

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	-Esame colturale Liquor -Ricerca antigeni solubili nel liquor	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1. Principio del test e sinonimi

Semina del LCR (liquido cefalorachidiano) per l'isolamento e identificazione dei patogeni batterici, nel caso di sospetta meningite batterica nosocomiale o comunitaria. Sinonimo: esame colturale del liquido cefalorachidiano.

2. Applicazione clinica

2.1 –La importanza dell'isolamento del batterio responsabile e della sua identificazione

Le meningiti batteriche si dividono in meningiti acquisite in comunità e meningiti nosocomiali. Le meningiti nosocomiali sono strettamente associate a operazioni di neurochirurgia e traumi che alterano la integrità della barriera emato encefalica e sono causate principalmente da stafilococchi, enterobatteriacee (*E.Coli* e *Klebsiella spp.*) e *Pseudomonas species*. La meningite acquisita in comunità è una delle più temute infezioni a causa della sua morbidità e mortalità. Nei paesi occidentali ci dobbiamo aspettare una incidenza di meningite batterica comunitaria fra 0.2 a 3 casi/100.000 abitanti. Pertanto nel territorio dell'ASL di L'Aquila dovremo aspettarci al massimo 3 casi di meningite batterica comunitaria l'anno. La meningite batterica riguarda raramente l'età adulta ma si concentra nei bambini sotto i 5 anni di età, negli adolescenti e nelle persone anziane sopra i 65 anni.

Questa tabella ripresa dalla letteratura sottolinea l'importanza dell'isolamento e della identificazione corretta del patogeno interessato in relazione al tasso di mortalità della meningite batterica (cioè sapere al più presto la specie batterica ci segnala la pericolosità dello stesso).

Batterio	Tasso di mortalità
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19-21%
<i>Neisseria meningitidis</i>	3-13%
<i>Hamophilus influenzae tipo b</i>	3-6%

E' lo *S. pneumoniae* fra i 3 principali agenti di meningite batterica comunitaria il più pericoloso nonché quello che dà il maggiore rischio di sequele neurologiche. Nei paesi dove è diffusa la vaccinazione contro l'*H. influenzae* tipo b è lo *Streptococcus agalactiae* la terza

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

maggior causa di meningite batterica dopo *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*. Un altro batterio causa di meningite comunitaria, la cui corretta identificazione è estremamente importante, è *Listeria monocytogenes*: *L. monocytogenes* è infatti naturalmente resistente alle cefalosporine di terza generazione ed in particolare al cefotaxime principale antibiotico usato nella terapia empirica della meningite.

2.2-L'importanza della antibiogramma in forma di MIC del batterio responsabile

Le cefalosporine di terza generazione sono gli antibiotici più usati nella terapia empirica della meningite. Questo non vale per *L. monocytogenes*, come detto, che interessa bambini <5 anni di età, individui in età > 50 anni, donne in gravidanza e pazienti immunocompromessi. In questo caso si usa l'ampicillina come regime empirico.

L'antibiogramma in forma di MIC è importante nel caso di *S. pneumoniae* in quanto stanno aumentando i casi di *S. pneumoniae* produttori di beta lattamasi. Lo schema raccomandato dalla NCCLS per *S. pneumoniae* è il seguente:

- Per lo screening di *S. pneumoniae* penicillino resistente usare un dischetto di oxacillina.
- Se il diametro di inibizione è superiore a 20 mm, il ceppo è penicillino sensibile. Se il diametro è inferiore, cercare l'esatto valore di MIC con il pannello MicroStrep della Dade Behring.
- Se la MIC è superiore a 1 ug/ml il ceppo è resistente, se la MIC cade fra 0.06 e 1 il ceppo ha sensibilità intermedia, ovvero ridotta sensibilità alla Penicillina.
- Se la MIC è < 0.06 il ceppo è sensibile.

Riguardo alle cefalosporine di terza generazione la MIC > 2 ug/ml indica resistenza, MIC fra 0.5-2 ug/ml resistenza intermedia.

