



**Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.
N. 1/21 IT VER**

**LE COMPETENZE DEL TSLB IN URGENZA NEI NUOVI MODELLI AZIENDALI DI
DIAGNOSI DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO**

Stefania Manni¹, Michele Reina¹

¹Dipartimento Anatomia Patologica, Medicina TrASFusionale e di Laboratorio, Ausl Romagna

Rev. 1.0

SITLaB news

Publicato: 24 Marzo 2021

Copyright: © SITLaB



Parole chiave: liquido cefalorachidiano (LCR), Meningite/Encefalite (M/E), Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB), Laboratorio di Urgenza, FilmArray® Meningitis/Encephalitis (FA-M/E) Panel.

ABSTRACT

Il tempo stimato per l'identificazione degli agenti patogeni maggiormente implicati nelle meningiti/encefaliti (M/E) attraverso la diagnosi di laboratorio si è significativamente ridotto grazie allo sviluppo e alla standardizzazione di nuovi modelli automatizzati. In questo contesto di laboratory automation si inserisce parallelamente lo sviluppo professionale e il know-how multidisciplinare del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB) nella diagnostica del liquido cefalorachidiano (LCR) nel laboratorio di urgenza.

Lo scopo del presente articolo è quello di analizzare le competenze attuali del TSLB nella gestione del LCR in relazione all'introduzione di nuovi modelli a livello aziendale. Tramite la descrizione delle tecniche diagnostiche classiche e innovative previste da questi workflow diagnostici, si vuole porre l'attenzione sull'expertise e autonomia professionale raggiunta nella diagnostica dei laboratori di urgenza.

1. INTRODUZIONE

Il LCR è secreto principalmente dal plesso corioideo nelle cavità ventricolari, circola attraverso i ventricoli, le cisterne, lo spazio subaracnoideo ed è assorbito nel sangue a livello dei villi aracnoidei ^(1,2,3). Le principali funzioni sono: supporto fisico delle strutture neuronali, riduzione del peso effettivo del cervello, trasporto intracerebrale di nutrienti e ormoni, controllo dell'ambiente chimico del sistema nervoso centrale, mantenimento di una costante pressione intracranica ^(1,2).

L'isolamento dagli altri liquidi corporei e il contatto stretto con lo spazio extravascolare del sistema nervoso centrale (SNC) rendono il LCR indispensabile per la diagnosi delle patologie a carico del SNC ⁽⁴⁾.

Lo sviluppo della puntura lombare come procedura clinica di routine per il prelievo del LCR, nonché l'applicazione di tecniche analitiche e strumentali disegnate dapprima per l'analisi su sangue e urine, hanno consentito l'esame formale e l'acquisizione delle conoscenze attuali sulla sua composizione biochimica ⁽⁵⁾.

Meningiti ed encefaliti (M/E) rappresentano rare infezioni del SNC potenzialmente letali, la rapidità della diagnosi eziologica mediante analisi del LCR è fondamentale sia per una appropriata scelta della terapia antibiotica, dove necessario, sia per ridurre la durata delle degenze ospedaliere contribuendo a una migliore gestione del paziente ^(3,6).

La formazione del LCR nell'uomo è di 0.3 - 0.4 ml/min e il volume totale è 90-150 ml negli adulti ⁽²⁾, 10-60 ml nei neonati ⁽³⁾. La procedura di raccolta invasiva del LCR (rachicentesi) lo rende un campione unico e raramente ripetibile, pertanto la contaminazione ematica, interferenza più rilevante dal punto di vista analitico, non preclude al laboratorio di urgenza l'accettazione del materiale e il suo utilizzo ⁽⁴⁾. Tutte le indagini sul campione impongono una preparazione culturale e un addestramento adeguato degli operatori coinvolti nel processo ⁽⁴⁾.

2. MATERIALI E METODI

La standardizzazione dei percorsi diagnostici consente al TSLB l'esecuzione degli esami previsti secondo l'algoritmo formalizzato dal laboratorio, esplicitando le proprie competenze dalla ricezione del campione di LCR all'autorizzazione dei risultati.

3. RICEZIONE DEL CAMPIONE

Il LCR deve essere prelevato in quantità adeguata, preferibilmente da 6 a 12 ml nell'adulto, volume necessario all'effettuazione di indagini di routine e specialistiche ⁽⁴⁾, di norma è raccolto in sequenza di 3-4 provette di polipropilene sterili a tenuta ermetica che devono essere introdotte e trasportate mediante sacchetti di polietilene sigillati per campioni biologici ^(4,7). Si raccomanda di utilizzare le ultime provette per l'esame citometrico ⁽⁴⁾ ed eseguire un prelievo aggiuntivo di siero/plasma per la determinazione della glicemia ^(4,7).

I campioni devono essere trasportati a temperatura ambiente il più rapidamente possibile e processati entro 1-2 ore dalla raccolta, in quanto l'ipotonicità del LCR favorisce la lisi dei neutrofili e la conta cellulare può diminuire del 32% dopo 1 ora e del 50% dopo 2 ore ^(3,4,7,8). La refrigerazione del campione a 4-8°C per 24/48 ore per eventuali indagini successive (ricerca arbovirus, antigeni e anticorpi, indagini molecolari) deve avvenire solo dopo l'esecuzione dell'esame culturale evitando così l'inibizione di alcuni microrganismi patogeni; per tempi più lunghi si consiglia il congelamento a -80°C ^(4,7).

