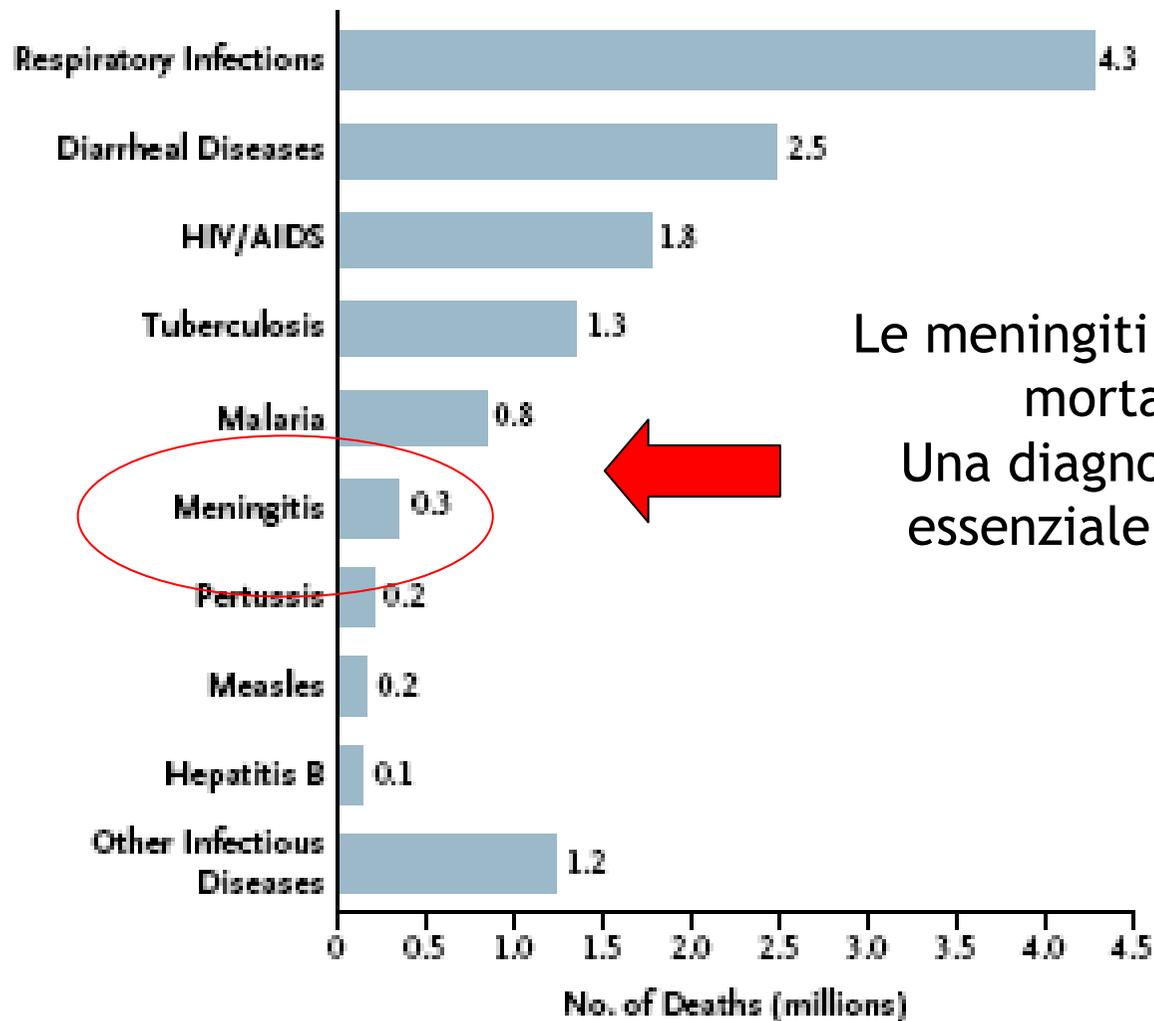


Cause principali di morte nel mondo per malattie infettive



Le meningiti restano ancora causa di mortalità e morbidità.
Una diagnosi rapida e accurata è essenziale per un buon *outcome*

n engl j med 366;5 nejm.org february 2, 2012 (dati WHO)

La meningite batterica rappresenta circa 1,2 milioni di casi ed è responsabile di circa 135.000 morti in tutto il mondo ogni anno. La meningite è tra le dieci più comuni cause infettive di morte. Sequele neurologiche sono gravi e piuttosto frequenti tra i sopravvissuti.

E' sempre **un'emergenza medica**

- Alto rischio di mortalità
- Elevata morbilità

se terapia non è adeguata ed instaurata con rapidità



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

La rachicentesi



L'esame del liquor è di fondamentale importanza per la diagnosi di tutte le forme di meningite



Spesso è difficile distinguere tra meningite batterica e virale

	Bacterial meningitis	Viral meningitis
White blood cell count (cells per μ L)	1000-10 000 Range <100 to >10 000	<300 Range <100-1000
Neutrophils	>80%	<20%
Protein levels	Elevated	Normal
Glucose levels	Reduced	Normal

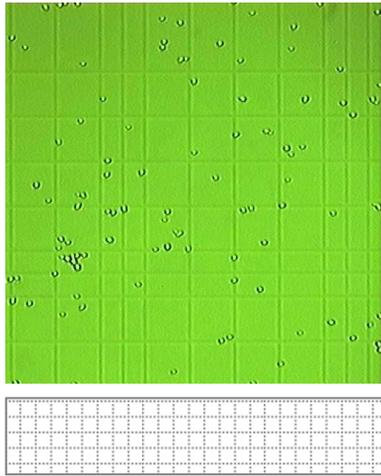
Nelle fasi precoci della meningite batterica e virale, i segni e i sintomi clinici sono spesso aspecifici



Tipici parametri all'esame del liquido cerebrospinale in pazienti con meningite batterica

Patogeno	Leucociti/mL ($\times 10^9$ /L)	Percentuale di neutrofili	Livelli di glucosio	Livelli di proteine, mg/dL (g/L)	Probabilità di riscontrare il microorganismo con la colorazione con metodo di Gram
Piogeni (no <i>Listeria monocytogenes</i>)	>500 (0,50)	>80	Bassi	>100 (1,00)	Circa 70%
<i>L. monocytogenes</i>	>100 (0,10)	Circa 50	Normali	>50 (0,50)	Circa 30%
Infezione da piogeni parzialmente trattata	>100	Circa 50	Normali	>70 (0,70)	Circa 60%
Meningite asettica, spesso virale	10-1000 (0,01-1,00)	Fase precoce: >50. Fase tardiva: <20	Normali	<200 (2,00)	Non si applica
Tubercolare	50 (0,05) – 500	<30	Bassi	>100	Rara
Fungina	50-500	<30	Bassi	Variabili	Spesso elevata per infezioni da criptococco

DIAGNOSTICA TRADIZIONALE di laboratorio su LCR prevede:



Esame chimico-fisico



Esame microbiologico

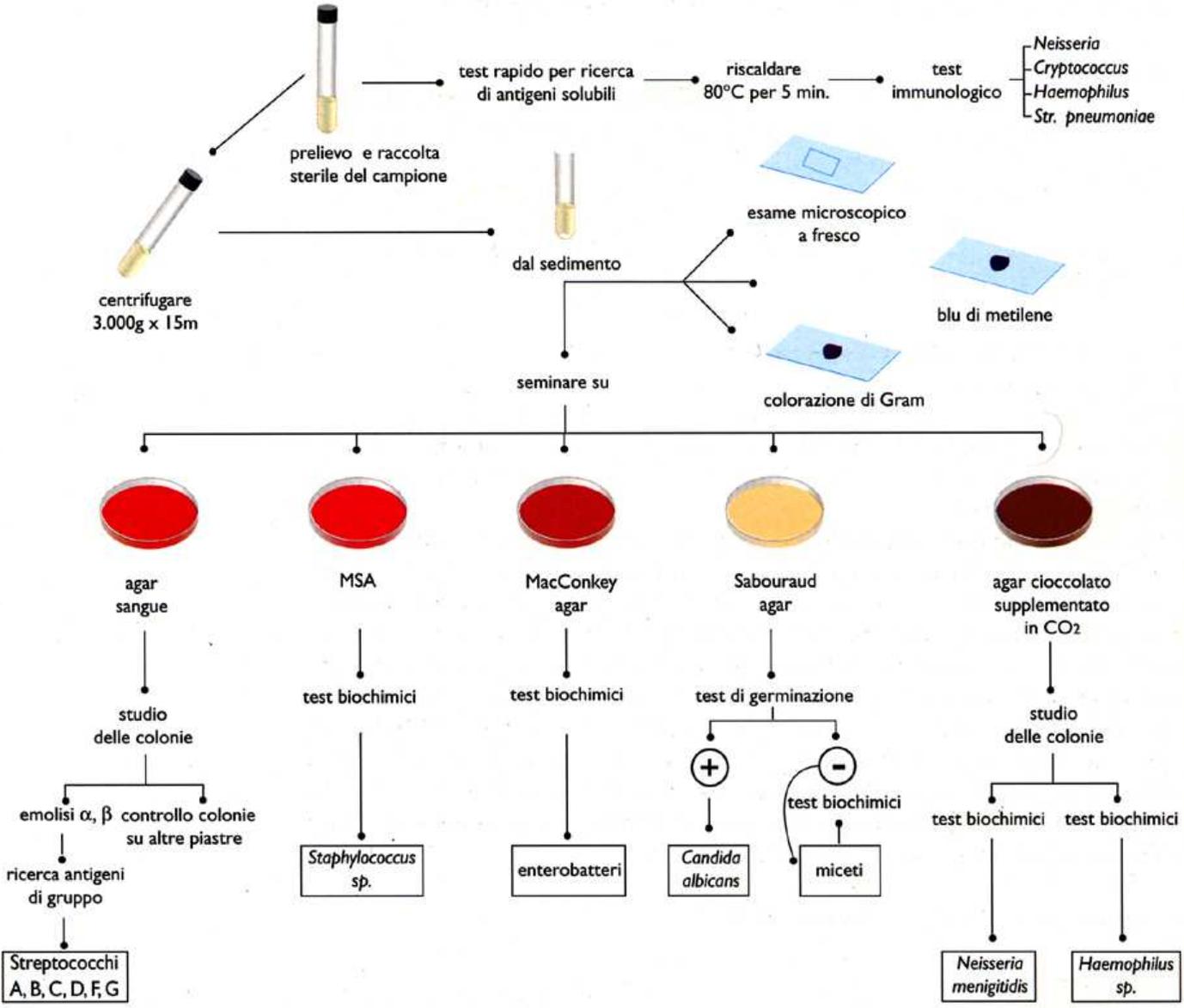


esame biochimico



Indagini di supporto (emocolture, esami sierologici, etc)

esame microbiologico



Condizioni richieste per ottenere un corretto risultato di un esame colturale del liquor



Germe vivo
 Non terapia antibiotica precedente
 Terreni di coltura adeguati
 Trasporto rapido (poche ore)

Trattamento antibiotico	sensibilità
no	36-94%
si	<10%

Tableau 11

Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives négatives et positives de la culture du LCR dans les syndromes méningés.

