

RACCOLTA, TRATTAMENTO E PREPARAZIONE DEL LIQUIDO CEFALORACHIDIANO NEL CANE E NEL GATTO*

BRIAN C. CELLIO, DVM
University of Missouri-Columbia

Riassunto

L'analisi del liquido cefalorachidiano (o liquor) è fondamentale nella valutazione diagnostica dei soggetti affetti da malattie neurologiche. È possibile eseguirvi numerosi test diagnostici nel tentativo di individuare l'eziologia delle anomalie neurologiche. In generale, l'analisi del liquor è un indice sensibile di neuropatia, benché raramente fornisca una diagnosi definitiva. Mentre la raccolta del liquido non comporta difficoltà seguendo la tecnica appropriata, successivamente sono necessari trattamenti e preparazioni particolari per garantire una sensibilità adeguata e aumentare le probabilità di identificare un processo patologico specifico. Se i campioni di liquido cefalorachidiano non vengono prelevati, trattati e preparati in modo adeguato, la differenziazione fra condizioni patologiche e non patologiche può risultare difficile se non impossibile.

Summary

Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is critical in the diagnostic evaluation of patients with neurologic disease. A multitude of diagnostic tests can be performed on CSF in an effort to identify the cause of neurologic abnormalities. In general, CSF analysis is a sensitive indicator of neurologic disease but rarely provides a definitive diagnosis. Although collection is easily performed with the appropriate technique, proper processing and preparation of CSF are necessary to ensure adequate sensitivity and improve the likelihood of identifying a specific disease process. Without proper collection, processing, and preparation of CSF samples, differentiation between pathologic and nonpathologic conditions may be difficult if not impossible.

L'analisi del liquido cefalorachidiano è fondamentale ai fini della valutazione complessiva dei soggetti affetti da neuropatie. L'esame del liquor, benché sensibile nell'identificare numerosi processi patologici spinali e intracranici, raramente fornisce una diagnosi definitiva.¹ Pertanto, questo tipo di esame costituisce soltanto una parte della valutazione diagnostica complessiva dei soggetti con sospetta patologia neurologica. Ciononostante, è necessario che i campioni di liquor siano prelevati, trattati e preparati in modo adeguato per garantire un'interpretazione accurata dei risultati. I test comunemente eseguiti sui campioni di liquido cefalorachidiano comprendono²:

- Determinazione delle concentrazioni totali di cellule nucleate e proteine
- Conteggi cellulari differenziali
- Titoli di anticorpi diretti contro i vari agenti infettivi
- Esame colturale

PRELIEVO

Il prelievo del liquor non si riduce soltanto alle conoscenze di neuroanatomia ed all'applicazione di una tecnica appropriata. Per decidere di eseguire questo tipo di indagine, spesso hanno la precedenza fattori quali il rischio anestesiológico e le condizioni neurologiche prevalenti. Nonostante la relativa facilità con cui nella maggior parte dei casi si esegue la raccolta, le complicazioni associate all'anestesia nei soggetti in condizioni compromesse e il rischio di ernie con innalzamenti della pressione intracranica richiedono l'approfondimento di questi concetti.

Anestesia

Il liquido cefalorachidiano viene prelevato mantenendo il soggetto su un piano di anestesia adeguato per impedire il movimento durante la procedura.² Poiché un numero significativo dei soggetti in cui è necessario eseguire il prelievo del liquor il rischio anestesiológico è elevato, occorre adottare precauzioni particolari riguardo a farmaci, posologie e monitoraggio. I prodotti iniettabili impediscono di modificare rapidamente la profondità dell'anestesia nel

*Da "The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian" Vol. 23, N. 9, settembre 2001, 786. Con l'autorizzazione dell'Editore.

corso del prelievo. Pertanto, è consigliabile intubare il soggetto e somministrare un'anestesia gassosa con integrazione di ossigeno dopo l'induzione.³ Questo sistema garantisce un livello adeguato di anestesia e consente di mantenerlo o modificarlo se la procedura si dovesse protrarre o se insorgessero altre complicazioni. Analogamente all'anestesia eseguita per qualsiasi altra procedura, è necessario valutarne in modo critico il rapporto fra rischi e benefici.

