

# L'esame del Fluido Cerebro-Spinale (CSF)

M. Gaino

Trento, 12 ottobre 2012

# Indicazioni cliniche

- **Meningiti e meningoencefaliti** (urgenza)
- Sclerosi multipla, encefaliti demielinizzanti
- Poliradicolonevriti disimmuni
- Carcinomatosi meningea
- Neuropatologia in m. infiammatorie/autoimmuni
- Emorragia sub-aracnoidea (non definibile con TC)
- Processi extra-cerebrali con oto/rinoliquorrea
- M. di Creutzfeldt-Jacob
- M. di Alzheimer

## Emergenze in infettivologia

- Meningite
- Epatite fulminante
- Malaria
- Insufficienza respiratoria
- Sepsi

*L'esame del liquor rappresenta il “gold standard”  
per la diagnosi di meningite*

## Sindrome meningea

- La diagnosi clinica di meningite o, come è nella maggior parte dei casi, di meningoencefalite, è quasi sempre agevole a quadro conclamato, ma può presentare qualche difficoltà in fase iniziale

## Sindrome meningea

- Iperpiressia, cefalea, vomito sono sintomi comuni a moltissime malattie infettive
- Occorre pensare alla meningite quando la cefalea è nucale, opprimente, il vomito non è preceduto da nausea, il paziente incomincia a presentare alterazioni psichiche

# Sospetto di meningite: quale sequenza?

- Ospedalizzazione
- TAC cerebrale
- **Rachicentesi**
- Terapia antibiotica (nel sospetto di meningite, iniziare la terapia prima della TAC)
- Terapia di sostegno

# Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults

Diederik van de Beek, M.D., Ph.D., Jan de Gans, M.D., Ph.D.,  
Allan R. Tunkel, M.D., Ph.D., and Eelco F.M. Wijdicks, M.D., Ph.D.

N Engl J Med 2006;354:44-53.

- tempo mediano fra arrivo in pronto soccorso e somministrazione di antibiotici: 4 ore

## Infezioni del SNC

- Numerose infezioni del SNC sono oggi curabili, ma il successo della terapia è condizionato dalla **tempestività** degli interventi.
- *Il rapido orientamento diagnostico pertanto è una esigenza prioritaria*



# Infezioni del Sistema Nervoso Centrale (Meningiti,meningoencefaliti)

- Meningiti acute batteriche e virali
- Meningiti subacute o croniche
- Meningiti a liquor torbido (batteriche)
- Meningiti a liquor limpido (batteriche e virali)

## MENINGITI BATTERICHE: agenti eziologici per classi di età

### 0 - 1 mese:

- *E. coli* K1
- *S. agalactiae*
- *L. monocytogenes*

### 2 mesi - 5 anni:

- *H. influenzae* tipo b (48%)
- *N. meningitidis*
- *S. pneumoniae*

### 6 - 30 anni:

- *N. meningitidis* (A, B, C, Y, W135)
- *S. pneumoniae* (30-50%)
- *H. influenzae* tipo b

### 31 - 60 anni:

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*

### > 60 anni:

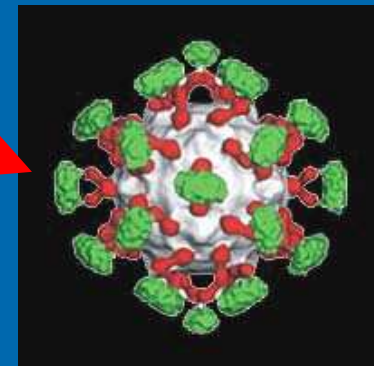
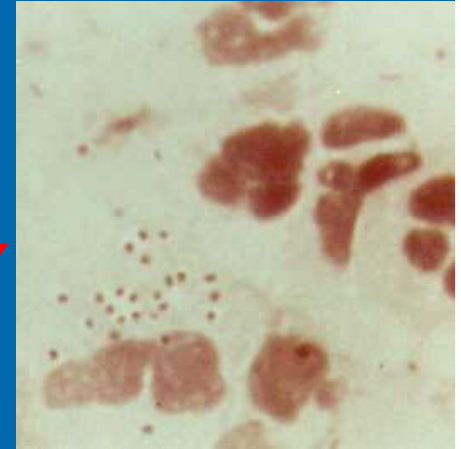
- *S. pneumoniae*
- *L. monocytogenes* (in aumento)
- Batteri Gram negativi

*S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae* causano complessivamente il 75-80% di tutte le meningiti batteriche.