Sensitivity, specificity, and predictive value (positive and negative) of CSF culture in meningeal syndromes.

Auteur	Ref	Inclusion	Culture ±	Se	Sp	VPP	VPN
Pusponegoro et al.	[9]	16	6-Nov	55	100	100	50
Surinder et al.	[29]	65	15/50	78	98	94	92
Marcos et al.	[30]	57	13/25	53	100	100	73
Dunbar et al.	[12]	2635	284/2351	94	91	23	99.8
Saravolatz et al.	[21]	74	15/74	88	98	94	97
Van Gastel et al.	[22]	37	Nm : 4/23 Spn : 5/14	17 36	100 100	100 100	71 86
Bryant et al.	[64]	24	15/24	63	100	100	100
Richardson et al.	[23]	38	21/38	55	100	100	93

Inclusion : nombre d'échantillon de l'étude ; Gram ± : nombre d'examen de la coloration de Gram positif/negative ; culture ± : culture positive/negative ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive negative ; Nm : *N. meningitides* ; Spn : *S. pneumoniae*.

Meningoencefaliti virali

Diagnostica tradizionale prevede:

- l'isolamento del virus in coltura cellulare
- la successiva identificazione degli antigeni

Viral Culture

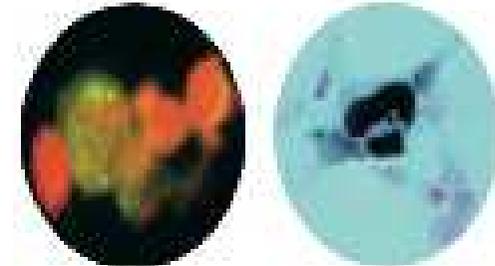
Standard tube cell monolayer



Centrifugation-enhanced shell vial monolayer



Direct Antigen/Nucleic Acid Detection



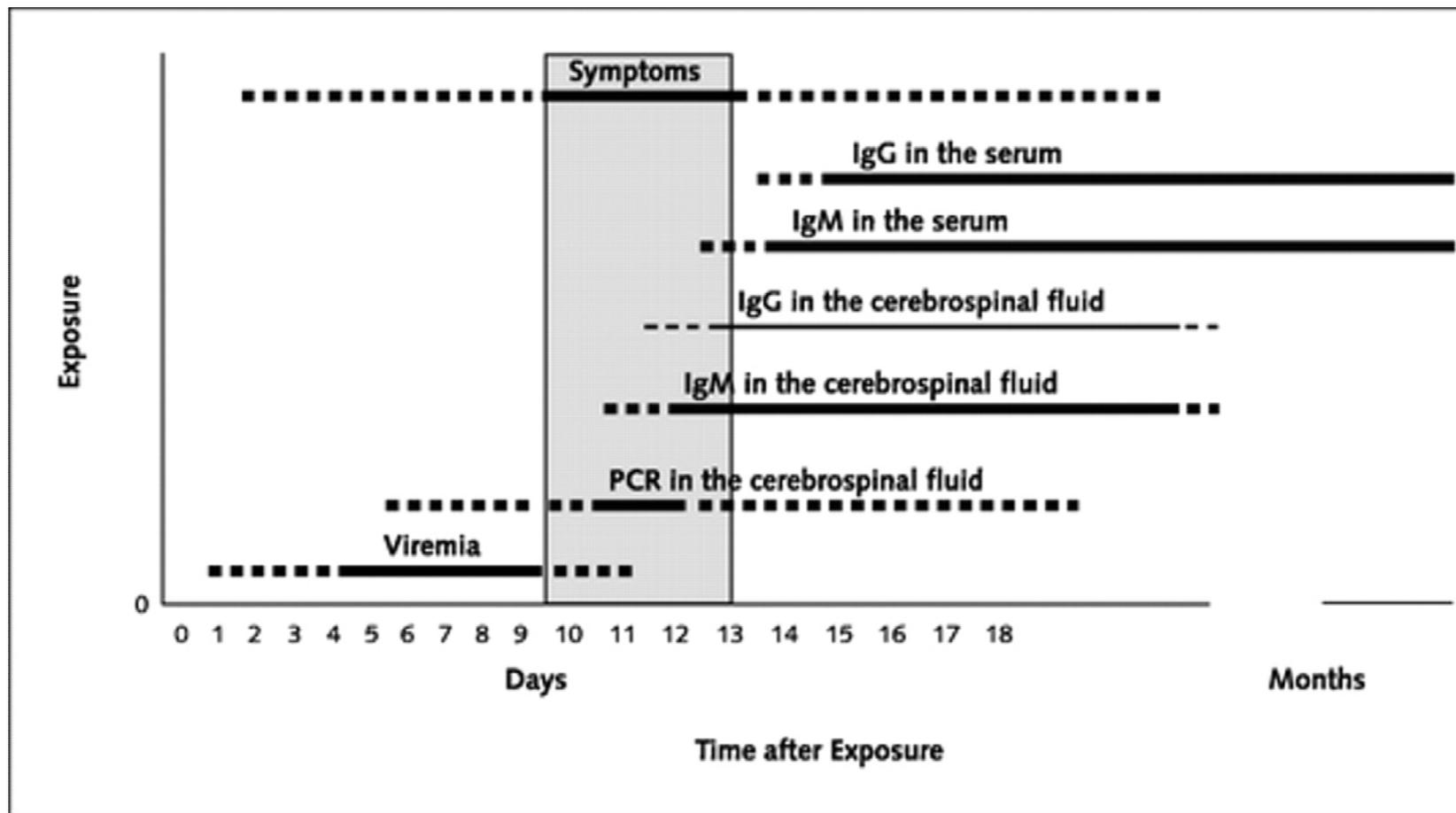
Il fattore tempo è cruciale (10-30 gg della coltura)

Poco sensibile

Non tutti i virus crescono in coltura!!!

I test sierologici spesso richiedono 2-4 settimane dopo l'infezione acuta per lo sviluppo di un aumento diagnostico in titoli anticorpali

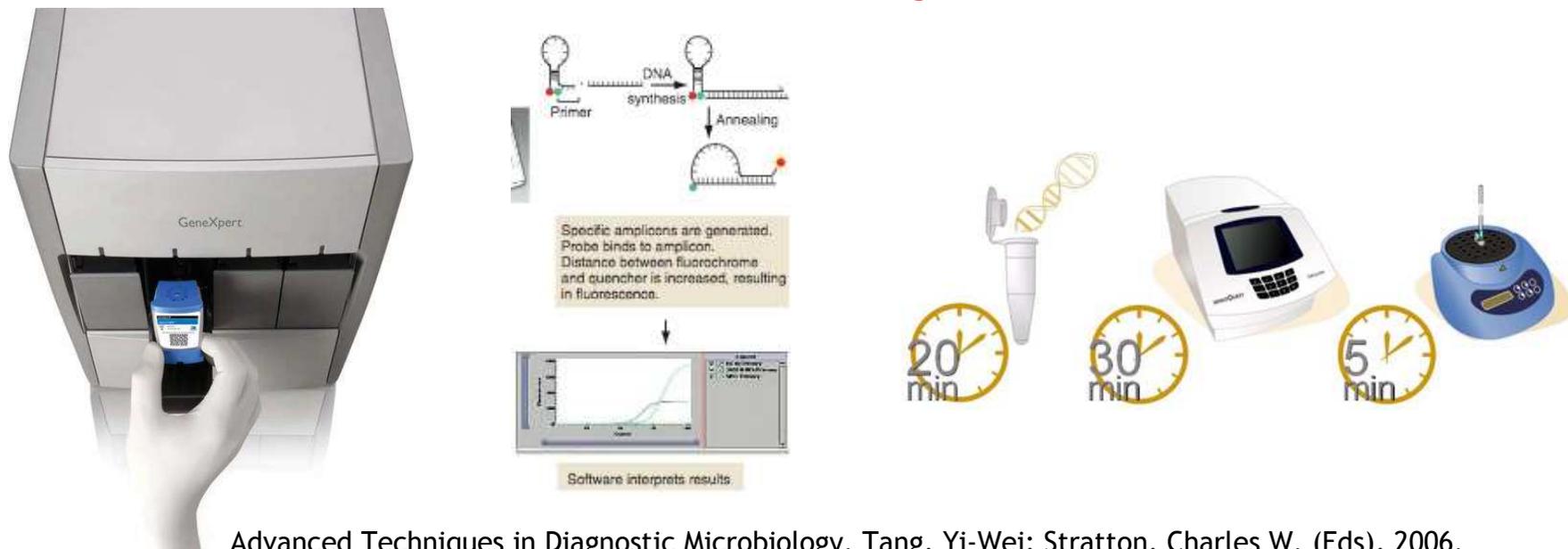
Il movimento anticorpale è di valore limitato per virus con elevati tassi di sieroprevalenza basali.



