

La diagnosi di liquorrea nasale e post-chirurgica

Gaetano Bernardi¹, Gabriella Passerini², Giuseppe Previtali³, Emilio Ciusani¹

¹Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

²Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Ospedale San Raffaele, Milano

³Dipartimento di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero di Fidenza, Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma

Questo lavoro è stato in parte presentato al Convegno "Il Laboratorio nelle malattie del sistema nervoso", 6-7 Giugno 2013, Vicenza.

ABSTRACT

Diagnosis of cerebrospinal fluid (CSF) rhinorrhoea and of post-surgical CSF leakage. Pathological CSF leakage outside central nervous system is a very dangerous situation with high risk of meningitis and cerebral abscess. Rhinorrhoea and post-surgical CSF leakage are the most frequent conditions. Diagnosis is made by combination of imaging procedures, radionucleide cisternography via lumbar puncture (fluorescein) and biochemical tests, which utilize markers suggesting the presence of CSF in suspected fluid. Low CSF glucose concentrations suggest rhinorrhoea, as glucose is absent in nose secretion, but cannot be used in post-surgical leakage, as blood is nearly almost present. CSF proteins are the best biomarkers and intrathecal synthesized β -trace protein and transferrin are the best choice. For quantitative analysis, nephelometric β -trace protein measurement has the best performance, as it can be easily automatically performed, also for stat analysis, but relatively high volume of sample is needed. Isoelectric focusing or high resolution electrophoresis followed by immunodetection are the most sensitive and specific methods for detecting asialotransferrin, but they are time consuming, unsuitable for stat analysis, even if they need low amounts of sample. Other quantitative tests include prealbumin/albumin ratio, having insufficient sensitivity in blood contaminated samples, and zone electrophoresis of protein pattern that, however, has too low sensitivity. New methods like capillary electrophoresis have been recently proposed.

INTRODUZIONE

La fuoruscita patologica di liquor [liquido cefalorachidiano (LCR)] da cavità anatomiche o da interruzioni patologiche della continuità tissutale è una condizione estremamente rischiosa perché mette in comunicazione il sistema nervoso centrale, obbligatoriamente sterile, con l'ambiente esterno, contaminato dalle più svariate specie di microrganismi potenzialmente patogeni. È una condizione che mette il soggetto a rischio di meningiti batteriche e ascessi cerebrali, condizioni a elevata mortalità e morbilità (1). La rinorrea nasale o rinoliquorrea è la forma più frequente e ha cause traumatiche nel 80-90% dei casi, post-operatorie nel 10%, spontanee nel 3-4%, neoplastiche nel 2% e infiammatorie nel 2% dei casi (2). Diversa è la liquorrea che può complicare il decorso post-operatorio di un intervento di neurochirurgia (liquorrea post-chirurgica).

Le due condizioni, da trauma o post-chirurgica, pur dovute allo stesso meccanismo hanno aspetti molto diversi e diverso approccio diagnostico. Nei casi di sospetta rinoliquorrea la diagnosi viene fatta con procedure radiologiche, con la ricerca e localizzazione della fistola tramite tomografia assiale computerizzata (TAC) e risonanza magnetica (RM); indagine di secondo livello è la cisternografia con radionucleide, che prevede l'introduzione di fluoresceina tramite puntura lombare. Nei casi di liquorrea post-chirurgica, essendo accessibile e noto il sito operatorio, la diagnosi viene fatta in prima istanza per ispezione visiva della ferita (i neurochirurghi dicono che la ferita "liquoreggia") e successivamente con l'analisi di laboratorio del materiale che fuoriesce; solo in casi estremamente dubbi si fa uso della fluoresceina. Diverso è anche il tipo di materiale da esaminare: infatti, mentre il materiale delle sospette rinoliquoree è spesso contaminato da secrezioni mucose, il materiale da ferita chirurgica è quasi sempre ematico.

Corrispondenza a: Gaetano Bernardi, Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, via Celoria 11, 20133 Milano. Tel. 0223942754, Fax 0223942535, E-mail gbernardi@istituto-besta.it

Ricevuto: 01.12.2013

Revisionato: 09.01.2014

Accettato: 15.01.2014

La diagnostica di laboratorio ha un ruolo primario e indispensabile, data l'invasività della tecnica alternativa, che prevede l'iniezione di fluoresceina endorachide; essa si basa sull'utilizzo di biomarcatori che documentino la presenza di LCR nella secrezione nasale o nel materiale da ferita.

