

**VADEMECUM PER
L'ESAME
DEL LIQUOR
CEREBROSPINALE
IN URGENZA**

A cura di:

Paolo Andreani

Ines Bianco

Fiorella Bottan

Giovanni Casiraghi

Anna Maria Cenci

Maria Ruggeri

Procedure Operative

Nel caso di tre provette di
liquor:



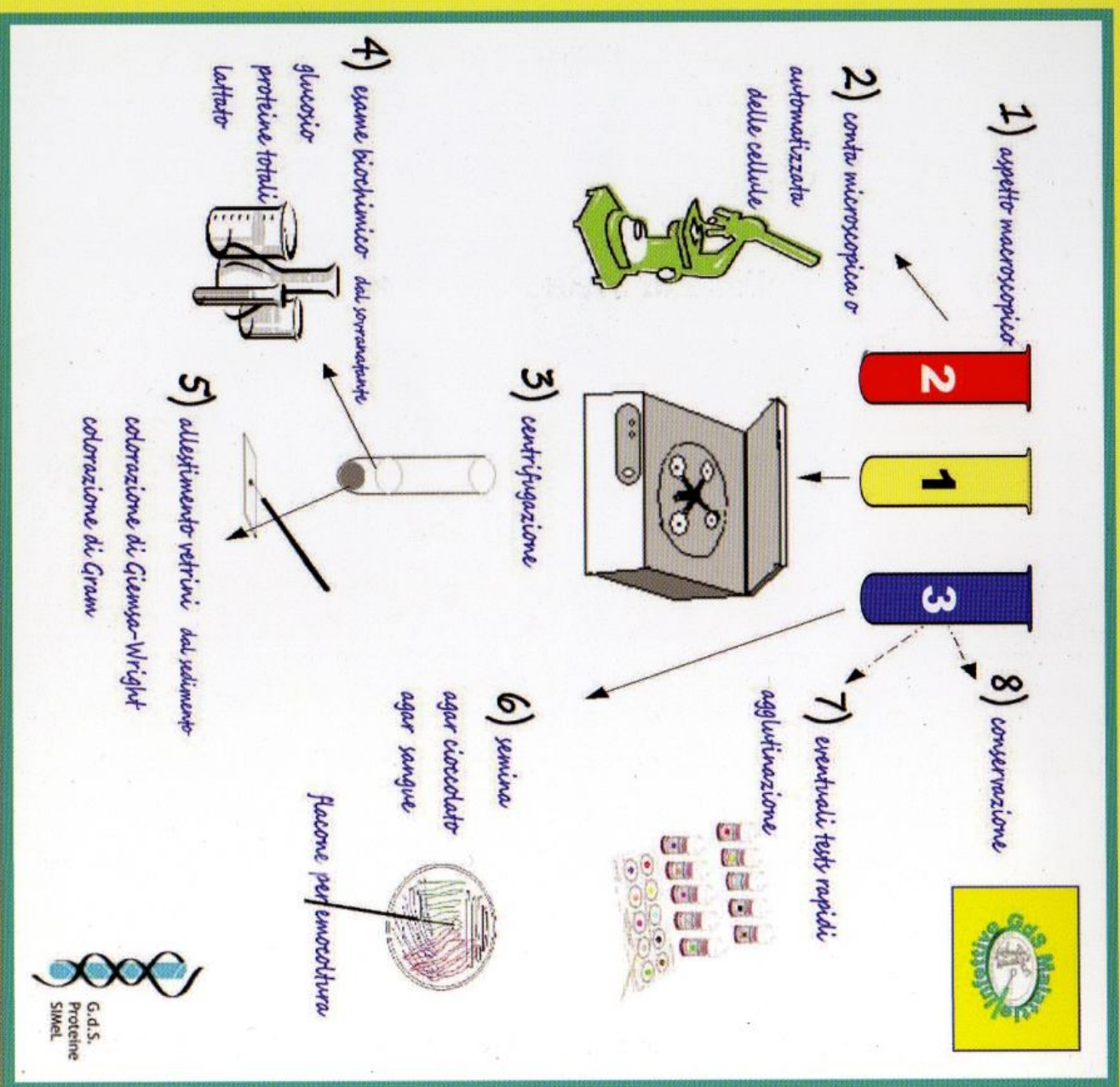
- 3 – Centrifugazione
- 4 – esame biochimico
- 5 – allestimento vetrini per colorazioni



- 6 – semina
- 7 – test rapidi
- 8 – conservazione



- 1 – aspetto macroscopico
- 2 – conta microscopica o automatizzata delle cellule



con il contributo di:

**Antonio Conti
Ettore Migali
Michele Schinella
Maria Letizia Tomassoni**

con il Patrocinio dei Gruppi di Studio di

**Ematologia
Informatica
Liquidi cavitari
Malattie Infettive
Proteine
Risk Management**

della Società Italiana di Medicina di Laboratorio

MEDIA
EDIZIONI SCIENTIFICHE
MED

Mediamed Srl

Via Gaggia, 1 - 20139 Milano - Tel. 02/56814813 - 02/56814877 - Fax 02/56817441

e-mail: redazione@mediamed.it - <http://www.mediamed.it>

Copia omaggio per i Sigg. Medici. Vietata la vendita.

© Mediamed Srl - Settembre 2009

Tutti i diritti di traduzione, memorizzazione elettronica, riproduzione e di adattamento parziale o totale con qualsiasi mezzo (compresi microfilm, copie fotostatiche e xerografiche) sono riservati per tutti i Paesi.

Introduzione

L'esame del liquido cerebrospinale (LCS) costituisce una **vera emergenza** per il Laboratorio di analisi Ospedaliero. La complessità e l'importanza dell'esame richiede un dirigente in pronta disponibilità. In mancanza di un settore dedicato alle urgenze è richiesta la pronta accessibilità di tre ambiti chiave del Laboratorio: la citometria, la chimica clinica e la microbiologia.

Qualunque procedura su detto materiale deve essere condotta in condizioni di massima sicurezza per l'operatore e le procedure microbiologiche devono essere rigorosamente svolte sotto cappa a flusso laminare.

È un **esame non ripetibile** e quindi **nessun campione può essere respinto dal laboratorio**, riportando però in commento le eventuali non idoneità riscontrate.