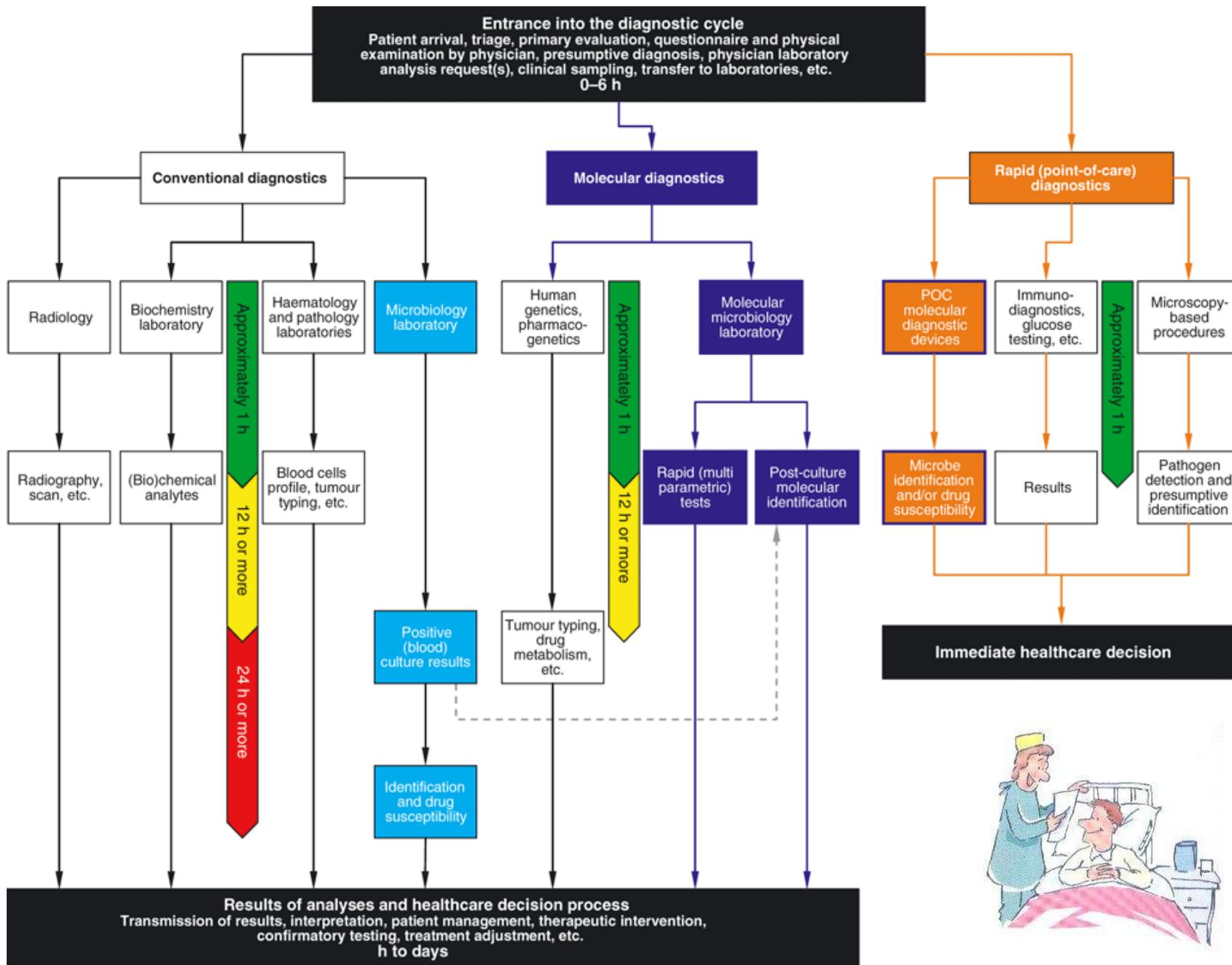
I recenti sviluppi delle biotecnologie e della biologia molecolare giocano un ruolo significativo nello sviluppo di metodi rapidi, specifici e sensibili per la diagnosi microbiologica diretta

Le tecniche rapide per l'amplificazione degli acidi nucleici con sistemi automatizzati e *user-friendly* hanno ampliato gli strumenti per la diagnostica microbiologica

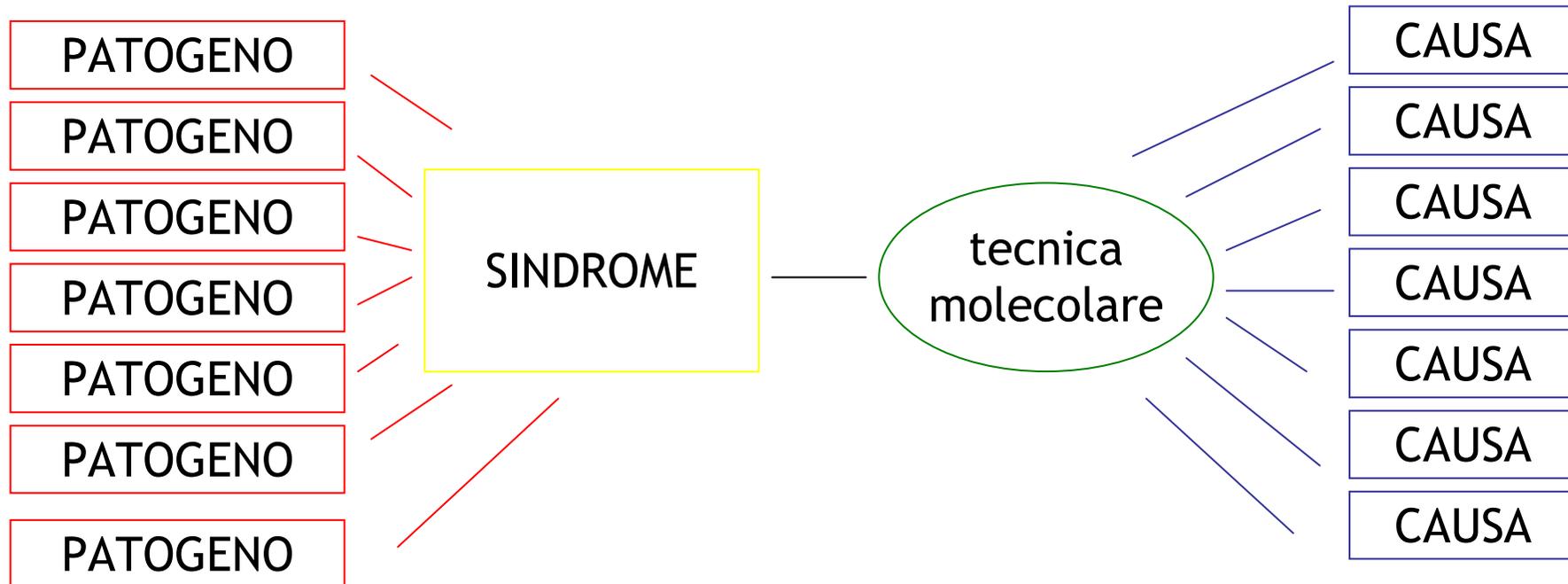
Le tecniche molecolari = maggiore contributo alla diagnostica di laboratorio di meningo-encefalite



Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Tang, Yi-Wei; Stratton, Charles W. (Eds), 2006.



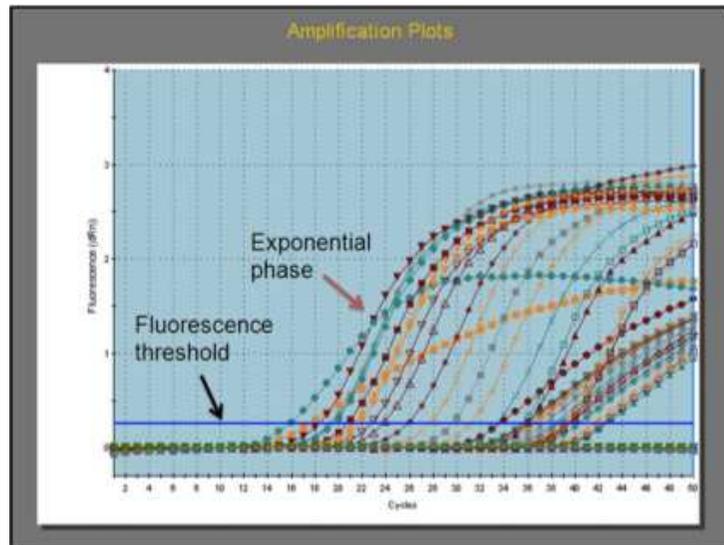
Le tecniche molecolari



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

PCR (Polymerase Chain Reaction) e' una sintesi enzimatica in vitro che consente di amplificare piccole quantità di DNA attraverso cicli termici ripetuti

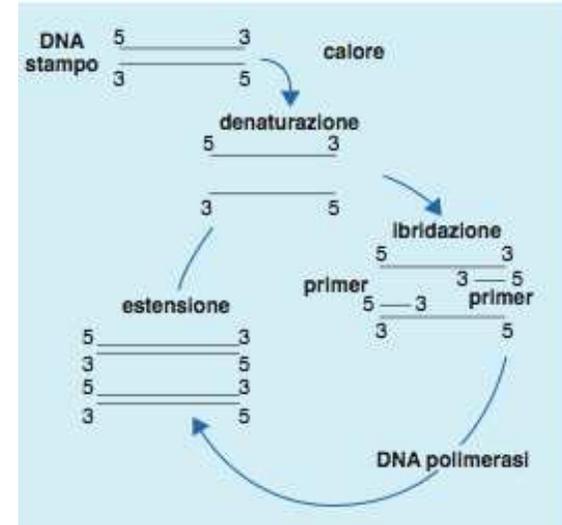
PCR Real Time



amplificazione e rivelazione del prodotto amplificato (DNA target) avvengono contemporaneamente. Il DNA target è riconosciuto e rilevato attraverso l'impiego di sonde fluorescenti (Taqman, Molecular Beacon etc..). L'incremento della fluorescenza è proporzionale alla quantità di DNA amplificato (nella fase iniziale).