FASE PREANALITICA

Il materiale che viene esaminato per sospetto di rinoliquorrea è molto variabile per composizione e quantità. Proviene dal naso, una cavità non sterile e caratterizzata da presenza di secrezioni spesso mucose. Può quindi essere estremamente vischioso e difficile da maneggiare: può essere utile centrifugare il campione a 14.000g per avere un sovrantante in fase liquida, che può essere pipettato e analizzato. Il materiale è spesso scarso e difficilmente aspirabile dagli analizzatori automatici. Se il metodo automatico è sufficientemente sensibile, si può diluire il campione per aumentarne il volume. Le tecniche elettroforetiche, al contrario, necessitano di pochissimo materiale (<20 μ L) da seminare direttamente sul gel e risentono meno di queste limitazioni. Poiché il materiale delle liquorree proviene da un ambiente esterno contaminato, al fine di evitare la proliferazione batterica è necessario analizzare il campione al più presto e conservarlo in congelatore. Spesso la fuoriuscita di materiale non avviene in modo continuo, ma in fasi alterne con scarso materiale per ogni raccolta: tipica la liquorrea che fuoriesce in posizioni particolari del capo, ad es., solo a letto. In questi casi può essere necessario consegnare al paziente stesso contenitori sterili che dovranno essere conservati in congelatore nell'intervallo di tempo che intercorre tra la raccolta e l'analisi.

BIOMARCATORI

Il primo marcatore utilizzato per diagnosi di rinoliquorrea è stato il glucosio, che è assente nelle secrezioni nasali e presente nel LCR (ma anche nel sangue, che può talora contaminare il campione).

Le proteine liquorali sono molecole ampiamente studiate, di esse sono note le concentrazioni relative nel LCR e nel sangue e sono facilmente dosabili (3). Sono marcatori ideali quelle proteine che hanno una concentrazione liquorale nettamente superiore a quella del sangue. Dai tracciati in elettroforesi zonale, aggiustando la concentrazione di campioni di LCR e siero in modo che siano confrontabili, si identificano facilmente quattro proteine che caratterizzano il tracciato liquorale (Figura 1). Queste quattro proteine, chiamate inizialmente in base alla posizione che occupano nel tracciato, sono poi state identificate come singole e specifiche molecole. Partendo dalla posizione più anodica si possono riconoscere:

1. la prealbumina, denominata poi transtiretina, in realtà meno concentrata nel LCR che nel siero, ben visibile nei tracciati perché nel LCR ha una concentrazione relativa rispetto all'albumina molto più alta. Può

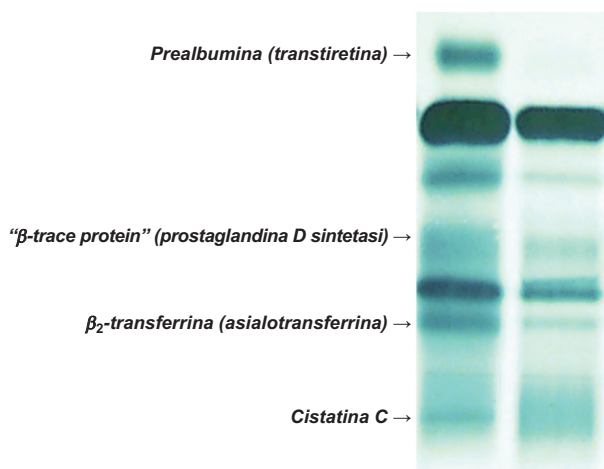


Figura 1

Tracciato elettroforetico ottenuto concentrando le proteine liquorali in modo da ottenere un'immagine paragonabile a quella del siero: si evidenziano in modo inequivocabile le 4 proteine liquorali caratteristiche.

essere utilizzata come biomarcatore solo considerando il rapporto prealbumina/albumina che nel siero è <1%;

2. la "β-trace protein", identificata poi come prostaglandina D sintetasi, presente nel LCR in concentrazioni ~30 volte superiori rispetto al siero;
3. la β₂-transferrina, miscela di isoforme con ridotto grado di sialificazione della transferrina (Tf), che è presente nel LCR e assente nel siero;
4. la "γ-trace protein", identificata poi come cistatina C, che nel tracciato liquorale simula una componente monoclonale di bassa concentrazione ed è presente nel LCR in concentrazione 5 volte superiori che nel siero.

Di queste, solo il dosaggio quantitativo della "β-trace protein" e la separazione elettroforetica delle isoforme della Tf hanno attualmente un ruolo diagnostico importante. In campioni poco contaminati da sangue può essere utile misurare il rapporto prealbumina/albumina, mentre il dosaggio della cistatina C non ha al momento trovato applicazioni diagnostiche in questo campo.

Non hanno significato diagnostico la ricerca delle cellule, né come conta né come formula, così come esami di tipo batteriologico.

Glucosio

Il dosaggio del glucosio è l'esame più vecchio ancora in uso per la diagnosi di rinoliquorrea, essendo il più semplice; mantiene la sua importanza per una rapida diagnosi di esclusione, anche perché può essere eseguito anche al letto del malato con strisce reattive (4). Concentrazioni di glucosio >10 mg/dL sono da considerarsi positive. Tuttavia l'esame non è utilizzabile in caso di contaminazione ematica per la presenza di glucosio nel sangue. Non è quindi indicato per la diagnosi di liquorrea post-chirurgica.