# MENINGITE

BATTERICA o meningite SETTICA

VIRALE o meningite ASETTICA

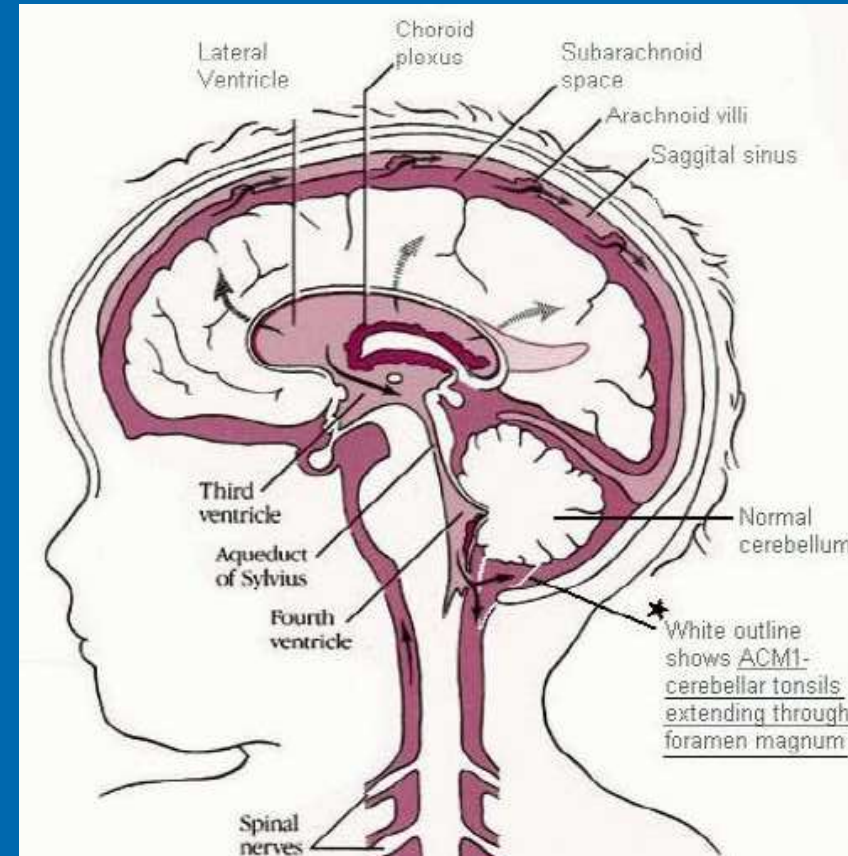


*La vera, forse unica, urgenza in  
Microbiologia è la diagnosi di meningite*

## Fluido Cerebro-Spinale

o Liquido cefalo-rachidiano

o Liquor



**Fluido limpido e incolore**, prodotto dall'attività di filtrazione e secrezione dei capillari dei plessi corioidei che circola lentamente negli spazi cerebrali e del midollo spinale:

Volume tra 90 – 150 ml

Peso specifico 1.008

Pressione clinostatismo 150 mmH<sub>2</sub>O

ortostatismo 400 mmH<sub>2</sub>O

Turnover LCR nell'adulto: circa 500mL /die

Protidorrachia : 15-45 mg/dl

Glicorrachia : 40-80 mg/dL  
(2/3 glicemia)

# SINTESI e FUNZIONI

1. Prodotto nei plessi corioidei e nei ventricoli
2. Ricambio continuo attraverso i villi aracnoidei
3. Assorbe i traumi cranici
4. Regola la pressione intracranica
5. Fornisce nutrimento al sistema nervoso
6. Rimuove i cataboliti

# PRELIEVO DI CSF

## Rachicentesi

(puntura lombare tra la IV e la V vertebra)

Controindicazioni:

Iperensione endocranica

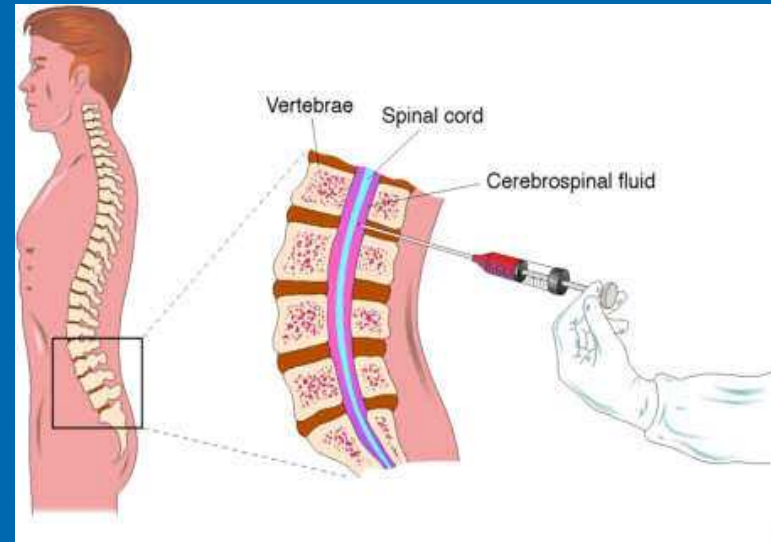
Disordini emostasi/coagul.

Infez. cutanee da miceti

Prelievo mediante puntura lombare da aliquotare in 3 provette consecutive

Quantità ottimale: 5-8 ml

Quantità minima: 1-2 ml



## TEMPO OTTIMALE DI PRELIEVO DEL CAMPIONE

- Preferibilmente prima dell'inizio della terapia antimicrobica, ma questa non deve necessariamente essere ritardata in attesa della puntura lombare.

## TEMPO FRA PRELIEVO DEL CAMPIONE E PROCEDURA ANALITICA

- I campioni devono essere trasportati e processati il più presto possibile.

## ACCORGIMENTI SPECIALI PER RIDURRE IL DETERIORAMENTO

- I campioni devono essere seminati in coltura il più presto possibile dopo il loro ricevimento in modo ottimale **entro 10 minuti e non oltre un tempo massimo di due ore.**

La lisi delle cellule ed i ritardi possono determinare un conteggio cellulare che non rispecchia la condizione clinica del paziente.

- Non refrigerare il campione fino a quando non sono completati l'esame microscopico e colturale.
- Successivamente il campione deve essere refrigerato e/o congelato a -80°C per eventuali approfondimenti successivi.

## TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

- Contenitore impermeabile sterile in contenitore di plastica chiuso.

## PROCEDURA ANALITICA SUL CAMPIONE- SICUREZZA

- Livello di contenimento 2 tranne in caso di sospette infezioni da microrganismi del gruppo 3; in questa evenienza le manipolazioni devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza con Livello di Contenimento 3.
- Sebbene la *N. meningitidis* appartenga al gruppo di Rischio 2, le direttive locali possono imporre che gli isolati sospetti di *N. meningitidis* debbano sempre essere manipolati in una cabina microbiologica di sicurezza.
- Tutte le manipolazioni su isolati sospetti di *N. meningitidis* che si ritiene possano generare aerosol devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.
- I Laboratori devono porre in atto provvedimenti cautelativi di sicurezza durante la manipolazione dei campioni di LCR. Le politiche di gestione del laboratorio che tengono conto delle condizioni di rischio locale possono disporre che debba essere utilizzata una cabina microbiologica di sicurezza quando si dispensa il campione.



## ESAME DEL LIQUOR

il campione deve essere inviato **IMMEDIATAMENTE** al  
LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CLINICA per:

- esame macroscopico
- conta cellule, glicorrachia, protidorrachia
- esame microscopico dopo colorazione di GRAM  
o eventualmente colorazione: Giemsa  
Inchiostro di China  
Ziehl-Neelsen
- esame colturale  
ove appropriato:
  - ricerca di antigeni batterici
  - PCR

# ESAME MACROSCOPICO

- **VOLUME**
- **ASPETTO:** limpido, sublimpido, opalescente, torbido, purulento, ematico; presenza di coagulo o fibrina

**ematico:** → emorragia cerebrale, trauma spinale

da prelievo → riduzione sequenziale del conteggio dei G.R.

