

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE MENINGITI ED ENCEFALITI

**MARIA TERESA ALLU'
U.O.C. PATOLOGIA CLINICA O.CIVILE**

25 settembre



Infezioni del sistema nervoso centrale: manifestazioni cliniche

Meningiti

Encefaliti

e relative forme associate
(meningoencefaliti, ...)

Mieliti

Ascessi



Meningiti

Processi infiammatori delle meningi, generalmente di origine infettiva, che possono evolvere in meningo-encefaliti o in encefalo-mieliti

PATOGENESI DELLA MENINGITE BATTERICA

Agente Patogeno

Attacco degli organi di difesa :

Cranio
Meningi (Pia Madre, Aracnoide, Dura Madre)
Barriera emato-encefalica

RESISTENZA A

Fagocitosi dei leucociti polimorfonucleati

Fagocitosi dalle cellule reticoloendoteliali

Lisi dal complemento

Attacco degli anticorpi specifici

Migrazione dei batteri nello spazio subaracnoide e nel liquor

Invasione e replicazione batterica con risposta infiammatoria nel fluido cerebrospinale

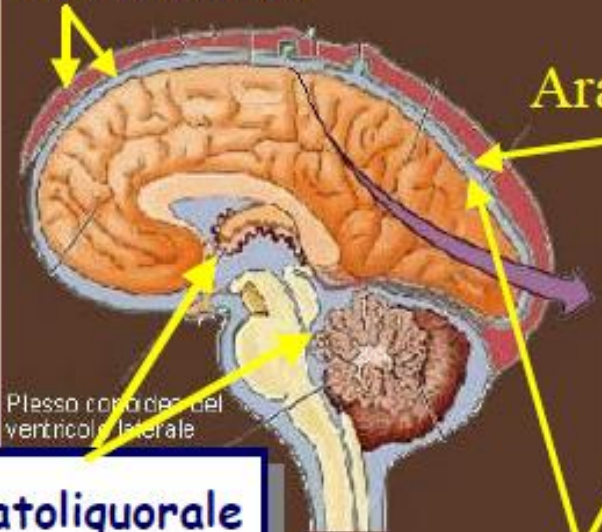
Meningite

Penetrazione dell'agente patogeno

Circolo ematico (più frequente)

Barriere permeabili per flogosi secondaria a batteriemia

Dura Madre

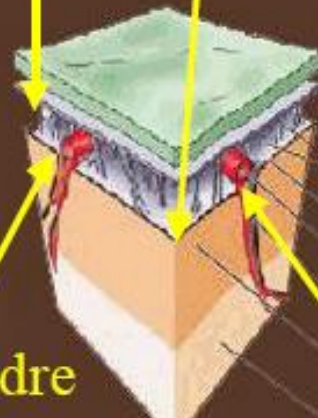


Plesso corioide del ventricolo laterale

Ematoliquorale

Aracnoide

Liquor-encefalica



Dura madre
Aracnoide
Spazio subaracnoideo
Trabecole dell'aracnoide
Pia madre
Arteria
Spazio perivascolare
Corteccia cerebrale

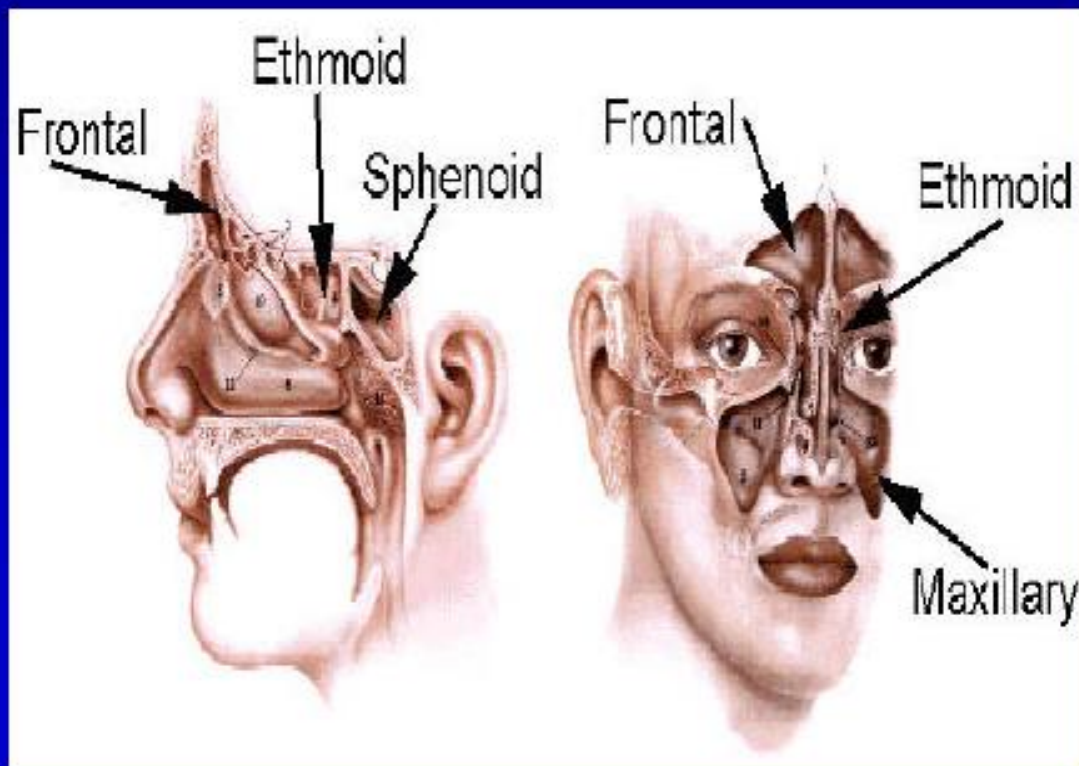
Pia Madre

Ematoencefalica

Penetrazione dell'agente patogeno

Per contiguità da infezioni presso le meningi

**Oto-mastoiditi- sinusiti acute, croniche
riacutizzate sconfinanti fino alle meningi**



Penetrazione dell'agente patogeno

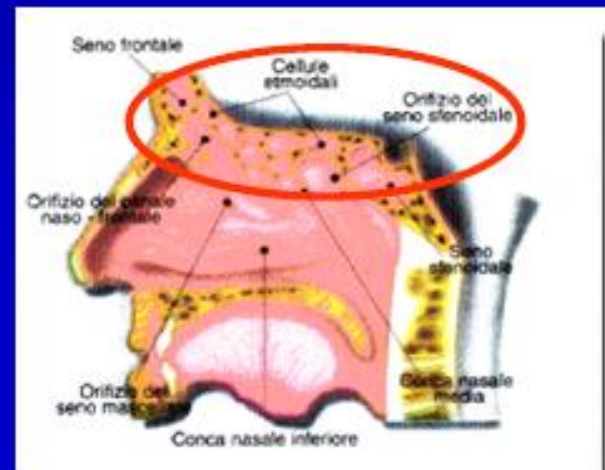
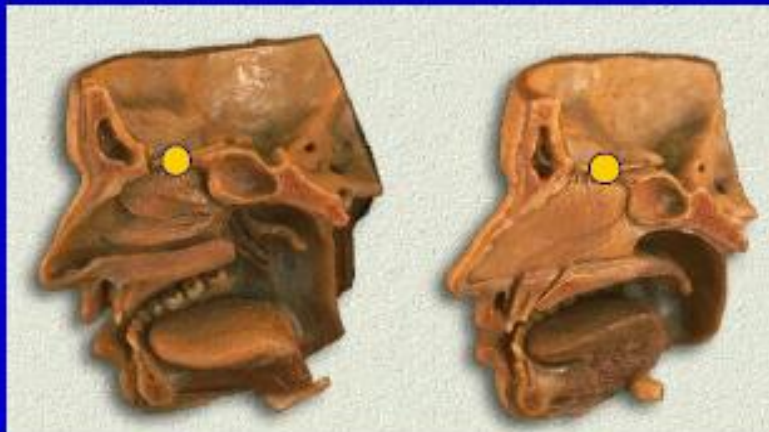
Dall'esterno per soluzioni di continuità:

- **congenite** (es. meningocele, seno dermico, ecc.)
- **traumatiche**
 - ☒ fistole liquorali,
 - ☒ fratture mal consolidate *frequenti della lamina cribrosa che comportano anche rinorrachia = perdita di liquor dalle fosse nasali*
- **interventi neurochirurgici**
- **indagini strumentali invasive**
- **derivazioni ventricolo-peritoneali**

Penetrazione dell'agente patogeno

Attraverso le guaine delle fibre dei nervi olfattorio ed ottico

- rinofaringe -> lamina cribrosa dell'etmoide
- dai capillari o/e vie linfatiche perinervose



Meningite Batterica

Altri Fattori di Patogenicità

Batterici

- Organi di adesione o "Pili" dei batteri
- Proteasi di *Streptococcus pneumoniae* che neutralizza l'attività delle Ig A

Meningite Batterica

Altri Fattori di Patogenicità

Cellulari

- **Specifici recettori di cellule mucose ed epiteliali (es. fagocitosi di *Neisseria meningitidis* nel naso-faringe)**

Meningite Batterica

Fattori di rischio per le meningiti di comunità

Paziente

- **Diabete mellito**
- **Otite media**
- **Polmonite**
- **Sinusiti**
- **Abuso di alcool**

Attia J, Hatala R, et al. Jama 1999

Meningite Batterica

Fattori di rischio per le meningiti nosocomiali

- **Interventi neurochirurgici**
- **Interventi di chirurgia ORL**
- **Derivazioni ventricolari**

CLASSIFICAZIONE DELLE MENINGITI

IN BASE AL DECORSO

TIPO	CLINICA
FULMINANTI	in poche ore si ha un'evoluzione in coma ed insufficienza respiratoria
ACUTE	
SUBACUTE	decorso lento e subdolo (micobatteriche, criptococciche)
RICORRENTI	episodi ripetuti a distanza di mesi o anni (forme pneumococciche in traumatizzati cranici)

CLASSIFICAZIONE DELLE MENINGITI

- A liquor torbido
- A liquor limpido

SITUAZIONI PATOLOGICHE PREESISTENTI CHE POSSONO INDIRIZZARE NELLA DIAGNOSI EZIOLOGICA

- Manifestazioni a carico delle alte vie respiratorie (eziologia meningococcica, da *Haemophilus* o da Pneumococco)
- Un trauma cranico chiuso (Pneumococco) o un trauma cranico aperto (Stafilococchi, Enterobatteri, Streptococchi)
- Immunodepressione (enterobatteri Gram-negativi, *Pseudomonas*, Pneumococchi, *Cryptococcus neoformans*, Stafilococchi, Micobatteri)

