

Valuazione del test Eazyplex CSF direct B per la diagnosi rapida di meningite batterica

Tiziana D'Inzeo, Barbara Fiori, Maria Federica Ventriglia, Giulia Menchinelli, Flora Marzia Liotti, Giulia De Angelis, Maurizio Sanguinetti, Teresa Spanu

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Fondazione Policlinico Universitario "Agostino Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma



INTRODUZIONE

La meningite batterica è una grave patologia che in assenza di un appropriato trattamento è rapidamente fatale. Una diagnosi precoce e un trattamento tempestivo consentono di ridurre la mortalità e la morbosità. L'algoritmo diagnostico convenzionale nei pazienti con sospetta meningite è basato sulle analisi chimico-citologiche, sull'esame microscopico mediante colorazione di Gram e sull'esame colturale su campioni di liquido cefalo-rachidiano (LCR). La possibilità di visualizzare il microorganismo nel LCR è funzione della sua concentrazione (range: 25% se la carica è 10^3 UFC/ml, 60% se la carica è $10^3 - 10^5$ UFC/ml e 97% se $\geq 10^5$ UFC/ml). La sensibilità dipende dalla specie microbica infettante: 25-35% nelle meningiti da *L. monocytogenes*, 50% in quelle da *H. influenzae*, 70-90% nelle meningiti meningococciche e 90% in quelle pneumococciche. La ricerca degli antigeni batterici incrementa di poco la sensibilità diagnostica e pertanto riveste un limitato valore. La coltura è positiva nel 60-90% dei casi (range: 96% per meningiti causate da *H. influenzae*, 87% per quelle pneumococciche e 82% in quelle meningococciche). Peraltro, l'accuratezza della diagnosi microbiologica diminuisce quando i pazienti sono trattati con antibiotici prima del prelievo. Per contro, diversi studi hanno dimostrato che l'utilizzo di metodi molecolari incrementa l'accuratezza diagnostica anche in pazienti trattati. Il sistema Eazyplex CSF direct B (Amplex Diagnostics GmbH, Germany, Biolife italiana SRL, Milano Italia) è un metodo di PCR real time che rileva in 30 minuti la presenza di acidi nucleici di *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pneumoniae* nei campioni di LCR. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'accuratezza di tale metodica in campioni di LCR ottenuti da pazienti con sospetta meningite batterica comunitaria.

MATERIALI E METODI

Sede e disegno dello studio. Lo studio è stato condotto prospetticamente presso il laboratorio di Microbiologia della Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma. Sono stati analizzati campioni di LCR prelevati da pazienti con sospetta meningite batterica acuta comunitaria durante il periodo 2016-2017. Per ogni campione sono stati raccolti prospetticamente i dati clinici e laboratoristici.

Metodo convenzionale. I campioni sono stati prelevati mediante puntura lombare. Un'aliquota è stata inviata per l'analisi chimico-fisica ed un'altra per l'analisi microbiologica. All'arrivo in laboratorio di Microbiologia il campione è stato ripartito in tre aliquote. Un'aliquota del campione è stata conservata a -80°C . Una seconda aliquota è stata utilizzata per la semina su piastre di TSA al 5% di sangue montone, cioccolato PVX e brodo tioglicollato (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France); le colture sono state incubate a $35-37^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 per 2 a 5 giorni; la parte restante è stata sottoposta a citocentrifugazione ed utilizzata per l'esame microscopico. L'identificazione dei microrganismi cresciuti in coltura è stata ottenuta mediante spettrometria di massa utilizzando il sistema MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) o metodi fenotipici. La terza aliquota è stata sottoposta ad indagini molecolari.

Ricerca degli acidi nucleici batterici. Tutti i campioni LCR sono stati analizzati mediante PCR e sequenziamento del 16S rRNA, o con primer specifici (*ctrA*, *ply*).