I valori per *N. meningitidis* sono i seguenti per la Penicillina:

- sensibilità MIC < 0.06, resistenza intermedia MIC 0.06-1. Ricordiamo che *N. meningitidis* è uniformemente sensibile alle cefalosporine di III generazione e la resistenza alla penicillina è rara.

2.3-La esistenza della barriera emato -encefalica spiega l'importanza della determinazione della MIC

La barriera emato encefalica esclude la maggior parte dei componenti del siero per mantenere l'omeostasi del cervello. La barriera fa parte della membrana delle meningi chiamata aracnoide a livello dell'endotelio microvascolare. Questi capillari hanno giunzioni molto strette fra le cellule endoteliali, non sono fenestrate, hanno poche vescicole pinocitiche. Solo l'acqua, i lipidi e alcuni ioni passano liberamente questa barriera, mentre proteine e molecole cariche sono escluse. Il cervello pertanto rappresenta una area del corpo umano priva o quasi di immunità cellulare e umorale (la concentrazione di immunoglobuline è 1/800 di quella del siero). I batteri provengono in genere dal sangue dove sono arrivati dopo la colonizzazione naso faringea. Grazie alla capsula polisaccaridica essi sopravvivono nel torrente sanguigno. Il modo in cui essi penetrano la barriera è oggetto di studi. Dopo che sono penetrati nello spazio sub aracnoideo, essi si replicano liberamente data la mancanza di difesa. La risposta infiammatoria inizia con la liberazione dei componenti delle membrane rilasciate con la morte dei batteri (acido teicoico e

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

acidi lipoteicocici per i batteri Gram + e il LPS lipopolisaccaride per i Gram negativi) , che stimolano ulteriormente le cellule della barriera a produrre citochine che iniziano la cascata infiammatoria e attraggono e attivano le cellule neutrofile. La barriera si allenta , le giunzioni intercellulari si allentano, l'attività pinocitica aumenta. Sebbene la crescita iniziale sia importante per lo stimolo iniziale , molto del danno alla barriera e alle cellule nervose è causata dalla risposta infiammatoria stessa. La meningite non va curata con antibiotici batteriostatici. Il problema è che è difficile che molti antibiotici attraversino la barriera non infiammata .Il picco di concentrazione dell'antibiotico è ritardato ed è molto piu' basso nel CSF (liquido cefalorachidiano) che nel siero. Molecole quali la vancomicina , altre cariche e legate strettamente alle proteine (come il ceftriaxone) passano la barriera molto difficilmente , mentre gli antibiotici lipofili (come rifampicina, fluorochinoloni, cloramfenicolo) passano piu' facilmente. Di regola la massima attività battericida avviene a concentrazioni da 10 a 30 volte che la MBC minima concentrazione battericida in vitro.

In caso di barriera intatta la concentrazione degli antibiotici beta lattamici è solo di 1-5% la concentrazione nel siero. In caso di infiammazione delle meningi , le concentrazioni nel liquor raggiungono il 20-30% dei livelli sierici. Gli antibiotici beta lattamici si comportano inoltre in maniera diversa nel siero e nel LCR. Essi devono raggiungere una concentrazione nel liquor che deve essere da 10 a 30 volte la MBC (minima concentrazione battericida) del siero .Inoltre è noto che i betalattamici sono efficaci nelle cellule batteriche che si dividono (antibiotici crescita dipendenti) e nel liquor la velocità di crescita batterica è molto piu' lenta che in vitro. Pertanto in corso di meningite il dosaggio antibiotico deve essere aumentato e un antibiotico che abbia una MIC molto bassa è piu' maneggevole di un altro . Per esempio la vancomicina penetra difficilmente nelle meningi integre o infiammate. Il livello di vancomicina è solo 5 volte la MBC nel liquor. Fluorochinoloni e la rifampicina penetrano bene nella meninge integra o infiammata .Si discute tra l'altro se la somministrazione dei beta lattamici che sono antibiotici batteriolitici provocando un rilascio del LPS e LTA aumenti la risposta infiammatoria.