È uno di quei casi in cui **il sospetto clinico indirizza il processo analitico** e si devono quindi sempre avere riferimenti ben precisi: non esitare mai a chiamare i colleghi clinici per avere notizie del paziente o del prelievo.

È sempre conveniente stabilire **accordi con i reparti**, in particolare le medicine, la pediatria, la neurologia e le malattie infettive, per poter ben definire protocolli di preallarme del laboratorio, procedure di prelievo, modalità di invio e di trattamento del campione ed evitare, quando possibile, che il campione di LCS giunga in laboratorio in momenti poco opportuni (talvolta il termine delle attività di reparto coincide con il ritmo massimo di lavoro in laboratorio) per far sì che il campione sia "atteso" e l'esame possa essere eseguito immediatamente. È necessario anche verificare l'avvenuta effettuazione di un prelievo venoso per esame emocromocitometrico completo, glicemia, proteine seriche totali, indagini sierologiche, dei prelievi per emocolture e possibilmente anche per indagini di diagnostica molecolare. Devono essere ben definite le modalità di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni nei laboratori di esecuzione quando diversi da quelli attivati durante la prima fase dell'emergenza.

Indicazioni per l'esame in urgenza sono:

1.Meningite

2.Emorragia subaracnoidea

Altre indicazioni per l'esame ma non in regime di urgenza sono:

3.Sclerosi multipla e altre malattie autoimmuni

4.Tumori

Esame Macroscopico

Valutare immediatamente la quantità del campione, la trasparenza, il colore e la formazione di precipitati; centrifugare un'aliquota e rivalutarne l'aspetto.

Il prelievo di almeno 5 mL deve giungere distribuito in tre provette di vetro siliconato o polipropilene numerate secondo l'ordine di raccolta ed una eventuale in EDTA per citometria automatizzata e deve essere accompagnato da notizie cliniche (compresa l'effettuazione di eventuali terapie antibiotiche) e dalla misura della pressione intratecale del liquido cerebrospinale all'inizio ed alla fine del prelievo (normale 10-40 cmH₂O). Il prelievo deve giungere **accompagnato da una provetta di sangue prelevato al paziente contemporaneamente** per poter valutare la glicemia e poter effettuare eventuali altri esami su siero. In gene-

re si utilizza la prima provetta per l'esame biochimico, la seconda per quello microbiologico e la terza per la citometria e la conservazione.

Eventuali non idoneità del campione vanno registrate nel referto, ma comportano comunque la tentata effettuazione dell'esame. La non idoneità può essere dovuta ad una quantità insufficiente di LCS, un numero di provette insufficiente, un campione macroscopicamente contaminato da sangue periferico (prelievo di LCS traumatico), un contenitore non idoneo.

Eventuali aliquotazioni devono essere eseguite in cappa a flusso laminare. In ogni caso la prima provetta non dovrebbe essere utilizzata per gli esami colturali per il pericolo di contaminazione da parte di batteri; se comunque il campione è costituito da una sola provetta, di solito le priorità sono:

1. esami microbiologici
2. conta cellulare
3. biochimica clinica
4. aliquota per la conservazione.

Se sono state ricevute due provette è meglio destinare la prima alla conta cellulare, all'esame biochimico e alla preparazione dei vetrini e alla eventuale aliquotazione per la conservazione, l'altra alla microbiologia per le indagini di settore. Se le provette pervenute sono di differente colorazione destinare alla conta delle cellule la provetta meno intensamente colorata. Se la quantità è insufficiente cercare di rispettare la gerarchia su indicata.

Registrare e annotare nella risposta la quantità di LCS pervenuta in laboratorio, l'aspetto generale ed il colore.

Per l'aspetto utilizzare preferibilmente la scala qualitativa: **limpido, sublimpido, torbido**. L'aspetto torbido può essere dovuto alla presenza di leucociti, eritrociti, microrganismi, coaguli di fibrina (normalmente assente nel LCS, annotarne la presenza se visibili), ma anche all'utilizzo di contenitori non idonei, come ad esempio provette contenenti acceleratori della coagulazione.

Per il colore utilizzare preferibilmente gli attributi **incolore, xantocromico, eritrocromico**.

La presenza di **sangue** va distinta dal sanguinamento legato al trauma del prelievo lombare e può indicare emorragia intracranica subaracnoidea o intracerebrale. In questo caso la quantità di sangue non si riduce durante la raccolta e non ci dovrebbero essere differenze macroscopiche nel numero di eritrociti tra la prima e l'ultima provetta. Il conteggio accurato dei globuli rossi non è invece utile per la diagnosi di emorragia cerebrale visto che la lisi degli eritrociti si verifica in breve tempo dopo la raccolta con liberazione di emoglobina libera. In tal caso dopo centrifugazione il sovranatante risulta di colore dal rosato al giallastro passando per tonalità arancio. Questo fenomeno prende il nome di **xantocromia** (dal greco xantos, giallo). La xantocromia si accentua col passare del tempo a causa della trasformazione dell'emoglobina in bilirubina e può persistere anche per settimane dall'evento emorragico. Raramente una colorazione giallastra è dovuta alla presenza di altri pigmenti come i carotenoidi o la melanina (metastasi da melanoma), o ad un importante aumento delle proteine del liquor. In assenza di quanto detto si deve anche considerare la possibile contaminazione accidentale del liquido da parte di soluzioni iodate o altre usate per la disinfezione della cute. Un liquor di **viscosità aumentata** può essere dovuto a metastasi da adenocarcinomi mucinosi, ma un modesto aumento della viscosità si può avere anche nella meningite da criptococco ed è legato al polisaccaride capsulare.

Esame Citometrico

Contare immediatamente le cellule al microscopio ottico o se disponibile in citometria automatizzata. Il livello di emergenza è in rapporto alla cellularità, quindi le cellule si devono contare appena possibile. Il liquor è ipotonico e gli eritrociti e i leucociti potrebbero lisarsi. A temperatura ambiente la conta degli elementi figurati diminuisce del 30% circa dopo un'ora e del 50% dopo 24 ore. Contare le cellule in una camera con reticolo di conta tipo Nageotte, Burkner, Toma-Zeiss, Neubauer o altra o in citometria automatizzata.

Conta in citometria automatizzata

È possibile per WBC > di 50/mm³ su citometri di tipo:

IL Iris iQ200 (su software dedicato), Sysmex XE2100 (canale Service_Diff), Siemens Advia (canale RBC/Baso), Abbott Cell Dyn, Beckman-Coulter LH750.

