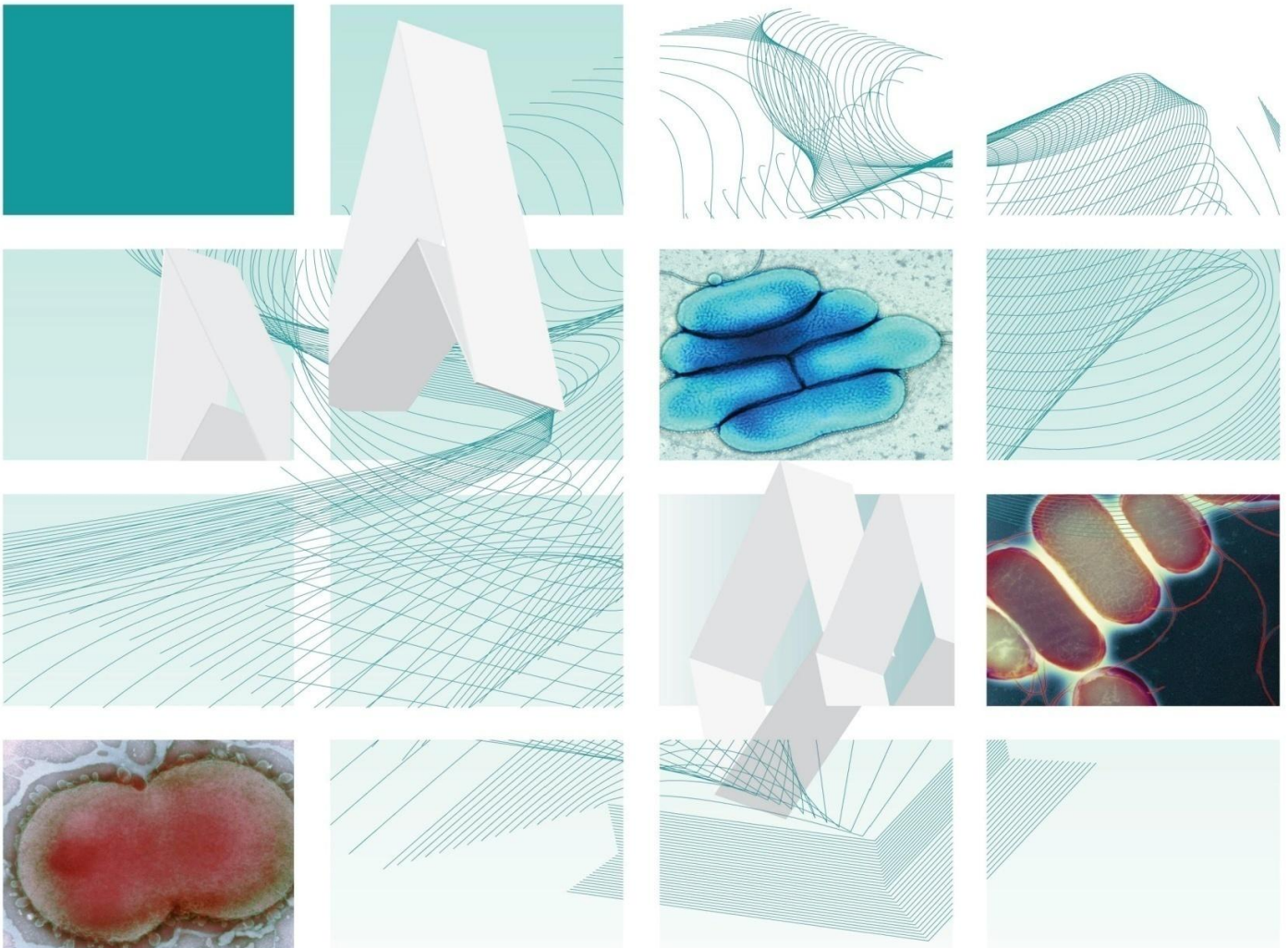




# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

4

## Ricerca su Liquido Cefalorachidiano



## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattar:

Standards Unit  
Microbiology Services Division  
Public Health England  
61 Colindale Avenue  
London NW9 5EQ

E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



I loghi sono corretti al momento della pubblicazione

## Contenuti

---

<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>2</b>
<b>TABELLA MODIFICHE</b> .....	<b>4</b>
<b>SMI RU: SCOPO E OBIETTIVO</b> .....	<b>5</b>
<b>SCOPO DEL DOCUMENTO</b> .....	<b>7</b>
<b>SCOPO</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
<b>INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA</b> .....	<b>13</b>
<b>2 PRELIEVO DEL CAMPIONE</b> .....	<b>14</b>
<b>3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE</b> .....	<b>14</b>
<b>4 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE</b> .....	<b>15</b>
<b>5 PROCEDURA DI REFERTAZIONE</b> .....	<b>21</b>
<b>6 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE</b> .....	<b>22</b>
<b>APPENDICE: RICERCA SU LIQUIDO CEFALORACHIDIANO</b> .....	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>25</b>



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation).

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

## Tabella delle Modifiche

---

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	10/31.05.17
Emissione eliminata. no	6
Emissione inserita no.	6.1
<b>Sezione(i) interessate</b>	<b>Modifica</b>
Diagnosi di meningite	Aggiornata tabella che si riferisce ai valori normali del LCR per includere una popolazione più ampia: neonati, lattanti e anziani

## SMI del RU#: Scopo e Obiettivo

### Users of SMIs

Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive. Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di test appropriati. I documenti forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute sia clinica che pubblica per la propria popolazione.

### Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati). Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova.

La standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori che è una condizione essenziale per interventi di sorveglianza della salute pubblica, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

### Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto in condizione paritaria da PHE, NHS, Royal College of Pathologists e organizzazioni professionali. L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. L'inclusione del logo di un'organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del Comitato Direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano. I rappresentanti agiscono da tramite con funzione di collegamento bi-direzionale per informazione e dialogo. Le attività di rappresentanza sono ricercate tramite un processo di consultazione. Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate tramite un ampio processo di consultazione.

### Assicurazione di Qualità

La NHS Evidence ha accreditato la procedura usata dai SMI Working Groups per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida emesse dall'Ottobre 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008. Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori

# Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accreditamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Le prestazioni della SMI dipendono da personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e che i risultati siano idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

### **Coinvolgimento del Paziente e della Comunità**

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato, la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web.

### **Informazione della Gestione dei Dati Sensibili**

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza. Lo sviluppo di metodi SMI è soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza <https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

### **Dichiarazione Legale**

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, la PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della revisione successiva. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

Le SMI sono assoggettate a diritti d'autore Crown che dovrebbero essere riconosciuti ove appropriato.

### **Citazione Suggesta per questo documento**

Public Health England. (2017). Investigation of Cerebrospinal Fluid. UK Standards for Microbiology Investigations. B 27 Emissione 6.1 <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

## Scopo del Documento

---

### Tipo di campione

Liquido cefalorachidiano... )

### Scopo

---

Questa SMI descrive l'esame del liquido cefalorachidiano (LCR) per la ricerca e l'identificazione dei microrganismi che causano la meningite. I virus e le altre cause di meningite vengono menzionate solo brevemente. Per maggiori informazioni sulla meningite virale fare riferimento a [G 4 – Investigation of Viral Encephalitis and Meningitis](#) e [V 43 – Investigation of Viral Encephalitis](#).