Schemi di trattamento delle meningiti batteriche principali:

batterio	Durata
<i>H. influenzae</i>	7 giorni
<i>N. meningitidis</i>	7 giorni
<i>S. pneumoniae</i>	10-14 giorni
<i>S. agalactiae</i> gruppo B	14-21 giorni
<i>L. monocytogenes</i>	14-21 giorni

Gli antibiotici sono dati per via parenterale. Nel caso di meningite pneumococcica la dose di cefotaxime puo' raggiungere anche i 24 grammi al giorno. La rifampicina uccide i batteri senza una diretta lisi e il rilascio di sostanze proinfiammatorie è molto scarso. Nel pannello MicroStrep della Dade Behring abbiamo fra gli antibiotici il meropenem al posto dell'imipenem. Questo perché l'imipenem ha grossi effetti collaterali , mentre il meropenem è piu' sicuro. La sua attività è sovrapponibile a quella delle cefalosporine della terza generazione.

3. Campione

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Nel caso di sospetta meningite la raccolta del liquido cefalo rachidiano tramite puntura lombare avviene in genere dopo l'instaurazione di una pronta terapia antibiotica .L'altro presidio diagnostico è la tomografia assiale computerizzata (TAC).Il liquor (1 ml almeno, 3-4 ml se possibile) va portato dalla siringa in una provetta sterile (2 provette se si vuole anche l'esame chimico -fisico).IL CAMPIONE NON VA REFRIGERATO. Il liquor teme le temperature estreme. Va bene conservarlo a temperatura ambiente ma è un campione che va processato al più presto, diciamo entro un ora dalla raccolta. Se il liquor non viene trattato subito ed è stato raccolto il giorno prima , è consigliabile che una parte sia inoculata con la siringa nella bottiglia bifasica per emocoltura Hemoline (Biomerieux) , posta durante la notte nel termostato a 35-37°C.

4. Standard , Controlli, Reagenti

4.1 -Terreni di coltura pronti in piastra

Agar sangue di montone 5%

Questo terreno è usato per l'isolamento di *S. pneumoniae*, *S.agalactiae* beta emolitico di gruppo B, *Listeria monocytogenes*. Vi cresce bene anche *N. meningitidis* .Incubare in atmosfera di CO2 con le bustine GenBag della Biomerieux , scatola blu. Verificare che le piastre non siano scadute, ovvero che non abbiano assunto un colore metallico prima della scadenza. Nel caso vanno scartate.

Agar cioccolato IsoVitaleX

L'Agar cioccolato con supplemento IsoVitaleX è un terreno che supporta la crescita dei germi comuni e fastidiosi. Ha una ridotta concentrazione di agar , che accresce il contenuto di umidità del mezzo. Ricordiamo che quando si prepara in casa l'agar cioccolato con sangue di montone o cavallo (mai umano) , aggiungiamo emoglobina (fattore X) solo. E' indispensabile nell'isolamento degli emofili.Per esperienza l'agar cioccolato della Biomerieux in uso funziona benissimo anche a un mese dalla scadenza, se tenuto in frigorifero. Fare prima i controlli di qualità con i ceppi standard.In mancanza di Agar sangue 5% di montone usare sempre l'agar cioccolato .L'agar cioccolato è il terreno cardine nell'isolamento di praticamente tutti i possibili patogeni batterici di meningite. Il suo uso è indispensabile.

Agar sale mannite

L'agar sale mannite lo useremo in caso di meningite nosocomiale, quando il liquor giunge da reparti quali neurochirurgia o rianimazione dopo una operazione chirurgica.

Agar Mc Conkey

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Come l'agar sale mannite, l'agar Mac Conkey è usato nel caso di meningite nosocomiale. Supporta la crescita delle enterobatteriacee e *Pseudomonas*.