I contaglobuli di ultima generazione nati per i conteggi e il riconoscimento delle cellule ematiche circolanti possono essere ora utilizzati anche in altri liquidi biologici infatti dispongono di protocolli di lettura software adattati allo studio di materiali, quali il liquor (LCR), che di norma si presentano ipo o acellulari. L'uso degli emocitometri ha apportato anche alle determinazioni su LCS le caratteristiche positive dell'automazione in termini di sensibilità, accuratezza e specificità nel conteggio e nel riconoscimento delle cellule presenti, con performance, però, differenti tra i risultati ottenuti per i vari elementi che vi si possono incontrare. Questa evenienza ricalca quanto conosciuto per il sangue periferico (come esempio si considerino i diversi CV% che si osservano nei risultati della rilevazione di linfociti e monociti praticamente per tutti i contaglobuli del mercato), e possono risentire anche della qualità del materiale con cui si lavora.

Se si utilizzano per la lettura, in alternativa, strumenti comunemente dedicati al riconoscimento e al conteggio degli elementi figurati presenti nelle urine (IL Iris iQ200, con software dedicato, Sysmex UF100) il problema può essere costituito dalla quantità di LCS richiesta dal test e dalle variabili che l'eventuale diluizione del campione, suggerita per risolvere questa criticità, può introdurre nelle determinazioni, con possibili interferenze sull'accuratezza e sulla precisione dei risultati.

La bassa cellularità, la morfologia dei leucociti e i ridotti volumi di campione che in passato limitavano l'uso dell'automazione, sembrano oggi non costituire più grosse difficoltà. Infatti, letture soddisfacenti, sovrapponibili al riferimento tuttora costituito dal microscopio, vengono registrate in molte pubblicazioni di diversi gruppi anche per concentrazioni cellulari molto scarse. Un utilizzo vantaggioso si riscontra nello studio delle pleiocitosi liquorali, di grado e tipologia cellulare differente, caratteristiche di patologie infettive, infiammatorie, immuni e neoplastiche primitive o secondarie del SNC.

Però, mentre le performance strumentali di conteggio risentono pressoché sempre positivamente del numero degli eventi esaminati, le caratteristiche delle immagini dei citogrammi possono essere diverse rispetto alle corrispettive fornite dalle cellule in periferia, a causa delle condizioni di presentazione e di conservazione legate alle caratteristiche stesse del liquor o al prelievo da puntura subito. Altre volte, invece, le cellule e i quadri liquorali ricalcano in modo sorprendente, le immagini degli elementi dello stesso paziente presenti nel suo sangue perife-

rico o in altre sedi di localizzazione sistemica (si pensi ad alcuni liquor provenienti da patologie leucemiche o linfoproliferative). Il problema, quindi, della qualità del campione, del tempo di analisi, del numero di cellule e delle dimensioni da queste presentate possono interferire sui risultati forniti.

Come nel caso del sangue periferico, la valutazione dei citogrammi aggiunge preziose informazioni sulla morfologia cellulare del LCS e porta suggerimenti all'approfondimento microscopico in caso di immagini anomale riconducibili a sospetto di cellule degenerate o atipiche, o interferenze da rumore di fondo.

I risultati attuali dimostrano la praticabilità di impiego dell'automazione nell'analisi del LCS, con conteggi e differenziazione leucocitaria ben correlati all'analisi microscopica, buone performance analitiche e diagnostiche, e vantaggi legati all'automazione quali tracciabilità, standardizzazione, riproducibilità, velocità di analisi, nessun pretrattamento del campione e, nel caso degli emocitometri, ridotto volume di materiale richiesto per l'analisi. Quest'ultimo punto appare di notevole vantaggio, anche in considerazione delle ridotte quantità di liquor che possono in genere venire prelevate senza creare problemi al paziente. A causa della scarsità di cellule normalmente presenti è essenziale azzerare correttamente le linee di base strumentali. Per pleiocitosi importanti e/o contaminazione ematica, con alcuni sistemi, il liquor può essere valutato anche con modalità "sangue intero" e l'esame dei citogrammi fornisce suggerimenti e contributi per l'approfondimento microscopico.

L'impiego di strumenti automatici risolve quindi spesso il problema del conteggio cellulare effettuato al microscopio con metodo manuale che, oltre a impegnare notevoli risorse di tempo, ha limiti di imprecisione, variabilità tra gli operatori, e scarsa standardizzazione.

Restano importanti i problemi legati alla preanalitica ed esiste, per lo più, la necessità di utilizzo di un anticoagulante, comunemente costituito dallo stesso utilizzato per l'emocromo (EDTA K2 o K3).

Va, infine, ricordata la possibilità di impiego della citofluorimetria nei casi in cui si renda necessaria, per l'inquadramento diagnostico, la ricerca dell'immunofenotipo delle cellule presenti.

La conta dei leucociti nel LCS degli adulti sani è di 0-5 cellule/mm³. Nei neonati è più elevata con 0-30 cellule/mm³ ed il limite superiore del valore normale di riferimento va progressivamente diminuendo fino al periodo dell'adolescenza.

In condizioni normali i globuli rossi sono presenti in quantità minima. Se sono più numerosi è probabile che ci si trovi in presenza di una causa patologica come neoplasie, infarto, emorragia o in seguito ad un traumatismo. In presenza di una puntura lombare traumatica, caratterizzata da campioni ematici con differente intensità di colorazione da una provetta all'altra, può essere utile anche la conta dei globuli rossi per avere un'approssimazione del vero valore dei globuli bianchi (WBC) o delle proteine totali.

L'approssimazione può essere valida soltanto se le misurazioni di WBC e RBC sono effettuate dalla stessa provetta, se la conta WBC nel sangue non è estremamente alta o bassa e se è accurato il conteggio RBC, altrimenti non ha alcun significato, anzi è controindicata.

La formula per correggere la conta dei leucociti è la seguente:

$$\text{WBC}_{\text{corr}} = \text{WBC}_{\text{oss}} - \text{WBC}_{\text{agg}}$$

dove:

$$\text{WBC}_{\text{agg}} = \text{WBC}^{\text{SP}} \times \text{RBC}^{\text{LCS}} / \text{RBC}^{\text{SP}}$$

con:

WBC_{corr} = conta leucocitaria del LCS corretta

WBC_{oss} = conta leucocitaria effettuata nel LCS

WBC_{agg} = leucociti aggiunti dalla contaminazione con il sangue periferico

WBC_{SP} = leucociti del sangue periferico

RBC_{LCS} = eritrociti nel CSF

RBC_{SP} = eritrociti nel sangue periferico.