Ricerca degli acidi nucleici batterici mediante sistema Eazyplex CSF direct B. L'esame Eazyplex, di semplice e rapida esecuzione, prevede il riscaldamento a 99°C per 3 minuti di una sospensione di 125 μl di CSF con 25 μl di un tampone di lisi (LA), il successivo trasferimento di 125 μl di tale sospensione in un secondo tampone di lisi (RALF), quindi il trasferimento di un'aliquota di 25 μl in ogni pozzetto del pannello. I risultati sono i forniti in automatico dal sistema dopo circa 20 min.

Verifica e analisi dei risultati. Sulla base della concordanza o della discordanza rispetto ai risultati ottenuti con il metodo di confronto molecolare sono state definite la sensibilità e la specificità dei tre metodi.

RISULTATI

Durante il periodo di studio sono stati analizzati 50 campioni di LCR prelevati da pazienti con sospetta meningite batterica comunitaria di cui 16 in trattamento antibiotico prima del prelievo di LCR e delle emocolture. Un'eziologia batterica è stata dimostrata in 25 pazienti (50%). Le principali caratteristiche demografiche e i parametri laboratoristici sono presentati in Tabella 1. La principale specie batterica identificata è stata *S. pneumoniae* (Figura 1).

Tabella 1

Caratteristiche	Campioni con risultati sul LCR	
	Positivi (n=25) ^b	Negativi (n=25)
Pazienti (n=50) ^a	11	11
Maschi		
Gruppi età		
0-6 mesi	5	7
7 mesi -5 anni	2	3
6-19 anni	2	3
20-34 anni	1	1
35-64 anni	9	7
>=65 anni	6	4
Parametri biochimici SANGUE		
Globuli bianchi (cell/mm ³)		
< 10000	6	8
> 10000	19	17
Proteina C reattiva (mg/L) ^c		
< 5	0	6
6-100	2	8
> 100	16	4
Parametri biochimici LCR		
Rapporto glucosio LCR/ sangue $\leq 0,36$	21	2
Proteine (mg/dl) media +SD	365±227	121±162
Globuli bianchi (cell/mm ³)		
0-100	3	21
101-500	2	2
501-1000	1	2
>1000	19	0
Emocolture positive	11	9

LCR, liquido cefalorachidiano
^a 15 pazienti avevano ricevuto terapia antimicrobica prima delle emocolture, e uno non ha eseguito il test.
^b Risultati positivi sul liquido cefalorachidiano con almeno uno dei tre metodi.
^c 36 pazienti hanno eseguito il test.

Come riportato in Figura 2, l'esame batterioscopico ha rivelato la presenza di microrganismi in 16 casi (32%) (1 *N. meningitidis*, 1 *S. agalactiae*, 8 *S. pneumoniae*, 1 *Streptococcus pyogenes*, 2 batteri gram positivi e 3 batteri gram negativi). L'esame colturale è risultato positivo in 19 casi (38%) (1 *S. agalactiae*, 1 *N. meningitidis*, 2 *L. monocytogenes*, 9 *S. pneumoniae*, 1 *Citrobacter koseri*, 1 *Streptococcus pyogenes*, 2 *Escherichia coli* e 2 *Propionibacterium acnes*). Il test Eazyplex CSF ha fornito un risultato positivo in 19 casi (38%) (1 *S. agalactiae*, 2 *L. monocytogenes*, 4 *N. meningitidis* e 12 *S. pneumoniae*). Globalmente la sensibilità dell'esame microscopico, dell'esame colturale e del sistema Eazyplex CSF B sono risultate rispettivamente pari al 64%, 76% e 76%. Considerando solo i microrganismi inclusi nel pannello Eazyplex CSF B, le sensibilità dell'esame microscopico, dell'esame colturale e del sistema Eazyplex CSF B sono risultate pari al 52.6%, 68.4% e 100%, rispettivamente. Pertanto l'incremento della resa diagnostica è stata del 47.4% rispetto all'esame microscopico e del 31.6% rispetto all'esame colturale.

