

La determinazione delle catene leggere libere nel liquido cefalorachidiano: l'esperienza di due laboratori italiani

Gaetano Bernardi¹, Ivana Cataldo² a nome del Gruppo di Studio SIBioC Biochimica clinica dei liquidi biologici non ematici

¹Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

²Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale SS. Annunziata, Chieti

ABSTRACT

Quantitation of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid: the experience of two Italian laboratories. The detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid (CSF) by isoelectricfocusing and immunodetection is the current "gold standard" method to detect an inflammatory process in central nervous system. However, as this test is time consuming and subjective, some authors have tested the measurement of free light chains (FLC) in CSF using a specific automated polyclonal antibody-based assay (Freelite, The Binding Site) with promising results. Recently, another automated nephelometric monoclonal antibody-based assay for FLC has been made available (N Latex FLC, Siemens). In our laboratories, we tested FLC κ and λ in CSF and serum using both assays. To test sensitivity and specificity, multiple sclerosis (MS) patients and non inflammatory neurological disease (NIND) patients as controls were selected. Both laboratories found statistically significant ($P < 0.05$) difference between results in two groups. Using Freelite, the first laboratory defined the best cut-offs to discriminate between MS and NIND by ROC curves: i.e., 0.56 mg/L for FLC κ , 7.82 for FLC κ index, 0.31 mg/L for FLC λ and 4.36 for FLC λ index. Using N Latex FLC, the second laboratory estimated cut-offs by means of the NIND patients highest interquartile value, resulting in 0.22 mg/L for FLC κ , 2.72 for FLC κ index, 0.15 mg/L for FLC λ and 2.07 for FLC λ index. Sensitivities found with Freelite assay were 95% for FLC κ index, 83% for FLC λ index and 100% when both tests were considered. With N Latex FLC assay sensitivities were 100% for FLC κ index and 93% for FLC λ index. In both centers, isoelectricfocusing had 97% global sensitivity for MS. Our results show that, with both evaluated methods, CSF FLC can support or even replace isoelectricfocusing in clinical laboratories.

INTRODUZIONE

Le catene leggere libere (FLC) κ e λ delle immunoglobuline sono determinate nel liquor da più di 25 anni, sia con metodi qualitativi che quantitativi, con risultati molto promettenti, ma non sono mai state integrate in alcun profilo di diagnostica liquorale applicato nei laboratori clinici (1, 2). Il problema maggiore delle prime sperimentazioni condotte con questo marcatore liquorale è derivato dalla scarsa specificità degli anticorpi anti-FLC, che mostravano un'eccessiva reattività crociata con la frazione di catene leggere legata alle catene pesanti. Nei primi anni 2000 il gruppo di Bradwell, utilizzando una tecnica immunologica molto sofisticata, è stato in grado di produrre anticorpi policlonali specifici, utilizzabili anche per il siero, matrice

biologica nel quale la concentrazione delle FLC è circa 1000 volte inferiore a quella delle catene leggere legate (3). Questi anticorpi sono stati poi adattati al dosaggio automatico nefelometrico e turbidimetrico, coniugandoli a particelle di lattice, nel saggio Freelite (The Binding Site). Alcuni autori hanno utilizzato questo saggio per determinare le FLC κ e λ nel liquor, rilevando prestazioni diagnostiche molto soddisfacenti in termini di sensibilità e specificità nella diagnosi della sclerosi multipla (SM) e dei linfomi cerebrali (4-10). Recentemente è stato commercializzato un altro saggio immunometrico per la determinazione delle FLC in siero e urine (N Latex FLC, Siemens) sui sistemi nefelometrici della stessa ditta, nel quale la specificità per le FLC è stata ottenuta utilizzando una miscela di anticorpi monoclonali. A oggi, tuttavia, non sono ancora comparsi in letteratura lavori condotti sul

Corrispondenza a: Gaetano Bernardi, Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, via Celoria 11, 20123 Milano. Tel. 0223942754, Fax 0223942535, E-mail gaetano.bernardi@istituto-besta.it

Ricevuto: 18.02.2013

Revisionato: 31.07.2013

Accettato: 31.07.2013

liquor utilizzando quest'ultimo saggio.

Scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare i risultati ottenuti con la determinazione delle FLC nel liquor nell'attività ordinaria di due laboratori che hanno utilizzato, rispettivamente, il saggio Freelite su nefelometro Delta (Radim) e il saggio N Latex FLC su nefelometro BN II (Siemens) nella diagnosi differenziale tra patologie neurologiche infiammatorie, come la SM, e non infiammatorie.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Presso la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano (centro 1) sono stati esaminati 75 pazienti (46 femmine; età 47 ± 18 anni), 24 con diagnosi di SM, secondo gli attuali criteri clinici, confermati dal reperto della risonanza magnetica nucleare (RMN) e dall'isoelettrofocalizzazione (IEF), che ha dimostrato in tutti i pazienti una sintesi intratecale di IgG (13 profili di tipo 2 e 11 di tipo 3), e 51 pazienti con diagnosi di dimissione di patologia non infiammatoria del sistema nervoso centrale (NIND), in maggioranza patologie di tipo degenerativo e di tipo non infiammatorio diagnosticate sulla base dei criteri clinici e della RMN. I risultati dell'IEF erano concordanti (assenza di sintesi intratecale di IgG) nel 96% dei pazienti con NIND: 33 profili di tipo 1, 14 di tipo 4 e due indeterminati con una singola banda addizionale nel liquor rispetto al siero. Sono stati inoltre inclusi un paziente con diagnosi di angioma cavernoso del peduncolo cerebellare (profilo IEF di tipo 2) e un paziente con sindrome atassica degenerativa con profili una volta di tipo 4 e un'altra volta di tipo 3. I risultati di FLC ottenuti nei due gruppi sono stati analizzati per rilevare un'eventuale differenza statisticamente significativa. Il livello decisionale che meglio discriminava le due popolazione è stato definito utilizzando la curva ROC. Ulteriori 13 pazienti con diagnosi di dimissione di "malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale" sono stati valutati per definire il contributo diagnostico della misura delle FLC liquorali rispetto alla ricerca delle bande oligoclonali.

Presso l'ospedale SS. Annunziata di Chieti (centro 2) sono stati arruolati 21 soggetti (17 femmine, età 39 ± 9 anni), suddivisi in due gruppi in base alla diagnosi di dimissione, definita con criteri clinici, di diagnostica per immagini (RMN dell'encefalo) e di laboratorio (IEF) (11): 16 pazienti con SM, che ottemperavano a tutti i criteri di Barkoff per la RMN e mostravano in 15 casi su 16 un profilo di tipo 2 o 3 all'IEF, e 5 soggetti con RMN non tipica per SM e con profilo di tipo 1 all'IEF. Ulteriori 2 pazienti con dati clinici e di RMN insufficienti per porre diagnosi di SM, sono stati valutati con IEF e determinazione delle FLC liquorali per valutare la sensibilità dei due metodi nel diagnosticare una SM confermata dal laboratorio ("laboratory supported multiple sclerosis") (11).

In entrambi i centri, per tutte le indagini di laboratorio si è sempre utilizzato materiale residuo di prelievi eseguiti a scopo diagnostico in pazienti che avevano

firmato il consenso informato per l'eventuale utilizzo a scopo di ricerca di volumi residui dei loro campioni biologici.

Metodi

Di tutti i soggetti arruolati nello studio in entrambi i centri sono stati valutati i campioni di sangue venoso e di liquor prelevato per rachicentesi. Nel centro 1, tutti i campioni sono stati esaminati entro una settimana dal prelievo dopo averli opportunamente trattati e conservati a $+4$ °C, mentre nel centro 2 i campioni di siero e di liquor opportunamente trattati e aliquotati sono stati congelati a -70 °C per un tempo più lungo. Nel giorno della seduta analitica, le due aliquote di ciascun paziente sono state contemporaneamente scongelate per la ricerca delle bande oligoclonali con antisiero anti-catene leggere κ e λ totali e la determinazione delle FLC κ e λ nel siero e nel liquor.