Il professionista TSLB, al momento della ricezione dei campioni in laboratorio, verifica che il materiale pervenuto sia congruo con la richiesta, la quale deve riportare i dati anagrafici del paziente, il reparto, la sede del prelievo (valori di riferimento di norma riferiti al LCR da puntura lombare), eventuali notizie anamnestiche e terapeutiche; segue il controllo dell'etichettatura dei campioni e il check-in nel LIS (Laboratory Information System). In questa fase è inoltre fondamentale valutare il numero di provette pervenute e il volume di materiale presente. Se è

disponibile un'unica provetta e la quantità di campione è insufficiente al completamento di tutto l'iter esecutivo, il TSLB comunica al dirigente la problematica e quest'ultimo stabilirà la priorità di indagine in accordo con il clinico. Nei modelli standardizzati, in cui il laboratorio d'urgenza e le unità di diagnosi hanno elaborato e concordato un protocollo diagnostico definito ⁽⁴⁾, il TSLB procede autonomamente al workflow seguendo l'algoritmo analitico (Fig. I).

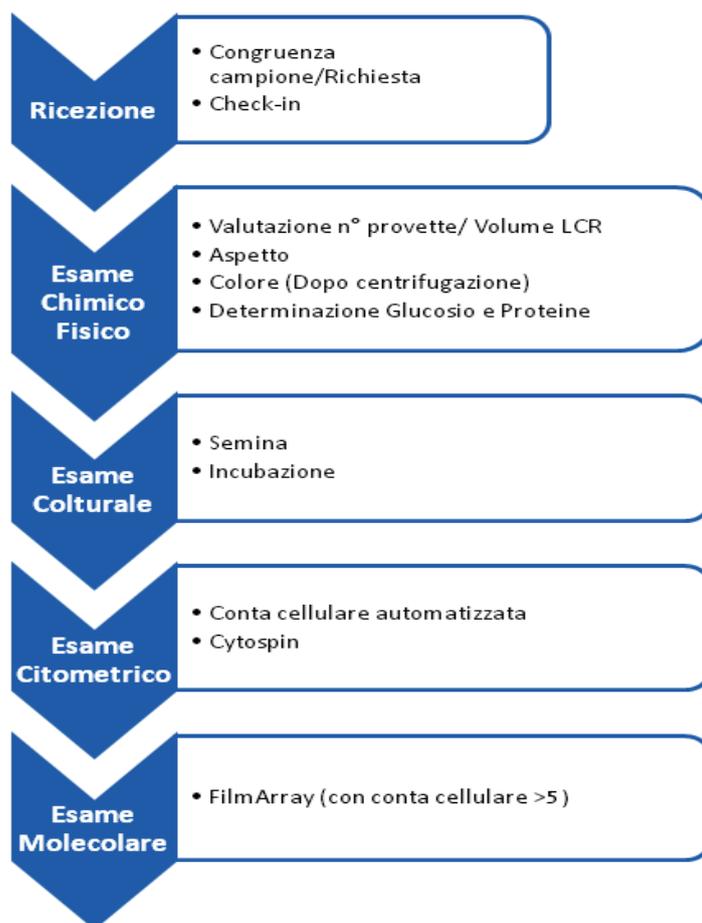


Fig. I *Modello di workflow LCR in urgenza.*

4. ESAME CHIMICO-FISICO

L'esame fisico del LCR si basa sulla valutazione visiva dell'aspetto del campione e colore del surnatante rispettivamente prima e dopo centrifugazione. L'aspetto descrive il grado di torbidità e l'eventuale presenza di coaguli (che dovrebbe invalidare il conteggio delle cellule, Fig. II A). Nella rarità di meningite tubercolare, deve essere segnalato se presente il tipico coagulo a "ragnatela" ⁽⁷⁾.

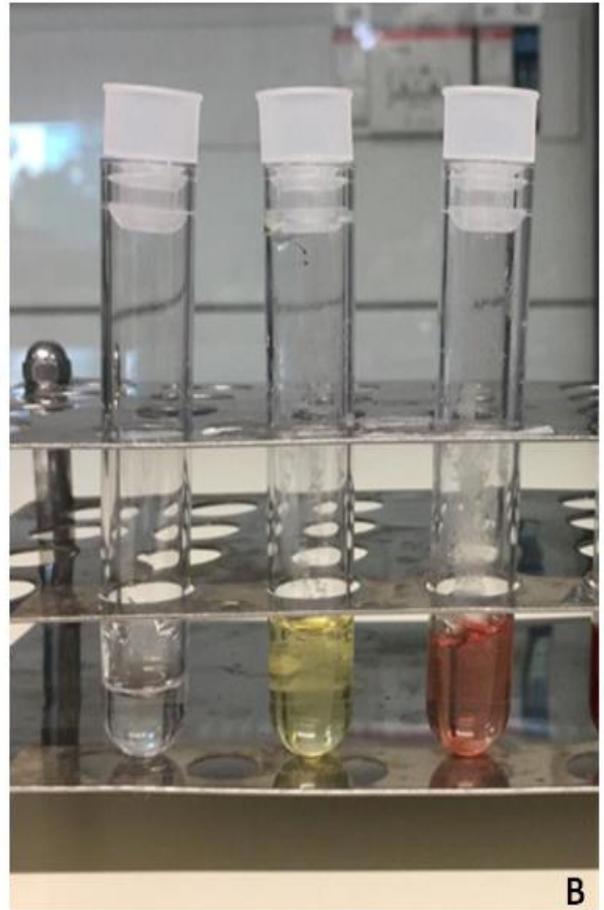
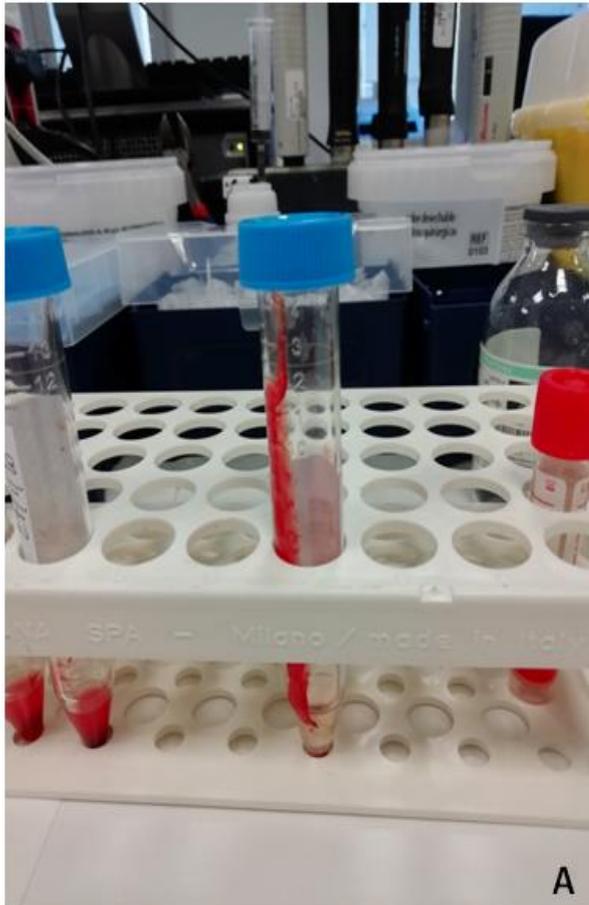


