

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Le nuove tecnologie per la gestione dell'urgenza/emergenza in microbiologia: le infezioni del sistema nervoso centrale



Dr.ssa Lucia Collini
Microbiologia e Virologia
Ospedale S.Chiara-Trento

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



URGENZA vs EMERGENZA

URGENZA: Ci troviamo nella situazione in cui normalmente una persona non è in pericolo di vita, si presenta una situazione dannosa e pericolosa e che potenzialmente potrebbe aggravarsi (**ciò che è necessario al più presto**)



EMERGENZA: Ci troviamo nella situazione in cui una persona è in pericolo di vita. Evento che richiede trattamento immediato per evitare ulteriori danni al paziente (**tempi intervento brevissimi**).

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



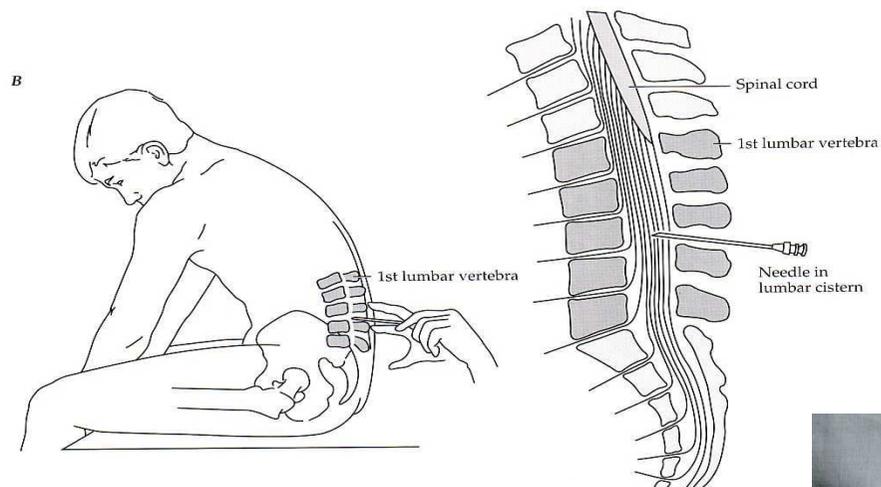
Il LIQUOR è sempre un'emergenza medica



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Prelievo del liquor: PERCHE' ?



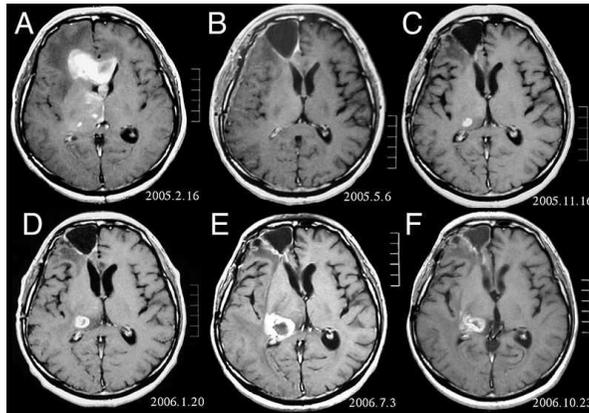
La rachicentesi



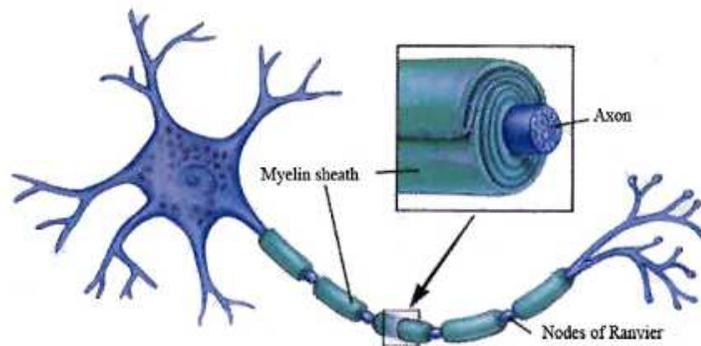
3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



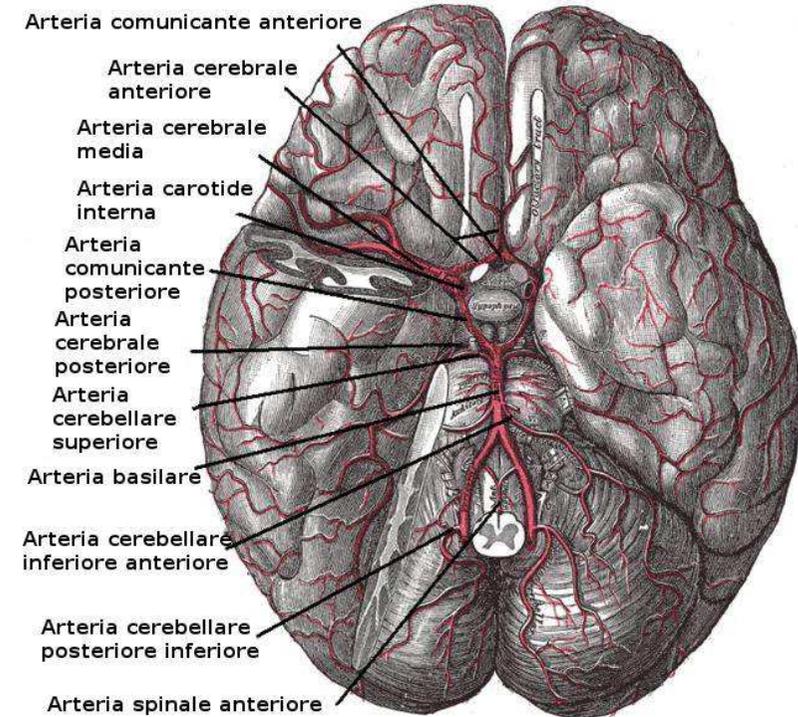
INDICAZIONI



Tumori del SNC



Emorragia subaracnoidea



Malattie demielinizzanti

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Infezioni del Sistema Nervoso Centrale



Meningiti

Encefaliti

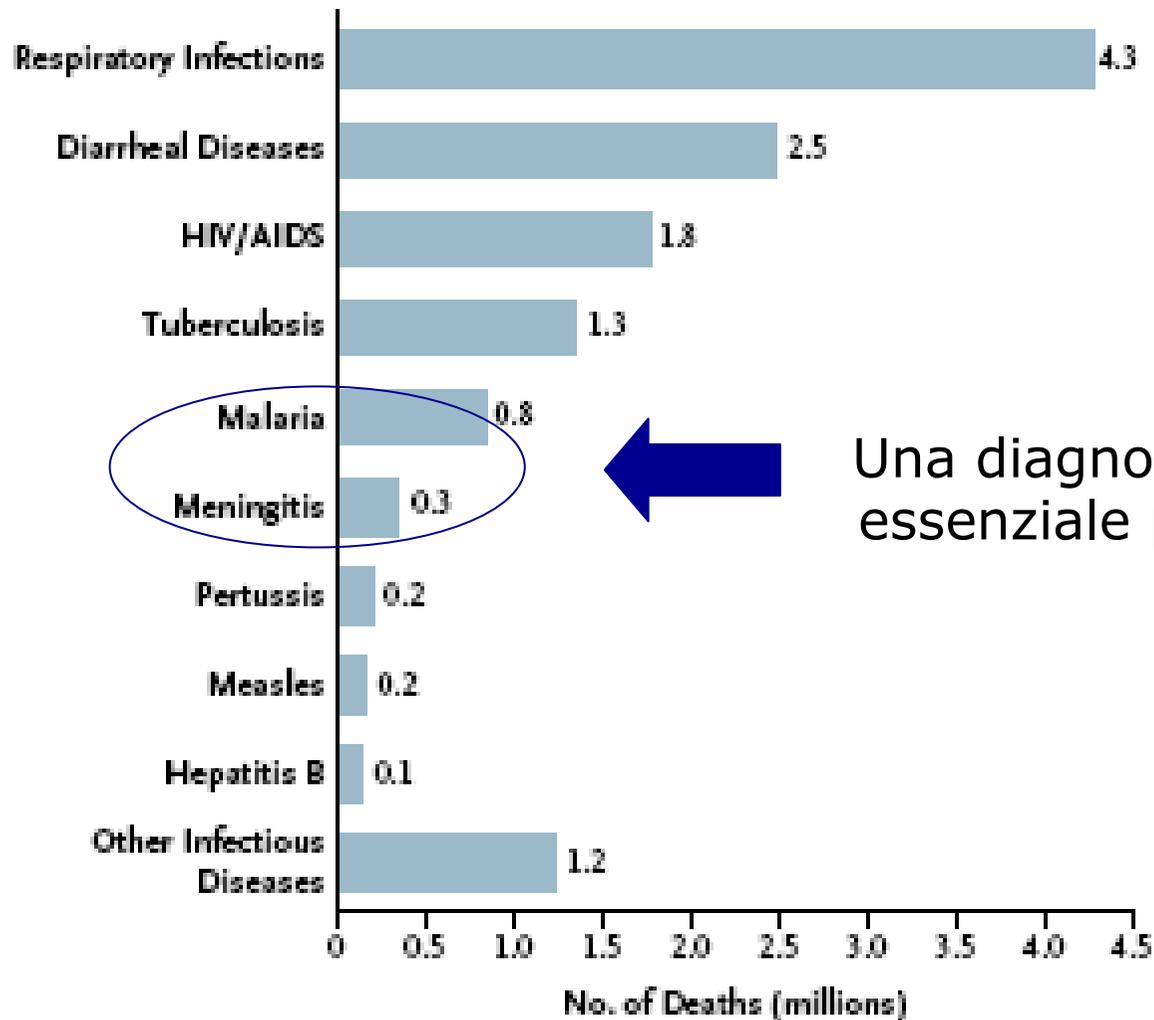
Forme associate (meningoencefaliti, ...)

