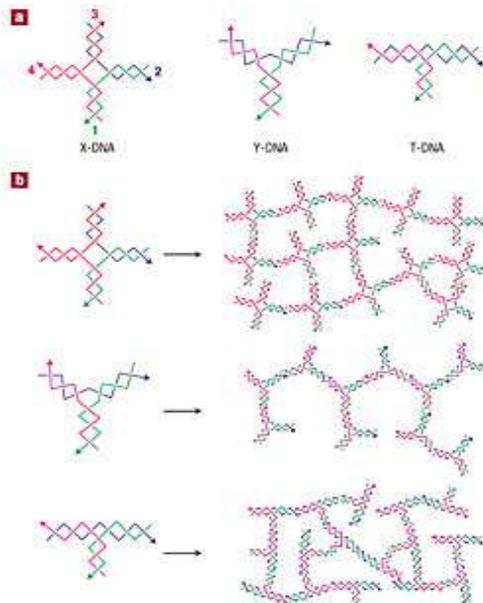
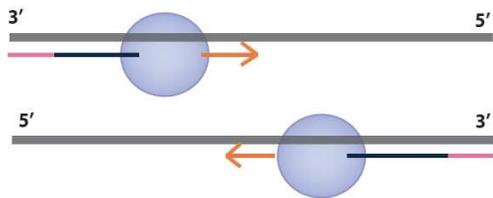
92% di tutte le meningiti virali



Quale metodo di PCR ?

Multiplex PCR

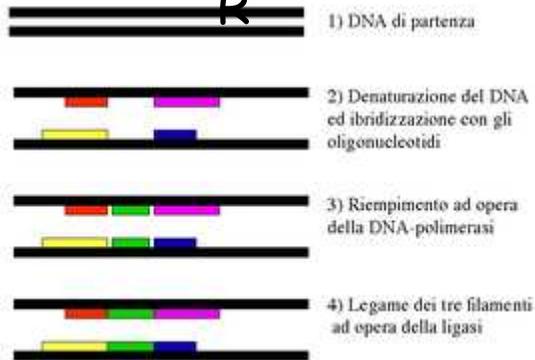
Uniplex and Multiplex PCR



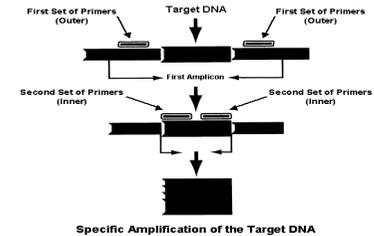
PCR Real-time

LC

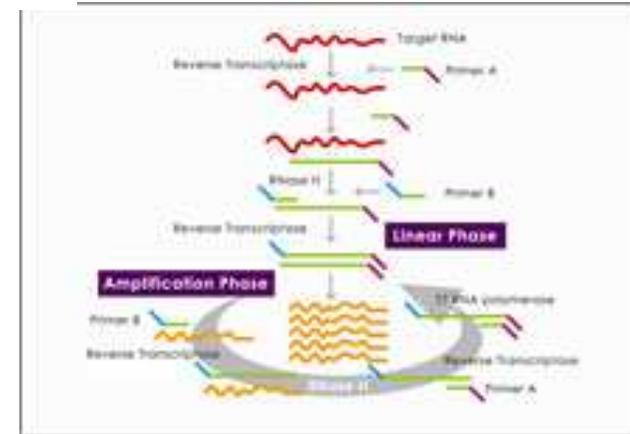
R



PCR nested



Branched DNA



NASBA (Nucleic Acid Sequence Base Amplification)