Prealbumina (transtiretina)

La transtiretina è una proteina globulare non glicosilata di PM 55 kDa. E' un tetramero formato da 4 subunità identiche. Lega gli ormoni tiroidei, la proteina legante il retinolo, la proteina A β -amiloide ed è considerata uno "scavenger" dei peptidi dell'amilioide nel LCR e nel sistema nervoso centrale (5). Sono state riportate 120 mutazioni del gene della transtiretina, che sono responsabili di amiloidosi in forme autosomiche dominanti e fatali (6). Diminuisce nel LCR nelle forme avanzate di Alzheimer (7) e sclerosi multipla (8). Topi carenti di transtiretina sviluppano precoci deficit di memoria (9).

Sebbene le recenti raccomandazioni SIBioC alla sua determinazione su plasma ne limitino molto le indicazioni diagnostiche (10), è comunemente analizzata nei laboratori e può essere facilmente misurata nel LCR per calcolare il rapporto prealbumina/albumina nel campione in esame per la diagnosi di sospetta rinoliquorrea (11). Il rapporto prealbumina/albumina nel LCR è più alto rispetto a quello del siero: ~7% nel LCR contro 0,6% nel siero. Campioni con rapporto prealbumina/albumina >1% sono considerati positivi per presenza di LCR. L'esame può essere eseguito in urgenza, come spesso è richiesto. E' però particolarmente sensibile alla contaminazione ematica: se l'albumina presente nel campione è >5 g/L l'esame perde di specificità e i risultati non devono essere utilizzati per questa diagnosi.

" β -trace protein" (prostaglandina D sintetasi)

E' una glicoproteina di ~27 kDa a singola catena polipeptidica. E' sintetizzata principalmente dall'epitelio dei plessi corioidei e dalle leptomeningi e, in misura minore, dalle cellule di Leydig e dall'epididimo. La sua principale funzione è quella di catalizzare la conversione di prostaglandina H₂ a prostaglandina D₂ e come tale è ritenuta essenziale per la maturazione e l'omeostasi del sistema nervoso centrale (12). Ha anche funzioni tipo lipocaline, proteine extracellulari in grado di legare sostanze lipofile come biliverdina, acido retinoico e bilirubina (13). Nel LCR è caratterizzata da un notevole gradiente di concentrazione tra il LCR ventricolare e quello lombare, con valori ventricolari medi di 1,5 mg/L e valori lombari medi di 16,6 mg/L (3); basse concentrazioni liquorali sono state riscontrate nel corso di meningiti (valori medi nel LCR lombare di 5,7 mg/L) (12).

Il LCR che può entrare in contatto con le cavità nasali proviene più frequentemente dagli spazi subaracnoidei nei quali arriva dopo essere passato dal canale lombare e ha quindi concentrazioni di " β -trace protein" di gran lunga superiori a quella dei liquidi extracerebrali e del siero, che sono mediamente di 0,59 mg/L (14). Mediante l'uso di tamponi introdotti nelle cavità nasali di soggetti sani è stato possibile misurare direttamente la concentrazione di " β -trace protein" nel secreto nasale fisiologico, che ha un valore medio di 0,39 mg/L; valori più alti con media di 1,05 mg/L sono stati trovati in pazienti dializzati (14). Per i motivi sopraelencati,

l'esame deve essere utilizzato con cautela in corso di meningiti (minore sensibilità) e in soggetti dializzati (minore specificità).

Molti studi sono stati eseguiti per definire i valori di cut-off per diagnosticare la presenza di liquorea nel campione (riassunti da Risch et al. nel rif. 1). Un recente studio, condotto su 134 pazienti con diagnosi certa di rinoliquorrea o liquorea post-chirurgica, ha dimostrato che, considerando negativi i campioni con valori <0,68 mg/L di " β -trace protein" e positivi valori >1,09 mg/L e anche i campioni con concentrazioni intermedie (0,68–1,09 mg/L) ma con un rapporto liquorea/siero di " β -trace protein" >4,9, questo esame raggiunge sensibilità di 96% e specificità di 97% (12). Secondo le indicazioni dell'"European Federation of Neurological Societies" (EFNS) la ricerca di liquorea mediante " β -trace protein" ha alta sensibilità e specificità con raccomandazioni all'uso diagnostico di grado A (15). E' oggi disponibile un metodo nefelometrico automatico per il dosaggio della " β -trace protein", ideale per eseguire questo esame in urgenza. Da un punto di vista pratico è bene ricordare che il numero di richieste che pervengono, anche in centri specializzati, è scarso, il che aumenta i costi di gestione. Dato il rischio clinico che comporta questo tipo di patologia, si ritiene che il dosaggio della " β -trace protein" sia da eseguire in ogni laboratorio che lavori in contesti in cui accedono traumi cranici o vi siano neurochirurgie.