Le FLC sono state determinate nel centro 1 utilizzando il saggio Freelite sul nefelometro Delta e nel centro 2 utilizzando il saggio N latex FLC su nefelometro BN II. Non essendo previsto sui due sistemi analitici un protocollo di analisi specifico per le FLC nel liquor, le metodiche fornite dai rispettivi produttori per la determinazione delle FLC κ e λ nel siero sono state adattate alle esigenze dell'indagine liquorale. In particolare, essendo documentato che le FLC sono presenti nel liquor in concentrazioni molto più basse rispetto al siero, per il saggio Freelite i campioni di liquor sono stati analizzati diluendo il liquor 1:2, mentre il siero prevede una diluizione 1:100. Nessun altro parametro dell'esame è stato modificato. Con questo accorgimento si è ottenuto un intervallo di misura di 0,11-3,50 mg/L per le FLC κ e di 0,09-3,00 mg/L per le FLC λ . Invece, l'intervallo di misura ottenuto con adattamenti simili per le determinazioni liquorali utilizzando il saggio N Latex FLC è stato di 0,04-1,12 mg/L per le FLC κ e di 0,10-3,21 mg/L per le λ . Su entrambi i sistemi, i campioni di liquor con valori superiori ai rispettivi intervalli di misura sono stati automaticamente rianalizzati a diluizioni maggiori, pre-impostate in fase di parametrizzazione sui due nefelometri. Inoltre, nel centro 1 i campioni di siero con valori inferiori all'intervallo di misura sono stati analizzati in "rerun" a una diluizione inferiore, mentre ai campioni di liquor con queste caratteristiche, non potendo essere rianalizzati a una diluizione inferiore, è stato assegnato un valore estrapolato dal segnale strumentale della misura del campione, utilizzando una curva di taratura a due punti ottenuta misurando il tampone analizzato come primo punto della curva (standard zero) e il calibratore più basso come secondo punto della curva. In entrambi i centri tutti i valori misurati sono stati elaborati sia come valori assoluti che come indici liquorali, applicando le seguenti formule:

$$\text{Indice FLC}\kappa = \frac{\text{CSF FLC}\kappa / \text{FLC}\kappa \text{ siero}}{\text{CSF albumina} / \text{albumina del siero}}$$

$$\text{Indice FLC}\lambda = \frac{\text{CSF FLC}\lambda / \text{FLC}\lambda \text{ siero}}{\text{CSF albumina} / \text{albumina del siero}}$$

Inoltre su tutti i campioni (siero e liquor) sono state determinate le concentrazioni di IgG e di albumina e sono stati calcolati il quoziente albuminico e l'indice IgG (indice di Link). La ricerca delle bande oligoclonali, attuale metodo per la definizione della sintesi intratecale di IgG, è stata eseguita mediante IEF in entrambi i centri, nel centro 1 con metodica su macrogel di agarosio, "blotting" con fluoruro di polivinilidene (PVDF) e immunorivelazione con anticorpi anti-IgG umane coniugate con perossidasi e lettura in chemiluminescenza (12) e nel centro 2 con tecnica in gel d'agarosio e successiva caratterizzazione immunologica dopo trasferimento su supporto di nitrato di cellulosa (IgG-IEF, Medical Systems), utilizzando, in tre sedute analitiche differenti, gli anticorpi anti-IgG, anti- κ e anti- λ totali.

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come frequenza (percentuale) oppure come mediana (interquartili), dove opportuno. I confronti tra gruppi sono stati valutati utilizzando il metodo non parametrico Mann Whitney U test, con significatività statistica prefissata a $P < 0,05$. L'analisi delle curve ROC è stata applicata per ricercare il miglior livello decisionale in grado di discriminare due popolazioni. Le informazioni acquisite nel centro 2 sono state registrate e analizzate per mezzo del database elettronico SPSS (version 11.0.1, SPSS Inc.).