Mieliti

Ascessi

Le meningiti restano ancora causa di mortalità e morbidità

Cause principali di morte nel mondo per malattie infettive



Una diagnosi rapida e accurata è essenziale per un buon *outcome*

ed

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.



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

- 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





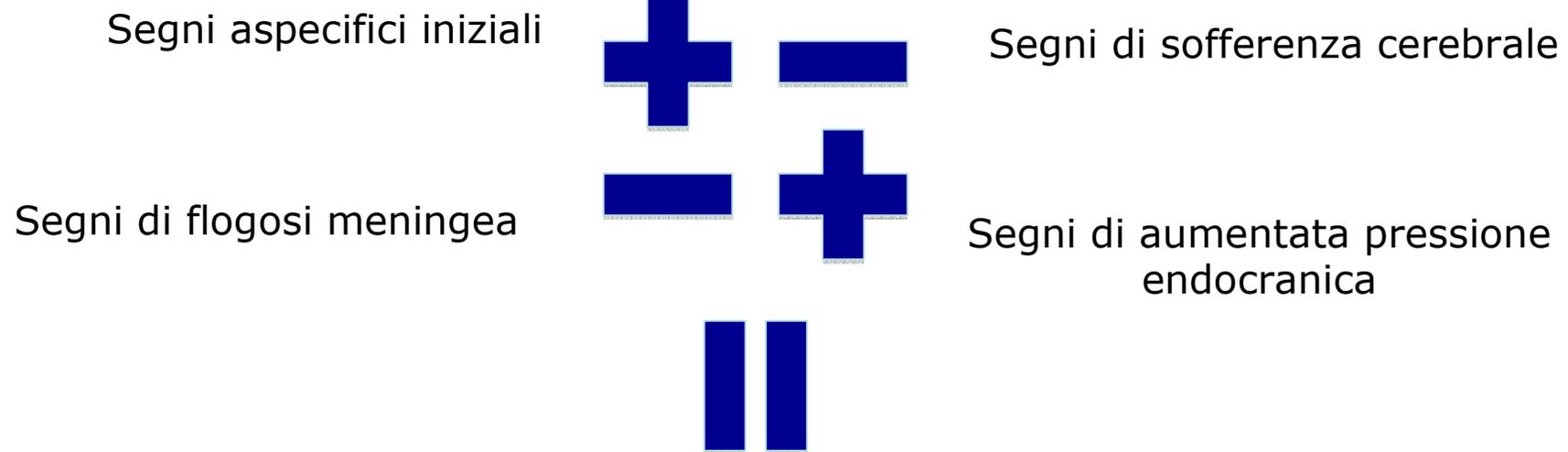
Rapidità della diagnosi di meningite e prognosi del paziente

Risk Factor	Mortality With Risk Factor	Mortality Without Risk Factor
Altered mental status	49%	16%
Age >60 years	37%	17%
Seizures within 24 hours	72%	18%
CSF protein >250 mg/dL	32%	4%
Leukopenia	63%	11%
Hemoglobin <11 mg/dL	16%	5%
Platelets <100k	25%	6%



Il *gold-standard*
per la diagnosi è l'analisi del liquor

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Spesso è difficile distinguere tra meningite batterica e virale

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

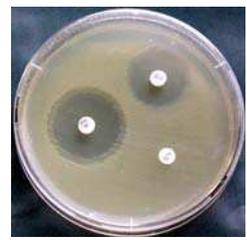
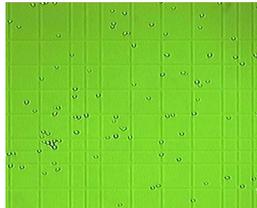


Lavorare su due binari paralleli che spesso si devono incontrare

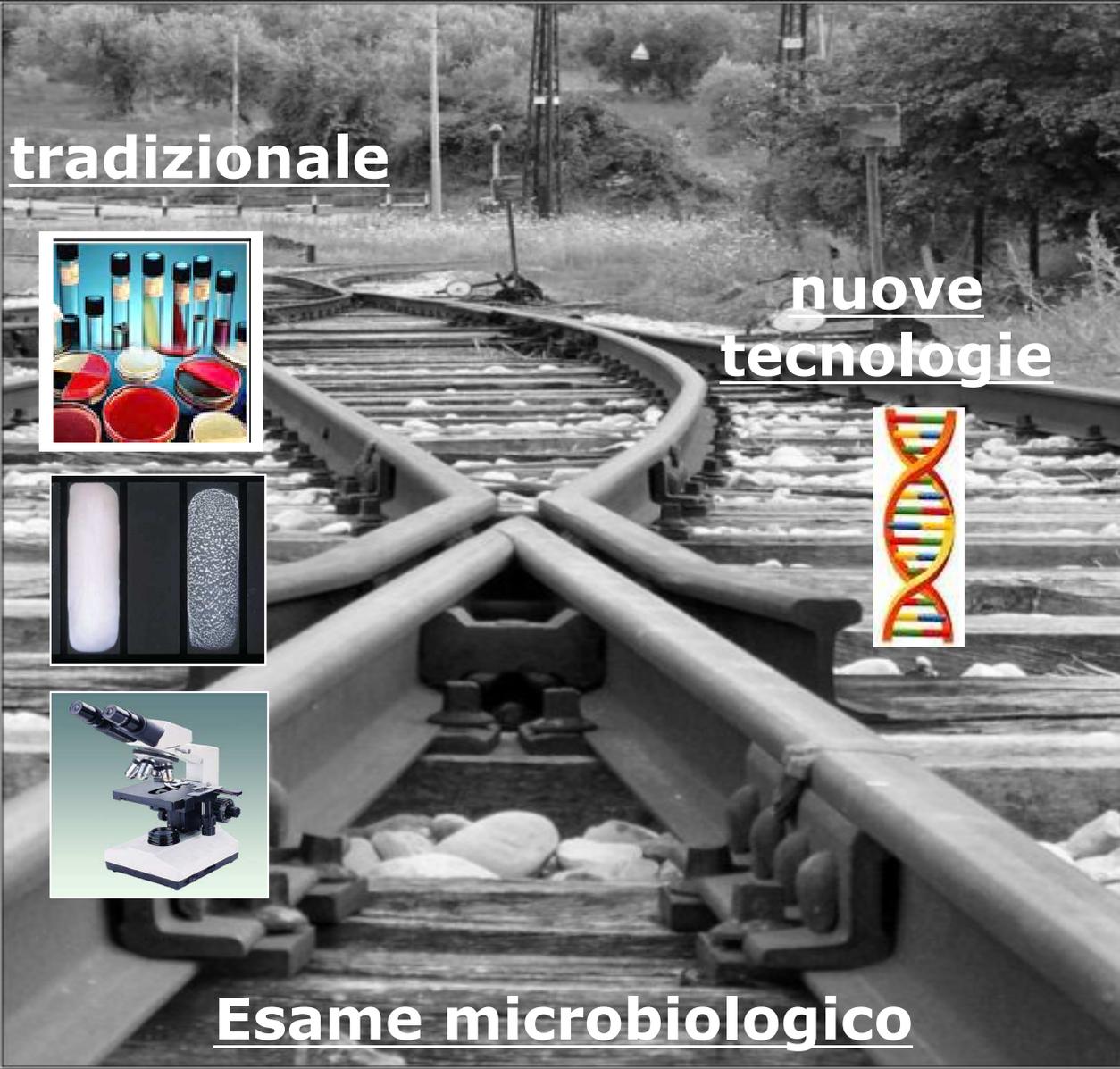


Esame chimico
fisico

Esame
microbiologico



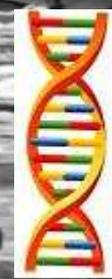
3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



tradizionale



nuove
tecnologie



Esame microbiologico



Esame chimico fisico

Parametri liquorali: diagnosi differenziale

Index	Normal	Bacterial	Viral	Fungal (tuberculosis)
WBC/micro L	<5	>1,000	<1,000	<1,000
Differential	<15% neutrophils	>80% neutrophils	<15% neutrophils	<15% neutrophils
Glucose (mg/dL)	45-65	reduced	normal	reduced
CSF: blood glucose	0.6	reduced	normal	Markedly reduced
Protein (mg/dL)	20-45	>250	50-250	>250
Opening pressure (cm/H2O)	<20	Normal to high	Normal to high	Normal to high

White Blood Cell count (range cells per microL: BM <100->1000 ; VM<100-1000)

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



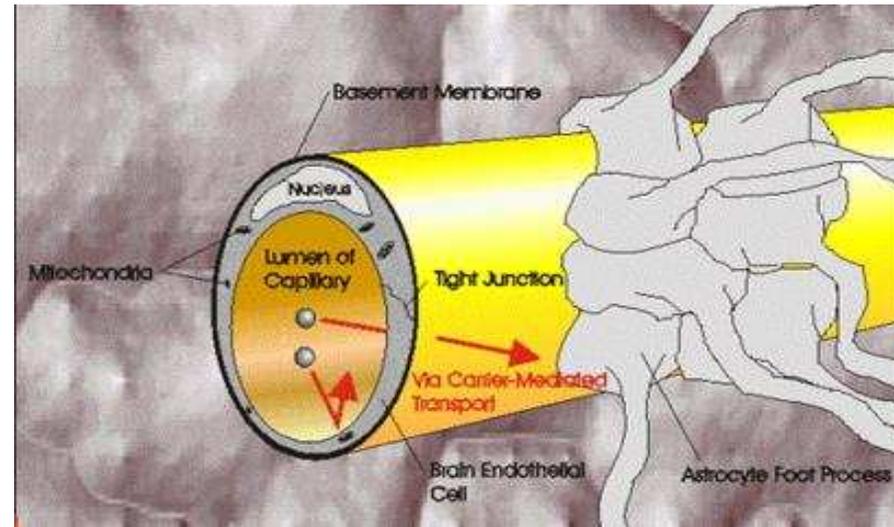
Dosaggio dei lattati



Fornisce maggiori informazioni della glicorrachia per differenziare le meningiti batteriche da quelle virali (v.r. 9-25 mg/dl); Aumento in corso di meningite

