

**MARCELO HAMILTON SAMPAIO**

**QUANTIFICAÇÃO NEFELOMÉTRICA DA PROTEÍNA *BETA-TRACE* PARA O  
DIAGNÓSTICO DA FÍSTULA LIQUÓRICA DA BASE ANTERIOR DO CRÂNIO:  
DETERMINAÇÃO DO VALOR DE CORTE EM FLUIDOS NASAIS UTILIZANDO  
DOIS GRUPOS CONTROLES.**

**CAMPINAS**

**2010**

**MARCELO HAMILTON SAMPAIO**

**QUANTIFICAÇÃO NEFELOMÉTRICA DA PROTEÍNA *BETA-TRACE* PARA O  
DIAGNÓSTICO DA FÍSTULA LIQUÓRICA DA BASE ANTERIOR DO CRÂNIO:  
DETERMINAÇÃO DO VALOR DE CORTE EM FLUIDOS NASAIS UTILIZANDO  
DOIS GRUPOS CONTROLES.**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Otorrinolaringologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Sa47q Sampaio, Marcelo Hamilton  
Quantificação nefelométrica da proteína *beta-trace* para o diagnóstico da fístula liquórica da base anterior do crânio: determinação do valor de corte em fluídos nasais utilizando dois grupos controles. / Marcelo Hamilton Sampaio. -- Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Carlos Takahiro Chone  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína. 2. Base do crânio. 3. Meningite. 4. Líquido cefalorraquidiano. 5. Fístula. I. Chone, Carlos Takahiro. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em Inglês: Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cut off determination in nasal fluids with two control groups**

**Keywords:** • Protein  
• Skull base  
• Meningitis  
• Cerebrospinal fluid  
• Leak

**Titulação: Doutor em Ciências Médicas**  
**Área de Concentração: Otorrinolaringologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone**  
**Prof. Dr. Richard Louis Voegels**  
**Prof. Dr. Ney Penteado de Castro Júnior**  
**Prof. Dr. Reinaldo Jordão Gusmão**  
**Prof. Dr. Agrício Nubiato Crespo**

**Data da defesa: 17.12.2010**

## Banca examinadora de Tese de Doutorado

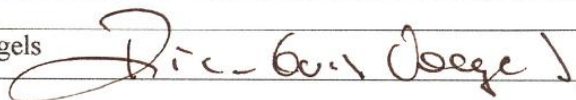
Marcelo Hamilton Sampaio

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carlos Takahiro Chone



### Membros:

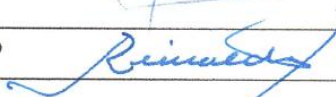
Professor (a) Doutor (a) Richard Louis Voegels



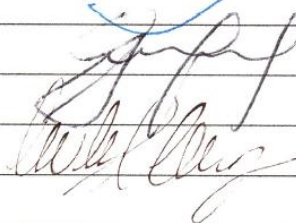
Professor (a) Doutor (a) Ney Penteadado de Castro Junior



Professor (a) Doutor (a) Reinaldo Jordão Gusmão



Professor (a) Doutor (a) Agrício Nubiato Crespo



Professor (a) Doutor (a) Carlos Takahiro Chone

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/12/2010

Esta tese é dedicada:

Aos meus pais, Aparecida e Hamilton,  
por serem sempre meus incentivadores

A minha esposa, Angela,  
por seu apoio incondicional

***AGRADECIMENTOS***

---

Os meus sinceros agradecimentos,

Aos pacientes que aceitaram colaborar, voluntariamente, com este estudo.

À Sandra Oliveira de Almeida Teixeira e Andrea Domênica Teodoro da Silva pelo grande paciência, apoio e realização das dosagens laboratoriais no departamento de Patologia Clínica, tornando possível a realização deste trabalho.

À Mariusa Terezinha dos Santos, supervisora do laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica – HC – Unicamp, por permitir meu acesso ao laboratório e possibilitar a coleta de dados.

Ao Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone, meu orientador, por receber-me como seu aluno e possibilitar meu crescimento na carreira médica.

À Prof. Dra Eulália Sakano, por receber-me no ambulatório de rinologia, por ser minha incentivadora e espelho na minha vida profissional, além de grande contribuidora e revisora do trabalho.

À Prof. Dra. Silvia de Barros Mazon, pelo apoio e disponibilidade em receber-me no Departamento de Patologia Clínica.

À Dra Érica Ortiz, minha colega de pós graduação, pela valiosa apresentação oral do trabalho em congressos internacionais.

***LISTAS***



## ***Lista de Ilustrações***

Figura 1. Material utilizado na coleta de amostras de secreção nasal.....	32
Figura 2. Nefelômetro modelo BN ProSpec, Dade Behring®, Marburg, Alemanha.....	34
Figura 3. Esquema da reação de aglutinação com formação de imunocomplexos.....	34
Figura 4. Esquema da nefelometria. A luz atravessa a cuveta onde ocorre a reação imunológica e a dispersão da luz é medida pelo detector do equipamento.....	35
Tabela 1. Grupo de pacientes.....	55
Tabela 2. Concentração da proteína $\beta$ -trace no grupo controle negativo.....	56
Tabela 3. Concentração da proteína $\beta$ -trace no grupo controle positivo.....	57
Gráfico 1. Concentração da proteína $\beta$ -trace em pacientes positivos e em amostras de liquor.....	58
Gráfico 2. Concentração da proteína $\beta$ -trace em pacientes negativos e em voluntários saudáveis.....	59
Gráfico 3. Concentração da proteína $\beta$ -trace em pacientes positivos e em pacientes negativos.....	60

## ***Lista de Abreviaturas***

FL: Fístula liquóricas

$\beta$ 2Tr: Beta 2 transferrina

$\beta$ Tp: Proteína Beta-trace

*SUMÁRIO*

---

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1.1. Etiologia.....	21
1.2. Complicações.....	22
1.3. Papel do tratamento cirúrgico.....	22
1.4. Quadro clínico.....	23
1.5. Testes laboratoriais.....	24
1.6. Estudos de imagem.....	26
1.7. Teste de fluoresceína.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
3. METODOLOGIA E MATERIAIS.....	30
3.1. Critérios de inclusão.....	31
3.2. Coleta de amostras de secreção nasal e dosagem da proteína $\beta$ -trace.....	32
3.3. Teste padrão.....	36
3.4. Análise estatística.....	36

4. CAPÍTULO.....	37
“Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cut off determination in nasal fluids with two control groups.”	
4. CONCLUSÃO GERAL.....	61
5. REFERÊNCIAS .....	63
6. ANEXOS.....	69
6.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	71
6.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	73
6.3 Autorização de utilização do manuscrito publicado na <i>American Journal of Rhinology &amp; Allergy</i> .....	74

***RESUMO***

**INTRODUÇÃO:** A Fístula liquórica da base anterior do crânio é a comunicação anormal entre a cavidade nasal ou os seios paranasais e o espaço subaracnóideo. Sua presença aumenta a incidência de complicações, como principalmente a meningite, com riscos de morte ou de seqüelas, como surdez, déficits motores e cognitivos. O diagnóstico precoce e correto da fistula liquórica é importante para que o tratamento cirúrgico seja realizado o mais brevemente possível. A detecção de liquor em fluidos nasais é realizada como método diagnóstico da fistula liquórica e baseia-se na pesquisa de proteínas específicas do líquor em secreções nasais, e pode ser feita através da pesquisa da  $\beta_2$ -transferrina, um teste imunológico caro e pouco disponível no Brasil. Recentemente foi descrita a quantificação nefelométrica da proteína  $\beta$ -trace para a identificação da fístula liquórica, uma proteína específica do cérebro e presente em altas concentrações no líquor. Os dados da literatura sugerem a mesma sensibilidade e especificidade que a  $\beta_2$ -transferrina. Grande parte dos laboratórios de análises clínicas possuem o equipamento nefelômetro para a quantificação da proteína  $\beta$ -trace.

**OBJETIVO:** Determinar o valor de corte para a medida da concentração da proteína  $\beta$ -trace e a previsibilidade do teste em confirmar ou não a presença de fístula liquórica em secreções nasais no dois lados da cavidade nasal.

**MÉTODOS:** Secreção nasal foi coletada de pacientes com suspeita de fístula liquórica e de voluntários saudáveis. Amostras de liquor puro foram usadas. O teste nefelométrico foi utilizado para determinar a concentração da proteína  $\beta$ -trace nas amostras. Os achados durante a cirurgia endonasal endoscópica foram o padrão ouro para o diagnóstico da fístula liquórica.

**RESULTADOS:** Foi encontrado um valor de corte entre 0,244 e 0,496 mg/L. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 100%. As médias de concentração de proteína  $\beta$ -trace no lado nasal acometido foram maiores que as médias de concentração de proteína  $\beta$ -trace no lado nasal não acometido, com diferença estatisticamente significativa.

**CONCLUSÃO:** Concentrações de proteína  $\beta$ -trace acima de 0,496 mg/L são altamente sugestivas da presença de líquor nas secreções nasais examinadas. O teste nefelométrico da proteína  $\beta$ -trace pode prever o lado nasal acometido pela fístula liquórica. O teste da proteína  $\beta$ -trace é uma boa alternativa para o diagnóstico de fístula liquórica em hospitais brasileiros.

**PALAVRAS-CHAVE:** proteína  $\beta$ -trace, valor de corte, líquor, líquido cefalorraquidiano, fístula liquórica, base do crânio, meningite, rinorréia, rinoliquorréia, nefelometria, prostaglandina D sintase, valor preditivo.

***ABSTRACT***

---



**BACKGROUND:** Cerebrospinal fluid (CSF) leak of the anterior skull base is an abnormal communication between the subarachnoid space and the nasal cavity or the paranasal sinus. Its presence increases the incidence of complications, as meningitis, with risk of sequels. The early and correct diagnosis of the CSF leaks is important in order to perform surgical treatment as soon as possible. The CSF detection in nasal fluids is performed as a diagnostic method of CSF leak, based on the detection of brain-specific proteins in nasal fluids, and could be made through the  $\beta_2$ -transferrin test, an expensive immunological test, not available to the majority of the Brazilian hospitals. Recently, the detection of  $\beta$ -trace protein for identification of CSF leaks has been described. Literature data suggests the same sensibility and specificity to the  $\beta_2$ -transferrin, because  $\beta$ -trace protein is also a specific brain protein and it is present in CSF in high concentrations. The majority of Brazilian laboratories of clinical analysis have the nephelometric equipment for  $\beta$ -trace protein detection.

**OBJECTIVE:** To determine threshold values for  $\beta$ -trace protein concentrations in nasal cavity secretions as a predictor of CFS leak.

