

# ¿Es posible diferenciar líquido cefalorraquídeo de otras secreciones? Utilidad de la proteína Beta Trace como biomarcador de fístulas de líquido cefalorraquídeo

## 1<sup>er</sup> Premio Beca AANC, 46<sup>o</sup> Congreso Argentino de Neurocirugía

Ezequiel Yasuda<sup>1</sup>, Santiago González Abbati<sup>1</sup>, Rodolfo Recalde<sup>1</sup>, Fernando Ane<sup>2</sup>, Pablo Bresciani<sup>3</sup>,  
María Laura Facio<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sección base de cráneo, División Neurocirugía, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup>División Otorrinolaringología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires.

<sup>3</sup>Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

### RESUMEN

**Objetivo:** Describir el uso de la proteína Beta Trace (PBT) como marcador de líquido cefalorraquídeo (LCR) en una serie de casos de pacientes con sospecha de fístula de LCR (FLCR).

**Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio retrospectivo con datos recolectados en forma prospectiva, observacional y descriptiva. Se revisaron las historias clínicas, estudio por imágenes y datos de laboratorio de una serie de 19 pacientes con sospecha de FLCR en los cuales se había realizado la detección de la PBT mediante electroforesis bidimensional, entre julio 2015-julio 2018.

**Resultado:** La edad promedio fue de 48,1 años, 9 fueron hombres y 10 mujeres, 10 pacientes provenían de neurocirugía, 7 de otorrinolaringología (ORL), y 2 de traumatología (OyT).

De las 19 muestras, 14 fueron positivas para la detección de PBT. Cinco casos (26.32%) presentaron antecedente de meningitis, todos ellos con PBT positivo. De los casos positivos, 14 fueron tratados, 3 sin cirugía y 11 con cirugía. La principal causa fue post quirúrgica (n=9). El seguimiento promedio fue de 13,79 meses, 13 casos tuvieron resultado “favorable” y uno “desfavorable”. Los 5 casos con PBT negativa fueron tratados con medidas no quirúrgicas. Todos con resultado “favorable”.

**Conclusión:** La PBT permitió, en los casos positivos, detectar LCR en las secreciones estudiadas, y en los negativos, descartarla.

**Palabras clave:** Base de Cráneo; Beta Trace; Cirugía Espinal; Fístula de Líquido Cefalorraquídeo; Rinorrea

### ABSTRACT

**Objective:** To describe the use of beta-trace protein (BTP) as a cerebrospinal fluid (CSF) marker in patients with suspected CSF leakage.

**Methods and Materials:** A retrospective study was conducted using data previously collected for a prospective, observational study. Data included the case records, imaging studies and laboratory data from a series of 19 patients with suspected CSF leakage in whom two-dimensional electrophoresis was performed for BTP detection, between July 2015 and July 2018.

**Results:** Average patient age was 48.1 years old, with nine males and ten females. Ten patients were from neurosurgery, seven from otorhinolaryngology (ENT), and two from traumatology. Of the 19 samples, 14 were positive for BTP. Nine of the patients (47.4%) sustained their CSF leakage during surgery. Five patients (26.3%) had a history of meningitis, all with positive BTP. All 14 BTP-positive cases were treated, three without and 11 with surgery. Average post-operative follow-up was 13.8 months, with 13 patients experiencing a “favorable” and one “unfavorable” outcome. All five patients who screened negative for BTP were treated non-surgically and had a favorable outcome.

**Conclusions:** In patients in whom BTP was identified, the marker was useful for detecting CSF in the secretions studied. Amongst those who screened negative for BTP, its absence helped to rule out the presence of a CSF leak.