La sua concentrazione è indipendente da quella sierica perché a pH fisiologico, essendo la molecola ionizzata, difficilmente attraversa la barriera

Rimane elevato dopo l'inizio della terapia per cui non è un buon marker di risposta alla terapia





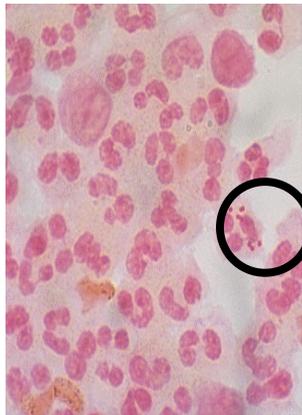
Esame
microbiologico

Il vetrino Gram è positivo dal 50 all' 80% dei casi

Il vetrino

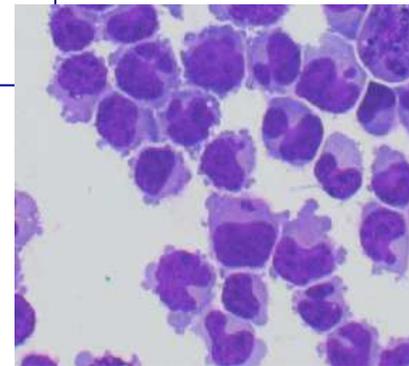


Specificità > 97%
Rapidità
Basso costo



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

MENINGITE VIRALE
dopo colorazione di Gram:
negativo

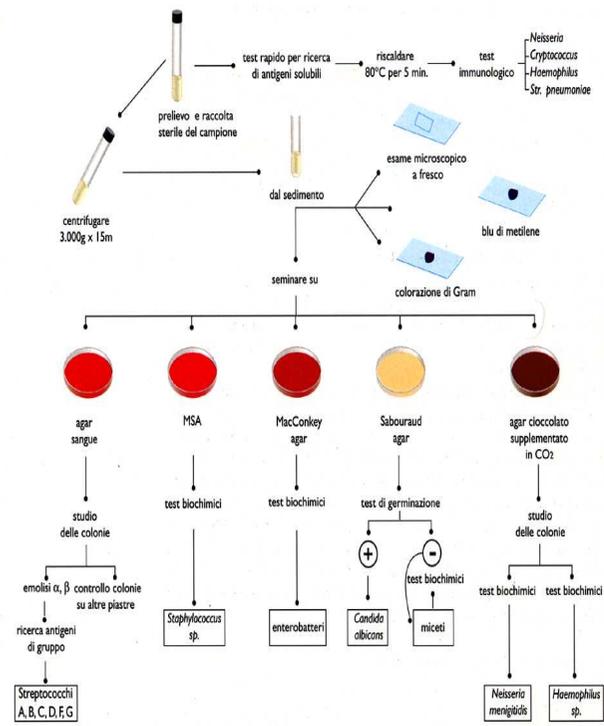


3° CONGRESSO NEWMICRO

...The need for speed: il laboratorio di Microbiologia e le Urgenze Infettive



ESAME MICROSCOPICO e COLTURALE



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

Patogeno	Leucociti/mL (x 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

La sensibilità scende sotto il 50% nei pazienti già in terapia antibiotica



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%

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

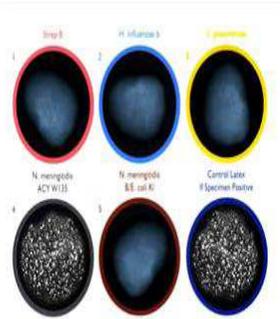
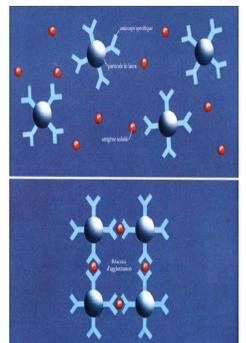
Inclusion : nombre d'échantillon de l'étude ; Gram ± : nombre d'examen de la coloration de Gram positif/negative ; culture ± : culture positive/negative ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive negative ; Nm : *N. meningitides* ; Spn : *S. pneumoniae*.

3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



Risultato esame colturale ha un tempo ≥ 10 ore

**COSA ABBIAMO A DISPOSIZIONE PER SODDISFARE
 "THE NEED FOR SPEED" ???**



La ricerca degli antigeni solubili è
 veloce ma spesso è negativa o
 genera falsi positivi

3 mn 100°C

Heat sample

5 mn at 3000g

Centrifuge

40 µL 1 drop

Mix supernatant + latex

10 mn at ~120 RPM

Rotate and read

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



COSA ABBIAMO A DISPOSIZIONE PER SODDISFARE "THE NEED FOR SPEED" ???

Binax è un test
immunocromatografico su
membrana realizzato per rilevare
l'antigene solubile dello
Streptococcus pneumoniae nelle
urine e nel Liquor



Nuovo test in immunofluorescenza
rapida con metodica a flusso laterale
(Quidel-DID) realizzato per rilevare
Streptococcus pneumoniae nelle urine
(su Liquor non validato)

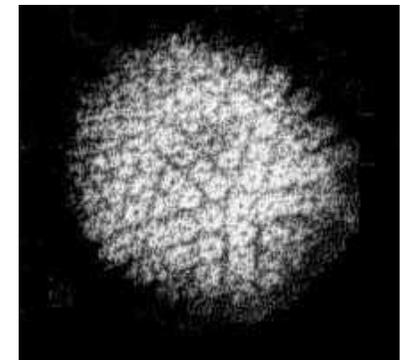
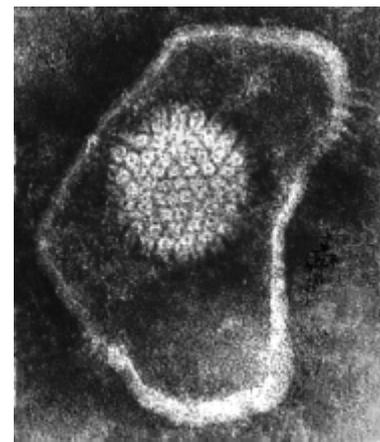
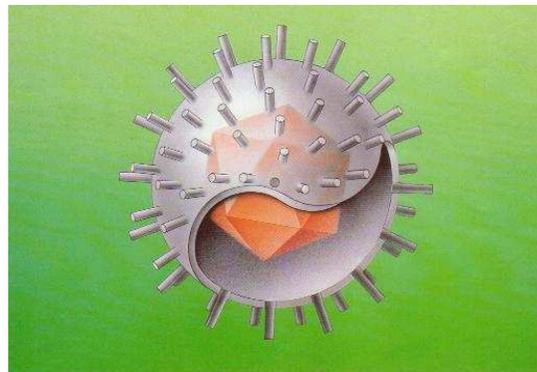
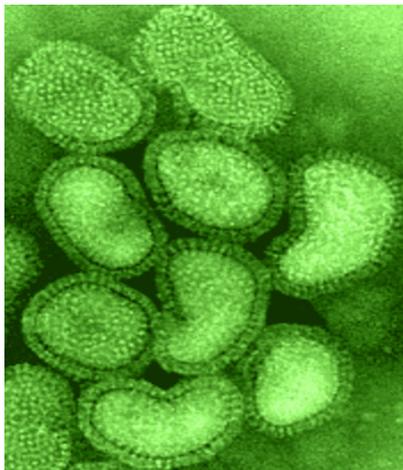


3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Da non dimenticare:

Sono più di 100 gli agenti eziologici di infezioni del sistema
nervoso centrale, per lo più VIRALI !!!