Questa SMI deve essere usata insieme alle altre SMI.

## Introduzione

---

La meningite è definita come infiammazione delle meningi<sup>1</sup>. Questo processo può essere di tipo acuto o cronico ed infettivo o non infettivo. Sono noti molti agenti infettivi che causano meningite, inclusi virus, batteri, funghi e parassiti.

### Microrganismi Causa di Meningite

Specie isolate tendono ad essere tipicamente, ma non esclusivamente, associate all'età o a fattori predisponenti del paziente<sup>1,2</sup>.

Da neonati e bambini fino a 2 mesi di età: streptococchi gruppo B di Lancefield, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, virus herpes simplex e *Neisseria meningitidis*. I neonati prematuri che necessitano di cure intensive sono a rischio di meningite da *Candida* sp. conseguente a candidemia.

Nei neonati e nei bambini fino a 2 mesi di età: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, virus (in particolare enterovirus) ed *Haemophilus influenzae* di tipo b. L'incidenza di *H. influenzae* tipo b meningite nel Regno Unito è stata notevolmente ridotta per l'immunizzazione di routine con di Hib<sup>2</sup>.

Da adulti: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, virus e occasionalmente *H. influenzae* non-Gruppo b.

I pazienti di età superiore a 60 anni, senza altri fattori predisponenti possono sviluppare infezioni da *Listeria monocytogenes*.

Funghi, come *Histoplasma capsulatum*, specie *Cryptococcus* sp. e *Coccidioides immitis* possono infettare le meningi nelle infezioni disseminate<sup>3</sup>.

Spirochete quali specie *Treponema pallidum*, *Borrelia* e *Leptospira* possono causare meningite come conseguenza di un'infezione generalizzata.

I parassiti (come le amebe specie *Acanthamoeba* e specie *Naegleria*) causano occasionalmente meningite. *Naegleria fowleri* invade le meningi attraverso la lamina cribrosa nei nuotatori d'acqua dolce che inalano piccole quantità di acqua, dando luogo a una consistente meningoencefalite con elevato tasso di mortalità.

Il nematode *Angiostrongylus cantonensis*, che ha una distribuzione principalmente nel sud-est asiatico ed è anche stato dalla Repubblica Dominicana, può causare meningite eosinofila in persone infette<sup>4</sup>.

Sono stati documentati molti altri microrganismi in grado di causare la meningite, ma non possono essere trattati tutti in questo documento.

## Meningite Batterica Acuta<sup>2</sup>

La meningite batterica acuta rappresenta un'emergenza medica. I segni ed i sintomi della meningite possono evolvere in pochi giorni od avere un inizio rapido ed un decorso fulminante di poche ore. L'andamento clinico può essere dominato da una concomitante setticemia, come nell'infezione meningococcica. Se non trattata, la mortalità è elevata. E' indispensabile che qualsiasi campione prelevato al paziente sia analizzato il più rapidamente possibile, con l'obiettivo di ottimizzare il trattamento clinico. Di norma, il LCR è invaso da leucociti neutrofili con aumento delle proteine e riduzione della concentrazione glucosio.

Numerose condizioni predispongono il singolo paziente a sviluppare la meningite<sup>1</sup>. Alcuni esempi sono rappresentati da: comunicazioni anomale post chirurgiche e traumatiche fra gli spazi subaracnoidali e sedi colonizzate (quali, naso e seni paranasali come conseguenza della frattura della base cranica), presenza di drenaggi del LCR, presenza di impianti cocleari, meningomielocele ed altre malformazioni congenite, infezioni di sedi contigue (quali cavità dell'orecchio medio o seni paranasali) e tumori in stretta prossimità al sistema nervoso centrale. Così come è possibile una diffusione diretta, l'infezione meningea può manifestarsi anche come risultato di un'infezione di origine ematica insorta in sede distante. I pazienti con disfunzioni immunologiche (come nelle sindromi da deficienza del complemento, ipogammaglobulinemia) o in trattamento con farmaci immunodepressori sono a maggiormente a rischio di meningite.

Le infezioni miste sono rare ma possono verificarsi in presenza di alcune condizioni predisponenti<sup>5,6</sup>. Queste sono associate a traumi, tumori o infezioni, quali la sinusite acuta che può estendersi direttamente alle meningi. Infezioni miste possono inoltre originare dall'ingresso diretto dei microrganismi tramite fistole o essere conseguenti alla rottura di un ascesso cerebrale.

## Meningite ("asettica") Virale<sup>7</sup>

La meningite virale è generalmente benigna e le complicanze sono rare. Il decorso è spesso subacuto, evolvendo in due o tre giorni. La causa principale è l'infezione enterovirale, specialmente nei mesi estivi e autunnali. Tipica è la predominanza dei linfociti nel LCR, ma si deve ricordare che precocemente nel corso della malattia, possono essere riscontrati sia neutrofili che linfociti (talvolta con predominanza neutrofili). La concentrazione di glucosio CSF è di solito normale e quella delle proteine è normale o leggermente aumentata<sup>1</sup>. Per maggiori informazioni, consultare [G 4 – Investigation of Viral Encephalitis and Meningitis](#).

## Meningite cronica<sup>8</sup>

Si definisce meningite cronica una infiammazione meningea che presenta segni e sintomi (incluse le anomalie del LCR) che sono rimasti presenti per un mese o più a lungo.

Una delle principali cause di questo tipo di infezione è la meningite tubercolare. Nel caso clinico conclamato il LCR può essere invaso da cellule linfocitarie. La meningite tubercolare assume un

quadro clinico insidioso e proteiforme. E' una manifestazione rara nel Regno Unito, ma la diagnosi deve essere considerata nelle aree ad alta prevalenza di TB ed in pazienti appartenenti a gruppi a rischio elevato. Per ulteriori informazioni consultare [B 40 - Investigation of Specimens for Mycobacterium species](#).



## Altri Tipi di Meningite<sup>8</sup>

La meningite da sarcoidosi è molto rara e determina un incremento della concentrazione proteica e del conteggio dei leucociti con lesioni delle meningi rilevabili dalla risonanza magnetica. La sarcoidosi è una malattia che coinvolge più organi ed è ad eziologia ignota, nonostante sia stata formulata l'ipotesi che sia la conseguenza dell'esposizione di soggetti geneticamente suscettibili agli agenti infettivi.

La meningite carcinomatosa prende origine da metastasi provenienti da sedi primarie con localizzazione meningea e la diagnosi solitamente si avvale dei sintomi correlati a lesioni dei nervi cranici quali la sordità, dell'utilizzo della risonanza magnetica e dell'esame citologico del LCR per la presenza delle caratteristiche cellule. E' inoltre importante differenziare una vera infezione e le conseguenze di una forma maligna in quanto le due condizioni possono coesistere.

## Gruppi Speciali a Rischio

I pazienti immunocompromessi sono maggiormente soggetti a meningite causata da microrganismi quali *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia* and *Toxoplasma gondii*<sup>9</sup>.

I pazienti con materiale protesico intracranico quali drenaggi (consultare [B 22 - Investigation of Cerebrospinal Fluid Shunts](#)) sono suscettibili a infezioni causate da *Staphylococcus aureus*, stafilococchi coagulasi-negativi, *Corynebacterium* species, *Propionibacterium* species, *Candida* species and *Enterobacteriaceae*.