Ernia

L'ernia rappresenta lo spostamento del contenuto intracranico da una zona a pressione elevata verso una zona a pressione minore. Nei soggetti con pressione intracranica elevata, l'inserimento di un ago spinale nello spazio subaracnoideo può esitare in un gradiente pressorio sufficiente a provocare lo spostamento caudale delle strutture intracraniche. Questo evento comporta un aumento di morbilità e di mortalità. Le condizioni che spesso comportano innalzamenti della pressione intracranica comprendono²:

- Neoplasie
- Emorragie
- Traumi
- Edemi
- Infiammazioni generalizzate
- Granulomi
- Ascessi

Anche se non sono sempre facilmente disponibili, può risultare utile l'impiego delle tecniche di diagnostica per immagini, che consentono di individuare le lesioni che potrebbero impedire il prelievo.

Se la raccolta del liquor è considerata indispensabile in soggetti con sospetto innalzamento della pressione intracranica, occorre adottare alcune precauzioni prima e durante la procedura. Un grado di ventilazione sufficiente a mantenere la pressione parziale del biossido di carbonio entro valori di 30 mm/Hg probabilmente impedisce la dilatazione dei vasi sanguigni cerebrali.⁴ Questo consente di ridurre al minimo qualsiasi ulteriore innalzamento di pressione intracranica secondariamente a un aumento del flusso ematico cerebrale. Attualmente, l'iperventilazione aggressiva viene consigliata unicamente nei soggetti con stato neurologico deteriorato e/o dove esista un forte sospetto di ernia.⁵ Il mannitolo è un diuretico osmotico, il cui impiego si rivela vantaggioso prima e durante il prelievo per abbassare la pressione intracranica.⁶

Sedi di prelievo

Il liquido cefalorachidiano solitamente viene raccolto nella cisterna cerebellomidollare che rappresenta una sede relativamente comoda per prelevare senza rischi un campione adeguato da sottoporre ad analisi. Il liquido può provenire anche dalla cisterna lombare, benché il prelievo in questa sede solitamente comporti maggiori difficoltà e quindi implichi campioni di volume insufficiente e maggiori probabilità di contaminazione ematica. Da entrambe le sedi è possibile prelevare senza rischio 1 ml di liquido cefalorachidiano ogni 5 kg di peso corporeo.⁷ Nonostante

la variabilità degli intervalli di riferimento dei singoli laboratori, il liquor prelevato in cani e gatti sani generalmente contiene meno di 5 leucociti/ μ l e meno di 25 mg/dl di proteine.² Come verrà descritto nel paragrafo relativo alla tecnica di prelievo, è possibile che nei campioni prelevati nella cisterna lombare i livelli proteici siano più elevati e superino i 25 mg/dl in cani e gatti sani.^{2,7,8} Generalmente, il liquido viene raccolto in una provetta sterile e solitamente non richiede l'aggiunta di anticoagulante. È possibile che la presenza di EDTA induca falsi innalzamenti dei livelli proteici e, nei campioni di piccole dimensioni, una diluizione del contenuto cellulare, rendendo inaffidabile l'interpretazione dei risultati.³

Tecnica

Indipendentemente dalla sede scelta per prelevare il liquido, la zona deve essere tosata e preparata chirurgicamente e devono essere indossati guanti sterili. Il posizionamento appropriato del soggetto è molto importante e facilita notevolmente la riuscita del prelievo.

Con 1 ml di liquor, solitamente è possibile eseguire conteggi degli elementi cellulari, tecniche citopreparatorie e dosaggi proteici. Tuttavia, è preferibile prelevare altri 2-3 ml di fluido, che consentono di eseguire esami colturali, titolazione di agenti infettivi o valutazioni biochimiche.⁷

Cisterna cerebellomidollare

Il prelievo di liquor dalla cisterna cerebellomidollare si esegue con il soggetto in decubito laterale destro, se l'operatore non è mancino e in decubito laterale sinistro nel caso contrario.³ L'asse del corpo viene posizionato parallelamente al bordo del tavolo e la testa viene fissata in modo da risultare perpendicolare al corpo (Figura 1). L'aiutante deve assicurarsi che il naso sia mantenuto allineato alla colonna vertebrale, in modo tale che il cranio non venga ruotato. Occorre accertarsi che il tubo orotracheale rimanga pervio mentre la testa viene flessa. I punti di repere utiliz-



