

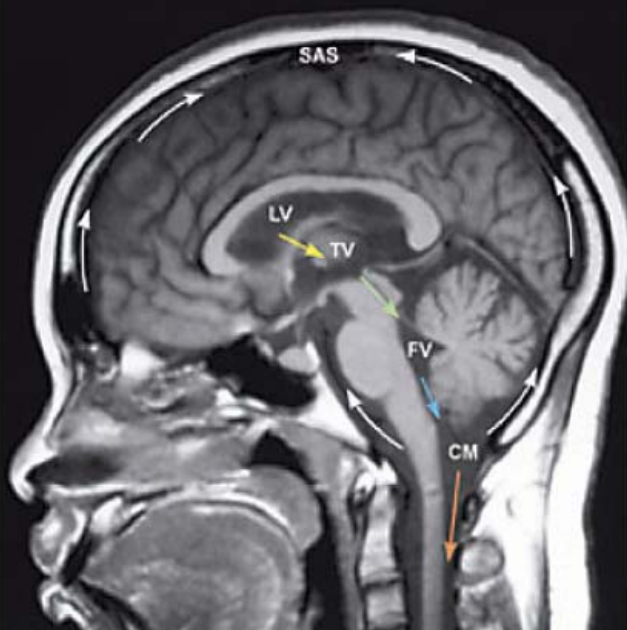
ESAMI DI LABORATORIO IN NEUROLOGIA

www.fisiokinesiterapia.biz

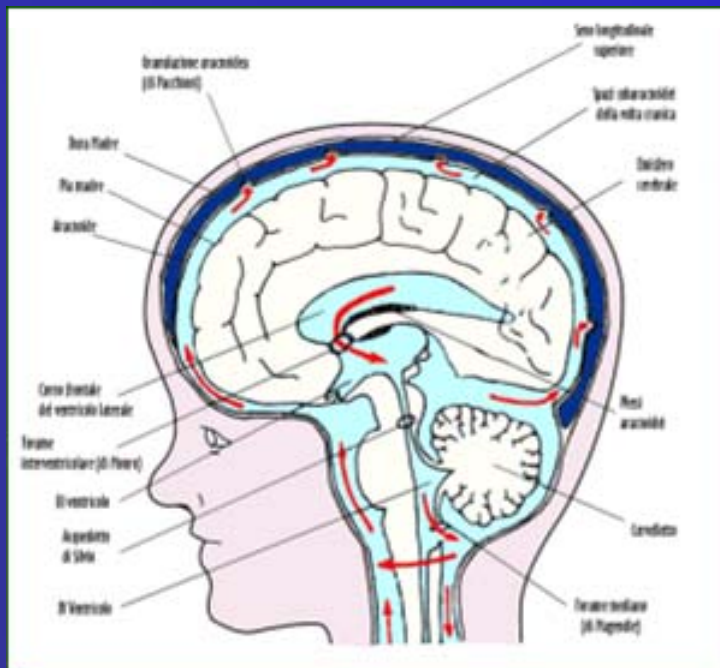
www.fisiokinesiterapia.biz

Esame del liquor

Liquor e Circolazione liquorale



- Fluido trasparente (70-160 ml) che permea il SNC, lo mantiene in sospensione, proteggendolo, nutrendolo e contribuendo alla regolazione della pressione intracranica
- Viene prodotto a partire dal plasma (plesso coroideo) . Produzione 500 ml/die.
- Circola attraverso i ventricoli encefalici fino a passare nello spazio subaracnoideo attraverso le aperture laterali del quarto ventricolo
- Da qui filtra tra la pia madre e l'aracnoide dell'encefalo e del midollo spinale
- Fluisce principalmente in direzione caudale, riassorbito dai villi aracnoidali dei seni venosi e delle vene cerebrali

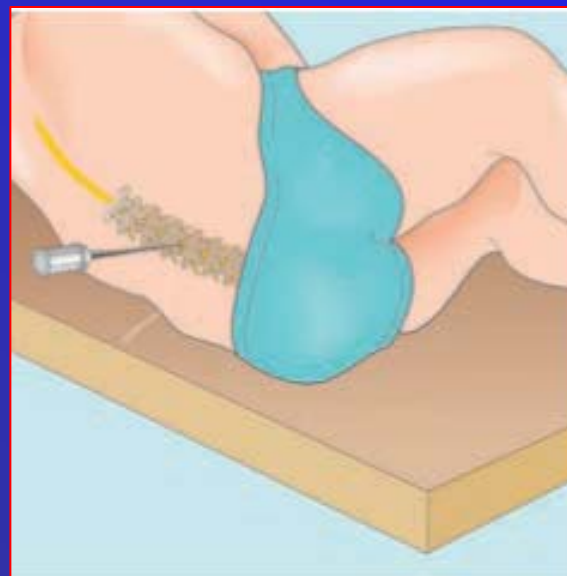
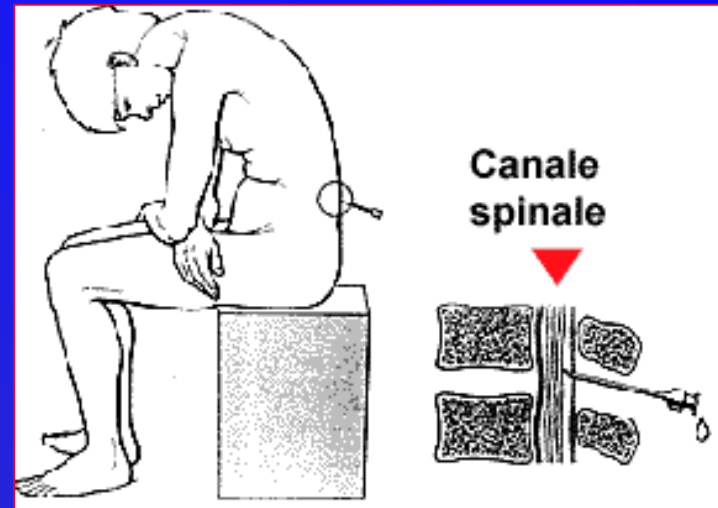
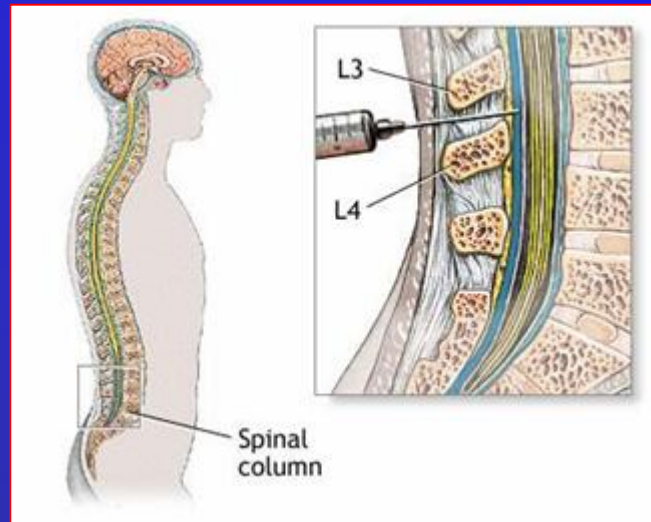


Esame del liquor: indicazioni

- - infezioni del SNC (meningiti, encefaliti)
- - malattie infiammatorie del SNC (vasculiti, malattie demielinizzanti)
- - malattie infiammatorie radicolari
- - emorragie subaracnoidee
- - tumori maligni delle meningi
- - altre condizioni (malattie metaboliche del SNC, malattie neurodegenerative, encefalopatie spongiformi, etc)

Puntura lombare

- - controindicazioni: processi espansivi intracranici, con ipertensione endocranica e rischio di erniazione
- - complicazioni:
 - cefalea
 - sanguinamento subaracnoideo
 - algie lombari
 - sindrome radicolare



- **L. normale: limpido incolore**
- **Aumento cellule: torpido – rosso**
- **Aumento proteine: xantocromico**

La composizione del liquor

<i>liquor</i>	<i>analita</i>	<i>sangue</i>	<i>rapporto l/s</i>
-	GR / μ l	5.000.000	
< 5	GB / μ l	5.000	
60	Glucosio mg/dl	90	2 / 3 *
15-50	Proteine mg/dl	6500– 8400	1 / 200