Transferrina

La Tf è una glicoproteina di ~80 kDa a singola catena polipeptidica. E' fondamentale per il trasporto del ferro per i cui ioni ha una forte capacità legante. E' comunemente dosata nel plasma nel percorso diagnostico della carenza marziale (16). Importante è il ruolo che la Tf ricopre come proteina presa a modello di glicosilazione proteica: non ha grande importanza diagnostica la struttura primaria della sua catena polipeptidica, di cui si conoscono almeno 38 varianti genetiche, quanto la diversa composizione delle catene glicaniche a essa legate. Alla proteina si possono legare fino a otto residui di acido sialico, che ne determinano altrettante isoforme con diversi pI in un intervallo di pH compreso tra 5,0 e 5,9 e conseguente diversa mobilità elettroforetica (17). Nel sangue prevale la tetrasialo-Tf (65-80%) e le forme parzialmente desialilate, salvo rare eccezioni, sono presenti in proporzioni molto ridotte o trascurabili (disialo-Tf, 0,5-2%; asialo-Tf, <0,5%); nel LCR, invece, accanto alle isoforme di derivazione plasmatica sono presenti in modo evidente la disialo-Tf, la monosialo-Tf e soprattutto la asialo-Tf (18), prodotto di sintesi delle cellule ependimali dei plessi corioidei nei roditori e degli oligodendrociti di tutte le specie animali (19, 20). Le forme poco sialilate vengono separate in modo netto e sono ben visibili mediante isolettrofocalizzazione ed elettroforesi ad alta risoluzione. All'elettroforesi zonale migrano in un'unica banda detta β_2 -Tf. Quest'ultimo termine è strettamente collegato alla tecnica elettroforetica e dovrebbe essere

abbandonato perché fuorviante. Le citate linee guida EFNS sono purtroppo poco aggiornate nel paragrafo relativo alla diagnosi di liquorrea, perché riportano evidenze insufficienti e sensibilità falsamente basse associate alla ricerca delle isoforme della Tf (15). Questo è dovuto alla strategia di ricerca utilizzata dagli autori, che hanno fatto ricorso al solo termine " β_2 -Tf" che, come detto, è strettamente legato a una tecnica poco sensibile e ormai obsoleta.

Purtroppo le isoforme poco sialilate della Tf hanno ancora una miriade di sinonimi, anche se per fortuna è stato abbandonato il termine di transferrina tau in uso negli anni '70, perché poteva confondersi con la proteina tau, biomarcatore di malattia di Alzheimer. Genera poca chiarezza anche l'uso del termine corrente per la diagnosi di abuso alcolico, Tf carboidrato-carente (CDT), che si identifica con la somma di disialo-Tf, monosialo-Tf e asialo-Tf (21).

Oggi le isoforme della Tf vengono ricercate per la diagnosi di liquorrea, la diagnosi di abuso alcolico e la diagnosi di sindromi da difetto congenito di glicosilazione ["carbohydrate deficient glycosylation (CDG) syndrome"]. Per la diagnosi di liquorrea, incentrata soprattutto sulla ricerca dell'asialo-Tf, sono necessari metodi altamente sensibili perché l'analisi viene eseguita su materiale in cui la proteina è presente in concentrazioni molto basse o assenti. Le tecniche in uso per la ricerca di asialo-Tf per diagnosticare una liquorrea sono di tipo elettroforetico ad alta risoluzione o di isoelettrofocalizzazione. La CDT si misura invece su siero con tecniche quantitative di HPLC o elettroforesi capillare, in cui per l'elevata concentrazione sierica di Tf è richiesta una sensibilità analitica minore; in questo caso, il marcatore principale è la disialo-Tf (21). Recentemente è stato messo a punto un metodo nefelometrico per la misura della CDT che ha mostrato risultati promettenti (22). Le sindromi CDG sono state inizialmente diagnosticate con i metodi qualitativi messi a punto per il LCR, ma, poiché l'analisi si esegue su siero, è possibile applicare anche i metodi in uso per la misura della CDT. Dato che le CDG sono sindromi dovute a diverse mutazioni, che alterano le diverse vie metaboliche di sialilazione, è necessario utilizzare metodiche che evidenzino tutte le isoforme della Tf.

Elettroforesi della transferrina

La separazione delle isoforme della Tf si basa su differenze di carica elettrica determinate dal diverso contenuto di residui di acido sialico nelle catene glicaniche, dagli amminoacidi che compongono la catena polipeptidica e dal differente grado di saturazione ferrica. Ogni corsa elettroforetica deve includere, oltre ai campioni da analizzare, un LCR come controllo positivo e un siero come controllo negativo. L'approccio analitico più diffuso e praticabile in tempi brevi è l'immunofissazione della Tf dopo elettroforesi in gel d'agarosio. Il profilo immunoelettroforetico nel siero evidenzia una singola banda che corrisponde alla tetrasialo-Tf, mentre nel LCR si separano due bande, la tetrasialo-Tf in posizione anodica e la asialo-Tf

(cosiddetta β_2 -Tf) in posizione più catodica; confrontando il quadro del liquido biologico con quello dei campioni di controllo (LCR e siero) si può confermare o escludere la condizione di liquorrea (Figura 2) (23). La sensibilità dell'analisi è 93% (intervallo di confidenza: 78-99) e la specificità 97% (intervallo di confidenza: 94-99) (24).