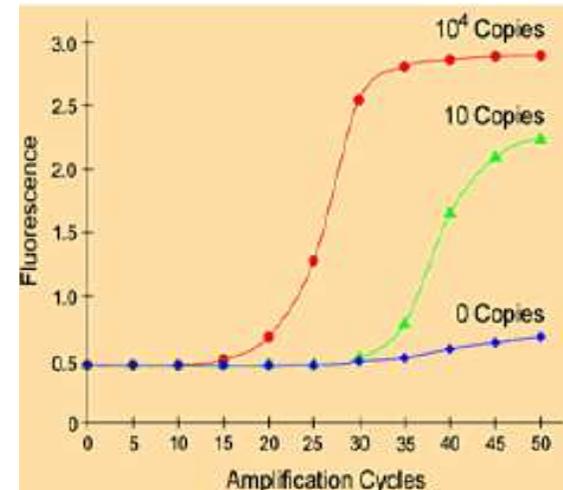
utilizzando uno stesso profilo termico si possono amplificare più genomi virali o batterici contemporaneamente con:

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



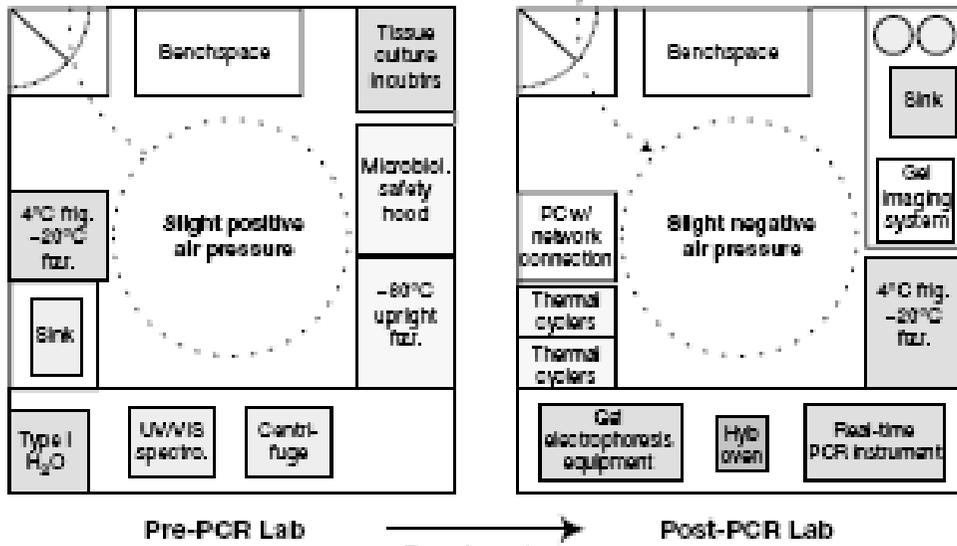
La Real time PCR

in genere alla valutazione qualitativa, aggiunge una **valutazione quantitativa**, fondamentale per discriminare positività a basso titolo senza significato clinico da positività ad alto titolo correlate a infezione produttiva



A differenza dei metodi tradizionali che possono dare risultati negativi se il paziente ha ricevuto anche piccole dosi di farmaci antivirali o trattamenti di immunizzazione passiva, la PCR mantiene la sua sensibilità. Questo permette l'attuazione di una rapida terapia empirica quando un paziente si presenta prima con sospetta meningite o encefalite, senza compromettere il potenziale diagnostico del test.

E'ideale per individuare organismi esigenti che possono essere di difficile o impossibile isolamento.



Pre-PCR Lab

Post-PCR Lab

Flow of samples for PCR analysis

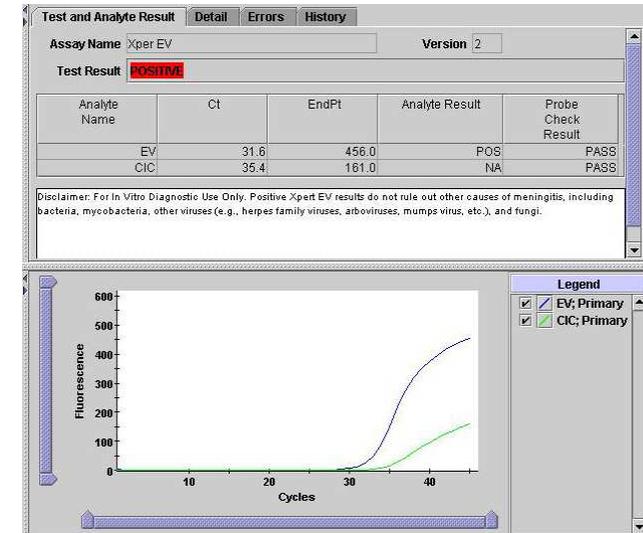
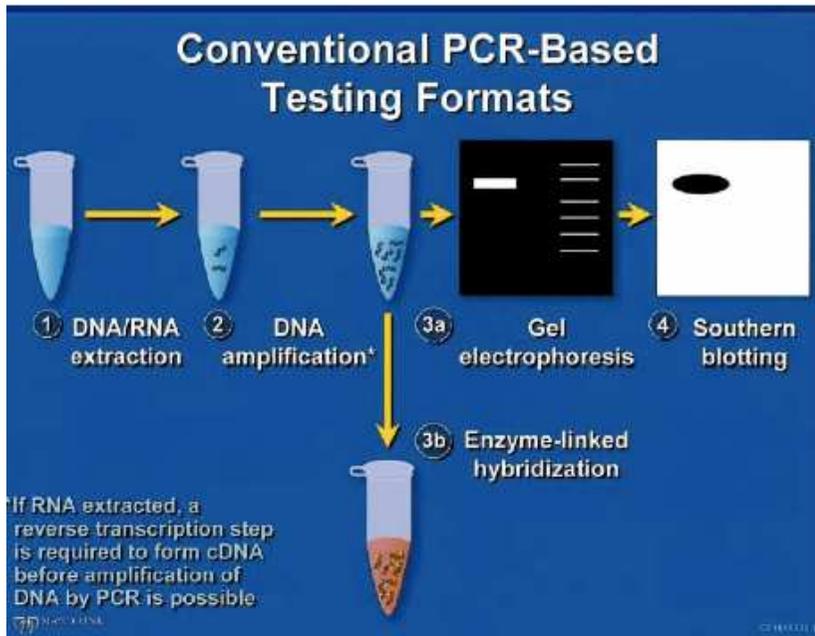
Diverse stanze, strumenti e tecnologie

LAB on a Chip Platforms

Ora



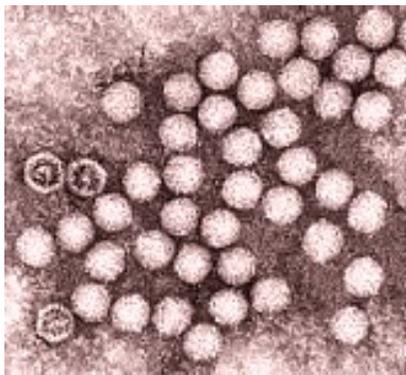
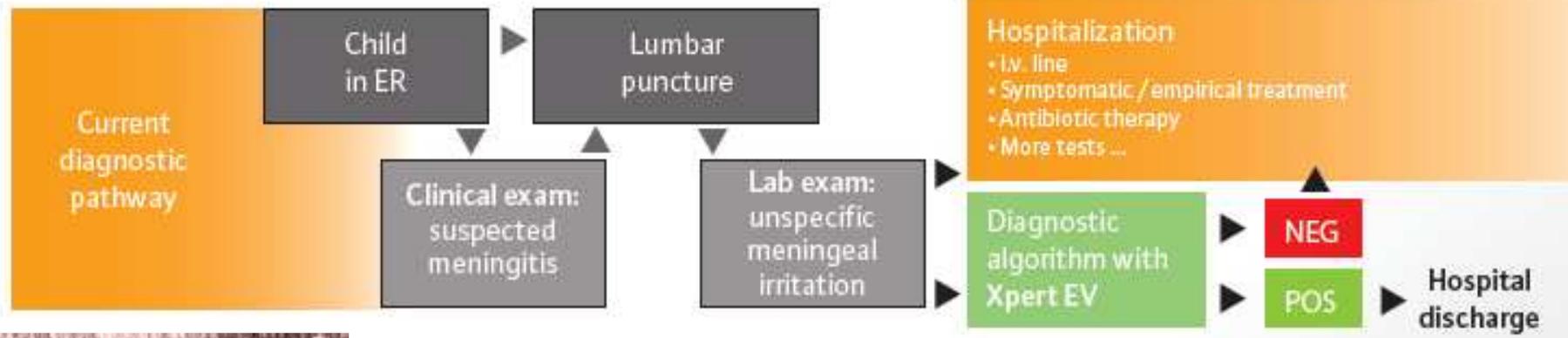
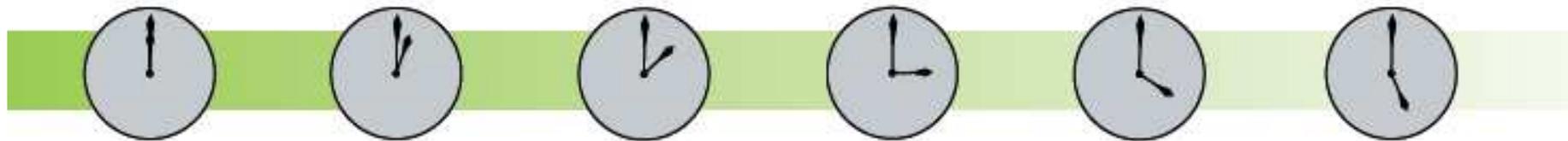
Solo una cartuccia