PCR REAL TIME

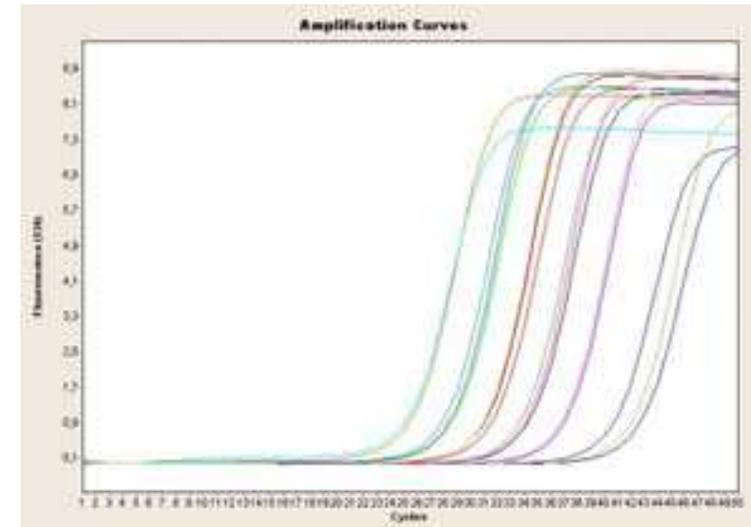
Metodi di PCR Real-time

permettono di identificare e/o quantificare il genoma di tutti i virus riportati (con i relativi sierotipi) in più matrici biologiche:

- liquor
- sangue intero
- plasma, etc

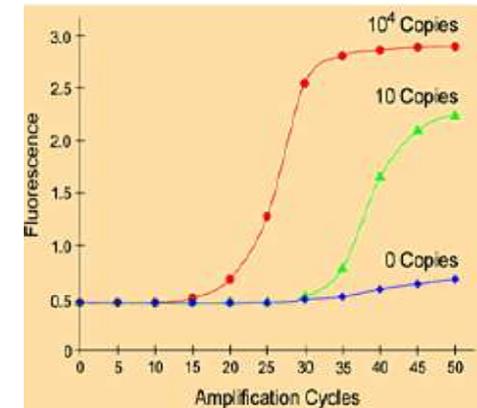
utilizzano uno stesso profilo termico permettendo di amplificare più genomi virali contemporaneamente con:

- riduzione dei tempi di esecuzione
- aumento della sensibilità (> 99%) e specificità alta (> 99%)

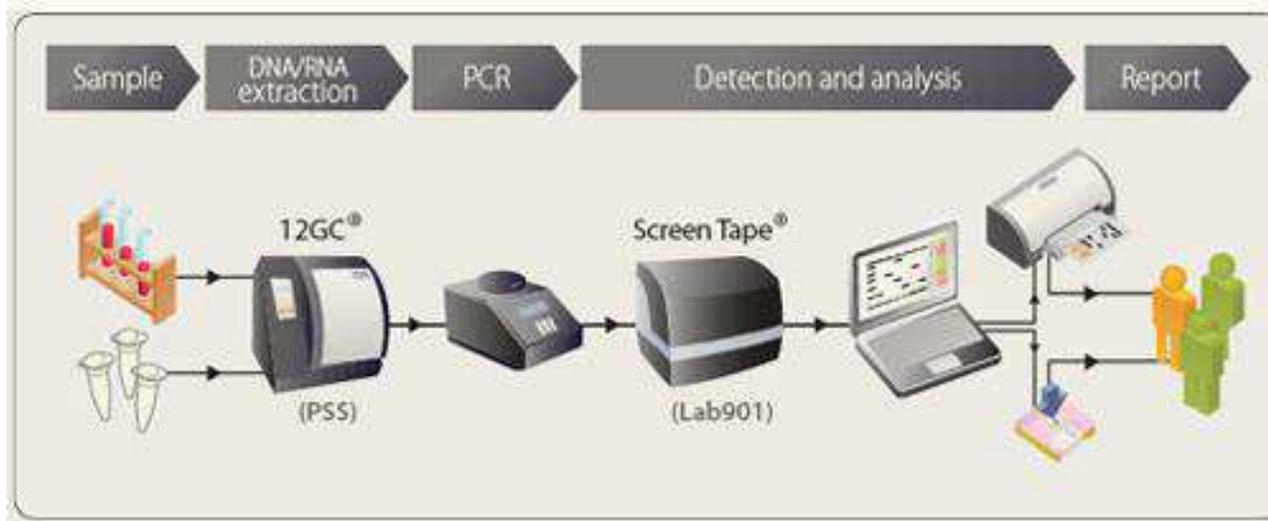


La real time PCR

- alla valutazione qualitativa (PCR semplice), la real time PCR aggiunge una **valutazione quantitativa**, fondamentale per discriminare positività a basso titolo senza significato clinico da positività ad alto titolo correlate a infezione produttiva
- la determinazione quantitativa del virus nel liquor è importante in quanto fornisce:
 - in fase iniziale, un parametro indiretto dell'estensione lesionale
 - in corso di malattia, indicazioni sulla prognosi e sull'efficacia della terapia (monitoraggio clinico-terapeutico)