FIGURA 1 - Posizionamento corretto del soggetto per il prelievo di liquor dalla cisterna cerebellomidollare. Il corpo dell'animale è collocato in parallelo al tavolo e la testa viene flessa in modo da rendersi perpendicolare all'asse maggiore del corpo.

zati sono la protuberanza occipitale e le ali dell'atlante.^{3,9} Gli operatori non mancini utilizzano la mano sinistra per identificare questi riferimenti mediante palpazione. Il pollice e il dito medio vengono posti sulle ali dell'atlante e l'indice viene collocato sulla protuberanza occipitale. Si traccia una linea immaginaria che unisca le ali dell'atlante e si utilizza la protuberanza occipitale come riferimento per identificare la linea mediana. L'ago spinale viene inserito lungo il margine craniale delle ali dell'atlante, avendo cura di rimanere sulla linea mediana (Figura 2).²

Nella maggior parte dei casi, è appropriato impiegare un ago spinale monouso da 20- o 22-G e 40 mm (1,5"), benché nei cani di grossa taglia possa rendersi necessario un ago da 65 mm (2,5"). È importante utilizzare un mandrino per evitare di introdurre cellule cutanee nello spazio subaracnoideo con conseguente formazione di cisti. L'ago viene inserito lentamente, rimuovendo frequentemente il mandrino per osservare la comparsa del flusso di liquor. Quando si attraversa il legamento atlanto-occipitale dorsale e si penetra nello spazio subaracnoideo è possibile percepire un cedimento della resistenza.² Tuttavia, questo non deve rappresentare l'unico mezzo per stabilire la profondità dell'ago. È fondamentale procedere con cautela e rimuovere spesso il mandrino per valutare la comparsa del flusso di liquor. Quest'ultimo verrà fatto gocciolare in una provetta sterile e successivamente l'ago verrà rimosso.

Cisterna lombare

Il prelievo di liquido cefalorachidiano dalla cisterna lombare avviene mantenendo il soggetto in decubito laterale destro oppure sinistro. Nel cane, il liquido viene raccolto negli spazi intervertebrali L5-6 oppure L6-7, mentre nel gatto il prelievo avviene nello spazio lombosacrale.² Interponendo un panno fra gli arti, spesso si favorisce l'apertura degli spazi intervertebrali facilitando il prelievo. Gli operatori non mancini utilizzano la mano sinistra per identificare con la palpazione i processi spinosi dorsali e isolare la sede appropriata. Solitamente, il processo spinoso dorsale più caudale raggiungibile mediante palpazione è quello appartenente a L-6. Tuttavia, servendosi di immagi-

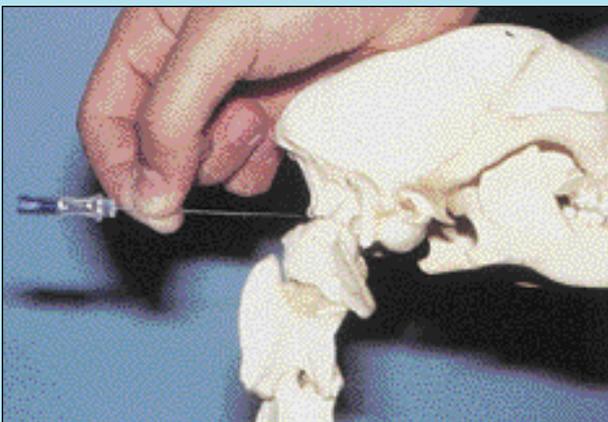


FIGURA 2 - L'ago viene inserito lungo la linea mediana in posizione immediatamente craniale alle ali dell'atlante. La protuberanza occipitale viene impiegata per facilitare l'individuazione della linea mediana.

ni radiografiche in bianco, è più semplice visualizzare i vari processi spinosi e stabilire la probabilità di riuscire ad identificarli al tatto. La linea mediana viene individuata palpando i processi spinosi dorsali e/o le ali dell'ileo, come può rendersi necessario negli animali obesi (Figura 3). L'ago viene inserito in sede immediatamente caudale allo spazio intervertebrale prescelto, lungo il margine craniale del processo spinoso dorsale caudale (Figura 4). Dopo avere incontrato l'osso, l'ago viene fatto avanzare lentamente in direzione craniale. È normale che l'arto scaldi leggermente quando si attraversa il legamento interarcuato, poiché ciò comporta l'irritazione della cauda equina. L'ago viene fatto avanzare fino a raggiungere il margine ventrale del canale vertebrale. Il mandrino viene rimosso e, se necessario, l'ago viene ritirato lentamente affinché la bietta venga a trovarsi nello spazio subaracnoideo ventrale e si renda evidente il flusso di liquor.