# ESAME MACROSCOPICO

- **COLORE:** dopo centrifugazione
  - incolore (con ev. sedimento ematico se PL traumatica recente)
  - **lievemente xantocromico**  
(colorazione giallognola del sovrinatante)
  - **xantocromico**  
la xantocromia se presente in tutti i campioni sequenziali suggerisce una emorragia nello spazio subaracnoideo

# Esame macroscopico e dei parametri chimico-clinici

## MENINGITE BATTERICA

liquor torbido

WBC/ml: 1000-100.000 (PMN)

rapporto glucosio/glicemia <0.4

Proteine: >450mg/l

pressione : >180 mmH<sub>2</sub>O



## MENINGITE VIRALE

liquor limpido

prevalenza linfociti

WBC/ml: 50-200

glucosio normale

proteine <150mg/l



# ESAME MICROSCOPICO

## da LCR intero



- conteggio totale  
standard delle cellule e  
differenziale dei leucociti  
  
su campione non centrifugato,  
preferibilmente dall'ultimo  
prelievo  
  
→ I conteggi non devono essere  
eseguiti su campione che contiene  
un coagulo

## da sedimento



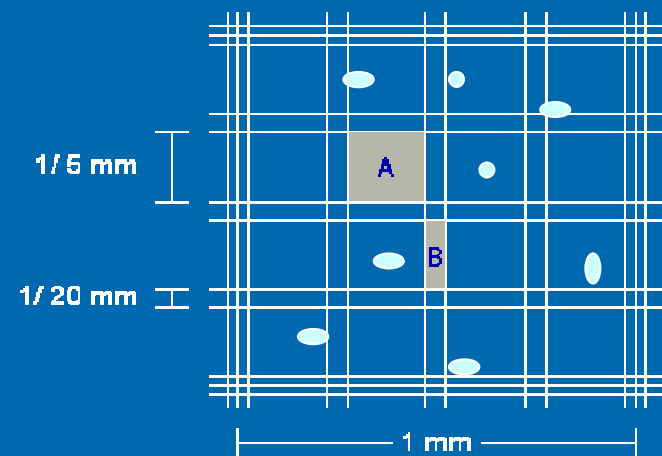
- colorazioni  
  
Gram  
Blu di metilene  
Giemsa
- Esame colturale

# CITOLOGIA VALORI NORMALI

	ADULTO	NEONATO
➤ <b>LEUCOCITI</b>	<b>&lt; 5 / mm<sup>3</sup></b>	<b>&lt; 30 mm<sup>3</sup></b>
LINFOCITI	40-80 %	5 – 35 %
MONOCITI	15-45 %	50 – 90 %
POLIMORFON.	0 - 6 %	0 – 8 %
➤ La conta differenziale dei G.B. è facoltativa		
➤ <b>EMAZIE</b>	<b>assenti</b>	
➤ <b>Cellule di PIA-ARACNOIDE</b>	<b>raramente</b>	

# Citometria

- Risospendere il liquor con soluzione colorante (soluz.acquosa di blu di metilene, ev. acido acetico per consentire la lisi dei G.R.)
- Lettura in camera di conteggio