Multiplex PCR for automatic Detection



TAT 5 ore,
applicabile su
campioni di sangue,
materiale
periodontale, liquido
articolare, liquor,
sputo e altri liquidi
biologici

Pathogen List of Seeplex[®] Meningitis ACE Detection

Virus panel

[6 DNA Viruses]

HSV1
HSV2
VZV (HHV3)
EBV (HHV4)
CMV (HHV5)
HHV6

[RNA Virus]

Enteroviruses
- Poliovirus
- Echovirus
- Coxsackievirus

Bacteria panel

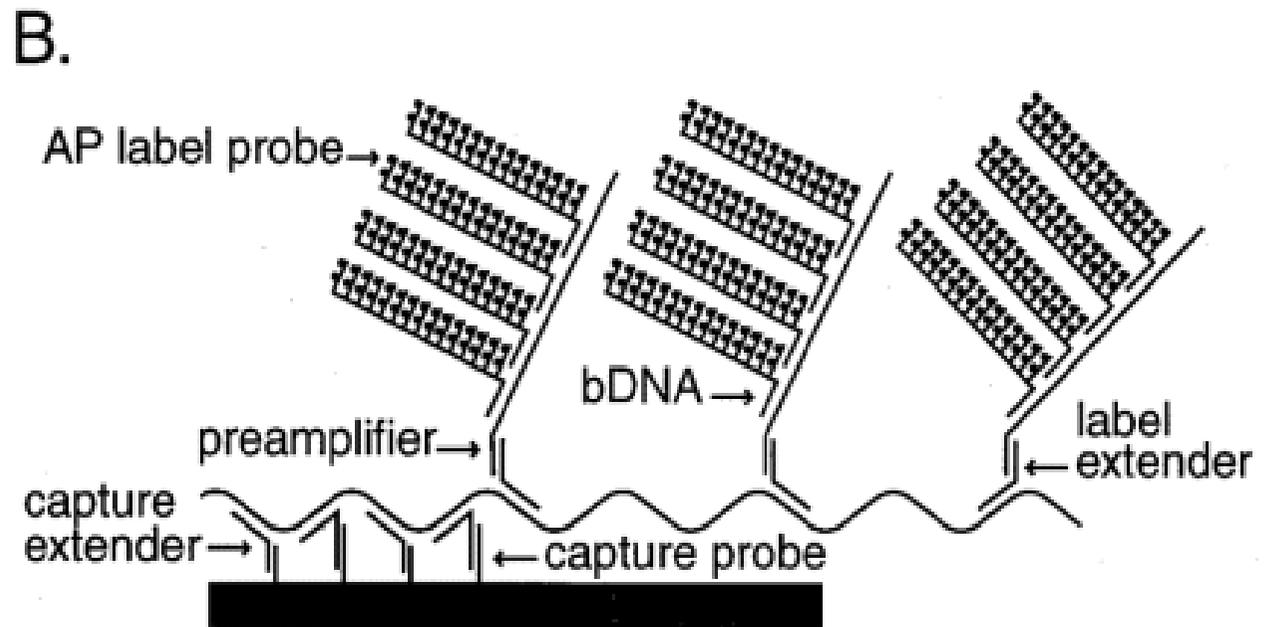
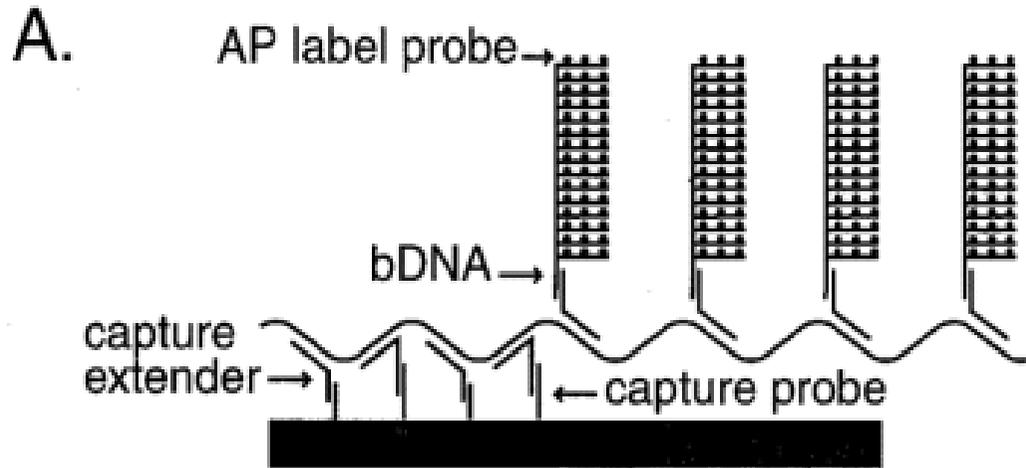
[5 Bacteria]

