

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia sperimentale e  
diagnostica funzionale e per immagini del sistema  
cardio-polmonare

Ciclo XXVII

Valutazione delle caratteristiche istologiche  
delle lesioni pleuriche e corrispettivo profilo  
citologico del versamento pleurico

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Emilio Marangio

Relatore:  
Chiar.mo Prof. Emilio Marangio

Tutor:  
Dott.ssa Roberta Pisi

Dottorando: Dott.ssa Martina Rendo

INTRODUZIONE	3
Anatomia della pleura.	3
Istologia della pleura.	4
Fisiologia della pleura.	4
La patologia pleurica.	5
Diagnostica clinica.	6
Analisi di laboratorio.	8
Diagnostica strumentale.	11
Eziologia del versamento pleurico.	11
MATERIALI E METODI	14
ANALISI STATISTICA	16
RISULTATI	17
CONCLUSIONI	18
BIBLIOGRAFIA	19
FIGURE	20
TABELLE	21

## INTRODUZIONE

Il versamento pleurico, la presenza di liquido in eccesso nella cavità pleurica, può essere determinato da cause di varia natura: infettive (batteriche, virali), emodinamiche, neoplastiche, immunologiche, traumatiche; ha il significato di una condizione di “sofferenza della pleura” e frequentemente è la manifestazione clinica d’esordio di malattie pleuro-polmonari ma anche di accompagnamento o di aggravamento di patologie in altri organi. E’ un’importante causa di ricovero nelle U.O. pneumologiche e internistiche, e spesso causa di lunghe degenze.

### Anatomia della pleura.

La pleura è costituita da una membrana sierosa che ricopre la superficie polmonare e la separa dalla parete toracica, dal mediastino e dal diaframma. L’estensione della pleura viscerale a livello del polmone sottostante determina la formazione di scissure (una maggiore ed una minore a destra ed una singola maggiore a sinistra) che suddividono il polmone in lobi; i due foglietti pleurici si congiungono a livello ilare. Lo spazio interposto tra la pleura viscerale e parietale è lubrificato da una quantità molto piccola di liquido (15 - 30 ml complessivi pari 0,1- 0,2 ml/Kg di peso corporeo) che facilita il movimento ventilatorio del sistema toraco-polmonare.

Vascolarizzazione: la pleura viscerale è perfusa essenzialmente dai rami delle arterie bronchiali ma anche dal circolo polmonare, il drenaggio avviene nelle vene polmonari e nelle vene sistemiche. La pleura parietale è irrorata dalla circolazione sistemica (rami delle arterie intercostali ) e il drenaggio avviene nella cava superiore, attraverso le vene azygos e le emiazygos.

Sistema linfatico: nella pleura viscerale il plesso linfatico superficiale e profondo drena a livello dei linfonodi del mediastino medio e posteriore; nello strato mesoteliale della pleura parietale ci sono delle aperture (stomi) in comunicazione con la rete linfatica sottostante soprattutto a livello diaframmatico e mediastinico; hanno molta importanza nel processo di riassorbimento del liquido pleurico.

Innervazione: la pleura viscerale è innervata dall’ortosimpatico toracolombare. Nel tessuto connettivo della pleura parietale sono presenti fibre dolorifiche responsabili di una reattività algogena piuttosto elevata. Hanno origine diversa (n.n intercostali, vago, frenico) e in relazione al territorio innervato determinano sensazione dolorifica alla spalla omolaterale e nella parete toracica adiacente.

## Istologia della pleura.

La pleura viscerale è formata da tre strati:

- endopleura superficiale, costituita da uno strato continuo di cellule mesoteliali che rivestono una sottile rete di fibre elastiche e collagene;
- lamina elastica esterna, costituita da un sottile strato di tessuto elastico e collagene denso, il cui spessore varia, probabilmente a causa delle differenze di tensione pleurica durante il ciclo respiratorio;
- strato vascolare (interstiziale), costituito da tessuto connettivo contenente vasi sanguigni e linfatici è in continuità con il tessuto interstiziale dei setti interlobulari e forma una sottile lamina elastica interna che riveste il parenchima polmonare e separa gli alveoli dalla pleura, dai setti interlobulari e dai fasci broncovascolari.

La pleura parietale è costituita da uno strato di tessuto connettivo addossato alla fascia endotoracica della parete toracica ed è suddivisa in due sezioni da un tessuto fibroelastico.

Le cellule mesoteliali formano uno strato continuo lungo le superfici della pleura parietale e viscerale, la dimensione e la forma di queste variano in accordo con la pressione transpolmonare (in seguito all'espansione del polmone le cellule si appiattiscono). La superficie cellulare è tipicamente ricoperta da numerosi, lunghi e sottili microvilli che svolgono anche una funzione protettiva verso le cellule mesoteliali (trauma conseguente al movimento pleurico nel corso della respirazione). Le cellule mesoteliali sono metabolicamente attive e svolgono numerose funzioni come: la produzione dei componenti del tessuto connettivo sottomesoteliale, la regolazione della composizione e della quantità di liquido pleurico. I fosfolipidi probabilmente sintetizzati dalle cellule mesoteliali sono simili a quelli presenti nel surfattante alveolare e svolgono un'azione lubrificante che facilita il movimento dei foglietti pleurici.