Il liquido cefalorachidiano viene raccolto e l'ago viene reinserito secondo necessità.

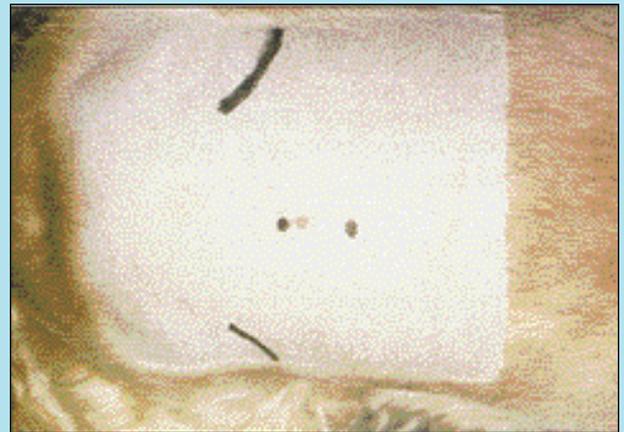


FIGURA 3 - I punti di repere per il prelievo di liquor dalla regione lombare comprendono le ali dell'ileo (linee nere) e i processi spinosi dorsali L-5 e L-6 (punti neri).

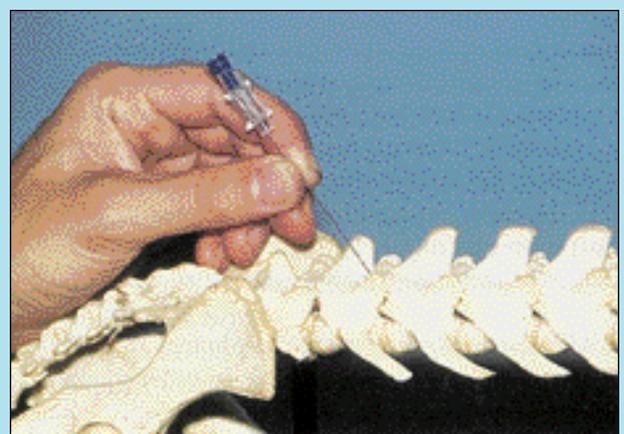


FIGURA 4 - Nel cane, l'ago spinale deve essere inserito negli spazi intervertebrali L5-6 o L6-7. In questa immagine, l'ago è stato introdotto nello spazio L5-6. Si noti l'angolo di penetrazione dell'ago.

Concentrazione di proteine e cellule nelle sedi di prelievo

Negli animali sani, i campioni prelevati nella cisterna lombare e in quella cerebellomidollare variano per concentrazione proteica e cellulare.^{7,8} Il liquor prelevato in sede lombare presenta solitamente maggiore contenuto proteico e minor numero di cellule rispetto ai campioni raccolti dalla cisterna cerebellomidollare. L'analisi del liquido cefalorachidiano prelevato in 31 cani sani da entrambe le cisterne ha evidenziato livelli medi di proteine pari a 29 mg/dl nei campioni lombari, con un contenuto medio di cellule nucleate pari a 0,55/ μ l. Al contrario, nel liquor proveniente dalla cisterna cerebellomidollare, i livelli proteici erano pari a 14 mg/dl, mentre il contenuto cellulare medio raggiungeva il valore di 1,45 elementi nucleati/ μ l.⁸ Benché non siano ancora stati chiariti i motivi di tali differenze, è possibile che il contenuto cellulare sproporzionatamente basso nei campioni lombari dipenda da accresciuta lisi cellulare o migrazione di cellule verso l'esterno quando il liquor fluisce in direzione caudale.¹⁰ Si ritiene che la differenza fra i livelli proteici dipenda dal rallentamento di circolo del liquido cefalorachidiano nella regione lombare con conseguente accumulo locale di proteine.⁷ Benché la differenza sia statisticamente significativa, l'importanza clinica del diverso contenuto cellulare nelle due sedi di prelievo è discutibile, poiché il numero di cellule normalmente presenti nel liquor è basso e il conteggio è espresso con numeri interi.