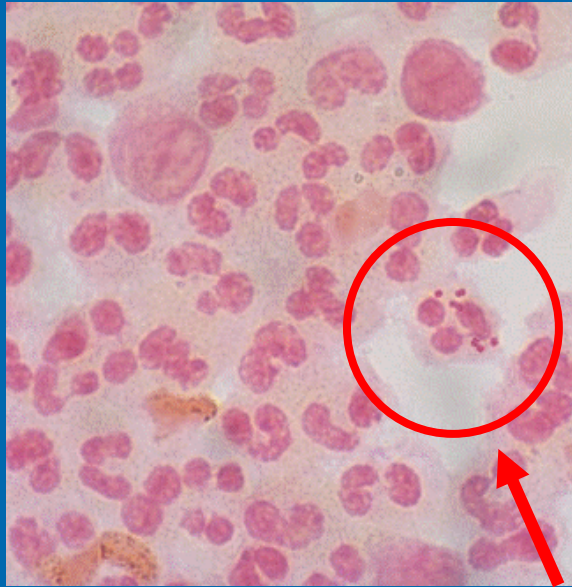


# Citometria

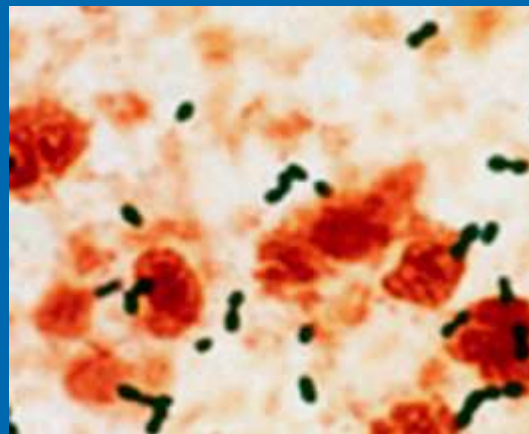
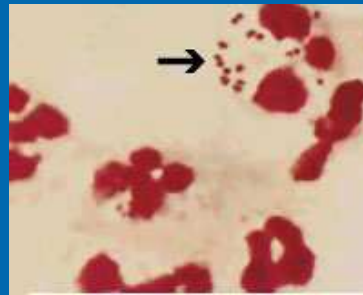
- La valutazione del rapporto polimorfonucleati/neutrofili non è sufficiente ad indicare l'eziologia dell'infezione
- La meningite virale, generalmente associata a linfocitosi del LCR, presenta nelle fasi precoci dell'infezione una predominanza neutrofila



MENINGITE BATTERICA  
colorazione di Gram

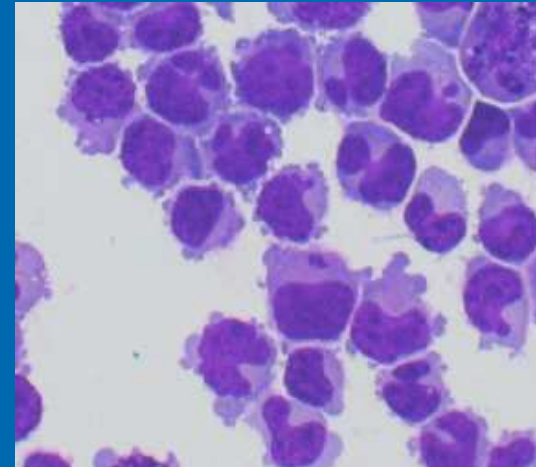


*N. meningitidis*



*S. pneumoniae*

MENINGITE VIRALE  
colorazione di Giemsa



Cellule linfo-monocitarie

# Colorazione di Gram: sensibilità

- La sensibilità varia dal 60 al 97% - la specificità si avvicina al 100% in assenza di terapia antibiotica
- In caso di trattamento precoce il VPN si riduce al 40-60%
- variabilità in funzione dell'agente batterico isolato:  
sensibilità  $\geq 90\%$  per *S. pneumoniae*,  $<50\%$  per *L.monocytogenes*
- correlazione tra carica batterica e positività al Gram

inoculo	sensibilità
$<10^3$	25%
$10^3 > < 10^4$	60%
$> 10^5$	97%



In casi particolari la colorazione di GRAM eseguita sul materiale da scarificazione petecchie /vescicole può essere un supporto diagnostico importante: nell'impossibilità di effettuare la rachicentesi, il riscontro di diplococchi gram negativi nello striscio è diagnostico per infezione da *N. meningitidis*