Encefaliti

- Processi infiammatori del tessuto cerebrale sostenuti da una causa infettiva, di origine virale, batterica o parassitaria
- La definizione di encefalite non implica necessariamente la presenza dell'agente infettivo nell'encefalo, poichè alcune forme possono essere indotte da meccanismi immunologici
- ✓ **ENCEFALITI PRIMARIE (diretta invasione del SNC da agente patogeno)**
- ✓ **ENCEFALITI SECONDARIE (post-infettive o post-vacciniche)**

Infezioni del SNC - Ag Etiologici più comuni

Meningite Acuta

Enterovirus
Herpes viruses
HIV
Mumps virus
S. pneumoniae
N. meningitidis
L. monocytogenes

Meningite Cronica

M. tuberculosis
T. pallidum
B. burgdorferi
C. Neoformans
Herpes virus

Encefalite

Herpes viruses
Arboviruses
HIV
Rabies virus
Enteroviruses
L. monocytogenes
T. gondii



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



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 spp.</i>

**INFEZIONI
SISTEMA NERVOSO CENTRALE
meningiti - encefaliti**

EMERGENZA SANITARIA

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



MENINGO-ENCEFALITE

diagnosi

- Rachicentesi
- immediato inizio di terapia antibiotica empirica
- RM dell'encefalo
- EEG
- TC cerebrale con contrasto solo se RM non disponibile o non chiara

Meningite - encefalite

diagnosi e management

Esami microbiologici urgenti



Liquido cefalo rachidiano (CSF)

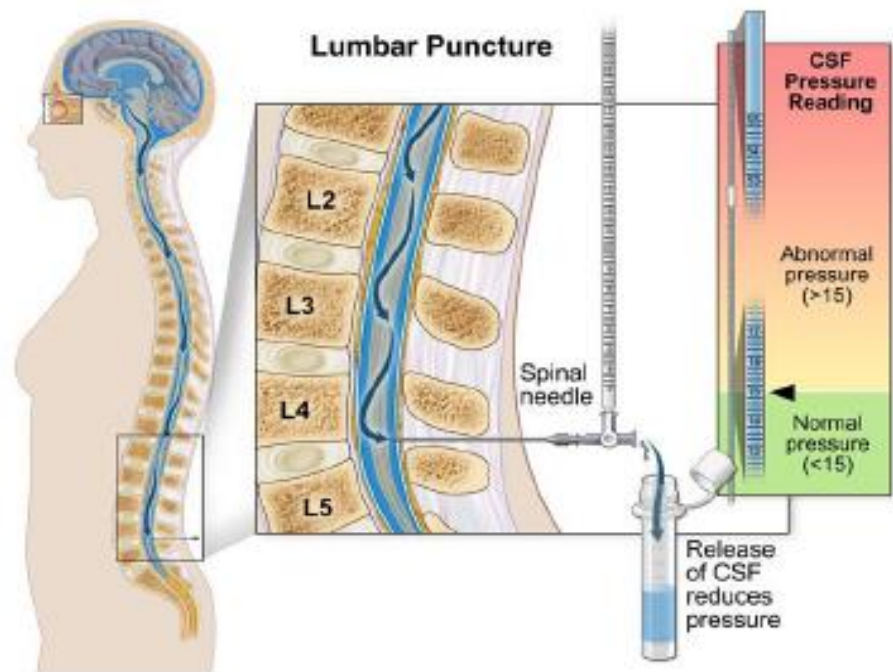
Sangue (emocolture)

Liquor cefalo-rachidiano

Raccolta e trasporto del campione LCR e altri campioni

prelevato per puntura lombare (PL) o rachicentesi nello spazio tra la 4^a e la 5^a vertebra lombare, raccolto in provette sterili con tappo a vite e fondo conico. La suddivisione sequenziale in tre aliquote consente di ridurre progressivamente la contaminazione con sangue proveniente dai tessuti perforati durante l'esecuzione della puntura lombare.

Il campione deve essere raccolto preferibilmente prima dell'inizio della terapia antimicrobica e inviato al laboratorio entro 15-30 minuti dal prelievo e comunque non oltre un tempo massimo di due ore.



Meningite - encefalite

diagnosi e management

Perché eseguire le emoculture?

Meningite batterica acuta

Frequenza di Positività di Emocolture in relazione a diversi agenti etiologici

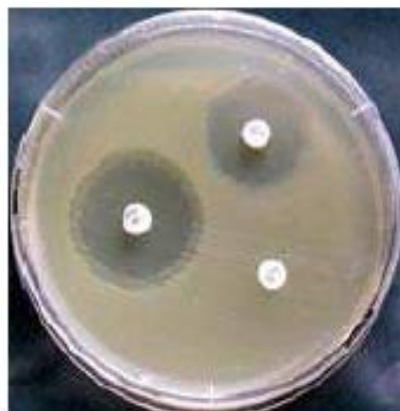
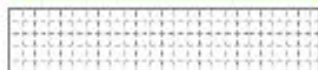
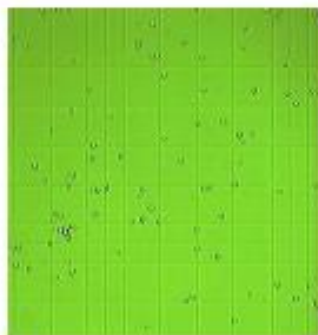
Microrganismo	%
H. influenzae	50-90
S. pneumoniae	75
N. meningitidis (bambino)	40
N. meningitidis (adulto)	60
Paziente pretrattato	-20

- Acad.Emerg.Med., 2008
- J. Microbiol. Immunol. Infect., 2008
- Medicine (Baltimore), 2008
- Clin.Microbiol.Infect., 2006



La diagnosi di laboratorio effettuata su LCR prevede:

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



Liquor Cefalorachidiano

Fattori di criticità per la diagnosi di laboratorio

PRELIEVO:

TEMPO

Il liquor è ipotonico: possibile lisi dei neutrofili.

A temperatura ambiente, diminuzione del 32% dopo 1 h e 50% dopo 24 h

TEMPERATURA

Conservare a temperatura ambiente o incubare a 35° C, non refrigerare.

LCR per RICERCA MICOBATTERI

Conservare a 4 °C

Liquor Cefalorachidiano

URGENZA



BIOCHIMICA

- LCR-Proteine totali
- LCR-Glucosio
- S-Glucosio

TAT: ≤ 30 minuti

MICROBIOLOGIA

- Conta cellule
- Esame batterioscopico (Cytospin)
 - Gram
 - Arancio di acridina

TAT: ≤ 60 minuti

Liquor Cefalorachidiano

valori di riferimento adulto

Valori di riferimento	
Glucosio	45 – 80 mg/dL (2.5 – 4.4 mmol/L)
Rapporto glucosio LCR/siero	≥ 0.6
Proteine	15 – 45 mg/dL
Conteggio Leucociti	< 5 cellule $\times 10^6/L$
Conteggio Eritrociti	0 - 10 cellule $\times 10^6/L$
Colorazione di Gram	Nessun microrganismo
Esame citologico	Non cellule atipiche

Liquor Cefalorachidiano

valori di riferimento neonato/bambino

Valori di riferimento		
leucociti	Neonato	0 – 30 cellule x 10 ⁶ /L
	Età 1 - 4 anni	0 - 20 cellule x 10 ⁶ /L
	Età 5 anni	0 - 10 cellule x 10 ⁶ /L
	> 5 anni	0 - 5 cellule x 10 ⁶ /L
eritrociti	Neonato	0 - 675 cellule x 10 ⁶ /L
proteine	Neonato ≤ 6 giorni	15-110 mg/dL

Meningite - encefalite

diagnosi e management



Liquor Cefalorachidiano

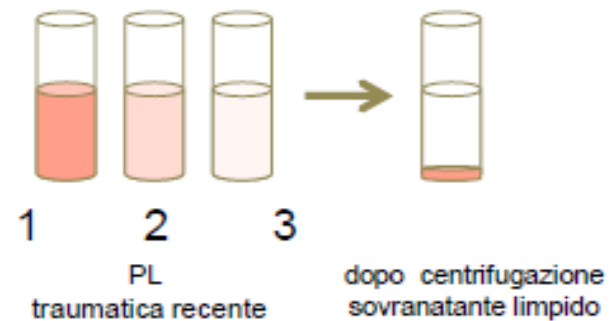
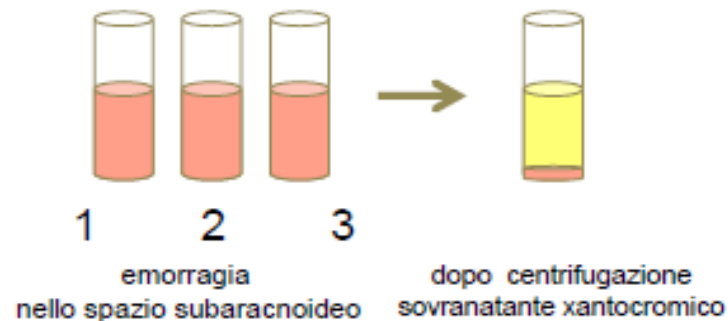
Valutazione macroscopica

☐ Volume (circa 8 ml)

☐ Aspetto e colore

(limpido, torbido, presenza di sangue, opaco, giallo, rosso, ecc.)

LCR presenza di globuli rossi



CSF

false-positive elevations of white cell count

- Traumatic lumbar puncture
- Intracerebral hemorrhage
- Subarachnoid hemorrhage

$$\text{True WBC in CSF} = \text{actual WBC in CSF} - \frac{\text{WBC in blood} \times \text{RBC in CSF}}{\text{RBC in blood}}$$


Untreated bacterial meningitis

C
O
M
M
O
N
F
I
Z
I
D
I
Z
I
G
E
S

- ❑ WBC 1000–5000 cells/mm³
(range: da 100 a > 10.000 cells/mm³)
- ❑ 80-95% predominanza PMN nel CSF
- ❑ ~10% predominanza linfociti nel CSF
(> 50% linfociti o monociti)
- ❑ ~ 50%–60% glicorrachia < 40 mg/dL
- ❑ CSF/siero glucosio ≤ 0.4
- ❑ CSF/siero glucosio ≤ 0.6 nei neonati

MANAGEMENT APPROACH – MAIN QUESTIONS

What laboratory testing may be helpful in distinguishing bacterial meningitis from other etiologies ?