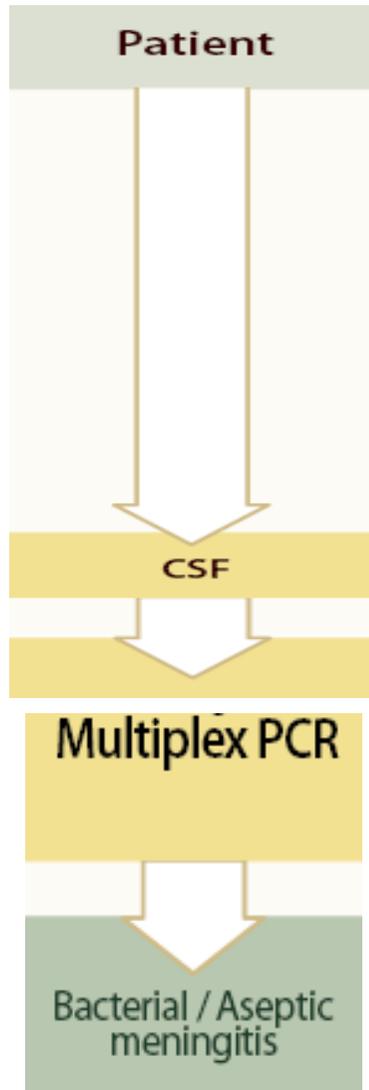
Xpert™ EV



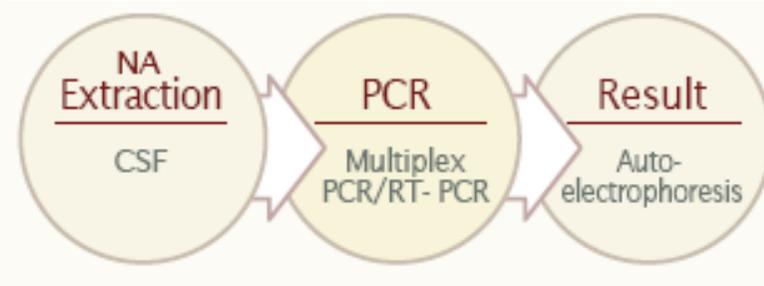
Risultati in ~2 ore



Una risposta tempestiva cambia il percorso del paziente



Multiplex PCR



Ricerca e
identifica più
virus e batteri
simultaneamente

Ideale per
infezioni ad
eziologia multipla

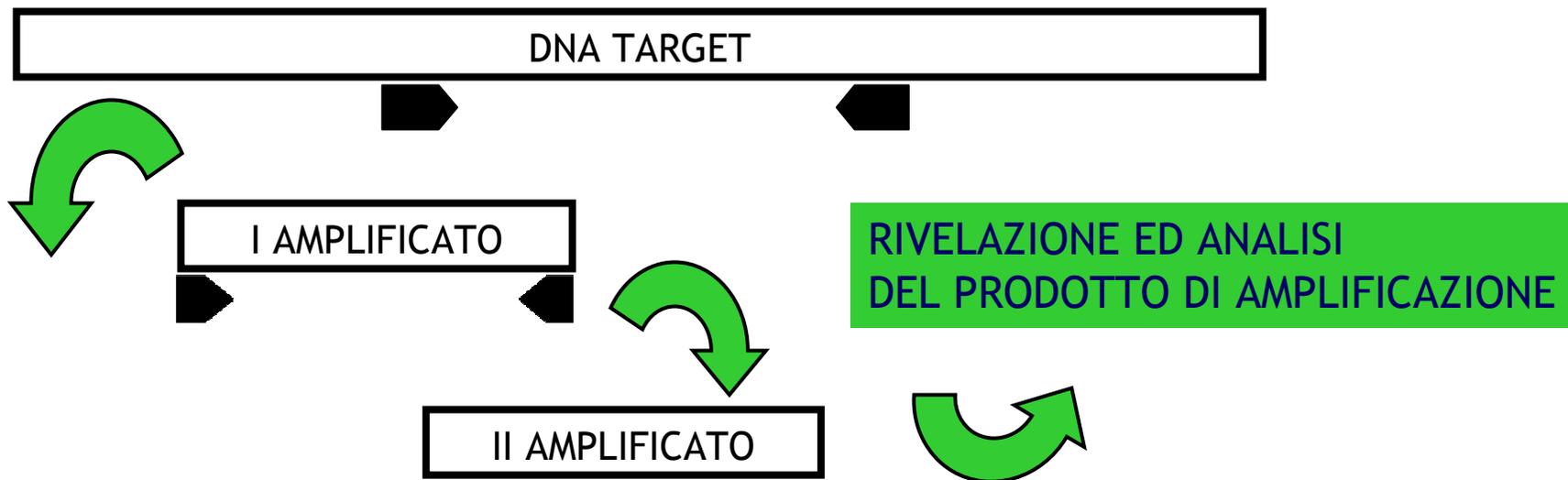
- HSV1
- HSV2
- VZV (HHV3)
- EBV (HHV4)
- CMV (HHV5)
- HHV6
- Enterovirus
- * Meningitis virus 2 panel covers Poliovirus, Echovirus, and Coxsackievirus.
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Haemophilus influenzae* type b
- *Listeria monocytogenes*
- Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*)

PCR “*primer consensus*”

La PCR con *primer consensus* viene utilizzata per amplificare sequenze conservate tra microorganismi simili, per esempio i differenti virus erpetici.

PCR “*nested*”

E' una variante della PCR classica, frequentemente utilizzata per lo studio del liquor, e la PCR “*nested*”. Questa metodica, basata sull'uso di due coppie di primer, il secondo dei quali e “annidato” all'interno del primo, è caratterizzata da una superiore sensibilità e specificità rispetto alla metodica classica.





PCR E DIAGNOSI DI MENINGITE BATTERICA

Sensibilità

PCR pre ATB: 88.7% post ATB: 58.1%

Coltura pre ATB: 69.8% post ATB: 29%

VANTAGGI

Rapidità (tempi diagnostici ridotti)

Elevata specificità

Elevata sensibilità

Buona riproducibilità

Meno dipendente dalla terapia

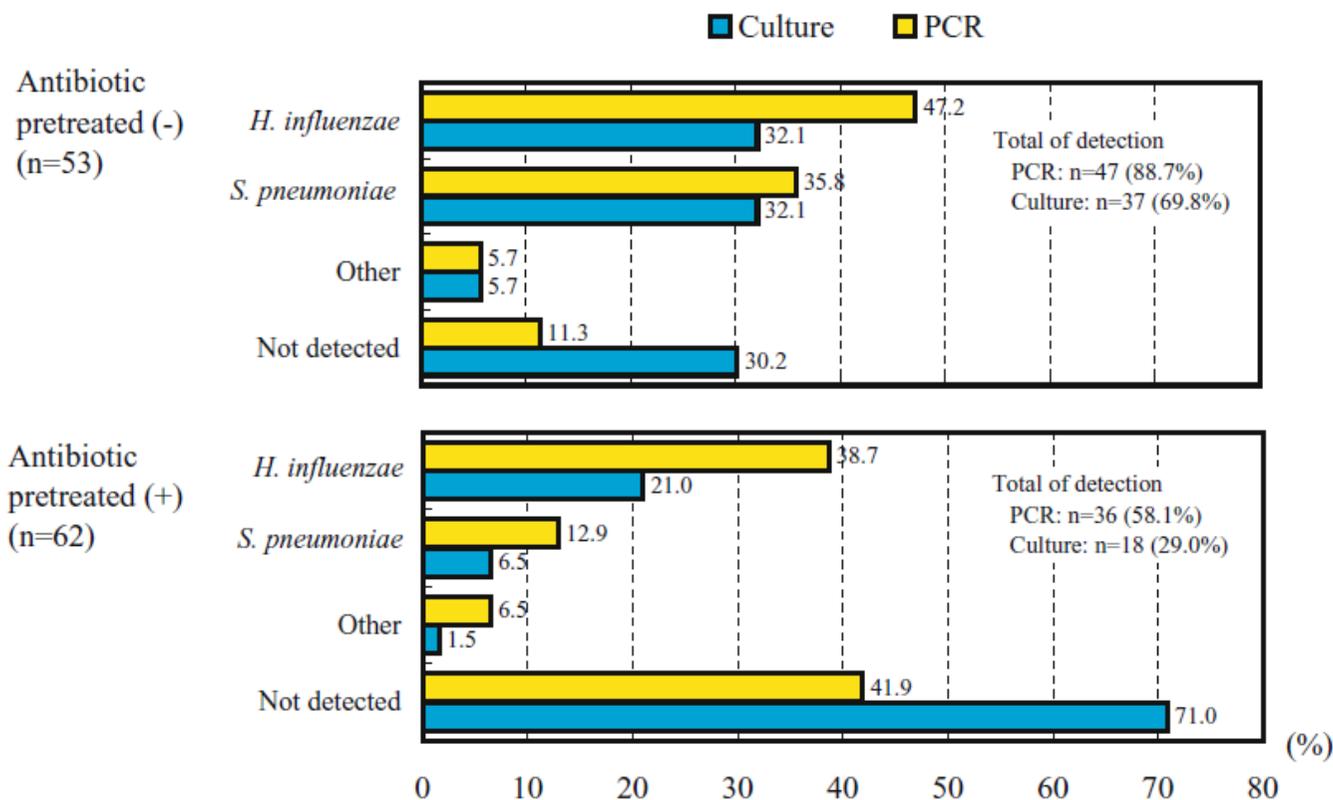


Fig. 1. Influence of prior antibiotics on the detection of causative pathogens by real-time PCR or culturing

PCR E DIAGNOSI DI MENINGITE VIRALE

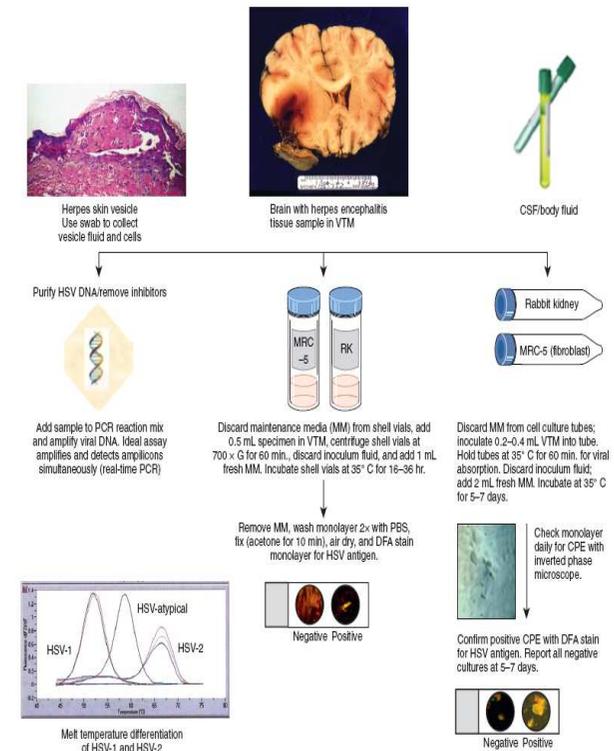
Consente la determinazione quantitativa del virus nel liquor
è importante in quanto fornisce:

-in fase iniziale, un parametro indiretto dell'estensione lesionale

-in corso di malattia, indicazioni sulla prognosi e sull'efficacia della
terapia (monitoraggio clinico-terapeutico)

PCR è sostanzialmente meno invasiva della
biopsia cerebrale, che in precedenza era il *gold
standard* per la diagnosi di molte infezioni del
sistema nervoso centrale (SNC) da *Herpesvirus*.

per gli *Enterovirus* e i
Parvovirus B19 è l'unica tecnica
disponibile



PCR E INDAGINI SIEROLOGICHE

Serological Detection of Virus Specific Antibodies



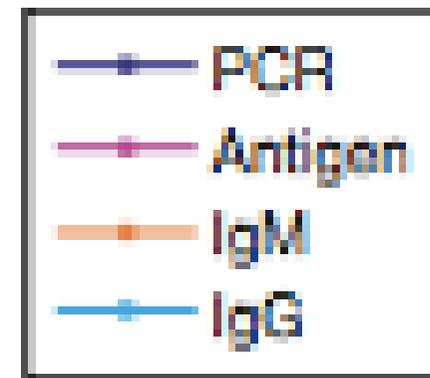
Acute illness

Recovery

Remain

In contrasto con test sierologici, la PCR produce risultati positivi durante l'infezione acuta, quando la quantità di virus replicante è massima.

