

L'interpretazione quantitativa dei dati liquorali

G. Bernardi, E. Corsini, E. Ciusani

IRCCS Istituto Nazionale Neurologico "C. Besta", Milano

Introduzione

L'esame del Liquido Cerebro Spinale (liquor), in inglese Cerebro Spinal Fluid (CSF), suscita spesso negli operatori dei laboratori clinici un senso di timore, se non di terrore, giustificato forse dal fatto che è tra i pochissimi esami rimasti ad avere le caratteristiche di esame urgente di competenza esclusiva del dirigente sanitario reperibile e la reazione può trovare la sua spiegazione anche nel fatto che si tratta di un esame raro del quale viene a mancare la necessaria esperienza che ne può conferire una minima dimestichezza.

Materiale raro e prezioso, dovuto ad un intervento traumatico inusuale negli odierni esami di laboratorio, pone in effetti alcuni problemi, sia per la concentrazione estremamente bassa di molti suoi analiti, che per le particolarità interpretative del dato analitico. La bassa concentrazione di molti suoi componenti è oggi risolta dall'estrema sensibilità delle tecniche analitiche, mentre la corretta interpretazione clinica necessita di una integrazione del singolo dato con altri, senza la quale il dato stesso può perdere qualsiasi significato diagnostico.

Scopo di questa relazione è quello di fornire gli elementi necessari per interpretare nel modo più corretto possibile il dato quantitativo dell'esame liquorale.

Gli esami liquorali di base

Gli esami liquorali "di base", quelli che qualsiasi laboratorio ospedaliero è in grado di assicurare, che sono la misura del glucosio (glicorrachia), delle proteine totali (protidorrachia) e conteggio degli elementi figurati (citometria), possono essere presi come modello per introdurre le necessità interpretative del dato liquorale.

La glicorrachia è patologica se la concentrazione del glucosio si abbassa: questo per consumo metabolico nel caso di patologie meningee, specie meningiti batteriche o carcinomatosi. Il valore della glicorrachia non è però una variabile indipendente ma di-

pende dalla glicemia e in condizioni fisiologiche ha un valore che è circa la metà. Una corretta interpretazione del consumo del glucosio liquorale deve quindi tenere conto del valore della glicemia. Per completezza espositiva occorre ricordare che nei laboratori specializzati la glicorrachia è stata sostituita dal dosaggio dei lattati che aumentano per effetto di una aumentata glicolisi anaerobia con la formazione di 2 molecole di lattato per ogni molecola di glucosio metabolizzata.

La misura della protidorrachia si ottiene facilmente utilizzando i metodi di dosaggio delle proteine urinarie in uso in tutti i laboratori. Le proteine totali si elevano nei casi di processo infiammatorio per la presenza del così detto "danno di barriera", con conseguente maggiore passaggio di proteine dal plasma al liquor. Livelli patologici, anche se di entità moderata (raramente oltre il doppio del limite normale), si possono avere però anche in assenza di danno di barriera per una notevole sintesi di immunoglobuline nel sistema nervoso centrale.

L'esame citometrico, ossia la conta degli elementi figurati liquorali, viene fatto ancora in camera di conta al microscopio, infatti, a tutt'oggi, non vi è strumento automatico per la conta dei leucociti (sangue o urine) di cui siano stati riportati in letteratura dei dati che ne possano consigliare l'uso (1). Se da un lato abbiamo delle difficoltà tecniche, dato che il microscopio oggi non viene più utilizzato per la conta degli elementi cellulari, (questo può spiegare il timore nell'affrontare l'esame liquorale), dall'altro lato possiamo dire che questo esame ha invece valore assoluto, infatti la conta dei leucociti al di sopra del valore normale (3-4 elementi/mm³) è sempre un dato patologico, indipendentemente dal conteggio dei globuli bianchi ematici.

Questi tre esami, scelti appositamente perché fanno parte dell'esperienza comune dei laboratori clinici, sono esempi della condizione degli analiti liquorali: di cui ce ne sono alcuni, come il glucosio di derivazione plasmatica, altri come i globuli bianchi il cui aumento è legato solo a processi fisiopatologici cerebrali ed altri come le proteine la cui origine può

essere dell'uno o dell'altro tipo, oppure mista; in letteratura le proteine liquorali sono infatti divise in "blood derived proteins" e "brain derived proteins" con una terza tipologia di "predominantly" brain (o blood) derived nel caso siano presenti entrambe le fonti (2).

Esami di laboratorio specialistici

Con questo termine vogliamo indicare quegli esami per l'interpretazione dei quali è necessario un minimo di conoscenze di fisiopatologia liquorale e quelli di pertinenza esclusiva dei laboratori specializzati.

Bisogna dire che le applicazioni diagnostiche principali sono oggi concentrate sullo studio delle proteine, utilizzate come marcatori di processi infiammatori, di processi neoplastici o di lesioni cellulari.