Agar Sabouraud +CAF

Serve per l'isolamento di *Candida* (frequente nelle meningiti nosocomiali da catetere) e soprattutto di *Cryptococcus neoformans*, il lievito causa di meningite negli immunodepressi. Ricordiamo che questo lievito ha tempi di incubazione più lunghi della *Candida* 3-10 giorni.

4.2- Terreno liquido per emocolture Hemoline Biomerieux

Il terreno liquido per emocolture bifasico Hemoline ha il vantaggio rispetto alle bottiglie delle emocolture del sistema Bact/Alert di poter meglio osservare, in caso di torbidità, la sospensione batterica al microscopio a x40, di fare facilmente un Gram e un antibiogramma su piastra direttamente dal brodo opportunamente diluito con soluzione fisiologica sterile. Rispetto al semplice Brain Heart infusion broth supporta la crescita anche dell'*Hemophilus*.

Può essere usato anche come mezzo di trasporto o mezzo di crescita da usare nelle urgenze da parte di colleghi non esperti di batteriologia o come complemento alla semina su piastra (backup broth). Nella nostra esperienza l'uso delle bottiglie da emocoltura Hemoline è a discrezione del batteriologo da usare sempre nel caso di liquor limpido. Il rischio è sempre quello di una crescita di contaminanti quali *Stafilococchi* coagulasi negativi.

4.3 Caratteristiche culturali

Terreno	<i>H. influenzae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Agar cioccolato	Colonie grandi, piatte, prive di colore o grigie, opache. Non c'è alone di emolisi		
Agar sangue 5%	Non crescono	Colonie rotonde, lisce, di aspetto umido, lucente, convesso, ad angolo intero. Con l'invecchiamento diventano più grigie e tendono a coalescere con le colonie vicine	Appaiono piccole, grigie, umide (alcuni ceppi mucoidi), zona verdastra di alfa emolisi intorno. Le colonie giovani appaiono rilevate. Ma dopo 24 ore di crescita fino alle 48 ore, le colonie si appiattiscono e la zona centrale diventa depressa (aspetto a pedana di dama)

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Identificazione di *N. meningitidis*

- colonie tonde, lisce, ossidasi positive
- diplococchi a chicco di caffè gram negativi
- il pannello rapido NHI della Dade Behring in uso identifica questa specie alle 4 ore ma nella nostra esperienza è molto deludente oltre che pericoloso , in quanto va fatta una sospensione pesante iniziale.
- si possono usare i lattici dello Slidex meningitidis kit per identificare le colonie.

Identificazione di *S. pneumoniae*

- colonie di streptococchi alfa emolitici con colonia a pedina di dama , cioè con centro depresso
- optochina sensibile
- usare il lattice del Kit Biomerieux o quello incluso nel kit Slidex meningitidis kit
- il pannello Combo Pos del Microscan identifica lo *S. pneumoniae* .Il Pannello non è attendibile per l'antibiogramma .Useremo allora l'ottimo pannello Microstrep dopo inoculazione in sangue laccato di cavallo. L'antibiogramma metodo Kirby-Bauer su piastra è utile per lo screening della oxacillina.Come detto sopra serve a identificare i ceppi penicillino resistenti, ancora rari in Italia ma molto diffusi in altri paesi.

Identificazione di *H. influenzae*

- colonie grigie, non emolitiche che crescono solo su agar cioccolato
- l'identificazione avviene con il pannello rapido NHI previa sospensione densa su inoculum broth. Valgono gli stessi discorsi fatti per il meningococco.
- il lattice incluso nel kit Slidex meningitidis identifica solo l'*H. influenzae type b* .

Identificazione di *S. agalactiae* di gruppo B

- colonie di streptococchi beta emolitici
- si identificano a livello di gruppo B con il kit Sclavo per gli streptococchi beta emolitici
- il pannello Combo Pos associato al Microscan identifica lo *S. agalactiae* molto bene.Non è attendibile per l'antibiogramma dove useremo il pannello Microstrep dopo inoculazione in sangue laccato di cavallo, come per lo pneumococco, oppure si può fare l'antibiogramma Kirby-Bauer su piastra su Agar Columbia sangue 5% di montone ovvero Agar Muller Hinton 5% sangue di montone.