I test sierologici non offrono una risposta rapida



test molecolari fondamentali per la diagnosi

Clinici

multidisciplinary approach

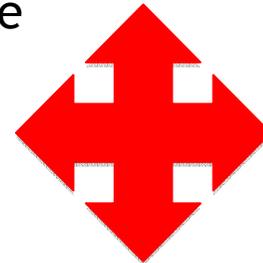


Laboratori di riferimento

Laboratori periferici

DIALOGO

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



formulare ipotesi diagnostiche che orientino le richieste



Rafforzare il ruolo dei laboratori nella diagnosi eziologica

Maggiore appropriatezza della richiesta

Corretta raccolta dei campioni clinici

Corretta gestione dei campioni da inviare al laboratorio di riferimento



Quando la PCR può essere utile ?

Con LIQUOR

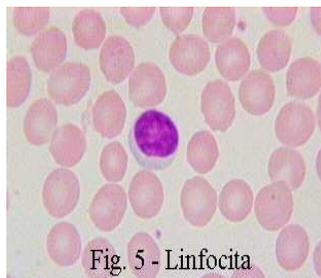
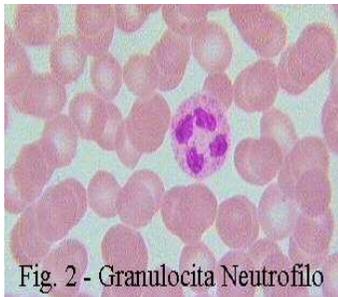
Aspetto:
limpido



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?

Meningite batterica

90% delle meningiti batteriche dei lattanti

75-80% di tutte le meningiti batteriche

PANNELLO ADULTI

PANNELLO LATTANTI



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

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia Coli*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Listeria monocytogenes*

* *Neisseria meningitidis*: IN CASO DI POSITIVITA' GENOTIPIZZARE (B,C)

Quali agenti infettivi ricercare e perché?



Meningite virale

PANNELLO

92% di tutte le meningiti virali

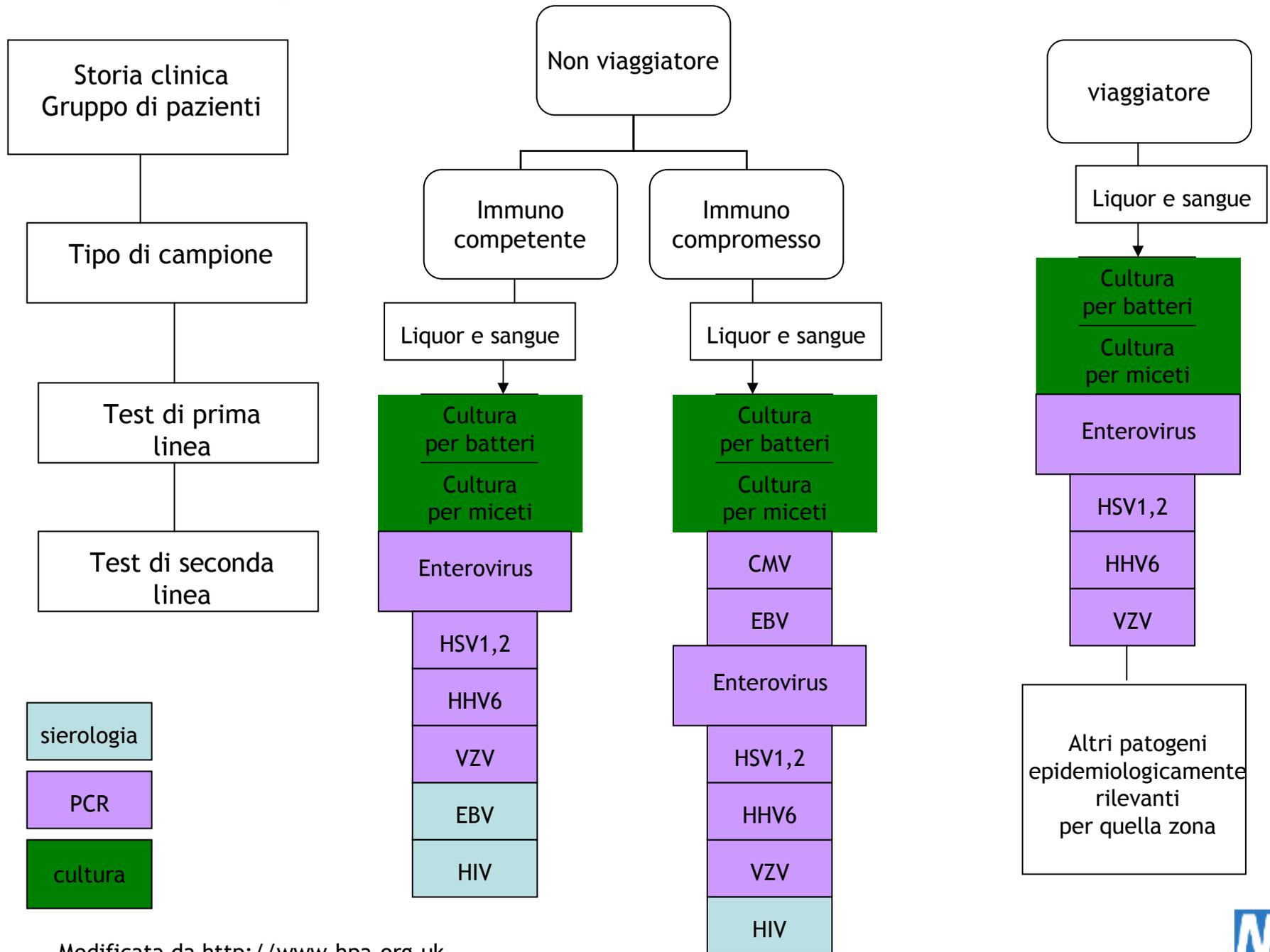
Enterovirus (70 sierotipi)

Herpes simplex 1 (4%)
Herpes simplex 2 (31%)
Varicella Zoster (11%)

46% di tutte le meningiti virali

EBV
CMV
HHV-6
HHV-7
HHV-8

Meningoencefaliti batteriche e virali acute: workflow



Modificata da <http://www.hpa.org.uk>

Situazione ideale diagnosi su liquor

Liquor raccolto in 3 provette sterili di polipropilene sequenziali

1



Prima provetta (2ml): conta cellulare ed esame biochimico

Seconda provetta (2ml): per esami microbiologici

2



3



Terza provetta (2ml):
aliquota per PCR (400-800 μ l) e aliquota per la conservazione

La PCR può essere eseguita su campione fresco o campione congelato.

Refrigerazione fino a tre giorni non sembra ridurre in modo significativo la resa del test (il DNA è relativamente più stabile di RNA).



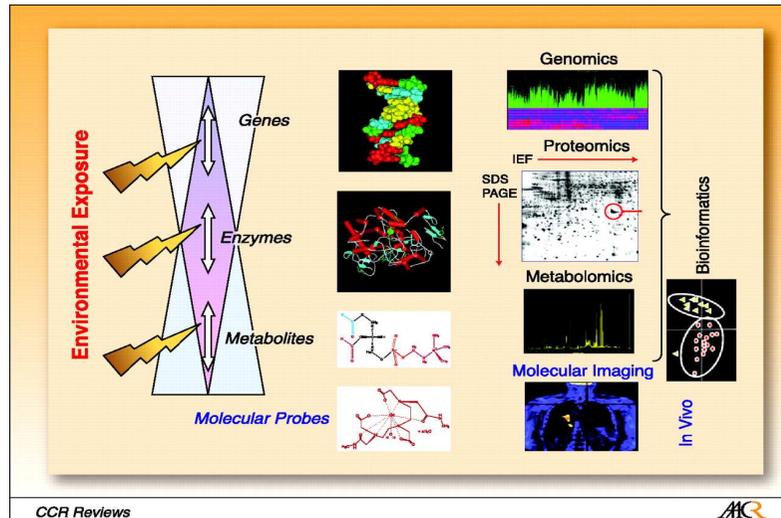
Sviluppi futuri

Potenziali applicazioni delle scienze -omiche



- Genomica
- Trascrittomica
- Proteomica
- Metabolomica

Le nuove nanotecnologie di *microarray* e proteomica possono contribuire a migliorare la diagnosi e il trattamento.



New tools open new doors

The human microbiome: at the interface of health and disease Ilseung Cho & Martin J. Blaser *Nature Reviews Genetics* 13, April 2012

Melissa B. Molecular Microbiology: Diagnostic principles and Pratiche, 2011

Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jun;394

Phillips, *Cellular Microbiology*, , 2005

Host Biomarkers and Paediatric Infectious Diseases: From Molecular Profiles to Clinical Application H.K. Brand, 2012

Il DNA “chips” o chips genici

L'identificazione dei patogeni utilizzando un *microarray* o *biochip* comporta:

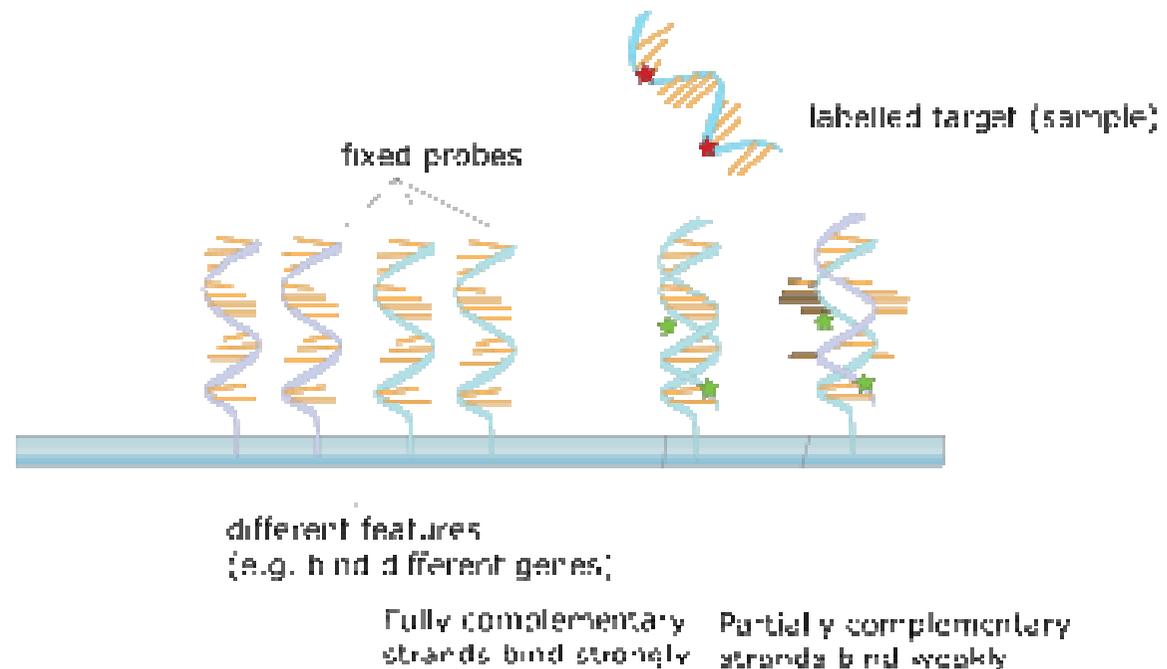
Estrazione dell'acido nucleico dal liquor

Amplificazione del frammento di DNA di interesse

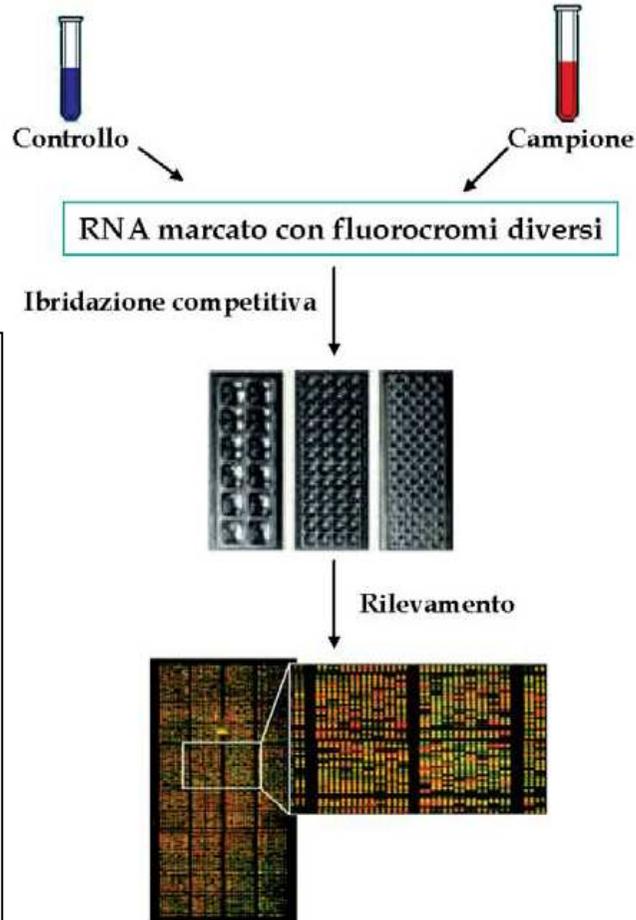
Ibridazione del DNA marcato con sonde oligonucleotidiche immobilizzate sul microarray



sviluppato per identificare simultaneamente i diversi agenti patogeni virali e batterici nel liquor



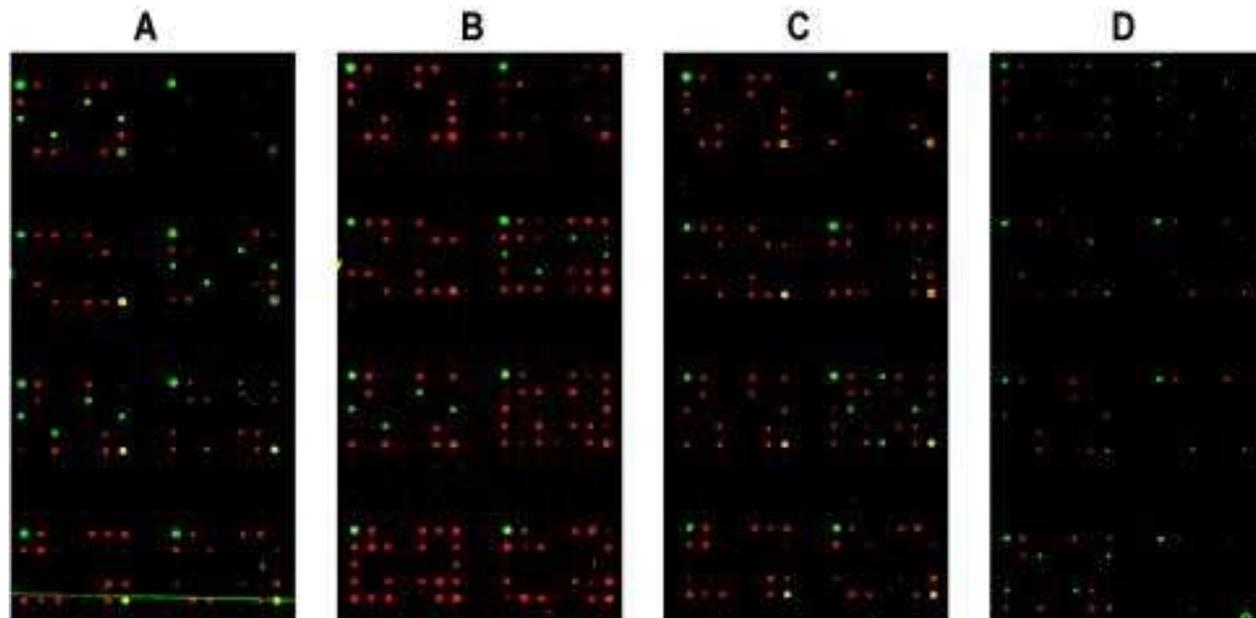
Microarray



matrice solida (vetrini) sulla quale è legato un numero notevole di molecole di DNA a singolo filamento (sonde), ognuna specifica per un dato gene.

VIRUS	META	SUB	VIRUS	META	SUB
CMV			VZV		
BK			HSV-1		
JC			HSV-2		
EBV			MUMPS		
HHV-7			MEASLES		
HHV-6A			ECHO		
HHV-6B			COX B		

Ogni sonda occupa una posizione specifica e nota a formare una microgriglia (*microarray*) con un caratteristico *pattern* che ne consente l'identificazione in modo univoco al momento della rivelazione



Strains of bacterial probes used in Megic™ Chips

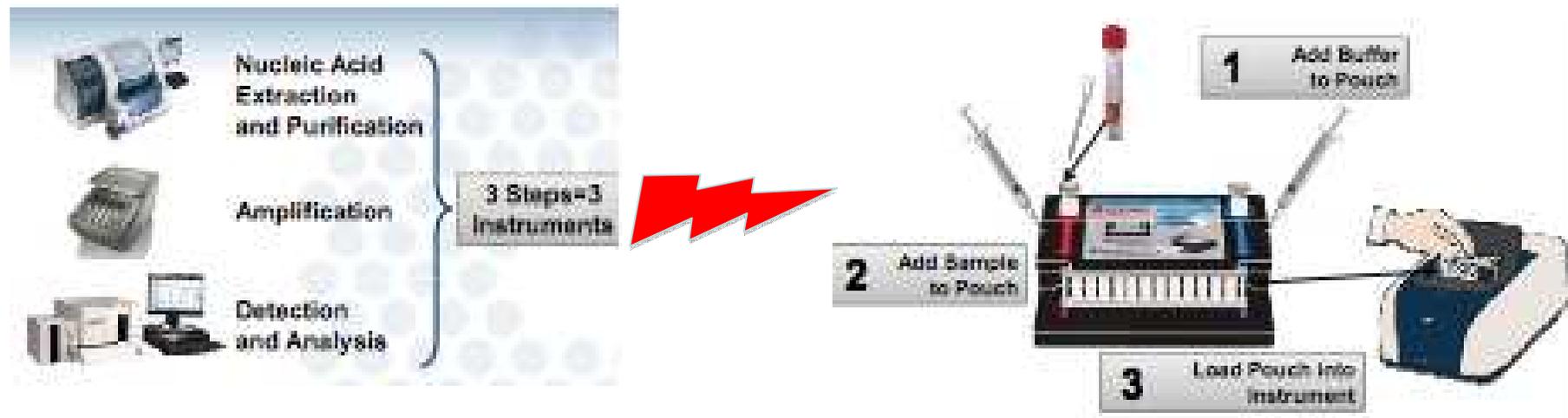
No.	Bacteria	No.	Bacteria
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	<i>Listeria monocytogenes</i>
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	<i>Escherichia coli</i>
3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	14	<i>Serratia marcescens</i>
5	<i>Streptococcus pyogenes</i>	15	<i>Enterobacter cloacae</i>
6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7	<i>Enterococcus faecium</i>	17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	18	<i>Proteus mirabilis</i>
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19	<i>Haemophilus influenzae</i>
10	<i>Legionella pneumophila</i>	20	<i>Neisseria meningitidis</i>