Glucose concentration	<34 mg/dL
Glucose CSF/plasma ratio	<0.23
Protein concentration	>220 mg/dL
Leukocyte count	>2000/mm ³

99%

bacterial etiology

esame chimico-fisico

Nota

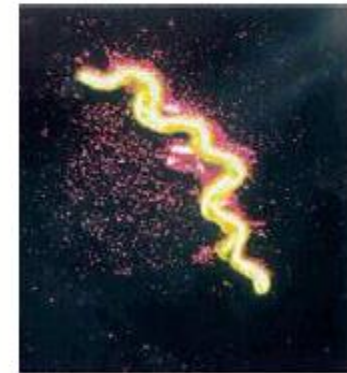
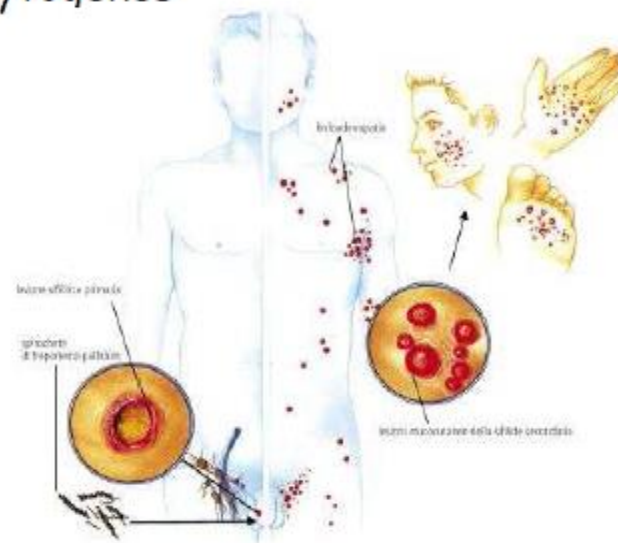
Pleiocitosi linfocitaria anche nelle meningiti:

da *Mycobacterium*

da *Borrelia burgdorferi*

da *Treponema pallidum*

da *Listeria monocytogenes*



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

MENINGITI BATTERICHE

diagnosi microscopica

I risultati sono affidabili ?



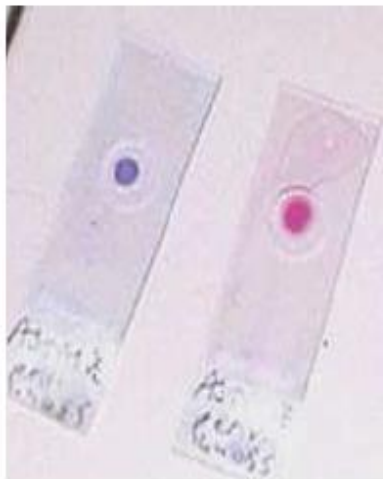
esame microbiologico

ESAME MICROSCOPICO

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

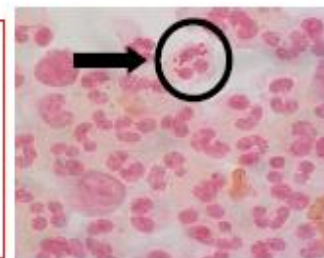
COLORAZIONI

Gram
Blu di metilene
Arancio di acridina
Grunwald-giemsa



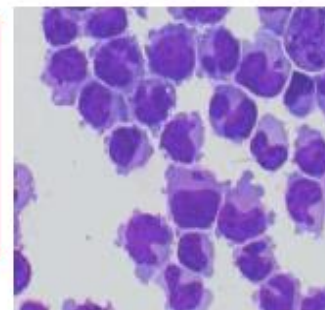
MENINGITE BATTERICA

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

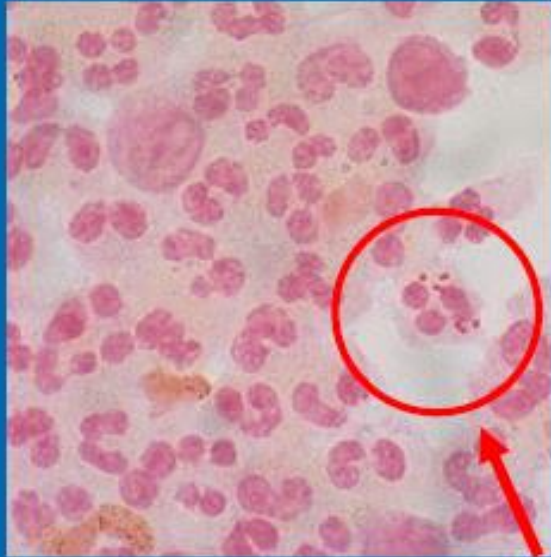


MENINGITE VIRALE

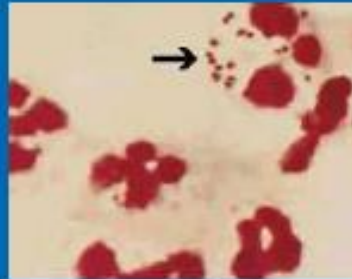
dopo colorazione di Gram:
negativo



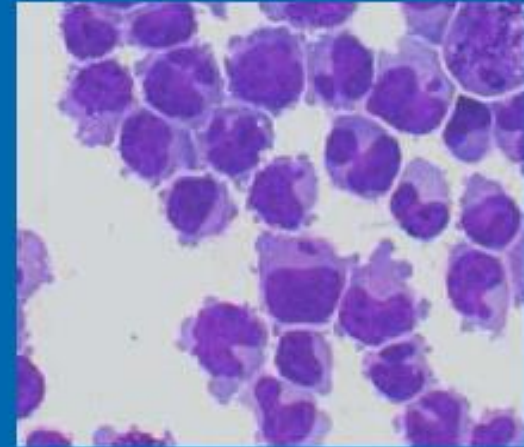
MENINGITE BATTERICA
colorazione di Gram



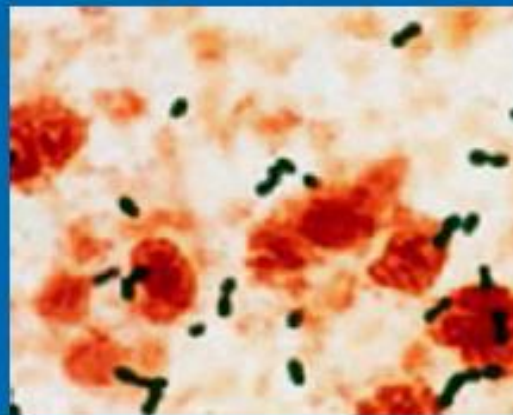
N. meningitidis



MENINGITE VIRALE
colorazione di Giemsa



Cellule linfo-monocitarie



S. pneumoniae

MENINGITI BATTERICHE

diagnosi microscopica

	SENSIBILITÀ
Colorazione di Gram	60-90%
Gram dopo cytopspin	100%
S. pneumoniae	90%
H. influenzae	86%
N. meningitidis	73%
Bacilli Gram-negativi	50%
L. monocytogenes	30%
Post-terapia antibiotica	20%



A-III

Clin Infect Dis 2004

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%

$> 10^5$

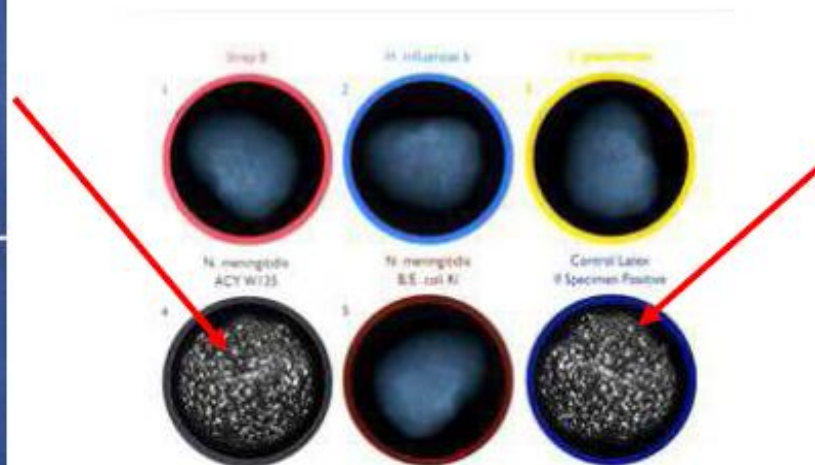
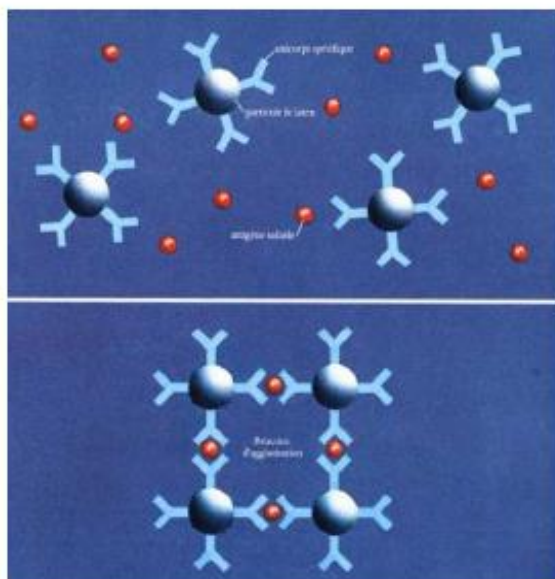
97%