Streptococcus pneumoniae
Neisseria meningitidis
Haemophilus influenzae type b
Listeria monocytogenes
Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*)

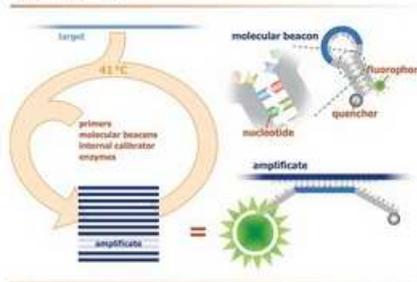
Metodo quantitativo che utilizza speciali sonde chemiluminescenti che si legano specificatamente alla sequenza di acido nucleico da identificare creando una struttura ramificata "branched DNA"(bDNA).

Branched DNA

Il segnale ottenuto alla fine della reazione è proporzionale alla quantità di bersaglio presente nel campione.

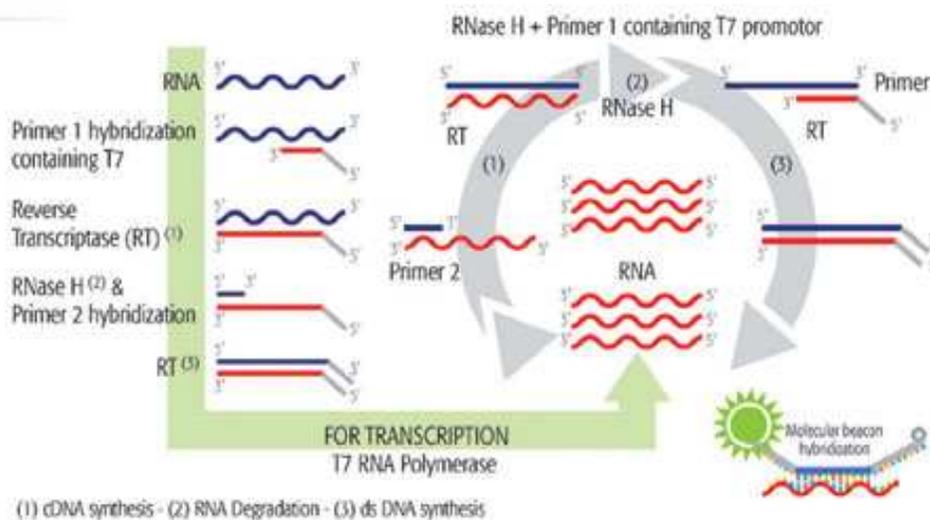


REAL-TIME NASBA



NASBA: da RNA a DNA e di nuovo a RNA

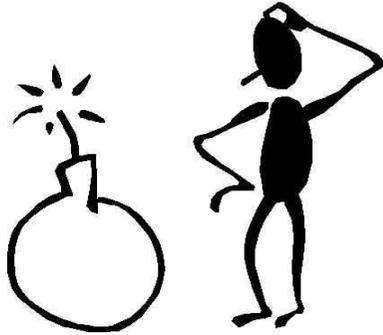
Utilizzando:
3 enzimi(RNA polimerasi T7, RT, RNase H) e **2 primer** specifici consente l'amplificazione sia di RNA sia di DNA in maniera esponenziale.