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



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



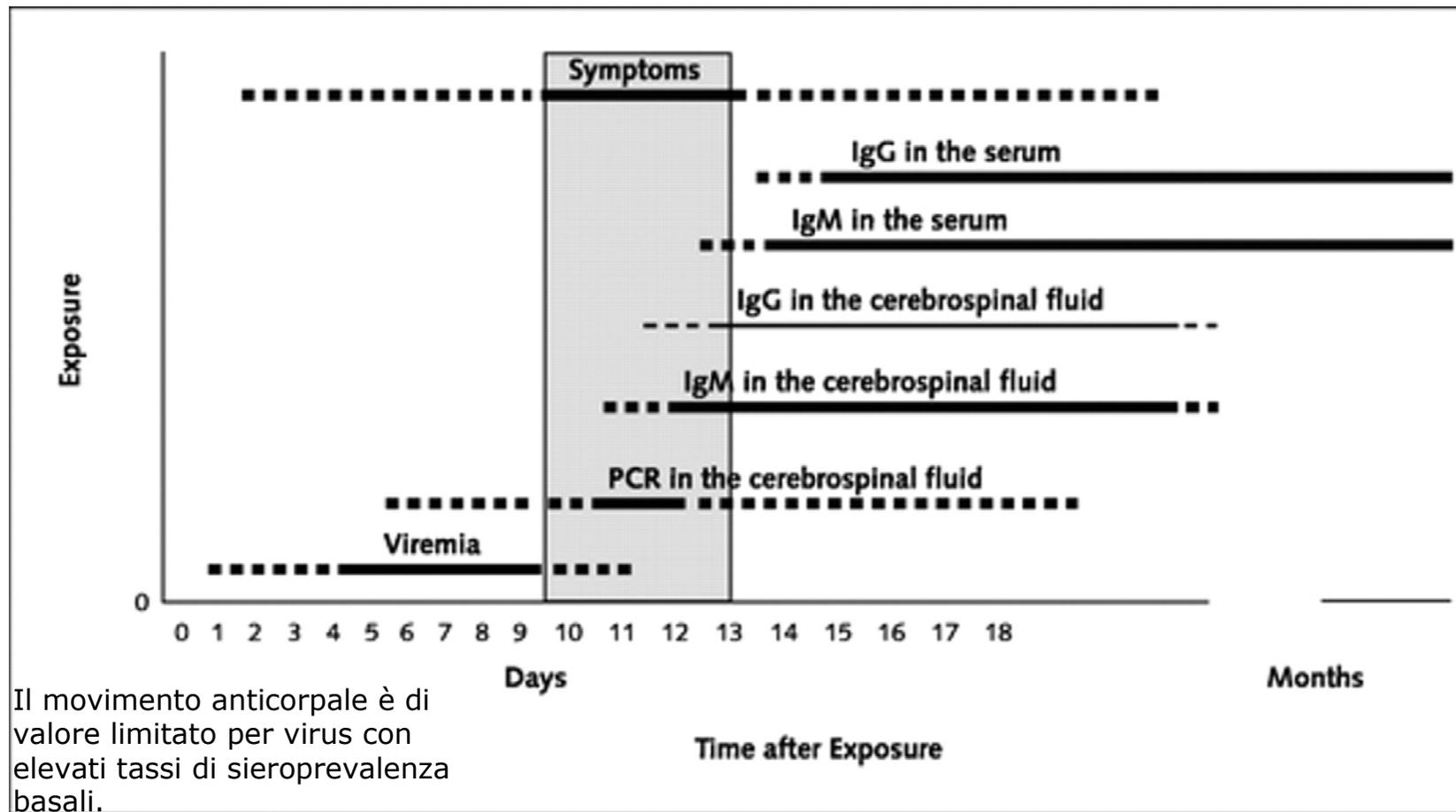
Il fattore tempo è cruciale (10-30 gg della coltura)

Poco sensibile

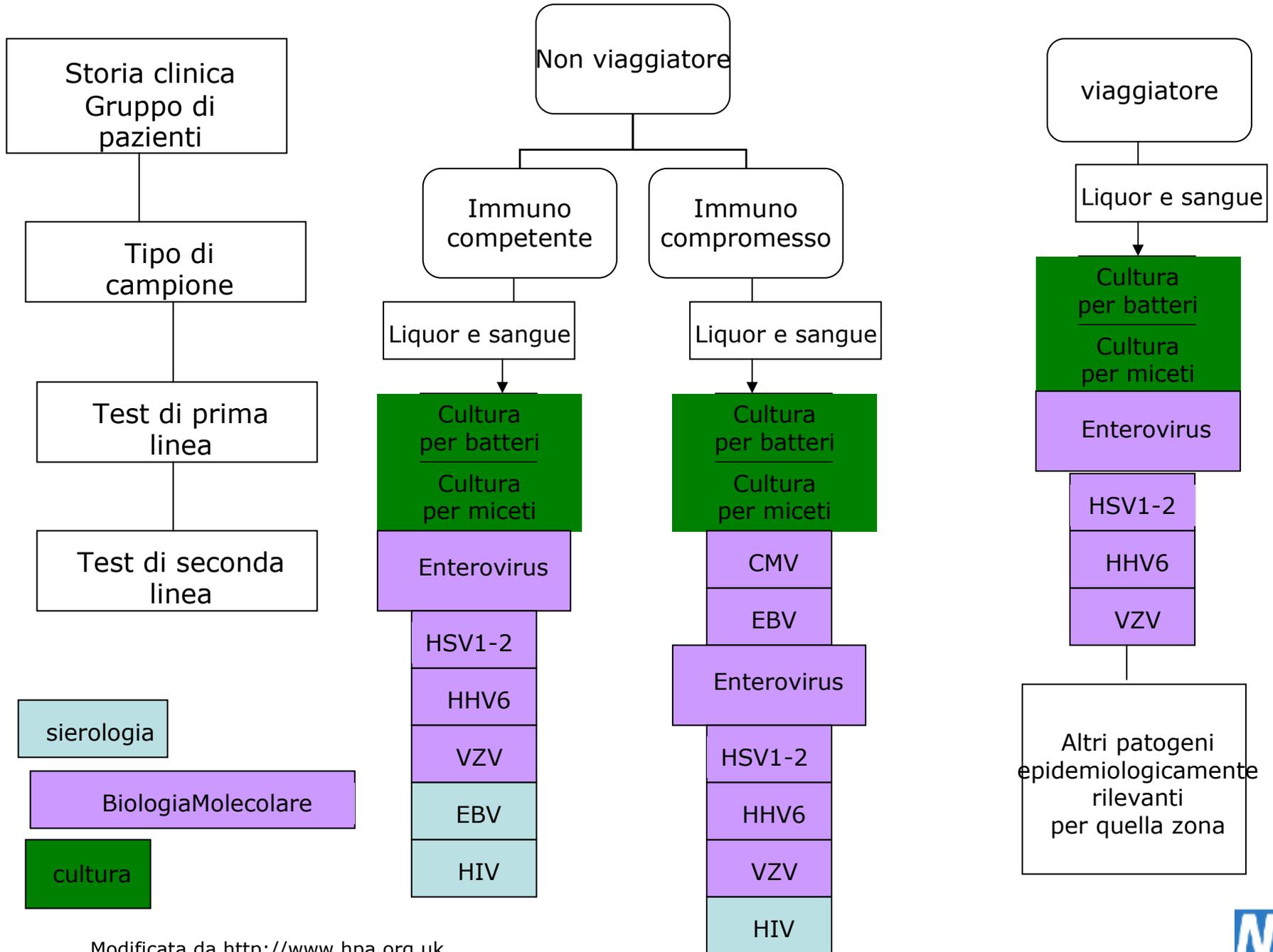
Non tutti i virus crescono in coltura!!!



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



WORKFLOW INFEZIONI SNC

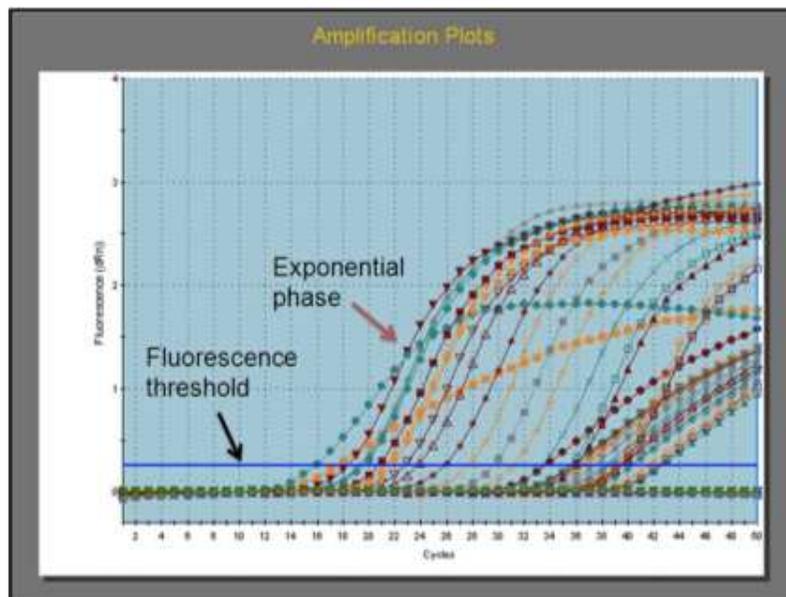


Modificata da <http://www.hpa.org.uk>

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Amplificazione dell'acido nucleico (NAT) ormai da più di dieci anni



Nuove tecnologie
Progresso rapido e continuo per
avere risultati sensibili e
specifici, ma il più possibile in
automazione

PCR Real Time

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%)