Un'elevata contaminazione ematica del secreto determina la sovrapposizione delle glicoforme e rende difficoltosa o impossibile l'interpretazione dell'analisi (25); l'eventuale presenza di varianti genetiche costituisce un ulteriore elemento di variabilità morfologica dei profili immunoelettroforetici e può causare difficoltà interpretative, superabili analizzando in parallelo il liquido con sospetta liquorrea e il siero del paziente adeguatamente diluito (26). Eseguendo in parallelo l'immunofissazione della Tf e della prealbumina, nel LCR oltre alle due glicoforme della Tf si osserva anche la banda prealbuminica con mobilità elettroforetica superiore alla proteina sierica ed è possibile aumentare la sensibilità diagnostica (27).

Disponendo di almeno 15 μ L di secreto e di un sistema immunoelettroforetico che consenta applicazioni multiple del campione, si può raggiungere una sensibilità analitica di 2 mg/L (28). Da alcuni anni è disponibile un kit formulato per lo studio delle glicoforme della Tf nei liquidi biologici su strumentazione semiautomatica. La separazione elettroforetica è ad alta risoluzione e l'immunofissazione utilizza un antisiero anti-Tf coniugato con perossidasi. L'analisi richiede un volume minimo di campione di 10 μ L e si completa in meno di tre ore. Nel profilo immunoelettroforetico si evidenziano 5-6 glicoforme: nel siero, pentasialo-Tf, tetrasialo-Tf e trisialo-Tf; nel LCR, anche le glicoforme catodiche a ridotta sialilazione, disialo-Tf e asialo-Tf (Figura 3). La banda più catodica corrisponde all'asialo-Tf e il suo riscontro nei liquidi biologici indica specificamente contaminazione liquorale; ulteriore criterio di positività per liquorrea è la verifica che la banda di asialo-Tf sia di intensità superiore o uguale alla disialo-Tf (29). Considerando l'elevato potere risolutivo della separazione elettroforetica e l'elevata sensibilità analitica (0,5 mg/L), è necessario pretrattare i campioni con una soluzione satura di ioni ferrici prima della migrazione, come avviene per l'isoelettrofocalizzazione. La contaminazione ematica non ostacola l'interpretazione dell'analisi per tracce di LCR fino al 5% del volume del liquido (Figura 4) (30).

Isoelettrofocalizzazione della transferrina

L'isoelettrofocalizzazione della Tf seguita da "immunoblotting" rappresenta il "gold standard" per l'analisi delle glicoforme della Tf nei liquidi biologici (Figura 5). Il metodo, che ha una sensibilità del 97,5% e una specificità del 100%, è complesso, richiede personale specializzato e non permette di risolvere in tempi brevi un importante quesito diagnostico (31, 32).

Nel metodo sviluppato nel laboratorio di uno degli autori, i campioni sono sottoposti a frazionamento elettroforetico a temperatura controllata (10 °C)

mediante isoelettrofocalizzazione in gel di agarosio 1,3%, addizionato di opportuna miscela di anfoliti necessaria per generare un gradiente di pH compreso tra 3 e 10,5, con particolare risoluzione nell'intervallo 4-6,5. Uno dei punti critici della metodica consiste nel determinare la corretta diluizione da applicare al campione che si sta analizzando. Infatti, in molti casi, le caratteristiche del campione (viscosità, quantità, contaminazione ematica) non consentono il dosaggio di alcun parametro (proteine totali o Tf) utile a determinarne le caratteristiche. E' necessario pertanto analizzare il campione utilizzando varie diluizioni (da 1:2 a 1:200) a seconda delle sue caratteristiche. Dopo l'isoelettrofocalizzazione, le proteine vengono trasferite dal gel di agarosio su una membrana di polivinildifluoruro (PVDF) (Immobilon P) mediante "blotting" capillare per 30 min a temperatura ambiente. La membrana di PVDF

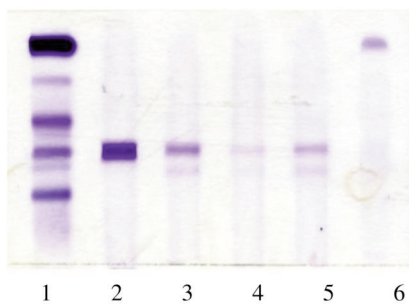


Figura 2
Immunofissazione manuale ad alta risoluzione delle isoforme della transferrina (traccianti 2-5). In 2 e 4 controlli (siero e liquor, rispettivamente); in 3 e 5 profili positivi per liquorrea; in 1 e 6 traccianti del siero e del liquido in esame.

viene in seguito immersa in una soluzione di anticorpo di topo anti-Tf umana (Dako) a una concentrazione di 0,1 mg/L per 30 min a temperatura ambiente, seguita da 4 brevi lavaggi con soluzione fisiologica contenente Tween 20 (0,1%). La membrana viene poi immersa in una soluzione di anticorpo secondario di capra-anti-topo coniugato a perossidasi per 30 min a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione la membrana di PVDF viene lavata 4 volte con soluzione salina contenente Tween 20 a temperatura ambiente. L'attività perossidasi residua è rivelata mediante chemiluminescenza (Immobilon Western, Millipore), utilizzando un acquisitore d'immagini (Syngene) in modo da ottenere immagini di varia intensità. Il metodo consente una netta separazione di tutte le isoforme permettendo di fare diagnosi sia di liquorrea che di sindrome CDG. Per la diagnosi di liquorrea, massima attenzione deve essere posta nella ricerca della banda più catodica, che è quella dell'asialo-Tf. Un'eventuale presenza di emoglobina non interferisce sulla sua ricerca, dato che l'emoglobina, in queste condizioni, migra in zona differente (Figura 6).