E' necessario a questo punto dare alcune definizioni.

Danno di barriera: identifica qualsiasi condizione fisiopatologica che comporta un aumentato passaggio di proteine dal plasma nel liquor; questo passaggio è tradizionalmente interpretato come dovuto ad un danno della barriera ematoliquorale.

Sintesi intratecale: qualsiasi condizione che comporta un aumento di proteine liquorali per aumentata produzione nel sistema nervoso centrale; il termine enfatizza il fatto che la produzione avviene esclusivamente all'interno della barriera ematoliquorale.

Plasma proteine (blood derived proteins)

In condizioni fisiologiche le proteine di derivazione plasmatica sono circa i 4/5 delle proteine liquorali totali.

La proteina presente in concentrazioni maggiori è l'albumina che rappresenta circa il 55% delle proteine totali. Il dosaggio dell'albumina è di importanza fondamentale in quanto è una proteina sintetizzata esclusivamente nel fegato: la sua misura (LAlb) è ritenuta il migliore indicatore dello stato della barriera ematoliquorale. Essendo presente una variabilità inter-individuale della concentrazione di albumina plasmatica (SAlb) ed essendo l'albumina liquorale dipendente unicamente da essa, il parametro in uso non è la sua concentrazione in assoluto ma il rapporto tra la sua concentrazione nel liquor e quella nel siero, il valore moltiplicato per 1000 prende il nome di *quoziente albuminico (QAlb)*:

$$QAlb = LAlb/SAlb \times 1000$$

(v.n. di un soggetto di 35 anni < 6.5).

Le immunoglobuline liquorali hanno importanza fondamentale per diagnosticare la presenza di uno stato infiammatorio del sistema nervoso centrale, sia come risposta ad un agente infettivo che come processo patologico dovuto ad una attivazione del sistema immunitario. Nel corso del processo infiammatorio i linfociti B migrano nel sistema nervoso cen-

trale e producono immunoglobuline che si riversano in prima istanza nel liquor. Le immunoglobuline di sintesi intratecale si sommano a quelle già presenti per semplice passaggio di barriera e lo scopo dell'analisi quantitativa è quello di differenziare le une dalle altre. Il primo passo è quello di calcolare il *quoziente immunoglobulinico (QIg)* (detto anche QTot per indicare che si tratta del dosaggio di una classe di immunoglobuline e non del dosaggio di un anticorpo specifico) che, come tutti i quozienti liquorali, si misura rapportando le immunoglobuline liquorali (LIg) con quelle del siero (SIg) e moltiplicando il risultato per 1000:

$$QIg = LIg/SIg \times 1000.$$

In questo caso, però, il semplice quoziente è insufficiente, in quanto può essere presente anche una quota di origine intratecale oltre a quella dovuta alla filtrazione plasmatica. La misura della quota plasmatica ci viene data dal quoziente albuminico, misura di riferimento del semplice passaggio passivo. Si definisce *indice liquorale di una determinata classe di immunoglobuline (Ig index)* il rapporto tra il quoziente di una determinata classe di immunoglobuline ed il quoziente albuminico:

$$\text{Indice IgG} = LIgG/SIgG/LAlb/SAlb$$

$$IgG \text{ Index} = QIgG/QAlb \text{ (v.n. } < 0.7).$$

Dato che il passaggio dalla barriera è condizionato dall'ingombro sterico delle singole molecole è evidente che, essendo le immunoglobuline G più grosse dell'albumina ne sarà atteso un minore passaggio e questo spiega il valore normale atteso inferiore ad 1 (0.7). Le altre classi di immunoglobuline IgA ed IgM essendo molecole più grandi hanno degli indici ancora più bassi.

Una impostazione di calcolo del genere (basato su di una equazione di tipo lineare) sarebbe corretta se la permeabilità della barriera fosse costante per tutti i livelli del danno di barriera, cosa che non si verifica: infatti all'aumentare del danno aumenta la permeabilità alle proteine di dimensioni maggiori (3). La funzione che descrive il passaggio delle diverse plasmoproteine nel liquor a seconda dello stato della barriera (definito come sempre dal quoziente albuminico), in assenza di processi infiammatori, è di tipo iperbolico e può essere applicata a tutte le plasmoproteine: il risultato prende il nome di *quoziente limite (QLim)*, si chiama limite perché il suo valore rappresenta il valore massimo (limite) che quella proteina può avere nel liquor in quelle determinate condizioni di stato di barriera:

$$Q \text{ Lim} = a/b \sqrt{Qalb^2 + b^2} - c$$

a, b e c sono delle costanti che dipendono dalle caratteristiche fisico-chimiche della proteina in esame.