In presenza di una normale conta RBC nel sangue periferico tale correzione ammonta a circa un leucocita per ogni 700 globuli rossi. Se il rapporto WBC_{oss} / WBC_{agg} è superiore a 10 si ha una sensibilità del 88% e una specificità del 90% per la meningite batterica, mentre per un rapporto inferiore la probabilità sembra essere bassa.

Se i leucociti sono più di 30/mm³ va subito effettuato il conteggio differenziale. Si devono allestire dei vetrini con il sedimento ottenuto dalla centrifugazione a 500 g per 10 min di 0,5 ml di LCS. I preparati fissati con alcool metilico possono essere colorati con il metodo di Giemsa-Wright o con altra colorazione panottica.

Neutrofilia superiore a 1000/mm³ indica presenza di infezione purulenta. Un aumento più modesto dei neutrofili si osserva sia nella meningite batterica che nelle fasi precoci della meningite virale, nella meningite tubercolare, nelle meningiti da funghi, da ameba e nelle fasi iniziali dell'ascesso cerebrale. Si può osservare neutrofilia nel liquor anche per cause non infettive come nelle reazioni a mezzi di contrasto usati in radiologia, in tumori metastatici e in risposta a rachicentesi ripetute.

Linfocitosi con leucocitosi fino a 500/mm³ si osserva nelle meningiti virali. Attenzione perché all'esordio di una meningite o meningoencefalite virale si può avere neutrofilia, seguita poi entro 2-3 giorni dall'aumento dei linfociti. Linfocitosi modeste si riscontrano nella neurosifilide, nella meningite tubercolare e si possono avere nelle patologie autoimmuni del SNC. Le **monocitosi** sono di solito associate all'aumento dei neutrofili o dei linfociti e sono più rilevanti nelle meningiti batteriche cronicizzate e nelle meningiti tubercolare e da miceti, l'aumento è più significativo nella rara meningoencefalite da toxoplasma in seguito a rottura di un ascesso cerebrale. La presenza di **macrofagi** nel liquor può aversi nella meningite tubercolare, in alcune meningiti virali e nelle reazioni da sostanze estranee come mezzi di contrasto radiologici, grasso, etc. Nel primo caso all'esame microscopico si possono osservare anche cellule giganti polinucleate.

Eosinofilia nel LCS può essere dovuta a diversi parassiti e inoltre si può avere in corso di neoplasie, nelle leucemie ad eosinofili, nel morbo di Hodgkin, nei linfomi non Hodgkin, nella meningite luetica, nella meningite tubercolare e anche dopo trattamenti farmacologici in soggetti con danni alla barriera ematoencefalica con ciprofloxacina, ibuprofene, vancomicina intratecale e gentamicina. Una modesta eosinofilia al di sotto del 10% dei leucociti totale può essere normale e non indica necessariamente la presenza delle malattie citate.

Possono essere presenti anche le **plasmacellule** accompagnate dai linfociti in infezioni virali acute e in malattie del sistema immunitario come la sclerosi multipla. Rare plasmacellule possono comparire nel LCS anche nel corso di infezioni intratecali di varia natura e in associazione a varie neoplasie. Il mieloma solo raramente coinvolge le meningi. **Blasti** possono comparire nel LCS in corso di leucemia spesso per ripresa della malattia dopo la chemioterapia. Infine nel LCS si possono talora osservare **cellule tumorali** derivanti da tumori primitivi come il meningioma, il medulloblastoma e l'astrocitoma metastatici o da tumori metastatici, soprattutto gli adenocarcinomi di polmone, mammella, colon ed il melanoma. I linfomi non Hodgkin che coinvolgono le meningi sono solitamente anaplastici ad alto grado di malignità.

Esame Biochimico

Eseguire sempre i dosaggi liquorali di proteine e glucosio.

I dosaggi di biochimica clinica, soprattutto se il liquor non è limpido, vanno eseguiti sul sovrantante del campione centrifugato a 500 g per 10 minuti.

Proteine:

Nel liquor in condizioni normali hanno una concentrazione molto bassa 150-450 mg/L, con valori più elevati nell'anziano, fino a 600 mg/L, e nel neonato, fino a 1700 mg/L. In corso di infezione batterica aumentano a concentrazioni molto superiori a 1000 mg/L, quasi sempre superiori a 2000 mg/L. In corso di infezione virale le proteine liquorali sono solo lievemente aumentate.

L'aumento delle proteine (albumina) è un indice di danno della barriera ematoencefalica, ma in alcuni casi c'è anche una produzione in situ di immunoglobuline. Il liquido cerebrospinale è caratterizzato normalmente da una bassa concentrazione proteica e la barriera ematoencefalica ostacola il passaggio delle proteine plasmatiche. La concentrazione delle singole proteine nel LCS è 1000-2000 volte inferiore rispetto a quella del plasma con l'eccezione dell'albumina e della transferrina (transferrina tau).

Un aumento delle proteine liquorali può dipendere dai seguenti fattori:

- 1.alterazione della barriera ematoencefalica con passaggio nel LCS delle proteine plasmatiche in misura più o meno importante;
- 2.produzione intratecale di immunoglobuline per la presenza di linfociti B o anche per la presenza di batteri nel corso di infezioni;
- 3.ostacolato riassorbimento proteico per la presenza di tumori o ascessi che determinano una aumentata concentrazione delle proteine;
- 4.prelievo traumatico con contaminazione del liquor da parte delle proteine plasmatiche.

Una diminuzione delle **proteine totali** liquorali si può avere invece quando il LCS aumenta di volume come ad esempio nell'idrocefalo ed anche in quelle condizioni in cui aumenta il turnover del LCS come nell'aumentato riassorbimento da parte dei villi aracnoidei nell'ipertensione endocranica e nella perdita cronica di liquor che si ha nell'otoliquorrea e nella rino-liquorrea (riconoscibili per la presenza di proteine caratteristiche come la transferrina tau.).