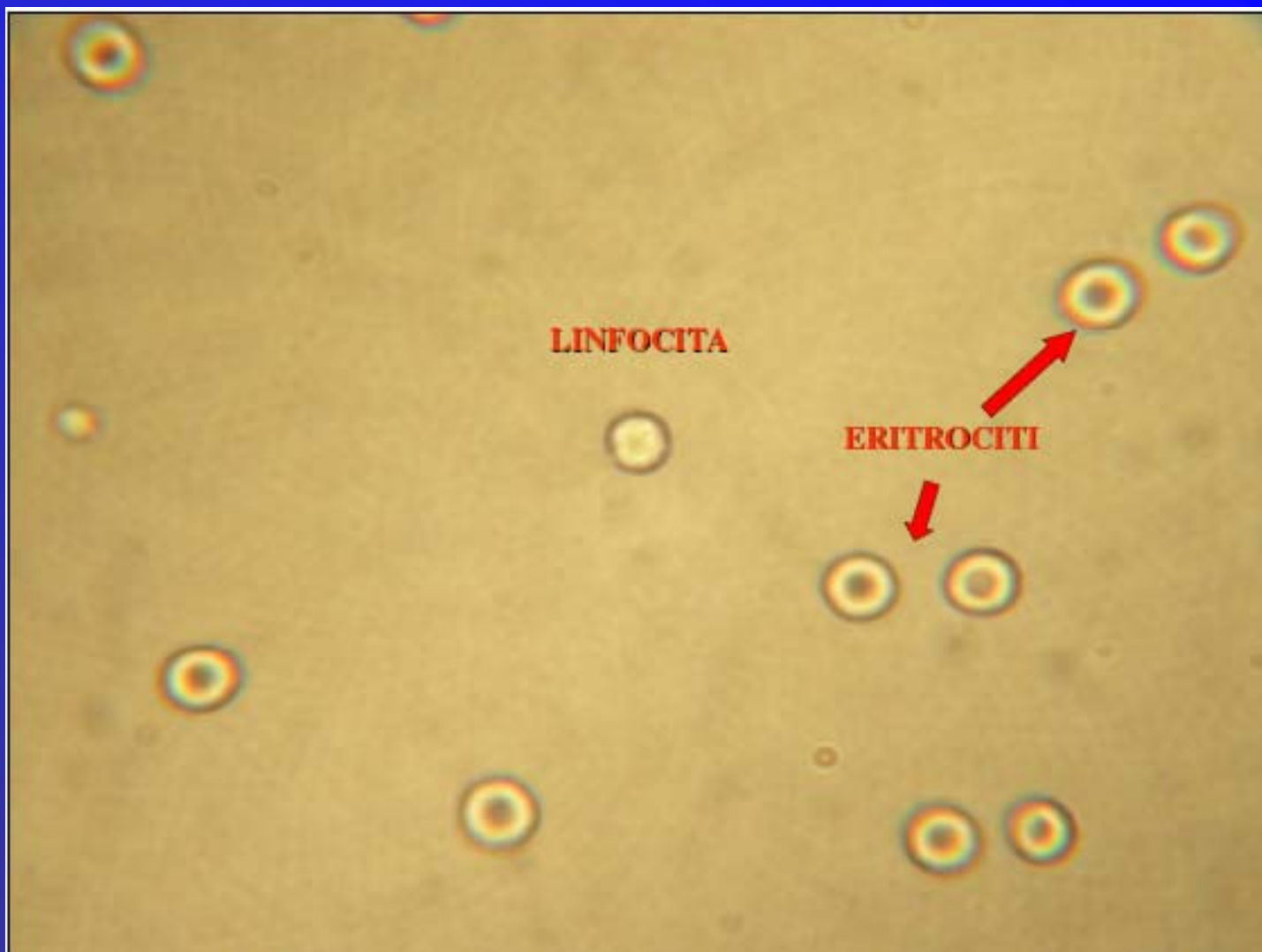
** a digiuno*

Pressione liquorale

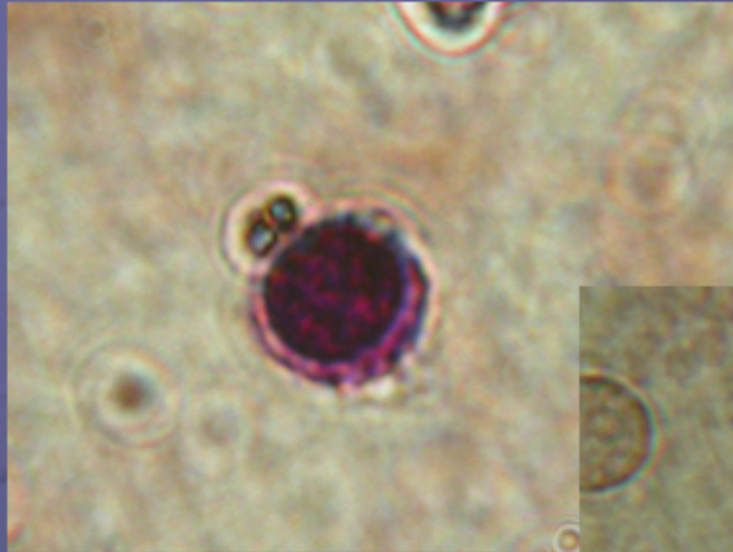
- decubito laterale: 50-200 mm Hg
- bassa pressione: precedente PL, disidratazione, blocco spinale subaracnoideo, fistole liquorali
- elevata pressione: edema cerebrale, processi espansivi intracranici, ipertensione endocranica benigna - pseudotumor cerebri

Cellule liquorali

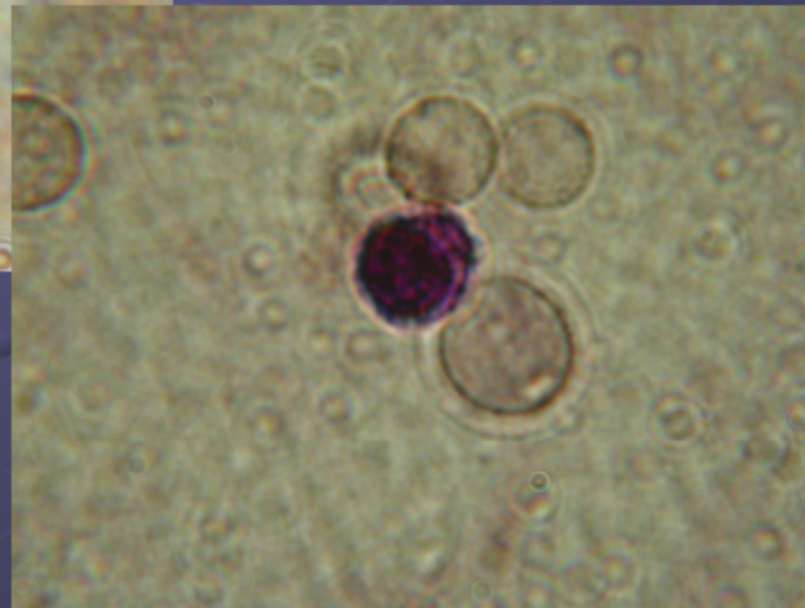
- Provenienza ematica (BEE)
- Vn: $< 5/\text{mm}^3$ (linfociti o mononucleate)
- - pleiocitosi se:
 - processi infiammatori (SNC e radici)
 - sanguinamento subaracnoideo
 - vasculiti cerebrali
 - demielinizzazione acuta
 - tumori cerebrali



Testsimplets ® (1)