**Key words:** Skull Base; Beta Trace; Spinal Surgery; Cerebrospinal Fluid Fistula; Rinorrea

## INTRODUCCIÓN

La fístula de líquido cefalorraquídeo (FLCR) es la salida de líquido cefalorraquídeo (LCR) por fuera del espacio subaracnoideo por una comunicación anómala entre dicho espacio y otra área de menor presión, generalmente el tracto respiratorio superior o la piel<sup>5</sup>. Esta comunicación permite la entrada de bacterias hacia el compartimiento subaracnoideo, generando un ambiente favorable para el desarrollo de meningitis, la principal causa de morbimortalidad relacionada con las FLCR<sup>10</sup>.

Ezequiel Yasuda

ezequielyasuda@gmail.com

Dependiendo del sitio del defecto meníngeo, las FLCR pueden estar asociadas a rinorrea, otorrea o secreción por la herida quirúrgica. La contaminación con otras secreciones tales como mucus, lágrimas o exudado inflamatorio pueden dificultar la interpretación de la naturaleza del líquido de la fístula. Teniendo en cuenta este obstáculo diagnóstico, la posibilidad de determinar mediante un estudio de laboratorio la existencia de LCR en una secreción constituiría una herramienta muy útil. Los marcadores biológicos de LCR clásicos como la glucosa oxidasa y la Beta 2 transferrina (B2TF) tienen limitaciones, como la baja sensibilidad y especificidad en la primera o la dificultad del procesamiento de las muestras contaminadas

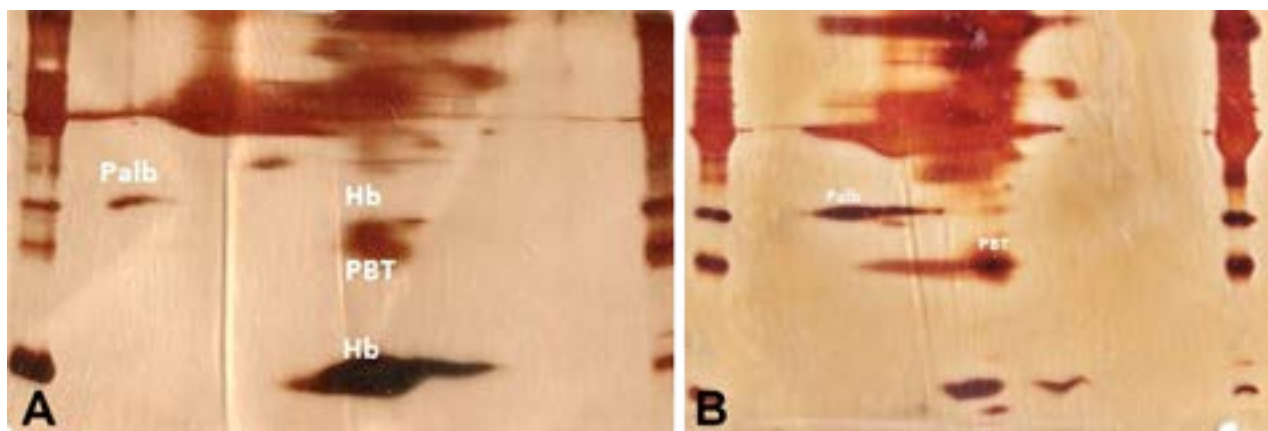


Figura 1: A) Electroforesis bidimensional de LCR. Palb: pre albúmina. PBT: proteína Beta Trace. Hb: hemoglobina. B) Electroforesis bidimensional de rinoarraquia. Nótese el parecido del patrón proteico con el LCR con la presencia de la PBT. Palb: prealbúmina. PBT: proteína Beta Trace.

con suero en la segunda<sup>7,9,14,15</sup>.

La proteína  $\beta$ -trace (PBT) fue introducida por Felgenhauer como marcador de LCR porque su concentración normal es 35 veces mayor que en el suero y, además, está ausente en lágrimas y en secreciones nasales<sup>7</sup>.