Dei 25 pazienti con risultato negativo sul campione di LCR, 1 aveva una batteriemia da *Acinetobacter baumannii*, 1 da *E. coli*, 1 da *Klebsiella pneumoniae*, 1 da *S. agalactiae*, 2 da *N. meningitidis*, 2 da *Staphylococcus aureus*, e 1 da *Streptococcus mitis*. Una eziologia virale è stata documentata in 4 pazienti, di cui 1 con batteriemia da *S. mitis*. La specificità dei tre metodi è risultata pari al 100%.

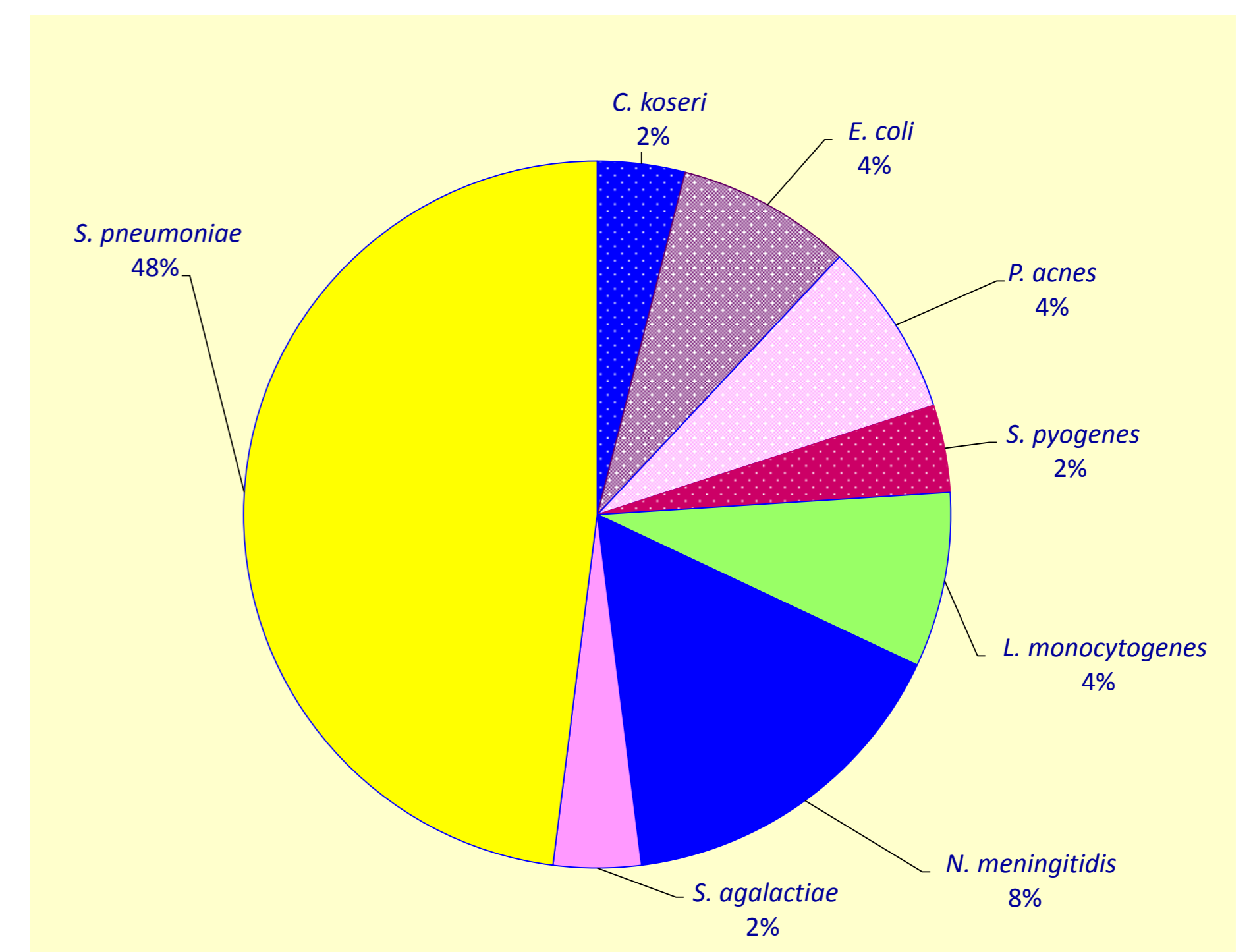


Figura 1

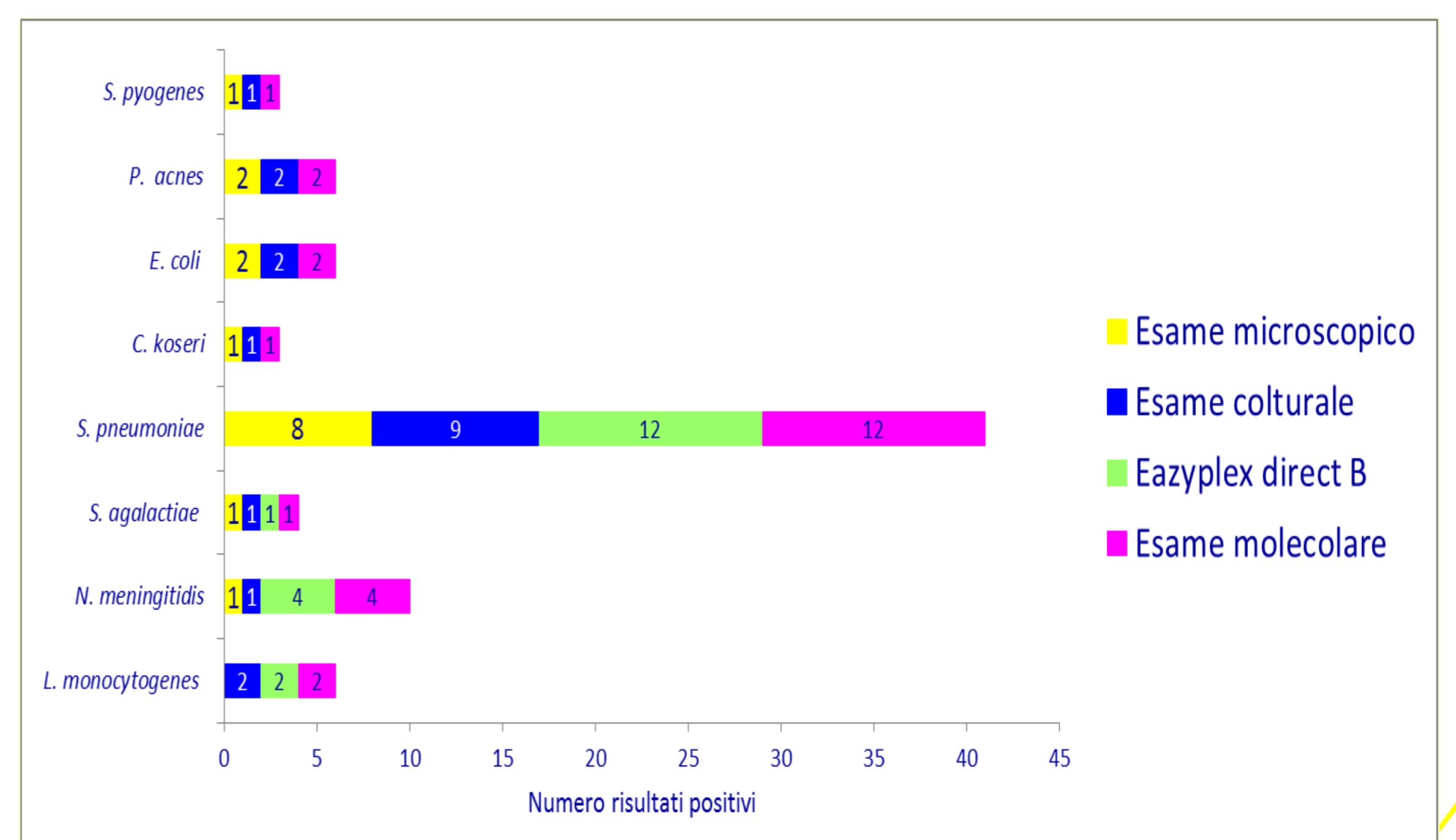


Figura 2

CONCLUSIONI

Il sistema Eazyplex CSF direct B fornisce risultati accurati e affidabili nei campioni di LCR che abbiamo saggiato, con un considerevole risparmio di tempo e lavoro. Questa esperienza suggerisce che tale metodica potrebbe essere usato nei laboratori per la routinaria identificazione dei ceppi responsabili di meningite batterica comunitaria, sebbene emerga chiaramente la necessità di un ampliamento delle specie identificabili.

BIBLIOGRAFIA

- McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3036-3047.
- Ku LC, Boggess KA, Cohen-Wolkowicz M. Bacterial meningitis in infants. *Clin Perinatol*. 2015;42(1):29-45.
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:467-922.
- Visintin C, Muggleston MA, Fields EJ, Jacklin P, Murphy MS, Pollard AJ. Guideline Development Group; National Institute for Health and Clinical Excellence. Management of bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children and young people: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2010 Jun 28;340:c3209.