Elettroforesi capillare zonale nella diagnosi delle liquorree

L'elettroforesi capillare zonale (CZE) è una tecnica analitica che fonde il principio dell'elettroforesi con i concetti strumentali e di automazione della cromatografia in fase liquida. La CZE fu introdotta per la prima volta nel 1967 ed è diventata una vera e propria tecnica analitica solo all'inizio degli anni '80 quando ne sono stati messi a punto i principi teorici e sono state descritte le relazioni fra le variabili operative e la qualità della separazione. Questa tecnica si propone come una sensibile e rapida alternativa ai tradizionali supporti per

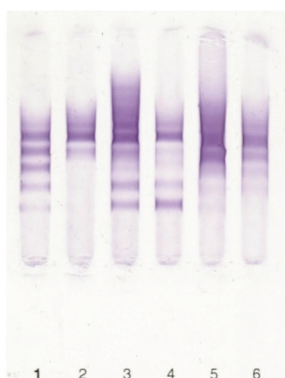


Figura 3
Profilo immunoelettroforetico con immunofissazione ad alta risoluzione (Sebia). In 1 e 2, rispettivamente, controllo positivo (liquor) e controllo negativo (siero); in 3 profilo positivo per liquorrea in campione ematico; in 4 profilo positivo per liquorrea in un campione privo di contaminazione ematica; in 5 profilo dubbio in presenza di forte contaminazione ematica; in 6 campione moderatamente ematico negativo per liquorrea.

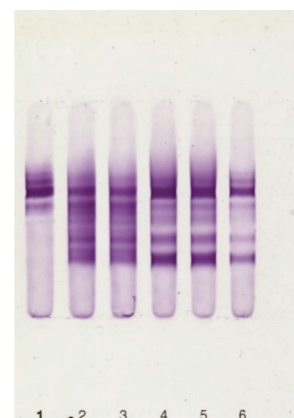


Figura 4
Effetto della contaminazione ematica su profilo immunoelettroforetico con immunofissazione ad alta risoluzione (Sebia). In 1 e 6, rispettivamente, controllo negativo (siero) e controllo positivo (liquor); in 2 e 3 secreto nasale fortemente ematico, profilo non interpretabile; in 4 e 5 campione moderatamente ematico raccolto dallo stesso paziente 2 giorni dopo, profilo positivo per liquorrea.

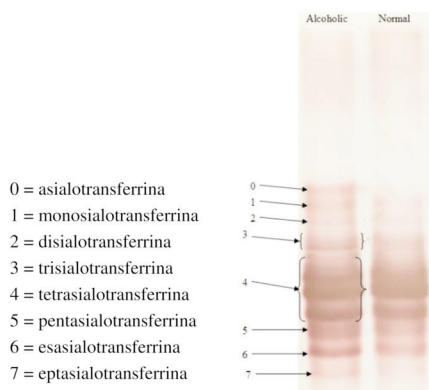


Figura 5
Metodo in isoelettrofocalizzazione e "immunoblotting" per la separazione delle isoforme della transferrina (Helena, Medical Systems).

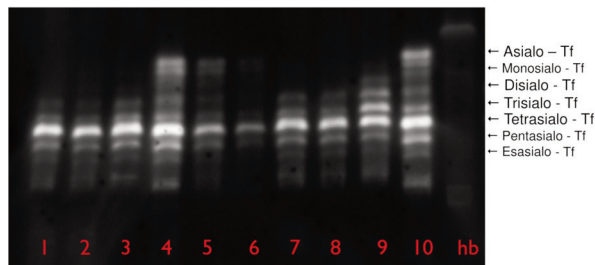


Figura 6
Isoelettrofocalizzazione della transferrina (Tf) e immunorilevazione. 1, 2, 3 = rinaliquoree negative; 4, 5, 6 = rinaliquorrea, campione a diverse diluizioni; 7, 8 = campioni di siero negativi per sospetta sindrome da difetto congenito di glicosilazione (CDG); 9 = campione di siero di soggetto affetto da CDG; 10 = campione di liquor (riferimento); hb = soluzione di emoglobina.