RISULTATI

Le prestazioni analitiche del saggio Freelite in termini di imprecisione, espresse come CV, sono risultate sempre $< 5\%$ quando valutate nella serie e $< 10\%$ quando

valutate, a differenti concentrazioni, tra le serie. I valori di mediana (primo e terzo interquartile) di tutti i parametri esaminati nei due centri, sia misurati che calcolati, con la significatività statistica calcolata per le differenze tra i pazienti e il gruppo di controllo sono riassunti nella Tabella 1. Il test statistico ha evidenziato una differenza significativa per l'indice FLC κ , l'indice FLC λ e la concentrazione liquorale di FLC κ in entrambi i centri e, nel centro 2, anche per la concentrazione liquorale di FLC λ . Applicando le curve ROC, i migliori risultati si sono ottenuti in entrambi i centri con l'uso dell'indice FLC κ che, nel centro 1, al miglior livello decisionale di 7,82, mostrava una sensibilità del 95%, con un'associata specificità del 98%, mentre nel centro 2 mostrava addirittura sensibilità e specificità assolute (area sottesa dalla curva ROC = 1).

Nel centro 1, i pazienti SM sono risultati tutti positivi all'IEF per presenza di bande oligoclonali nel liquor, mentre dei 51 pazienti NIND, 49 erano negativi per sintesi intratecale di IgG, tra i quali due che presentavano una sola banda esclusivamente liquorale, criterio non sufficiente per definire una reazione oligoclonale, e due, invece, che mostravano le bande oligoclonali nel liquor (sensibilità IEF, 100%; specificità, 96%). I pazienti con SM hanno tutti mostrato almeno uno degli indici delle FLC (κ o λ) positivo, come pure due pazienti del gruppo NIND, con una sensibilità degli indici FLC pari a 100% e una specificità pari a 98%.

Nel centro 2, la ricerca delle bande oligoclonali è risultata positiva in 15 dei 16 pazienti con SM (13 pazienti con profilo di tipo 2 e due pazienti con profilo di tipo 3), sia per l'IEF con anticorpi anti-IgG che anti- κ che anti- λ , mentre il gruppo di controllo presentava in tutti i pazienti e con tutti i metodi un profilo di tipo 1, quindi

Tabella 1

Valore mediano (primo e terzo interquartile) delle variabili prese in esame, suddivise tra casi e controlli

Variabile	Centro 1			Centro 2		
	Casi (n=24)	Controlli (n=51)	P	Casi (n=16)	Controlli (n=5)	P
FLC κ siero (mg/L)	11,2 (8,7-16,7)	11,6 (8,4-15,7)	NS	13,2 (8,7-14,6)	12,0 (10,8-14,4)	NS
FLC κ liquor (mg/L)	2,9 (1,5-5,8)	0,13 (0,06-0,19)	0,032	0,9 (0,5-4,0)	0,10 (0,08-0,22)	0,001
Indice FLC κ	52,3 (32,6-107,7)	2,9 (1,6-3,8)	$< 0,001$	19,4 (5,8-64,3)	1,7 (1,4-2,7)	$< 0,001$
FLC λ siero (mg/L)	10,9 (8,4-14,5)	9,5 (8,3-14,0)	NS	12,2 (10,3-14,2)	12,3 (10,8-15,4)	NS
FLC λ liquor (mg/L)	0,8 (0,3-2,3)	0,13 (0,06-0,19)	NS	0,5 (0,2-0,7)	0,14 (0,10-0,15)	0,005
Indice FLC λ	15,1 (8,4-44,1)	2,0 (1,4-2,6)	0,003	6,7 (3,6-14,4)	1,9 (1,6-2,1)	0,001
IgG liquor (mg/L)	41,3 (26,2-68,2)	23,2 (16,0-35,2)	NS	28,0 (21,4-36,4)	23,8 (18,3-30,4)	NS
Quoziente albuminico	4,38 (3,22-6,03)	5,21 (3,80-7,41)	NS	5,10 (4,30-6,80)	6,30 (4,12-7,00)	NS
Indice di Link	0,82 (0,70-1,13)	0,49 (0,45-0,54)	NS	0,57 (0,47-0,69)	0,43 (0,41-0,53)	0,036

FLC, catene leggere libere; NS, non significativo.

negativo per sintesi intratecale di IgG o catene κ e λ . In questo centro, quindi, i risultati hanno evidenziato una maggiore sensibilità (100%) del dosaggio delle FLC κ e FLC λ rispetto all'IEF (94%) nell'identificare i pazienti con SM.