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**

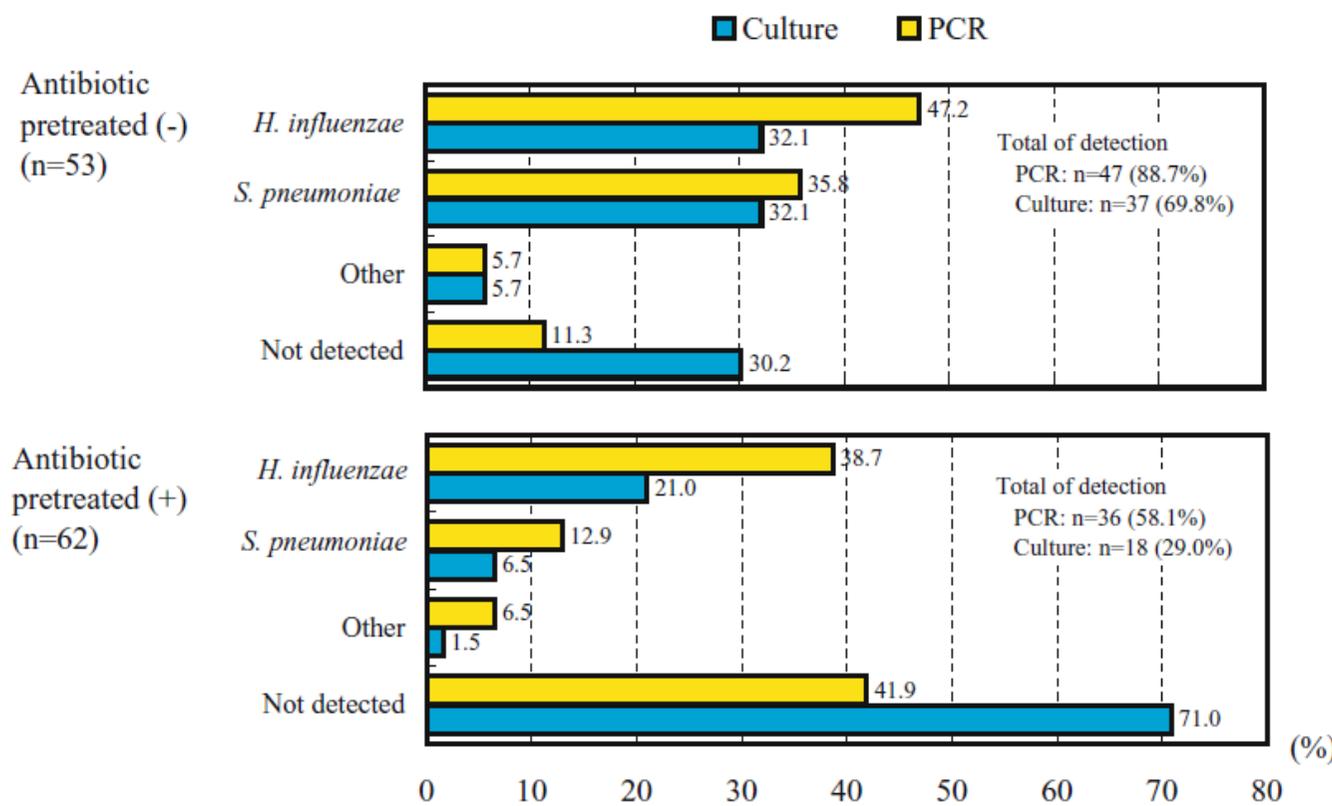


Fig. 1. Influence of prior antibiotics on the detection of causative pathogens by real-time PCR or culturing



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)



per gli *Enterovirus*
e i *ParvovirusB19* è l'unica tecnica disponibile

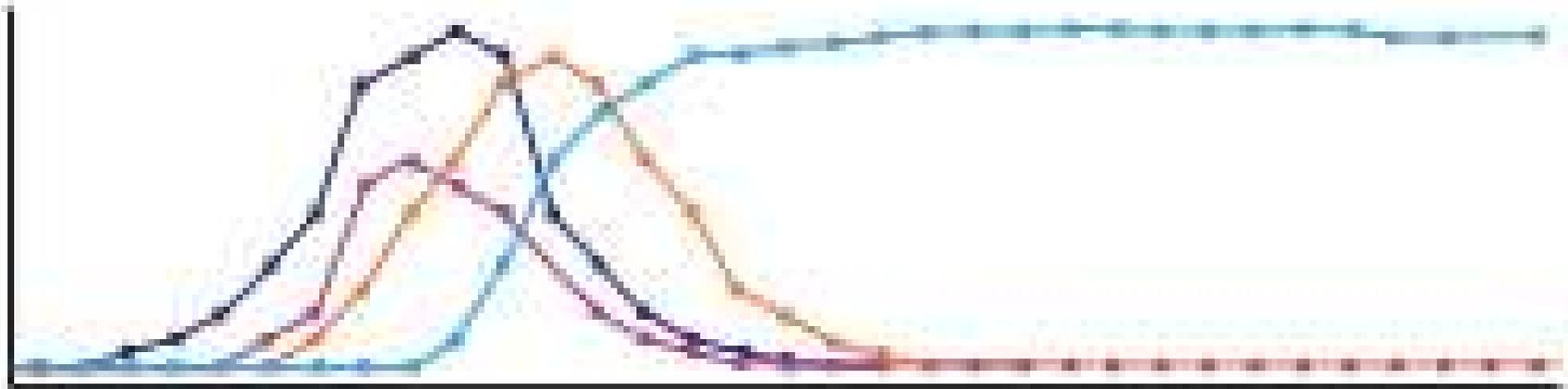


Diversi studi hanno suggerito che il numero di copie
di acido nucleico virale (*viral load*) può essere un
marker per la gravità della malattia e può aiutare a
predire l'esito dell'infezione



PCR E INDAGINI SIEROLOGICHE

Serological Detection of Virus Specific Antibodies



Acute illness Recovery

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

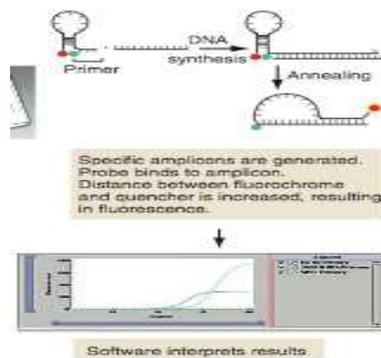
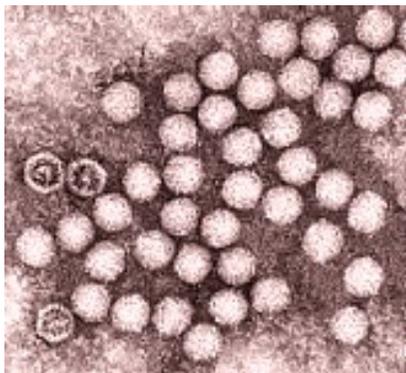
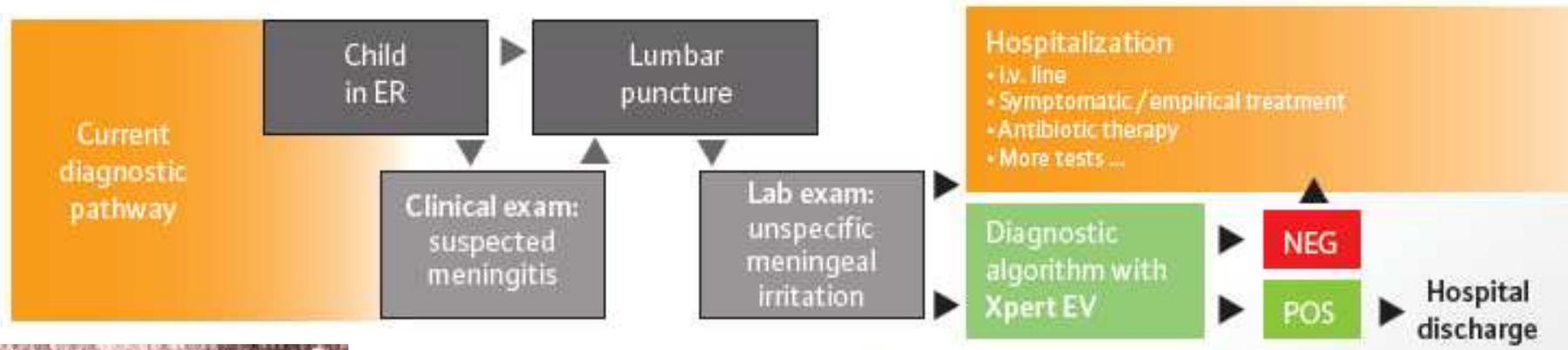
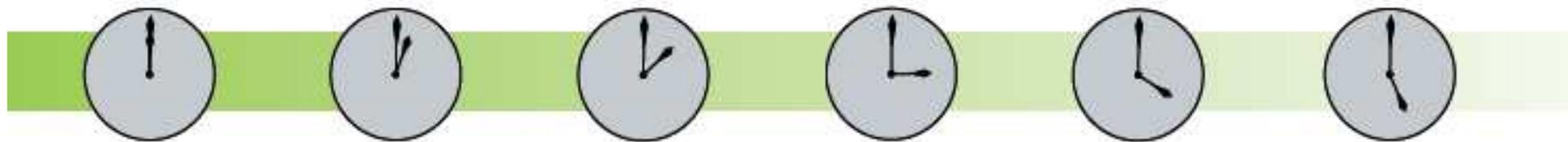
Remote



I test sierologici non offrono una risposta rapida

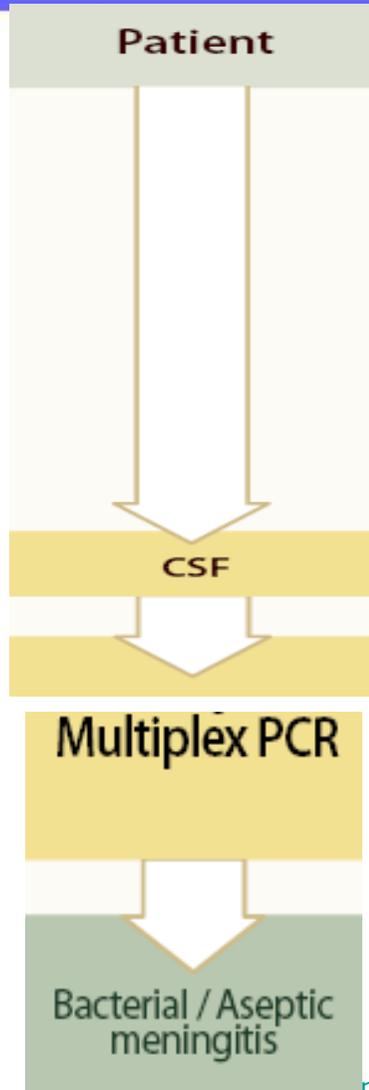


Real time in microfluidica: Risultati in ~2 ore

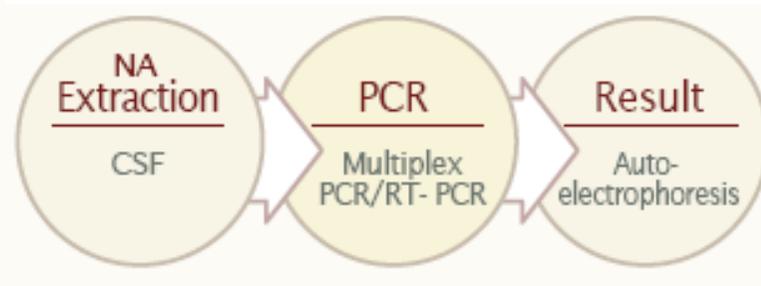




So Youn Shin, et al. Evaluation of the Seeplex® Meningitis ACE Detection Kit for the Detection of 12 Common Bacterial and Viral Pathogens of Acute Meningitis, Ann Lab Med, 2012;32



Multiplex PCR



- HSV1
- HSV2
- VZV (HHV3)

- EBV (HHV4)
- CMV (HHV5)
- HHV6

- Enterovirus

* Meningitis virus 2 panel covers Poliovirus, Echovirus, and Coxsackievirus.