## Fisiologia della pleura.

La pressione vigente nel cavo pleurico è determinata dalla differenza tra le forze elastiche toraciche e quelle polmonari. A Capacità Funzionale Residua (CFR) il polmone tende a retrarsi verso l'interno mentre la forza elastica della parete toracica e della gabbia costale è diretta verso l'esterno. La risultante tra la retrazione elastica polmonare e la forza espansiva della gabbia toracica è una pressione negativa di -5 cmH<sub>2</sub>O. Questo valore non è uniforme lungo tutto il cavo

pleurico ma è più negativo all'apice e meno alla base con un gradiente di 0,2 cmH<sub>2</sub>O per ogni cm. di altezza.

Tra la pleura viscerale e parietale c'è uno spazio virtuale di 10-20 μ (cavità pleurica) nel quale è presente un sottile film liquido, che svolge varie funzioni, fra cui quella di lubrificare le superfici dei foglietti pleurici in modo da ridurre l'attrito tra la gabbia toracica e il parenchima polmonare e facilitare l'atto respiratorio. La piccola quantità di liquido presente nello spazio pleurico viene prodotta dalla pleura parietale e riassorbita dalla viscerale. La produzione e il riassorbimento è un continuo processo dinamico regolato dalla legge di Starling, basata sui gradienti di pressione idrostatica vigente nei capillari della pleura parietale e la pressione colloidale-osmotica nei capillari sistemici:

$$F = K (P_{cap} - P_{pl}) - \sigma (\pi_{cap} - \pi_{pl})$$

F = uscita netta di liquido

K = costante di permeabilità

P<sub>cap</sub> = pressione idrostatica capillare

P<sub>pl</sub> = pressione idrostatica fluido interstiziale

π<sub>cap</sub> = pressione oncologica capillare sistemico

π<sub>pl</sub> = pressione oncologica fluido interstiziale

σ = coefficiente di riflessione osmotica per le proteine.

### La patologia pleurica.

Non si hanno dati certi sull'incidenza della patologia pleurica, diversi fattori ne influenzano la distribuzione (area geografica, età della popolazione, identificazione della patologia, condizioni socio-economiche). Nei paesi industrializzati, si stima intorno ai 300 casi x 100.000 abitanti, nei paesi dove la malattia tubercolare ha ancora un'alta prevalenza, la pleurite tubercolare rappresenta il 25-35% di tutti i versamenti. Negli USA Light riporta circa 1.300.000 nuovi casi/anno di versamento pleurico con netta prevalenza dello scompenso cardiaco congestizio, seguito da pleuropatie infettive e neoplastiche; uno studio più recente condotto da Marel conferma questo andamento (Tab. 1).

La perdita di equilibrio tra produzione e riassorbimento di liquido attraverso le membrane, si traduce in un accumulo di fluido nel cavo (Fig.1)

I meccanismi patogenetici che possono portare a un versamento pleurico possono essere da cause intratoraciche o sistemiche (Tab. 2).

### Diagnostica clinica.

Un'accurata raccolta dei dati anamnestici (esposizione a sostanze nocive, abitudine tabagica, pregresse patologie infettive), un attento esame clinico obiettivo (dolore pleurico, tosse, febbre, emottisi), una radiografia del torace nelle due proiezioni (standard e laterale) rappresentano, il primo approccio diagnostico ad un versamento pleurico.

La sintomatologia è collegata alla quota liquida presente nel cavo pleurico e alla velocità con la quale si è formata, anche se in alcuni casi di versamenti di lieve entità, il decorso clinico, può essere asintomatico (10%).

Il dolore toracico e la dispnea sono i sintomi più comuni ai quali possono associarsi, con frequenza variabile, febbre, tosse, perdita di peso, anoressia e altri sintomi eventualmente collegati alla malattia di base responsabile del versamento. Il dolore pleurico (pleurodinia) è causato dall'irritazione delle fibre sensitive presenti nella pleura parietale, ha quasi sempre carattere puntorio, si accentua con gli atti respiratori, con i colpi di tosse e le manovre espiratorie forzate.

La dispnea è frequente e si manifesta in genere per versamenti superiori ai 500 ml, il sintomo è presente nel 50% della patologia pleurica neoplastica e in corso di scompenso cardiaco congestizio. Se la quota di versamento è abbondante, con compressione del parenchima polmonare, dislocazione del mediastino e compromissione della funzione respiratoria, la dispnea potrà essere severa. La tosse è secca, ma può diventare produttiva quando c'è anche l'interessamento broncopolmonare. Se la pleurite compare e si associa all'infezione polmonare è definita parapneumonica, se insorge in un tempo successivo alla patologia broncopolmonare è chiamata metapneumonica.

Nel versamento parapneumonico è presente il dolore che si accompagna a febbre, tosse ed espettorato muco-purulento o striato di sangue. Nella pleurite tubercolare,

più frequente nei giovani adulti, il dolore toracico si associa a tosse, febbre e dispnea.

La presenza di un versamento pleurico di modesta entità (meno di un terzo dell'emitorace) associato a dispnea e dolore toracico insorto improvvisamente, deve far sospettare la possibilità di un accidente vascolare acuto (embolia, infarto polmonare). Il versamento, in un fumatore o in un lavoratore in ambiente a rischio, associato a dolore toracico, tosse stizzosa, emoftoe, deve indurre al sospetto di una probabile patologia neoplastica primitiva pleurica o polmonare. Un versamento bilaterale associato a edemi declivi, ortopnea, alterazioni del ritmo cardiaco, valori pressori elevati è molto probabile che sia secondario a insufficienza cardiaca e scompenso di circolo.