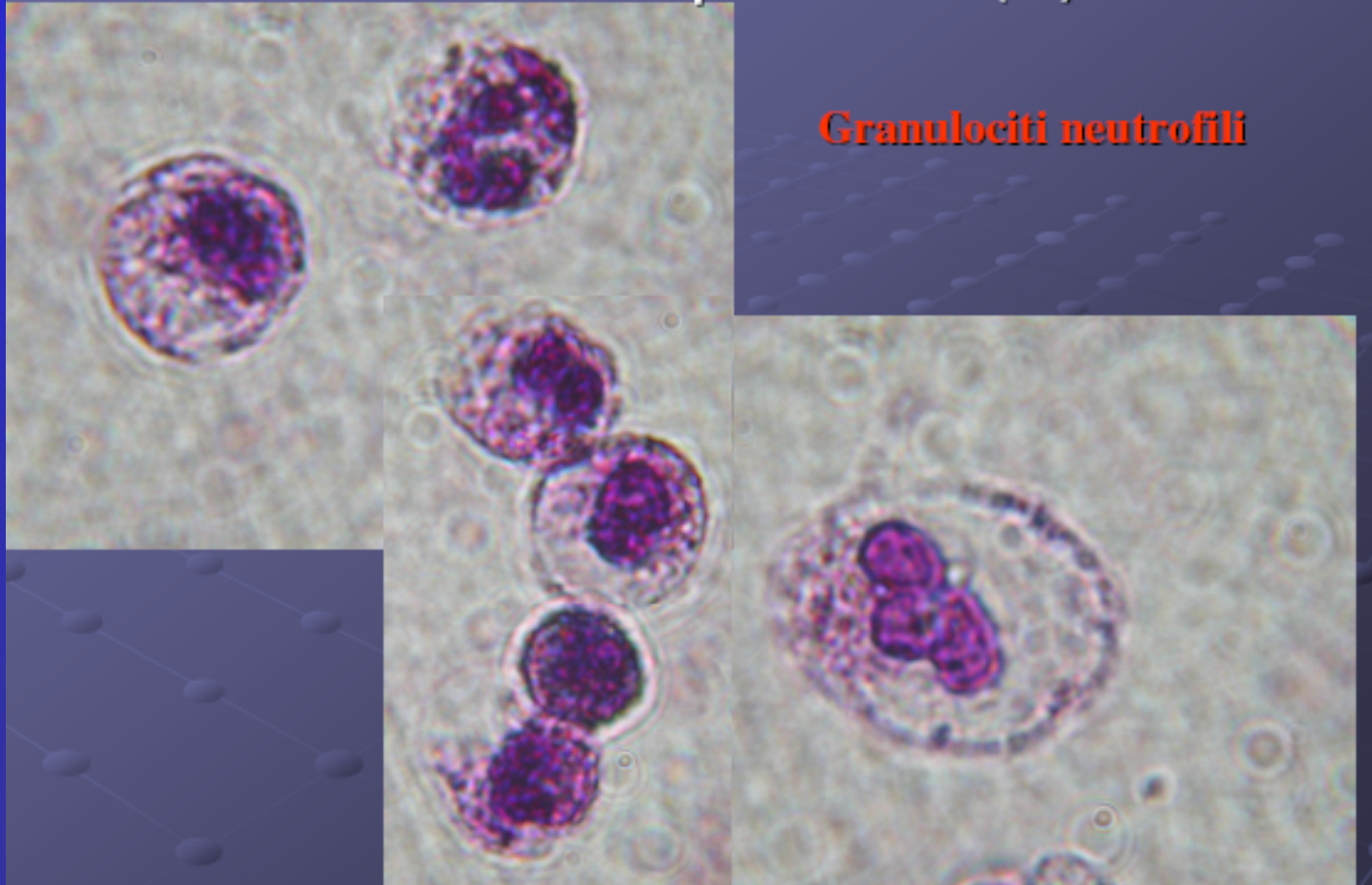


Linfociti



Testsimplets ® (2)

Granulociti neutrofili

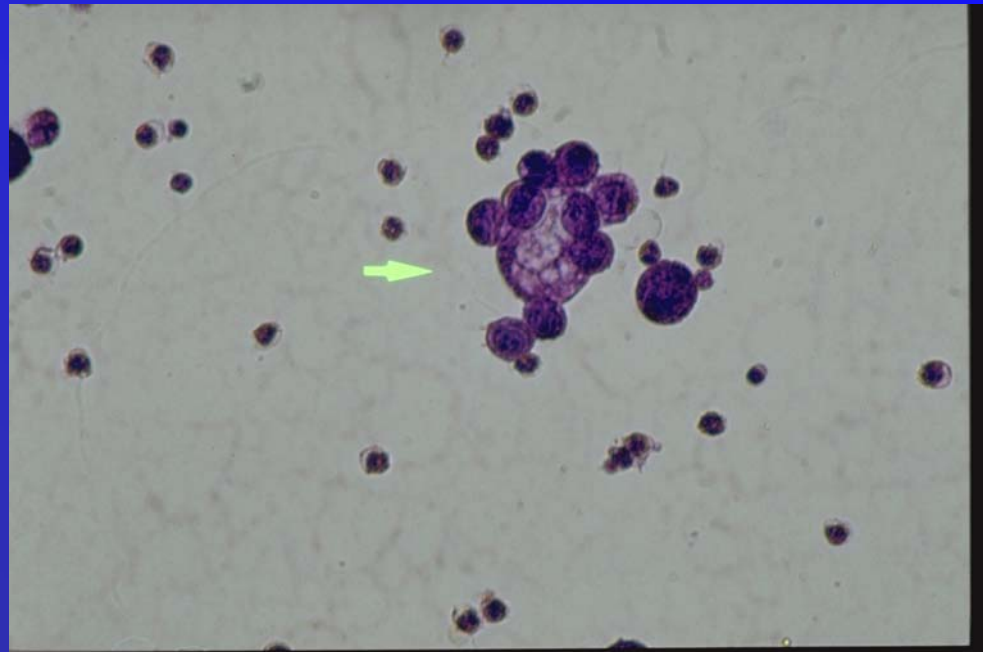
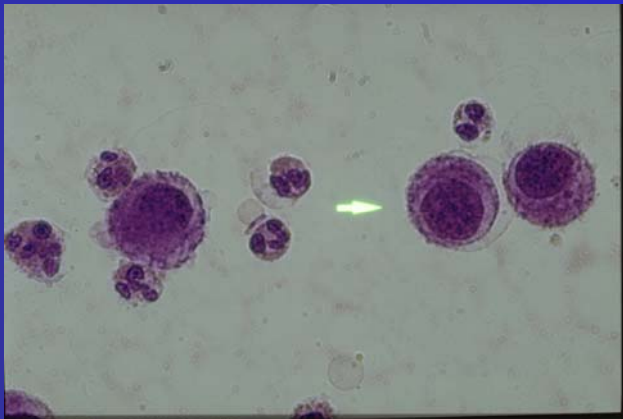
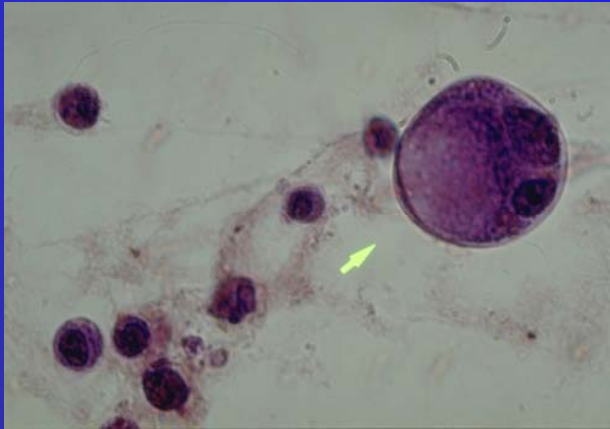


Testsimplets ® (3)



Reperti “atipici”

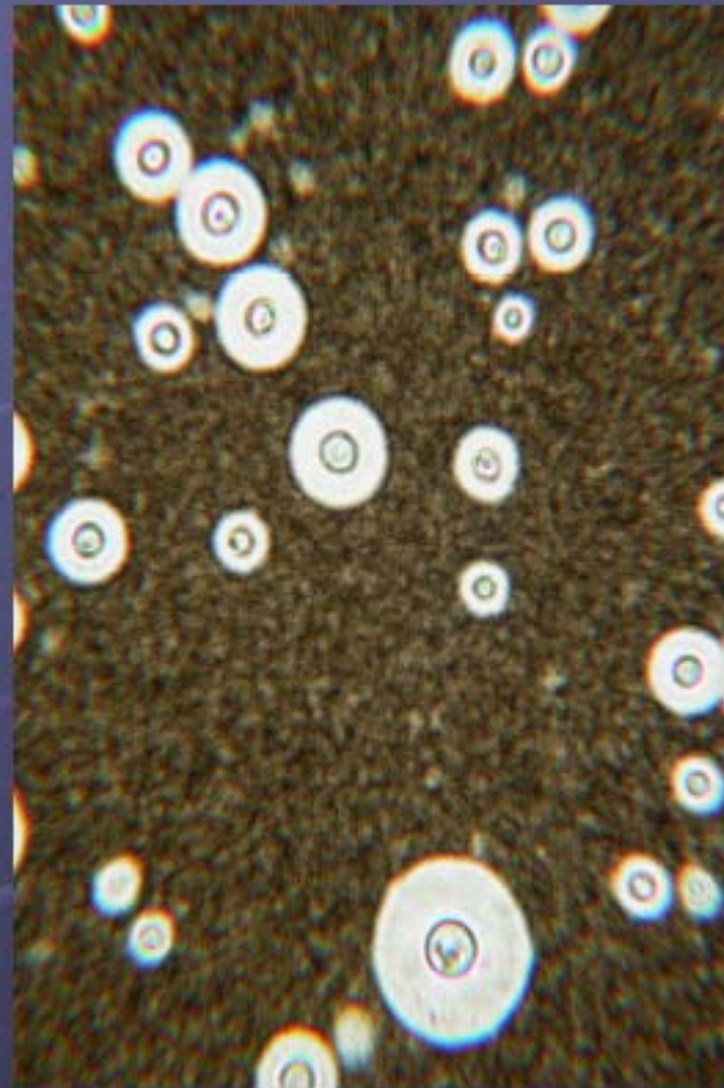
Sedimento risospeso in
fisiologica posto su
vetrino precolorato