## Diagnosi di Meningite<sup>1,2</sup>

La diagnosi di meningite è definita nel modo migliore con l'esame di laboratorio del LCR. Questo è di solito prelevato con una puntura lombare, ma si possono utilizzare anche liquor del ventricolo, cisterna o fontanelle. La puntura lombare può causare un'ernia cerebrale, pertanto nei pazienti a rischio di aumento della pressione intracranica è opportuno una TC preliminare a questa procedura. In alcuni casi il paziente è pure in condizione precaria o ha una diatesi emorragica conseguente ad una sindrome settica e pertanto non è in grado di tollerare la puntura lombare. Oltre all'esame del LCR, l'emocoltura e tamponi faringei possono essere utili nella diagnosi di meningite meningococcica e sierologia può consentire una diagnosi retrospettiva su sieri prelevati in fase acuta e durante la convalescenza

Nei pazienti con controindicazione alla puntura lombare, si deve produrre il massimo impegno per definire la diagnosi microbiologica con ogni altra modalità. Questo obiettivo è importante a fini epidemiologici e per un trattamento appropriato dei casi che hanno subito un contatto.

La diagnosi di meningite dall'esame del LCR comprende quanto segue<sup>1</sup>:

- Conteggio completo delle cellule
- Conta differenziale dei leucociti
- Esame dello striscio colorato con Gram
- Coltura
- Determinazione delle concentrazioni di glucosio e proteine (di solito eseguita dal Dipartimento di Biochimica clinica)
- PCR dove appropriata
- Ricerca antigene

La terapia non dovrebbe essere ritardata in attesa dell'esame microscopico o dell'esame colturale. Infatti, è importante iniziare rapidamente un'efficace terapia antimicrobica, che deve essere somministrata prima dell'esame del LCR. Ulteriori decisioni sulla gestione iniziale dovrebbero quindi essere prese sulla base dell'immediata disponibilità del numero delle cellule e della colorazione di Gram. L'esame del deposito da citocentrifugazione (es Cytospin) è il metodo più accurato di differenziazione cellulare, ma potrebbe non essere disponibile di routine.

I test in PCR sono disponibili come procedura diagnostica per i virus (per maggiori informazioni fare riferimento a [G 4 – Investigation of Viral Encephalitis and Meningitis](#)) e alcuni altri microrganismi sebbene, queste tecniche rimangono costose e evidenzino differenze in sensibilità e specificità tra i diversi insiemi di sonde e piattaforme di laboratorio<sup>2, 10,11</sup>. È stato definito un primer batterico ad ampio range che consente di rilevare anche microrganismi di riscontro meno frequente o che sono agenti eziologici batterici sconosciuti di meningite<sup>12</sup>. La PCR può essere particolarmente utile in situazioni in cui la cultura è negativa per somministrazione di chemioterapia, e la sierologia può essere utile anche in modo retrospettivo nei pazienti che sopravvivono. Tuttavia l'accuratezza del metodo 16S rDNA PCR differisce in funzione del tipo di campione, dei microrganismi coinvolti, della carica batterica e della presenza di DNA batterico diverso dal patogeno implicato nella malattia infettiva<sup>13</sup>.

I batteri che causano comunemente meningite presentano specifici antigeni polisaccaridici di superficie che possono essere rilevati dai test di agglutinazione al Lattice (LAT - Latex Agglutination Test). I LAT sono costosi, l'affidabilità è controversa e la sensibilità è ridotta<sup>14</sup>. Non dovrebbero essere usati sul LCR se non quando il conteggio cellulare è anomalo, lo striscio colorato con Gram è negativo e l'emocoltura risulta negativa dopo 48 ore<sup>14</sup>. Il medico deve essere informato che, anche se un LAT positivo indica la presenza di un agente infettivo, un risultato negativo non è definitivo. In questa SMI non è raccomandato l'uso di routine dei LAT.

Il test dell'antigene criptococcico dovrebbe essere effettuato sul LCR in tutti i casi di sospetta meningite criptococcica, e in tutti quelli di meningite nei pazienti immunocompromessi in cui si riscontra nel LCR un'elevata leucocitosi e per i quali non è stata formulata nessuna diagnosi alternativa<sup>15</sup>. In queste circostanze, il siero dovrebbe essere saggiato per l'antigene criptococcico (CRAG). 10<sup>6</sup>

### Valori normali del LCR<sup>1,16,21</sup>

Leucociti	Neonati	Meno di 28 giorni	0-30 cells x 10 <sup>6</sup> /L
	Lattanti	1-12 mesi	0-15 cells x 10 <sup>6</sup> /L
	Bambini/Adulti	1 year +	0-5 cells x 10 <sup>6</sup> /L
Eritrociti	Nessun GR dovrebbe essere presente nel LCR normale		
Glucosio	Neonati	meno di 28 giorni	1.94-5.55 mmol/L
	Lattanti	29 a 58 giorni	1.55-5.55 mmol/L
		2-12 mesi	1.94-5.0 mmol/L
	Bambini/Adulti	1 year +	2.22-4.44 mmol/L
Proteine	Neonati	meno di 28 giorni	0.65-1.5 g/L
	Lattanti	29-56 giorni	0.5-0.9 g/L
	Bambini	2 mesi a 18 anni	0.05- 0.35 g/L
	Adulti	più di 60 anni	0.15-0.6 g/L
		18 a 60 anni	0.15-0.45 g/L

Questi valori rappresentano i limiti superiore ed inferiore della condizione normale e sono solo a carattere indicativo.

## Anomalie associate a meningite batterica<sup>1</sup>.

- Ridotta concentrazione del glucosio: <60% del glucosio ematico (LCR: serico rapporto <0.6)
- Concentrazione proteica elevata
- Aumento dei globuli bianchi (CGB):  $10^1 - 10^4$  prevalenza di polimorfonucleati
- Pressione intracranica elevata

La presenza di globuli rossi nel CSF può derivare da una emorragia intra-cerebrale o sub-aracnoidea o da una puntura lombare traumatica (LP), in cui il sangue periferico contamina il LCS. La presenza del sangue contaminante può rendere più difficile l'interpretazione delle analisi del liquor, ma oscura raramente le anomalie associate a meningite batterica<sup>26</sup>.

Sono esaminati i campioni sequenziali 1 e 3 da una puntura lombare. La colorazione ematica uniforme di tutti i campioni suggerisce emorragia pregressa nello spazio sub-aracnoideo, mentre conte in riduzione nei campioni sequenziali suggeriscono sanguinamento indotto dalla procedura di prelievo.

Il rapporto GB: GR di 1: 500 e 1: 1000 è generalmente considerato come non indicativo di infezione. I LCR prelevati più di 12 ore dopo l'emorragia intra-cranica possono presentare aumento del conteggio leucocitario a valori fino di  $500 \times 10^6$  causato dalla risposta infiammatoria.

Sebbene i pazienti con meningite batterica acuta non trattati presentino solitamente conteggi elevati di GB polimorfonucleati nei LCR, il rapporto polimorfonucleati : linfociti è inaffidabile per definire la causa della meningite. Ciò è particolarmente vero nei neonati o quando il conteggio totale dei leucociti è inferiore a  $1000 \times 10^6/L^2$ . La meningite virale è classicamente descritta come associata a un LCR con linfocitosi, ma i neutrofilii possono predominare, soprattutto nelle prime fasi della malattia<sup>27,28</sup>. Nelle prime fasi dell'infezione anche la meningite tubercolare può essere associata a infiltrati di neutrofilii e non a infocitosi<sup>8</sup>. I pazienti neutropenici non possono produrre nel LCR risposte affidabili o caratteristici GB polimorfi o neutrofilii.