Dal punto di vista semeiologico un versamento può essere obiettivato quando è superiore ai 300 mL:

- all'ispezione si rileva una ipomobilità dell'emitorace interessato e la tendenza del paziente a decubare sul lato malato in modo da favorire il movimento toracico controlaterale;
- alla palpazione, in corrispondenza dell'area interessata dal versamento, c'è la riduzione o assenza del fremito vocale tattile (FVT) e la zona può essere dolente e calda;
- alla percussione si evidenzia ipofonesi o ottusità al margine superiore della linea di Damoiseau-Ellis, suono timpanico nel triangolo di Garland, suono ottuso nel triangolo paravertebrale di Grocco (Fig.2);
- all'auscultazione una riduzione o assenza del murmure vescicolare (MV), un soffio bronchiale al margine superiore e sfregamenti nella parte inferiore del versamento.

La toracentesi rappresenta l'esame di prima istanza per l'inquadramento diagnostico. Deve essere eseguita in condizioni di massima sterilità per evitare di infettare il cavo pleurico. Con una toracentesi esplorativa (50/100 ml) è possibile sia una valutazione macroscopica del liquido che l'effettuazione di numerose indagini su campioni di liquido pleurico (es. chimico-fisico, batteriologico e citologico). (Tab. 3).

Nei versamenti massivi la toracentesi evacuativa, può essere anche terapeutica, infatti il drenaggio del liquido presente nel cavo, riduce la compressione polmonare e migliora la dispnea. Fare attenzione a non rimuovere tutto il liquido in un'unica

seduta (max 1500 ml) per non indurre brusche variazioni di pressione che possono causare tosse e dispnea.

Controindicazioni alla toracentesi sono: la tosse incoercibile, scompenso cardiaco congestizio, gravi coagulopatie, enfisema di grado elevato, infezioni della parete toracica.

### Analisi di laboratorio.

- Esame chimico-fisico.

L'analisi della composizione chimica del versamento pleurico aiuta a comprendere il meccanismo patogenetico che ha portato alla formazione. Un primo elemento fondamentale per la diagnosi è differenziare il trasudato dall'essudato (Tab. 4):

- il trasudato ha un colore chiaro, l'aspetto è limpido, il sedimento è scarso, il contenuto proteico è

< a 30 g/l, peso specifico <1015;

- l'essudato ha il colore giallo-paglierino, l'aspetto torbido, il sedimento è abbondante, il contenuto proteico > a 30 g/l, peso specifico >1015.

I criteri di Light (contenuto proteico e LDH) e alcuni criteri aggiuntivi (proteine, colesterolo) rappresentano il "gold standard" (sensibilità del 95% specificità del 65%) nella capacità di differenziazione tra essudati e trasudati. Si definisce "essudato" quando:

- Criteri di Light -

- concentrazione proteine totali liquido pleurico/proteinesiero > 0.5
- concentrazione LDH liquido pleurico/LDHsiero > 0.6
- LDH liquido pleurico > 200 UI/l o > 2/3 del valore normale LDH nel siero

- Criteri aggiuntivi -

- LDH liquido pleurico > 0.45 rispetto al limite maggiore del valore normale del LDH nel siero
- concentrazione Colesterolo liquido pleurico > 45 mg/dL
- Proteine liquido pleurico > 2.9 g/dL
- Albuminasierica - albumina liquido pleurico < 1.2.

- pH

In condizioni normali il valore è uguale a quello ematico; nei trasudati è leggermente superiore (7,42 - 7,55) al pH del sangue. Il pH acido ( $\leq 7,30$ ) è prodotto dal metabolismo anaerobico del glucosio da parte dei batteri (formazione di CO<sub>2</sub> e



lattato) o delle cellule tumorali. Si rileva nella tubercolosi, nelle neoplasie, nel versamento parapneumonico, empiema, rottura esofagea, lupus, pleurite reumatoide. Valori al di sotto di 7,20 sono indicativi di ulteriori complicanze e di una prognosi peggiore.

- Glucosio.

La glicometria ha valori simili al sangue. Valori bassi (anche <60 mg/dl) si riscontrano nella pleurite reumatoide, empiema, nel lupus, neoplasie, nella tubercolosi, nella rottura esofagea e traumi toracici.

- Amilasi.

Se nell'essudato si trova un rapporto amilasi liquido pleurico/amilasi del siero >1 associato a un valore elevato di LDH la diagnosi differenziale può essere tra: pancreatite acuta, pseudocisti pancreatica, rottura esofagea, rottura di una gravidanza ectopica e neoplasia. In quest'ultima patologia, recenti studi hanno evidenziato una ridotta sopravvivenza nei versamenti con valori elevati di amilasi (>600U/l)

- LDH

In condizioni normali il valore è del 50% inferiore rispetto al livello plasmatico. Valori elevati si trovano nell'essudato ed esprimono la gravità del processo infiammatorio. Nelle pleuriti parapneumoniche se i valori sono <500 U/l il versamento viene classificato non complicato; se valori >1000 U/l il versamento è complicato (empiema).

- Conta cellulare e formula.

In caso di versamento ematico, l'aspetto macroscopico del liquido può essere rosso vivo o francamente emorragico, rosato o siero emorragico, rosso scuro, come nei versamenti di vecchia data. E'opportuna una valutazione dell'ematocrito liquido pleurico/sangue periferico: se il rapporto è >50%, si tratta di un emotorace. Una conta di oltre 100.000 GR/mm<sup>3</sup> in assenza di trauma, induce al sospetto di una neoplasia, un'embolia polmonare, una pleurite asbestosica.