El objetivo de este trabajo fue describir el uso de la proteína Beta Trace (PBT) como marcador de LCR en una serie de casos de pacientes con sospecha de FLCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, observacional y descriptivo en el período comprendido entre julio 2015-julio 2018. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con sospecha clínica de FLCR, con un seguimiento mayor a 2 meses. Se analizó el tiempo desde el inicio de la secreción hasta la realización del estudio, antecedentes de relevancia, la causa asociada, la presencia de meningitis previa, antecedentes quirúrgicos, y tratamiento instaurado.

Un total de 19 pacientes cumplieron los requisitos de inclusión. La edad promedio fue de 48,1 años (rango de 21 a 76 años), 9 fueron hombres y 10 mujeres, 10 pacientes provenían de neurocirugía, 7 de otorrinolaringología (ORL), y 2 de traumatología (OyT).

Se objetivó el resultado luego de dicho tratamiento definiendo como “favorable” a aquellos pacientes que no presentaron ni meningitis ni secreción, y “desfavorable” a aquellos que presentaron alguno de los mencionados eventos.

### Muestras

Se analizaron 19 muestras, 14 muestras fueron nasales remitidas en tubo seco (73,68%), una de oído remitida en tubo seco (5,26%), dos de piel remitidas a través de gasas húmedas (10,53%) y dos de drenajes de sitio quirúrgico obtenido durante una reintervención (10,53%).

### Procesamiento de las muestras

Las muestras se sedimentaron por centrifugación a 300G. Luego se sembraron entre 10 a 20 microlitros del sobrenadante en acetato de celulosa.

### Electroforesis

Las muestras se evaluaron a través de la técnica de electroforesis bidimensional de uso clínico (2D UC)<sup>6,17</sup>. Se realizó un primer fraccionamiento de las proteínas por carga, mediante un proteinograma en acetato de celulosa gelatinizado (Cellologel-Biosystem), con buffer veronal pH 8,6; Fi 0,05 (Helena) a 200 voltios en corriente continua durante 30 minutos. Luego se sometió a un fraccionamiento por tamiz molecular mediante el equipo Mini proteom 3 System (Bio-Rad USA), utilizando un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12,5%. Luego se realizó la electroforesis vertical durante 45 min a 200 voltios en buffer tris glicina con SDS. Finalizado el procedimiento se realizó coloración argéntica.

La proteína PBT se identificó por única vez por Espectrometría de masa en LCR. El resultado de la determinación en la electroforesis por 2D UC indica presencia o ausencia de la proteína en las “coordenadas” Beta 1 (primera dimensión) y 29 kDa (segunda dimensión) (fig. 1).

## RESULTADOS (TABLA 1)

El seguimiento promedio fue de 16,79 meses (rango 2-37). De los 19 casos 5 (26,32%) presentaron antecedente de meningitis, de los cuales todos presentaron PBT positiva.

Del total de casos, 14 presentaron PBT positiva, siendo la causa principal postquirúrgica (n=9) con un tiempo promedio de aparición de 10,33 días pop (rango 2-24 días). De los casos positivos, 14 fueron tratados, 3 sin cirugía y 11 con cirugía. Del último grupo, en 9 pacientes se realizó una nueva exploración con cierre de fistula, en uno de ellos, se de-