Occasionalmente l'esame di un preparato a fresco o l'allestimento di un vetrino con inchiostro di china sarà in grado di rilevare rispettivamente le amebe e *C. neoformans*. Quest'ultimo accertamento è essenziale se l'infezione criptococcica è sospettata in un paziente immunocompromesso, questo accertamento dovrebbe essere confermato con l'agglutinazione con lattice<sup>14</sup>.

## Xantocromia.

La xantocromia si manifesta con colorazione giallognola nel soprannatante nel centrifugato del LCR. Può essere conseguente al metabolismo dei prodotti degradati dei GR, aumento della concentrazione di proteine del LCR, o la colorazione dovuta a bilirubina. L'emolisi dei GR nel LCR

inizia approssimativamente 1–2 ore dopo l'emorragia. Il soprannatante può inizialmente colorarsi in rosa per presenza di ossiemoglobina. Dopo 24 ore, il soprannatante inizia a dimostrare un incremento della xantocromia causata dalla degradazione della ossiemoglobina a bilirubina. Questa evenienza raggiunge il picco dopo 36–48 ore.

Nell'emorragia subaracnoidea la xantocromia è associata ad un aumento di dieci volte della concentrazione delle proteine con valori  $\geq 1.5$  g/l che raggiunge il picco massimo 8–10 giorni dopo l'esordio e poi decresce. In una puntura lombare traumatica recente, il soprannatante del LCR è di solito trasparente e privo di colorazione, sebbene numerosi altri fattori possono contribuire alla determinazione del suo aspetto<sup>26</sup>.

La determinazione visiva è inaffidabile. La xantochromia deve essere determinata con la spettrofotometria sul surnatante del liquor centrifugato ricercando ematina o bilirubina macroscopicamente non visibili, che, se presenti, confermeranno l'emorragia intracranica precedente alla puntura lombare<sup>29</sup>.

## Informazione Tecnica/Limitazioni

---

### Limitazioni delle SMI del RU

Le raccomandazioni formulate nelle SMI del RU sono basate su prove (ad esempio sensibilità e specificità), se disponibili, opinioni degli esperti e pragmatismo, tenendo in considerazione anche le risorse disponibili. I laboratori dovranno tenere in considerazione le esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive, se appropriato. Prima del loro uso, i laboratori devono assicurare che tutti i saggi commerciali e in-house sono stati validati e sono idonei allo scopo.

### Terreni Selettivi nelle Procedure di Screening

I terreni selettivi che non consentono la crescita di tutti i ceppi di microrganismi circolanti possono essere consigliati sulla base delle evidenze disponibili. Pertanto, se si usa più di una piastra di terreno, deve essere ricercata una soluzione d'equilibrio tra le prove disponibili e le risorse necessarie.

### Contenitori per campioni<sup>30,31</sup>

Le SMI usano il termine " contenitore a chiusura ermetica con marchiatura CE " per descrivere quelli contrassegnati con la marchiatura CE per la raccolta e il trasporto dei campioni clinici. I requisiti per i contenitori dei campioni sono riportati nella Direttiva UE per i Dispositivi Sanitari Diagnostici in vitro (98/79/CE allegato 1 B 2.1) in cui si stabilisce: " La progettazione deve consentire un'agevole manipolazione e, se necessario, ridurre per quanto possibile la contaminazione dei, e perdite dal dispositivo durante l'uso e, nel caso di recipienti per campioni, il rischio di contaminazione degli stessi. Le procedure di fabbricazione devono essere adatte a questi scopi".

# 1 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>30-46</sup>

## 1.1 Considerazioni sulla sicurezza<sup>30,35</sup>

Usare tecnica asettica

Raccogliere in appropriati contenitori marcati CE a tenuta ermetica i campioni e di trasportarli in sacchetti di plastica sigillati.

E' essenziale la conformità alle normative postali e dei trasporti.

## 1,2 Procedura sul Campione<sup>30-46</sup>

La maggior parte delle procedure diagnostiche può essere eseguita a Livello di Contenimento 2 tranne quando si sospetta un'infezione da a) *N. meningitidis*, b) Microrganismo appartenente al Gruppo di Rischio 3 o c) sospetto di TSE.

a) *N. meningitidis* causa malattie gravi e talvolta mortali. Sono state segnalate infezioni acquisite in laboratorio. Il microrganismo infetta principalmente attraverso la respiratoria. E' disponibile un vaccino efficace per alcuni gruppi di meningococco.

*N. meningitidis* appartiene al Gruppo di Rischio 2 e il trattamento dei campioni diagnostici può essere eseguito a Livello di Contenimento 2.

A causa della gravità della malattia e dei rischi associati con la generazione di aerosol del microrganismo, qualsiasi manipolazione di isolati sospetti di *N. meningitidis* deve sempre essere effettuata in una cabina di sicurezza microbiologica fino a quando *N. meningitidis* è stata esclusa (come per qualsiasi procedura di laboratorio che genera aerosol infettivi).

c) Fare riferimento a <https://www.gov.uk/government/groups/advisory-committee-on-dangerous-pathogens> per indicazioni su agenti TSE. Le politiche di laboratorio che tengono conto delle valutazioni del rischio locale possono imporre l'uso di una cabina microbiologica di sicurezza quando si procede all'erogazione del campione.

Le procedure di laboratorio che si ritiene possano generare aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza<sup>38</sup>.

Prima della colorazione, fissare il materiale strisciato ponendo il vetrino su una piastra elettrica (65-75° C), sotto una cappa, fino a essiccamento. Mettere quindi su un portavetrini o altro supporto idoneo.

**Nota:** la fissazione al calore può non uccidere tutte le specie di *Mycobacterium*<sup>47</sup>. I vetrini devono essere manipolati con cura.

La centrifugazione deve essere eseguita con contenitori chiusi che in seguito sono aperti in una cabina microbiologica di sicurezza.

I contenitori dei campioni devono essere collocati su un supporto idoneo

Fare riferimento alle attuali linee guida per la manipolazione sicura di tutti i microrganismi documentati in questa SMI.

Le linee guida precedentemente esplicitate devono essere supplementate con la COSHH locale e con la valutazione del rischio.

## 2 Prelievo del Campione

---

### 2.1 Tipo di campione

LCR

### 2.2 Tempo Ottimale e Metodo di Prelievo<sup>48</sup>

Per considerazioni sulla sicurezza, consultare la Sezione 1.1.

Prelevare i campioni prima della terapia antimicrobica se possibile, ma questa non deve essere ritardata inutilmente in attesa della puntura lombare e dell'esame colturale del LCR<sup>48</sup>.

Prelevare i campioni in appropriati contenitori impermeabili con marchiatura CE e inserirli in sacchetti di plastica sigillati.

Il prelievo viene eseguito da specialista secondo i protocolli locali

### 2.3 Quantità Adeguata e Numero Appropriato di Campioni<sup>48</sup>

Il LCR normalmente raccolto in sequenza in tre o più contenitori separati che devono essere numerati progressivamente. Raccogliere i campioni in appropriati contenitori impermeabili con marchiatura CE e trasportarli in sacchetti di plastica sigillati.