Ricerca e identifica più virus e batteri simultaneamente

Ideale per infezioni ad eziologia multipla

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

[Neisseria meningitidis](#) [Methods in Molecular Biology](#) Volume 799, 2012, Detection of Neisseria meningitidis in Cerebrospinal Fluid Using a Multiplex PCR and the Luminex Detection Technology [Jens Kjølse Møller](#)

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Multiplex PCR

Ricerca il DNA di *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, Herpes Simplex Virus (type 1 + type 2), Varicella-Zoster Virus e simultaneamente l'RNA di Enterovirus.

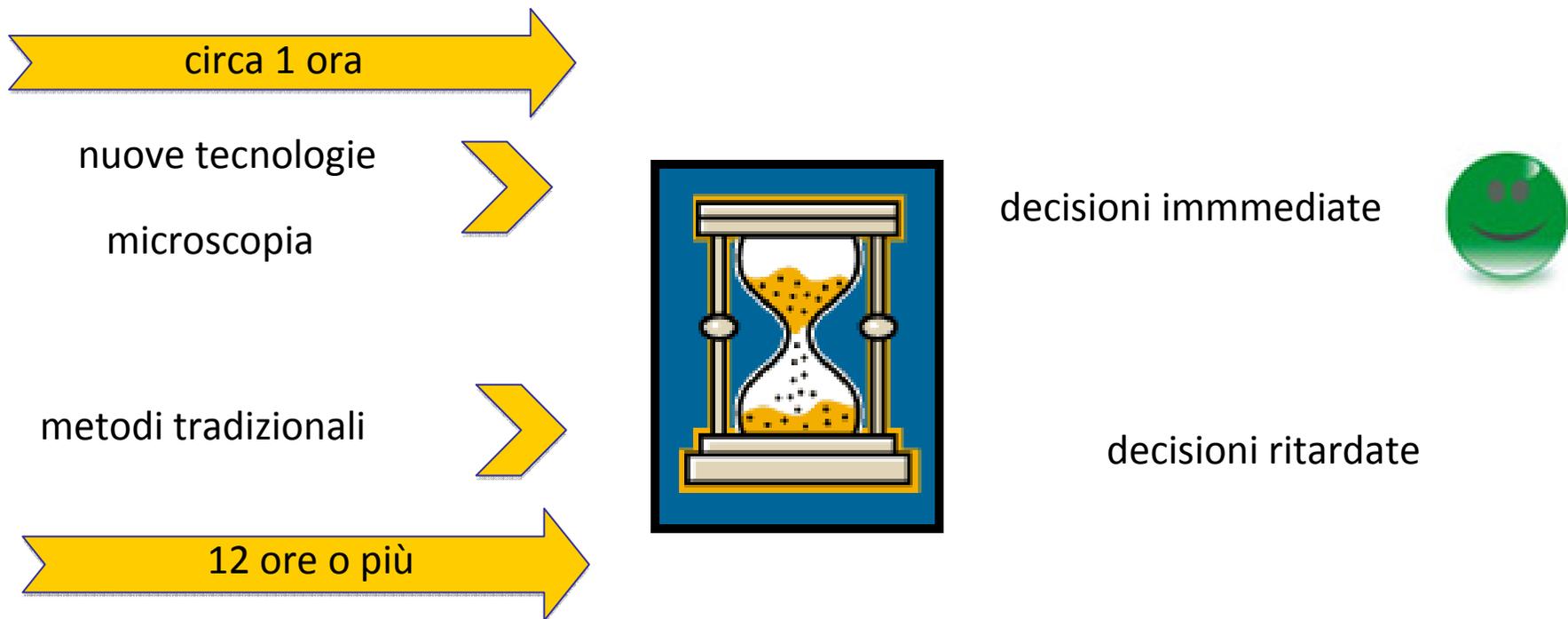


Differenziazione fra meningite batterica e virale in poco tempo con ottimi valori di sensibilità e specificità (rapidità è importante per una precoce profilassi e migliore prognosi)

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



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

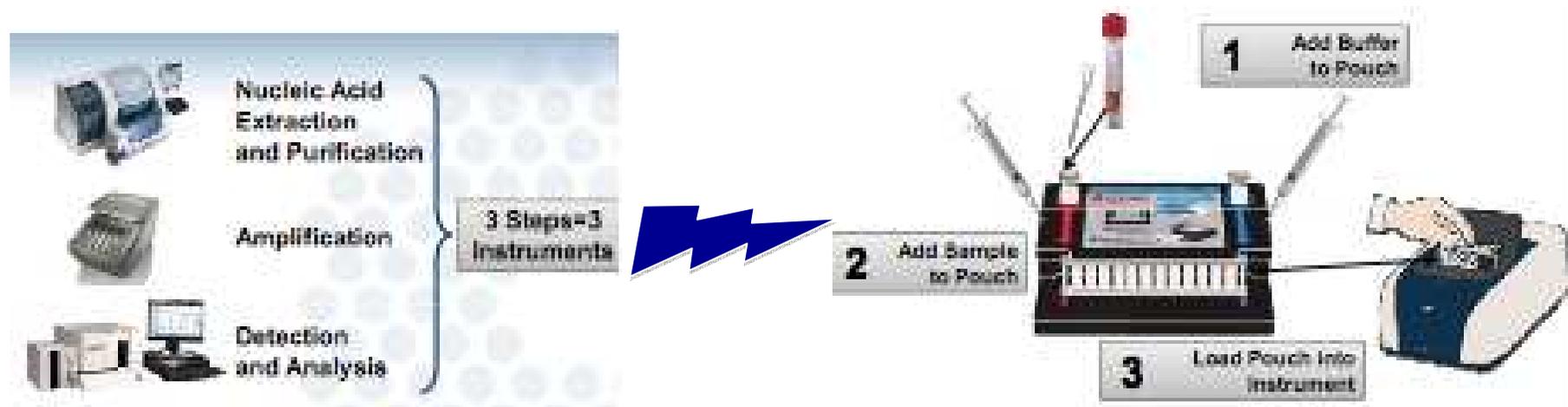




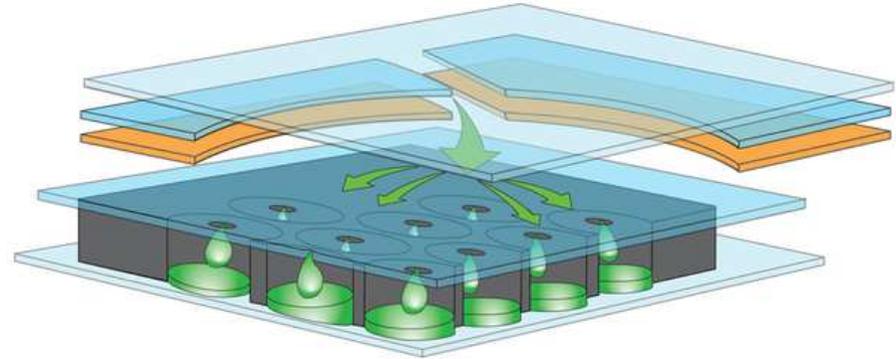
Film array

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

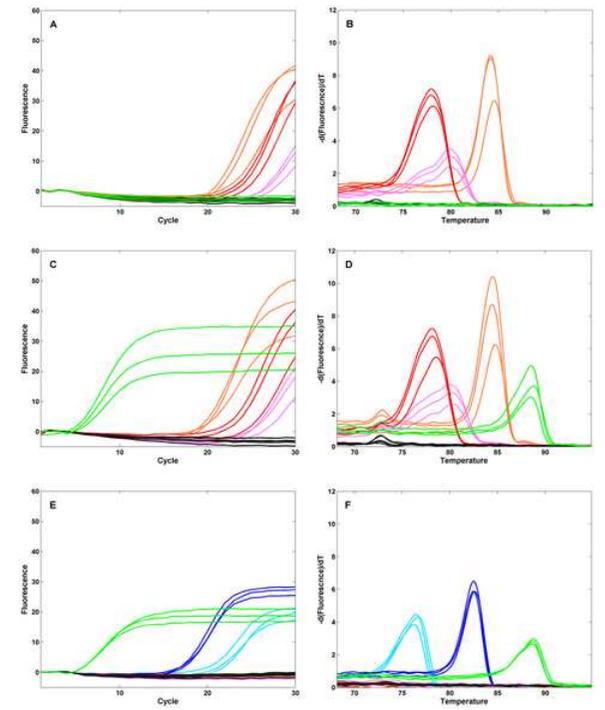
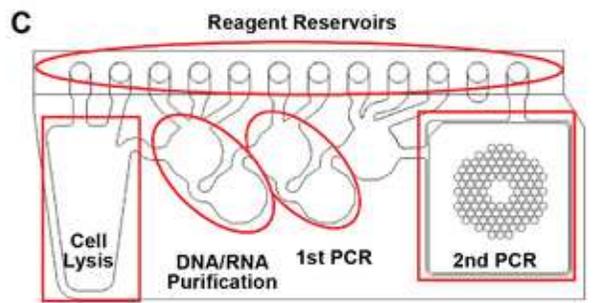
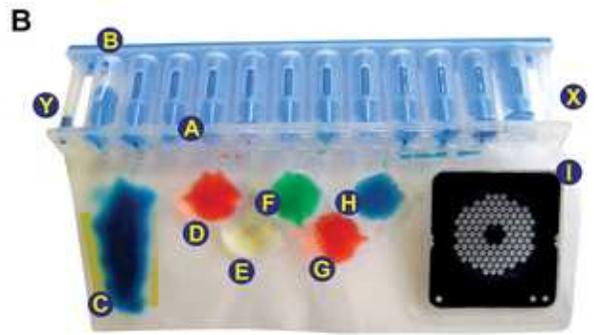
- estrazione e purificazione degli acidi nucleici con biglie magnetiche
- amplificazione tramite nested multiplex PCR
- rilevazione della positività mediante ibridazione su array.