Il dosaggio delle proteine totali rappresenta l'esame biochimico più importante nel liquor, anche se la sua specificità è bassa perchè si possono avere falsi negativi anche in presenza di patologie neurologiche gravi. L'aumento delle proteine da alterazione della barriera ematoen-

cefalica si può avere per esempio a causa di un'infezione: se il danno è lieve passano molecole piccole; ma se la barriera è gravemente alterata, anche grosse molecole possono passare dal siero al liquor, come ad esempio il fibrinogeno con formazione di coaguli.

Se viene alterato il riassorbimento del liquor, come nel caso di processi espansivi o in ernie discali con il blocco della circolazione liquorale, le proteine totali e soprattutto l'albumina aumentano notevolmente.

Nel caso di LCS ematico a causa di puntura traumatica può essere utilizzata per correggere le proteine una formula analoga a quella vista per correggere i globuli bianchi:

$$TP_{agg} = [TP^{ser} \times (1 - HCT)] \times RBC^{LCS} / RBC^{SP}$$

In presenza di normale concentrazione proteica nel siero tale correzione ammonta a circa 8 mg/dL di proteine per ogni 10000 RBC /mm³. Come per la conta WBC l'approssimazione è valida soltanto se le misurazioni di RBC e proteine sono effettuate dalla stessa provetta e se è accurato il conteggio RBC.

Considerata la specificità delle proteine totali, è importante, dal punto di vista clinico, la determinazione di albumina e IgG contemporaneamente nel liquor e nel siero, in quanto ci permette di calcolare gli indici di funzione di barriera:

Q_{ALB} = rapporto tra albumina siero/ albumina liquor (normale è > 130)
e di sintesi intratecale di IgG:

Q_{IgG} o IgG index = IgG liquor x albumina siero/ albumina liquor x IgG siero
che è < 60 nelle persone normali e ci permette di distinguere la produzione di IgG intratecali dalla aumentata permeabilità della barriera).

In elezione, oltre alla valutazione quantitativa, deve seguire una valutazione qualitativa mediante isoelettrofocusing (IEF) su liquor e siero per la ricerca delle bande oligoclonali presenti in molte malattie infiammatorie demielinizzanti.

Glucosio:

Il **glucosio** è presente nel liquido cerebrospinale con una concentrazione variabile, dipendente dall'assunzione di carboidrati e anche da eventuali alterazioni metaboliche del paziente. È perciò importante determinarne contemporaneamente la concentrazione plasmatica per calcolarne il rapporto liquor/siero che in condizioni normali è di circa 0,60 e può variare in un range di 0,3 e 0,9. Il glucosio passa dal plasma al liquor attraverso un meccanismo di diffusione facilitata che richiede alcune ore per raggiungere l'equilibrio. Nelle meningiti batteriche la concentrazione di glucosio è generalmente ridotta a valori intorno a 40 mg/dL o al di sotto del 60% del corrispettivo livello ematico; nelle meningiti virali il glucosio è più spesso normale, in ogni caso un glucosio normale non esclude la diagnosi di meningite batterica.

L'**ipoglicorrachia** viene considerato un segno di infezione intratecale batterica, virale, tubercolare o parassitaria. Nel caso di meningiti batteriche la riduzione del glucosio liquorale è molto più intensa che in quelle virali perché i batteri e i leucociti utilizzano il glucosio attraverso il metabolismo anaerobio e sembra anche possibile un'alterazione del meccanismo di trasporto attivo del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica.

Altri esami che possono essere utili

Lattato:

Per l'aumento della glicolisi anaerobia nel corso di infezioni batteriche aumenta la produzione di acido lattico. L'acido lattico, prodotto finale del metabolismo anaerobio, aumenta però in ogni situazione che si associa ad ipossia tissutale del sistema nervoso: nelle infezioni, nell'ischemia, nell'emorragia e nell'infarto cerebrale, nelle lesioni traumatiche, nell'idrocefalo, nell'ipertensione endocranica, nelle neoplasie intracraniche primitive e metastatiche. Il lattato aumenta di più nelle meningiti batteriche, tubercolari e fungine rispetto a quelle virali. Un valore al di sopra di 36 mg/dL indica con una sensibilità di oltre 80% la presenza di un'infezione batterica.

Elettroliti: non ci sono indicazioni cliniche per il dosaggio degli elettroliti nel LCS ad eccezione dei **cloruri** che aumentano in corso di meningite tubercolare.

Esame Microbiologico

La diagnostica microbiologica del liquor riveste sempre carattere di urgenza, per cui le diverse procedure necessarie ad ottenere una diagnosi eziologica devono essere immediatamente messe in atto. Lunghi tempi di trasporto, variazioni di temperatura o procedure di refrigerazione ostacolano la vitalità di molti dei germi responsabili di meningiti e rendono ragione della necessità di processare immediatamente i campioni di liquor.

Notizie di carattere clinico e soprattutto di terapie antibiotiche intercorrenti possono essere decisive ai fini dell'orientamento diagnostico e di eventuali indagini di approfondimento.

La quantità di campione necessaria per l'esecuzione degli esami microbiologici è di almeno 1 ml.

I microrganismi in grado di causare meningite sono diversi, ma nella pratica clinica la maggior parte delle infezioni è sostenuta da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae*.

E' importante, ai fini della diagnosi eziologica e delle procedure da attuare, considerare anche altri fattori, quali:

- ➔ l'età, per maggiori possibilità di infezioni sostenute da *Streptococcus agalactiae* o *Listeria monocytogenes* nella fascia neonatale, da *Neisseria meningitidis* nell'età pediatrica e adolescenziale e da *Streptococcus pneumoniae* o batteri Gram negativi nella fascia di età dall'adulto all'anziano;
- ➔ la provenienza del paziente da ambienti comunitari o lo sviluppo dell'infezione in ambienti di cura;
- ➔ lo stato immunitario del paziente, la presenza di patologie concomitanti e la storia clinica, fattori tutti che potrebbero orientare la ricerca verso agenti meno comuni, in generale, ma più probabili in queste circostanze quali miceti, micobatteri, treponemi o parassiti.

Le possibilità di identificare l'agente responsabile aumentano concentrando il campione di liquor tramite centrifugazione, per almeno 10 minuti a 1500-2500 rpm, soprattutto se si dispone di piccoli volumi.

Esame microscopico

L'esame microscopico, con colorazione di Gram, deve essere allestito sempre nel sospetto di un'infezione batterica, confortato oltre che dal quesito diagnostico anche dai dati degli esami chimico-fisici e citomorfologici.