Identificazione di *Listeria monocytogenes*

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

-colonie con leggero alone di emolisi completa. Bastoncelli gram positivi, catalasi positivi
 -mobili a 25°C
 -Il pannello Combo Pos del Microscan ha tra i suoi punti di forza la corretta identificazione della *Listeria monocytogenes*!

5. Strumentazione

Non applicabile

6. Procedimento dettagliato

6.1 Centrifugazione, semina del sedimento, colorazione di Gram del sedimento

Nel caso il liquor giunga al laboratorio entro un'ora dal prelievo:

- 1) Centrifugare il liquor a 2000 rpm per 20 minuti
- 2) Il sedimento si usa per:
 - 2a) fare un vetrino per la colorazione di Gram .Se il liquor è molto purulento esso va diluito sul vetrino con soluzione fisiologica sterile. Lo striscio non deve essere troppo carico o diventa illeggibile.
 - 2b) si inocula il sedimento almeno nelle due piastre fondamentali cioè l'agar cioccolato e l'agar sangue 5% di montone in CO₂ a 35 –37°C .Nel caso di meningite nosocomiale e se il campione è sufficiente inoculeremo anche una piastra agar sale mannite (per stafilococchi), una di Mc Conkey (Pseudomonas e enterobatteriacee) e negli immunodepressi sempre una piastra di agar Sabouraud per ricerca di Candida e Criptococcus.
- 3) Il sovranatante servirà per le prove di agglutinazione degli antigeni capsulari. Si può conservare in frigorifero o addirittura congelarne una aliquota.

NOTA IMPORTANTE: l'uso della bottiglia per emocoltura

Nel caso il liquor sia stato prelevato senza che possa pervenire in tempo in laboratorio o in assenza di un batteriologo nel pomeriggio o in urgenza è consigliabile che venga iniettato in parte direttamente in una bottiglia da emocoltura Hemoline bifasica .La funzione della coltura su terreno bifasico è quella di terreno di trasporto , di rivitalizzazione dei batteri poco vitali presenti nel liquor dopo molte ore dal prelievo , di crescita batterica in caso di basse cariche iniziali. Il rischio è sempre una contaminazione da batteri stafilococchi coagulasi negativi. Inoltre è buona norma iniettare una parte del campione su bottiglia bifasica nel caso ritrovassimo sul tavolo il campione tal quale , prelevato da molte ore e non processato subito. In ogni caso si incuba la bottiglia per 24-48 ore e si subcoltura in agar cioccolato e agar sangue .Nel caso sia negativo dopo 48 ore si prolunga la incubazione per altre 48 ore per sicurezza. Anche se si ha sufficiente liquor e sedimento è buona norma inoculare il pellet anche in un brodo di backup (Brain hearth

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

infusion) che va incubato o meglio una bottiglia bifasica Hemoline per emocoltura che sostiene la crescita anche degli emofili.

Riassumendo l'uso della bottiglia bifasica è consigliata:

- 1) nel caso che il prelievo non arrivi in tempo in laboratorio da parte del personale del reparto;
 - 2) quando pur pervendo in laboratorio in tempo, non venga processato subito in mancanza di personale esperto;
 - 3) quando il liquor sia insufficiente meno di 1 mL;
- nel caso di liquor limpidi o quando non si sospetti da parte del clinico e da parte del batteriologo (per la natura del liquor all'esame chimico fisico), la natura batterica della meningite. Ricordiamo che nei primi stadi di meningite batterica, i leucociti possono essere assenti nel liquor, sebbene la coltura può essere positiva. Dunque l'assenza di leucociti nel liquor, l'eventuale assenza di torbidità, non esclude la meningite batterica.
- 4) in ogni caso anche quando il liquor sia stato processato mediante centrifugazione e semina del pellet, è consigliato sempre inoculare una bottiglia bifasica come brodo di backup.