3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



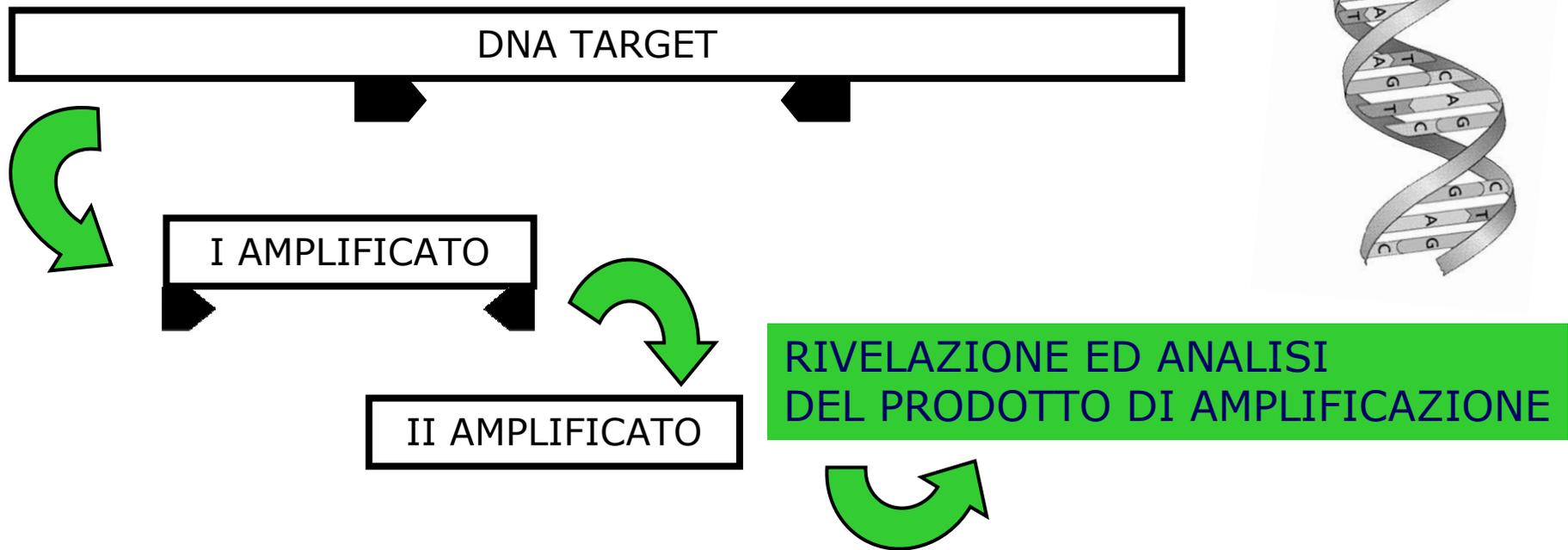
**Lab in a pouch
 system**





Filmarray è un dispositivo miniaturizzato- semplice- veloce- sicuro

Prevede una PCR "nested"



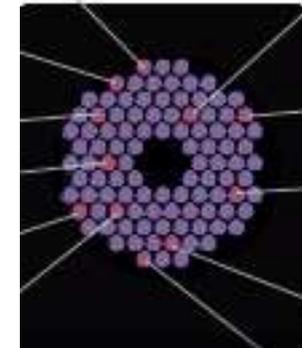
3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



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

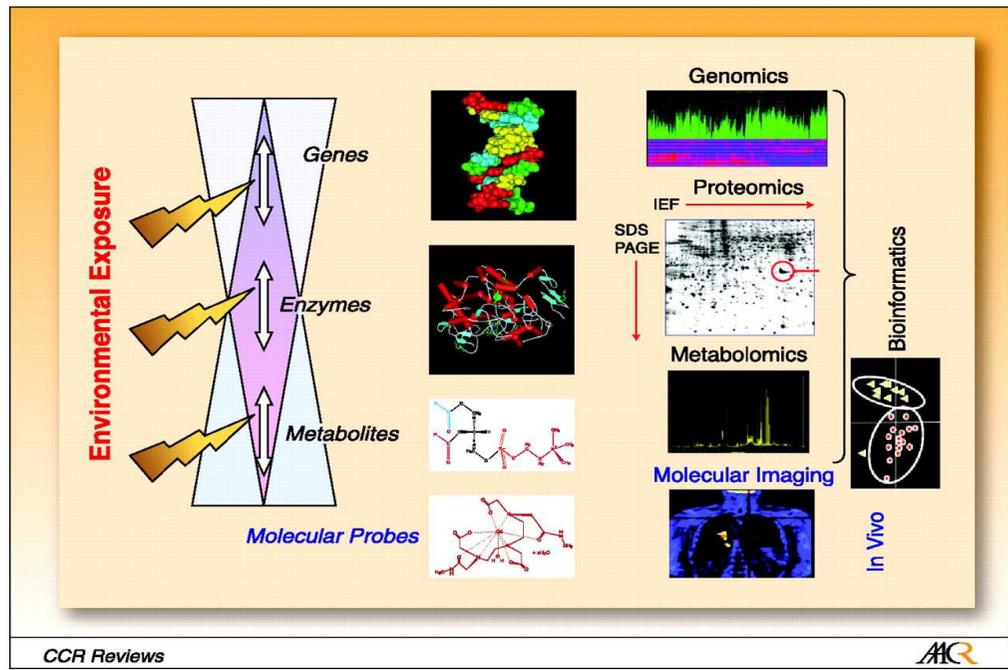


3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



Potenziali applicazioni delle scienze -omiche

Genomica
 Trascrittomica
 Proteomica
 Metabolomica



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 Practice, 2011

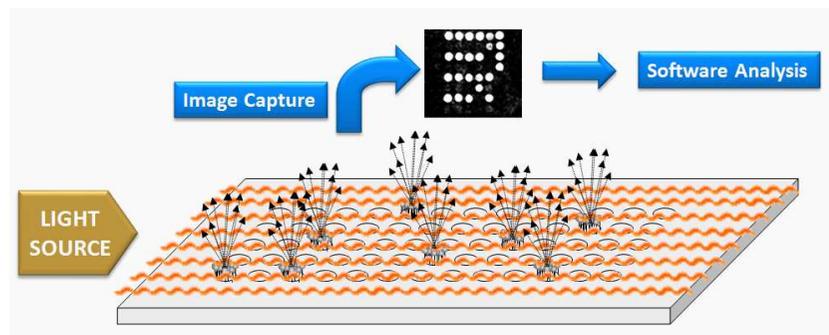
Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics
 in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jun;394

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

3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il laboratorio di Microbiologia e le Urgenze Infettive



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



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		

Ben RJ, Kung S, Chang FY, Lu JJ, Feng NH, Hsieh YD. Rapid diagnosis of bacterial meningitis using a microarray. *J Formos Med Assoc* 2008;107:448-53.