**METHODS:** Nasal secretions were collected from patients with suspicion of CSF leak and from healthy volunteers. Pure CSF samples were used. A nephelometric assay was used to determine the  $\beta$ -trace protein concentration in samples. The gold standard diagnostic method was the surgery.

**RESULTS:** Values between 0.244 and 0.496 mg/L were determined for the cut-off. Positive predictive value and negative predictive value were 100%. The concentration in the affected side were higher than the contralateral side.

CONCLUSION:  $\beta$ -trace concentrations above 0.496 mg/L are highly suggestive of the presence of cerebrospinal fluid in examined nasal secretion.  $\beta$ -trace protein nephelometric test can predict the side of the CSF leak. The  $\beta$ -trace protein test is a good alternative for the detection of CSF leak in Brazilian hospitals.

KEY WORDS: beta-trace protein, cut off, cerebrospinal fluid, cerebrospinal fluid leak, cerebrospinal fluid fistula, skull base, meningitis, rhinorrhea, nephelometry, Prostaglandin D synthase, predictive value

***INTRODUÇÃO***

---

A base anterior do crânio corresponde ao assoalho da fossa anterior do crânio, composta pelo osso frontal, pela lâmina crivosa do osso etmoidal e pelo osso esfenoidal, também correspondendo ao teto das fossas nasais e do seio etmoidal.

O sistema nervoso central é envolvido por três meninges, denominadas pia-máter, em contato direto com o parênquima do sistema nervoso central, a aracnóide, intermediária, e a dura-máter, mais distal em relação ao sistema nervoso central. O líquido cefalorraquidiano, ou líquor, está presente e circula entre a pia-máter e a aracnóide, em um espaço denominado espaço subaracnóideo.

A fístula liquórica da base anterior do crânio (FL) é definida como a comunicação do espaço subaracnóideo com o meio externo (seios paranasais e/ou fossas nasais). Para que isso ocorra, há a necessidade de que haja uma abertura na aracnóide, na dura máter e no osso da base anterior do crânio. Quando esta comunicação ocorre, pode ocorrer a saída de líquor pela cavidade nasal e/ou paranasal.

A localização e o diagnóstico preciso da FL são fundamentais para o tratamento dos pacientes portadores. Embora as FL possam ser diagnosticadas por exames radiológicos e outros métodos invasivos, esses procedimentos expõem os pacientes a riscos significativos, portanto, métodos não invasivos são preferíveis. Assim, a análise bioquímica de secreções, como, por exemplo, a nasal, em busca de sinais da presença de líquor, é uma boa opção para o diagnóstico.

Testes para a detecção da  $\beta$ 2-transferrina ( $\beta$ 2Tr) e para a dosagem da proteína  $\beta$ -Trace ( $\beta$ TP), duas proteínas específicas do líquor, foram relatados na literatura como sendo métodos altamente específicos e sensíveis para a detecção de líquor em amostras de

secreções nasais. Portanto, esses são os métodos preferíveis para o diagnóstico de FL, e estudos devem ser feitos para torná-los exequíveis no Brasil.

***REVISÃO DA LITERATURA***

---

## ***Etiologia***

As FL ocorrem, mais freqüentemente, após trauma craniano com fratura de base do crânio, o que pode provocar a comunicação do espaço liquórico com o meio externo. Cerca de 70% a 80% das FL são causadas por trauma craniano (1,2), e 2% a 4% dos traumas cranianos agudos resultam em FL(2).

Defeitos iatrogênicos na base anterior do crânio também podem causar FL. As cirurgias que mais levam à ocorrência de FL são a cirurgia endoscópica funcional dos seios paranasais e a neurocirurgia (3). Os dois locais mais comuns de ocorrência de lesão da base anterior do crânio associada a cirurgia endoscópica nasossinusal são a lamela lateral da placa cribiforme do etmóide e o teto etmoidal posterior próximo à face anterior do esfenóide (3). A FL decorrente de neurocirurgia está associada a uma grande variedade de procedimentos, mas o mais comum é a cirurgia da pituitária (4).

Tumores podem levar a FL direta ou indiretamente. A invasão tumoral da base do crânio pode diretamente causar grandes defeitos ósseos e levar a rinoliquorréia. Também, tumores do sistema nervoso central podem obstruir o fluxo de líquido, aumentando a pressão intracraniana e evoluindo à hidrocefalia, o que pode indiretamente levar a uma FL (3).

Além disso, deformidades congênitas do osso da base do crânio associadas a meningoceles ou meningoencefalocelos são causas de FL (3).

Finalmente, há FL denominadas espontâneas assim definidas quando não se pode discernir a etiologia (3,5).

## ***Complicações***

A presença da FL aumenta o risco de complicações, sendo a principal consequência o risco do desenvolvimento de infecção no sistema nervoso central, principalmente a meningite bacteriana, o que eleva a chance de evoluir para seqüelas posteriores mais graves, como surdez neurossensorial parcial ou total, convulsões, alterações cognitivas e motoras, e até mesmo a morte (1). Portanto, para se evitar a exposição a situações graves, o diagnóstico preciso e precoce deve ser buscado.

Mincy (1) estudou uma série de 54 pacientes com rinoliquorréia após trauma craniano e observou que a meningite ocorreu em 11% dos pacientes que tiveram a parada espontânea da rinoliquorréia em até sete dias, comparados com a ocorrência de meningite em 88% dos pacientes que tiveram a duração da rinoliquorréia acima de sete dias, e concluíram que a correção cirúrgica da FL deve ser feita quando a rinoliquorréia não parar após uma semana. Scholsem *et al* (6) obtiveram resultados semelhantes.

## ***Papel do tratamento cirúrgico***

O tratamento cirúrgico da FL consiste na correção do defeito da base do crânio com o objetivo de interromper a rinoliquorréia e evitar a ocorrência da meningite. Bernal-Sprekelsen *et al.*(7) estudou 39 pacientes portadores de FL, e observou que quinze (36,5%) apresentaram meningite bacteriana antes do tratamento cirúrgico, mas nenhum episódio infeccioso ocorreu no pós-operatório, durante o período médio de seguimento de 65 meses.

Além disso, Bernal-Sprekelsen *et al.* (2) afirmaram que o fechamento espontâneo da FL, sem a intervenção cirúrgica, resulta em um fechamento com um tecido fibroso muito fino ou com apenas uma fina camada de mucosa, pois a dura mater não se regenera. Desta

forma, a correção cirúrgica da FL previne os episódios de meningite por resultar em um fechamento mais robusto do defeito da base do crânio.

Atualmente, a cirurgia endonasal endoscópica nasossinusal para o fechamento da FL da base anterior do crânio é considerada o procedimento padrão (3,8,9,10), com taxa de sucesso acima de 90% (11).

### *Quadro clínico*

Miller (12), em 1826, foi o primeiro a caracterizar a rinoliquorréia como sinal da presença de fístula liquórica e foi Thompson (13) quem estudou mais detalhadamente a saída de líquido pela cavidade nasal.

A manifestação clínica mais freqüente da FL é a presença de rinorréia aquosa geralmente unilateral (1,4,13), correspondendo à rinoliquorréia. A drenagem de líquido pela cavidade nasal pode ser contínua ou pode ser estimulada pela manobra de Valsalva e pela flexão anterior da cabeça. Porém, algumas vezes a rinoliquorréia é intermitente, dificultando o diagnóstico. Este quadro clínico pode suceder um trauma craniano ou cirurgia na base do crânio, mas em alguns casos ocorre espontaneamente, sem antecedentes traumáticos ou cirúrgicos, o que torna o diagnóstico mais difícil. O diagnóstico diferencial da queixa de rinorréia aquosa é a rinite alérgica ou vasomotora (14), sendo que estas normalmente apresentam-se com rinorréia bilateral.

Outra manifestação clínica possível e que levanta a suspeita do diagnóstico de FL é a presença de meningites de repetição (2,7,15,16,17). Trinta e cinco por cento dos pacientes com meningite recorrente possuem FL causada por trauma craniano, além disso, um trauma craniano com fratura da base do crânio pode resultar em meningites recorrentes até 21 anos



após o acidente (18). Desta forma, o diagnóstico de FL na presença de meningites de repetição deve ser considerado.

O diagnóstico preciso e a localização exata do local da FL são necessários para que a correção cirúrgica seja realizada com o objetivo de cessar os sintomas e prevenir a ocorrência das complicações.

Diante de um quadro clínico suspeito de FL, seja pela presença de rinorréia sugestiva de drenagem de líquido pela cavidade nasal, seja pela recorrência de meningites, o diagnóstico necessita ser confirmado e a localização do defeito deve ser determinada. Para tanto, são realizados exames complementares que podem ser divididos em: testes laboratoriais, estudos de imagem e o teste da fluoresceína.

#### ***Testes laboratoriais:***

Baseiam-se na procura de marcadores de líquido na secreção nasal, dosando-se substâncias que possam indicar a contaminação da secreção nasal por líquido.

O teste da glicose é um dos métodos mais antigos e consiste na dosagem da glicose na secreção nasal, considerando que valores acima de 30 mg/dl na secreção nasal são sugestivos da presença de líquido (19). A especificidade deste teste, quando comparado com o teste da  $\beta$ 2-transferrina, é zero (20). Assim, com o surgimento de testes altamente sensíveis e específicos, o teste da glicose caiu em desuso.

A  $\beta$ 2-transferrina é uma proteína específica do líquido e foi introduzida como método diagnóstico da FL em 1979 por Meurman (21). Ela é encontrada apenas no LCR, humor aquoso e perilinfa (20,22). A especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de FL,

segundo Warnecke (22), é de 99% e 97%, respectivamente, sendo que outros autores relataram sensibilidade e especificidade de 100% (23). A sua detecção é realizada através de imunoeletroforese, e a sua presença na secreção nasal confirma a FL (22). Falsos-positivos podem ocorrer em portadores de insuficiência hepática. Como desvantagem, trata-se de um método demorado para a execução, caro, (24) e não disponível rotineiramente no Brasil. Além disso, o teste não é confiável quando há contaminação da amostra de secreção nasal com sangue (25).