Leucociti: con valori < 1000/μl è un trasudato; se è >5000 e va oltre 10.000/μl può trattarsi di neoplasia primitiva o secondaria, TBC, artrite reumatoide, LES, chilotorace; valori >50.000/μl nell'empiema, pancreatite, infarto polmonare.

Neutrofili: un aumento >50% sta a indicare un processo flogistico o infettivo acuto (batterico o virale), una pleurite da asbesto, la pleurite tubercolare. Se c'è anche il coinvolgimento del parenchima polmonare può trattarsi di versamento parapneumonico o di embolia con infarto polmonare.

Linfociti: sono presenti nei processi infiammatori cronici. Una quota superiore al 50-70% fa sospettare una neoplasia; quote più elevate (80-90%) si trovano nei linfomi, nel chilotorace, nella pleurite reumatoide e nei versamenti tubercolari.

Eosinofili: quote  $\geq 10\%$  del totale si trovano in corso di infarto polmonare, traumi della pleura, pneumotorace spontaneo, malattie parassitarie e infezioni fungine, ipersensibilità ai farmaci, esposizione all'asbesto, S.di Churg-Strauss.

Basofili: non frequenti; una presenza  $> 10\%$  è indicativa di un'infiltrazione leucemica o di mieloma multiplo o plasmocitomi.

Cellule mesoteliali: si possono trovare nei versamenti trasudatizi e in quelle situazioni in cui c'è un'esfoliazione di cellule mesoteliali nel cavo.

Cellule LE: il riscontro può essere positivo nell'80% dei casi di manifestazioni polmonari di lupus eritematoso e può avere valore diagnostico. Di solito la positività si associa ad analoga positività sul siero per cui il test non aggiunge particolare valore diagnostico rispetto a quanto già riscontrato sul siero.

- Citologia e immunoistochimica.

La positività dell'indagine citologica sul liquido pleurico varia dal 50 al 80% dei versamenti maligni, con percentuali molto alte, vicine al 100%, se è un adenocarcinoma. Percentuali più basse si hanno per i carcinomi a cellule squamose (20%), i linfomi (25-40%) e sarcomi (25%); la citologia è meno efficace in caso di mesotelioma (10%).

La determinazione dell'antigene carcinoembrionario (CEA), dell'antigene 125 (CA-125) e del frammento-19-citocheratina (CYFRA 21-1) nei versamenti pleurici maligni, non mostra un'accuratezza significativa e una particolare sensibilità.

L'immunoistochimica con l'impiego di anticorpi monoclonali specifici per cellule mesoteliali, cellule del mesotelioma maligno e adenocarcinomi, offre la possibilità di distinguere un adenocarcinoma metastatico da un mesotelioma maligno

- Markers per TBC.

Dosaggio dell'enzima adenosina-deaminasi (ADA) nel liquido pleurico (cut-off 45-60U/l), ha dimostrato una sensibilità del 99% e una specificità del 97% nella diagnosi di pleurite tubercolare (valori di ADA  $> 50\text{U/l}$ ). Altri due test altrettanto utili, ma più complessi e costosi, sono il livello di IFN- $\gamma$  che è elevato nel liquido pleurico tubercolare (cut off 3,7 U/mL) e la ricerca del DNA del M. tuberculosis con il test di amplificazione genica: polymerase chain reaction (PCR).

- Colorazione di Gram.

Se sussiste il sospetto di una eziologia infettiva si può utilizzare la colorazione di Gram e la coltura per batteri aerobi e anaerobi.

### Diagnostica strumentale.

#### - Ecotomografia del torace

Può precedere la toracentesi e risulta utile tanto per la conferma della diagnosi che per lo studio del tipo di versamento: libero, saccato, in via di organizzazione.

#### - Tomografia assiale Computerizzata (TAC).

Non viene richiesta routinariamente in quanto non trova un'indicazione elettiva nella diagnosi dei versamenti pleurici. Può dare maggiori informazioni, dopo toracentesi evacuativa, sulla condizione polmonare (zone di atelettasia, infiltrati polmonari) e mediastinica (linfadenomegalie), sulla presenza di piccoli noduli di sospetta natura neoplastica, di placche, ispessimenti e calcificazioni pleuriche.

#### - Toracosopia.

E' indicata soprattutto nei versamenti pleurici recidivanti, nei quali, nonostante le varie indagini effettuate, non si è riusciti ad ottenere la diagnosi. La toracosopia può essere chirurgica (Video Assisted Thoracic Surgery - VATS eseguita in anestesia generale) e medica (paziente in anestesia locale, non intubato, in respirazione spontanea). Con l'introduzione del toracoscopio, attraverso una piccola incisione nella parete toracica è possibile esaminare la pleura parietale, viscerale ed eseguire biopsie multiple mirate. La metodica permette di identificare la presenza di una neoplasia primitiva o secondaria e di infiltrati tubercolari, con una positività dall'80 al 93% di tutti i casi sottoposti a tale indagine.

#### - Agobiopsia della pleura.

In corso di toracentesi, utilizzando gli aghi di Cope o di Abrams, oltre al drenaggio del liquido si può eseguire la biopsia pleurica percutanea, che consente di ottenere frammenti di tessuto della pleura parietale. La metodica è utile soprattutto per la diagnosi istologica della pleurite tubercolare e di quella neoplastica (sensibilità 70-90%).

### Eziologia del versamento pleurico.

- Versamento secondario ad infezione virale: è presente nel 10-15% dei casi di pleurite e può essere dimostrato nel 20% dei pazienti con polmonite virale. Il

versamento, in genere, è di piccola entità, asintomatico e spesso non viene diagnosticato in quanto si risolve spontaneamente.