La sede del prelievo riveste una propria importanza nel favorire l'identificazione della patologia neurologica. In uno studio condotto su 145 cani con anomalie neurologiche localizzate, il liquor prelevato caudalmente alla lesione rivelava anomalie di contenuto proteico e cellulare con frequenza nettamente superiore rispetto al liquido raccolto in un punto situato cranialmente.¹¹ È probabile che queste differenze derivino dal flusso caudale di liquor lungo il nevrasso. In generale, bisogna localizzare la lesione e prelevare il liquido in una sede posta caudalmente.

TRATTAMENTO

Dopo il prelievo, esistono diverse possibilità per il trattamento e l'analisi di un campione di liquor. È possibile trattare e valutare il campione ambulatorialmente impiegando una delle diverse tecniche citopreparatorie che verranno descritte oppure inviare il campione pretrattato in un laboratorio di patologia clinica per l'interpretazione. In alternativa, è possibile prelevare il liquor e mescolarlo con siero autologo che ne facilita la conservazione fino a 48 ore, durante le quali si provvede all'invio in laboratorio.¹²

Il trattamento ritardato del campione comporta l'allestimento di vetrini non adatti ad essere interpretati a causa dell'alterata struttura cellulare.^{1,3,7,12} Le modificazioni cellulari comunemente osservate in caso di valutazione tardiva comprendono picnosi, lisi e disintegrazione di citoplasma e membrane nucleari.¹² In generale, quando non si adotti alcuna misura per aumentare la stabilità delle cellule contenute nel liquor, i campioni devono essere trattati entro 30 minuti dalla raccolta.^{1,2,3,7} Si ritiene che lo scarso contenuto proteico contribuisca al rapido deterioramento

delle cellule, rendendo necessario procedere con rapidità.¹²

Se il campione viene inviato presso un laboratorio esterno per essere trattato e valutato, è opportuno prelevare due aliquote di liquor (ognuna pari a circa 0,25 ml) raccogliendole in provette sterili. Quindi si esegue un prelievo di sangue e se ne separa il siero. In una delle due provette si aggiungono 0,03 ml di siero (circa una goccia da un ago da 25-G) che verranno mescolati all'aliquota di liquor. Le provette devono essere etichettate e quindi conservate in frigorifero e/o inviate al centro diagnostico imballate con panetti di ghiaccio entro 48 ore dal prelievo. È importante che il siero sia aggiunto soltanto in una delle due provette. Il campione privo di siero verrà adoperato per quantificare il contenuto di proteine e cellule nucleate, poiché le alterazioni morfologiche cellulari non tendono a inibire la valutazione del numero complessivo degli elementi nucleati. Il campione contenente il siero viene impiegato per gli esami citologici ed eventualmente per la determinazione del conteggio cellulare differenziale.

TECNICHE CITOPREPARATORIE

Nonostante la variabilità dei valori nei cani e nei gatti sani, il liquido cefalorachidiano solitamente contiene meno di 5 cellule nucleate/ μ l.² In generale, se nel liquor è presente un numero di elementi nucleati inferiore a 500/ μ l è necessario impiegare una tecnica di concentrazione per ottenere una quantità di cellule sufficiente alla valutazione citologica.^{1,3} Spesso, si ritiene che il riscontro di un valore normale della concentrazione delle cellule nucleate effettuata con un emocitometro indichi che il liquor esaminato appartenga ad un soggetto normale. Tuttavia, procedendo a valutazione citologica dopo avere concentrato il campione è possibile rilevare anomalie fondamentali all'interpretazione complessiva dei risultati.¹³ Ad esempio, attraverso l'esame citologico si possono identificare distribuzioni anomale delle cellule tipicamente presenti nel liquor, popolazioni cellulari anomale, microrganismi patogeni o cellule con struttura alterata. Per questo motivo si consiglia di sottoporre il liquor a valutazione citologica dopo avere applicato una tecnica di concentrazione, indipendentemente dal contenuto totale in elementi nucleati.