Questa indagine, relativamente semplice e rapida, è in grado di fornire decisive indicazioni ai fini terapeutici ed epidemiologici, il risultato deve essere quindi sempre e immediatamente comunicato al clinico specificando la presenza, il numero e la morfologia di eventuali microrganismi. Può essere conveniente affiancare al gram la colorazione all'arancio acridina, indicata proprio nello screening di campioni sterili come il liquor, perché rende più visibili i batteri anche se in bassa concentrazione o coperti da un numero elevato di globuli bianchi. Nel dubbio di meningite tubercolare può essere utile allestire vetrini per colorazioni specifiche quali Ziehl-Nielsen e Auramina-fenolo Colorazioni a fresco o all'inchiostro di china devono essere riservate alla conferma di specifiche patologie parassitarie e fungine da indicare sempre nel quesito diagnostico.

Allestimento delle colture

Il protocollo standard minimo per la coltura batterica del liquor prevede di seminare per la ricerca di tutti i microrganismi :

➤ Agar cioccolato

➤ Agar sangue

entrambi in atmosfera di CO₂ al 5-10 % e incubazione a 35- 37°C

in aggiunta, se disponibile, un volume di liquor (*minimo 1mL*) può essere inoculato rispettivamente in:

➤ flacone da emocoltura per aerobi (*come arricchimento*);

➤ flacone da emocoltura per anaerobi e terreno Schaedler in anaerobiosi (*solo nel sospetto di ascesso cerebrale*);

➤ agar Sabouraud incubato a 35-37 °C (*nel paziente immunodepresso*)

Metodi rapidi per la determinazione degli Antigeni batterici - test aggiuntivi

Antigeni batterici

Il 75-90% delle colture liquorali positive trovano conferma nella colorazione di Gram, le percentuali diminuiscono tra il 40 e il 60% nei pazienti che hanno ricevuto terapia antibiotica prima della puntura lombare.

I test di agglutinazione al lattice permettono la determinazione rapida e diretta degli antigeni batterici solubili e possono fornire risultati positivi anche quando coltura e colorazione di Gram sono negative.

I più comuni patogeni per i quali sono disponibili test rapidi per la determinazione degli antigeni, sono:

■ Haemophilus influenzae di tipo b

■ Streptococco pneumoniae

■ Streptococco gruppo B (agalactiae)

■ Neisseria meningitidis, sierogruppi A, C B/E.Coli K1, Y, W135

E' possibile la ricerca sempre con test rapidi al lattice degli antigeni di *Criptococcus neoformans* su specifico quesito.

Par Test

Se sussiste il sospetto che sia già in atto una terapia antibiotica, nell'ottica della riduzione del rischio clinico e dell'efficacia diagnostica può essere utile effettuare il Par-test che conferma la presenza di antibiotici nel liquor e giustifica l'eventuale negatività della coltura e dei test aggiuntivi.

Vdrl/Rpr

Nella diagnosi di neurosifilide, sulla base di un sospetto diagnostico, in campioni non contaminati da sangue, la positività liquorale dei test non treponemici VDRL o RPR è la più diretta evidenza di infezione luetica. L'iter diagnostico deve essere completato successivamente con ricerche anticorpali su liquor e siero e IgG/IgM index.

Emocoltura

L'effettuazione contemporanea di emocolture può aumentare le possibilità diagnostiche soprattutto nei pazienti già trattati con terapia antibiotica.

Indagini molecolari

Le indagini molecolari, soprattutto con metodica Real-time, hanno trovato larghe applicazioni nella diagnosi di meningiti batteriche e virali. Queste metodiche, utili nel rilevare rapidamente ed accuratamente la presenza di microrganismi nei materiali biologici, presentano molti vantaggi in termini di sensibilità, rapidità, impiego di volumi ridotti di campione, possibilità di pannelli dedicati per apparato neurologico, tipizzazione e risultati quantitativi. L'utilizzo della molecolare può rivelarsi inoltre decisivo nelle forme trattate con terapia antibiotica, nelle quali le indagini microbiologiche forniscono risultati forzatamente negativi.

Quando non è possibile effettuare tali indagini nel proprio laboratorio, è consigliabile riservare un'aliquota (1 ml) del campione di liquor, che in questo caso può essere refrigerato, per test di diagnostica molecolare da effettuarsi presso un Centro di Riferimento.

Conservazione per ulteriori indagini

La finalità della conservazione è quella dello svolgimento di indagini successive utili al completamento diagnostico.

Tutte le procedure di aliquotazione del LCS vanno svolte in cappa a flusso laminare. Sul liquor e contemporaneamente su siero, si possono successivamente effettuare valutazioni comparative di livelli anticorpali nei confronti di virus o batteri neurotropi (lue, borreliosi)

Riferimenti bibliografici

1. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Saunders Elsevier, Philadelphia, 21st ed, 2006
2. Ravel R. Clinical Laboratory Medicine: Clinical Applications of Laboratory Data. Mosby, St Louis, 6th ed, 1995
3. Nespolo A., Aguzzi F., Cerrato d., et al.: Le proteine del liquor e l'elettroforesi delle proteine liquorali. Raccomandazione ufficiale della Commissione Sibioc 05. Giorn. It. Chim. Clin., 15, 73-80, 1990
4. Richard S., Miossee V., Moreau J.F., Taupin J.L.: Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. Clin. Chem., 48, 1670-173, 2002
5. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Frey H, Skoog I, Svennertholm L. Formulas for the quantitation of intrathecal Ig G production. Their validity in the presence of blood-brain barrier damage and their utility in multiple sclerosis. J Neurol Sci, 1994, 121: 90-96
6. Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis: Comparison of various formulae with the "gold standard" of isoelectric focusing. J Neurol Sci, 1991, 102 : 11-16
7. BSOP 27 –NHS Investigation of Cerebrospinal Fluid <http://www.hpa-standardmethods.org.uk>
8. BSOPTP 39 –NHS Staining procedures <http://www.hpa-standardmethods.org.uk>
9. BSOP 40 - Investigation of specimens for Mycobacterium species <http://www.hpa-standardmethods.org.uk>
10. BSOP 31 - Investigation of specimens other than blood for parasites. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk>
11. Manuale Tecnico per la diagnosi microbiologica della Tuberculosis www.Ministerodellasalute.It/./C17_Pubblicazioni_614_Allegato.Pdf
12. BT Goth PC van Voorst Vader European guideline for the management of syphilis UK 2008.