Si raccomanda inoltre il prelievo aggiuntivo di un campione in una provetta contenente fluoro per la determinazione del glucosio che deve essere riempita per ultima in modo da evitare la contaminazione della coltura ad opera di batteri ambientali.

Di consuetudine si inviano il primo e l'ultimo campione prelevato per l'esame microbiologico e il secondo per la determinazione delle proteine. Il campione contenente fluoro non deve essere inviato al laboratorio di Microbiologia. In teoria, l'accertamento deve essere eseguito sull'ultimo campione, mentre il primo è conservato come controllo.

Idealmente è richiesto un volume minimo di 1 ml per ogni provetta 1 e 3 prelevato per l'esame microscopico (negli adulti). Quando il volume del campione è inferiore a quanto atteso, è possibile miscelare i campioni.

Per le specie *Mycobacterium*, almeno 10 ml, quando possibile.

**Nota:** Maggiore è il volume prelevato, maggiore è la possibilità d'isolamento, in particolare per l'indagine colturale di *M. tuberculosis*.

## 3 Trasporto e Conservazione del Campione<sup>30,31</sup>

---

### 3.1 Trasporto e Conservazione Ottimale del campione

Per considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.1

Il tempo che intercorre dal prelievo all'esame microscopico e colturale dovrebbe essere contenuto entro un massimo di 2 ore<sup>1,44</sup>. Le cellule si disgregano e un ritardo può determinare il conteggio cellulare che non riflette la situazione clinica del paziente.

I campioni devono essere trasportati e processati il più presto possibile<sup>48</sup>

Non refrigerare il campione se non dopo avere eseguito l'esame microscopico e l'esame colturale. Il campione può essere allora refrigerato per eventuali ricerche.

## 4 Procedura sul Campione<sup>30,31</sup>

### 4.1 Selezione della Prova

I campioni prelevati dopo gli accertamenti neurologici di routine (quali mielogramma, sclerosi multipla) non richiedono l'allestimento di un vetrino per il Gram o l'esame colturale se non quando è aumentato il conteggio dei leucociti, o questi accertamenti sono clinicamente indicati o specificati da un protocollo locale.

Dividere il campione in quantità multiple, dopo l'esecuzione dell'esame microscopico e colturale, per ulteriori appropriati accertamenti quali, determinazione della concentrazione proteica, esame colturale per specie di *Mycobacterium* ([B 40 - Investigation of Specimens for Mycobacterium species](#)), ricerca di parassiti ([B 31 - Investigation of Specimens other than Blood for Parasites](#)), screening per antigene criptococcico o esame virologico secondo le indicazioni dei riscontri clinici, degli esami eseguiti o dei risultati microscopici.

**Nota:** Se il volume del campione è insufficiente per tutti gli accertamenti, stabilire la loro priorità dopo aver consultato il medico microbiologo.

Nei casi di meningite batterica lo screening rapido per la ricerca degli antigeni batterici nel LCR non è raccomandato come routine. Comunque può essere utile nel caso si deva accertare se due o più casi identici si sono manifestati in una scuola (per definire la profilassi di massa o la vaccinazione).

La PCR è attualmente disponibile per alcuni microrganismi. Si deve preferire un campione di materiale da provetta non ancora aperta, se disponibile.

### 4.2 Aspetto

Descrivere il grado di torbidità e l'eventuale presenza di coagulo (che dovrebbe invalidare il conteggio delle cellule).

Nei casi gravi di meningite TB può essere presente il tipico coagulo a "ragnatela". Sebbene ciò accada raramente, questo deve essere segnalato se presente.

Registrare se il volume del campione è insufficiente per tutti gli accertamenti e, se appropriato, richiedere al medico microbiologo indicazioni per gli esami prioritari.

Descrivere il colore del sopranatante dopo la sua centrifugazione

Se richiesta, o se si debba chiarire la sorgente dei GR presenti nel LCR, la conferma della xantocromia deve essere eseguita con lo spettrofotometro.<sup>24</sup> Questa determinazione è di solito eseguita dai dipartimenti di biochimica clinica, così come la determinazione delle proteine e del glucosio.

### 4.3 Preparazione del Campione

Per Considerazioni sulla sicurezza fare riferimento alla Sezione 1.2

Consultare le sezione Microscopia.

### 4.4 Microscopia

#### 4.4.1 Conteggio standard totale delle cellule

Eeguire il conteggio totale dei GB e dei GR sul campione non centrifugato, preferibilmente sull'ultimo campione prelevato, utilizzando una camera di conteggio.

I conteggi non devono essere eseguiti su campione che contiene un coagulo (che invalida i risultati).

## Conteggio differenziale delle cellule

### 1. Metodo di conteggio in camera (raccomandato per bassi conteggi di GB)

#### a) Campioni con colorazione ematica assente o lieve

Trattare il LCR non centrifugato con 0.1% di soluzione colorante quale toluidina, blu metilene o blu Nilo. Questi colorano il nucleo dei leucociti e consentono la differenziazione delle cellule. Se il LCR è diluito dall'aggiunta del colorante, tenere conto del fattore di diluizione per il conteggio definitivo delle cellule.

Conteggiare e registrare il numero esatto di ciascun tipo di leucocita. Esprimere il conteggio dei leucociti come numero di cellule per litro.

#### b) Campioni con evidente colorazione ematica

Diluire il campione con liquidi appropriati per GB ed attendere 5 minuti prima di trasferirlo nella camera di conteggio. Ciò consente la lisi dei GR e la colorazione del nucleo dei leucociti per la loro differenziazione.

Conteggiare e registrare il numero riscontrato di ciascun tipo di leucocita. Tenere conto del fattore di diluizione, esprimere il risultato come numero di cellule per litro.

### 2. Metodo di colorazione (raccomandato per elevati conteggi di GB nei quali la differenziazione in camera di conteggio risulta difficile)

Preparare un vetrino dal sedimento di LCR centrifugato come per le preparazioni del Gram, ma lasciare asciugare all'aria. Fissare in alcool e colorare utilizzando un colorante idoneo per definire la morfologia dei GB.

**Nota 1:** La fissazione al calore coarta la morfologia cellulare.

**Nota 2:** Conteggiare e registrare il numero di ciascun tipo di leucocita. Tenere conto del fattore di diluizione, esprimere il risultato come numero di cellule per litro.

**Nota 3:** Il sedimento da citocentrifugazione (quale Cytospin) permette una più accurata differenziazione delle cellule. Porre attenzione ad utilizzare una provetta sterile se il centrifugato deve essere utilizzato per la colorazione di Gram.

## Conteggio totale dei globuli rossi

Se si sospetta un'emorragia, eseguire il conteggio totale dei GR su almeno due campioni diversi prelevati con la stessa puntura lombare per verificare l'uniformità della colorazione ematica. Per ogni diluizione richiesta deve essere utilizzata soluzione fisiologica isotonica o tampone fosfato.

Colorazione Gram (**fare riferimento alla [TP 39 - Staining Procedures](#)**)

Eseguire la colorazione Gram su tutti i campioni sospetti eccetto:

- Campioni coagulati (consultare di seguito)
- Campioni neurologici di routine solo se i conteggi dei leucociti sono aumentati
- I conteggi cellulari dei PM di campioni non affidabili dovrebbero essere seminati in coltura

Centrifugare in contenitore sterile, chiuso, a fondo conico a 1200 x g per 5-10 minuti.