Fig.II A. *Evidenza di coagulo in un campione di LCR*; B. *Colorazione surnatante dopo centrifugazione del LCR. Da sinistra: incolore, xantocromico, ambrato.*

L'aspetto è classificato come limpido, opalescente, torbido o ematico. La meningite batterica è di solito caratterizzata da LCR torbido o opalescente, in alcuni casi purulento, nella meningite virale (asettica) è tipicamente limpido, in quella tubercolare si può osservare lasciando il liquido a riposo il cosiddetto reticolo di Mya, dovuto ad un reticolo di fibrina. L'aspetto ematico del LCR può derivare da una emorragia cerebrale o dalla rachicentesi; in quest'ultimo caso il conteggio dei globuli rossi (RBC) si riduce in maniera sequenziale nelle provette raccolte ⁽⁷⁾.

La descrizione del colore è eseguita solo dopo centrifugazione del campione a bassa velocità (400g per 10 min a temperatura ambiente) per preservare l'integrità cellulare ^(4,7), la classificazione normalmente utilizzata è: incolore, xantocromico e ambrato ⁽⁷⁾ (Fig. II B).

Il sovrinatante incolore con evidente sedimento eritrocitario è tipicamente associato alla puntura lombare traumatica, mentre la xantocromia presente in tutti i campioni sequenziali suggerisce una pregressa emorragia subaracnoidea (ESA). La xantocromia si manifesta come colorazione giallognola nel sovrinatante a causa della degradazione di emoglobina o dell'aumento della concentrazione di proteine e può essere lieve o moderata. L'emolisi dei RBC nel LCR inizia approssimativamente 1-2 ore dopo l'emorragia, il sovrinatante può colorarsi di rosa per la presenza di ossiemoglobina. Dopo 24 ore, la xantocromia aumenta a causa della degradazione dell'ossiemoglobina a bilirubina raggiungendo il picco dopo 36-48 ore ⁽⁷⁾.

L'analisi biochimica in urgenza prevede la determinazione della concentrazione di glucosio liquorale (glicorrachia) e delle proteine totali (protidorrachia).

La glicorrachia è direttamente proporzionale a quella ematica e corrisponde al 50-60% dei valori sierici ⁽⁴⁾. Il rapporto glucosio LCR/siero (Qglu) < 0.6 è considerato patologico, una diminuzione è osservabile nelle meningiti batteriche e fungine ⁽⁸⁾.

Il siero ultrafiltrato nel plesso corioideo è la fonte dell'80% delle proteine del LCR (350-500 mg/L), soprattutto albumina (150-350 mg/L) e IgG (fino a 40 mg/L), il rimanente 20% è sintetizzato dal plesso corioideo, meningi e dal parenchima cerebrale ^(8,9). Se la barriera ematoliquorale (BEL) e la barriera ematoencefalica (BEE) non sono compromesse, il valore della protidorrachia è normalmente compreso tra 0.20-0.45 g/L ⁽⁴⁾. Le meningiti batteriche si caratterizzano da una elevata concentrazione di proteine ^(4,5), che si presenta invece modesta o nei limiti in quelle virali ^(4,7,8).

Il TSLB dopo aver centrifugato il campione procede all'analisi dei parametri biochimici suddetti mediante analizzatore automatico.

5. ESAME COLTURALE

L'isolamento colturale è considerato da sempre il gold standard per ottenere la diagnosi etiologica in caso di sospetto di meningite batterica.

I terreni utilizzati routinariamente per le colture batteriche di LCR sono agar sangue di montone al 5%, agar cioccolato e brodo di arricchimento (BHI-Brain Heart Infusion, tioglicolato, peptone) ^(3,7). Le piastre sono incubate a 37° C in atmosfera al 5-10% di CO₂ per 48/72 ore, il brodo per 5 giorni ⁽³⁾. Gli esami colturali sul LCR di norma si associano alla contemporanea esecuzione dell'emocoltura.