Recentemente, o teste imunonefelométrico para a dosagem da proteína  $\beta$ -trace ( $\beta$ TP) foi descrito como método diagnóstico da FL. Trata-se de uma proteína específica do líquido, com concentração líquórica 35 vezes maior que a concentração sérica (26). A  $\beta$ TP é a segunda proteína mais abundante do líquido, após a albumina (27). O teste imunonefelométrico da  $\beta$ TP é quantitativo, automatizado, além de ser mais rápido e mais barato que o teste da  $\beta$ 2-transferrina (28). Apenas 5 $\mu$ L de amostra são necessários para a dosagem. Além disso, a sua sensibilidade e especificidade são semelhantes à  $\beta$ 2-transferrina, e alguns estudos descrevem como superiores (28,29,30). Há controvérsia na literatura quanto ao valor de corte da concentração de  $\beta$ TP em secreções nasais para o diagnóstico da FL, variando de 0,35mg/L a 6mg/L (14,26,28,29,30,31,32). Na insuficiência renal a concentração de  $\beta$ TP está aumentada e, em contraste, está diminuída na vigência de meningite (33,34,35). No nosso meio, o teste nefelométrico é um método mais atrativo, pois, além de mais barato que a  $\beta$ 2-transferrina, o nefelômetro é um equipamento relativamente comum nos laboratórios, bastante utilizado para determinações de proteínas no sangue, urina e outros fluidos corpóreos e mais rapidamente exequível.

O presente estudo utilizou-se do teste imunonefelométrico da  $\beta$ TP, e será mais detalhadamente descrito a frente.

### ***Estudos de imagem***

Os estudos de imagem desempenham um papel importante no topodiagnóstico da FL. São fundamentais para se pesquisar, localizar e caracterizar o local do defeito antes da realização da cirurgia (36).

A tomografia computadorizada de alta resolução desempenha um papel fundamental na avaliação da FL (37). Cortes finos de 1-2 mm, coronais e axiais, através da base do crânio podem demonstrar pequenos defeitos e fraturas desta região. Na análise da imagem, considera-se a FL como presente se ficar demonstrada solução de continuidade óssea associada a pneumocéfalos ou a opacificação suspensa dentro de um seio paranasal. Esta opacificação corresponde a liquor (hipodenso) ou a parênquima herniada (isodenso) (38,39). Por outro lado, um traço de fratura isoladamente não permite o diagnóstico, pois é possível que a dura-máter esteja íntegra (38,39), sendo possível que se tenha um falso-positivo.

A tomografia computadorizada com cisternografia consiste na injeção de contraste iodado no espaço subaracnóideo via punção lombar, com o intuito de que o contraste extravase para a cavidade nasal ou paranasal, demonstrando, assim, a presença da FL. Porém, grande parte dos casos apresenta-se com uma rinoliquorréia intermitente, não garantindo que a fístula esteja ativa no momento do exame. Nestes casos, a administração intratecal do contraste previamente à execução da tomografia computadorizada não demonstrará a fístula e não terá maior acurácia que o exame sem o contraste. Entretanto,

quando a fístula é constante, freqüente ou pode ser induzida por medidas voluntárias, como a manobra de Valsalva, a cisternografia pode oferecer provas do verdadeiro local da fístula, uma vez que um pequeno defeito ósseo aparente à tomografia computadorizada sem cisternografia não prova que a fístula está ocorrendo (37). O exame é invasivo, mais trabalhoso, e mais demorado.

A cisternografia com radioisótopo consiste na injeção intratecal de um contraste marcado com um isótopo radioativo (indium 111 ou tecnécio 99). São colocados algodões no interior das fossas nasais para que sejam submetidos a uma medida de radioatividade, e desta forma, avaliar se houve passagem do contraste radioativo do espaço subaracnóideo para a cavidade nasal. Este método caiu em desuso atualmente por apresentar tanto falsos positivos quanto falsos negativos, por não apresentar detalhamento anatômico que permita a precisa localização do defeito, e, além disso, por ser invasivo (37).

A ressonância nuclear magnética não necessita de injeção intratecal de contrastes para realizar a cisternografia e baseia-se no fato de que o líquido fica hiperintenso na sequência ponderada em T2. Porém, apresenta baixo detalhamento ósseo, o que limita a sua acurácia em determinar a precisa localização da fístula. É um método útil em distinguir entre tecido inflamatório e meningoencefalocèle no local da fístula (40).

### ***Teste de fluoresceína***

A injeção intratecal de fluoresceína sódica a 5% diluída em 10 ml de líquido é utilizada principalmente no intraoperatório. O líquido adquire uma coloração esverdeada que facilita a visualização endoscópica pelo cirurgião. É um método com baixas taxas de complicações quando usado em doses baixas de fluoresceína (38).

***OBJETIVOS***

---

Os objetivos deste estudo foram:

- 1.) Determinar os valores de corte para o teste nefelométrico da proteína  $\beta$ -trace para a detecção de líquido em secreções nasais.
- 2.) Calcular sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo para o teste nefelométrico da proteína  $\beta$ -trace para o diagnóstico de fístula líquórica da base anterior do crânio.
- 3.) Determinar a previsibilidade do método nefelométrico da proteína  $\beta$ -trace em diagnosticar o lado da cavidade nasal em que a fístula líquórica está presente.

***METODOLOGIA E MATERIAIS***

---

Este estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (anexo I). Todos os sujeitos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II).

Este foi um estudo prospectivo com dois grupos controles, um positivo e um negativo, e um grupo de pacientes.

Entre os meses de fevereiro de 2007 e dezembro de 2008, 16 sujeitos que preencheram os critérios de inclusão abaixo descritos foram admitidos no estudo para comporem o grupo de pacientes e atendidos no ambulatório da disciplina de otorrinolaringologia Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas da Unicamp, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Também foram admitidos 20 voluntários saudáveis para comporem o grupo controle negativo e foram utilizadas 20 amostras normais de líquido obtidas no Departamento de Patologia Clínica da mesma instituição para comporem o grupo controle positivo.

#### ***Critérios de inclusão***

Os critérios de inclusão utilizados para se formar o grupo de pacientes foram a suspeita clínica da FL, que incluía os seguintes sintomas: rinorréia aquosa após trauma craniano, cirurgia nasal ou cirurgia da base do crânio; rinorréia aquosa unilateral espontânea, sem melhora após o tratamento clínico para rinite; e/ou a presença de meningite recorrente, caracterizada por mais do que um episódio.

Para se formar o grupo controle negativo foram utilizados os critérios de inclusão seguintes: voluntários saudáveis sem antecedentes de cirurgia nasal ou da base do crânio, ausência de queixas de rinorréia, ausência de antecedentes de trauma craniano, ausência de insuficiência renal, e ausência de outros antecedentes mórbidos.



Finalmente, o critério de inclusão para se formar o grupo controle positivo foi a ausência de sinais inflamatórios, como ausência de IgG oligoclonal e contagem celular normal.

#### ***Coleta de amostras de secreção nasal e dosagem da proteína $\beta$ -trace***

As amostras de secreção nasal dos sujeitos do grupo de pacientes e do grupo controle negativo foram coletadas introduzindo-se compressas de algodão no interior de ambas as cavidades nasais, utilizando-se de espéculo e pinça do tipo baioneta (figura 1).



**Figura 1.** Material utilizado na coleta de amostras de secreção nasal. Duas compressas de algodão, dois tubos plásticos tipo “ependorf”, uma pinça metálica do tipo baioneta, um espéculo nasal.

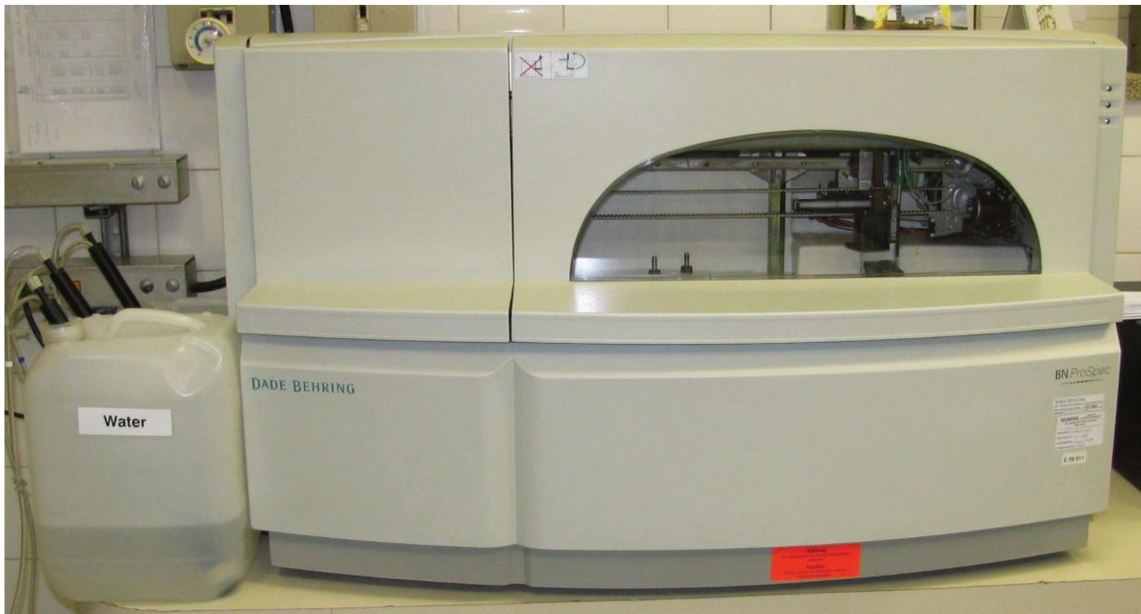
Após vinte minutos em posição de flexão anterior da cabeça, as compressas foram retiradas do interior da cavidade nasal. As amostras foram colocadas nos tubos de “ependorf”, centrifugadas no laboratório e pipetadas, conforme artigo do capítulo desta

tese (submetido, aceito e publicado: Sampaio MH, de Barros-Mazon S, Sakano E, Chone CT. Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cutoff determination in nasal fluids with two control groups. Am J Rhinol Allergy 2009;23(6):585-90).

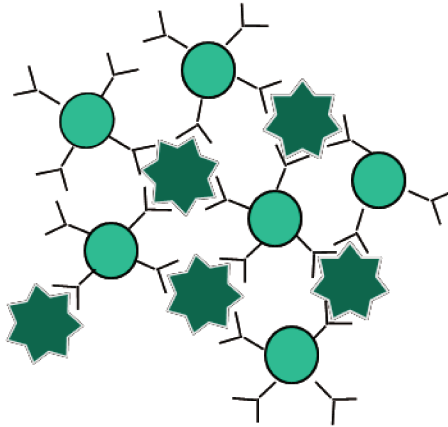
As amostras de secreção nasal de pacientes com suspeita de FL, dos indivíduos saudáveis controle negativo e das amostras de líquido (controle positivo), foram levadas ao nefelômetro (figura 2), onde ocorre a reação imunológica, automatizada, abaixo descrita, para que fosse determinada a concentração de  $\beta$ TP.


A nefelometria é a medida imunoquímica mais comumente utilizada para determinações de proteínas no sangue, urina e outros fluidos corpóreos. É também considerado o método de maior acurácia para este fim. Ele baseia-se na interação da luz com partículas em uma solução. A luz atinge as partículas quando atravessa a solução, ocorrendo sua dispersão. A nefelometria é a medida direta da luz dispersada pelas partículas de uma solução.