Incubare sempre le piastre di agar cioccolato e agar sangue in CO₂ sia nella semina diretta che dopo passaggio in terreno liquido.

6.1.2 Colorazione di Gram del liquor

- (a) si centrifuga il liquor 2000 rpm/ 20 minuti come detto
- (b) Il vetrino è preparato con 1 o 2 gocce di sedimento su un vetrino pulito e sgrassato. Non fare lo striscio, cioè non diffondere il fluido, non usare una eccessiva concentrazione del sedimento;
- (c) Fare asciugare il vetrino sotto cappa a flusso laminare in dotazione;
- (d) Se non si dispone di una fiamma da becco Bunsen, fissare con metanolo o con lo stesso decolorante del Gram per 2-3 minuti (vale per preparati ottimali cioè non troppo carichi);
- (e) Procedere secondo la classica colorazione di Gram (vedi procedura di colorazione batterioscopica o depliant del kit dei coloranti). Nota: vale la pena provare come contro-colorante la soluzione di Ziehl-Neelsen diluita 1:10 con acqua distillata.

Che cosa si può vedere:

Neisseria meningitidis si vedono intra o extracellularmente nei leucociti polimorfonucleati come diplococchi Gram negativi, a chicco di caffè. *S. pneumoniae* sono diplococchi lanceolati, Gram positivi, spesso in piccole catene. *H. influenzae* sono bastoncelli pleomorfi, cocco bacilli. *Listeria monocytogenes* si presenta come bastoncelli Gram positivi, *S. agalactiae* gruppo B è simile a *S. pneumoniae* e solo la coltura o il test di agglutinazione rapido al lattice può discriminarli.

6.1.3 Test rapido di agglutinazione al lattice del sovrantante

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Questo test fa parte del kit Slidex meningite kit 5 della Biomerieux a cui si fa riferimento per i dettagli.

Principio:

Nel corso del processo infettivo, alcuni batteri liberano all'interno dei liquidi biologici degli antigeni di natura polisaccaridica.

L'agglutinazione rapida su cartoncino di questi antigeni si deve a una reazione con particelle al lattice sensibilizzate.

Per potere fare questo test è indispensabile disporre di:

- ◆ provette di vetro
- ◆ bagno maria a 100°C, in alternativa si può usare anche il Termoblock fornello a secco. Il bagno maria si trova sotto la centrifuga del settore, il Termoblock nella stanza dell'Hplc.
- scaldare il sovrantante a 100°C per 5 minuti. Attenzione a tenere chiusa la provetta di vetro onde non fare evaporare il contenuto;
- nel caso che il sovrantante sia ad alto contenuto proteico è visibile una netta coagulazione
- Dopo raffreddamento e distacco dell'eventuale coagulo si centrifuga a 2000 rpm /per 10 minuti ;
- questo ultimo sovrantante costituisce l'estratto da esaminare.

Si cimenta una goccia di estratto con il lattice sensibilizzato su cartoncino apposito e si attende l'eventuale reazione di agglutinazione che deve avvenire in un tempo inferiore a 2 minuti.

Il lattice R4 (*N. meningitidis B/E.Coli K1*) dà una reazione positiva in corso di meningite neonatale per *E.Coli*, mentre in corso di meningite in soggetti più adulti, verosimilmente indica, la presenza di *N. meningitidis B*.

Il controllo positivo interno aggluso al kit serve a due scopi:

- 1) verificare che nessuno dei lattici agglutini se mescolato a una goccia di soluzione fisiologia;
- 2) che tutti i reattivi al lattice agglutinino se cimentati con il controllo positivo.

Come tutti i reattivi anche questi di questo kit hanno una certa sensibilità e specificità. Essi, secondo il depliant del kit, hanno una sensibilità che va dal 75% al 94% a seconda del lattice. La specificità è intorno al 98%.

Soprattutto la reazione con l'antigene capsulare del meningococco di gruppo B ha una bassa sensibilità e specificità, dato che questa capsula ha uno scarso potere immunogenico.