METODI PIÙ UTILIZZATI

Metodi di conta al Microscopio Ottico

Riempire per capillarità lo spazio fra il coprioggetto e la camera di conta con il reticolo e contare gli eritrociti e soprattutto i leucociti (cellule di forma sferica rifrangenti con il variare della regolazione del fuoco del microscopio).

Particelle per μL = Particelle contate / Superficie contata (mm^2) \cdot Profondità camera (mm) \cdot Diluizione

Esempio: eritrociti

1. Particelle conteggiate: 528

2. Superficie contata: 5 gruppi quadrati, equivalenti a $0,2 \text{ mm}^2$

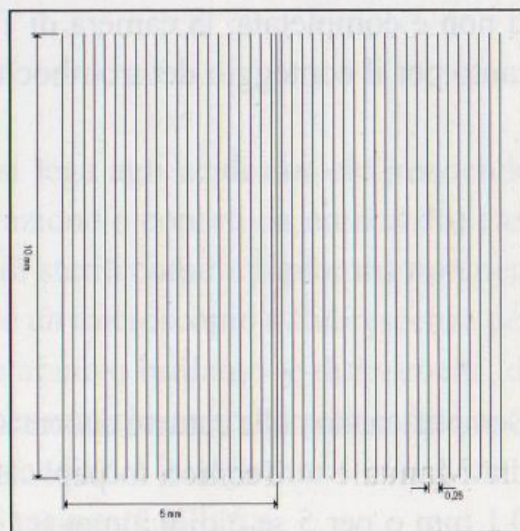
3. Profondità camera: $0,1 \text{ mm}$

4. Diluizione: 1:200

$$528 \cdot 200 / 0,2 \cdot 0,1 \cdot 1$$

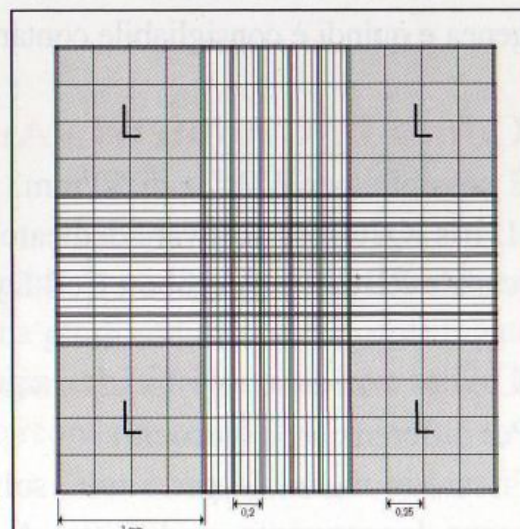
$$= 5,28 \cdot 10^6 \text{ eri/}\mu\text{L sangue} = 5.280.000 \text{ eri/}\mu\text{L sangue}$$

Nelle camere di conta tipo **Nageotte** la profondità della camera è di $0,5 \text{ mm}$. L'area quadrata di 100 mm^2 è suddivisa in 40 rettangoli ciascuno con un'area di $2,5 \text{ mm}^2$: fare la media delle cellule contenute in ogni rettangolo da $2,50 \text{ mm}$.



La camera di **Neubauer** è il modello più utilizzato. La profondità è di $0,1 \text{ mm}$. Il reticolo mostra 9 larghi quadrati ciascuno di 1 mm^2 .

I 4 larghi quadrati agli angoli (indicati da una "L") sono suddivisi in altri 16 quadrati, con lati da $0,25 \text{ mm}$. Sono utilizzati per il conteggio dei leucociti. Il largo quadrato centrale è suddiviso in 25 quadrati con lati da $0,2 \text{ mm}$. Ogni gruppo di quadrati contiene 16 mini quadrati con lati da $0,5 \text{ mm}$ ognuno con un'area di $0,0025 \text{ mm}^2$. I 25 quadrati nell'area centrale sono usati per il conteggio di trombociti ed eritrociti. La linea centrale di delimitazione



è la linea limite che determina se le cellule nell'area marginale devono essere incluse o escluse dal conteggio.

Colorazioni per Micobatteri : Auramina- fenolo e Ziehl – Neelsen

La colorazione **Auramina-fenolo** utilizza un fluorocromo che si lega agli acidi micolici della parete dei micobatteri, è più sensibile della Ziehl-Neelsen e più idonea alla colorazione di strisci da materiali clinici. I micobatteri osservati a 100X appaiono fluorescenti in giallo contro lo sfondo scuro. E' possibile ricolorare con carbolfucsina il preparato già colorato con auramina. La colorazione **Ziehl – Neelsen** si basa sulla proprietà dei Micobatteri, definita acido-alcool resistenza, una volta colorati di resistere alla decolorazione con alcool-acido. All'osservazione microscopica i bacilli acido-resistenti appariranno di colore rosso su uno sfondo blu. Il tempo di centrifugazione del liquor (almeno 1 ml) deve essere protratto a 15-20' a 2000-2500 g .

Preparazione del vetrino

- *Strisciare una goccia di sedimento su un vetrino e lasciare asciugare all'aria, ripetere l'operazione sovrapponendo una goccia alla precedente per tre volte*
- *Fissare alla fiamma o su una piastra riscaldata (65-75 °C) per 2 h o in metanolo assoluto per 1'*

1.Colorazione Auramina-fenolo

- *Coprire il vetrino con auramina 15' sciacquare con acqua*
- *Decolorare con acido-alcol per 2' sciacquare con acqua*
- *Colorare con permanganato di potassio per 2' sciacquare con acqua*
- *Asciugare all'aria ed osservare al microscopio a fluorescenza entro 24 h*

2.Colorazione Ziehl – Neelsen

- *Coprire il vetrino con fucsina fenicata far evaporare riscaldandolo delicatamente alla fiamma per 3-5', sciacquare con acqua*
- *Decolorare con alcool –acido fino alla scomparsa del colorante (2'-3'), sciacquare con acqua*
- *Controcolorare con blu di metilene o verde malachite per 30", sciacquare con acqua*
- *Lasciare asciugare all'aria e osservare al M.O.*






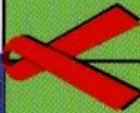

Test al lattice per la ricerca diretta di Antigeni batterici e fungini

Gli antigeni batterici presenti nel campione di liquor possono essere identificati per mezzo di particelle di lattice ricoperte con anticorpi specifici. La reazione positiva viene evidenziata da una agglutinazione visibile.