O teste da  $\beta$ TP consiste numa reação imunológica de aglutinação com formação de imunocomplexos. A  $\beta$ TP contida na amostra de secreção nasal é o antígeno da reação, e partículas de poliestirenos recobertas por anticorpos anti- $\beta$ TP obtidos de coelhos constituem o reagente (figura 3). Quando em contato com o reagente, a proteína  $\beta$ TP se liga aos anticorpos formando os imunocomplexos.



**Figura 2.** Nefelômetro modelo BN ProSpec, Dade Behring®, Marburg, Alemanha.



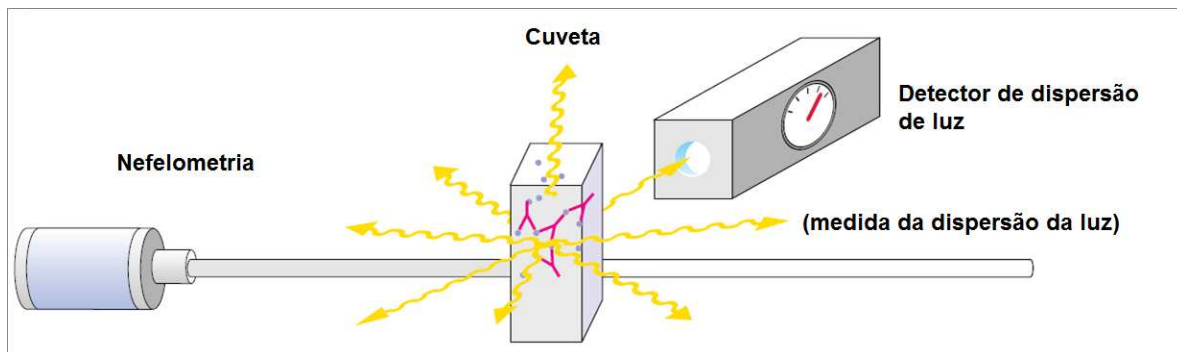
 = partícula de poliestireno

 = proteína  $\beta$ -trace

 = anticorpo anti-  $\beta$ TTP

**Figura 3.** Esquema da reação de aglutinação com formação de imunocomplexos.

A reação imunológica ocorre em uma cuveta no interior do equipamento e há a incidência de uma luz laser que a atravessa. Ao atingir os aglutinados formados pela reação, a luz sofre dispersão que é medida pelo equipamento. Através desta medida, comparando-se com uma curva padrão, o equipamento calcula a concentração da  $\beta$ TTP na amostra (figura 4).



**Figura 4.** Esquema da nefelometria. A luz atravessa a cuveta onde ocorre a reação imunológica e a dispersão da luz é medida pelo detector do equipamento.

### ***Teste padrão***

A cirurgia endonasal endoscópica com o teste da fluoresceína foi utilizada como procedimento padrão ouro para a confirmação da presença da FL. Todos os sujeitos do grupo de pacientes foram submetidos a este procedimento. Nos casos em que a FL foi visualizada, procedeu-se à sua correção utilizando-se das técnicas descritas na literatura (3,10).

O teste da fluoresceína foi realizado na sala cirúrgica previamente ao procedimento cirúrgico em todos os pacientes. A solução de fluoresceína sódica a 5% foi diluída em nove ml de líquor do próprio paciente e os 10 ml da solução resultante foi injetado no espaço subaracnóide por uma punção lombar. Em seguida, o paciente foi colocado na posição de Trendelenburg por 40 minutos. O procedimento endonasal endoscópico foi realizado a seguir.

### ***Análise estatística***

A elaboração das análises estatísticas foi realizada com o apoio da Ferramenta Estatística SPSS 12.0. Foram feitas comparações entre a concentração de  $\beta$ TP na secreção nasal do grupo de pacientes e a concentração de  $\beta$ TP na secreção nasal do grupo controle negativo e entre a concentração de  $\beta$ TP na secreção nasal do grupo de pacientes e a concentração de  $\beta$ TP em amostras de líquor do grupo controle positivo. Além disso, foi calculado o valor de corte da concentração de  $\beta$ TP para se determinar a presença ou não de líquor na secreção nasal analisada.

Para isso, foi usado o teste T para igualdades de médias com intervalo de confiança de 99%.

*CAPÍTULO*

---

A deliberação CCPG-002/06 da Universidade Estadual de Campinas regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite que artigos científicos de autoria do candidato constem como capítulos da dissertação ou tese. Portanto, esta dissertação é composta por um capítulo contendo o artigo submetido, aceito e publicado em periódico científico (Sampaio MH, de Barros-Mazon S, Sakano E, Chone CT. Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cutoff determination in nasal fluids with two control groups. Am J Rhinol Allergy 2009;23(6):585-90).

**Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cut off determination in nasal fluids with two control groups.**

CSF leak and Beta-trace protein (short running title)

Marcelo Hamilton Sampaio, MD <sup>1</sup>  
Silvia de Barros-Mazon, PhD <sup>2</sup>,  
Eulália Sakano, MD PhD<sup>1</sup>  
Carlos Takahiro Chone, MD PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology Head and Neck, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

This study was approved by the Institutional Review Board

Conflict of interest: none

Financial disclosure: none

Presented as an oral presentation at the Rhinology World 2009 Philadelphia, PA, USA, April 16, 2009

**Corresponding author:**

Marcelo Hamilton Sampaio  
Av Jose Bonifacio 2240 Campinas  
São Paulo, Brazil 13092-305  
Phone: +55 19 3252-4241  
Fax: +55 19 3253-7205  
[mh.sampaio@terra.com.br](mailto:mh.sampaio@terra.com.br)



## **ABSTRACT**

**Background:** Cerebrospinal fluid (CSF) leak of the anterior skull base is an abnormal communication between the subarachnoid space and the nasal cavity or the paranasal sinus. Its presence increases the incidence of complications, as meningitis, with risk of sequels. The early and correct diagnosis of the CSF leaks is important in order to perform surgical treatment as soon as possible. The CSF detection in nasal fluids could be made through the  $\beta_2$ -transferrin immunoelectrophoretic test, an expensive and cumbersome immunological test, not available to the majority of the Brazilian hospitals. Recently, the detection of  $\beta$ -trace protein for identification of CSF leaks has been described. Literature data suggests the same sensibility and specificity to the  $\beta_2$ -transferrin, because  $\beta$ -trace protein is also a specific brain protein and it is present in CSF in high concentrations. The majority of Brazilian hospitals have the nephelometric equipment for  $\beta$ -trace protein detection.

**Objective:** To determine threshold values for  $\beta$ -trace protein concentrations in nasal cavity secretions as a predictor of CFS leak. **Methods:** Nasal secretions were collected from patients with suspicion of CSF leak and from healthy volunteers. Pure CSF samples were used. A nephelometric assay was used to determine the  $\beta$ -trace protein concentration in samples. **Results:** Values between 0.244 and 0.496 mg/L were determined for the cut-off.

**Conclusion:**  $\beta$ -trace concentrations above 0.496 mg/L are highly suggestive of the presence of cerebrospinal fluid in examined nasal secretion. Positive predictive value and negative predictive value were 100%.  $\beta$ -trace protein nephelometric test can predict the side of the CSF leak.

**Key words:** beta-trace protein, cut off, cerebrospinal fluid, cerebrospinal fluid leak, cerebrospinal fluid fistula, skull base, meningitis, rhinorrhea, nephelometry, Prostaglandin D synthase, predictive value

## INTRODUCTION

Cerebrospinal fluid (CSF) leak at the anterior skull base is indicative of a pathological communication between the subarachnoid space and the nasal cavity. These leaks may occur as a complication of head trauma, skull base surgery, or spontaneously. In addition, there are reports of nontraumatic processes such as inflammatory disorders or tumors as the underlying etiology for these leaks <sup>1</sup>. However, the majority of CSF leaks are secondary to head trauma <sup>2</sup> with increased incidence of meningitis<sup>3</sup>, deafness, seizures, cognitive impairment, brain damages and even death <sup>3, 4</sup>. Cerebrospinal fluid rhinorrhea lasting more than one week increases the rate of meningitis in 8 to 10 %, and an early surgical repair is indicated to prevent life-threatening consequences <sup>5</sup>.

Accurate diagnosis and localization of CSF leaks is critical for management of these challenging patients. Although CSF leaks may be diagnosed via radiological and invasive methods, these procedures accompany significant risk to the patient. Thus, noninvasive laboratory methods are preferable. Biochemical analysis of CSF in secretions (e.g. nasal, ear, wound) via measurement of glucose was previously reported, however, this method has been abandoned due to low sensitivity and specificity.<sup>6, 7</sup> Assays for  $\beta$ 2-transferrin ( $\beta$ 2Tr) and  $\beta$ -Trace protein ( $\beta$ TP), two brain-specific proteins, have been reported in the literature as highly sensitive and specific methods for the detection of CSF in nasal secretions, and are considered to be pathognomonic for CSF fistula.

Immuno-electrophoretic procedures to detect  $\beta$ 2Tr have been reported in the literature. However, these assays are both laborious and expensive<sup>8</sup>. Recently, the nephelometric assay, a cost-effective alternative for  $\beta$ -Trace protein quantification, was described as a reasonable alternative for detection of CSF in body secretions including nasal fluids.  $\beta$ TP, or prostaglandin-D synthase <sup>9</sup>, is produced by epithelial cells of the

plexus choroideus and leptomeninges<sup>10, 11</sup> and is present in high concentrations in CSF; it is the second most abundant protein in CSF after albumin<sup>12</sup>. Nephelometric quantification of  $\beta$ TP is quicker and less expensive than  $\beta$ 2Tr immunoelectrophoretic procedures<sup>13</sup>. Normative threshold values for  $\beta$ TP have not been established, despite preliminary reports suggesting values ranging from 0.35 mg/L to 6 mg/L<sup>14, 15</sup>. The objective of the current study was to determine the values of the nephelometric  $\beta$ TP assay for the detection of CSF in nasal secretions which were reliability indicative of CSF leak. Healthy controls and patients with suspected of CSF leaks were included. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated based on comparisons to standardized assays. Predictability of side of CSF leak in nasal cavity was evaluated based on difference of value of  $\beta$ TP concentration on each side.

## **METHODS**

The local institutional review board approved this study. Informed consent was obtained from all subjects. Inclusion criteria for the patient group were clinical suspicion of CSF leak, including the following symptoms: aqueous rhinorrhea after a head trauma, a nasal surgery, or a skull base surgery; spontaneous unilateral aqueous rhinorrhea, without recovery after clinic treatment for rhinitis; and/or presence of recurrent meningitis (>1). From February 2007 to December 2008, 16 patients who met inclusion criteria were admitted to the study and seen in the outpatient clinic of Department of Otolaryngology Head and Neck, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Brazil.