Il TSLB in urgenza procede a seminare il campione sterilmente sotto cappa biologica e a incubare il materiale fino al tempo utile per l'invio al laboratorio di Microbiologia di riferimento. Questo provvederà all'isolamento dell'agente patogeno e all'effettuazione di ulteriori indagini specialistiche: semina in altri terreni di coltura, prolungamento dei tempi di

incubazione; prove di sensibilità ai farmaci (antibiogramma); prove supplementari per micobatteri, funghi e parassiti; test di agglutinazione al lattice; indagini di microscopia e molecolari^(3,7).

La terapia antibiotica empirica, la cui somministrazione è raccomandata precocemente al sospetto di meningite batterica, se effettuata prima della rachicentesi può ridurre il numero di batteri nel LCR da 10^2 a 10^6 con possibile negativizzazione dell'esame^(3,7), limite a oggi superato dalle tecniche di biologia molecolare.

6. ESAME CITOMETRICO

L'esame citometrico rappresenta uno dei parametri di base nell'analisi del LCR e consiste nel conteggio delle cellule nucleate totali (TC o EN) e globuli rossi (RBC) del campione non centrifugato e nella differenziazione dei globuli bianchi (WBC) in polimorfonucleati (PMN) e mononucleati (MN)^(4, 10). Il range di normalità nel LCR ottenuto da rachicentesi nell'adulto è ≤ 5 TC/ μ L^(4, 7, 11). Un'alterata conta cellulare è sempre indicativa di un processo patologico in atto⁽⁴⁾, nelle meningiti batteriche di solito si osserva aumento dei WBC con prevalenza di polimorfonucleati, nelle virali tipica invece è la predominanza di linfociti⁽⁷⁾.

La conta e la differenziazione cellulare possono essere ottenute mediante microscopia ottica (MO), analizzatore ematologico o citofluorimetro.

Il metodo in microscopia ottica (MO) prevede l'utilizzo di una camera di conta (Neubauer, Fuchs-Rosenthal, Nageotte) ed eventuale aggiunta di reagenti (Türk, Samson) per facilitare l'identificazione e differenziazione dei WBC. Sebbene il conteggio al microscopio sia stato per lungo tempo utilizzato per l'esame citometrico del LCR anche in urgenza, presenta alcuni svantaggi quali il tempo per l'allestimento della camera, la variabilità intra- e inter-operatore e l'esperienza del citolettore^(4, 12).

Falsi negativi (< 5 TC/ μ L) possono ritardare la diagnosi e l'inizio della terapia antibiotica mirata, un conteggio falsamente elevato invece può portare a procedure diagnostiche non necessarie⁽¹¹⁾.

L'accuratezza e la standardizzazione degli analizzatori ematologici per la citometria del LCR, che nel tempo hanno acquisito un'alta sensibilità funzionale e analitica (detection limit) tale da soddisfare i requisiti di refertabilità secondo le specifiche di qualità della Food and Drug Administration (FDA), hanno consentito il loro utilizzo in urgenza. I vantaggi sono notevoli: ridotto volume di campione per l'analisi, assenza di pre-trattamento del campione e differenziazione automatica delle popolazioni cellulari.^(4,11,12)

La citofluorimetria, oltre a consentire la differenziazione delle principali sottopopolazioni leucocitarie mediante valutazione del volume e granulosità, identifica una vasta gamma di popolazioni cellulari mediante immunofenotipizzazione di antigeni di superficie, citoplasmatici

e nucleari. Questa tecnologia non trova utilizzo in urgenza, ma nei settori specialistici contribuendo alla diagnosi di altre patologie neurologiche (metastasi leptomeningee di tumori ematologici) ^(4,12).

Il TSLB nel laboratorio di urgenza esegue in autonomia l'indagine citometrica, considerando critica la miscelazione del campione che deve essere sufficientemente adeguata a garantire l'uniformità del campione. Al valore soglia di positività, il professionista procede in accordo con il dirigente e con il protocollo diagnostico all'identificazione del presunto agente eziologico mediante esame molecolare.

La valutazione della morfologia cellulare del LCR si esegue su un preparato cytopspin colorato con May-Grunwald-Giemsa. Nei laboratori di urgenza che effettuano la conta in automazione, si allestisce ugualmente il cytopspin in quanto è fondamentale conservare i componenti cellulari e le loro caratteristiche morfologiche, valutazioni spesso necessarie all'inquadramento diagnostico (gold standard per la diagnosi di metastasi leptomeningee con specificità del 100%) ^(4,13). Se l'esame citometrico con analizzatore ematologico evidenzia una bassa concentrazione cellulare, si effettua un pre-aricchimento del campione mediante centrifugazione a bassa velocità (400g per 10 min a temperatura ambiente) utilizzando il sedimento cellulare ottenuto per all'allestimento del cytopspin ^(7,13).

7. COLORAZIONE DI GRAM

La colorazione di Gram rappresenta, insieme all'esame citometrico, il metodo tradizionale più rapido, rispetto al metodo colturale, per supportare il clinico sulle successive decisioni terapeutiche e di profilassi del paziente, prima dell'isolamento del microrganismo e delle indicazioni sulla sensibilità agli antibiotici ⁽⁷⁾. È una colorazione differenziale che permette di classificare i microrganismi in Gram negativi e Gram positivi in funzione della loro reattività al metodo di colorazione secondo la struttura della parete cellulare ⁽¹³⁾.