Ogni tecnica di concentrazione comporta aspetti vantaggiosi e svantaggiosi. In generale, le caratteristiche che occorre considerare comprendono:

- Possibilità di conservare la morfologia cellulare
- Capacità di concentrare le cellule al fine di garantire una conta differenziale rappresentativa
- Tempo e costi previsti

Striscio diretto

Il basso contenuto in cellule nel liquor normale impedisce di realizzare uno striscio diretto di utilità diagnostica. Inoltre, i livelli proteici normalmente bassi non garantiscono un supporto adeguato alle cellule favorendo fenomeni di distorsione cellulare durante le operazioni di allestimento dello striscio. Questa tecnica risulta accettabile quando

il contenuto in cellule nucleate sia superiore a 500 elementi/ μ l e vengono aggiunte alcune gocce di siero autologo.¹

Centrifugazione semplice

Un millilitro di liquor può essere centrifugato a bassa velocità per 5 minuti. Il surnatante viene asportato con una pipetta e successivamente impiegato per esami di tipo non citologico. Si aggiunge una goccia di siero alle cellule e si mescola con cautela. Una seconda goccia viene strisciata delicatamente sul vetrino. Solitamente, questa tecnica viene considerata inadatta ai fini di conservazione e recupero delle cellule e quindi se ne sconsiglia l'uso.¹⁴

Filtrazione su membrana

Questa tecnica rappresenta una procedura relativamente semplice e poco costosa che permette un eccellente recupero delle cellule contenute nei campioni di liquor.^{1,14,15} Inizialmente, la tecnica di filtrazione è stata impiegata in medicina umana per trattenere le cellule tumorali mentre il sangue veniva filtrato attraverso membrane con pori di diametro sufficientemente ampio al passaggio degli elementi corpuscolati ematici normali e abbastanza piccolo da impedire il transito delle cellule tumorali di grosse dimensioni.¹⁵ Quando questo sistema viene applicato a campioni di liquor, la porosità della membrana è sufficientemente fine da trattenere gli elementi cellulari e permettere l'osservazione al microscopio della membrana stessa.¹⁶ Il recupero cellulare è compreso fra 90% e 100% degli elementi.^{16,17}

I vantaggi di questa tecnica comprendono¹⁴

- Eccellente recupero cellulare
- Conservazione immediata delle cellule
- Maggiore probabilità di identificare tipi cellulari anormali (elementi micotici, neoplastici)

Svantaggi - Nonostante la conservazione della normale struttura cellulare, è possibile che l'interpretazione comporti alcune difficoltà legate ai motivi seguenti:

- In seguito a filtrazione su membrana, le cellule vengono circondate e parzialmente intrappolate dalla matrice tridimensionale del filtro, il che complica l'interpretazione di alcuni elementi.¹
- I coloranti Giemsa, che garantiscono un migliore contrasto fra i componenti cellulari rispetto all'ematossilina, non possono essere adoperati con questi filtri.^{1,14}
- Campioni con elevato contenuto in cellule o proteine possono ostruire il filtro, rendendo difficile l'interpretazione per l'eccessiva presenza di materiale.¹⁵

Nonostante l'eccellente recupero cellulare e la facilità nell'eseguire la filtrazione su membrana, le possibili difficoltà interpretative impediscono di consigliare l'uso della procedura nella pratica generale. In altre sedi sono disponibili descrizioni dettagliate di questa metodica.^{1,15}

Sedimentazione

La tecnica di sedimentazione è quella consigliata per gli ambulatori che non dispongono di centrifuga per citologia.¹⁴

I vantaggi di questa tecnica comprendono quanto segue:

- Si tratta di un metodo moderatamente veloce e semplice che garantisce la raccolta di un numero adeguato di cellule (circa 60%).
- La distribuzione degli elementi cellulari nel sedimento generalmente indica la reale distribuzione cellulare nel campione di liquor.¹⁸
- I risultati ottenuti garantiscono buona qualità cellulare e concentrazione adeguata di elementi nucleati anche in campioni con contenuto corpuscolare normale.¹ Rispetto alla tecnica di filtrazione su membrana, le cellule si diffondono e si appiattiscono maggiormente, consentendo una migliore valutazione dei dettagli nucleari e citoplasmatici.¹

Svantaggi - È possibile osservare la trasformazione (attivazione) di alcune cellule mononucleate del liquor¹⁹ con conseguente