Cellule con caratteri di atipia

Criptococchi:

- **Forma caratteristica a doppia membrana**
- **Non assorbono l'inchiostro di china**
- **Dimensioni variabili**
- **Facilmente confondibili, a fresco, con eritrociti**



Cellule liquorali

- “inquinamento ematico”
- correzione valore GB
 - emocromo normale: $G_{\text{tot}} - (1GB \times 1000GR)$
 - emocromo anormale:
 - $GB = \frac{GB_{\text{sangue}} \times GR_{\text{liquor}}}{GR_{\text{sangue}}} \times 100$

Contenuto ematico nel liquor

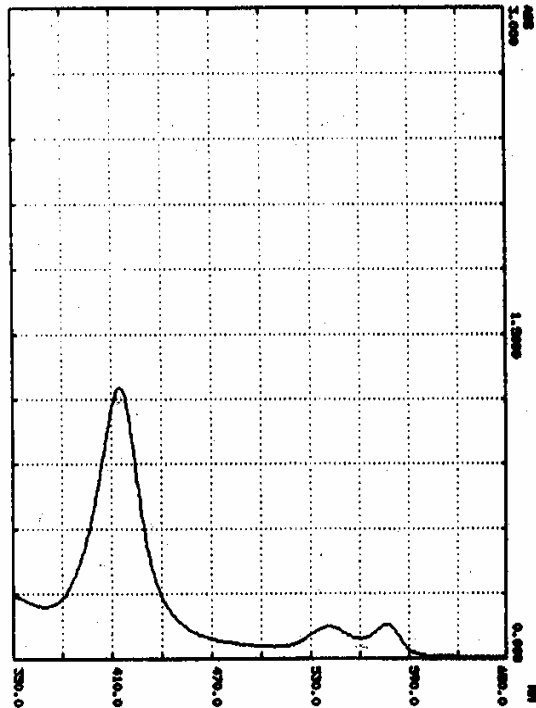
- - test delle 3 provette (+ conta cellulare): sanguinamento subaracnoideo uniformemente distribuito nelle 3 provette
- - se emorragia primitiva
 - Sanguinamento uniformemente presente nelle 3 provette
 - La centrifugazione lascia un supernatante xantocromico (pigmenti)
- - ESA acuta: supernatante chiaro 2-4 ore

Pigmenti liquorali

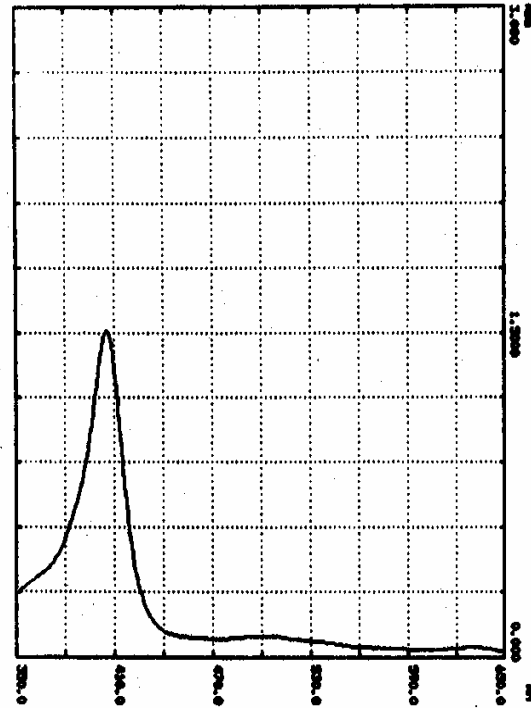
- L. xantocromico o sospetto di ESA
- Ossiemoglobina (lisi GR): da 2 ore dopo ESA, picco dopo 36, scompare 7-10 gg
- Bilirubina (cellule leptomeningee su Hb): da 10 ore dopo ESA, picco 48 ore e persistere fino a 2-4 settimane

Esame dei pigmenti

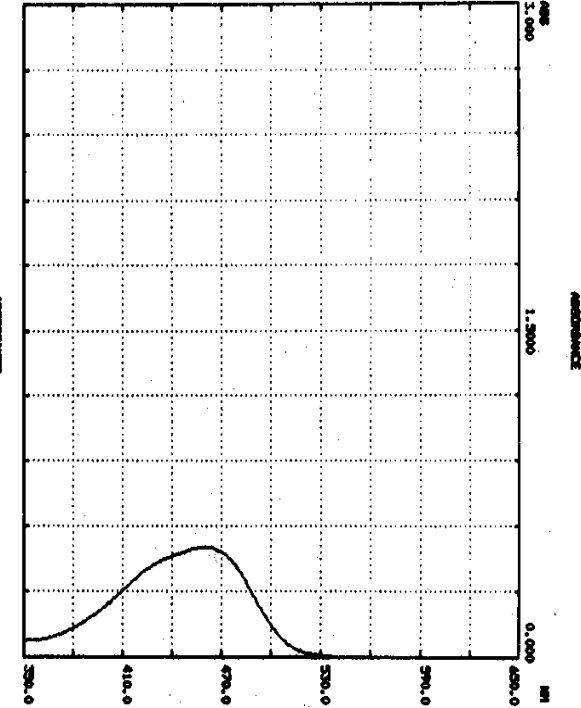
Ossiemoglobina: Picco maggiore > 410nm; picchi secondari tra 530 e 590 nm.



Metaemoglobina: Picco primario < 410 nm; lievi assorbimenti tra 470 e 530 ed oltre 620nm.



Bilirubina: Assorbimento tra 400 e 530 nm con punta massima attorno a 470 nm



Scansione spettrofotometrica del campione tra 350 e 650 nm. Curve standard

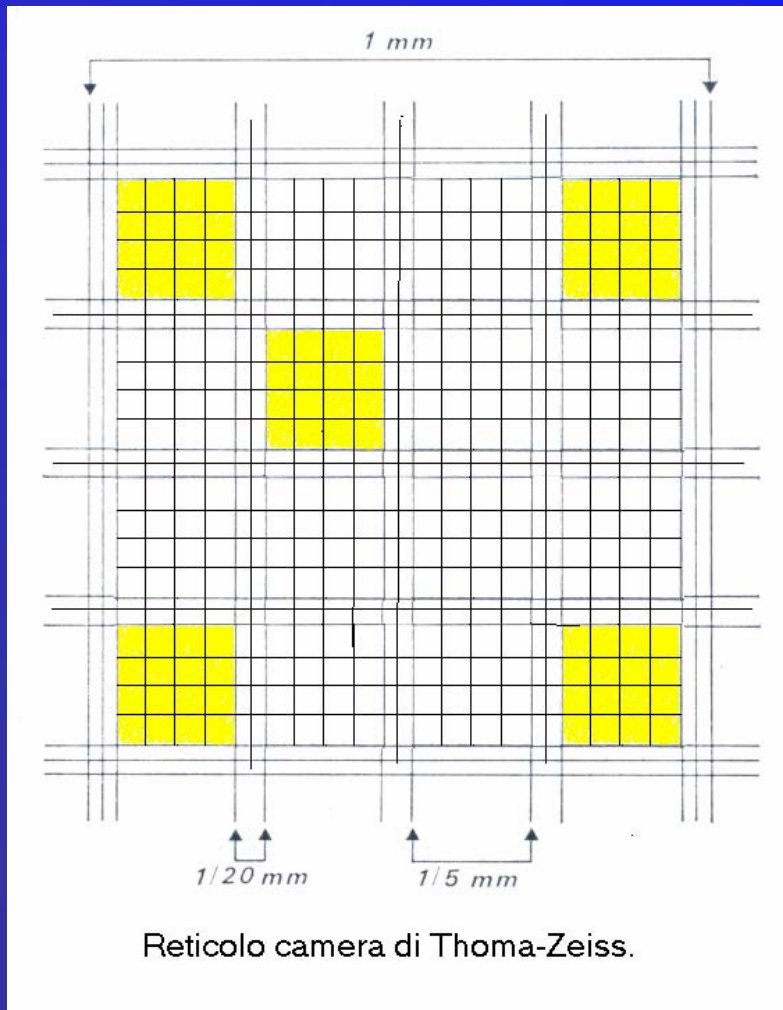
Proteine totali

- Vn: 15-50 mg/dl
- - aumento:
 - > permeabilità cellule endoteliali
 - se > 150 mg/dl: xantocromia
 - correzione inquinamento ematico
 - (-1mgx1000 gr)
 - processi infiammatori, blocco spinale (ma anche condizioni neoplastiche, sanguinamenti)