Il prodotto della reazione NASBA è un RNA a singolo filamento, che rappresenta 10^6 - 10^9 volte la sequenza bersaglio, sembra fornire maggiori garanzie di specificità.

La tecnica si pone come alternativa al metodo **RT-PCR** in molte occasioni, specie quando la sequenza di partenza è di RNA. Rispetto alla PCR, il NASBA permette:

- Maggiore efficacia di amplificazione di RNA in una miscela ricca di DNA
- Condizioni di lavoro isoterme (di solito 41°C)
- Maggiore rapidità dei test
- Rivelazioni di minori quantità di acido nucleico



Problemi

Rischio di generare **falsi positivi** per "carry-over" (contaminazione con prodotti delle amplificazioni precedenti). Misure precauzionali (mantenimento della sterilità dell'ambiente e dei reagenti) e analisi dei controlli negativi in parallelo ai campioni clinici e analisi dei campioni in doppio

Rischio di generare **falsi negativi** (elevata specificità) per inibitori della reazione di amplificazione. Molecole standard a concentrazione nota misurano la quantità di acido nucleico (rappresentano il riferimento) e controllano l'efficienza di amplificazione

Conclusioni-1

- Per la ricerca su liquor dei virus HSV1/2 (evita la biopsia cerebrale), HHV6, EBV, CMV, Adenovirus la PCR è il "gold-standard" e per gli Enterovirus e ParvovirusB19 è l'unica tecnica disponibile
- L'introduzione di tecniche PCR nella gestione della diagnosi su liquor in urgenza/routine permette la differenziazione fra meningite batterica e virale in poco tempo con una sensibilità del 99%, maggiore rispetto al metodo colturale e batterioscopico



Sensibilità PCR: > 99%
Esame colturale: 80%
Batterioscopico Gram : 50-80%





Conclusioni-2

- I metodi molecolari risultano essere particolarmente efficaci:
In pazienti che abbiano ricevuto la terapia antibiotica (rilevazione anche di germi non vivi)
Anche con piccole quantità di agente patogeno
Già nelle prime fasi dell'infezione (la risposta anticorpale specifica a livello intratecale è utile solo nelle fasi più avanzate)
- I metodi molecolari sono di ausilio:
in sindromi neurologiche di origine incerta (meningite di Mollaret)
per riconoscere forme poco note (ventricolo-encefaliti da CMV)
per identificare nuovi virus responsabili di infezioni del SNC (*Hendra e Nipah virus, Usutu virus*)

Conclusioni-3

- I metodi molecolari aumentano l'efficacia della diagnostica delle meningiti aumentando la **sensibilità** e diminuendo il tempo di risposta (**rapidità**)
(importante per una precoce profilassi (*N.meningitidis*) ed una terapia adeguata per una migliore prognosi)

Rimangono tutte le indagini eseguite fino ad oggi in urgenza per la diagnosi di meningite:

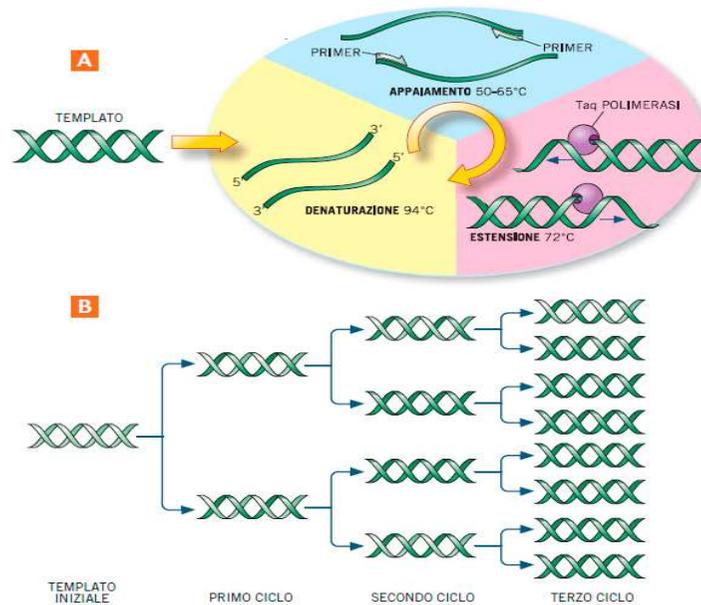
- Batterioscopico Gram,
- Esame colturale,
- Estrazione degli antigeni solubili