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



Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis

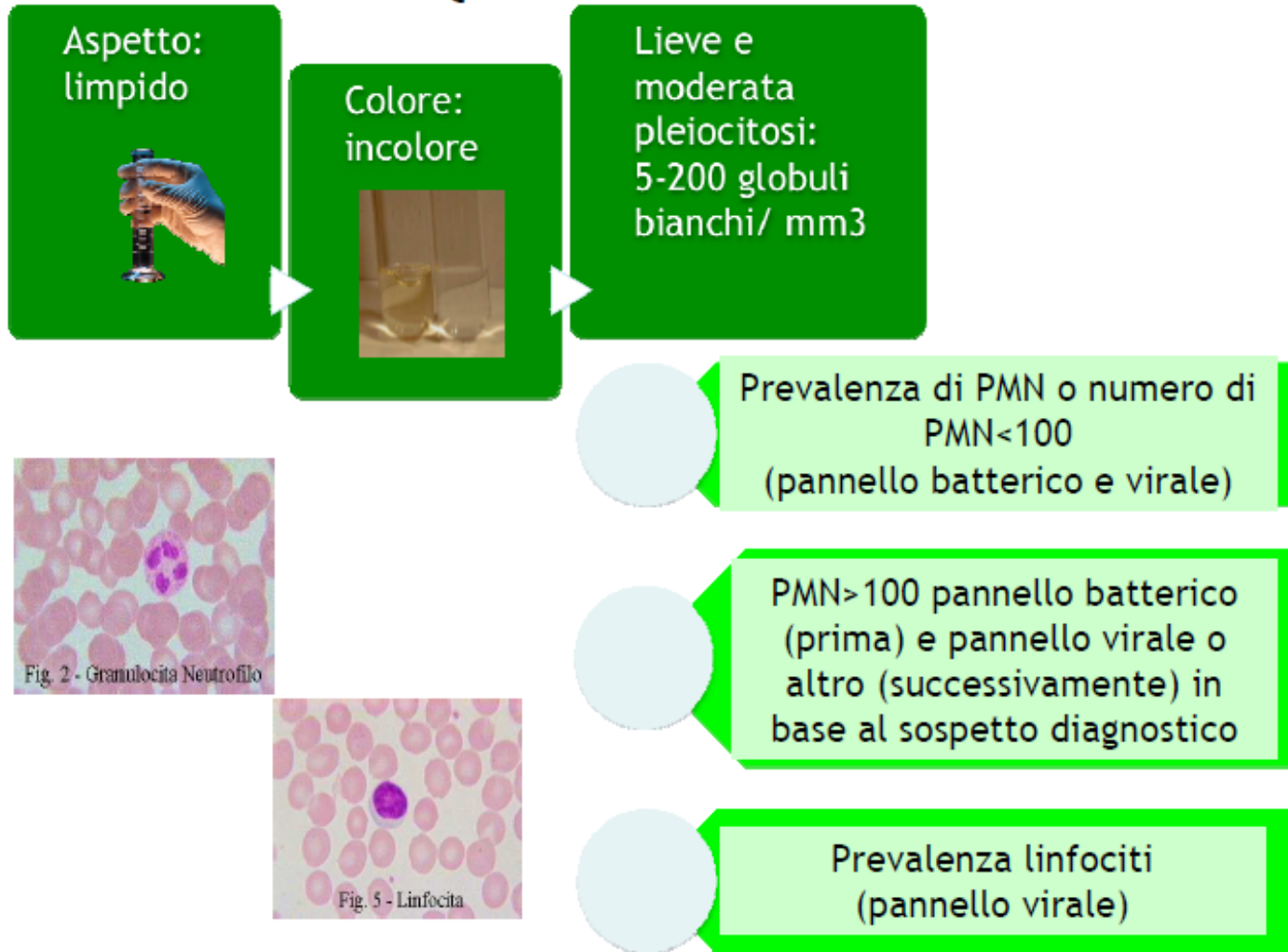
Sensitivity	CSF	Urine	Direct Antigen Test		No. of patients
	95.4%	57.1%	CSF	Urine	
I. Positive for <i>S. pneumoniae</i> (n = 22)			Positive	Positive	12
			Positive	Negative	8
			Positive	NT*	1
			Negative	Negative	1
II. Positive for other bacteria (n = 27)			Negative	Negative	22
					5

Specificity	CSF	Urine
	100%	86.3%

Test Binax NOW per meningite da *S. pneumoniae*
 Su Liquor: affidabile e attendibile
 Su urine: non utile e potenzialmente fuorviante

Quando la PCR può essere utile ?

Con LIQUOR





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

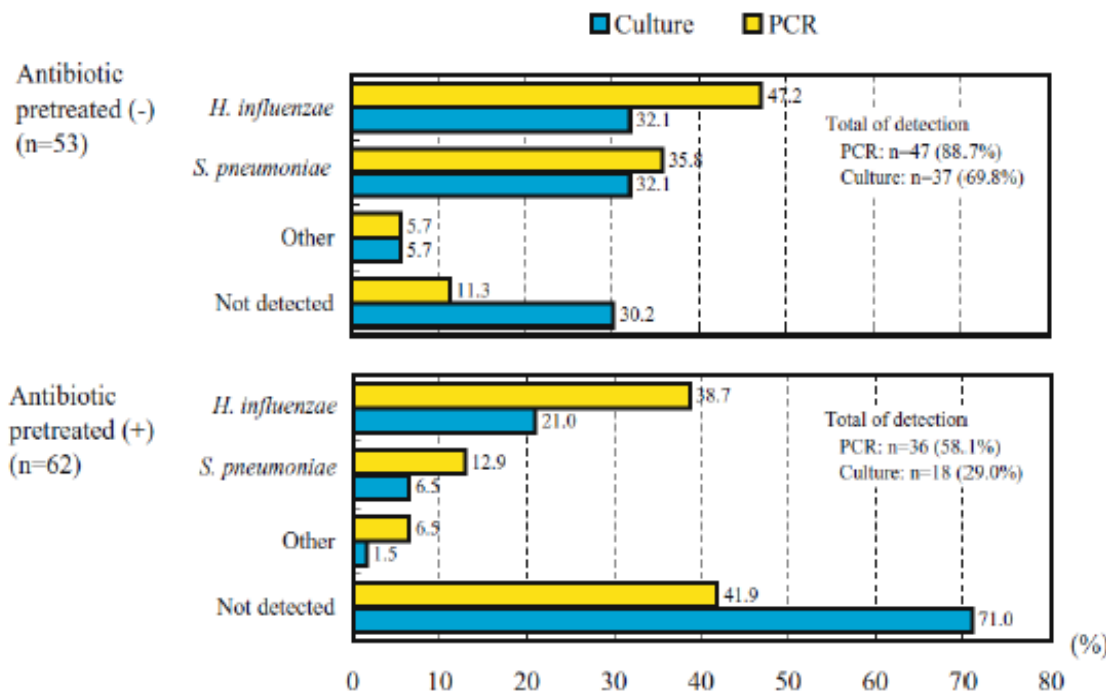


Fig. 1. Influence of prior antibiotics on the detection of causative pathogens by real-time PCR or culturing

[Mol Biotechnol.](#) 2013 Jan;53(1):74-9.

A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms

[Favaro M](#), [Savini V](#), [Favalli C](#), [Fontana C](#).

multi-target

S. pneumoniae, *N. meningitidis*, *H. influenzae*,
S. agalactiae, *L. monocytogenes*, *C. neoformans*

n. 269 LCR n. positivi	Microscopia/ coltura	PCR	Concordanza %	Discordanza %
46	+	+	16	
13	-	+ *		4
Totale LCR positivi n.59 (20%)				

(*) pz trattati prima del prelievo LCR

MENINGITI BATTERICHE

Esami colturali LCR

- Positività : 85-90 % in 24-48 ore
- Test di sensibilità in vitro : altre 24 ore

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
Pusponogoro 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*.

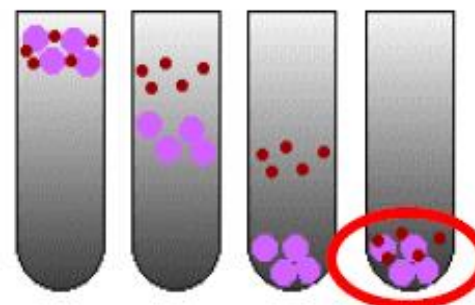
esame microbiologico

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



Meningite - encefalite

diagnosi e management



LIQUIDO CEFALO RACHIDIANO

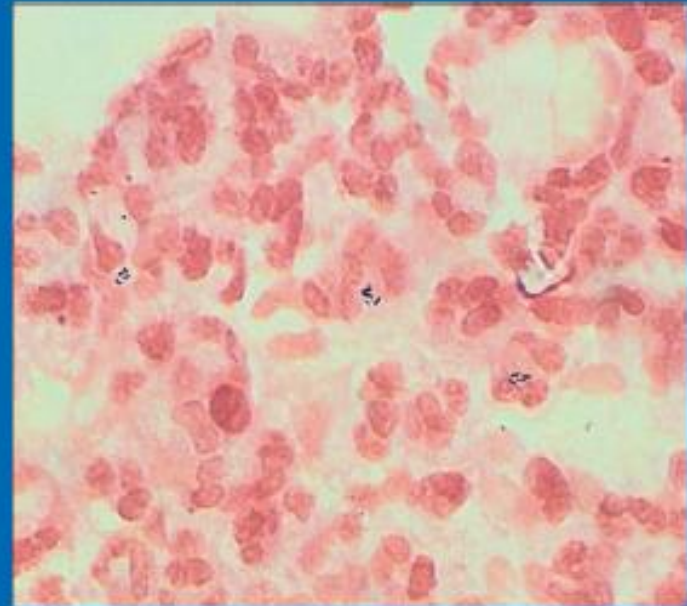
- cellularità >5/mmc
- prevalenza linfomonocitaria o PMN
- proteine normali o aumentate
- glucosio normale o basso

TYPICAL CEREBROSPINAL FLUID FINDINGS IN PATIENTS WITH SELECTED INFECTIOUS CAUSES OF MENINGITIS

Cause of meningitis	White blood cell count (cells/mm ³)	Primary cell type	Glucose (mg/dL)	Protein (mg/dL)
Bacterial	1000 – 5000	neutrophilic	<40	100 – 500
Viral	50 – 1000	mononuclear	≥45	<200
Tuberculous	50-300	mononuclear	≤45 or ≥45	50-300
Cryptococcal	20 - 500	mononuclear	≤45 or ≥45	≥45

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

MENINGITI da Miceti

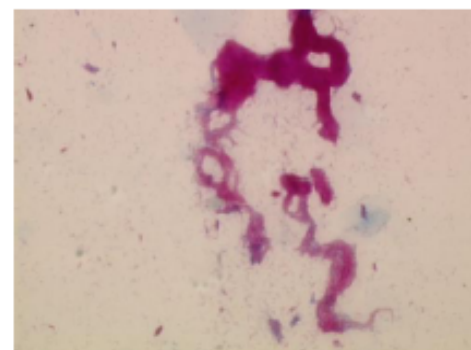
indagini microbiologiche



Eziologia: FUNGHI	TEST
Microscopia	Gram
Microscopia a colorazione negativa	Inchiostro di china
COLTURA	Sabouraud
Amplificazione genica	+ poco indicata
Associazione emocoltura per miceti	+++ molto indicata
Antigeni solubili nel siero e CSF	<i>Criptococcus neoformans</i>