Immunoglobuline

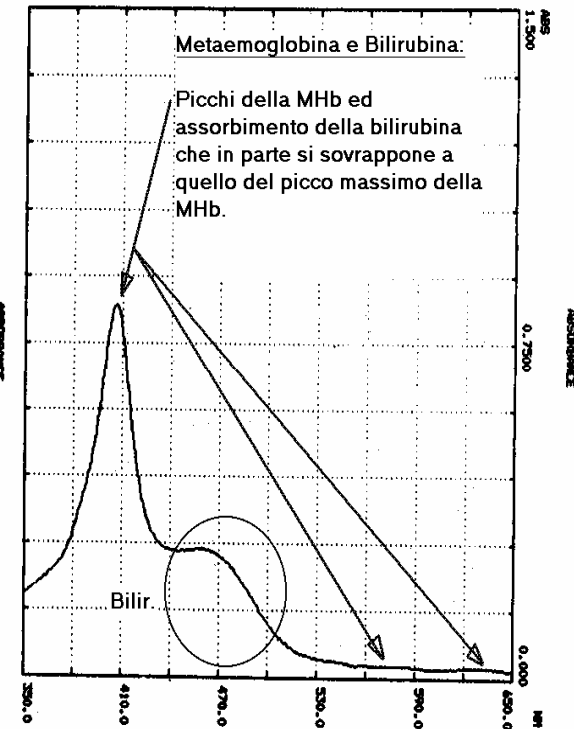
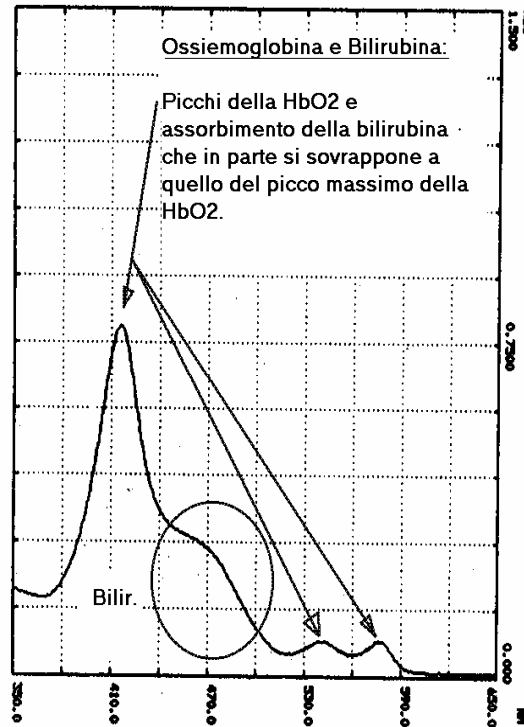
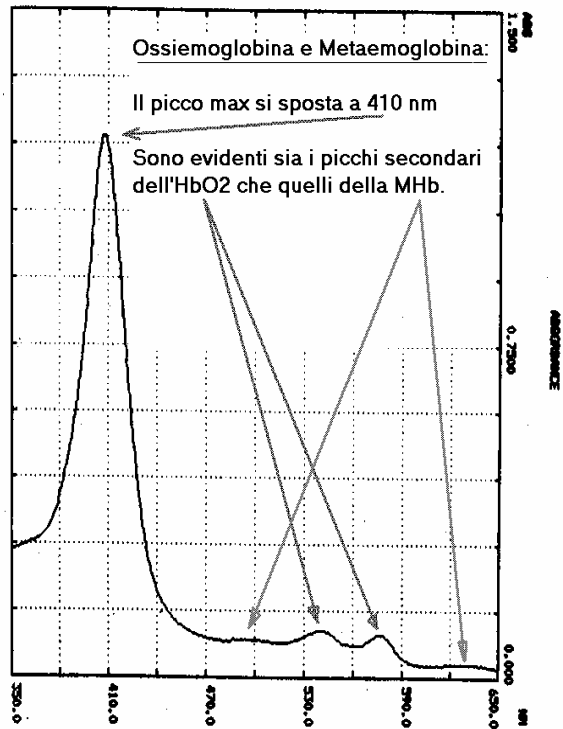
- Indice di risposta infiammatoria del SNC
- - malattie immunologiche (SM, vasculiti)
- - malattie infettive (batteri, virus, spirochete e funghi)
 - indice di IgG (correzione per passaggio siero-liquor)
 - bande oligoclonali

Camera di Thoma-Zeiss:



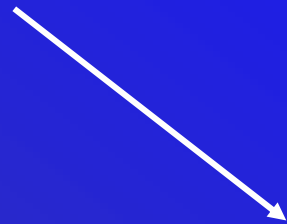
- Si contano le cellule su 5 dei 16 quadrati; si moltiplica il valore ottenuto per 50 tenendo in considerazione eventuali fattori di diluizione applicati al campione nel caso di utilizzo del Liquido di Turk.

Esame dei pigmenti:



- Scansione spettrofotometrica del campione tra 350 e 650 nm. Miscela di pigmenti.

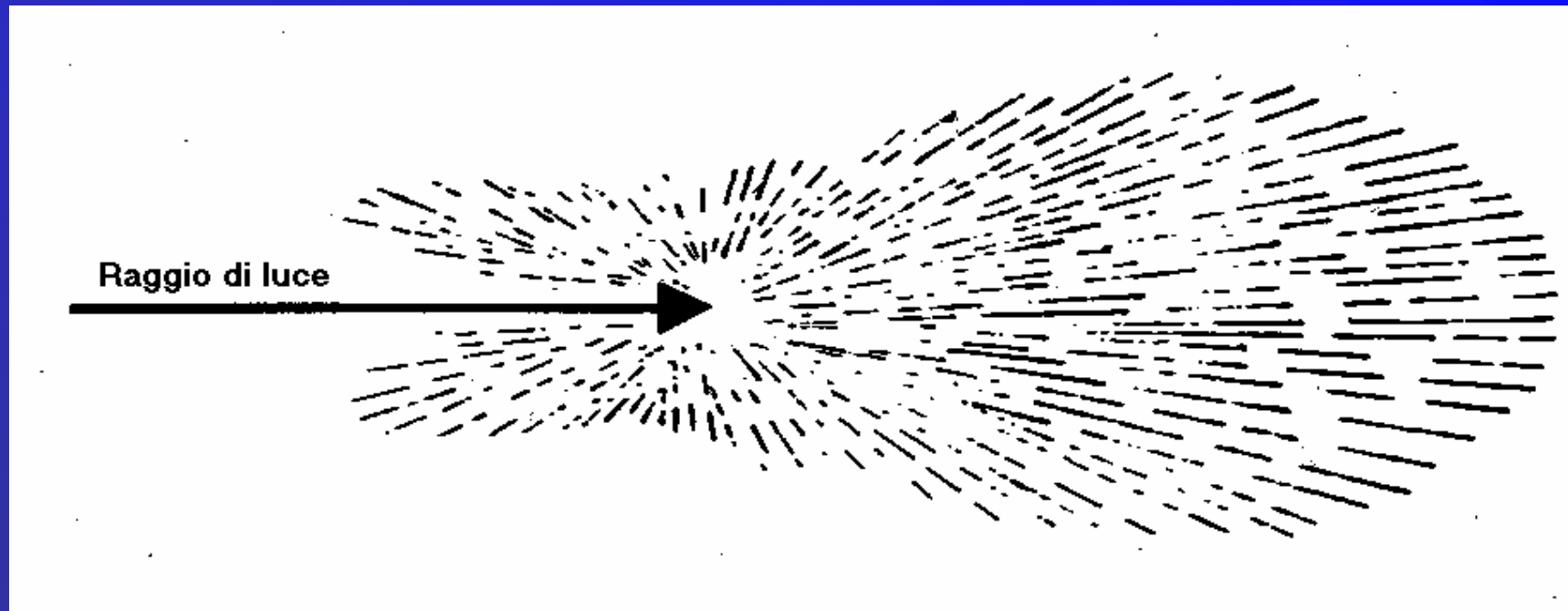
Nefelometria



Dosaggio Albumina e Ig
Liquor e siero

Nefelometria

Reazione tra antigene (campione) ed anticorpo monoclonale (reattivo) che porta alla formazione di immunocomplessi



Gli immunocomplessi interagiscono con un raggio di luce riuscendo a rifletterla o deviarla. Il sistema ottico del Nefelometro rileva la quantità di luce riflessa entro un determinato angolo. Essa è direttamente proporzionale alla quantità di immunocomplessi formati durante la reazione tra antigene ed anticorpo

Indice di Link. VN < 0.69

Alb sintetizzata nel fegato
(se ↑ L → danno BEE)

Nefelometria - Interpretazione

Calcolo del Q. Alb.