Abbiamo in questo modo un valore teorico col quale confrontarci: confrontando il quoziente del nostro paziente con il quoziente limite potremo dire se è presente (QIg > QLim) o meno (QIg < QLim) una sin-

tesi intratecale. La quantità di immunoglobuline presenti può essere anche espressa come *frazione intratecale (IF)* (intrathecal fraction), che è la quota di immunoglobuline liquorali totali (espressa in percentuale o in concentrazione) dovuta alla sintesi intratecale:

$$IF = (1 - Q_{Lim}/Q_{Tot}) \times 100$$

espresso in % della concentrazione liquorale totale.

Questo tipo di calcoli deve essere sempre utilizzato per interpretare le risposte analitiche quantitative di tutte le proteine liquorali di cui sia dimostrabile una quota di origine plasmatica, cosa che non si verifica solo nel caso delle immunoglobuline (soprattutto nel caso di ricerca di anticorpi specifici) ma anche nel caso dei marcatori tumorali (4).

Queste sono le note interpretative, ci sono però importanti considerazioni da fare anche dal punto di vista analitico. In generale si può dire che, con opportune modifiche, si possono utilizzare le metodiche proposte per le plasmaproteine nel siero per il dosaggio delle "blood derived proteins" liquorali, questo è possibile se si considerano alcuni limiti. Il primo è quello della sensibilità analitica: le IgA hanno una concentrazione liquorale attesa che è 1/800 di quelle plasmatiche, la differenza è ancora più marcata per le IgM (1/3400), è chiaro che è necessario utilizzare metodiche dedicate differenti da quelle proposte per le componenti plasmatiche, sono necessarie infatti metodiche immunonefelometriche o immunoturbidimetriche al lattice o metodi ELISA. Il secondo punto è quello della "sicurezza analitica", trattandosi di metodi di determinazione di un immunocomplesso in fase liquida, il rischio di trovarci di fronte alla presenza di un eccesso di antigene è sempre presente, molto di più di quello che si può verificare nella pratica del dosaggio delle proteine nel plasma: basti considerare che, in presenza di grossi danni di barriera, la concentrazione attesa di un analita come le IgM può aumentare di 100000 volte rispetto ai valori dei soggetti normali. E' necessario perciò utilizzare metodi estremamente "robusti" che garantiscano una elevata precisione a bassi livelli di concentrazione analitica associata ad un assoluto controllo della linearità di reazione.

Proteine marcatori di danno cerebrale (brain derived proteins)

Le proteine utilizzate come marcatori di danno cerebrale hanno come caratteristica il fatto che sono presenti, in concentrazioni estremamente basse, quasi esclusivamente nel liquor e che non sia possibile trarre informazioni cliniche dal loro dosaggio nel plasma. Questo perché esse trovano nel liquor un elemento in cui "concentrarsi" oppure perché in circolo sono presenti molecole analoghe originarie da altri tessuti. Delle varie e numerose proteine proposte solo la proteina 14-3-3 ha dimostrato una sicura

utilità diagnostica tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha deciso di inserirla tra i criteri per la diagnosi di forme sporadiche di Creutzfeld-Jakob Disease (CJD) (5). La metodica in uso è un metodo semiquantitativo con frazionamento elettroforetico (SDS PAGE) del liquor e successivo immunoblotting, recentemente è stato proposto un metodo quantitativo ELISA, più facilmente applicabile alla routine di laboratorio, con sensibilità analoga (6).

Dal punto dell'interpretazione del dato analitico il lavoro di Reiber già citato (2) enfatizza l'assoluta indipendenza del dosaggio di tali analiti dallo stato della barriera ematoliquorale, con il rischio di false associazioni fisiopatologiche nel caso che i dati venissero espressi come i relativi quozienti ed indici.

Sierologia liquorale

Scopo della sierologia liquorale è quello di diagnosticare una risposta anticorpale specifica all'interno del sistema nervoso centrale. Si misura calcolando la sintesi intratecale di anticorpi specifici per un determinato antigene (7). Il metodo di indagine utilizzato nella maggior parte dei laboratori è di tipo quantitativo con metodologie ELISA, anche se risultati analoghi possono essere ottenuti con metodi di "blotting di affinità" (8).

E' indispensabile utilizzare metodiche la cui sensibilità sia adeguata alle basse concentrazioni delle immunoglobuline liquorali, di solito derivate da metodiche ELISA standardizzate per il siero, è anche necessario che le quantità di anticorpi specifici si misurino in Unità Internazionali o in Unità Arbitrarie, che linearizzino il rapporto dose/risposta.