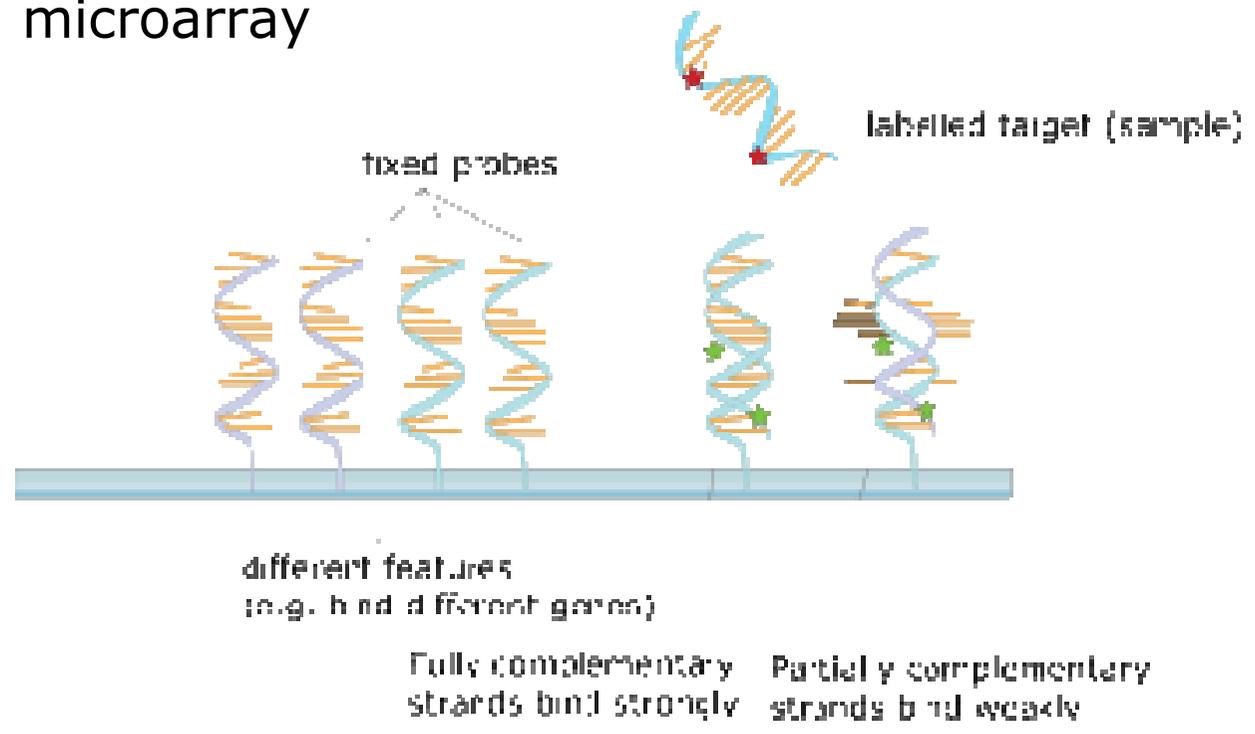


Il DNA "chips" o chips genici

- Estrazione dell'acido nucleico dal liquor
- Amplificazione del frammento di DNA di interesse
- Ibridazione del DNA marcato con sonde oligonucleotidiche immobilizzate sul microarray



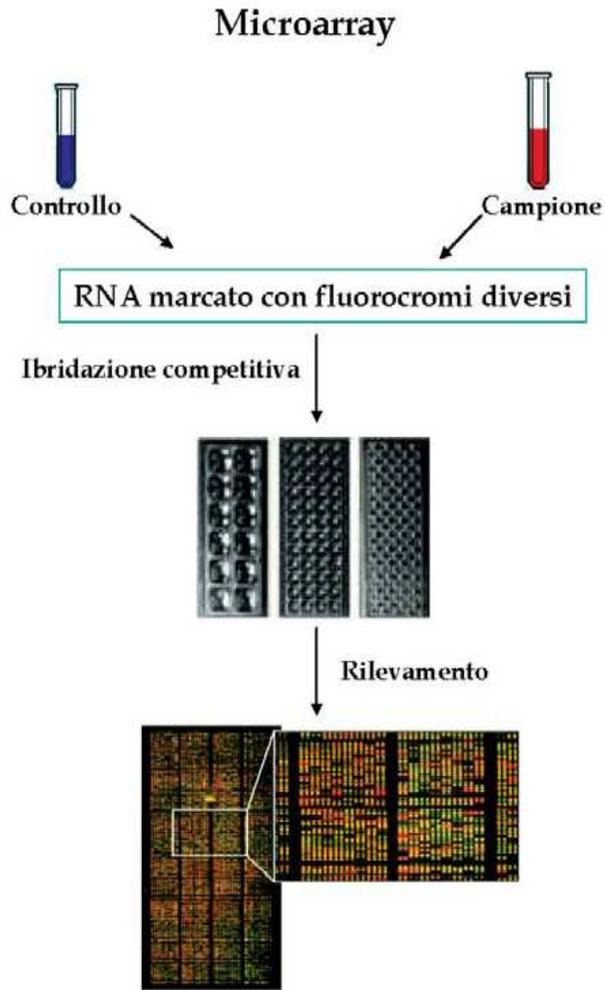
sviluppato per
identificare
simultaneamente i
diversi agenti
patogeni virali e
batterici nel liquor



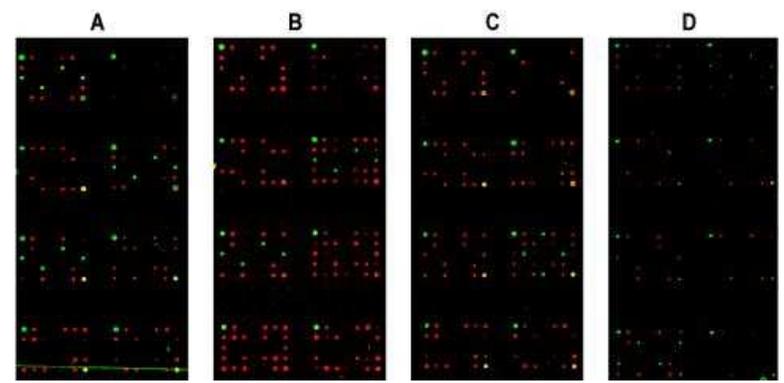
3° CONGRESSO NEWMICRO
 ...The need for speed: il
 laboratorio di Microbiologia e le
 Urgenze Infettive



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



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



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Meningitis panel in progettazione:

Viruses

7-Enteroviruses

8-Herpes simplex Virus

Gram-Negative Bacteria

#4- Neisseria meningitidis

#5- Haemophilus influenzae

#6- E. coli

Gram-Positive bacteria

#1- Streptococcus agalactiae

#2- Streptococcus pneumoniae

#3- Listeria monocytogenes



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



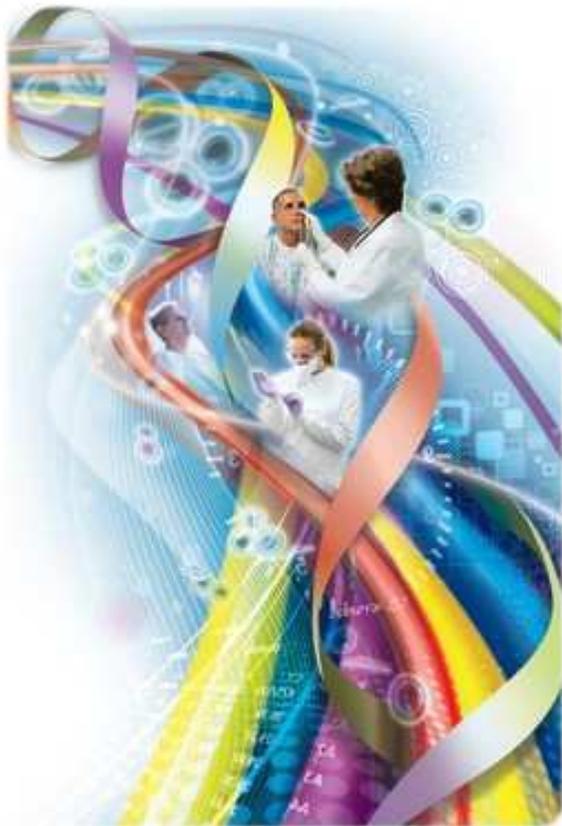
**Le nuove tecnologie molecolari = maggiore contributo alla
diagnostica di laboratorio di meningo-encefalite**



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



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



Quali agenti infettivi ricercare e perché?

Domanda che non serve più



Meningite batterica

90% delle meningiti batteriche dei lattanti

75-80% di tutte le meningiti batteriche

PANNELLO ADULTI

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



PANNELLO LATTANTI

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



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

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

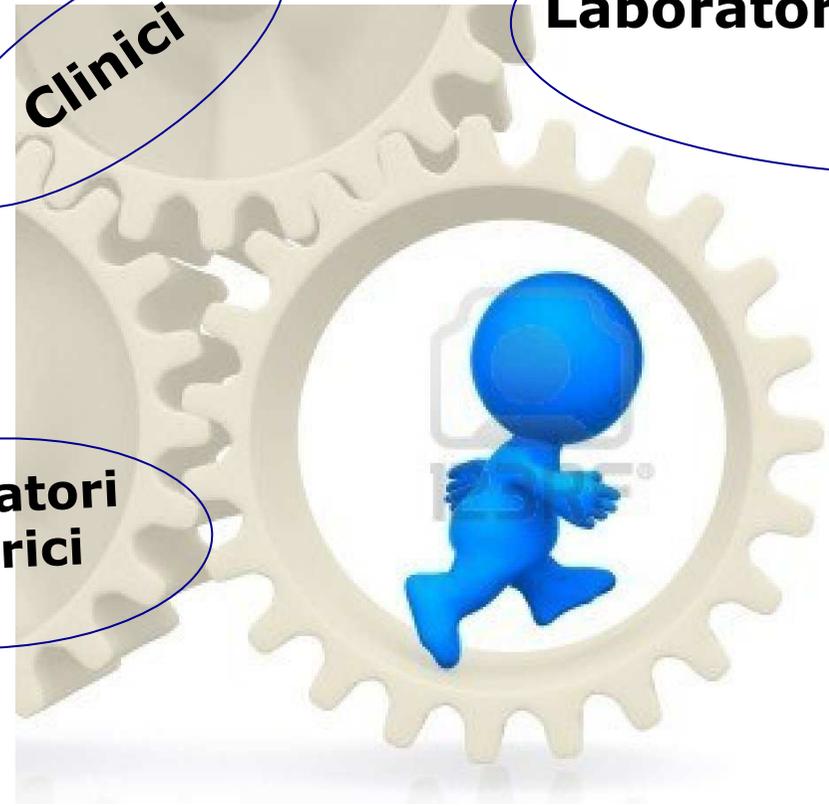


multidisciplinary approach

Clinici

Laboratori di riferimento

Laboratori periferici



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



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

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Le tecniche molecolari nella diagnostica clinica: CRITICITA'



Costi

Corretta raccolta dei campioni clinici

FORMAZIONE DEL PERSONALE

ORGANIZZAZIONE DEL LABORATORIO

} Criticità parziali

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)

Biologia Molecolare (in laboratori adeguatamente attrezzati)

3° CONGRESSO NEWMICRO

...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