Both positive and negative control groups were also included. The negative control group were healthy volunteers without nasal or skull base surgical antecedents, no rhinorrhea complaints, no head trauma, no kidney failure, and no other morbid antecedents. The positive control group were CSF samples without signs of inflammation (no oligoclonal IgG, normal cell count).

Twenty healthy volunteers served as the negative control group and nasal fluid samples were collected via absorption using cotton gauzes placed inside the nasal cavity, in both sides. Samples were obtained from 20 positive control subjects via CSF lumbar puncture samples from a pool originated in the Department of Clinical Pathology of our institution.

### ***Collecting samples of nasal fluids in patients and healthy volunteers***

Nasal secretions were collected using cotton gauze placed in both nares for at least 20 minutes with forward flexion of the head. The samples were then placed in microcentrifuge eppendorf tubes and they were centrifuged for 10 minutes and removed from the gauze using a pipette. A few samples with viscous fluids or fluids with insufficient

sample volume were prediluted with defined volume (1:2 or 1:4) of phosphate buffer saline (N- diluent for nephelometry<sup>®</sup>; Dade Behring<sup>®</sup>, Marburg, Germany).

### ***β-Trace Protein Immunonephelometric assay***

Using the BN-ProSpec nephelometer<sup>®</sup> and the N Latex βTP test <sup>®</sup> (Dade Behring, Marburg, Germany), samples were assessed for quantitative determination of βTP. Polystyrene particles coated with antibodies to human βTP are agglutinated when mixed with samples containing βTP. The intensity of the scattered light in the nephelometer depends on the concentration of the analyte in the sample, and consequently, its concentration can be determined by comparison with a known standard curve.

The samples were assayed according to the manufacturer's recommendations. Briefly, five microliters of sample were diluted to a total volume of 500 μl with N-diluent for nephelometry and light scattering was measured after the addition of 50 μl of the N latex βTP<sup>®</sup> reagent (polystyrene particles coated with immunoaffinity-purified polyclonal rabbit antihuman βTP antibodies) plus 15μl of supplement reagent for Nephelometry<sup>®</sup> (Dade Behring<sup>®</sup>) to avoid interference with anti-immunoglobulin-G antibodies. The concentration of βTP was calculated by Behring Nephelometer Analyzer software<sup>®</sup>; a seven-point standard curve of highly purified human βTP, which had been quantified by amino acid analysis, was used. The measuring range was 0.25 to 15.8 mg/L for the original dilution of 1:100. Samples with higher or lower βTP content were measured again with an appropriate dilution. The minimal volume for a sample was 5μl. The analytical imprecision of the assay was 2.3 to 6.5%<sup>16</sup>.

### ***Standard Assay***

Endonasal sinus surgery with intraoperative fluorescein was used as the gold standard procedure to confirm the presence of a CSF leak. All patients with suspected CSF leaks were submitted to this procedure. If a CSF fistula was visualized, it was repaired using the current techniques described in the literature<sup>17,18</sup>.

### ***Statistical analysis***

All statistical analyses were performed utilizing SPSS v12.0. T-test for Equality of Means was used with a 99% Confidence Interval.

## RESULTS

Thirty-two  $\beta$ TP measurements was obtained in patients with suspected CSF leaks; 16 from each nare (Table 1).  $\beta$ TP concentrations in this group ranged from 0.01 to 30mg/L (mean= 9.38mg/L; SD= 9.65). Twenty samples from both the healthy volunteers and normal CSF control group were obtained.  $\beta$ TP concentrations ranged from 0.02 to 0.29mg/L (mean= 0.15mg/L; SD=0.08) in healthy volunteers and from 5.89 to 31.70mg/L (mean=14.30mg/L; SD=6.77) in CSF control group (Tables 2 and 3).

All patients suspected with CSF leak were submitted to reparative surgical procedures including the fluorescein test 40 minutes prior to the surgery. Four out of the 16 patients had no signs of CSF leak during surgery. The remaining 12 patients had confirmed presence of CSF leak with successful repair (Table 1).

$\beta$ TP measurements between patients with confirmed CSF leaks (mean=12.45mg/L; SD=9.27) and the CSF control group were statistically comparable ( $p=0.52$ ; Figure 1.). Results from the patient group with suspected CSF leak, but negative findings during surgery (mean= 0.16mg/L; SD= 0.08) were compared to nasal secretions from healthy volunteers. These data were also comparable ( $p=0.798$ ) (Figure 2). The negative patients were then compared to positive patients. These data suggest a statistically-robust difference ( $p=0.021$ ) (Figure 3).

Furthermore,  $\beta$ TP concentrations in healthy volunteers differed significantly from the positive subjects ( $p<0.0001$ ; equality of covariance rejected using the Box test,  $p<0.0001$ ; independent samples test, t-test for Equality of Means,  $t= -6,01$ ,  $p<0.0001$ , 99% confidence interval). Using these data, a cut-off value for  $\beta$ TP concentration was determined to between 0.2444 mg/L and 0.4670mg/L. No patients had concentrations of  $\beta$ TP in nasal secretion above 0.2444 mg/L and below 0.4670 mg/L. Considering cut-off

values of  $\beta$ TP concentration in nasal secretion between 0.2444mg/L and 0.4670mg/L for diagnosis of CSF leak in anterior skull base, the sensitivity of test was 100% (12/12), specificity was 100% (4/4), PPV was 100% (12/12) and NPV was 100% (4/4).

Furthermore, it was studied whether the  $\beta$ TP assay may indicate the side on which the disease is present. For this, concentrations of  $\beta$ TP on both sides of the nose were compared. The side of the fistula in positive patients had a mean of 12.45mg/L (SD=9.26), and on the contralateral side had a mean of 1.52mg/L (SD=1.72), a statistically-significant difference ( $p=0.0006$ ).



## DISCUSSION

The precise diagnosis of CSF leaks is critical to avoid life-threatening conditions including meningitis. In some cases, traditional imaging methods may not identify the fistula area due to low volume of leakage. In contrast, the  $\beta$ -trace protein immunonephelometric assay may be useful to accurately detect small amounts of CSF in nasal secretions in a small volume as 5 $\mu$ L. Therefore, the  $\beta$ -trace protein nephelometric assay appears as an excellent tool for the diagnosis of CSF fistula with high sensitivity and specificity.<sup>19,20</sup>

Our results are consistent with previous data<sup>14</sup>. We propose a cut-off value between 0.244mg/L and 0.467mg/L in nasal fluids for the detection of CSF leaks. It is, however, important that our patient samples were obtained from blood-free noses using cotton gauze. Kleine et al<sup>16</sup> found out that a portion of  $\beta$ TTP was lost when collected using gauze, yielding a 10 to 30% reduction in the actual concentration of the protein. Thus, our cut-off must be analyzed considering the use of cotton as well as the absence of blood.

Great variability of  $\beta$ TTP cut-off values is reported in literature<sup>14</sup>. Risch et al<sup>21</sup>, proposed a cut off of 1.11mg/L, calculated with ROC analysis. Their samples were obtained from the nose, ear or neurosurgical wound secretions and nose tamponades. There is no reference if the samples were contaminated with blood, for example, when collecting samples intra-operatively. This information is crucial, as  $\beta$ TTP is 30 times higher in blood and serum than in nasal secretions<sup>21</sup>.

Our study is the first to use samples exclusively free of blood and to compare these specimens to the current gold standard for diagnosis. Measurements of  $\beta$ TTP in nasal secretions from patients with suspected CSF leaks were compared to nasal secretions of healthy volunteers and also to normal CSF samples. A comparison of  $\beta$ TTP concentration in

nasal secretion was then made between healthy volunteers and negative subjects after surgical procedure.  $\beta$ TTP concentrations in nasal secretion between subjects with disease were statistical equal to normal CSF samples.  $\beta$ TTP concentrations between healthy subjects with patients without CSF leak after surgery confirmation were also statically equal.  $\beta$ TTP in positive patients after gold standard procedure were statistically different to results of negative patients, and also different from healthy volunteers. These comparisons increased the reliability of statistical analyses and were included in the calculation of a cut-off value of 0.244mg/L to 0.496mg/L. In between these values, management will depend on patient-based clinical factors. All patients with suspicious CSF leak confirmed by surgery had  $\beta$ TTP concentrations in nasal secretion above 0.496mg/L. Considering this value as the upper limit for the diagnosis of CSF leak, the PPV was 100% (12/12) and sensitivity was 100% (12/12). Patients with suspicious CSF leaks but not confirmed by surgery, had  $\beta$ TTP concentrations in nasal secretions below 0.244mg/L with a NPV of 100% (4/4) and specificity of 100% (4/4).

The measurement of  $\beta$ TTP is also useful for the determination of the side of surgical approach for correction of CSF leak. After confirmation for presence of CSF leak, the side of leak in nasal cavity may be determined based on the difference of  $\beta$ TTP values between the nares. However, imaging is likely still necessary for precise evaluation of the site and size of the fistula if it is in roof of nasal cavity, ethmoid, sphenoid sinus or unusual sites or composition of sites. The precise localization of site and size of fistula is the keystone for successful endoscopic closure<sup>17,18</sup> as well as selection of the most appropriate technique for closure.

One must consider that there is no standardization in the protocol for sample collection. This discrepancy may explain the variability of cut-off values in the literature.

The measurement of  $\beta$ TP in serum, as previously described<sup>16, 21, 23</sup>, was not performed as all nasal secretion samples were free of blood contamination. This procedural issue may explain why a lower cut-off value was obtained in the current study. Samples contaminated with blood are likely to contain an increased  $\beta$ TP concentration which is likely to increase the cut-off value.

Furthermore, several conditions in patients with CSF leakage may complicate the interpretation of  $\beta$ TP results. In renal failure,  $\beta$ TP concentrations are increased.<sup>13, 24</sup> In contrast, patients with meningitis often present with decreased concentrations<sup>13, 25</sup>. In these patients,  $\beta$ TP concentrations in secretions might be lower (meningitis) or higher (renal failure), and false negative or false positive findings may occur. Thus, the cut-off value of 0.467mg/L may not apply to these patients. More studies with this population must be performed to determine the role of  $\beta$ TP in the diagnosis of CSF leaks in patients with reduced glomerular filtration rate or with meningitis.

## CONCLUSION

Small traces of CSF can be detected by  $\beta$ -TP immunonephelometric assay.

The cut-off value for  $\beta$ TP concentrations in nasal secretions was 0.244mg/L to 0.496mg/L.