Deve essere calcolato il *quoziente anticorpale specifico (QIgspec)* dato dal rapporto tra il valore di anticorpi specifici trovato nel liquor (LAbSpec) e quello trovato nel siero (SAbSpec)

$$QIgspec = LAbSpec / SAbSpec$$

Questo deve essere confrontato con il *quoziente anticorpale totale (QIgtot)*

$$QIgtot = LIg/Sig$$

si ottiene così l'*indice anticorpale specifico (AI)*

$$AI = QIgspec / QIgtot \text{ (v.n. } 0.5-1.5)$$

che ci dice se l'attività anticorpale specifica liquorale è uguale o superiore a quella attesa in base a quella presente nel siero. Risulterà chiaro che se l'attività è superiore questa può essere dovuta solo a sintesi intratecale.

Ricordando che il quoziente limite ci indica il valore massimo di immunoglobuline filtrate passivamente dal siero a quel determinato livello di danno di barriera, è necessario correggere la formula nel seguente modo:

$$se \ Q_{Tot} > Q_{Lim}, \ AI = Q_{spec} / Q_{Lim}$$

La correzione per il quoziente limite ha una base fisiopatologica, ci indica infatti quante unità anticorpali possono essere presenti nel liquor per semplice

passaggio passivo ed è indispensabile per potere ottenere una sensibilità analitica adeguata.

Discussione

Una delle principali attività del laboratorio di patologia clinica, forse la più importante, è quella di "razionalizzare" la risposta del dato analitico cercando di trasformare il livello di concentrazione del metabolita in messaggio inequivocabile sullo stato di salute del paziente.

L'identificazione dei così detti "valori normali" della popolazione, inteso come l'intervallo di valori entro il quale rientrano i valori della popolazione sana con ragionevole attendibilità statistica, presuppone l'identificazione preliminare dei soggetti sani, sui quali eseguire le indagini ed, una volta eseguite, è necessario definire i limiti del valore della loro distribuzione, successivamente, una volta identificata con parametri certi la popolazione dei malati, questa dovrà essere studiata con la stessa metodologia nella speranza che i valori di questa si scostino non solo significativamente da quelli sani ma soprattutto che non ci sia sovrapposizione tra i valori dei normali e quelli dei malati.

Questi concetti sono ben noti al patologo clinico tanto da potere sembrare superflui. Abbiamo cercato di dimostrare come l'indagine liquorale si discosti spesso da questi concetti in quanto molto spesso è più importante correggere il dato analitico "grezzo" con lo stato della barriera ematoliquorale e con la concentrazione dell'analita presente nel siero dello stesso soggetto per potere definire uno stato di patologia: sintesi intratecale che è assente nei sani, piuttosto che i dati ottenuti dal confronto tra i valori assoluti liquorali nella popolazione dei sani e quelli dei malati.

Gli esperti della diagnostica liquorale hanno messo a punto dei sistemi di refertazione in cui l'interpretazione del dato viene facilitata dall'uso di grafici e si rimanda il lettore alla recente letteratura (9).

Di particolare interesse è il dibattito sulla "priorità" diagnostica del dato quantitativo rispetto a quello

qualitativo. E' presente da poco in rete Internet un sito creato da esperti nel settore www.team-space.net/csf in cui sono riportate le discussioni a caldo fatte sull'argomento utilizzando un sistema di comunicazione telematico (Lotus notes).

Bibliografia

1. Ziebig R, Lun A, Sinha P. Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with automated hematology analyzer CellDyn 3500 and the urine flow cytometer UF-100. *Clin Chem* 2000;46:242-7.
2. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;310:173-86.
3. Reiber H. Evaluation of blood-CSF barrier function and quantification of the humoral immune response within the CNS. In: Thompson EJ, Trojano M, Livrea P, eds. *CSF analysis in multiple sclerosis*. Milano: Springer-Verlag; 1996, p. 51-72.
4. Croci D, Eoli M, Gilardoni F, Danieli N, Di Ciocia S, Salmaggi A, Bernardi G. Clinical utility of CSF CEA, AFP and b-HCG as tumor markers of secreting germ cell CNS tumors. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (special suppl.):S225.
5. Green AJ., Ramljak S, Mueller WEG, Knight RSG, Schroeder HC. 14-3-3 in the cerebrospinal fluid of patients with variant and sporadic Creutzfeld-Jakob disease measured using capture assay able to detect low levels of 14-3-3 protein. *Neurosci Lett* 2002; 324: 57-60.
6. Peoc'h K, Schroeder HC, Laplanche JL, Ramljak S, Mueller WEG. Determination of 14-3-3 protein levels in cerebrospinal fluid from Creutzfeld-Jakob patients by a highly sensitive capture assay. *Neurosci Lett* 2001;301:167-70.
7. Bernardi G. Indagini sierologiche liquorali. *Atti del convegno Diagnostica Liquorale tra presente e futuro*. Varese 27 novembre 1998. p.159-84.
8. Sindic CJM, Van Antwerpen MP, Goffette S. The Intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:333-40.
9. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:324-32.