- Gaillennin O, McGill F. Have a high index of suspicion for meningitis in adults. *Practitioner*. 2016 Jul-Aug;260(1795):25-30.
- Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, van de Beek D. Diagnostics in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*. 2012;380:1684-92, 66-67.
- Tamune H1, Takeya H2, Suzuki W2, Tagashira Y3, Kuki T3, Honda H4, Nakamura M5. Cerebrospinal fluid/blood glucose ratio as an indicator for bacterial meningitis. *Am J Emerg Med*. 2014 Mar;32(3):263-6.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KS, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 1;39(9):1267-84.
- D. van de Beek, C. Cabellios, O. Droupova, S. Esposito, M. Klein, A. T. Klok, S. L. Leib, B. Mouroullier, C. Ostergaard, P. Pagliano, H. W. Pfister, R. C. Read, O. Resat Sipahi and M. C. Brouwer, for the ESCMID Study Group for Infections of the Brain (ESGIBESCBT): guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: S37-S42.
- van Ettelevsen C.N., D. van de Beek, M.C. Brouwer. Update on community-acquired bacterial meningitis: guidance and challenges. *Clinical Microbiology and Infection* 23 (2017) 601e60. McGill F, Heyderman RS, Michael BD, Defres S, Beeching NJ, Borrow R, Glennie L, Gaillennin O, Wynocill D, Kaczmarek E, Nadel S, Thwaites G, Cohen J, Davies NW, Miller A, Rhodes A, Read RC, Solomon T. The UK joint specialist societies guideline on the diagnosis and management of acute meningitis and meningococcal sepsis in immunocompetent adults. *J Infect*. 2016 Apr;72(4):405-38.
- Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge III JE. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1617-20.
- Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Kjersem H, Jessen O, Johnsen N, et al. 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. Part III of a three-part series. *J Infect* 1983;7:193-202.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1553-8.
- Tzanakaki G, Tsopanomalou M, Kesanoopoulos K, Matzourani R, Sioumalia M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:386-90.
- Leber AL, Everhart K, Balada-Liasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, Desjarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven JL, Carroll KC, Miller JA, Dien Bard J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2251-61.
- Gomez CA, Pinsky BA, Liu A, Banaei N. Delayed Diagnosis of Tuberculous Meningitis Misdiagnosed as Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis With the FilmArray Syndromic Polymerase Chain Reaction Panel. *Open Forum Infect Dis*. 2016 Dec 7;4(1):ofw245.
- Shin SY, Kwon KC, Park JW, Kim JM, Shin SY, Koh SH. 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 Jan;32(1):44-9.