Film array

Filmarray è un dispositivo miniaturizzato- semplice- veloce- sicuro

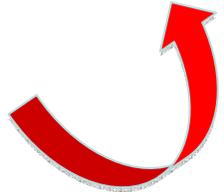
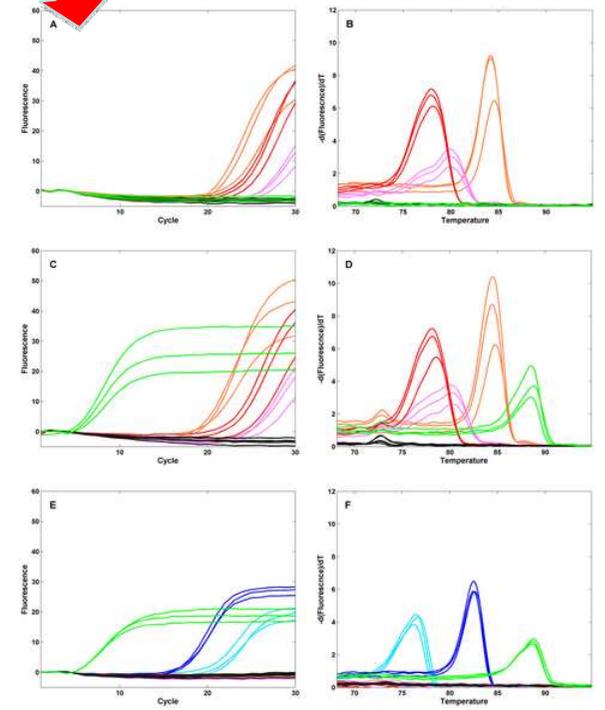
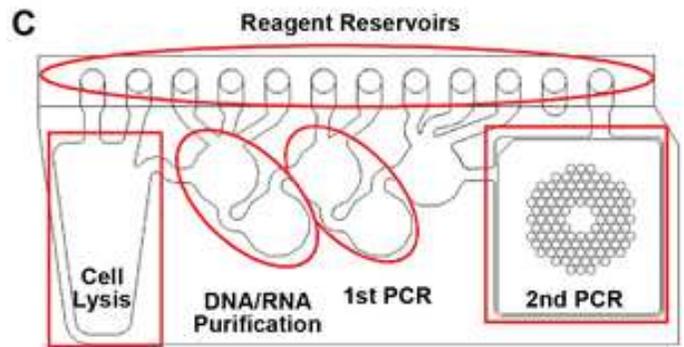
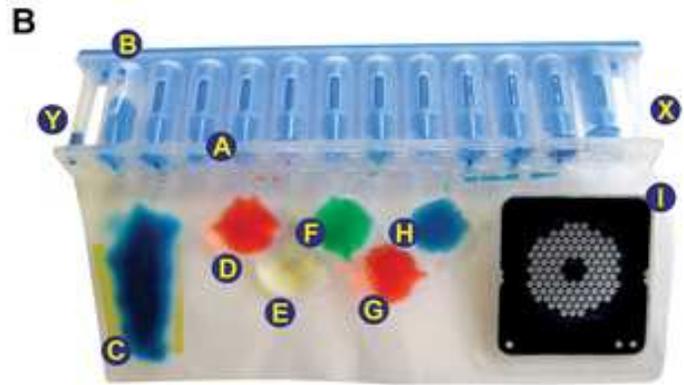
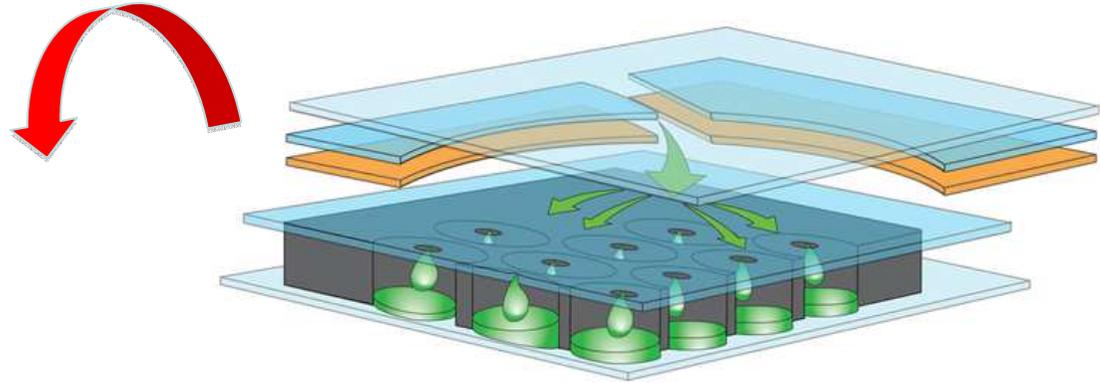
FilmArray è un sistema rivoluzionario che racchiude in un unico supporto:

- estrazione e purificazione degli acidi nucleici con biglie magnetiche
- amplificazione tramite *nested multiplex PCR*
- rilevazione della positività mediante ibridazione su array.





Lab in a pouch-system



Lab in a pouch-system: lista patogeni

Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus spp</i>
<i>Haemophilus influenza</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococci spp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus spp</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>
viridans streptococci

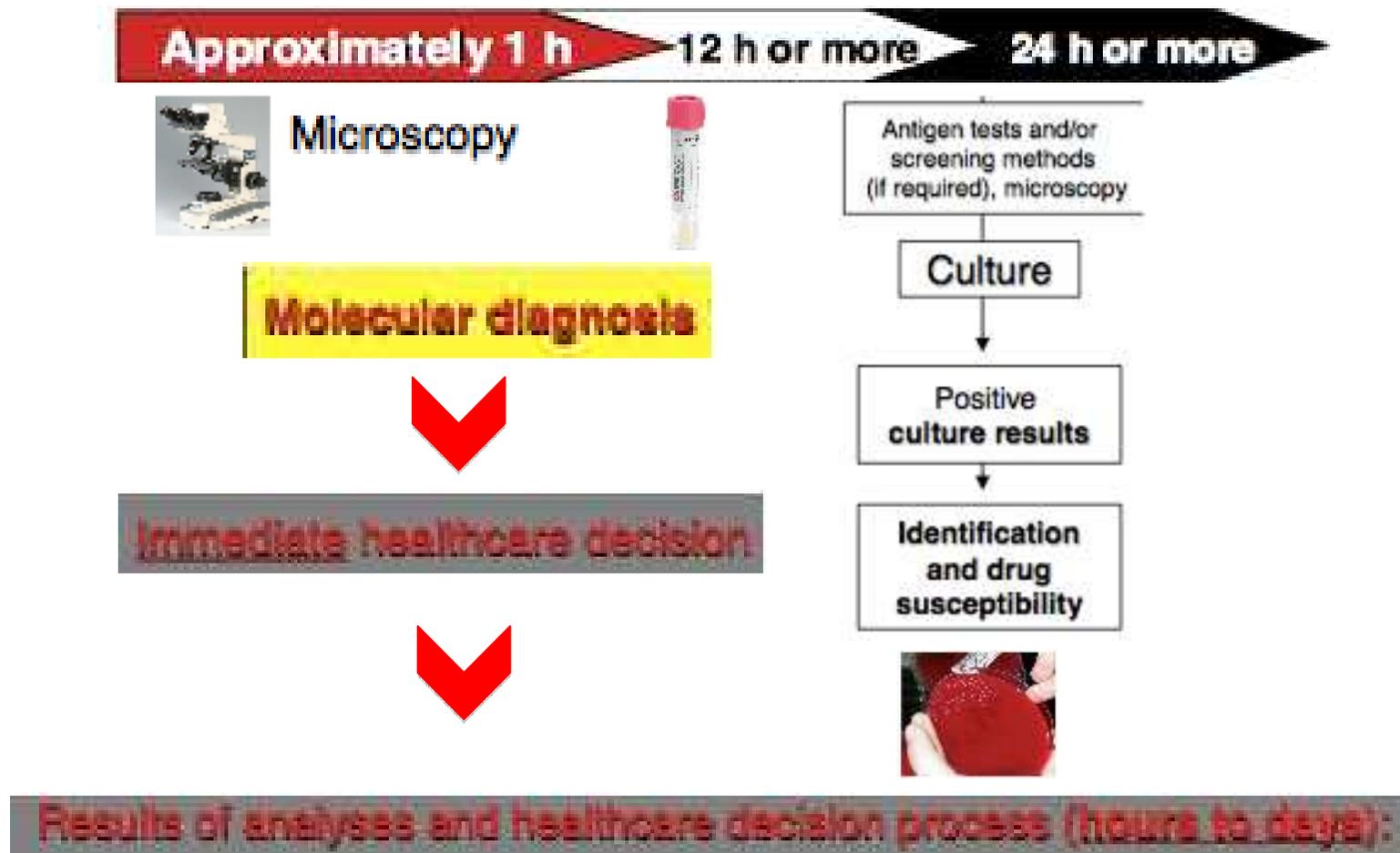
Adenovirus
Enterovirus
Parechovirus
HSV1
HSV2
VZV
EBV
CMV
HHV(6)

pipeline: 2013



Conclusioni

L'introduzione di tecniche PCR nella gestione della diagnosi su liquor permette la differenziazione fra meningite batterica e virale in poco tempo con ottimi valori di sensibilità e specificità (il tempo di risposta rapido è importante per una precoce profilassi (*N.meningitidis*) ed una terapia adeguata per una migliore prognosi)



Nota bene

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)

Diversi studi hanno suggerito che il numero di copie di acido nucleico virale (*viral load*) può essere un *marker* per la gravità della malattia e può aiutare a predire l'esito dell'infezione



La squisita sensibilità della PCR è al tempo stesso la sua virtù più grande e la sua più grande potenziale limitazione.



Un risultato positivo indica la presenza di acido nucleico ed è un *marker* di infezione attiva recente o in corso.

Un risultato falso positivo può verificarsi a causa di contaminazione accidentale o mancata specificità del prodotto amplificato.

Un risultato falso negativo potrebbe accadere con inibitori della reazione di PCR presenti all'interno del campione, ma né cellularità o proteine alte incidono sul risultato.

Le tecniche molecolari nella diagnostica clinica: CRITICITA'



Costi

Corretta raccolta dei campioni clinici

FORMAZIONE DEL PERSONALE

ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO

} Criticità parziali ora

non esiste un esame di laboratorio con affidabilità, rapidità, sensibilità, specificità ottimale

UTILIZZARE SEMPRE TUTTI I TEST DI LABORATORIO DISPONIBILI:

Esame chimico- fisico

Esame microscopico

Esame colturale (liquor e sangue)

Ricerca antigeni (liquor e urina)

PCR (in laboratori adeguatamente attrezzati)

U.O. Microbiologia e Virologia
Dott. Paolo Lanzafame



Provincia Autonoma di Trento
Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari



Grazie a tutti

Danila, Marina, Cristina P., Rosanna, Patrizia, Iole

Cristina B.
Lorenzo
Micaela
Alessio
Cira
Stefano Z.
Francesca
Luca
Antonella
Daniela
Claudia



Anna G.
Anna R.
Ivana
Milena
Alessandra
Beatrice
Laura
Emilia
Fabiana
Lucia

Silvia
Elisabetta
Stefano F.

Alba, Antonietta, Rosi, Anna C., Daniela N., Irma, Francesco

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: Collini_Meningoencefaliti

STACK:

```
(4)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20121116110457+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20121116110457+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```