Tecniche molecolari

Identificazione

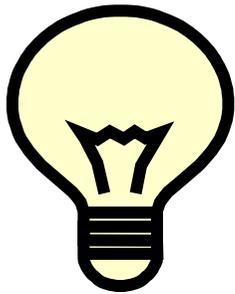
Tipizzazione

Quantificazione

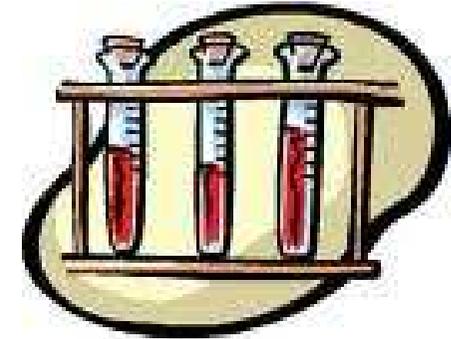


Referto rapido in 1,5 - 6 ore





Situazione ideale diagnosi su liquor



Liquor raccolto in 3 provette sterili di polipropilene sequenziali

- Prima provetta (2ml): conta cellulare ed esame biochimico
- Seconda provetta (2ml): per esami microbiologici
- Terza provetta (2ml): aliquota per PCR (400-800 μ l) e aliquota per la conservazione

Due emocolture (tempo 0 e tempo 15-30)

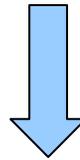
positività: 75% nei soggetti con meningite batterica non trattata

positività: 56% nei soggetti con meningite dopo inizio trattamento antibiotico

LCR Quantità: almeno 3 ml, in più provette - Trasporto: non refrigerato ed entro 2 ore



cellularità >2000/mmc
PMN >1200/mmc
Proteine aumentate-Glucosio basso



Microscopia
Ricerca antigeni
Coltura:
AS, AC 37°C in CO₂, TSB, BHI

Richiedere emocolture in tutti i casi

CONSERVARE IL CAMPIONE a -80°C

LCR Quantità: almeno 3 ml, in più provette - Trasporto: non refrigerato ed entro 2 ore



IMMUNOCOMPETENTE

Microscopia
Coltura:
AS, AC 37°C
in CO₂,
TSB, BHI

Coltura in
terreno
liquido per
Micobatteri

PCR EV, HSV, VZV
• Se PCR HSV
NEGATIVA
ripetere LCR dopo
3-7 gg se
clinica sospetta
per encefalite
erpetica
Indagini
sierologiche

cellularità >5~500/mmc
Linfomonocitaria o PMN
Proteine aumentate
Glucosio normale o basso

IMMUNOCOMPROMESSO

Come
IMMUNOCOMPETENTE
+
PCR LCR per CMV, JCV

SE VIAGGIATORE ESTERO o STAGIONALITA'

Come
IMMUNOCOMPETENTE
+
PCR LCR
Arbovirus, West Nile,
TOSV, TBE o altro in base
all'epidemiologia della zona e
sierodiagnosi sp.