La procedura è la seguente:

- *Riscaldare il campione a 100 °C per 3' in incubatore a secco o a bagno-maria*
- *Lasciar raffreddare e centrifugare per 5'a 1500 g*
- *Procedere alla agglutinazione con antisieri mettendo una gtt di sovrantante sulla cartina di agglutinazione e aggiungendo gli antisieri specifici*
- *Ruotare la cartina per 10' osservare la comparsa di agglutinazione visibile*

Con lo stesso principio può essere eseguita la ricerca di Antigene capsulare di Criptococco neoformans con un pretrattamento del campione a 56 °C per 30'.

Aree di criticità		patogeni	
Neonati		Streptococchi gruppo B, <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocitogenes</i> , <i>Klebsiella</i> spp. ed altri Enterobatteri	
Età <2 mesi		Streptococchi gruppo B, <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocitogenes</i>	
Età <10 anni			<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B, <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Adulti		<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	
Anziani		<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Bacilli gram-negativi, <i>Listeria monocitogenes</i>	
Pazienti con AIDS e immunodepressi		 <i>Cryptococcus neoformans</i> (fare richiesta specifica)	
Meningiti o ascessi endocranici associati a traumi, neurochirurgia o corpi estranei endocranici		Stafilococchi aurei e non aurei, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , Batteri anaerobi gram-positivi e gram-negativi, <i>Pseudomonas</i> spp. ed altri non fermentanti	
Ascessi intracranici non associati a traumi			Streptococchi anaerobi o microaerofili, Batteri anaerobi gram-negativi (spesso flora mista aerobia e anaerobia proveniente dalle alte vie respiratorie)

DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE MENINGITI

	NORMALE	MENINGITE BATTERICA	MENINGITE VIRALE	MENINGITE DA MICETI
PRESSIONE INTRA CAVITARIA	In decubito laterale: 10 – 20 cm H₂O Seduto: 20 – 40 cm H₂O	Molto elevata di solito > 300 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O
ESAME MACROSCOPICO				
aspetto	Limpido, acqua di Sorgente, privo di precipitati e coaguli (assenza di fibrina)	Da sub limpido a torbido	Limpido o sublimpido	Da limpido a torbido
Aspetto dopo centrifugazione (10' a 1500 rpm)	Immodificato	Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento
colore	Incolore	Da Incolore a grigiastro	incolore	Da Incolore a grigiastro, a volte xantocromico
ESAME CITOMETRICO				
Conteggio dei leucociti	≤ 10 mmc: Neonati ≤ 30 mmc	Aumentati: di solito ≥ 1000 mmc	Aumentati: di solito < 1000 mmc	Aumentati: di solito < 500 mmc
PMN neutrofili	$< 10 \%$	In prevalenza neutrofili (nel 10% linfocitosi) PMN > 80%	In prevalenza linfociti (fasi precoci con lieve neutrofilia) PMN < 50%	In prevalenza linfociti PMN < 50%
ESAME BIOCHIMICO				
Proteine	15-45 mg/dl Anziani 15-60 Neonati 15-170	Aumentate di solito > 200 mg/dl	Normali o aumentate di solito < 200 mg/dl	Aumentate di solito > 200 mg/dl
Albumina	<35 mg/dl			
Glucosio	40-70 mg/dl (più alto nel DM) ~ 60 % dei livelli plasmatici	di solito ≤ 40 mg/dl	Come nel normale	di solito diminuito <40 mg/dl
Rapporto Glucosio Liquor Serico	$\geq 0,6$	di solito molto diminuito $\leq 0,4$	di solito normale	di solito diminuito
Lattato	< 25 mg/dl $< 2,8$ mmol/L	> 3,3 mmol/L	$< 2,8$ mmol/L	
ESAME MICRO BIOLOGICO				
Esame colturale		Colorazione di Gram o Aran-cio acridina: Specificare Presenza, numero, morfologia di ev. microrganismi		Presenza di miceti
Esame microscopico	Sterile		sterile	Inchiostro di china
Test Rapidi		Ag batterici		AG Criptococco neoformans

MENINGITE TUBERCOLARE	EMORRAGIA SUB ARACNOIDEA	MENINGITE NEOPLASTICA	MENINGITE LUETICA	MENINGITE AMEBICA
Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O	Normale o aumentata di solito < 200 mmH₂O
ESAME MACROSCOPICO				
In genere limpido o sublimpido, se in fase iniziale dopo alcune ore reticolo di Mya	Da sub limpido a torbido	Da limpido a sublimpido	Limpido o sublimpido	Da sublimpido a torbido
Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento	Sovranatante limpido con sedimento
Da Incolore a grigiastro	eritrocromico o xantocromico	variabile	Da Incolore a grigiastro	Da Incolore a grigiastro,
ESAME	CITOMETRICO			
Aumentati: di solito < 1000 mmc	lievemente aumentati	Aumentati: di solito ≥ 500 mmc	Aumentati: di solito < 1000 mmc	Aumentati: di solito < 1000 mmc
In prevalenza linfociti PMN < 50%	Come nel sangue periferico	Prevalentemen- te linfociti, monociti e cellule tumorali PMN < 50 %	In prevalenza linfociti (in fasi precoci a v. neutrofilia) PMN < 50 %	In prevalenza neutrofili (nel 10% è presente linfocitosi) PMN > 80 %
ESAME	BIOCHIMICO			
Aumentate di solito > 200 mg/dl	Aumentate di solito > 200 mg/dl	Aumentate di solito > 200 mg/dl	Normali o aumentate di solito < 100 mg/dl	Aumentate di solito > 200 mg/dl
di solito diminuito < 40 mg/dl		di solito ≤ 40 mg/dl	Come nel normale	di solito diminuito < 40 mg/dl
di solito diminuito	aumentato > 60% dei livelli plasmatici		di solito normale	di solito diminuito
	aumentato	aumentato	< 2,8 mmol/L	
ESAME MICRO	BIOLOGICO			
Colorazione A uramina e Ziehl – Neelsen Presenza di bacilli fluorescenti o acido-alcool resistenti	Sterile	Sterile	VDRL	Colorazione a “fresco” Presenza di trofozoiti