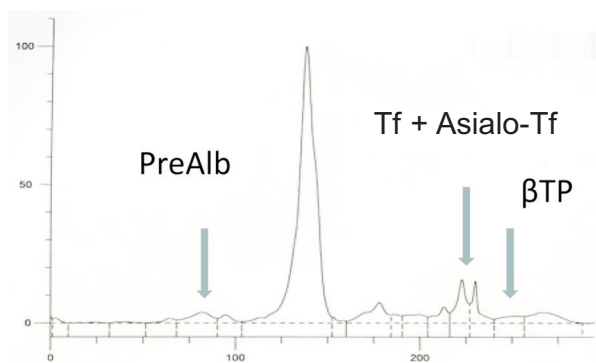


Figura 7
Tracciato liquorale in elettroforesi capillare su strumento V8 Helena (tamponi SPE Zoom). Sono ben evidenti i picchi della prealbumina (PreAlb), dell'asialo-transferrina (Tf) e della "beta-trace protein" (betaTP).

la separazione delle molecole cariche elettricamente, come le proteine, in diversi fluidi biologici, come siero, urine, LCR, liquido sinoviale e saliva. In particolare, la CZE presenta rapidità d'analisi, alta efficienza di separazione dovuta alla dinamica del flusso all'interno del capillare che minimizza l'ampiezza dei picchi, assenza di una vera e propria cella di misura con un basso rumore di fondo e lunghezza d'onda operativa nell'UV che permette una buona rivelazione delle proteine, piccole quantità di campione e di reattivi e possibilità di automazione.

La tecnica CZE è stata utilizzata per l'esame del LCR da un esiguo numero di ricercatori, che l'hanno applicata come analisi di base per la valutazione di numerose patologie neurologiche (33, 34), per la ricerca delle bande oligoclonali (35) o per la determinazione della "beta-trace protein" (24, 36).

La presenza di "beta-trace protein", transtiretina e

asialo-Tf caratterizza il tracciato liquorale e le tre proteine sono chiaramente visibili (Figura 7). L'analisi qualitativa del LCR in CZE con strumenti di ultima generazione permette la valutazione contemporanea delle tre proteine con un semplice tracciato elettroforetico, senza particolari soluzioni tecnologiche e in un sistema completamente automatizzato.

Anche il dosaggio delle isoforme della Tf in CZE si presenta con la precisione derivante dalla lettura diretta delle proteine e dalla semplicità strumentale.

Queste caratteristiche incoraggiano ulteriori studi e una validazione clinica per l'utilizzo della tecnologia capillare nell'analisi del LCR in caso di sospetta fistola liquorale.

CONCLUSIONI

La diagnosi di liquorrea, condizione estremamente rischiosa per lo stato di salute del paziente, ha nell'indagine di laboratorio un criterio diagnostico fondamentale, risolutivo e indispensabile. I due principali esami oggi disponibili, quello quantitativo con il dosaggio della "beta-trace protein" e quello qualitativo con la ricerca dell'asialo-Tf con metodi separativi ad alta risoluzione, hanno eccellenti prestazioni analitiche con sensibilità e specificità prossime al 100%. Rimane aperto il problema organizzativo: le richieste di questi esami sono rare, queste tecniche necessitano di personale estremamente specializzato, ma le risposte devono essere disponibili nel più breve tempo possibile, dato il rischio che il paziente corre e l'elevato valore diagnostico dei risultati. La soluzione che si può suggerire è quella di creare una rete diagnostica che dia la possibilità di inviare velocemente i campioni in centri specializzati.