SE EPIDEMIA o CLINICA POS

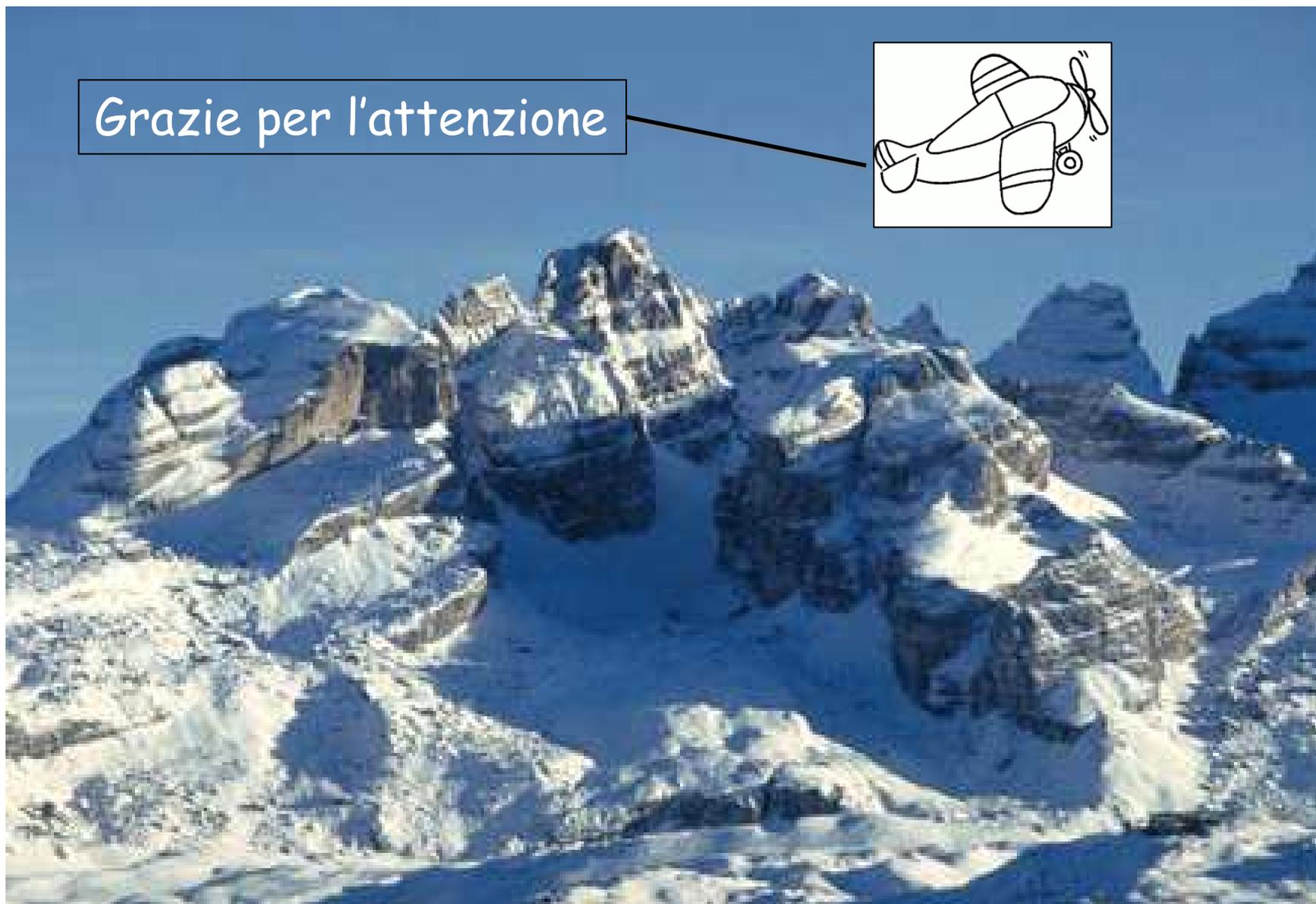
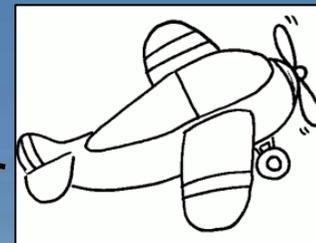
Sierodiagnosi specifiche
e/o PCR LCR:
Parotite, Influenza,
morbillo, rosolia o altro

CONSERVARE IL CAMPIONE a -80°C



**In medicina le regole possono essere assolute, ma le
conseguenze sono variabili**
Aulo Cornelio Celso (25 a.C. -50 d.C.)

Grazie per l'attenzione



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: COLLINI_Le

STACK:

```
(9)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20110128104546+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20110128104546+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```