**Nota:** Se è richiesta anche la ricerca di specie *Mycobacterium*, il tempo di centrifugazione può essere protratto a 15-20 minuti a 3000xg (consultare [B 40 - Investigation of Specimens for Mycobacterium species](#)), ed utilizzare lo stesso sedimento per questa specifica ricerca e per l'esame microscopico e colturale di routine<sup>50</sup>.

Trasferire completamente il sopranatante, tranne gli ultimi 0.5 ml, in un'altra provetta sterile per prove addizionali qualora richieste (quali protidorrachia, esami virologici).



Sospendere di nuovo il deposito nel restante liquido.

Utilizzare una pipetta sterile e deporre una goccia del centrifugato su un vetrino da microscopio pulito.

Diffondere il materiale con un'ansa sterile e approntare uno striscio sottile per il Gram.

La sensibilità della colorazione Gram può essere migliorata con la sovrapposizione seriale delle gocce dopo che ciascuna di esse è asciugata, al fine di ottimizzare la quantità di materiale esaminato. Prendere le dovute precauzioni per evitare che lo striscio non venga lavato via durante la colorazione.

### **Campioni coagulati**

Quando possibile, il coagulo dovrebbe essere rotto utilizzando una pipetta sterile ed una sua quota utilizzata per la preparazione di uno striscio per la colorazione Gram.

## **4.4.2 Prove supplementari**

### **Esame per *M. tuberculosis***

La tecnica di "sovrapposizione seriale" dello striscio precedentemente descritta è raccomandata per la ricerca delle specie di *Mycobacterium* (consultare [B 40 - Investigation of Specimens for \*Mycobacterium\* species](#)). Se è presente un coagulo a "ragnatela", questo deve essere incluso nella quota di campione da esaminare al microscopio e da seminare in coltura.

### **Esame per *C. neoformans***

Mescolare una goccia del sedimento del centrifugato con una goccia di inchiostro di china e nigrosina e 50% di acqua su un vetrino da microscopio pulito e coprire con un coprioggetto (consultare [TP 39 - Staining Procedures](#)).

Ricercare la presenza di funghi di aspetto rotondeggiante od ovale con un evidente alone chiaro che circonda la cellula, questo rilievo indica la presenza di una capsula. La presenza di questa struttura permette un'identificazione presunta di *C. neoformans*.

### **Ricerca per amebe**

Esaminare il sedimento del centrifugato ed il campione non centrifugato con preparazione a goccia umida. Porre la goccia del campione su un vetrino da microscopio pulito, ricoprire con coprioggetti ed esaminare per la ricerca dei trofozoiti di ameba ([B 31 - Investigation of Specimens other than Blood for Parasites](#)).

## **4.5 Coltura e Ricerca**

### **4.5.1 Pre trattamento**

#### **Standard**

Centrifugare il campione (eseguire immediatamente l'esame microscopico – consultare 4.4).

#### **Ricerche supplementari**

Specie *Mycobacterium* ([B 40 - Investigation of Specimens for \*Mycobacterium\* species](#)) e parassiti (consultare [B 31 - Investigation of Specimens other than Blood for Parasites](#)).

### **4.5.2 Procedura sul campione**

#### **Standard**

Per tutti i LCR

- Con una pipetta sterile inoculare ciascuna piastra con il deposito del centrifugato (consultare [Q 5 - Inoculation of Culture Media for Bacteriology](#))
- Lasciare asciugare l'inoculo prima di diffonderlo per ridurre al minimo qualsiasi effetto conseguente alla presenza di antibiotici che potrebbero essere presenti
- Per ottenere colonie isolate diffondere l'inoculo con un'ansa sterile

### **Campioni coagulati**

Seminare i frammenti del coagulo in ciascuna piastra di agar.

Se il campione contiene solamente un piccolo coagulo, questo dovrebbe essere incluso nella coltura di una piastra di agar cioccolato. La parte di campione di LCR non coagulata deve essere seminata in modo normale come precedentemente descritto.

### **Prove supplementari**

Se la cultura da paziente clinicamente malato ha esito negativo, considerare altri metodi non-colturali, quali ad esempio la diagnosi con 16S PCR, MALDI TOF, etc.

Le brodocolture non sono raccomandate in quanto non si raggiunge un grado significativo di positività mentre la contaminazione risulta frequente, a meno che non si tratti di un'infezione del dispositivo di drenaggio dove può essere un valore aggiunto<sup>51-53</sup>.

## 4.5.2 Terreni di coltura, condizioni e microrganismi per tutti i campioni:

Aspetti clinici/ condizioni	Campione	Terreno standard	Incubazione			Lettura colture	Microrganismo (i) ricercati
			Temp C°	Atmos	Tempo		
Meningiti Dopo neurochirurgia Serbatoi di raccolta Ventricolite Immocompromessi	LCR	Agar cioccolato	35 -37	5 – 10% CO <sub>2</sub>	40 – 48 ore	giornaliera	Tutti i microrganismi
		Agar sangue	35 -37	5 – 10% CO <sub>2</sub>	40 – 48 ore	giornaliera	

In queste situazioni aggiungere quanto segue:

Aspetti clinici/ condizioni	Campione	Terreni supplementari	Incubazione			Lettura colture	Microrganismo (i) ricercati
			Temp C°	Atmos	Tempo		
Pazienti immuno-compromessi	LCR	Piastra di Sabouraud	35 -37	aria	14 g*	≥40 ore:	Funghi
Ascessi cerebrali Ventricolite Serbatoi di raccolta Post neurochirurgia Dopo otite media con complicazioni	LCR	Agar per anaerobi esigenti	35 -37	Anaerobia	10	≥40 ore e 5 g e 10g se si dispone di cabina anaerobica, altrimenti a 10g	Anaerobi
Se lo striscio colorato con Gram indica la possibilità di infezione mista	LCR	Agar neomicina per anaerobi esigenti	35 -37	anaerobia	7 - 14 giorni	≥40 ore e 5g e 10g se si dispone di cabina anaerobica, altrimenti a 10g	

\* Se la coltura richiede tempi lunghi, alla piastra può essere aggiunto un becco di clarino di sabouraud. Brodi di arricchimento possono migliorare la diagnosi di una infezione del drenaggio (consultare pagina 18). Altri microrganismi da prendere in considerazione - specie *Mycobacterium* e parassiti, come descritto nei test supplementari, *T. pallidum* e virus possono essere trovati nella SMI pertinenti.

## 4.6 Identificazione

Per l'identificazione, fare riferimento alle singole SMI.

### 4.6.1 Livello minimo di identificazione in laboratorio

Anaerobi	Livello specie
<a href="#">Actinomyces</a>	Livello specie
<a href="#">β-haemolytic streptococci</a>	Livello gruppo di Lancefield

Tutti gli altri microrganismi	Livello specie
<i>Mycobacterium</i>	<a href="#">B 40 - Investigation of specimens for <i>Mycobacterium</i> species</a>
Parasiti	<a href="#">B 31 - Investigation of specimens other than blood for parasites</a>

**Nota:** Qualsiasi microrganismo considerato contaminante può non richiedere l'identificazione a livello di specie.

I microrganismi possono successivamente essere identificati se sussistono indicazioni di tipo clinico od epidemiologico.