$\beta$ TP concentrations in nasal secretions above 0.496mg/L could be highly confirmative for diagnosis of CSF leaks and below 0.244mg/L could exclude presence of CSF leaks.

$\beta$ TP concentrations in nasal secretions between 0.244mg/L and 0.496 mg/L are currently considered questionable and management will depend on clinical conditions of patient and suspicious condition by clinical evaluation and image analysis.

The PPV, NPV, sensitivity and specificity of  $\beta$ TP concentration in nasal secretions for the diagnosis of CSF leaks were 100%, 100%, 100% and 100%, respectively.

$\beta$ TP concentrations were increased in the ipsilateral side of the CSF leak, yielding valuable diagnostic information.

**Acknowledgment:** A debt of gratitude is owed to Maria Teresa Villalobos Aguayo for the professional statistical analysis.

## REFERENCES

1. Har-El G. What is “spontaneous” cerebrospinal fluid rhinorrhea? Classification of cerebrospinal fluid leaks. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:323-6
2. Meco C; Oberascher G. Comprehensive Algorithm for Skull Base Dural Lesion and Cerebrospinal Fluid Fistula Diagnosis. *Laryngoscope* 2004; 114: 991-999.
3. Choi D, Spann R. Traumatic cerebrospinal fluid leakage: risk factors and the use of prophylactic antibiotics. *Br J Neurosurg* 1996; 10:571-5.
4. Crawford C, Kennedy N, Weir WR. Cerebrospinal fluid rhinorrhoea and Haemophilus influenzae meningitis 37 years after a head injury. *J Infect* 1994; 28:93– 7.
5. Brodie HA. Prophylactic antibiotics for posttraumatic cerebrospinal fluid fistulae: a meta-analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997 Jul;123(7):749-52.
6. Chan DTM, Poon WS, Ip CP, Chiu PWY, Goh KYC. 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 Jan;27(1):39-42.
7. Baker EH, Wood DM, Brennan AL, Baines DL, Philips BJ. New insights into the glucose oxidase stick test for cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *Emerg Med. J.* 2005;22:556-7.
8. Freek WC, Roelandse N, van der Zwart JHD, van Loon J, Souverijn JHM. Detection of CSF leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gel, direct immunofixation of transferrins, and silver staining. *Clin Chem* 1998;44:351– 3.

9. Watanabe K, Urade Y, Mäder M, Murphy C, Hayaishi O. Identification of  $\beta$ -trace as prostaglandin D synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Sep 15;203(2):1110-6.
10. Urade Y, Kathama K, Oshishi J, Kaneko T, Mizuno N, Hayashi O. Dominant expression of m-RNA for prostaglandin D-synthetase in leptomeninges, choroids plexus and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9070–4.
11. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;20(310):173– 86.
12. Felgenhauer K, Schadlich HJ, Nekic M.  $\beta$ -trace protein as marker for cerebrospinal fluid fistula. *Klin Wochenschr* 1987;65:764–8.
13. Meco C; Berascher 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;129:508-17.
14. Bachmann-Harildstad G. Diagnostic values of beta-2 transferrin and beta-trace protein as markers for cerebrospinal fluid fistula. *Rhinology* 2008; 46:82-85.
15. Reiber H, Walther K, Althaus H. Beta-trace protein as sensitive marker for CSF rhinorrhea and CSF otorhea. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 359–362.
16. Kleine TO, Damm T, Althaus H. Quantification of  $\beta$ -trace protein and detection of transferrin isoforms in mixtures of cerebrospinal fluid and blood serum as models of rhinorrhea and otorrhea diagnosis. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 366 :382–386.
17. Schlosser RJ; Bolger WE. Endoscopic Management of Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea. *Otolaryngol Clin N Am* 39 (2006) 523–538.

18. Mattox DE, Kennedy DW. Endoscopic management of cerebrospinal fluid leaks and cephaloceles. *Laryngoscope* 1990;100:857–62.
19. Petereit HF, Bachmann G, Nekic M, Althaus H, Pukrop R. A new nephelometric assay for  $\beta$ -trace protein (prostaglandin D synthase) as an indicator of liquorrhea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:347–351.
20. Schnabel C, Di Martino E, Gilsbach JM, Riediger D, Gressner A, Kunz D. Comparison of  $\beta_2$ -Transferrin and  $\beta$ -Trace Protein for Detection of Cerebrospinal Fluid in Nasal and Ear Fluids. *Clinical Chemistry* 2004; 50(3):661-663.
21. Risch L, Lisec 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. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351:169–176.
22. Melegos DN, Diamandis EP, Oda H, Urade Y, Hayaishi O. Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids. *Clin Chem* 1996;42:1984–91
23. Arrer E; Meco C; Oberascher G; Piotrowski W; Albegger K; Patsch W.  $\beta$ -Trace Protein as a Marker for Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea. *Clinical Chemistry* 2002; 48 (6): 939-941.
24. Melegos Dn ; Grass L; Pierratos A; Diamandis EP. Highly elevated levels of prostaglandin D synthase in the serum of patients with renal failure. *Urology* 1999, 53 (1): 32-37.
25. Tumani H, Reiber H, Nau R, Prange HW, Kauffmann K, Mäder M. Felgenhauer  $\beta$ -trace protein concentration in cerebrospinal fluid is decreased in patients with bacterial meningitis. *Neurosci Lett* 1998;242:5–8

**Table 1.** Patients group.  $\beta$ -trace protein dosage (mg/L) in nasal secretions in both sides of the nose of patients. Surgery results (\*negative: no CSF leak was found by the fluorescein test and under direct visualization during the endoscopic surgery exploration; positive: CSF visualized by the fluorescein test or by direct visualization during the endoscopic surgery)

<b>Patients</b>	<b>Right nasal cavity</b>	<b>Left nasal cavity</b>	<b>Surgery results (with the fluorescein test)</b>
<b>1</b>	0.24	0.08	negative
<b>2</b>	0.10	0.09	negative
<b>3</b>	0.01	0.10	negative
<b>4</b>	10.60	5.48	Positive in the right side
<b>5</b>	18.10	1.00	Positive in the right side
<b>6</b>	0.32	0.47	Positive in the left side
<b>7</b>	0.18	8.85	Positive in the left side
<b>8</b>	0.59	11.10	Positive in the left side
<b>9</b>	1.10	0.16	Positive in the right side
<b>10</b>	0.53	11.00	Positive in the left side
<b>11</b>	3.25	14.50	Positive in the left side
<b>12</b>	0.20	0.170	negative
<b>13</b>	20.50	2.11	Positive in the right side
<b>14</b>	0.81	30.00	Positive in the left side
<b>15</b>	0.63	0.22	Positive in the right side
<b>16</b>	22.60	3.54	Positive in the right side



**Table 2.**  $\beta$ -trace protein concentration in healthy volunteers group.

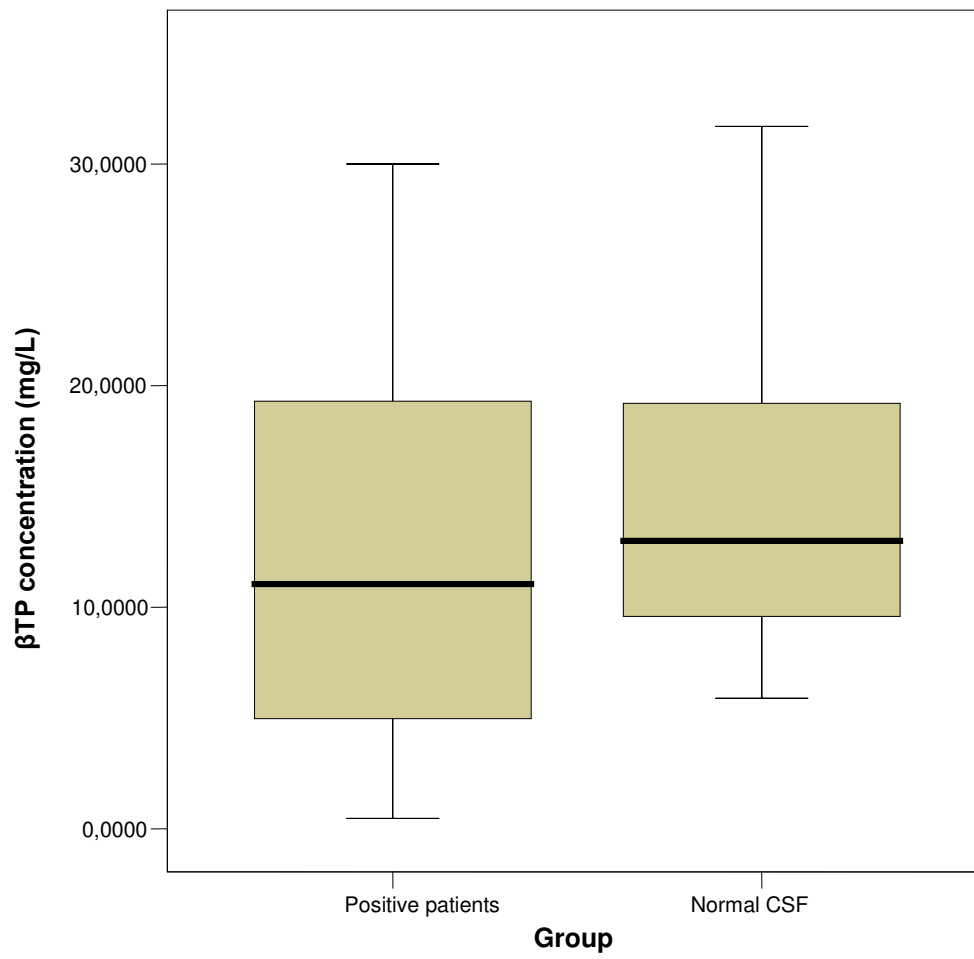
<b>Subjects</b>	<b><math>\beta</math>-trace protein concentration in nasal fluids of healthy volunteers</b>
1	0.07
2	0.10
3	0.26
4	0.08
5	0.03
6	0.21
7	0.28
8	0.19
9	0.14
10	0.03
11	0.29
12	0.23
13	0.12
14	0.15
15	0.13
16	0.22
17	0.20
18	0.09
19	0.14
20	0.02