Nei protocolli convenzionali, che non utilizzano le tecniche molecolari, il TSLB nei laboratori di urgenza allestisce un vetrino Gram per citocentrifugazione o mediante centrifugazione convenzionale della provetta di LCR (400g per 10 min) ⁽⁷⁾. Il cytopspin aumenta la possibilità di osservare i batteri nel LCR e preserva maggiormente le caratteristiche morfologiche dei componenti leucocitari ⁽³⁾. Durante la seduta di colorazione Gram si utilizzano come controlli di qualità preparati con sospensione colturale di batteri Gram negativi e positivi ⁽¹³⁾. I vetrini vengono osservati al microscopio ottico dal personale dirigente.

La colorazione di Gram rappresenta un metodo semplice, accurato, rapido ed economico per l'identificazione di batteri e cellule infiammatorie nel LCR di pazienti con meningite batterica. Del 90% delle colture positive circa il 75% risultano positive alla colorazione di Gram, la percentuale decresce dal 60 al 40 % in caso di pazienti che hanno ricevuto la terapia antibiotica prima della puntura lombare ⁽³⁾. Oltre alla bassa sensibilità, la tecnica necessita della buona

preparazione del citolettore, svantaggi che hanno contribuito all'introduzione nella diagnostica liquorale in urgenza della PCR (Polymerase Chain Reaction).

8. BIOLOGIA MOLECOLARE

Le tecniche molecolari nella diagnosi in urgenza di M/E, considerata l'importanza clinica della patologia e il potenziale miglioramento di un trattamento antimicrobico specifico, sono di grande interesse in quanto è possibile ottenere risultati in circa 1 ora, permettendo di individuare con sensibilità e specificità molto elevate l'agente eziologico coinvolto anche quando è stata già intrapresa una terapia antibiotica empirica ^(14, 15).

Il primo test approvato dalla FDA (ottobre 2015) è stato il FilmArray[®]Meningitis/Encephalitis (FA-M/E) Panel (BioFire Diagnostics, a bioMérieux Company) che permette l'identificazione di 14 patogeni più frequentemente responsabili di M/E nella popolazione sana e nei soggetti immunocompromessi ⁽¹⁴⁾ (Tabella I).

Il sistema FilmArray è un dispositivo automatizzato per la diagnostica *in vitro* (IVD) da utilizzare in combinazione a cartucce di reagente specifiche (FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel-ME) per la rilevazione e identificazione di target multipli di acido nucleico di batteri, virus e lieviti più frequentemente coinvolti nelle M/E in campioni di LCR prelevato da pazienti con sintomatologia compatibile ⁽¹⁶⁾.

Le fasi del processo includono l'estrazione e purificazione dell'acido nucleico mediante lisi meccanica (bead beating) e tecnologia a sfere magnetiche; trascrizione inversa dell'acido nucleico target (virus a RNA); amplificazione mediante nested multiplex PCR (nmPCR). Questa utilizza due diverse PCR: nella prima si sfruttano "primer esterni" multipli per eseguire una PCR multiplex sugli stampi target presenti nel campione; la seconda fase è una PCR singleplex per amplificare le copie di DNA generate nel primo ciclo sfruttando dei "primer interni" determinando così un aumento della sensibilità e specificità delle reazioni. Durante questo ciclo di amplificazione, i prodotti ottenuti dalla prima PCR vengono miscelati con reagenti contenenti un colorante fluorescente intercalante del DNA (LC Green Plus, analogo del SYBR Green). I singoli pozzetti dell'array contengono primer in triplice copia per specifiche sequenze di acidi nucleici dei patogeni rilevati nel primo step di amplificazione, quindi tutti i target sono testati in triplicato ⁽¹⁶⁾.

I prodotti di PCR specifici vengono denaturati mediante aumento della temperatura (temperatura di melting - T_m) e la fluorescenza in ogni pozzetto viene rilevata e analizzata per generare una curva di melting del DNA. Il software FilmArray, quindi, interpreta automaticamente i risultati mediante due tipi di analisi: analisi delle curve di melting, confronto della T_m del prodotto con l'intervallo di T_m atteso; analisi delle repliche, almeno due delle tre curve di melting associate a un target devono essere considerate positive e le T_m devono essere

simili (entro 1°C) (14, 16). Al termine il software genera un report di visualizzazione dei risultati (Fig.III A).

La cartuccia di reazione rappresenta un sistema chiuso monouso, i reagenti (primer e materiale di controllo) sono liofilizzati e vengono reidratati al momento dell'utilizzo da parte dell'operatore. In ogni cartuccia sono presenti due controlli di processo: controllo di processo di RNA (RNA Process Control) che consiste nell'analisi diretta a un trascritto di RNA dal lievito *Schizosaccharomyces pombe* grazie al quale vengono monitorate le fasi di lisi, estrazione, purificazione, trascrizione inversa, PCRI/II e rilevazione; controllo della PCR II (PCR2 Control) che invece rileva un DNA template liofilizzato nei pozzetti insieme ai corrispettivi primer, il cui risultato positivo indica che il 2° ciclo di PCR è riuscito ⁽¹⁶⁾ (Fig.III B).

La seduta FilmArray ME Panel è considerata valida se entrambi le analisi di controllo interno sono positive, in tal caso i controlli vengono visualizzati come "Passed" e i risultati su report sono indicati come "detected" o "not detected". Se la seduta non è stata superata, i controlli sono visualizzati come "Failed" o "Invalid" ⁽¹⁷⁾.

Il TSLB procede autonomamente all'esecuzione del test contraddistinto da due fasi, preparazione della cartuccia e caricamento nello strumento FilmArray. La prima avviene sotto cappa biologica e prevede l'idratazione della cartuccia con la Hydration Injection Vial e la preparazione della Sample Injection Vial mediante aggiunta di una soluzione tampone (Sample Buffer) e di 200 µL di LCR. Dopo attenta miscelazione, la stessa è dispensata nella cartuccia FilmArray ME, la quale è trasferita nello strumento con avvio dell'analisi. Al termine, i risultati sono trasmessi e visualizzati su LIS.