TABLA 1: RESULTADOS. H: HOMBRE. M: MUJER. POP: POST-OPERATORIO. ATB: ANTIBIÓTICO. DLE: DRENAJE LUMBAR EXTERNO

Nº	Sexo	Edad	Secreción	Causa	Patología	PBT	Tratamiento	Tiempo secreción	Meningitis	Resultado	Control (M)
1	H	76	Drenaje	Post quirúrgica	Canal estrecho cervical	-	Control	2 pop	No	Favorable	36
2	M	62	Nasal	Post quirúrgica	Quiste de la bolsa de Rathke	+	Cirugía	8 pop	No	Favorable	35
3	M	45	Nasal	Espontánea	Rinitis	-	ATB	6 meses	No	Favorable	36
4	H	45	Piel	Post quirúrgica	Tumor intraventricular	+	Gorro compresivo	4 pop	No	Favorable	37
5	M	51	Nasal	Post quirúrgica	Tumor hipofisario	-	Control	4 pop	No	Favorable	27
6	H	25	Nasal	Traumática	TEC	+	Cirugía	1 semana	No	Favorable	12
7	M	58	Nasal	Espontánea	Rinitis	-	Control	6 meses	No	Favorable	24
8	M	65	Nasal	Traumática	TEC	+	Cirugía	6 meses	No	Desfavorable	14
9	M	23	Nasal	Post quirúrgica	Quiste óseo aneurismático	+	Cirugía	13 pop	Si	Favorable	23
10	M	62	Oído	Espontánea	Otitis media crónica	+	Cirugía	2 años	No	Favorable	19
11	M	29	Nasal	Post quirúrgica	Tumor hipofisario	+	Cirugía	9 pop	Si	Favorable	12
12	M	21	Nasal	Post quirúrgica	Cordoma de clivus	+	PL	7 pop	No	Favorable	11
13	H	42	Nasal	Post quirúrgica	Craneofaringioma	+	DLE	24 pop	Si	Favorable	10
14	H	27	Piel	Post quirúrgica	Ependimoma cola de caballo	+	Cirugía + DLE	21 pop	No	Favorable	6
15	M	45	Nasal	Post quirúrgica	Schwannoma vestibular	+	Cirugía	5 pop	Si	Favorable	2
16	H	76	Drenaje	Post quirúrgica	Revisión de artrodesis lumbar	+	DLE	2 pop	Si	Favorable	3
17	H	46	Nasal	Espontánea	Tumor hipofisario	+	Cabergolina	6 meses	No	Favorable	5
18	H	58	Nasal	Espontánea	Espontáneo	+	Cirugía	8 meses	No	Favorable	4
19	H	58	Nasal	Post quirúrgica	Poliposis nasal	-	Control	1 año	No	Favorable	3

ció, además, colocar un drenaje lumbar externo (DLE). Los restantes 2 casos sólo se colocó un DLE. En el 100% de los casos donde se evidenció la FLCR durante la cirugía, la PBT había sido positiva. De los 3 casos tratados sin cirugía, 1 caso se resolvió con punciones lumbares evacuadoras, otro mejoró con el tratamiento con cabergolina (prolactinoma) y el tercero mejoró con un vendaje compresivo, resolviéndose en todos los casos la fístula en forma exitosa. Trece casos tuvieron resultado “favorable” y uno “desfavorable” (actualmente en control por recidiva de rinorrea) con un seguimiento promedio fue de 13,79 meses (rango 2-37 meses).

De los 5 casos con PBT negativa ninguno fue intervenido quirúrgicamente, en 4 se realizó un seguimiento con controles periódicos y 1 con tratamiento antibiótico. Todos presentaron un resultado “favorable”. Ninguno presentó meningitis ni cefalea durante el periodo de seguimiento. El promedio de seguimiento fue de 25,2 meses (rango 3-36 meses).

## DISCUSIÓN

Las FLCR pueden ser clasificadas en traumáticas, post-quirúrgicas o espontáneas. La causa más frecuente es la traumática. Sin embargo, en nuestra serie de casos, debido a que nuestra institución no es un centro de derivación de pacientes con traumatismo encefalocraneano y, sumado a la cantidad de casos de patología de base de cráneo tratada, predominó la causa post-quirúrgica.

Dado que la presentación clínica de las FLCR generalmente es oligosintomática, con un inicio muchas veces tardío y solapado y, sumado al riesgo de complicaciones potencialmente graves, es que torna prioritario el correcto y precoz diagnóstico. Para ello es importante la utilización de un marcador que pueda detectar la presencia de LCR en diferentes secreciones.