MENINGITI da MICOBATTERI

indagini microbiologiche



Eziologia: MICOBATTERI	TEST
Microscopia mediante cytospot	Auramina e/o Ziehl Neelsen
COLTURA	Terreno liquido
Amplificazione genica	+++ molto indicata
Associazione emocoltura per micobatteri	+++ molto indicata

Se la quantità di CSF è scarsa:

- ↪ prima coltura,
- ↪ poi l'amplificazione (DAT)
- ↪ infine la microscopia

senza nessuna decontaminazione del campione

TYPICAL PROFILES OF CEREBROSPINAL FLUID IN ACUTE MENINGITIS AND ENCEPHALITIS

INVESTIGATION	MENINGITIS		ENCEPHALITIS
	BACTERIAL	VIRAL	
White cells	Greatly increased	Moderately increased	Moderately increased
Total count Differential	Neutrophils predominate	Lymphocytes predominate	Lymphocytes predominate
Glucose concentration	Decreased	Normal or slightly decreased	Normal or slightly decreased
CSF/serum glucose ratio	Decreased	Normal	Normal
Protein concentration	Increased	Normal or slightly increased	Normal or slightly increased

Meningiti virali: agenti eziologici

- **Enterovirus (46%)**
- **HSV2 (31%)**
- **VZV (11%)**
- **HSV1 (4%)**

Causes of viral encephalitis

- Herpes simplex virus 1-2
- Other virus: VZV, CMV, EBV, HHV6
- Enterovirus
- Adenovirus
- Influenza A

- Measles, mumps and rubella virus
- Rabies
- Arbovirus
- Bunyaviruses
- Reovirus
- Arenaviruses

Meningiti virali: agenti eziologici

	IMMUNO COMPETENTI	VIAGGIATORI o STAGIONALITA'	IMMUNO COMPROMESSI	EPIDEMICI
Enterovirus	Red			
HSV 1 / 2	Red			
VZV/EBV/HHV6	Red			
HIV	Red			
Influenza				Green
Parotite				Green
Morbillo				Green
CMV			Blue	
JCv			Blue	
WNV		Yellow		
Tosv		Yellow		
Chikungunya v		Yellow		
TBEv		Yellow		

Meningo-encefaliti virali

DIAGNOSI DI LABORATORIO

DIRETTA

Test molecolari su liquor
cefalo-rachidiano (LCR)

INDIRETTA

- Ricerche anticorpali sp.
(diagnosi retrospettiva)
- HIV Ab

PCR E DIAGNOSI DI MENINGITE VIRALE

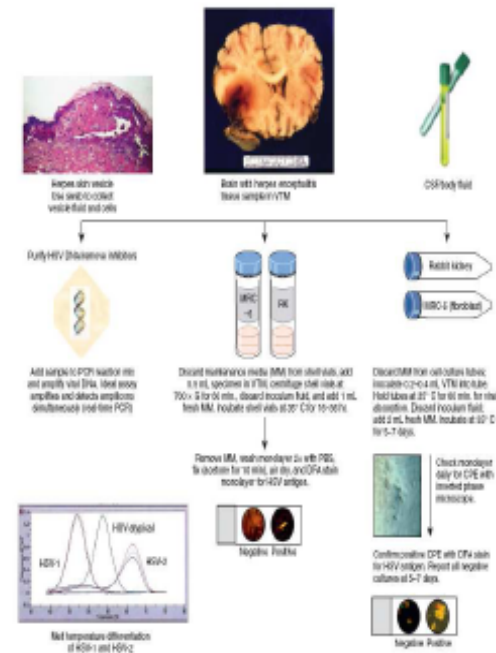
Consente la determinazione quantitativa del virus nel liquor
è importante in quanto fornisce:

-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



Picornaviridae

non polio enteroviruses

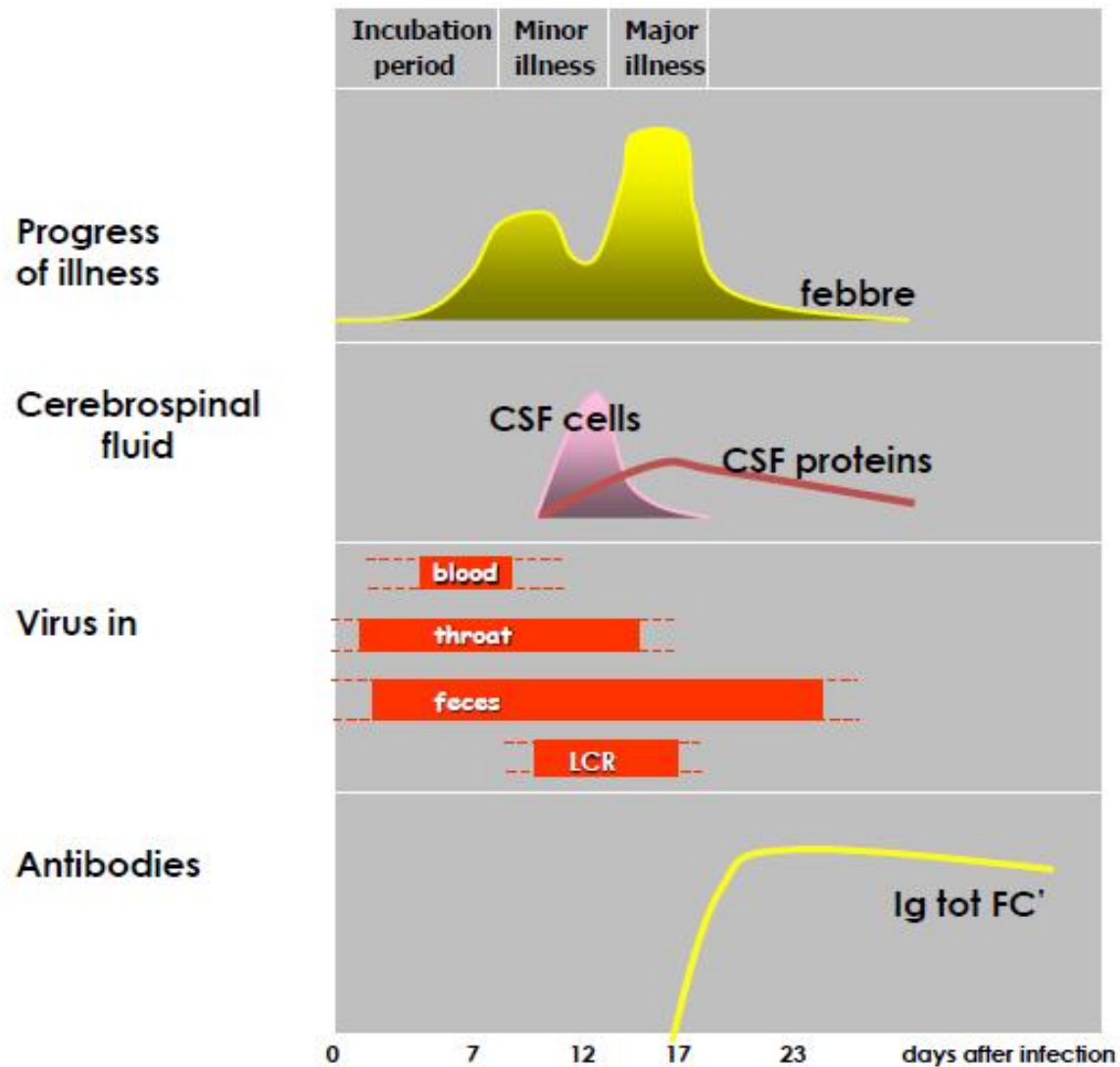
EPIDEMIOLOGY

- Echoviruses, Coxsackieviruses, and Enterovirus 71 (outbreak) and various other numbered enteroviruses
- Peak incidence in late summer and early fall
- Worldwide in distribution

DIAGNOSIS

- Real time PCR* of CSF
 - Real time PCR* of stool and throat samples
 - Serologic testing (FC')
-

Course of infection with Enterovirus



Evoluzione della meningite da herpes simplex 1-2

Fase iniziale

CSF:

2-5 linfociti /mm³

Glucosio e proteine LCR normali

HSV 1/2 DNA: 10-100 cp/ml



**DIAGNOSI DI
SOSPETTO CLINICO**

dopo 3-5 giorni

CSF:

> 5 linfociti /mm³

Glucosio e proteine LCR normali o alterate

HSV 1/2 DNA : >1000 cp/ml



**DIAGNOSI DI
CERTEZZA CLINICA**

Epstein Barr virus

EPIDEMIOLOGY

- Nell'infezione acuta la compromissione del SNC avviene nel 0,5-7,5%

DIAGNOSIS

Serologic testing (VCA IgM, EA VCA EBNA IgG)

LCR PCR for EBV (results may be false positive)

VIRUS VARICELLA ZOSTER

EPIDEMIOLOGY

- All age groups, but incidence highest in adults
- All seasons
- Recrudescence disease (herpes zoster) in immunocompetent and immunocompromised persons
- Can occur in patients without rash, especially if immunocompromised

DIAGNOSIS

- Real time PCR* quantitative of CSF
 - Real time PCR* o DFA of skin lesions
 - serum IgM primary varicella
-

Infezioni SNC immunocompromessi

Citomegalovirus

- ❑ Immunocompromised persons (especially those with AIDS)
- ❑ Rarely reported in immunocompetent patients
- ❑ Congenital infection in 1% of neonates

JCV

- ❑ Cell-mediated immunodeficiencies (e.g., AIDS, hematologic malignancies)
- ❑ Immunomodulating therapy (natalizumab, rituximab)