- Versamento secondario ad infezione batterica - parapneumonico: può essere una frequente complicanza di una polmonite pneumococcica (40%) o da altri agenti (20% - Mycoplasma, Chlamidia). Clinicamente si manifesta con tosse, febbre, dolore toracico e dispnea. Nella maggior parte dei casi il versamento "parapneumonico-semplice" è monolaterale e si risolve con la terapia antibiotica e gli antiinfiammatori; nei versamenti "complicati" dalla presenza di sacchature tra i foglietti pleurici, con pH <7,20, LDH aumentato, glucosio diminuito, oltre al trattamento antibiotico è necessaria l'evacuazione del liquido con una o più toracentesi.

In alcuni casi il versamento può infettarsi e nel cavo pleurico compare un liquido torbido o francamente purulento: l'empiema. Nella maggior parte dei casi è secondario a diffusione per contiguità da un focolaio pneumonico o sottodiaframmatico (ascesso epatico), ma può svilupparsi per altre cause: disseminazione ematogena, infezione post-chirurgica, in soggetti defedati, immunocompromessi(AIDS), alcolisti, diabetici. I microrganismi responsabili sono aerobi gram-positivi (S.pneumoniae, St.aureus) ma anche in misura minore gram-negativi (Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella, Serratia) e anaerobi (Bacteriodes fragilis, Clostridium). Le manifestazioni cliniche: dolore toracico, febbre elevata, tosse, espettorazione talvolta maleodorante, grave stato tossisemico. Evoluzione:

- fase fibrinopurulenta con deposizione di fibrina e formazione di numerose concamerazioni e sinechie pleuriche;
- fase cronica nella quale c'è la proliferazione fibroblastica, la presenza di cottenne pleuriche che incarcerano il polmone, ne impediscono la riespansione e ostacolano la meccanica toraco-polmonare.

Le complicanze, piuttosto frequenti in era preantibiotica, sono la fistolizzazione dell'essudato verso il polmone (fistola broncopleurica) o verso la parete toracica (empiema necessitatis).

- Versamento tubercolare: la pleurite tubercolare, è ancora oggi una patologia piuttosto frequente nelle zone dove la malattia ha un'alta incidenza. Il versamento può essere primitivo: ad esordio acuto, in assenza di lesioni polmonari o extra polmonari, quale espressione della tubercolosi primaria che si manifesta nei soggetti giovani, con uno stato particolare di reattività immunologica (ipersensibilità ritardata); secondario: da riattivazione di pregressi processi

tubercolari (infezione post-primaria), in soggetti adulti o anziani debilitati o in pazienti immunodepressi; il decorso è subdolo, senza febbre, modesti sintomi respiratori, decadimento delle condizioni generali. L'esame radiologico del torace, può evidenziare oltre al versamento anche le lesioni parenchimali.

Il versamento, molto spesso monolaterale, è un essudato, giallo paglierino in cui prevalgono i linfociti (>65%): il valore dei T linfociti CD4+ è molto più alto che nel siero, mentre i B linfociti sono bassi. Esami utili ai fini dell'orientamento diagnostico sono: i livelli di ADA (v.soglia 50/U/l), il lisozima, l'INF- $\gamma$  che ha un'elevata sensibilità e la PCR (positività dal 30 al 60%).

L'agobiopsia pleurica, per via percutanea e la toracoscopica, permettono di ottenere frammenti di tessuto della pleura parietale, nei quali è possibile evidenziare la presenza dei tipici granulomi tubercolari. Per la diagnosi definitiva di tubercolosi pleurica è necessario l'identificazione del micobatterio nel liquido con l'esame diretto o colturale (positività 20-40%).

- Versamento neoplastico: il tumore del polmone, della mammella e i linfomi, sono responsabili del 75% dei versamenti pleurici maligni; altri tumori che possono interessare secondariamente la pleura, sono il carcinoma ovarico e gastrico. Il versamento spesso è un essudato, giallo citrino, ma può essere siero ematico o francamente emorragico. I valori di LDH sono aumentati, il glucosio è normale e il pH  $\geq 7,30$  (valori inferiori si associano ad una prognosi infausta). La presenza di cellule neoplastiche nell'essudato è un evento sfavorevole, in quanto ha significato di malattia tumorale in fase avanzata e disseminata.

Le manifestazioni cliniche sono correlate alla malattia di base, il paziente potrà accusare tosse, dolore toracico, perdita di peso e, in rapporto all'entità del versamento e al tempo di formazione si manifesterà dispnea da sforzo o anche a riposo. Per la diagnosi, l'esame citologico del liquido pleurico è la metodica più semplice e può dare una positività dal 35 al 85%; la biopsia percutanea dà percentuali minori, mentre la toracoscopia è la più accurata con una sensibilità di oltre il 90%. La metodica può essere anche utilizzata per la somministrazione di sostanze sclerosanti come la polvere di talco per indurre una pleurodesi.