- Aumento delle dimensioni cellulari
- Sviluppo di vacuoli
- Aumento dell'attività fagocitaria

Preparazione

I vetrini per l'esame devono essere preparati prima di procedere alla raccolta del liquor. Servendosi di una lama da bisturi riscaldata si tagliano i 2 cm prossimali di una provetta per centrifuga da 15 mm di diametro (Figura 5). In alternativa, è possibile utilizzare il cilindro di una siringa pulita. La parte liscia di quest'ultimo viene posta in un gel di vaselina riscaldata e quindi adagiata su un vetrino pulito. Quando il tutto sia sigillato a tenuta d'acqua (nell'arco di 30 minuti circa), il campione è pronto per l'uso.

Procedura

Nella camera di sedimentazione si pone 1 ml di liquor appena prelevato, lasciandolo per 30 minuti. Il surnatante viene aspirato con cautela inserendo una pipetta immediatamente sotto la superficie del liquor e seguendo il campione verso il basso non appena abbia inizio il processo di aspirazione. Il surnatante può essere conservato per

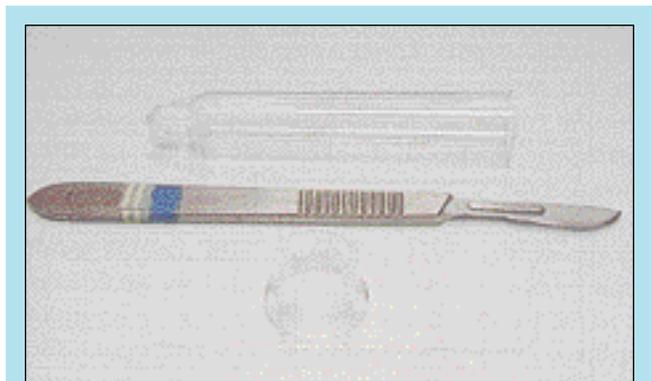


FIGURA 5 - I 2 cm prossimali della provetta per centrifuga vengono tagliati servendosi di una lama da bisturi riscaldata e la superficie liscia viene fatta aderire a un vetrino utilizzando vaselina in gel.

ulteriori analisi. Quindi, il cilindro viene rimosso e la restante quota di liquor viene raccolta toccando delicatamente il centro del campione con un pezzetto di carta assorbente. Il vetrino viene immediatamente lasciato asciugare all'aria agitandolo energicamente. L'asciugatura praticata con calore eccessivo oppure troppo lenta o incompleta è causa di cattiva qualità citologica. Il rimanente gel di vaselina viene raschiato via con un bisturi e il vetrino viene colorato e osservato al microscopio oppure inviato a un laboratorio di analisi veterinarie. Inoltre, è possibile impiegare la colorazione di Wright o Wright-Giemsa per intensificare i dettagli cellulari. Tuttavia, la distorsione cellulare aumenta rapidamente se il vetrino non viene asciugato all'aria con sollecitudine.¹⁴

Citocentrifugazione

La citocentrifugazione è la tecnica maggiormente utilizzata nei laboratori di citologia medica.¹⁴ L'attrezzatura è costosa; tuttavia fornisce risultati rapidi, è di facile impiego e garantisce un buon dettaglio citologico.^{20,21} Il recupero cellulare è paragonabile a quello ottenuto mediante sedimentazione, ma è notevolmente inferiore a quello che si ha con la filtrazione su membrana.¹⁶ Un altro vantaggio della citocentrifugazione è la limitata quantità di liquor necessaria all'esame. È possibile ottenere buoni risultati con appena 0,2 ml di liquido.¹⁴ La tecnica prevede l'inserimento del liquido cefalorachidiano nella camera di centrifugazione che verrà avviata alla velocità di 500 - 1000 giri/min per 5 minuti. L'aggiunta di una piccola quota di albumina al 30% (0,05 ml) facilita la cattura delle cellule.²⁰ In generale, si consiglia di allestire due vetrini da sottoporre ad esame.

I vantaggi di questa tecnica sono i seguenti:

- L'aspetto delle cellule nei campioni sottoposti a citocentrifugazione appropriata è considerato da buono a eccellente.
 - Solitamente le cellule sono diffuse in modo appropriato e consentono di valutare distintamente la morfologia di nucleo e citoplasma.
- Gli svantaggi sono invece rappresentati da:³
- Costo dell'attrezzatura
 - Possibile peggioramento della vacuolizzazione cellulare secondaria al processo di centrifugazione.