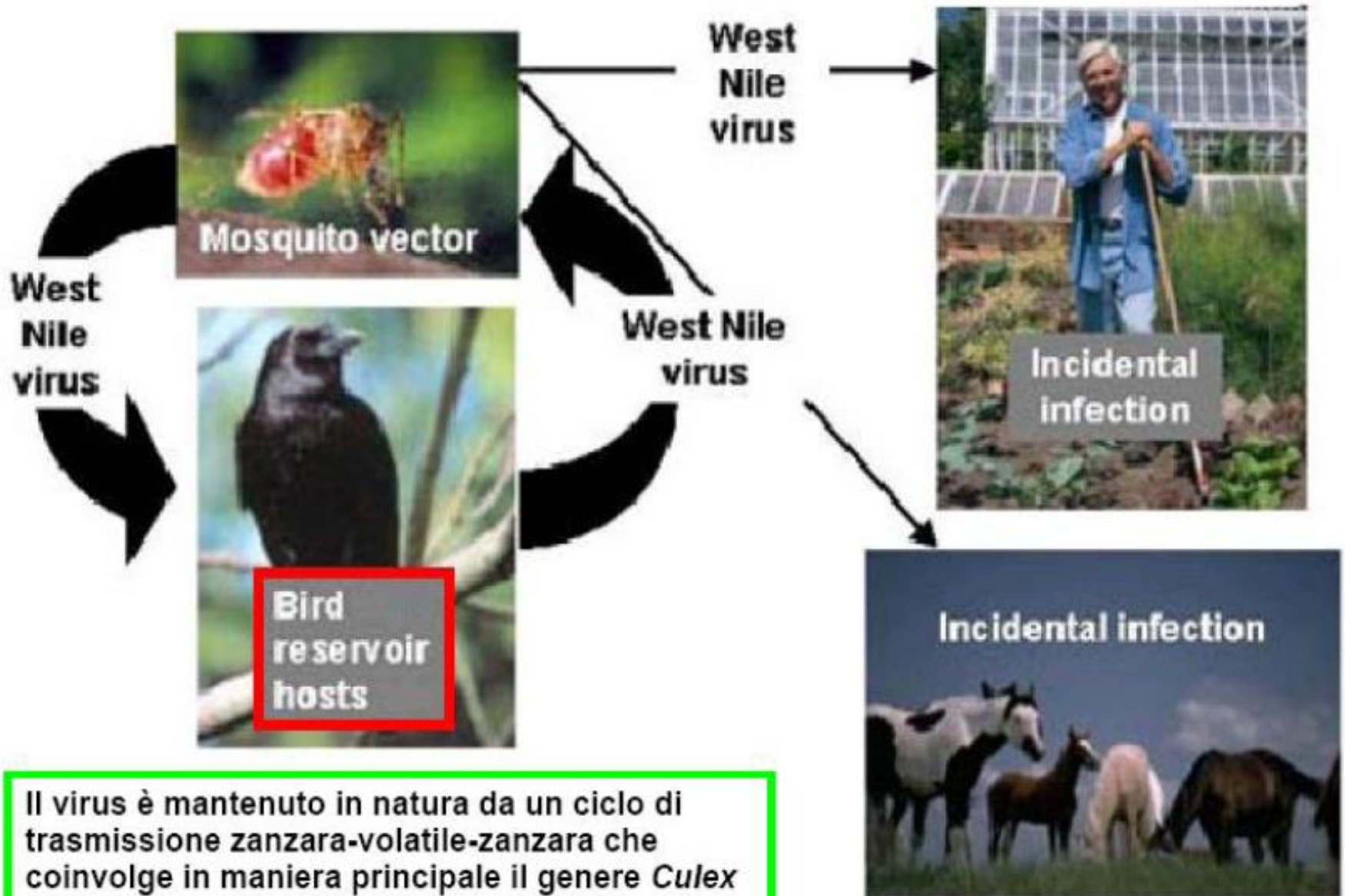
DIAGNOSIS

- LCR (*Real Time PCR*)
- quantitative PCR available
- Brain biopsy, if needed

Infezioni trasmesse da vettori

- Sono più di 600 gli Arbovirus (ARtropode-BORne virus) noti, dei quali almeno 150 causano malattia nell'uomo
- Zanzare e zecche sono vettori indispensabili per la loro propagazione
- I cambiamenti climatici influenzano, favorendo od ostacolando, la loro diffusione nel mondo

WEST NILE VIRUS: CICLO DI TRASMISSIONE



Il virus è mantenuto in natura da un ciclo di trasmissione zanzara-volatile-zanzara che coinvolge in maniera principale il genere *Culex* Spp

West Nile virus

NUOVO ASSETTO EPIDEMIOLOGICO DELL'INFEZIONE



Africa (West Nile), Asia , Medio Oriente



USA, Europa

- Modificazione rotte uccelli migratori, imputabili ai cambiamenti di habitat provocati dall'uomo
- Viaggi intercontinentali di persone infette da un paese endemico a altri paesi
- Diffusione dei vettori (zanzara del genere culex) e di ospiti naturali suscettibili (corvidi)

West Nile virus

e altri Arbovirus

Chikungunya virus

Toscana virus

DIAGNOSIS

- Real time PCR of CSF*
 - Serologic testing (IgM)*
-

MALATTIA DA VIRUS	VETTORI	ARBOVIRUS
West Nile	<i>Culex pipiens</i>	Flavirus
Chikungunya	<i>Aedes albopictus</i>	Alphavirus
Toscana	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Phlebovirus

Chikungunya virus

Nel luglio 2007, in Emilia Romagna, si è verificata la prima epidemia europea di Chikungunya, importata da un soggetto di ritorno da Kerala (India), paese in cui la malattia è endemica. La rapida diffusione dell'infezione è stata facilitata dall'elevata densità di zanzare tigre, durante l'estate, nell'area di Ravenna. A fine estate 2007, il numero complessivo di casi confermati in laboratorio è stato di **217**.

IN ITALIA: PRIMA EPIDEMIA EUROPEA DA IMPORTAZIONE DI CHIKUNGUNYA VIRUS

VETTORE: ZANZARA TIGRE (presente fin dai primi anni '90)

Malattia caratterizzata da sintomi simil-influenzali quali febbre elevata, cefalea, debolezza, dolori articolari diffusi, che talora costringono il paziente ad assumere una posizione piegata nel tentativo di alleviare il dolore causato dall'infiammazione delle articolazioni (in dialetto swahili, "*Chikungunya*" significa "*che contorce*")

·Altri agenti patogeni trasmessi da zanzara e presenti sul nostro territorio sono il virus Toscana e il virus Usutu (virus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*). Recente identificazione di due casi d'infezione da virus Usutu in cittadini italiani con patologia neuroinvasiva

Il virus Toscana



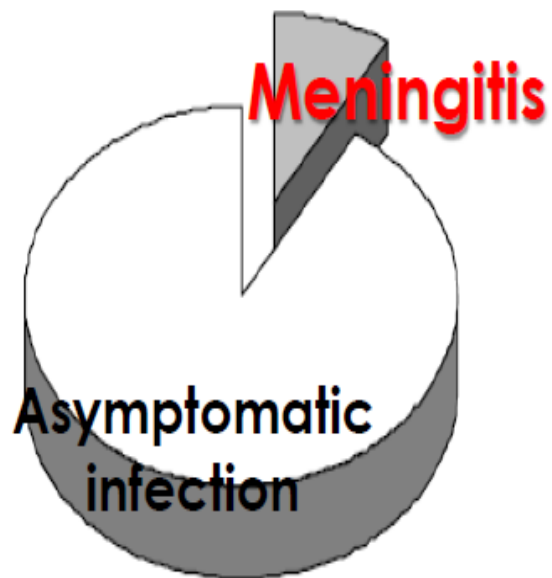
Arbovirus, famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus, isolato nel 1971 dal pappatacio *Phlebotomus perniciosus* nella zona di Grosseto

- ❑ Presente in aree rurali e suburbane, in zone fluviali e paludose
- ❑ Circolazione strettamente dipendente dalle condizioni climatiche (temperatura e umidità) che permettono la sopravvivenza dei Flebotomi (periodo giugno-settembre/ottobre)

Clinical manifestation of TOSV infection

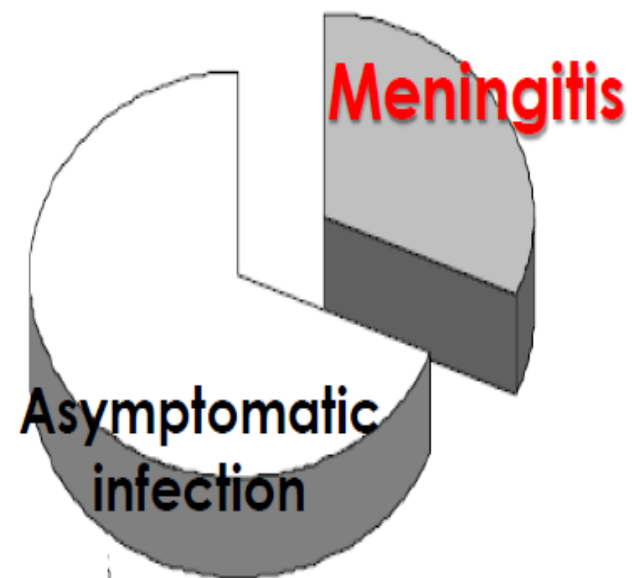
young people

9 %



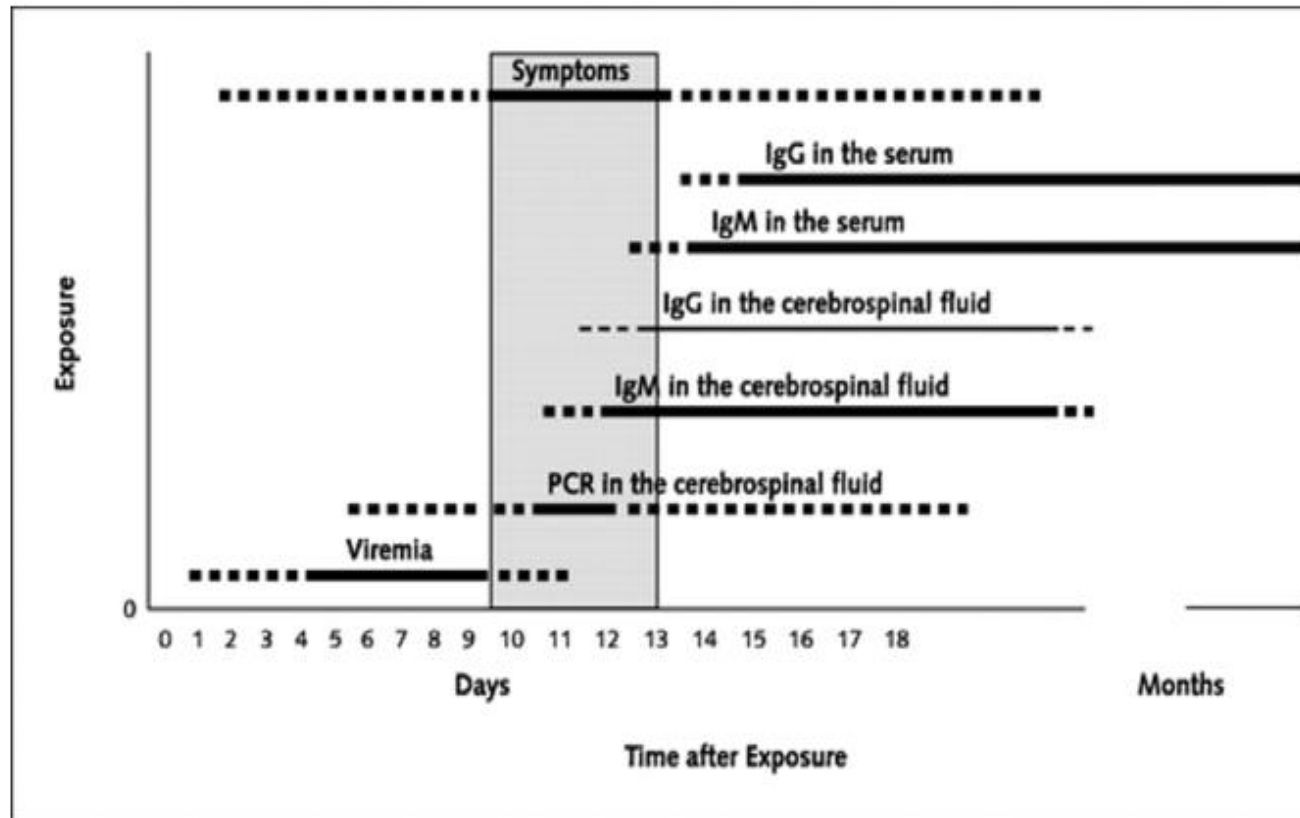
adults

31,4 %



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.