- Il mesotelioma è una neoplasia primitiva della pleura strettamente collegata all'esposizione all'amianto. In circa i 2/3 dei pazienti è presente il versamento pleurico che, può raggiungere notevoli proporzioni, ha le caratteristiche dell'essudato, giallo paglierino o sieroematico. Le prime manifestazioni cliniche sono alquanto aspecifiche: da un dolore vago alla spalla e al torace alla pleurodinia;

con il progredire della malattia comparirà la dispnea, la tosse secca e stizzosa, profonda astenia e calo ponderale. La diagnosi di mesotelioma può essere sospettata sulla base dei dati anamnestici, clinici e radiologici soprattutto la TC (ispessimento pleurico unilaterale simile a una placca o lobulato, versamento pleurico, invasione della parete toracica e del mediastino) ma anche RM e PET. Sul campione di liquido pleurico è possibile effettuare misurazioni dell'antigene carcinoembrionario (CEA), della Lung surfactant protein-A (SP-A) e dell'ac. ialuronico per un aiuto nella diagnosi differenziale tra il mesotelioma (livelli elevati di ac. ialuronico), l'adenocarcinoma (CEA e SP-A elevati) e il ca. metastatico (CEA basso). L'esame citologico non sempre è in grado di differenziare le cellule mesoteliali reattive da quelle neoplastiche e da un adenocarcinoma. La toracosopia consente sia l'esplorazione del cavo pleurico che l'esecuzione di prelievi biotipici ed è la procedura migliore per ottenere una diagnosi di certezza.

- Chilotorace.

È la raccolta di linfa (chilo) nello spazio pleurico. Le cause sono numerose dall'ostruzione alla rottura per trauma del dotto toracico, alle forme congenite. La lesione che provoca ostruzione è spesso una neoplasia (linfomi, ca. polmonare, metastasi linfonodali ilari), il versamento è bilaterale, presenta il caratteristico aspetto "lattescente" ha un elevato contenuto di chilomicroni e trigliceridi. I traumi da ferite penetranti o possono conseguire a procedure chirurgiche. La linfangiografia ha un ruolo importante e lo studio consente di delineare meglio l'eventuale sede della lesione.

## MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato in modo retrospettivo le cartelle di 148 pazienti, 98 maschi e 50 femmine, afferiti alle U.O. di Clinica Pneumologica, Pneumologia ed Endoscopia Toracica e Day Hospital pneumologico dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma per versamento pleurico in corso di accertamenti. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a toracentesi o a toracosopia a scopo diagnostico e/o terapeutico. Abbiamo preso in considerazione alcune notizie clinico anamnestiche (tabagismo, dispnea, tosse, espettorato, dolore pleurico, febbre) e dati laboratoristici (LDH nel liquido pleurico (LDH pl), LDH pl/LDH sierico, Proteine nel liquido pleurico (Proteine pl), Proteine pl/ Proteine sieriche, concentrazione di

Glucosio nel liquido pleurico). Durante ciascun esame sono stati raccolti diversi campioni: i campioni ad uso microbiologico sono stati inviati al Laboratorio centrale dell'Azienda Ospedaliera, quelli ad uso citologico ed istologico all'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera, un campione è stato analizzato in estemporanea con emogasanalizzatore presente in struttura per la determinazione del pH e un ulteriore campione è stato inviato al nostro laboratorio per caratterizzazione morfologica e citologica del liquido al fine di stabilire le popolazioni cellulari presenti. Una volta consegnato in laboratorio, si esaminano le caratteristiche macroscopiche del liquido, riportandone il colore e la limpidezza, e il grado di acidità (pH). Viene quindi processato e analizzato nel più breve tempo e comunque mai oltre le due ore dopo l'esecuzione della procedura di raccolta. Nel caso in cui debba trascorrere un periodo di tempo maggiore, il campione viene conservato a 4°C, e comunque mai analizzato oltre le 72 ore dal prelievo. Dopo aver mescolato omogeneamente il campione con pipetta Pasteur, si esegue una prima centrifugazione del campione (per dieci minuti alla velocità di 1200 rpm) per ottenere la separazione del pellet dal sovrantante. Il sovrantante viene in parte conservato in apposite provette Eppendorf da 1.5 ml e stoccato a -20°C, mentre il pellet viene utilizzato per le fasi successive di processazione. Si prepara poi una serie di diluizioni atte ad ottenere una concentrazione di circa  $30 \times 10^3$  cellule per la preparazione dei vetrini. Le diluizioni si ottengono diluendo il pellet cellulare attraverso l'utilizzo del PBS che permette il lavaggio delle cellule. I vetrini così ottenuti vengono posti in centrifuga (per dieci minuti alla velocità di 600 rpm). Dopo la centrifugazione, i vetrini vengono lasciati ad asciugare per almeno un'ora i vetrini (meglio over-night se non c'è urgenza). Successivamente i vetrini vengono posti nella vaschetta con colorante May Grünwald, curandosi di ricoprire accuratamente i pozzetti del vetrino, per 15 minuti; trascorso questo tempo si effettua un lavaggio nella vaschetta con acqua di fonte, eliminando la soluzione alcolica che sarà smaltita secondo l'apposito protocollo. Una volta lavato il vetrino, lo si sistema nella vaschetta con colorante Giemsa. Dopo venti minuti si effettua nuovamente il lavaggio con acqua di fonte e lo smaltimento della soluzione lavata. Dopo la colorazione, si lasciano asciugare per almeno un'ora i vetrini. A questo punto si applica il copri oggetto in modo che sia possibile la lettura. La lettura si effettua al microscopio ottico con ingrandimento 100x per la conta cellulare differenziale (CCD), in cui viene riportata separatamente la componente di macrofagi, neutrofilo, linfociti e eosinofili, espressa in % sul totale. La CCD viene

effettuata su un totale almeno di 400-600 cellule con doppia lettura in cieco; viene infine registrata la media delle due letture.