#### 4.7 Prova di Sensibilità agli Antibiotici

Fare riferimento alle linee guida della [British Society for Antimicrobial Chemotherapy \(BSAC\)](#) e/o [EUCAST](#)

#### 4.8 Riferimento per Ricerche su Focolaio Epidemico

N/D

#### 4.9 Invio ai laboratori di riferimento

Per informazioni sulle prove disponibili, tempi di risposta, procedure per il trasporto e altre richieste del laboratorio di riferimento, [click here for user manuals and request forms](#).

$\beta$ -haemolytic streptococci	Serotipizzazione
<i>S. pneumoniae</i>	Serotipizzazione
<i>H. influenzae</i>	Serotipizzazione
<i>Listeria</i> species	Serotipizzazione
<i>N. meningitidis</i>	Caratterizzazione dei ceppi, prova di sensibilità agli antimicrobici
Funghi	Identificazione e/o prova di sensibilità agli antimicrobici
<i>Mycobacterium</i> species	<a href="#">B 40 - Investigation of Specimens for <i>Mycobacterium</i> species</a>

Gli isolati associati a epidemie, dove epidemiologicamente indicato, microrganismi con insolite o inattese resistenze che evidenziano un problema clinico o di laboratorio che richiede interpretazione, dovrebbero essere inviati al laboratorio di riferimento.

LCR, doppi campioni di sangue con EDTA e siero possono essere inviati al Meningococcal Reference Unit (MRU) per accertamenti con metodi molecolari o sierologici se si sospetta un'infezione meningococcica e la coltura è negativa.

I campioni per i saggi molecolari per altri microrganismi possono essere inviati ai laboratori appropriate se clinicamente richiesto.

Dovrebbero essere inviati ai laboratori appropriati i microrganismi con resistenze insolite o inattese, e nel caso di problemi insoliti di laboratorio o clinici, o anomalie che richiedono chiarimenti.

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni sulle prove disponibili, tempi di consegna, procedure di trasporto ed eventuali altri richieste per 'invio del campione:

Inghilterra e Galles

<https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services>

Scozia

<http://www.hps.scot.nhs.uk/reflab/index.aspx>

Irlanda del Nord

<http://www.publichealth.hscni.net/directorate-public-health/health-protection>

## 5 Procedura di Refertazione

---

### 5.1 Aspetto

Refertare l'aspetto del LCR e la presenza di un coagulo se appropriato.

### 5.2 Microscopia

#### Conteggio cellulare (se richiesto)

Refertare il numero di GR x 10<sup>6</sup>/L

Refertare anche il numero dei PMN e linfociti x 10<sup>6</sup>/L

Refertare i PMN e linfociti come percentuali del totale dei GB (riportata come x 10<sup>6</sup>).

In alcuni casi può essere opportuno richiedere l'identificazione citologica delle cellule mononucleate e di altri tipi di cellule.

#### Colorazione di Gram

Refertare i microrganismi osservati e presenza assenza di cellule del pus.

#### Supplementari

Inchiostro d'India o nigrosina.

Refertare i lieviti rilevati dotati di capsula.

Microscopia per specie *Mycobacterium* ([B 40 - Investigation of Specimens for \*Mycobacterium\* species](#)) e parassiti ([B 31 - Investigation of Specimens other than Blood for Parasites](#)).

#### 5.2.1 Tempo di risposta dell'esame microscopico

I risultati del conteggio delle cellule e colorazione di Gram dovrebbero essere comunicati immediatamente, entro due ore dal ricevimento del campione e resi disponibili sui sistemi di comunicazione in uso ai clinici. Qualora tali mezzi non siano presenti, dovrebbero essere disponibili referti preliminari scritti o generati dal sistema informatico entro le 24 ore successive alle informazioni preliminari/verbali.

### 5.3 Coltura

Refertare i microrganismi isolati o

Refertare assenza di crescita

Refertare anche i risultati delle prove supplementari

#### Tempo di risposta dell'esame colturale

I risultati degli esami colturali clinicamente urgenti devono essere comunicati per telefono o inviati per via elettronica, quando disponibili.

Referto provvisorio/finale, dopo 16- 72 ore, se appropriato, segnalare l'invio di un successivo referto.

Risultati delle prove molecolari (se disponibile).

Ricerche supplementari : specie *Mycobacterium* ([B 40 - Investigation of specimens for Mycobacterium species](#)) funghi ([B 39 - Investigation of dermatological specimens for superficial mycoses](#)) e parassiti ([B 31 - Investigation of specimens other than blood for parasites](#))

## 5.4 Sensibilità agli Antimicrobici

Refertare le sensibilità come clinicamente suggerito. Usare in modo prudenti gli antimicrobici secondo i protocolli locali e nazionali raccomandati.

## 6 Notifica al PHE<sup>54,55</sup> o Equivalente<sup>56-59</sup>

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England Protection Agency (HPA) tutti i casi nei quali s'identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della HPA. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente alla PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

**Nota:** La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per Human Immunodeficiency Virus HIV & Sexually Transmitted Infections STIs, Healthcare Associated Infections e HCAs e Creutzfeldt–Jakob disease CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non al 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010>

Sono vigenti altre disposizioni in [Scotland](#)<sup>56,57</sup>, [Wales](#)<sup>58</sup> e [Northern Ireland](#)<sup>59</sup>.

Gli isolati dal LCR clinicamente significativi devono essere segnalati al CIDSC regionale e al CCDC locale.

Fare riferimento a quanto segue:

Identificazione microrganismi SMI specifiche.

Pubblicazioni della Health Protection Agency:

“Laboratory Reporting to the Health Protection Agency. Guide for diagnostic laboratories”.