COLORAZIONE

I preparati allestiti in ambito ambulatoriale vengono colorati ed esaminati in sede oppure inviati per posta presso un laboratorio di patologia clinica veterinaria. Le colorazioni standard di Romanowsky, Wright e Wright-Giemsa garantiscono un buon grado di dettaglio cellulare nei campioni di liquor asciugati all'aria. I vari metodi di colorazione rapida, quali Diff-Quik®, sono convenienti e forniscono un buon dettaglio cellulare.¹⁴ Se i vetrini vengono inviati in laboratorio per l'interpretazione, è consigliabile non colorarli e sistemarli in un contenitore adatto.

CONCLUSIONI

L'analisi del liquido cefalorachidiano è un indice sensibile di neuropatia e le tecniche di concentrazione facilitano il riconoscimento delle anomalie. I campioni con contenuto cellulare complessivo inferiore a 500 cellule/μl devono essere sottoposti a una tecnica di concentrazione, che deve essere attuata necessariamente prima della valutazione citologica. Ognuna di queste metodiche comporta vantaggi e svantaggi. In generale, la tecnica di sedimentazione rappresenta il sistema più comodo per la preparazione del liquor in ambito ambulatoriale.

Bibliografia

1. Mayhew IG, Beal CR: Techniques of analysis of cerebrospinal fluid. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 10: 155-176, 1980.
2. Oliver JE, Lorenz MD, Kornegay JN: Handbook of Veterinary Neurology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders Co, 1997.
3. Parent JM, Rand JS: Cerebrospinal fluid collection and analysis, in August JR (ed): Consultations in Feline Veterinary Medicine. Philadelphia, WB Saunders Co, 1994, pp 385-392.
4. Bagley RS: Intracranial pressure in dogs and cats. *Compend Contin Educ Pract Vet* 18(6): 605-621, 1996.
5. Proulx J, Dhupa N: Severe brain injury. Part II. Therapy. *Compend Contin Educ Pract Vet* 20(9): 993-1006, 1998.
6. Jandrey KE: Using mannitol to treat traumatic brain injuries. *Vet Med August*: 717-725, 1999.
7. Chrisman CL: Cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2: 781-810, 1992.
8. Bailey CS, Higgins RJ: Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs. *Am J Vet Res* 46: 1162-1165, 1985.
9. de Lahunta A: Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology, ed 2. Philadelphia, WB Saunders Co, 1983.
10. Fishman RA: Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System. Philadelphia, WB Saunders Co, 1980.
11. Thomson CE, Kornegay JN, Stevens JB: Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987). *JAVMA* 196:1841-1844, 1990.
12. Bienzle DB, McDonnell JJ, Stanton JB: Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *JAVMA* 216: 1761-1764, 2000.
13. Christopher MM, Perman V, Hardy RM: Reassessment of cytologic values in canine cerebrospinal fluid by use of cytocentrifugation: *JAVMA* 192: 1726-1729, 1988.
14. Jamison EM, Lumsden JH: Cerebrospinal fluid analysis in the dog: Methodology and interpretation. *Semin Vet Med Surg Small Anim* 3: 122-132, 1988.
15. Roszel JF: Membrane filtration of canine and feline cerebrospinal fluid for cytologic evaluation. *JAVMA* 160: 720-725, 1972.
16. Barret DL, King EB: Comparison of cellular recovery rates and morphologic detail obtained using membrane filter and cytocentrifuge techniques. *Acta Cytol* 20: 174-180, 1976.
17. Hansen HH, Bender RA, Shelton BJ: The cytocentrifuge and cerebrospinal fluid cytology. *Acta Cytol* 18: 259-262, 1974.
18. Sörnäs R: A new method for the cytologic examination of the cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 30: 568-577, 1967.
19. Sörnäs R: Transformation of mononuclear cells in cerebrospinal fluid. *Acta Cytol* 5: 545-551, 1971.
20. Woodruff KH: Cerebrospinal fluid cytology using cytocentrifugation. *Am J Clin Pathol* 60: 621-627, 1973.
21. Ducos R, Donoso J, Weickhardt U, et al: Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer* 43: 1479-1482, 1979.