Studi su numerosi pazienti hanno evidenziato un'alta affidabilità della metodica, riportando una concordanza con i metodi convenzionali (colorazione di Gram, esame colturale, PCR per enterovirus e HSV-1/2, ricerca antigeni per *Cryptococcus gattii/neoformans*), maggiore del 90% ⁽¹⁸⁾. L'alta sensibilità e specificità unita alla rapidità del test, nonché alla scarsa quantità di campione necessaria, ne confermano il valido utilizzo nella diagnosi delle M/E in urgenza ^(19, 20).

Tra gli svantaggi si annovera l'impossibilità di identificare patogeni non presenti nel pannello; infatti, un FilmArray ME Panel negativo non esclude la possibilità di infezione e non deve essere usato come unica base per la diagnosi, il trattamento o altre decisioni della gestione del paziente. Necessita inoltre di dotazione strumentale e presenta costi più elevati.

In merito alla possibile interferenza di sostanze presenti nel campione, la ditta produttrice fornisce nella scheda tecnica l'effetto delle sostanze potenzialmente interferenti sul FilmArray ME Panel. La maggior parte delle sostanze testate (glucosio, lattato, WBC, ecc) non presenta nessuna interferenza, neanche sangue intero (concentrazione testata: 10% v/v) o emoglobina (concentrazione testata: 200 mg/dl) ⁽¹⁵⁾.

FilmArray Meningitis / Encephalitis (ME) Panel - IVD **BIOFIRE**
A BIODIVERSITY COMPANY
www.BioFireDX.com

Run Summary

Sample ID: _____ Run Date: 16 Apr 2020 12:52 AM
Detected: None Controls: Passed

Result Summary

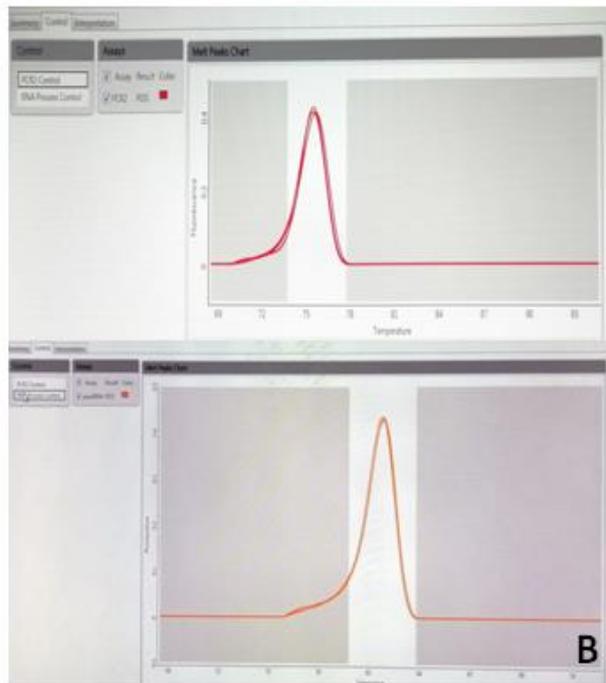
Bacteria	
Not Detected	Escherichia coli K1
Not Detected	Haemophilus influenzae
Not Detected	Listeria monocytogenes
Not Detected	Neisseria meningitidis
Not Detected	Streptococcus agalactiae
Not Detected	Streptococcus pneumoniae

Viruses	
Not Detected	Cytomegalovirus
Not Detected	Enterovirus
Not Detected	Herpes simplex virus 1
Not Detected	Herpes simplex virus 2
Not Detected	Human herpesvirus 6
Not Detected	Human parechovirus
Not Detected	Varicella zoster virus

Yeast	
Not Detected	Cryptococcus neoformans/gattii

Run Details

Pouch: ME Panel v1.4 Protocol: CSF v3.0
Run Status: Completed Operator: _____
Serial No.: 24896275 Instrument: 2FA00073
Lot No.: 812619



Summary | **Control** | **Interpretation**

Interpretation

- Cryptococcus neoformans/gattii
- Cytomegalovirus
- Enterovirus
- Escherichia coli K1
- Haemophilus influenzae
- Herpes simplex virus 1
- Herpes simplex virus 2
- Human herpesvirus 6
- Human parechovirus
- Listeria monocytogenes
- Neisseria meningitidis
- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus pneumoniae**
- Varicella zoster virus

Assays

- Assay Result Color
- Spneumoniae POS

Melt Peaks Chart

Summary | **Control** | **Interpretation**

Interpretation

- Cryptococcus neoformans/gattii
- Cytomegalovirus
- Enterovirus
- Escherichia coli K1
- Haemophilus influenzae
- Herpes simplex virus 1
- Herpes simplex virus 2
- Human herpesvirus 6
- Human parechovirus
- Listeria monocytogenes
- Neisseria meningitidis
- Streptococcus agalactiae
- Neisseria meningitidis**
- Streptococcus pneumoniae
- Varicella zoster virus

Assays

- Assay Result Color
- Neisseria meningitidis POS

Melt Peaks Chart

Fig.III A. Report risultati; B. Controlli PCR: PCR2 Control, RNA Process Control; C. FilmArray Positivo per Streptococcus Pneumoniae; D. FilmArray Positivo per Neisseria meningitidis

PANEL ME	BATTERI	VIRUS	FUNGHI
	Escherichia coli k1	Citomegalovirus (CMV)	Criptococcus gattii/neoformans
	Haemophilus influenzae	Enterovirus	
	Listeria monocytogenes	Herpes Simplex Virus 1 (HSV1)	
	Neisseria meningitidis	Herpes Simplex Virus 2 (HSV2)	
	Streptococcus pneumoniae	Human Herpes Virus 6 (HHV6)	
	Streptococcus agalactiae	Human Parechovirus	
		Varicella Zoster Virus (VZV)	

Tabella I. Pannello dei patogeni identificabili con FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel (BioFire Diagnostics, a bioMérieux Company).