**Table 3.**  $\beta$ -trace protein concentration in normal CSF samples group.

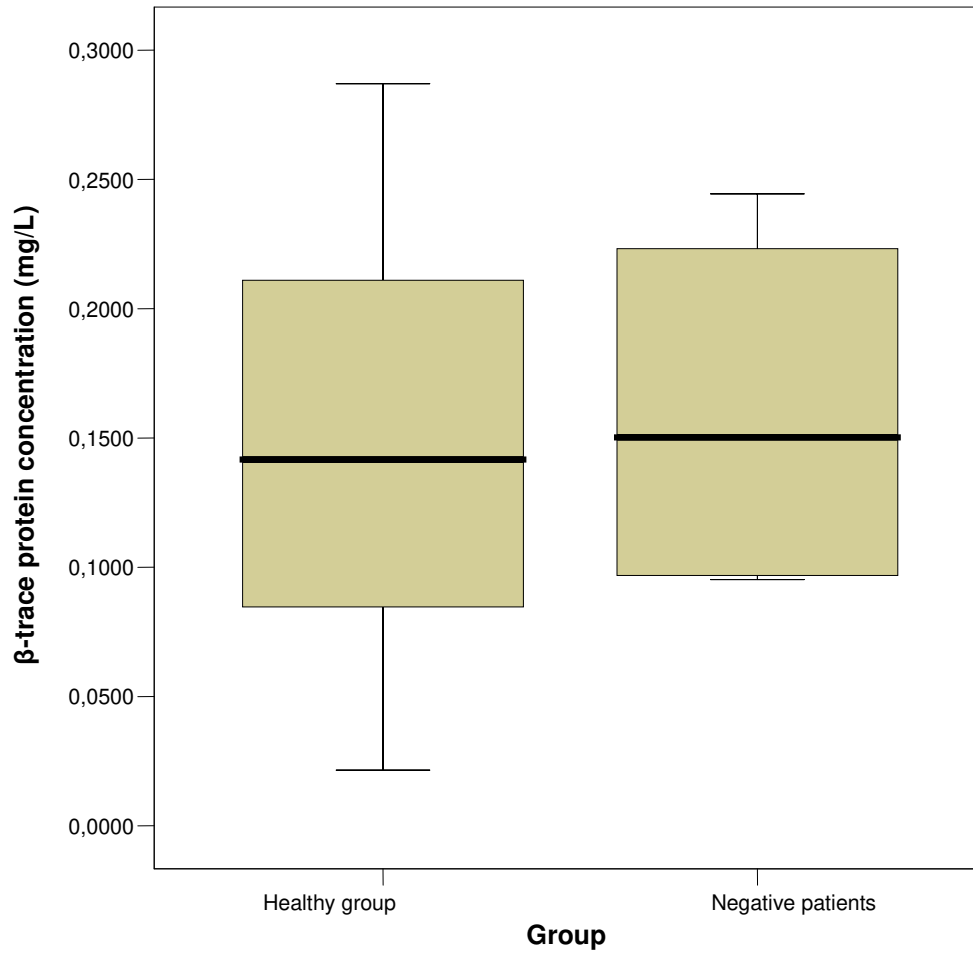
<b>Subjects</b>	<b><math>\beta</math>-trace protein concentration in normal CSF</b>
<b>1</b>	7.82
<b>2</b>	13.10
<b>3</b>	21.70
<b>4</b>	10.10
<b>5</b>	12.90
<b>6</b>	15.10
<b>7</b>	22.80
<b>8</b>	12.70
<b>9</b>	31.70
<b>10</b>	5.89
<b>11</b>	12.10
<b>12</b>	22.90
<b>13</b>	13.50
<b>14</b>	9.17
<b>15</b>	6.60
<b>16</b>	19.70
<b>17</b>	10.00
<b>18</b>	18.70
<b>19</b>	13.60
<b>20</b>	5.90

**Figure 1.**  $\beta$ -trace protein concentration in positive patients and in CSF control subjects

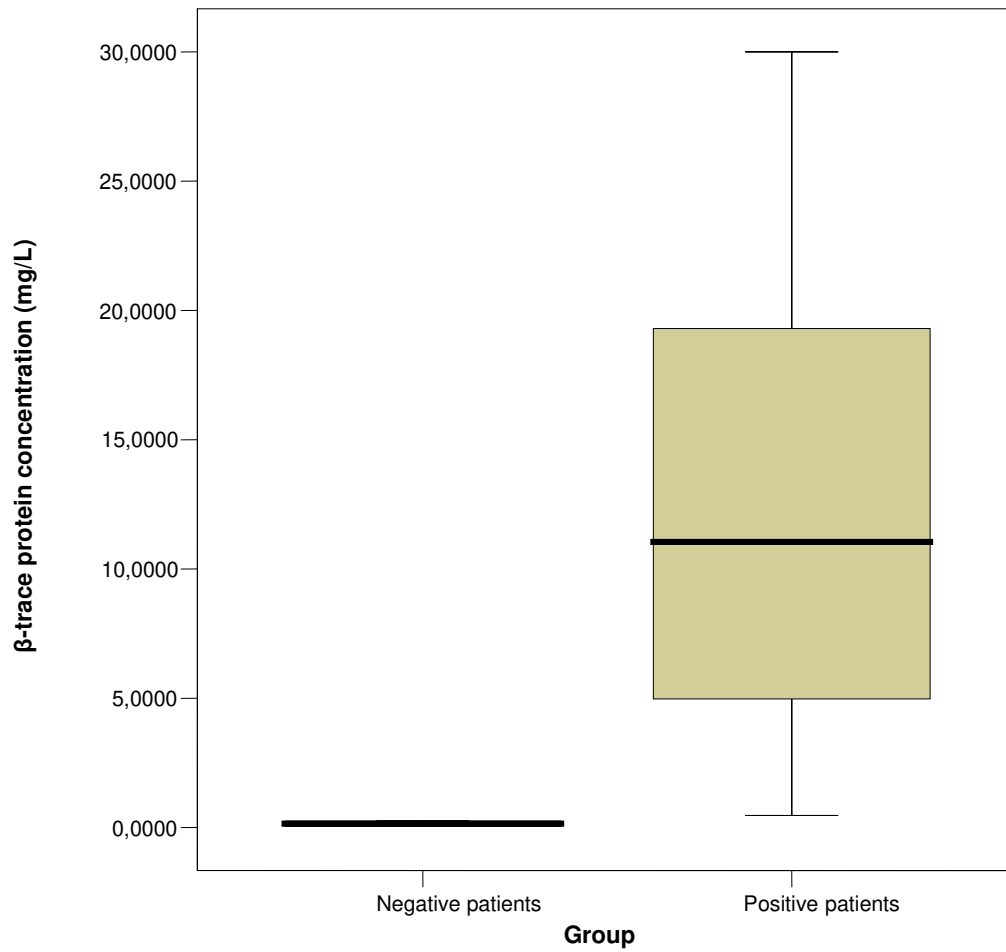
( $p=0.52$ )



**Figure 2.**  $\beta$ -trace protein concentrations in nasal secretions from negative patients and from healthy volunteers (p=0.798)



**Figure 3.**  $\beta$ -trace protein concentrations in positive and negative patients (p=0.021).



***CONCLUSÃO GERAL***

---

As conclusões obtidas no trabalho foram:

- 1.) O valor de corte para as concentrações de  $\beta$ TP foram 0,244mg/L a 0,496 mg/L.  
Pequenos traços de liquor podem ser detectados pelo teste imunonefelométrico da  $\beta$ -TP.
  
- 2.) Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram 100%, 100%, 100% e 100% , respectivamente, para o teste nefelométrico da  $\beta$ TP
  
- 3.) Concentrações de  $\beta$ TP foram maiores no lado da cavidade nasal que apresentava a FL em relação ao lado contralateral, fornecendo uma valiosa informação diagnóstica

***REFERÊNCIAS***

---



1. Mincy J. Post-traumatic spinal fluid fistulas of the frontal fossa. *J Trauma* 1966; 6:618-22
2. Bernal-Sprekelsen M, Bleda-Vazquez C, Carrau RL. Ascending meningitis secondary to traumatic cerebrospinal fluid leaks. *Am J Rhinol* 2000;14:257-9
3. Schlosser RJ; Bolger WE. Endoscopic Management of Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea. *Otolaryngol Clin N Am* 39 (2006) 523–538.
4. Gassner HG; Ponikau JU; Sherries DA; Kern EB. CSF rhinorrhea: 95 consecutive surgical cases with long term follow-up at the Mayo Clinic. *Am J Rhinol* 1999;13:439-47
5. Har-El G. What is “spontaneous” cerebrospinal fluid rhinorrhea? Classification of cerebrospinal fluid leaks. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:323-6
6. Scholsem M, Scholtes F, Collignon F, Robe P, Dubuisson A, Kaschten B et al. Surgical management of anterior cranial base fractures with cerebrospinal fluid fistulae: a single-institution experience. *Neurosurgery*. 2008;62(2):463- 71.
7. Bernal-Sprekelsen M, Alobid I, Mullol J, Trobat F, Tomás-Barberán M. Closure of cerebrospinal fluid leaks prevents ascending bacterial meningitis. *Rhinology*. 2005 Dec;43(4):277-81.
8. Meco C; Oberascher G. Comprehensive Algorithm for Skull Base Dural Lesion and Cerebrospinal Fluid Fistula Diagnosis. *Laryngoscope* 2004; 114: 991-999.
9. Lanza DC; O'Brien DA; Kennedy DW. Endoscopic repair of cerebrospinal fluid fistulae and encephaloceles. *Laryngoscope* 1996; 106:1119-25.
10. Mattox DE; Kennedy DW. Endoscopic management of cerebrospinal fluid leaks and cephaloceles. *Laryngoscope* 1990;100:857-62