Probabile Meningite /Encefalite Virale

Eziologia	Test di riferimento	Altri potenziali test da utilizzare
Herpes Simplex virus	LCR PCR	Sieroimmunologia: HSV 1/2 Isolamento, PCR, DFA, ME: <i>scraping</i> lesioni cutanee
Varicella Zoster virus	LCR PCR	Isolamento, PCR, DFA, ME: <i>scraping</i> lesioni cutanee
Enteroviruses	LCR PCR	RT PCR: tamponi orofaringei, rettali o feci (eliminazione del virus per lungo tempo attraverso le feci)
virus Toscana e WNV <i>(in periodo di attività dei vettori ematofagi)</i>	LCR PCR IgG e IgM su siero e liquor	
Virus parotite, morbillo e rosolia	IgG e IgM su siero	PCR : tamponi orali, urine, sangue EDTA, saliva
HIV	Test di screening combinato	HIV <i>viral load</i> (plasma, LCR)
Epstein Barr virus	VCA IgM e IgG, EBNA IgG	LCR PCR
CMV, JC virus <i>(nei soggetti immunodepressi)</i>	LCR PCR	

IDSA Guidelines for Management of Encephalitis – CID 2008;47
 U. K. Ihekwaba et al. - Viral Meningitis in Adults • CID 2008; 47:783–9
 S.Logan and E. MacMahon Viral meningitis *BMJ* 2008;336:36-40
 M.H. Beaman and S.L. Wesseling *MJA* Vol.176; 15 April 2002

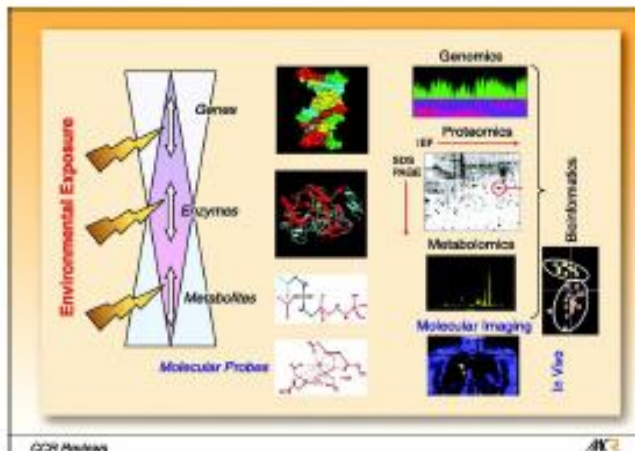
Sviluppi futuri

Potenziati 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

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

Phillips, *Cellular Microbiology*, 2005

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

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

Il DNA “chips” o chips genici

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

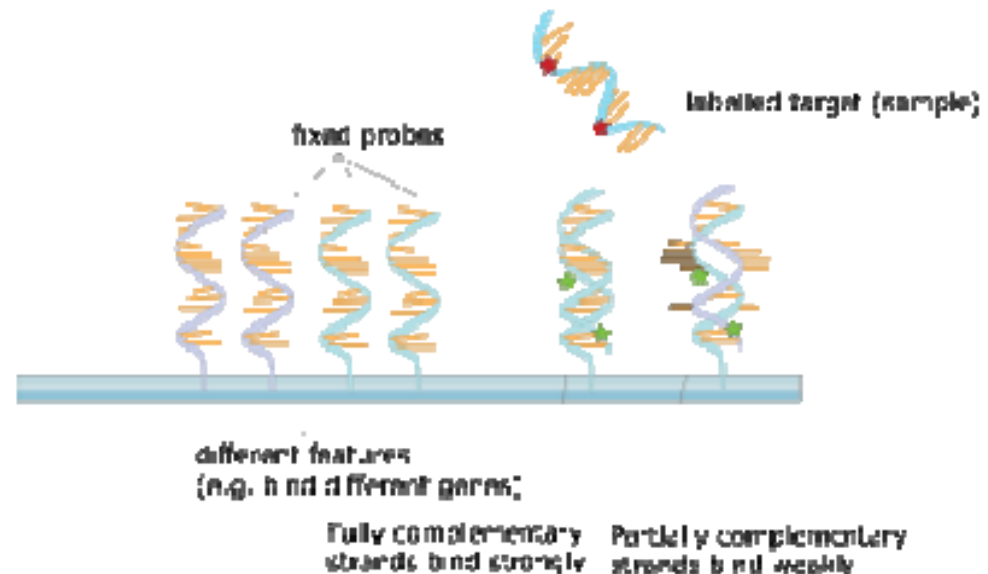
Estrazione dell'acido nucleico dal liquor

Amplificazione del frammento di DNA di interesse

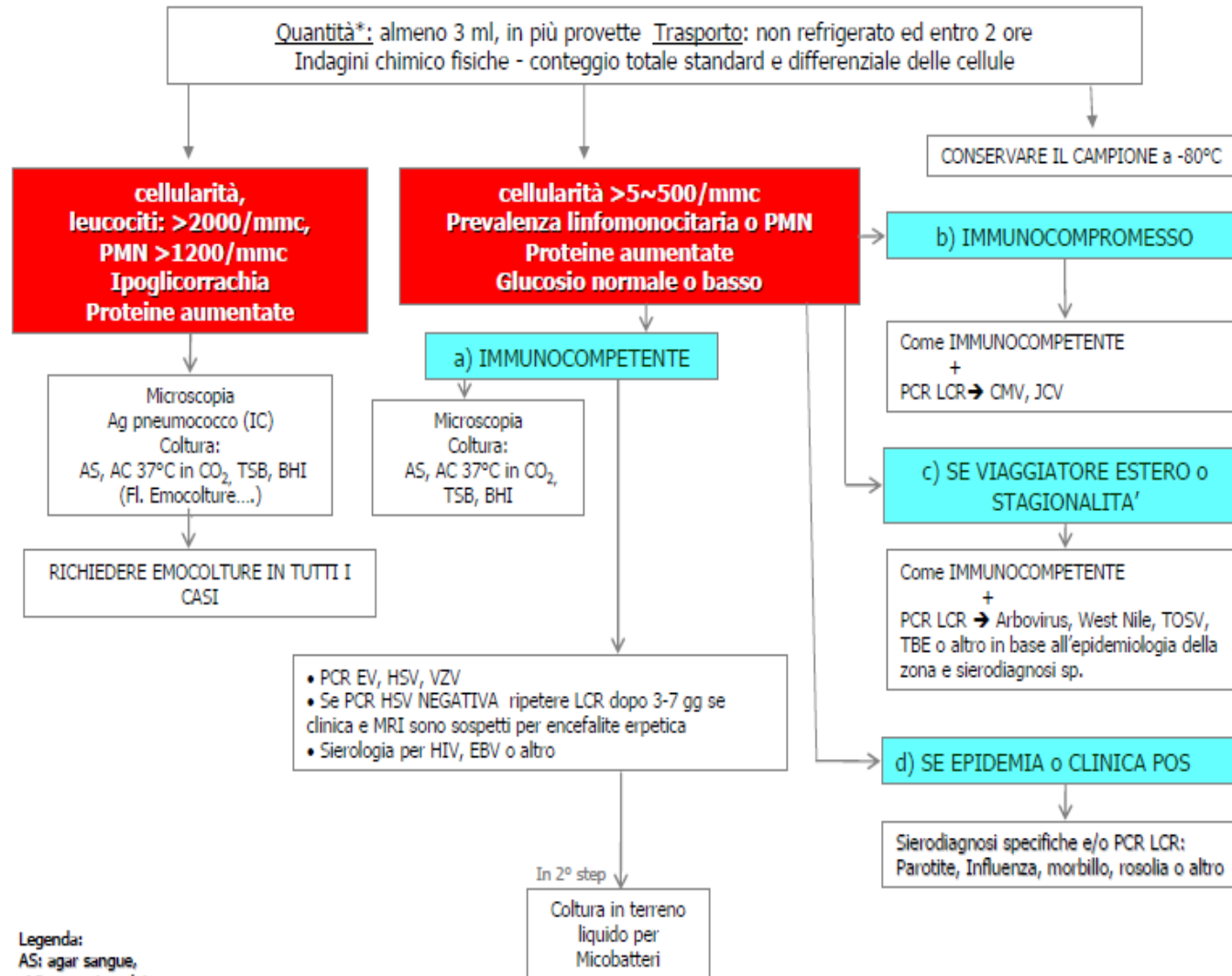
Ibridazione del DNA marcato con sonde oligonucleotidiche immobilizzate sul microarray



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



CAMPIONE LIQUIDO CEFALO RACHIDIANO (LCR)



Legenda:

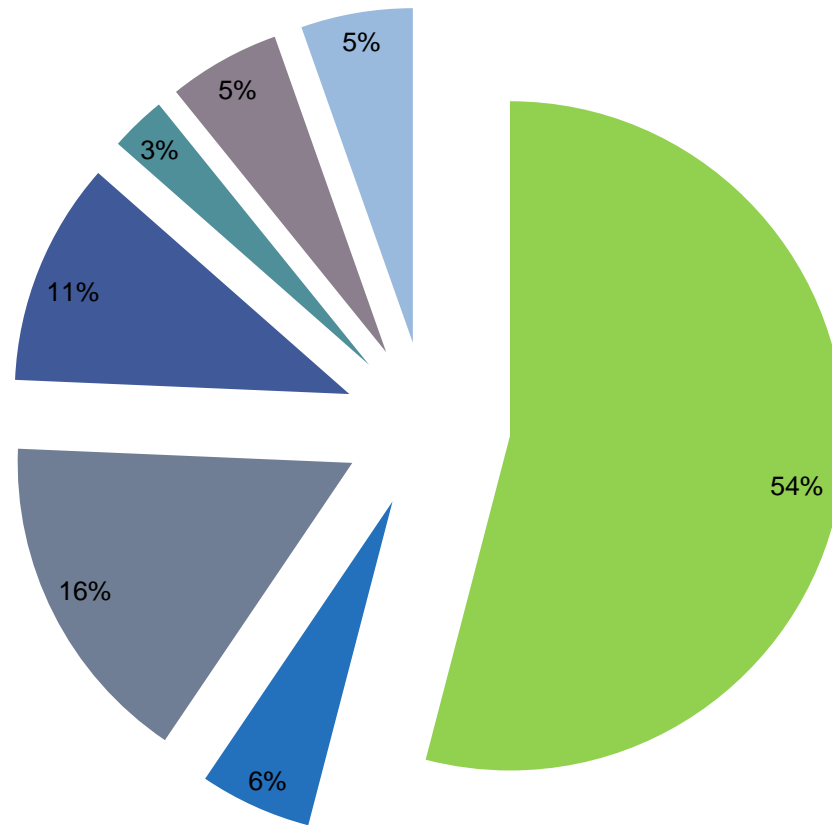
AS: agar sangue,

AC: agar cioccolato

(*): se quantità insufficiente, prediligere coltura

Microrganismi isolati da campioni di liquor dal 2008 al 2014 LABORATORIO MICROBIOLOGIA RAGUSA

■ S.pneumoniae ■ N.meningitidis ■ S.pyogenes ■ M.tuberculosis ■ M.avium complex ■ L.monocytogenes ■ C.neoformans



Percorso assistenziale

- tabella di Gantt -

CHI, QUANDO, COSA, DOVE

	Prima del ricovero	Ricovero	1° giorno	2° giorno dimissione
Medico				
Infermiere				
Caposala				
Radiologo				
Tecnico di radiologia				
Medico di laboratorio				
Microbiologo				
Tecnico di laboratorio				
Ausiliario				

TABELLA DI GANTT PERCORSO MENINGITI

DIPARTIMENTO DI EMERGENZA				
	Primi 30 minuti	Secondi 30 minuti	Seconda ora	Terza ora
MEDICO	Il Medico esegue anamnesi ed esame obiettivo entro 10' dall'arrivo del paziente	Il Medico rivaluta le condizioni cliniche del paziente	Il Medico rivaluta le condizioni cliniche del paziente ed identifica la necessità di ulteriori eventuali terapie urgenti	Il Medico rivaluta le condizioni cliniche del paziente ed identifica la necessità di ulteriori eventuali terapie urgenti
	Valuta la necessità di effettuare TAC		Il Neuroradiologo fornisce risultati della TAC	
	Dispone la misurazione di parametri vitali	Il Neuroradiologo esegue TAC in urgenza e comunica referto	Prende visione della TAC e valuta l'eleggibilità del paziente nel percorso	
	Formula le ipotesi diagnostiche differenziali	Il Medico di Laboratorio esegue in regime di urgenza la lettura degli esami ematochimici e comunica il referto	Prende visione dei risultati degli esami ematochimici in urgenza	Dispone eventuale infusione di terapia antibiotica empirica
	Dispone il prelievo per esami ematochimici		Ottiene il consenso informato all'esecuzione della rachicentesi	Dispone il ricovero presso il dipartimento di Malattie Infettive
	Organizza eventuali altri esami strumentali urgenti guidati dalla clinica		Esegue rachicentesi per gli accertamenti previsti	
	Attiva la consulenza neurologica se sono presenti segni neurologici	Il Neurologo fornisce eventuale consulenza neurologica		
MEDICO	Identifica la necessità di eventuali terapie urgenti			Valuta i risultati forniti dal Laboratorio (esame chimico-fisico e conta cellule) e Microbiologia (Gram)
	Identifica la necessità di eventuali misure preventive			
	Fornisce le prime informazioni alla famiglia (stato clinico del paziente, possibili rischi infettivi per i contatti)		Aggiorna la famiglia sulle condizioni cliniche e sul risultato TAC	Aggiorna la famiglia sulle condizioni cliniche e sulla eventuale necessità di terapia antibiotica profilattica dei contatti
	Dispone ed adotta eventuali misure protettive			

TABELLA DI GANTT PERCORSO MENINGITI

	DIPARTIMENTO DI EMERGENZA			
	Primi 30 minuti	Secondi 30 minuti	Prima e Seconda ora	Terza ora
CAPOSALA				Prende contatto con il Reparto di destinazione del paziente ed informa sull'imminente ricovero
ALTRE FIGURE PROFESSIONALI		Il Tecnico di Neuroradiologia esegue TAC Il Tecnico di laboratorio: esegue esami emato-chimici in regime di urgenza Microbiologia: provvede al corretto avvio della emocoltura	Il Laureato di laboratorio comunica telefonicamente i risultati degli esami emato-chimici e microbiologici in urgenza	
INFERMIERE	Accoglie il paziente	Accompagna il paziente in Neuroradiologia	Assiste il medico nell'esecuzione della rachicentesi	Rivaluta i parametri vitali: PA, FC, FR e TC
	Misura parametri vitali: PA, FC, FR e TC	l'IP della Neuroradiologia infonde eventuale mezzo di contrasto e sorveglia il paziente	Rivaluta i parametri vitali: PA, FC, FR e TC	Allerta l'ambulanza per il trasferimento del paziente nel reparto di destinazione
	Incannula vena Esegue prelievo venoso Somministra eventuali terapie urgenti o sintomatiche per cefalea, vomito e febbre, per lo shock settico e per il controllo dell'ipertensione endocranica) (All. 2B) Adotta eventuali misure protettive (All. 2D)		Somministra eventuali terapie urgenti (All. 2B)	Somministra eventuali terapie urgenti (All. 2B)
AUSILIARIO	Consegna i prelievi venosi in laboratorio	Accompagna se stabilito il paziente in Neuroradiologia	Consegna i prelievi di liquor in laboratorio	

TABELLA DI GANTT PERCORSO MENINGITI

MICROBIOLOGIA					
professionalità	PRIMA ora	Secondo giorno Ore 8.00-14.00	Secondo giorno 14.00-20.00	Terzo giorno	Quarto giorno
Tecnico/ infermiere	Accettazione dei campioni: LCR emocolture				
Tecnico	Preparazione vetrini per conta e Colorazioni specifiche				
	Indagini biochimiche				
	Semina coltura	Lettura colture		Lettura colture	
	Incubazione emocolture	Lettura emocolture Se pos: microscopi, ATB diretto, sottocolture	Lettura emocolture Se pos: microscopi, ATB diretto, sottocolture	Lettura emocolture Se pos: microscopi, ATB diretto, sottocolture	Lettura emocolture Se pos: microscopi, ATB diretto, sottocolture
	Stock LCR a -80°C e 2-8°C per eventuale ricerca MTB				
	Introduzione su SG, referto preliminare				
Medico/ biologo	Lettura microscopia	Lettura colture LCR Se emo pos, lettura microscopi e disposizione du sottocolture e ATB diretto	Se emo pos, lettura microscopi e disposizione du sottocolture e ATB diretto	Lettura colture LCR Se emo pos, lettura microscopi e disposizione du sottocolture e ATB diretto	Lettura colture LCR Se emo pos, lettura microscopi e disposizione du sottocolture e ATB diretto
	Validazione referto preliminare e comunicazione con clinico	Validazione referto preliminare e comunicazione con clinico	Validazione referto preliminare e comunicazione con clinico	Validazione referto preliminare e comunicazione con clinico	

TABELLA DI GANTT PERCORSO MENINGITI

DIPARTIMENTO DI MALATTIE INFETTIVE				
Quarta ora	Seguito del primo giorno	Secondo giorno	Terzo giorno	Quarto giorno
Il Medico di Reparto esegue anamnesi ed esame obiettivo e dispone ulteriori eventuali terapie urgenti	Il Medico rivaluta le condizioni cliniche del paziente	Il Medico di Reparto esegue esame obiettivo	Il Medico di Reparto valuta i risultati degli esami batteriologici e virologici	Il Medico di Reparto valuta la necessità di eseguire una ulteriore rachicentesi sulla base di persistenza di febbre, cefalea, vomito, peggioramento sintomi neurologici
			Esegue eventuale aggiustamento della terapia sulla base dei risultati degli accertamenti microbiologici	Il Medico di Reparto valuta eventuali effetti avversi della terapia intrapresa
Dispone la periodicità del monitoraggio dei parametri vitali: PA, FC, FR e TC	Valuta l'andamento delle condizioni cliniche del paziente	Valuta l'andamento delle condizioni cliniche del paziente	Valuta l'andamento delle condizioni cliniche del paziente	Valuta l'andamento delle condizioni cliniche del paziente
Dispone eventuale prelievo venoso per esami emato-chimici di approfondimento	Esponde al paziente il percorso diagnostico-terapeutico	Illustra al paziente e alla famiglia i risultati degli esami eseguiti e l'andamento clinico	Illustra al paziente e alla famiglia i risultati degli esami eseguiti e l'andamento clinico	Illustra al paziente e alla famiglia i risultati degli esami eseguiti e l'andamento clinico
Dispone schema terapeutico				
Compila la cartella clinica	Aggiorna la cartella clinica con i risultati disponibili	Aggiorna la cartella clinica con i risultati disponibili	Aggiorna la cartella clinica con i risultati disponibili	Aggiorna la cartella clinica con i risultati disponibili
Aggiorna la famiglia sulle condizioni cliniche e fornisce informazioni sul programma terapeutico e sulla prognosi				
	Richiede eventuali ulteriori consulenze			
Aggiorna la famiglia sulle condizioni cliniche e valuta la necessità di terapia antibiotica profilattica dei contatti (All. 2C)				
		Attiva le ulteriori eventuali consulenze		

M
E
D
I
C
O



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