Schematicamente la processazione del liquido pleurico avviene secondo i seguenti punti:

- Centrifugare il campione per 10 minuti a 1200 rpm
- Separare il sovrantante dal pellet cellulare
- Trasferire il sovrantante in cryovials che vengono chiuse e contrassegnate col numero di riferimento e quindi stoccate a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Preparazione delle diluzioni opportune con PBS per ottenere una concentrazione ottimale di  $30-40 \times 10^3$  cellule
- Preparazione dei citospin con i relativi vetrini
- Citocentrifugazione a 600 rpm per 10 minuti
- Lasciare asciugare, indi effettuare la colorazione dei preparati con colorante May-Grunwald-Giemsa
- Effettuare la conta cellulare differenziale
- Contare almeno 800 cellule in due conte differenziali in cieco e riportare la percentuale di macrofagi, neutrofil, eosinofili e linfociti
- Effettuare la media delle due CCD

Parametri di controllo finale:

Conta di 400 cellule in campi randomizzati come raccomandano le linee guida internazionali.

Lettura in cieco dei vetrini.

Verifica da parte del responsabile del laboratorio.

Rilettura dopo un intervallo di tempo libero di un vetrino a caso (non deve discostarsi dai valori della precedente lettura di non più del 10%).

## ANALISI STATISTICA

I pazienti sono stati divisi in 5 gruppi in base alla diagnosi finale: tumore primitivo, tumore secondario, infezione non tubercolare, infezione tubercolare, infiammazione aspecifica/scompenso cardiaco. Le analisi comparative sono state ottenute usando il test della t di Student per valutare le differenze di pH, rappresentazione di grandi cellule mononucleate (GCM) e linfociti (L) nel liquido pleurico dei diversi gruppi di



pazienti alla conta cellulare eseguita nel nostro laboratorio. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di  $P < 0.05$ .

## RISULTATI

Abbiamo confrontato il gruppo di pazienti affetti da infezione non tubercolare (gruppo 3) con quello di pazienti affetti da tumore primitivo del polmone (gruppo 1) ed è stata rilevata una differenza statisticamente significativa nel valore di pH e nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM). (Tab. 5)

Confrontando il gruppo di pazienti affetti da infezione tubercolare (gruppo 4) con quello di pazienti affetti da tumore primitivo del polmone (gruppo 1) abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa nel valore di pH, nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM) e di linfociti (L). (Tab. 6)

Confrontando anche il gruppo di pazienti affetti da infezione tubercolare (gruppo 4) con quello di pazienti affetti da secondarismi polmonari (gruppo 2) è stata rilevata una differenza statisticamente significativa nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM). (Tab. 7)

Abbiamo inoltre confrontato il gruppo di pazienti affetti da infezione non tubercolare (gruppo 3) con quello di pazienti affetti da infezione tubercolare (gruppo 4) ed è stata rilevata una differenza statisticamente significativa nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM) e linfociti (L). (Tab. 8)

Confrontando il gruppo di pazienti affetti da infezione non tubercolare (gruppo 3) con quello di pazienti affetti da infiammazione aspecifica o scompenso cardiaco (gruppo 5) è stata rilevata una differenza statisticamente significativa nel valore di pH e nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM). (Tab. 9)

Infine confrontando il gruppo di pazienti affetti da infezione tubercolare (gruppo 4) con quello di pazienti affetti da infiammazione aspecifica o scompenso cardiaco (gruppo 5) abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa nel

valore di pH , nella conta cellulare di grandi cellule mononucleate (GCM) e linfociti (L). (Tab. 10)

## CONCLUSIONI

La conta cellulare al microscopio ottico è una metodica semplice, veloce ed economica. Inserirla nel percorso diagnostico-terapeutico dei pazienti affetti da versamento pleurico, ponendo particolare attenzione al valore di pH e alla conta cellulare di grandi cellule mononucleate e linfociti a completamento del quadro clinico e anamnestico può essere molto utile per una diagnosi tempestiva, per un inizio precoce della terapia, per accelerare l'iter diagnostico e quindi per abbreviare i tempi di degenza. Questa metodica può essere particolarmente utile in caso di scarse risorse e tecnologie laboratoristiche e condizioni disagiate.

## BIBLIOGRAFIA

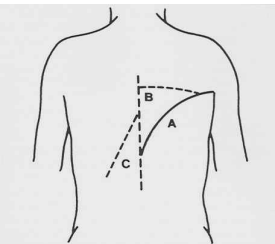
1. Noppen M, De Waele M, Li R, Vander Gucht K, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* Vol. 162 pp. 1023-1026, 2000
2. Sahn SA. Pleural Disease. *ACCP Pulmonary Med Brd Rev* pp. 513-546, 2010
3. Sahn SA. The value of pleural fluid analysis. *Am J Med Sci* 2008; 335(1):7-15
4. Antony BV, Godbey SW, Kunkel SL, Hott WJ, Hartman DL, Burdick MD, Strieter RM. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. *The American association of immunologists*, vol 151, 7216-7223, 1993
5. Valdes L, San José ME, Pose A, Gude F, Gonzalez-Barcala FJ, Alvarez-Dobano JM, Sahn SA. Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis; a study of patients less than 40 years old in an area with high incidence of tuberculosis. *Respiratory medicine* 2010
6. Kalomenidis I, Light RW. Eosinophilic effusions. *Cur Opin Pulm Med* 2003, 9;254-260
7. Krenke R, Nesilowinsky J, Korczynski P, Gorska K, Przybylowski T, Chazan R, Light RW. Incidence and aetiology of eosinophilic pleural effusion. *Eur Respir J* 2009; 34, 1111-1117
8. Haffner JE, Klein J. Parapneumonic effusion and empyema. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, vol. 22, number 6, 2001
9. Luis Valdes, M Esther San José, Antonio Pose, Francisco Gude, Francisco J Gonzalez-Barcala, José M Alvarez-Dobano, Steven A Sahn. Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis. A study of patients less than 40 years-old in an area with a high incidence of tuberculosis. *Respiratory Medicine* (2010) 104, 1211-1217.
10. Nicola Dalbeth and Y.C.Gary Lee. Lymphocytes in pleural disease. *Curr Opin Pulm Med* 2005, 11:334-339
11. Angelo G. Casalini. *Pneumologia interventistica*. Casa Editrice Spirnger, 2007.