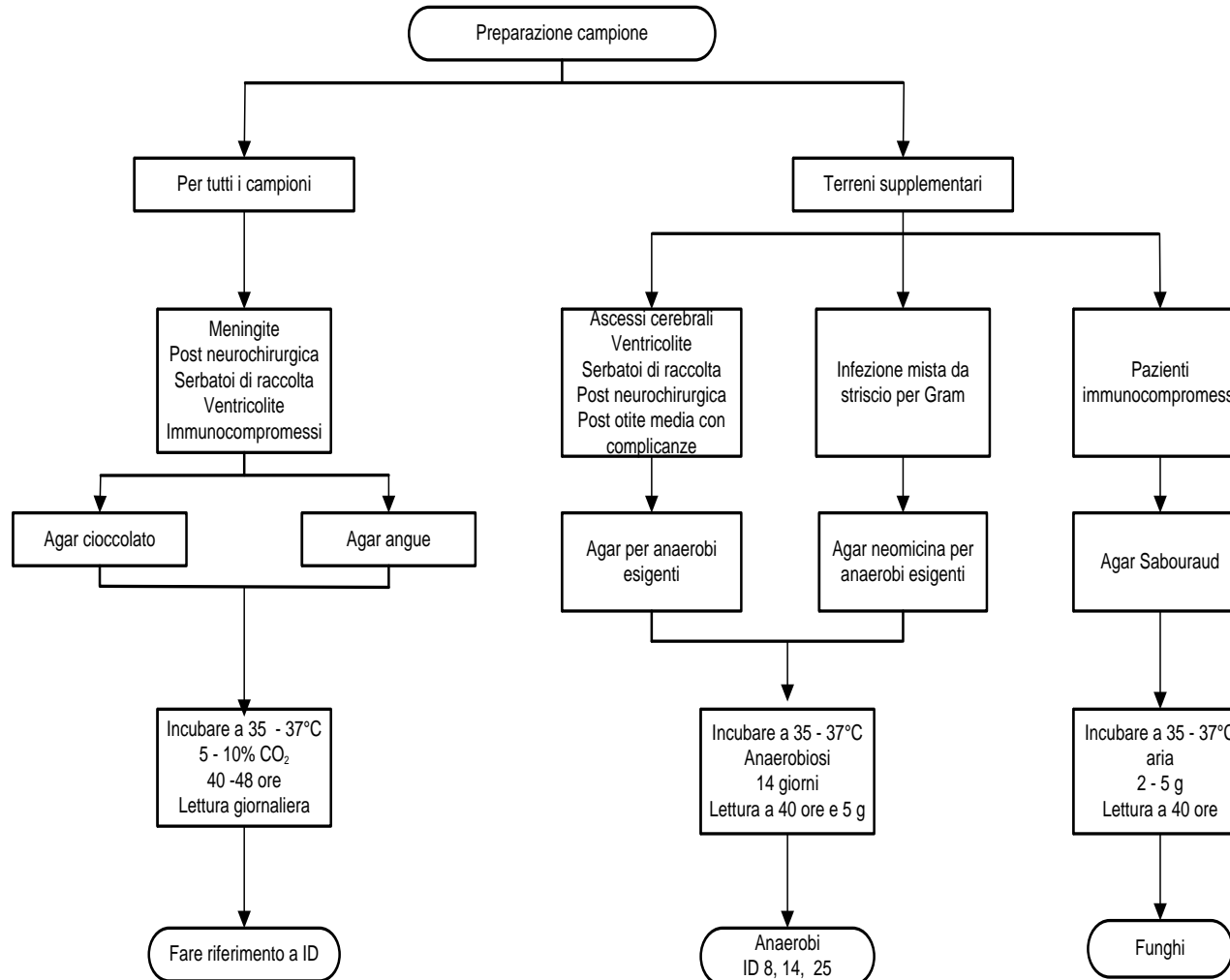
Memorandum Locale d'Informazione.

Informativa attuale delle linee guida CIDSC e COSURV.

In caso di sospetta malattia meningococcica e di contatti l'isolamento di *N. meningitidis* deve essere segnalato immediatamente al CCDC.

Segnalare tutti i seguenti isolati: specie *Mycobacterium*.

## Appendice: Ricerca su Liquido Cerebrospinale





## Bibliografia

---

1. Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:130-45.
2. Brouwer MC, Tunkel AR, van de BD. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *ClinMicrobiolRev* 2010;23:467-92.
3. Salaki JS, Louria DB, Chmel H. Fungal and yeast infections of the central nervous system. A clinical review. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:108-32.
4. Furugen M, Yamashiro S, Tamayose M, Naha Y, Miyagi K, Nakasone C et al. Elsberg syndrome with eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Intern Med* 2006;45:1333-6.
5. Marchandin H, Ventura V, Alonso JM, Van de PP. Mixed bacterial meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in an 18-month-old child. *JClinMicrobiol* 2005;43:1477-9.
6. Chang WN, Lu CH, Huang CR, Chuang YC. Mixed infection in adult bacterial meningitis. *Infection* 2000;28:8-12.
7. White K, Ostrowski K, Maloney S, Norton R. The utility of cerebrospinal fluid parameters in the early microbiological assessment of meningitis. *DiagnMicrobiol Infect Dis* 2012.
8. Ginsberg L, Kidd D. Chronic and recurrent meningitis. *PractNeurol* 2008;8:348-61.
9. Bross JE, Gordon G. Nocardial meningitis: case reports and review. *Rev Infect Dis* 1991;13:160-5.
10. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho M, Azevedo J, Oliveira TQ et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae meningitis* diagnosis. *BMCInfectDis* 2013;13:26.
11. Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du PM, Wolter N et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *JClinMicrobiol* 2012;50:702-8.
12. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004;42:734-40.
13. Esparcia O, Montemayor M, Ginovart G, Pomar V, Soriano G, Pericas R et al. Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *DiagnMicrobiolInfectDis* 2011;69:153-60.
14. Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* 1995;33:1486-91.
15. Dominic RS, Prashanth H, Shenoy S, Baliga S. Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. *JLab Physicians* 2009;1:67-8.

16. McPherson RA, Pincus MR Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017. 481-508.
17. Shah SS, Ebberson J, Kestenbaum LA, Hodinka RL, Zorc JJ. Age-specific reference values for cerebrospinal fluid protein concentration in neonates and young infants. *J Hosp Med* 2011;6:22-7.
18. Seiden JA, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Lack of cerebrospinal fluid pleocytosis in young infants with enterovirus infections of the central nervous system. *Pediatr Emerg Care* 2010;26:77-81.
19. Nascimento-Carvalho CM, Moreno-Carvalho OA. Normal cerebrospinal fluid values in full-term gestation and premature neonates. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:375-80.
20. Nigrovic LE, Kuppermann N, Macias CG, Cannavino CR, Moro-Sutherland DM, Schremmer RD et al. Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA* 2007;297:52-60.
21. Nigrovic LE, Kimia AA, Shah SS, Neuman MI. Relationship between Cerebrospinal Fluid Glucose and Serum Glucose. *New England Journal of Medicine* 2012;366:576-8.
22. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Philadelphia: Elsevier; 2006. 871-872.
23. Leen WG, Willemsen MA, Wevers RA, Verbeek MM. Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PLoS One* 2012;7:e42745.
24. Kahlmann V, Roodbol J, van Leeuwen N, Ramakers CRB, van Pelt D, Neuteboom RF et al. Validated age-specific reference values for CSF total protein levels in children. *Eur J Paediatr Neurol* 2017.
25. Menkes JH, Sarnat HB, Maria BL Child Neurology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2011. 15.
26. Bonadio WA, Smith DS, Goddard S, Burroughs J, Khaja G. Distinguishing cerebrospinal fluid abnormalities in children with bacterial meningitis and traumatic lumbar puncture. *J Infect Dis* 1990;162:251-4.
27. Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000;105:316-9.
28. Spanos A, Harrell FE, Jr., Durack DT. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. *JAMA* 1989;262:2700-7.
29. UK National External Quality Assessment Scheme for Immunochemistry Working Group. National Guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem* 2003;40:481-8.
30. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes". 1998.

31. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices 1998. 1-37.
32. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009.
33. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
34. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
35. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001.
36. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013. 1-32.
37. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003.
38. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005.
39. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive 2008.
40. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
41. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed.: HSE Books; 2002.
42. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
43. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
44. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books 2003.
45. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000.
46. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 2005. 1-14.
47. Allen BW. Survival of tubercle bacilli in heat-fixed sputum smears. J Clin Pathol 1981;34:719-22.
48. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, Jr. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). ClinInfectDis 2013;57:e22-e121.

49. Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1986;23:965-6.
50. Ratnam S, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1986;23:582-5.
51. Meredith FT, Phillips HK, Reller LB. Clinical utility of broth cultures of cerebrospinal fluid from patients at risk for shunt infections. *J Clin Microbiol* 1997;35:3109-11.
52. Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE, III. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1617-20.
53. Shah SS, Hines EM, McGowan KL. Cerebrospinal fluid enrichment broth cultures rarely contribute to the diagnosis of bacterial meningitis. *PediatrInfectDisJ* 2012;31:318-20.
54. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories 2013. 1-37.
55. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 1-112. 2010.
56. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008.
57. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
58. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
59. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967.