## ESAME COLTURALE

Centrifugare il campione per 10 minuti a 2500 rpm

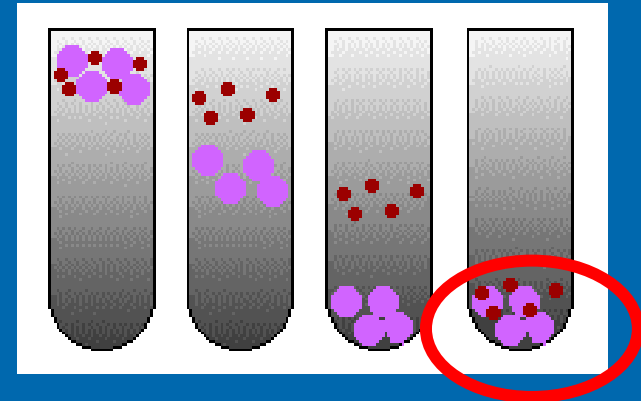
dal sedimento allestire le colture in:

- Agar sangue di montone al 5%
- Agar cioccolato arricchito  
→ Incubazione in CO<sub>2</sub> al 5% a 35-37°C per 48/72 h

ev. terreni selettivi  
(es. Ag. Sabouraud per *Cryptococcus neoformans*)

Flacone per emocoltura in aerobiosi

ev. brodo di arricchimento  
(es. BHI)



### MENINGITE BATTERICA

Coltura del liquor: positiva nel 70-80% dei pazienti non trattati.

emocoltura: positiva nel 40-60% dei casi

→ va eseguita sempre anche se non è possibile effettuare la rachicentesi

# RICERCA DI ANTIGENI BATTERICI SOLUBILI NEL LIQUOR

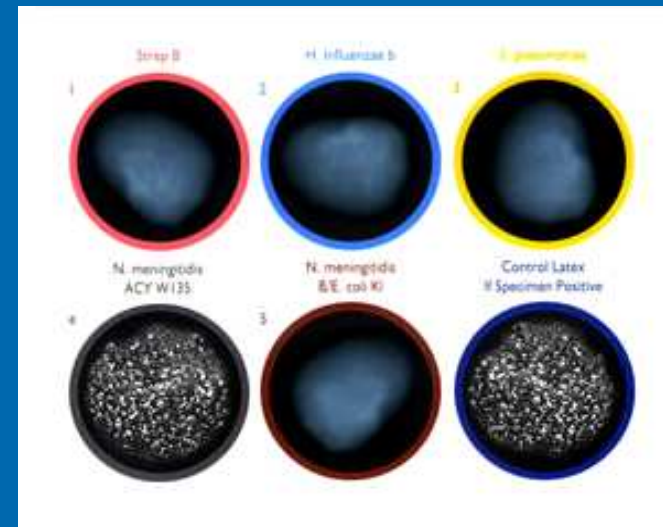
*S. agalactiae*

*H. influenzae* tipo b

*S. pneumoniae*

*N. meningitidis* A C Y/ W135

*N. meningitidis* B / *E. coli* K1



Particelle di lattice sensibilizzate con anticorpi verso polisaccaridi specifici di sierogruppi/sierotipi batterici :  
una agglutinazione visibile indica un risultato positivo

# RICERCA DI ANTIGENI BATTERICI SOLUBILI

- **LIMITI:** sensibilità e specificità variabili in diversi contesti clinici (casi sporadici, epidemie)

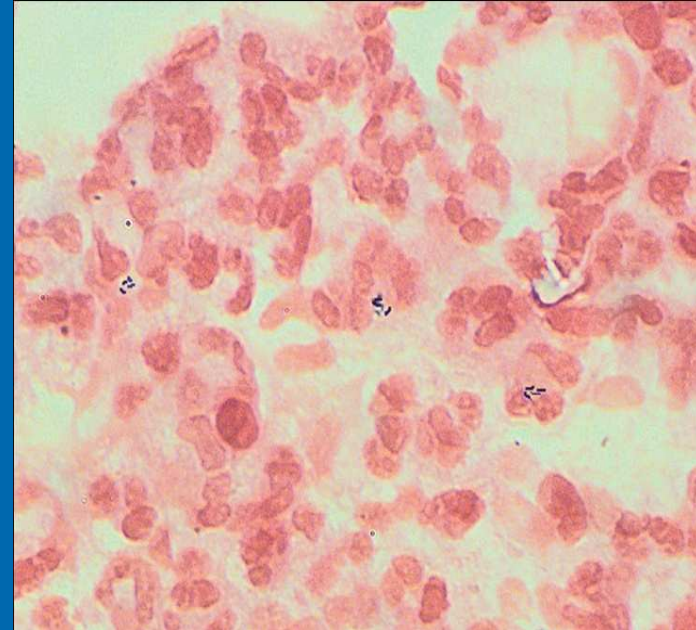
## **Prova di agglutinazione al lattice (PAL)**