$$((Alb_l / Alb_s) * 1000)$$

Calcolo del Q. Ig

$$((IgX_l / IgX_s) * 1000)$$

Calcolo del Q. limite ⁽³⁾

$$(a/b \sqrt{(Q.Alb.^2 + b^2)} - c) \S$$

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

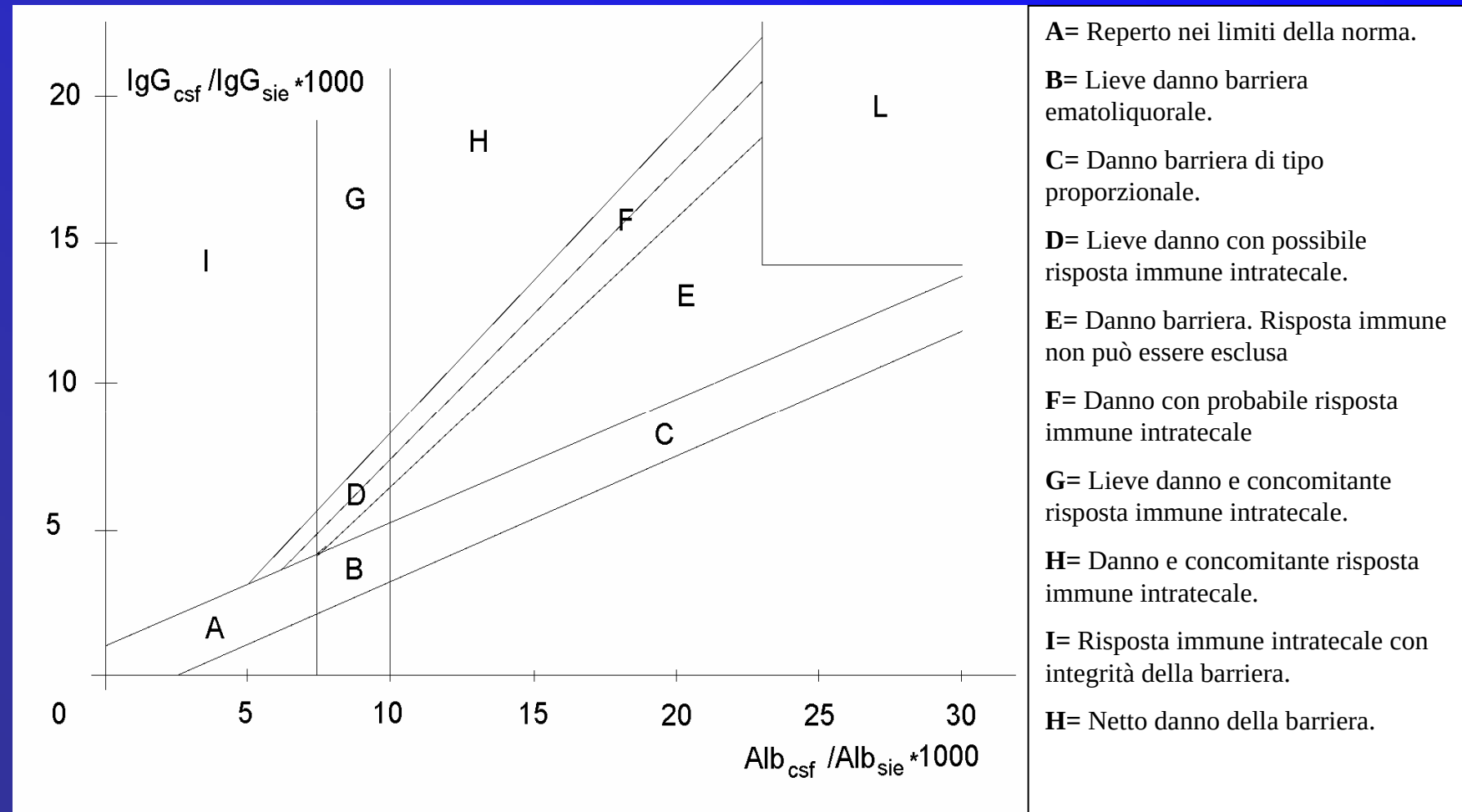
Il Q. Lim. rappresenta il **valore massimo** che quella proteina può avere **nel liquor del pz.** in quelle determinate **condizioni di funzionalità di barriera**, contestualmente alla sua **età**.

E' a questo quoziente che viene confrontato il Q. Ig calcolato in precedenza e se Q. Ig > Q. Lim. potremmo ipotizzare la presenza di una sintesi intratecale.

L'elaborazione dei dati nefelometrici eseguita da Protis® fornisce una interpretazione QUANTITATIVA della sintesi intratecale la cui presenza deve essere confermata con la ricerca delle Bande Oligoclonali di Ig su liquor, eseguita tramite Isoelettrofocusing (metodo QUALITATIVO).

Nefelometria.

- Interpretazione del grafico di Reiber.





AZIENDA OSPEDALIERO - UNIVERSITARIA PISANA
CLINICA NEUROLOGICA (Dir. Prof. L. Murri)
LABORATORIO DI NEUROLOGIA CLINICA E NEUROCHIRURGIA
Diagnostica Neurale, Metabolica, Molecolare
Tel. 050/05191 Tel/FAX 050/05149 - Tel. 050/05048 FAX 050/05408
e-mail: lab.liqor@ao-pisa.toscana.it

protis



ANALISI DIAGNOSTICA DEL LIQUOR

Esame n° 12256

Cognome e nome :

Data: 08/02/2007

Data di nascita :

Sex: F

Reparto :

88 - NEUROLOGIA

Quarto diagnostico

Clin. demenziale

Sezione di Provenienza	Posizione	Esame vivo CSF Aspetto	Esame vivo CSF Colore
PL	CSF VEN	880	880

Dati aggiuntivi del campione

Proteine totali:

Totale albumina

Concentrazione globuli:

Proteine totali

Conta delle cellule

Esame n°

Cellule

Unità:

Proteine

CSF

Siero

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

Quotiente

11/02/2007 Prof. O. Scialoja

Firma

L'interpretazione dei risultati forniti da protis va valutata in base ai parametri di riferimento e ai dati clinici del paziente.

12256

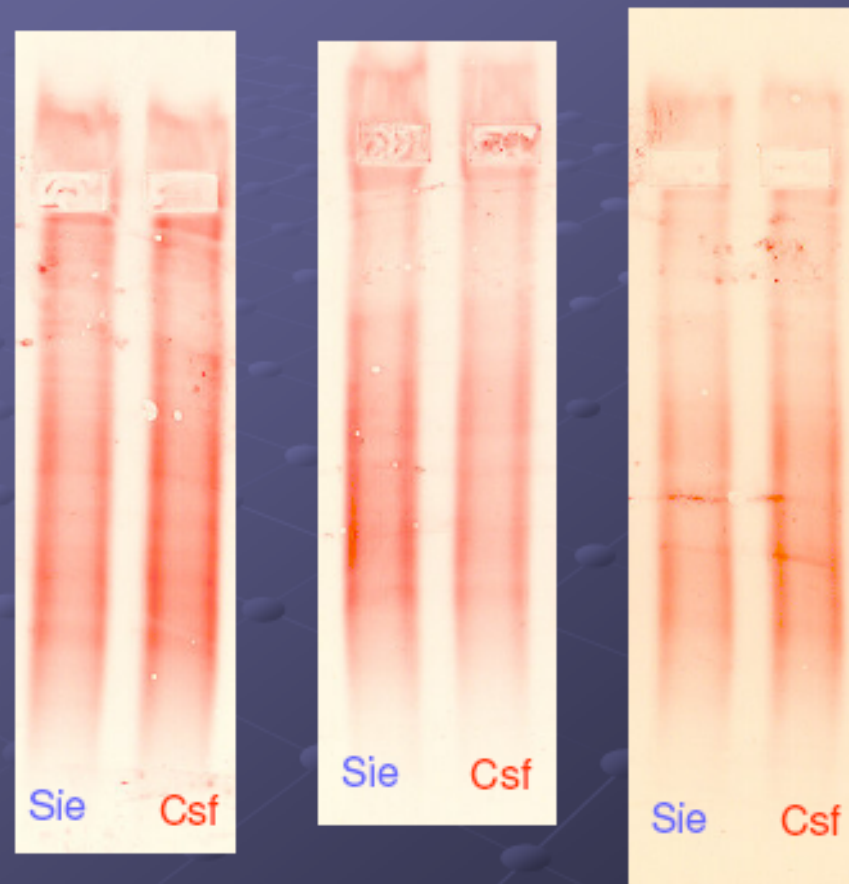
Pag. 1/1

Protis® è un software sviluppato da Dade-Behring in applicazione degli studi dei modelli matematici di produzione, diffusione, distribuzione e riassorbimento di proteine attraverso ed all'interno della barriera ematoliquorale condotti da H. Raiber. In particolare i modelli che il programma applica, sono quelli riportati nel lavoro
"Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs"