11. Hegazy HM, Carrau RL, Snyderman CH, et al. Transnasal endoscopic repair of cerebrospinal fluid rhinorrhea: a meta analysis. *Laryngoscope* 2000;110:1166-72
12. Miller C. Case of hydrocephalus chronicus with some unusual symptoms and appearances on dissection. *Trans Med-Chir Soc Edinburgh*. 1826; 2:243
13. Thomson St C. The cerebrospinal fluid: its spontaneous escape from the nose with observations of its composition and function in humans subjects. London: Cassell; 1899
14. Guimarães RES, Becker HMG, Giannetti AV, Crosara PFBT, BeckerCG, Nogueira LM. Rinite vasomotora pós-cirúrgica: diagnóstico diferencial de rinoliquorrea. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(2):252-5
15. Choi D, Spann R. Traumatic cerebrospinal fluid leakage: risk factors and the use of prophylactic antibiotics. *Br J Neurosurg* 1996; 10:571-5.
16. Pappas DG Jr, Hammerschlag PE, Hammerschlag M. Cerebrospinal fluid rhinorrhea and recurrent meningitis. *Clin Infect Dis*. 1993 Sep;17:364-8.
17. Koso-Thomas AK, Harley EH. Traumatic cerebrospinal fluid fistula presenting as recurrent meningitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Mar;112(3):469-72.
18. Levin S, Nelson KE, Spies HW, et al. Pneumococcal meningitis: the problem of the unseen cerebrospinal fluid leak. *Am J Med Sci* 1972;264:319-27.
19. Calcaterra TC. Diagnosis and management of ethmoid cerebrospinal rhinorrhea. *Otolaryngol Clin North Am* 1985; 18:99-105
20. Chan DTM, Poon WS, Ip CP, Chiu PWY, Goh KYC. 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 Jan;27(1):39-42.
21. Meurman OH, Irjala K, Suonpaa J et al. A new method for the identification of cerebrospinal fluid leakage. *Acta Otolaryngol* 1979; 87: 366-369.
  22. Warnecke A, Averbeck T, Wurster U, Harmening M, Lenarz T, Stover T. Diagnostic relevance of  $\beta$ 2-transferrin for the detection of cerebrospinal fluid fistulas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Oct;130:1178-84.
  23. Ryali RG, Peacock MK, Simpson DA. Usefulness  $\beta$ 2-transferrin assay in the detection of cerebrospinal fluid leaks following head injury. *J Neurosurg.* 1992 Nov;77:737-9.
  24. Bachmann-Harildstad G. Diagnostic values of beta-2 transferrin and beta-trace protein as markers for cerebrospinal fluid fistula. *Rhinology* 2008; 46:82-85.
  25. Gorogh T, Rudolph P, Meyer JE et al. Separation of beta2-transferrin by denaturing gel electrophoresis to detect cerebrospinal fluid in ear and nasal fluids. *Clin Chem* 2005; 51: 1704-1710
  26. Petereit HF, Bachmann G, Nekić M et al. A new nephelometric assay for beta-trace protein (prostaglandin D synthase) as an indicator of liquorrhoea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 347-351.
  27. Melegos DN, Diamandis EP, Oda H, Urade Y, Hayaishi O. Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids. *Clin Chem* 1996;42:1984–91
  28. Risch L, Lisec 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. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351:169–176.

29. Arrer E; Meco C; Oberascher G; Piotrowski W; Albegger K; Patsch W.  $\beta$ -Trace Protein as a Marker for Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea. *Clinical Chemistry* 2002; 48 (6): 939-941.
30. Schnabel C, Di Martino E, Gilsbach JM, Riediger D, Gressner A, Kunz D. Comparison of  $\beta_2$ -Transferrin and  $\beta$ -Trace Protein for Detection of Cerebrospinal Fluid in Nasal and Ear Fluids. *Clinical Chemistry* 2004; 50(3):661-663.
31. Reiber H, Walther K, Althaus H. Beta-trace protein as sensitive marker for CSF rhinorrhea and CSF otorhea. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 359–362.
32. Bachmann G; Djenabi U; Jungehülsing M et al. Incidence of occult cerebrospinal fluid fistula during paranasal sinus surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128:1299-1302.
33. Meco C; Berascher 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;129:508-17
34. Melegos DN ; Grass L; Pierratos A; Diamandis EP. Highly elevated levels of prostaglandin D synthase in the serum of patients with renal failure. *Urology* 1999, 53 (1): 32-37.
35. Tumani H, Reiber H, Nau R, Prange HW, Kauffmann K, Mäder M. Felgenhauer  $\beta$ -trace protein concentration in cerebrospinal fluid is decreased in patients with bacterial meningitis. *Neurosci Lett* 1998;242:5–8
36. Lloyd KM; DelGaudio JM; Hudgins PA. Imaging of skull base cerebrospinal fluid leaks in adults. *Radiology* 2008; 248(3):725-36
37. Lund VJ, Savy L, Lloyd G, Howard D. Optimum imaging and diagnosis of cerebrospinal fluid rhinorrhoea. *J Laryngol Otol.* 2000;114(12):988-92.

38. Wise SK, Schlosser RJ. Evaluation of spontaneous nasal cerebrospinal fluid leaks. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;15:28-34.
39. Shetty PG, Shroff MM, Sahani DV, Kirtane MV. Evaluation of high-resolution CT and MR cisternography in the diagnosis of cerebrospinal fluid fistula. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998 Apr;19:633-9.
40. Placantonakis DG, Tabae A, Anand VK, Hiltzik D, Schwartz TH. Safety of low-dose intrathecal fluorescein in endoscopic cranial base surgery. *Neurosurgery* 2007;61:161-6.

*ANEXOS*

Relação de anexos:

- 1.) Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- 2.) Termo de consentimento livre e esclarecido.
- 3.) Autorização de utilização do manuscrito publicado na revista American Journal of Rhinology & Allergy.

## Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 21/12/06.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** N° 598/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0475.0.146.000-06

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA DETECÇÃO DE LÍQUOR EM FLUIDOS NASAIS ATRAVÉS DA PESQUISA DE PROTEÍNA  $\beta$  - TRACE”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Marcelo Hamilton Sampaio

**INSTITUIÇÃO:** HC/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/10/06

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 21/12/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Avaliar a acurácia da detecção da proteína  $\beta$  - trace em secreções de cavidade nasal para confirmar presença ou não de fístula líquórica em base anterior do crânio.

### III - SUMÁRIO

Pacientes com hipótese diagnóstica de fístula líquórica serão submetidos à coleta de fluido nasal através da colocação de cotonoides em fossas nasais. Essas amostras serão, então, encaminhadas para a realização do teste nefelométrico e quantificação da proteína  $\beta$  - trace. A expectativa é que seja encontrada elevada acurácia para a detecção de presença de líquido em fluidos nasais para pacientes com suspeita de serem portadores de fístulas líquóricas (FL), o que pode se constituir em uma boa alternativa diagnóstica para a detecção de FL em hospitais brasileiros.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O protocolo em questão destaca que os sujeitos de pesquisa não serão expostos a nenhum novo risco ou prejuízo devido a sua participação no estudo e garante que o tratamento será realizado normalmente conforme protocolos já estabelecidos, sem mudanças em condutas terapêuticas habituais. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado no protocolo está adequado. O orçamento previsto para condução do estudo é de R\$ 8.966,00.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem





restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Extraordinária do CEP/FCM, em 30 de outubro de 2006.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**PROJETO:** QUANTIFICAÇÃO NEFELOMÉTRICA DA PROTEÍNA BETA-TRACE PARA O DIAGNÓSTICO DA FÍSTULA LIQUÓRICA DA BASE ANTERIOR DO CRÂNIO: DETERMINAÇÃO DO VALOR DE CORTE EM FLUIDOS NASAIS UTILIZANDO DOIS GRUPOS CONTROLES.

Médico responsável: Dr. Marcelo H. Sampaio

Paciente: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ Tel.: \_\_\_\_\_

O(a) senhor (a) está sendo convidado(a) a fazer parte de um projeto de pesquisa que será realizado com o objetivo de avaliar um novo exame para o diagnóstico de fístula liquórica, na disciplina de Otorrinolaringologia Cabeça e Pescoço da UNICAMP. A fístula liquórica nasal é a saída de líquido (o líquido que envolve o sistema nervoso central) pelo nariz e o seu diagnóstico preciso ajuda o médico a decidir-se pelo adequado tratamento para a correção do problema. Não será necessário coletar nenhum exame além daqueles que já fazem parte da rotina diagnóstica de todos os pacientes que, como o(a) senhor(a), têm a suspeita de serem portadores de fístula liquórica.

Participando desta pesquisa, o(a) senhor(a) estará autorizando que a sua secreção nasal seja coletada e enviada para análise em busca de uma proteína chamada  $\beta$ -trace, a qual, se presente, confirma a presença de líquido no nariz, confirmando o diagnóstico da fístula liquórica. Para tanto, será colocado no interior de cada lado de seu nariz, três pequenos algodões. Após 15 minutos, eles serão retirados e enviados para a análise.

Sua participação é voluntária e não interferirá em nenhum momento com o seu tratamento e acompanhamento no ambulatório de Otorrinolaringologia da UNICAMP. O(a) senhor(a) tem o direito de recusar ou de se retirar do estudo a qualquer momento, mesmo tendo assinado este termo de consentimento livre e esclarecido. Será garantido o sigilo de seus dados e, em nenhum momento, seu nome será citado na pesquisa.

Caso tenha alguma pergunta a fazer, sinta-se à vontade para isto. Poderá, também, entrar em contato com o pesquisador responsável ou com o comitê de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp a qualquer momento para esclarecer suas dúvidas. Meu telefone de contato é (19) 35217524 e o telefone do CEP é (19) 35218936 ou (19) 35217187.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro ter sido informado(a) a respeito da pesquisa a qual farei parte e de ter esclarecido as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_ (assinatura do paciente)

**Marcelo Sampaio**

---

From: "Susan Colucci" <susancolucci@oceansidepubl.com>  
Date: terça-feira, 15 de fevereiro de 2011 12:42  
To: "Marcelo Sampaio" <mh.sampaio@terra.com.br>  
Subject: RE: Copyright release

Dr Sampaio,

Please let this letter serve as permission to use your manuscript:

Sampaio MH, de Barros-Mazon S, Sakano E, Chone CT. Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cutoff determination in nasal fluids with two control groups. Am J Rhinol Allergy 2009;23(6):585-90

...for the purpose of inclusion in your PhD thesis dissertation.

This permission is for the use of the above text/figure/table in print/online. **OceanSide Publications retains copyright of the above materials.** Thank you for your assurance that our content will not be used for any direct marketing, nor be modified in any way without specific permission, nor will it be made available to anyone who does not require it for regulatory/educational purposes. All corresponding copyright notices will be maintained with the text. **Please extend proper credit for the reproduced material to American Journal of Rhinology and Allergy.**

*best,  
Susan*

Susan Colucci

OceanSide Publications, Inc.  
Allergy and Asthma Proceedings  
American Journal of Rhinology and Allergy

95 Pitman Street  
Providence RI 02906  
401-331-2510 phone  
401-331-0223 fax  
susancolucci@oceansidepubl.com

---

**From:** Marcelo Sampaio [mailto:mh.sampaio@terra.com.br]  
**Sent:** Monday, February 14, 2011 8:53 PM  
**To:** susancolucci@oceansidepubl.com  
**Subject:** Copyright release  
**Importance:** High

Campinas, February 14th 2011

Permissions Department

American Journal of Rhinology

OceanSide Publications, Inc.

95 Pitman St.

Providence, RI 02906

This is to request to COPYRIGHT release of the following article published in American Journal of Rhinology & Allergy for purpose of including in my Ph.D. thesis dissertation:

Sampaio MH, de Barros-Mazon S, Sakano E, Chone CT. Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cutoff determination in nasal fluids with two control groups. *Am J Rhinol Allergy* 2009;23(6):585-90

This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. I am planning in making ten copies of my thesis. One of these copies will be displayed in the University (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) library. In addition, an electronic version of the thesis will be made available at the *University Thesis Database*.

I thank you very much in advance.

Sincerely,

Marcelo Hamilton Sampaio