- I batteri che comunemente causano meningite presentano sulla loro superficie antigeni di natura polisaccaridica che possono essere rilevati con la PAL. La cui **affidabilità** è tuttora **controversa** e la **sensibilità è scarsa**. È stato dimostrato che trattamenti con ultrasuoni aumentano la sensibilità delle PAL fino a 600 volte. È stato raccomandato che i lattici non siano utilizzati su LCR se non in caso di conteggi anomali di cellule, di esame negativo allo striscio colorato con Gram e quando il LCR e le emocolture permangono negative per oltre 48 ore.
- **Il clinico deve essere informato che una positività al lattice può indicare la presenza di un agente infettivo, mentre un risultato negativo non rappresenta un esito definitivo.**
- L'uso di routine dei lattici non è raccomandato in questo MNS.



## Meningite da *Listeria monocytogenes*

- ◆ 80% sierotipi Ia, IIa e Ivb
- ◆ mortalità 29%
- ◆ fattori di rischio:
  - età estreme
  - alcoolismo
  - cirrosi
  - terapia corticosteroidea
  - insuff. renale cronica
  - patologie del collagene
  - 25% gravidanza 3°trimestre



meningite batterica ma spesso a liquor limpido per la scarsa cellularità

# MENINGITE CRONICA da miceti

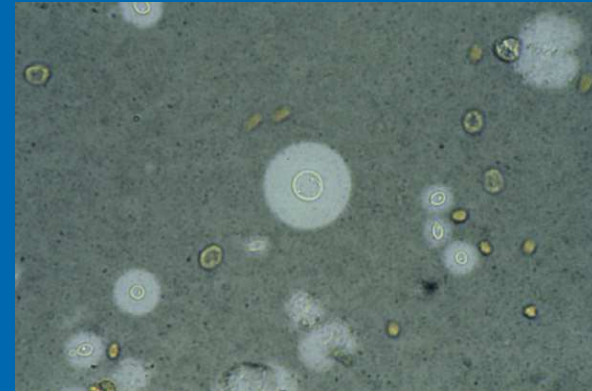
## ESAME DEL LIQUOR

1. aumentata pressione del liquor
2. elevato contenuti di proteine
3. diminuito livello di glucosio (45% della glicemia)
4. leucocitosi (40-400/mm<sup>3</sup> - PMN)
5. *C. neoformans* presente nel liquor (India ink)
6. tests sierologici per antigene criptococcico

## ESAME CULTURALE: Semina in agar Sabouraud

In caso di sospetta meningite criptococcica:  
esame microscopico a fresco dopo **colorazione  
con India ink**

*(Soluzione acquosa 1:1 inchiostro di china)*





# EMORRAGIA

In emorragie molto recenti il liquor ha un aspetto ematico uniforme nelle tre provette consecutive\*.