Uno de los primeros marcadores que surgió fue la Glu-

cosa oxidada. Es un método fácil de usar, rápido, barato y disponible en todos los centros de salud. Sin embargo, Steedman en 1987<sup>16</sup> desestimó su uso como screening en FLCR traumáticas y luego Chan y col. en 2004<sup>3</sup> demostraron que presenta una baja sensibilidad y especificidad al compararlo con la B2TF. Además presenta falsos positivos en pacientes que se encuentran cursando un cuadro de vía aérea superior o hiperglucemia y falsos negativos en aquellos casos en los cuales la glucorraquia es baja como en las meningitis o hemorragias subaracnoideas<sup>2</sup>.

Otro marcador que se utiliza es la B2TF. Esta variante de la transferrina se encuentra específicamente en LCR, perilinfa y humor acuoso del ojo y es producida por la actividad de la enzima neuraminidasa presente en el cerebro. Risch y col. demostraron una sensibilidad del 84% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de FLCR<sup>15</sup>. En casos de muestras contaminadas, en especial con suero, el método se torna menos específico y más dificultoso de obtener, requiriendo además la comparación con la relación asilo/sialo en el suero<sup>4,11,12,13</sup>. Otra desventaja es que la B2TF puede verse aumentada en pacientes con alteración hepática<sup>19</sup>. La B2TF se detecta mediante la utilización de electroforesis con inmuno-marcación. Es, por lo tanto, una técnica cara, que puede llegar a demorar 8 hs, requiere de un laboratorio con profesionales especializados, muchas veces se debe comparar con una muestra de sangre venosa y, por último, no se encuentra ampliamente disponible<sup>4,11-13,19</sup>.

En las últimas décadas tomó importancia la PBT, ya que presenta una concentración 35 veces mayor en el LCR en comparación con la del suero, siendo la más alta entre todas las proteínas presentes en el LCR. Además, está ausente en lágrimas y secreciones nasales y se sintetiza principalmente en las leptomeninges<sup>7</sup>. Bachmann en 2000 describió una sensibilidad del 91,17% y una especificidad del 100% mediante el uso de inmunoelectroforesis, una técnica similar a la utilizada en nuestro laboratorio<sup>1</sup>. Su desventaja es que aumenta su concentración en pacientes con alteración en la función renal y dismi-

nuye durante una meningitis<sup>7</sup>. En nuestra serie de casos, sin embargo, se detectó la PBT en todos los pacientes con antecedente de meningitis en curso o ya tratada. Se trata de una proteína estable, por lo cual la muestra puede ser recolectada durante algunos días en el domicilio del paciente, en casos de ser una fístula intermitente, para luego ser remitida al laboratorio<sup>1</sup>. Por último, debido a que utilizamos la electroforesis bidimensional, la cual no sólo evidencia la presencia de la PBT, sino que, además, permite ver el patrón proteico de la muestra, ello aumenta la especificidad del estudio. Asimismo, mediante nefelometría se puede medir de forma simple, barata y veloz la concentración de PBT, pero dicha técnica no se encuentra disponible en nuestro país.

Respecto a las FLCR espinales, según una serie de 641 casos de descompresión lumbar presentados por Wang y col. se evidenció que la durotomía incidental fue la complicación más frecuente (14% de los casos)<sup>18</sup>. En la gran mayoría de casos se puede resolver intraoperatoriamente con el cierre dural primario. Sin embargo, si no son diagnosticadas y tratadas a tiempo, pueden provocar una FLCR cutánea con complicaciones graves como meningitis, síndrome de hipotensión de LCR o pseudomeningocele con posibilidad de afectación radicular. El diagnóstico de las FLCR espinales se torna muchas veces dificultoso ya que se debe diferenciar de seromas e infecciones que cursan con un cuadro similar<sup>8</sup>. En nuestra serie, se logró diagnosticar dos casos de FLCR espinales, una por medio de una gasa embebida por la secreción de la herida y otra de una muestra del drenaje de la lodge quirúrgica. Lo novedoso de este último caso, es que no existe ningún reporte de caso en la bibliografía de diagnóstico de FLCR a través del análisis del débito de un drenaje de herida quirúrgica, constituyendo un diagnóstico precoz.