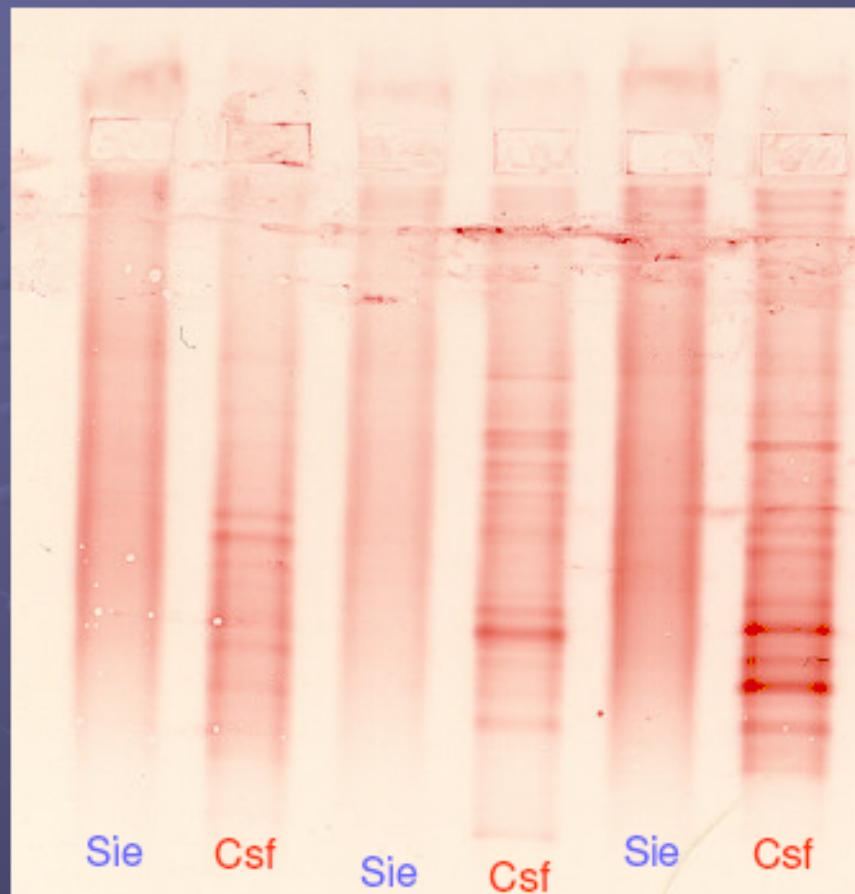
Isoelettrofocusing.

- Principio del metodo:
 - Le proteine ematiche e liquorali, seminate su gel di agarosio con pH variabile tra 3 e 10, sottoposte ad una d.d.p. migrano all'interno del gel fino a quando raggiungono il valore di pH al quale la loro carica netta viene annullata.
 - In quella posizione “focalizzano” e si concentrano.
 - Vengono “blottate” su membrana di nitrocellulosa ed in seguito colorate con anticorpo specifico anti Immunoglobuline (Ig) coniugato a perossidasi.
 - Il pattern di Ig liquorali deve essere SEMPRE confrontato con quello delle Ig sieriche del paziente.

IEF – Reperto normal



IEF – Sintesi Ig

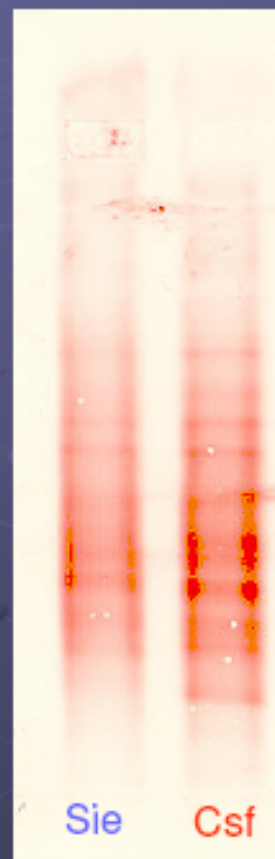


Isoelettrofocusing.

- Alcuni casi:
 - I due pattern sono identici (“mirror”). Questo caso evidenzia come le Ig che si riscontrano nel liquor, qualora non si abbia una concomitante sintesi intratecale, sono esattamente le stesse del siero a parte una differente concentrazione.



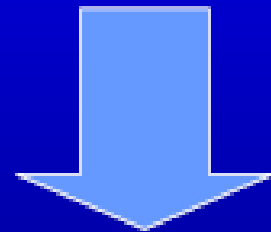
IEF – Sintesi & mirror



Esempi applicativi.....

MENINGITI

Malattie infiammatorie delle membrane
che avvolgono l'encefalo e spazi interposti
(specie leptomeninge e spazio
subaracnoideo)



CAUSE: agenti infettivi (batteri, virus, miceti protozoi o elminti)
agenti fisici
agenti chimici

CLASSIFICAZIONE DELLE MENINGITI IN BASE AL QUADRO LIQUORALE

	M. virale	M. batterica
Aspetto e colore	limpido	torbido
Pressione	aumentata	nettamente aumentata
Cellularità	50-500 cell/mm ³	5000-10000 cell/mm ³
Tipo di cellule	mononucleati	PMN
Proteinorrachia	0,8-1 g/l	5-10 g/l

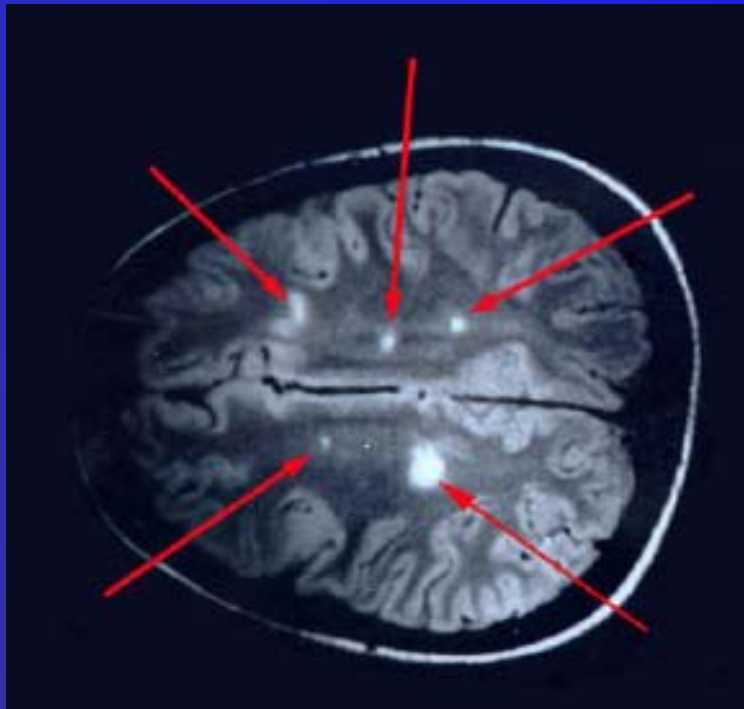


Esame microscopico

Ricerca agente eziologico mediante diagnostica indiretta, PCR.

Liquorcoltura

Sclerosi Multipla



Malattia infiammatoria cronica del SNC

Caratterizzata da placche sclerotiche nella s.b. encefalo e midollo

Clinicamente eterogenea

Analisi liquorale

Moderata iperproteinorachia (0.5-0.7g/l)

Aumentati livelli IgG

No danno BEE

Moderata pleiocitosi (10-20 c/ml)

Sintesi intratecale Ig → bande oligoclonali (95% p.)