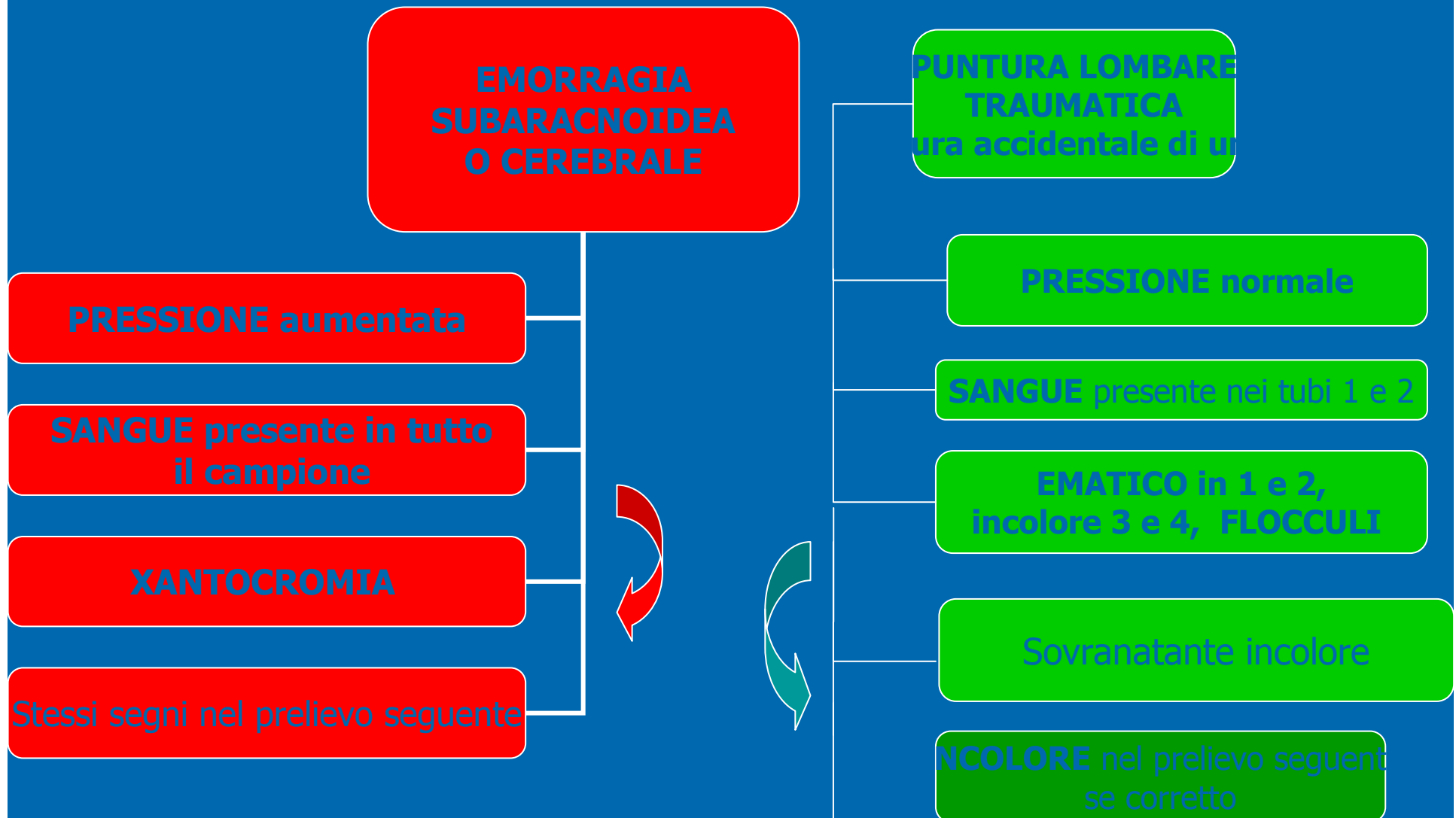
Dopo centrifugazione il sovrinatante ha un aspetto normale, incolore e limpido con pellet di emazie

In emorragie pregresse intracerebrali o subaracnoidee il liquor è xantocromico da 1+ a 4+ a causa dell'emolisi e dei derivati dell'Hb: ossiemoglobina, metaemoglobina e bilirubina\*\*. Anche dopo centrifugazione il sovrinatante rimane xantocromico.

**\*Le emazie restano integre nel liquor circa 2-3 ore; sono necessarie almeno 12 h perché l'Hb rilasciata dalle emazie venga convertita a bilirubina**

**\*\* La bilirubina persiste nel 70% dei pz a 3 settimane dall'evento**

# Diagnosi Differenziale: emorragia / prelievo traumatico raccolta in 3 provette diverse



## Casi di meningite Osp. di Trento anno 2012

- *N. meningitidis* n. 2
- *Haemophilus influenzae* Hib n.2
- *S. pneumoniae* n.4
- *Listeria monocytogenes* n.2



ERROR: undefined  
OFFENDING COMMAND: Gaino\_L'esame

STACK:

```
(3)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20121116110427+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20121116110427+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```