## CONCLUSIÓN

La PTB permitió, en todos los casos positivos, detectar LCR en las secreciones estudiadas y en los negativos, descartarla.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bachmann G, nekic M, Michel O. Clinical experience with beta trace protein as a marker for cerebrospinal fluid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:1099-102.
- Baker E, Wood D, Brennan A, Baines D, Philips B. New insights into the glucose oxidase stick test for cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *Emergency Medicine Journal: EMJ*. 2005;22(8):556-557. doi:10.1136/emj.2004.022111.
- Chan DT, Poon WS, Ip CP, Chiu PW, goh KY. How useful is glucose detection in diagnosing cerebrospinal fluid leak? The rational use of CT and beta-2 transferrin assay in detection of cerebrospinal fluid fistula. *Asian J Surg* 2004;27:39-42.
- Chrostek L1, Szmítkowski M [CDT (desialylated transferrin)—a new biochemical marker of alcohol abuse]. *Psychiatr Pol*. 1999 Mar-Apr;33(2):189-201.
- Di Leiva A, Lee JM, Cusimano MD. Cerebrospinal fluid fistula in skull base pathologies. In: *Handbook of skull base surgery*. New York: Thieme Medical Publishers 2016, P 809-82.
- Facio ML, Madalena LB, Fraind S, Alejandro ME, Bresciani P y Pizzolato M. Electroforesis bidimensional en orina. Una alternativa para el laboratorio clínico. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47(1): 37-46.
- Felgenhauer K, Schädlich HJ, Nekic M. B-trace protein as marker for cerebrospinal fluid fistula. *Klin Wochenschr* 1987; 65:764-8.
- Haft GF, Mendoza SA, Weinstein SL, Nyunoya T, Smoker W. Use of Beta-2-Transferrin to Diagnose CSF Leakage Following Spinal Surgery: A Case Report. *The Iowa Orthopaedic Journal*. 2004;24:115-118.
- Mantur M, Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Kulakowska A, Ganslandt O, Kemona H, et al. Cerebrospinal fluid leakage-Realizable diagnostic methods. *Clin Chim Acta* 2011; 412(11-12):837-40.
- Meco C, Oberascher G, Arrer E, Moser G, Albegger K. Beta-trace

- protein test: new guidelines for the reliable diagnosis of cerebrospinal fluid fistula. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(5):508-517.
11. Nandapalan V, Watson ID, Swift AC. Beta-2-transferrin and cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *Clin Otolaryngol* 1996; 21: 259-64.
  12. Oberascher G. Cerebrospinal fluid otorrhea -new trends in diagnosis. *Am J Otol* 1988; 9: 102-8.
  13. Oberascher G. A modern concept of cerebrospinal fluid diagnosis in oto- and rhinorrhea. *Rhinology* 1988; 26: 89-103.
  14. Petereit HF, Bachmann G, Nekić M, Althaus H, Pukrop R. A new nephelometric assay for  $\beta$ -trace protein (prostaglandin D synthase) as an indicator of liquorrhoea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001. 71:347-351.
  15. Risch L, Lisek I, Jutzi M, Podvinec M, Landolt H, Huber AR. Rapid, accurate and non-invasive detection of cerebrospinal fluid leakage using combined determination of  $\beta$ -trace protein in secretion and serum. *Clin Chim Acta* 2005; 351(1-2):169-76.
  16. Steedman DJ, Gordon M. CSF rhinorrhoeae: significance of the glucose oxidase strip test. *Injury* 1987;18:327-8.
  17. Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacryl-amide gels. *Anal Biochem*.1979; 98: 323-7.
  18. Wang JC, Bohlman HH, Riew KD: Dural tears secondary to operations on the lumbar spine. *J BoneJoint Surg* 80A:1728-1732, 1998.
  19. Warnecke A, Averbeck T, Wurster U, Harmening M, Lenarz T, Stover T. Diagnostic relevance of beta2-transferrin for the detection of cerebrospinal fluid fistulas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:1178-84.