Professionisti esperti possono mettere a punto nei loro laboratori la misura del rapporto prealbumina/albumina o l'elettroforesi su campione concentrato con immunofissazione della Tf e prealbumina, ma devono essere consci della ridotta sensibilità di queste metodiche rispetto alla ricerca dell'asialo-Tf con metodi separativi ad alta risoluzione o al dosaggio della "β-trace protein". La CZE può rappresentare una valida alternativa futura data la rapidità di indagine e i bassi costi; necessita però di un'approfondita fase di validazione. Termini obsoleti come β₂-Tf dovrebbero essere abbandonati perché inevitabilmente richiamano a tecniche ormai superate e sono da preferire termini come asialo-Tf, che identificano in modo inequivocabile le molecole.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Giorgio Tamaro e Helena Laboratories per avere loro concesso la pubblicazione del tracciato di isoelettrofocalizzazione della Tf riprodotto nella Figura 5.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Risch L, Lisek I, Jutzi M, et al. Rapid, accurate and non-invasive detection of cerebrospinal fluid leakage using combined determination of beta-trace protein in secretion and serum. *Clin Chim Acta* 2005;351:169-76.
- Abuabara A. Cerebrospinal fluid rhinorrhoea: diagnosis and management. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E397-400.
- Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;310:173-86.
- Steedman DJ. CSF rhinorrhea: significance of glucose oxidase strip test. *Injury* 1987;18:327-8.
- Faxén-Irving G, Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, et al. Effects on transthyretin in plasma and cerebrospinal fluid by DHA-rich n-3 fatty acid supplementation in patients with Alzheimer's disease: the OmegaAD study. *J Alzheimers Dis* 2013;36:1-6.
- Ando Y, Ueda M. Diagnosis and therapeutic approaches to transthyretin amyloidosis. *Curr Med Chem* 2012;19:2312-23.
- Brouillette J, Quirion R. Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging. *Neurobiol Aging* 2008;29:1721-32.
- Hybelová M, Svatonova J, Sobek O, et al. Cerebrospinal fluid and serum prealbumin (transthyretin) in patients with multiple sclerosis (MS): comparison of particular subgroups of MS patients. *Folia Microbiol* 2009;54:173-6.
- Doggui S, Brouillette J, Chabot JG, et al. Possible involvement of transthyretin in hippocampal beta-amyloid burden and learning behaviors in a mouse model of Alzheimer's disease (TgCRND8). *Neurodegener Dis* 2010;7:88-95.
- Graziani M S, Caldini A, Basile U, et al. Indicazioni per la misura delle principali proteine sieriche. *Biochim Clin* 2012;36:244-67.
- Bernardi G, Frigerio S, Malesani L, et al. Il dosaggio quantitativo della transtiretina come marcatore della presenza di liquido cefalorachidiano. Riassunti XLVI Congresso Nazionale AIPAC 1996:174.
- Huber A. Quantification of BTP for diagnosis of cerebrospinal fluid leakage. *Biochim Clin* 2013;37:S78-9.
- Urade Y, Hayaishi O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:259-71.
- Meco C, Oberascher G, Arrer E. Beta-trace protein test: new guidelines for the reliable diagnosis of cerebrospinal fluid fistula. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:508-17.
- Deisenhammer F, Egg R, Giovannoni G, et al. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *Eur J Neurol* 2009;16:760-70.
- Szöke D, Braga F, Dolci A, et al. Saturazione della transferrina: c'era una volta il test. *Biochim Clin* 2012;36:339-48.
- Joneli J, Wanzenried U, Schiess J, et al. Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum by capillary zone electrophoresis: evaluation of assay performance and quality assurance over a 10-year period in the routine arena. *Electrophoresis* 2013;34:1563-71.
- Stibler H, Allgulander C, Borg S, et al. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978;204:49-56.
- Zakina M M, Barona B, Guillouf F. Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev Neurosci* 2002;24:222-6.
- Bradbury MW. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem* 1997;69:443-54.
- Bianchi V, Pacifici R, Palmi I, et al. Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative. *Biochim Clin* 2010;34:128-38.
- Chrostek L, Cylwik B, Gruszevska E, et al. N-Latex CDT results in liver diseases. *Alcohol Alcohol* 2012;47:428-32.
- Arrer E, Gibitz HJ. Detection of β₂-transferrin (asialotransferrin) by agarose gel electrophoresis, immunofixation and silver staining in cerebrospinal fluid, secretions and other body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:113-6.
- Arrer E, Meco C, Oberascher G, et al. β-Trace protein as a marker for cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Clin Chem* 2002;48:939-41.
- Oberascher G, Arrer E. Immunologic cerebrospinal fluid diagnosis using beta-2-Transferrin principles and method. *Laryngol Rhinol Otol* 1986;65:158-63.
- Sloman A J, Kelly R. Transferrin allelic variants may cause false positives in the detection of cerebrospinal fluid fistulae. *Clin Chem* 1993;39:1444-5.
- Vernocchi A, Ravasio R, Pelliccia D, et al. Rinorrea o rinoliquorrea? Proposta di un metodo diagnostico non invasivo. *Biochim Clin* 2002;26:295.
- Papadea C, Schlosser RJ. Rapid method for β₂-Transferrin in cerebrospinal fluid leakage using an automated immunofixation electrophoresis system. *Clin Chem* 2005;51:464-70.
- Lescuyer P, Auer L, Converset V, et al. Comparison of gel-based methods for the detection of cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Clin Chim Acta* 2012;413:1145-50.
- Schnabel C, Di Martino E, Gilsbach JM, et al. Comparison of beta₂-transferrin and beta-trace protein for detection of cerebrospinal fluid in nasal or ear fluids. *Clin Chem* 2004;50:661-3.
- Blennow K, Fredman P. Detection of cerebrospinal fluid leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gels with silver staining using the PhastSystem. *Acta Neurochir*

- 1995;136:135-9.
32. Kleine TO, Damm T, Althaus H. Quantification of beta-trace protein and detection of transferrin isoforms in mixtures of cerebrospinal fluid and blood serum as models of rhinorrhea and otorrhea diagnosis. *Fresenius J Anal Chem* 2000;366:382-6.
 33. Cowdrey G, Firth M, Firth G. Separation of cerebrospinal fluid proteins using capillary electrophoresis: a potential method for the diagnosis of neurological disorders. *Electrophoresis* 1995;16:1922-6.
 34. Ivanova M, Tzvetanova E, Jetcheva V, et al. Abnormal protein patterns in blood serum and cerebrospinal fluid detected by capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods* 2002;53:141-50.
 35. Sanders E, Katzmann JA, Clark R, et al. Development of capillary electrophoresis as an alternative to high resolution agarose electrophoresis for the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:37-45.
 36. Hiroaka A. Detection by capillary electrophoresis of changes in the beta-trace protein levels in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *Prostaglandins* 1996;51:290.