Sie Csf

Malattie infiammatorie e autoimmuni del sistema nervoso periferico

Ganglioniti

Processi infiammatori delle radici dorsali o dei gangli del tronco encefalico

Poliradicoliti

Processi infiammatori delle radici nervose

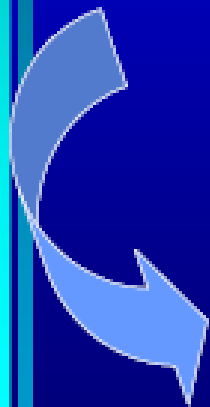
Polinevriti

Processi infiammatori dei nervi periferici

Miositi

Processi infiammatori del muscolo

CAUSA INFETTIVA O IMMUNITARIA



Mal. Infiammatorie autoimmuni SNP



Esempi:

Guillan Barrè syndrome

CIDP

Analisi liquorale

iperproteinorrachia (0.5-0.7g/l)

Danno di BEE

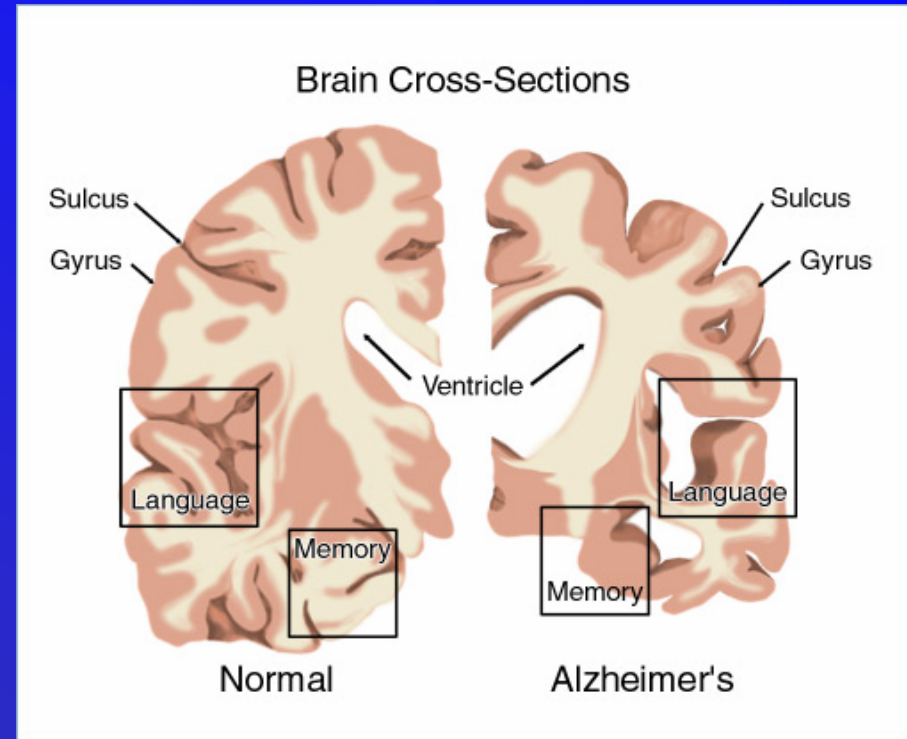
No pleiocitosi

Dissociazione albumino citologica

MALATTIA DI ALZHEIMER- NEUROPATOLOGIA

Ampliamento degli spazi liquorali

Rarefazione neuronale a livello delle aree corticali fronto-temporali (riduzione di circa il 40%)



Rarefazione neuronale a livello di strutture profonde dell'encefalo, quali amigdala e nuclei a proiezione corticale diffusa (nucleo di Meynert, locus coeruleus, nucleo dorsale del rafe)

EZIOPATOGENESI

Malattia di Alzheimer

6-7%

esordio precoce
(*early-onset*)
<65aa

>90%

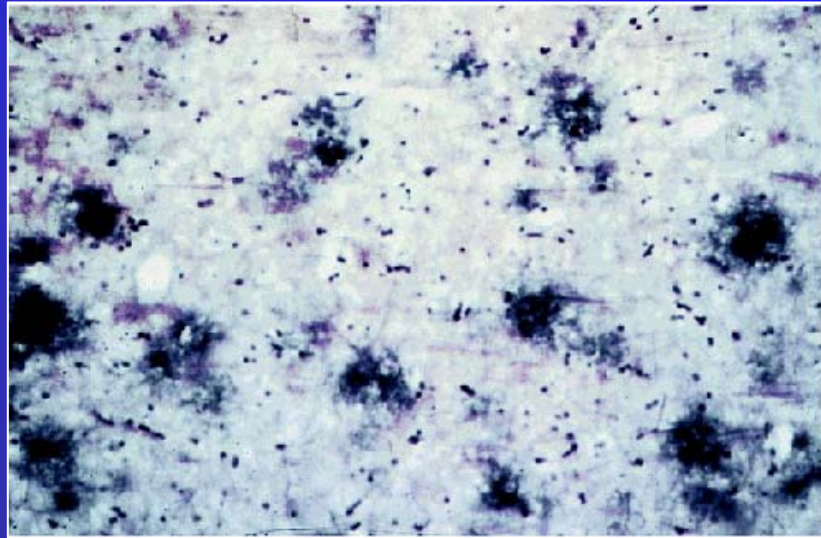
esordio tardivo
(*late-onset*)
>65aa



7% delle forme *early-onset* mostrano un'erediatarietà di tipo autosomico dominante (FORME FAMILIARI)

Nella stragrande maggioranza FORME SPORADICHE

NEUROPATOLOGIA: alterazioni microscopiche



placche senili

formazioni extracellulari di
fibrille insolubili della proteina
amiloide (Aβ42-43)



grovigli
neurofibrillari

ammassi di filamenti
intraneuronali della proteina τ
iperfosforilata

Proteina Tau totale, fosforilata e non (t-Tau)

➤ Incremento statisticamente significativo di t-Tau nel liquor dei pazienti con MA (circa 300% più alta in MA rispetto a controlli)

➤ Incremento dei livelli di T-tau è età-correlato:

V.N.	21-50aa	<300 pg/ml
	51-70aa	<450 pg/ml
	70-93aa	<500 pg/ml

➤ Specificità 65-85%

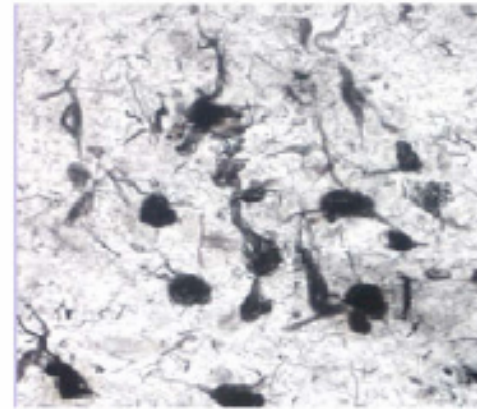
Sensibilità 40-86%

La fosforilazione della proteina tau è condizione indispensabile per la sua successiva deposizione nei grovigli neurofibrillari, a loro volta causa della degenerazione neuronale.

p-Tau

indice più attendibile e
specifico del processo
degenerativo che è
all'origine della
malattia di Alzheimer

Neurofibrillary tangles



p-Tau

- un marcato incremento dei p-Tau è stato riscontrato nei pz con MA;
- non riscontrato un aumento della p-Tau in CJD o altre demenze come VaD, FTD e DLB e in disordini neurologici cronici come PD, SLA



migliore specificità

Aumento dei valori di p-Tau181 in pz MCI che hanno successivamente sviluppato MA (Andersen et al., 2003) : possibile riconoscimento della potenzialità evolutiva del MCI?

Demenze e Malattie da prioni

"Encefalopatie spongiformi trasmissibili",
che hanno un comune meccanismo
patogenetico, basato sull'alterazione di una
proteina, chiamata prione, che assume
particolari caratteristiche chimico-fisiche,
causando una degenerazione neuronale

- 
- ✓ Malattia di Creutzfeld-Jacob
 - ✓ Variante della m. di Creutzfeld-Jacob
(contaminazione con tessuto di encefalop. spongiforme bovina, BSE)
 - ✓ Insonnia fatale familiare
 - ✓ Malattia di Gerstmann-Straussler-Scheinker
 - ✓ Kuru

Malattia di Creutzfeld-Jacob

- 85% CJD sporadica
- 10-15% CJD familiare
(mutaz. *prion protein gene*, PRNP)
- CJD iatrogena

Criteri diagnostici

World Health Organisation criteria for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

I	Rapidly progressive dementia
II	
A	Myoclonus
B	Visual and/or cerebellar signs
C	Pyramidal or extrapyramidal features
D	Akinetic mutism
III	
A	EEG show periodic wave complexes
B	Positive 14-3-3 analysis in CSF
Possible sCJD	I and 2 of II with a maximal duration of 2 years
Probable sCJD	I and 2 of II and III A and/or III B
Definite sCJD	Neuropathologically confirmed case of sCJD

CSF biomarkers di CJDs

$A\beta_{1-42}$ + 14.3.3

aumento specificità

	TP	TN	FP	FN	Sens	Spec
All 14-3-3 bands	52	183	15	0	100%	92%
Only strong bands	49	191	7	3	94%	96%
Densitometric analysis	50	192	6	2	96%	97%
14-3-3 and $A\beta_{1-42}$ *	52	194	4	0	100%	98%
Tau	45	193	5	7	87%	97%
Tau and $A\beta_{1-42}$	45	194	4	7	87%	98%

n=250 CJD possibile: 47 CJD, 198 altri(AD, non-AD, Dsec)

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2003

Nei casi di sospetta rinoliquorrea (od otorrea) è possibile ricercare, nel campione raccolto, la presenza di Asialotransferrina e di Beta trace protein.