Per il test di agglutinazione al lattice, il sovrantante denaturato può essere conservato in congelatore.

I lattici sono sensibilizzati contro gli antigeni polisaccaridici di:

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

R1: *H. influenzae* tipo b
 R2: *S. pneumoniae*
 R3: *N. meningitidis* A
 R4: *N. meningitidis* B/E. Coli K1
 R5: *N. meningitidis* C

Si può provare il lattice dello streptococco di gruppo B del kit Sclavo che però non reagisce contro un antigene capsulare ma contro un antigene diverso .

6.1.4 Test non batteriologici

Nelle meningiti batteriche il numero dei leucociti nel sangue e i livelli delle proteine della fase acuta, quale la PCR (proteina C reattiva), sono di norma elevate. Il numero dei leucociti nel liquor eccede 800/mm³ o ul , e c'è una prevalenza dei granulociti. Il livello delle proteine nel liquor è aumentato e quello del glucosio è diminuito. Il glucosio va messo in relazione al glucosio del sangue. Se è sì è sotto il 50% rispetto al valore di glicemia il dato è significativo di meningite batterica. Ma nei primi stadi di meningite batterica , i leucociti possono essere assenti nel liquor, sebbene la coltura può essere positiva. Dunque l'assenza di leucociti nel liquor non esclude la meningite batterica.

Esami non batteriologici da fare

-sangue

Emocromo con formula, D-dimero, Na, K, Calcio, creatinina, urea, PCR, glucosio
 Albumina.

-liquor

glucosio, proteine, Na, K, Cl, lattato, PCR, immunoglobuline, albumina

7. Calcoli

Non applicabile

8. Controllo di qualità interno

Ogni mezzo di coltura , ad ogni cambio di lotto e intorno alla data di scadenza viene testato con un ceppo di riferimento ATCC dei principali patogeni di meningite batterica e cioè almeno con *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*. Ogni controllo di qualità interno viene registrato nel sistema informatico del laboratorio Powerlab. Inoltre i ceppi standard vengono testati con i sistemi di identificazione in uso nel nostro laboratorio in particolare i pannelli rapidi NHI della Dade Behring per *N. meningitidis* e *H. influenzae* e Combo 12 PC per *S. pneumoniae*.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

9. Valori di riferimento, Interpretazione, valori critici

Non sviluppo di flora batterica e lieviti

10. Linearità e limite di riferimento

Non applicato

11. Limitazione del metodo

Paziente sottoposto ad antibiotici,, raccolta impropria, uso di mezzi di coltura disidratati, temperatura di incubazione differente da 35-37°C.

12. Riferimenti bibliografici

1) La qualità in totale trasparenza. Terreni di coltura .Manuale Tecnico.Biomerieux edizione 2000.

2) P. R. Murray, E.J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover, R. H. Tenover:Manual of Clinical Microbiology –7th edition .American Society for Microbiology. 1999.

3) E.W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janda, P.C. Schreckenberger, W. C. Winn, Jr.: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology .Fifth edition .Lippincott Williams & Wilkins .1997.

4) R.J. Olds Microbiologia. testo atlante a colori. Lombardo editore .1976

5) C.R. Mahon, G. Manuselis.Textbook of diagnostic Microbiology, second edition.W.B. Saunders Company.2000.

6) M.A. Bartelt .Diagnostic Bacteriology.A Study Case. F.A. Davis Company.2000
Kristiansen B-E., Flaegstad T. Guidelines for the diagnosis and treatment of meningococcal meningitis.Review article. Dis. Manage Health Outcomes. 1999:73-81.

7) Vandecasteele S.J., Knockaert D., Verhaegen J., Van Eldere J., Peetermans W.E.The antibiotic and anti-inflammatory treatment of bacterial meningitis in adults:do we have to change our strategies in an era of increasing antibiotic resistance?-Acta Clinica Belgica , 2001;56-4. 225-233.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.