9. DISCUSSIONE

Per delineare l'evoluzione professionale del TSLB nel contesto della diagnostica liquorale è necessario partire da un'analisi delle competenze di base, proseguendo con lo sviluppo scientifico acquisito mediante approfondimento e formazione mirata. Parallelamente è d'obbligo considerare l'interrelazione con i nuovi modelli organizzativi attui a standardizzare la rete di laboratori sul territorio, migliorare i tempi di risposta, la gestione delle risorse umane ed economiche. In questo razionale si inserisce la visione del modello "hub" e "spoke" caratterizzato da un laboratorio centrale (hub) e una serie di laboratori più piccoli (spoke) nelle strutture ospedaliere periferiche, finalizzati alla risposta alle urgenze e ad attività analitiche non concentrate nel laboratorio centrale dove le dotazioni strumentali hanno un grado di complessità commisurato alla realtà e alla tipologia dei quesiti diagnostici richiesti al laboratorio.

Per comprendere le competenze attuali del TSLB nella diagnostica del LCR è doveroso quindi menzionare i percorsi convenzionali e paragonarli ai nuovi modelli aziendali.

Considerando in primo luogo l'esame citochimico del LCR, esso si caratterizza nei percorsi diagnostici convenzionali, dal conteggio manuale delle cellule e dell'esame microscopico del preparato dopo colorazione di Gram. La maggiore tempistica necessaria all'ottenimento di un buon cytopsin e lettura dei componenti cellulari ha favorito nel corso del tempo l'adozione in

urgenza di analizzatori automatici di fluidi biologici che non solo forniscono il conteggio totale cellulare, ma anche la differenziazione delle popolazioni. Le competenze strumentali del TSLB contribuiscono alla notevole riduzione del tempo necessario all'ottenimento di questo dato e allo stesso tempo a una maggiore autonomia sul profilo professionale. Il TSLB, per mezzo di modelli standardizzati e di sistemi informatici esperti, non è solo responsabile dell'accettazione del campione e dell'esame chimico-fisico, ma anche di quello citometrico. Quindi, la conta cellulare in automazione rappresenta il primo punto di svolta nel percorso diagnostico e professionale ottenendo da un lato il cut-off entro il quale il campione è considerato positivo o negativo e dall'altro maggiore competenza professionale.

Proseguendo con l'analisi dei nuovi workflow, la grande innovazione è senza dubbio rappresentata dall'introduzione della metodica molecolare che apporta notevoli vantaggi quali:

_ identificazione del patogeno: nei percorsi diagnostici convenzionali è necessario allestire in urgenza un vetrino Gram per l'osservazione al microscopio. Oltre alla buona qualità del preparato occorre una notevole formazione del citolettore, aspetti non standardizzabili in quanto dipendenti dall'esperienza e mantenimento delle specifiche competenze microbiologiche. Il sistema FilmArray M/E Panel utilizzato dai nuovi modelli aziendali, fornisce in urgenza l'identificazione del patogeno mediante metodica in semi-automazione. La preparazione della cartuccia di reazione è competenza del TSLB che sotto cappa biologica esegue un protocollo standardizzato dalla ditta produttrice per ridurre al minimo le contaminazioni e il tempo necessario all'esecuzione della PCR in urgenza. L'analisi e trasmissione dei risultati è ottenuta in completa automazione tramite software dedicato con l'identificazione dei patogeni più frequentemente responsabili di M/E tra cui non solo batteri, ma anche funghi, virus e parassiti.

_ riduzione del tempo di risposta: l'identificazione del patogeno mediante FilmArray M/E Panel prevede un tempo di preparazione della cartuccia di reazione di circa 5-10 minuti e di esecuzione totale di circa un'ora. Il sistema inoltre non prevede rilevazione dei prodotti di PCR con gel d'agarosio o lettura manuale delle bande di amplificazione riducendo notevolmente il tempo di analisi.

_ minore manipolazione del campione: nei laboratori di urgenza organizzati in area vasta, in cui il personale dirigente deputato all'osservazione microscopica è di riferimento per più sedi ospedaliere, l'esecuzione di un protocollo aziendale convenzionale comporta la spedizione del materiale biologico nel laboratorio di riferimento, però solo successivamente all'allestimento delle piastre di coltura nel laboratorio di arrivo del campione. Questo inevitabilmente comporta la ripetuta manipolazione delle provette, oltre a un aumento del tempo di risposta necessario all'effettuazione del trasporto. Nei protocolli moderni il TSLB esegue in autonomia tutto il percorso diagnostico e in caso di positività del campione informa il personale dirigente che concorrerà a ricevere le informazioni cliniche e a comunicare al TSLB la necessità di allestire la metodica molecolare.



_ expertise professionale: mediante sistemi esperti, metodiche e tempi standardizzati tutto il personale agisce nell'ambito delle proprie competenze. Il TSLB grazie ai nuovi modelli aziendali esplica la sua attività tecnico-professionale dalla patologia clinica alla biologia molecolare.

_ riduzione dell'errore analitico: l'automazione e sistemi informatici di rilascio dei dati a LIS riducono errori di natura umana.