## FIGURE

Fig. 1 - Rx torace: versamento pleurico dx



Fig. 2 - A: linea di Damoiseau-Ellis; B: triangolo di Garland; C: triangolo paravertebrale opposto di Grocco



## TABELLE

Tab. 1.

Causa principale di versamento:	
Scompenso cardiaco congestizio	50%
Patologia neoplastica	21.8%
Patologia infettiva	17%
Embolia polmonare	5,6%
Totale	94,4%

Tab. 2 .

<i>Meccanismo patogenetico</i>	<i>Patologia correlata</i>
Alterata permeabilità delle sierose pleuriche	Patologia neoplastica, infiammatoria, embolia polmonare
Riduzione della pressione oncotica intravascolare	Ipoalbuminemia, cirrosi epatica
Aumentata permeabilità capillare o distruzione del letto vascolare	Traumi, neoplasie, processi infiammatori ed infettivi, infarto polmonare, uremia, pancreatite, danno da farmaci
Aumento della pressione idrostatica nel circolo sistemico o polmonare	Scompenso cardiaco congestizio, sindrome della vena cava superiore
Riduzione della pressione nello spazio pleurico	Atelettasia polmonare, trapped lung
Ridotto drenaggio linfatico	Neoplasie, traumi
Accumulo di liquido nella cavità peritoneale con passaggio attraverso la rete linfatica ed i pori del diaframma	Cirrosi epatica, dialisi peritoneale

Tab. 3.

Giallo citrino - Giallo verde	Trasudato non specifico; Pleurite reumatoide
Ematico - Siero-ematico Marrone - Nero	Emotorace traumatico, neoplasie, embolia polmonare Rottura di ascesso amebico - Infezione da <i>Aspergillus fumigatus</i>
Bianco lattescente	Chilotorace
Purulento	Empiema (se maleodorante suggerisce infezione da batteri anaerobi)

Tab. 4. Classificazione dei versamenti pleurici.

Trasudati	Scompenso cardiaco congestizio, cirrosi epatica con o senza ascite, dialisi peritoneale, sindrome nefrosica glomerulo nefrite, ipoalbuminemia
Essudati	Neoplasie primitive (mesotelioma), neoplasie secondarie (polmone, mammella, stomaco, etc.), linfomi, leucemie, sarcoma di Kaposi, infezioni, patologie del tratto gastroenterico, connettiviti, pleurite asbestosica benigna, pleuriti indotte da farmaci, pleurite uremica, S. di Meigs, pleuriti in corso di malattia cardiovascolare, pleuriti post-attiniche, sindrome delle unghie gialle, chilotorace
Condizioni in cui il versamento può mostrare indifferentemente caratteristiche di essudato o trasudato	Embolia polmonare, ipotiroidismo, trattamento diuretico prolungato, pericardite infiammatoria o costrittiva, atelettasia, trapped lung, amiloidosi.
Situazioni meno frequenti associate a versamento	Trapianto di polmone o fegato, ARDS, embolia grassosa, sindrome da iperstimolazione ovarica, rottura di gravidanza ectopica, versamento postpartum, rottura di protesi mammaria, teratoma benigno, iatrogeno (mal posizionamento di tubo toracico nel mediastino, posizionamento di catetere venoso centrale, infusione di nutrizione enterale attraverso catetere posizionato erroneamente in cavo pleurico, aortografia translombare

Tabella 5.

	media	P < 0,05
pH gruppo 3 pH gruppo 1	7,25 7,37	0,028
GCM gruppo 3 GCM gruppo 1	9,26 20,95	0,012

Tabella 6.

	media	P < 0,05
pH gruppo 4 pH gruppo 1	7,24 7,37	0,012
GCM gruppo 4 GCM gruppo 1	2,98 20,95	0,006
linfociti gruppo 4 linfociti gruppo 1	85,78 55,53	0,001

Tabella 7.

	media	P < 0,05
GCM gruppo 4 GCM gruppo 2	2,98 15,55	0,019

Tabella 8.

	media	P < 0,05
GCM gruppo 3 GCM gruppo 4	9,26 2,98	0,012
linfociti gruppo 3 linfociti gruppo 4	60,85 85,78	0,015

Tabella 9.

	media	P < 0,05
pH gruppo 3 pH gruppo 5	7,25 7,41	0,013
GCM gruppo 3 GCM gruppo 5	9,26 19,67	0,016

Tabella 10.

	media	P < 0,05
pH gruppo 4 pH gruppo 5	7,24 7,41	0,009
GCM gruppo 4 GCM gruppo 5	2,97 19,67	0,005
linfociti gruppo 4 linfociti gruppo 5	85,78 62,86	0,009