10. CONCLUSIONI

La riduzione dei tempi di risposta, l'identificazione rapida del patogeno responsabile di M/E (indicatori di processo), nonché la standardizzazione dei criteri di competenze professionali (indicatori di struttura), caratterizzano i nuovi modelli aziendali di diagnostica del LCR come percorsi innovativi e migliorativi alla gestione del paziente con M/E.

Nel contesto di implementazione e innovazione strumentale, introduzione di algoritmi diagnostici e di sistemi informatici esperti previsti da questi modelli, il TSLB ha acquisito competenze multidisciplinari, apportando un notevole contributo alla riduzione del tempo che intercorre dall'arrivo del campione di LCR in laboratorio all'autorizzazione dei risultati, diventando un attore importante di tutto il processo.

L'aumento delle competenze esperte non può che incidere positivamente sulla qualità dell'assistenza sanitaria e valorizzare al tempo stesso le figure professionali.

Valutare l'evoluzione delle competenze raggiunte dalla professione TSLB ci consente di creare uno stato dell'arte e individuare percorsi di innovazione tecnologica e formativi finalizzati alla maggiore crescita e autonomia professionale.

11. CONFLITTO D'INTERESSI

Nessuno. I Marchi e le Aziende citate sono a titolo esemplificativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bothwell S.W., Janigro D., Patabendige A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. *Fluids Barriers CNS* 2019,16:9 <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0129-6>

2. Brinker T. et al. A New Look at Cerebrospinal Fluid Circulation. *Fluids Barriers CNS* 2014, 11:10 <https://www.fluidsbarrierscns.com/content/11/1/10>
 3. Larry D.Gray, Daniel P. Feforko. Laboratory Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 1992, p.130-145.
 4. Bernardi G., Brunati P., Biagioli T., Buoro S., Cataldo I., Ciusani E., Corsini E., Dessì M., Fanelli A., Muratore M.T., Passerini G., Previtali G. Gruppo di studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "Biochimica clinica dei liquidi biologici non ematici". Documento "L'analisi del liquido cefalorachidiano". *Biochimica clinica*, 2014, vol.38, n.3.
 5. A O Olukoga, J Bolodeoku, D Donaldson. Origins of Cerebrospinal fluid analysis in clinical diagnosis. *J Clin Pathol* 1997; 50:187-192.
 6. Bailu Du, Chunzhen Hua, Yijun Xia, Jin Li, Yongping Xie, Yue Tao, Qing Cao, Xi Mo. Evaluation of the BioFire FilmArray meningitis/encephalitis panel for the detection of bacteria and yeast in Chinese children. *Ann Transl Med* 2019;7(18):437 <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2019.08.103>
 7. Public Health England (2017). Investigation of Cerebrospinal Fluid. UK Standards for Microbiology Investigation. B27 Emissione 6.1
 8. Regeniter A., Kuhle J., Mehling M., Moller H., Wurster U., Freidank H., H.Siede W. A modern approach to CSF analysis; Patgophysiology, clinical application, proof of concept and laboratory reporting. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111, 2009, 313-318.
 9. E.J. Thompson. Cerebrospinal Fluid. *Journal of Neurology, and Psychiatry* 1995; 59:349-357
Tilmann O.Kleine et al. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry-Cytometry Part A*, 81A:255-264, 2012
 10. B. Schroeder, Dr. F. Haukamp, Prof. F.-J Schmitz, C. Wienefoet, and J. Linssen. Performance Evaluation of Automated Leucocyte Counting in Cerebrospinal Fluid (CSF) bu the XE-2100 Compared to Manual Counting. *Sysmex Journal International Vol.14 No.1* (2004)
-



11. Marieke T. de Graaf et all. Journal of the International Society for Advancement of Cytometry- Cytometry Part B, 80B:271-281, 2011
12. Public Health England (2019). Bacteriology - Test procedures. UK Standards for Microbiology Investigation. TP 39 emissione n.3 (17.5.2019)
13. Agathe Boudet et al. Articles from Plose ONE. 2019;14(10): e0223887, doi: 10.1371/journal.pone.0223887.
14. Giulio Diodato and Nellie Bradbury. Cerebrospinal Fluid Analysis with the Biofire Filmarray Meningitis/Encephalitis Molecular Panel Reduce Length of Hospital Stay in Patients With Suspected Central Nervous System Infections. Articles from Kansas Journal of Medicine, 2019 Mar 5. doi: 10.1093/ofid/ofz119.
15. Biofire a Biomèrieux Company. Filmarray 2.0 CE IVD user's manual. Amy L. Leber, et al.. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, viruses, and Yeast in cerebrospinal Fluid Specimens. Journal Clinic microbiology 2016 Sep, 54(9): 2251-2261, doi: 10.1128/JCM.00730-16.
16. G.S Tansarli, K.C. Chapin. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. Clinical Microbiology and Infection 26 (2020) 281-290, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.016>.
17. Rachael M. Liesman, Angela P. Strasburg, Angela K. Heitman, Elitza S. Rheel, Robin Patel, and Matthew J. Binnicker. Evaluation of a Commercial Multiplex Molecular Panel for Diagnosis of infectious Meningitis and Encephalitis. Journal of Clinical Microbiology <https://doi.org/10.1128/JCM.01927-17>.
18. Sze Hwei Lee, Shey-Ying Chen, Jung-Yien Chien, Tai-Fen Lee, Jong-Min Chen, Po-Ren Hsueh. Usefulness of the FilmArray meningitis/encephalitis (M/E) panel for the diagnosis of infectious meningitis and encephalitis in Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection (2019) 52, 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.04.005>.