Degli ulteriori 13 pazienti valutati nel centro 1, tutti ricoverati con sospetta diagnosi di SM e dimessi con diagnosi confermata di "malattia demielinizante del sistema nervoso centrale", 10 casi sono risultati positivi per presenza di bande oligoclonali nel liquor all'IEF, 11 con indice FLC κ e 9 con indice FLC λ positivo e 12 positivi per almeno uno degli indici delle FLC. Quindi uno solo è risultato negativo per entrambi gli indici FLC. Nel centro 2, i due pazienti con diagnosi dubbia sono risultati negativi all'IEF tradizionale con antisiero anti-IgG, ma uno è risultato positivo all'IEF eseguita utilizzando l'antisiero anti- κ ed entrambi sono risultati positivi per le FLC κ liquorali, permettendo di porre diagnosi di SM supportata da un dato di laboratorio, dato che poi è stato confermato dall'evoluzione clinica in un paziente, mentre l'altro non si è presentato alla visita di controllo programmata. Il caso negativo all'IEF tradizionale IgG è risultato positivo con IEF e antisieri anti- κ e λ e debolmente positivo agli indici FLC.

DISCUSSIONE

Nei B-linfociti le catene leggere sono sempre sintetizzate in eccesso rispetto alle catene pesanti e, una volta assemblate le immunoglobuline complete, le FLC sono secrete dalle cellule immunocompetenti nei liquidi biologici. Le FLC immesse nel torrente circolatorio passano il filtro glomerulare e vengono riassorbite dai tubuli renali. Le FLC sono praticamente assenti o presenti in concentrazione minime (<15 mg/L) nelle urine fisiologiche, ma nel caso di patologia linfoproliferativa maligna possono causare un'importante proteinuria, tanto che la loro presenza nelle urine è nota da più di un secolo come proteinuria di Bence Jones. La disponibilità di nuovi anticorpi estremamente specifici e sensibili per le FLC ne ha reso possibile la misura nel siero permettendo di diagnosticare e monitorare malattie linfoproliferative sul solo campione di sangue venoso. In questo caso i parametri da misurare sono sia le concentrazioni assolute che il rapporto tra le FLC κ e λ .

Diverso è l'approccio proposto per la diagnostica liquorale, per la quale la sintesi intratecale di immunoglobuline è patognomica di processo infiammatorio del sistema nervoso centrale. Anche la produzione di immunoglobuline nel sistema nervoso centrale comporta un eccesso di sintesi di catene leggere, che viene riversato nel liquor come FLC, dove esse non solo non subiscono la depurazione renale, ma vengono anzi trattentate dalla barriera ematoencefalica, trovando le condizioni ottimali per concentrarsi nella matrice liquorale. La presenza di immunoglobuline di sintesi intratecale può essere dimostrata in laboratorio perché le immunoglobuline sono presenti in concentrazione superiore a quella imputabile al semplice passaggio di barriera o perché, essendo prodotte da un

limitato numero di cloni isolati (questa reazione è stata definita non a caso oligoclonale), sono poco eterogenee e con tecniche di separazione elettroforetica ad alta risoluzione come l'IEF assumono nel tracciato la tipica disposizione a "bande", le cosiddette bande oligoclonali. L'IEF, con successiva immunorivelazione delle IgG liquorali comparate a quelle del siero dello stesso paziente, è considerata il metodo di riferimento di laboratorio per la ricerca delle bande oligoclonali. L'approccio quantitativo per lo studio della sintesi intratecale delle diverse classi di immunoglobuline è, infatti, meno sensibile della ricerca delle bande con IEF, perché il passaggio passivo delle immunoglobuline dal siero al liquor è estremamente variabile da paziente a paziente e il confronto non viene eseguito su valori documentali riferiti al paziente stesso, ma su una base statistica derivata dai valori medi della popolazione (13). Le FLC del siero danno uno scarso rumore di fondo nel liquor perché, pur passando la barriera ematoliquorale più facilmente dell'albumina in quanto molecole più piccole, sono presenti nel siero in concentrazione molto bassa, ~1000 volte meno delle immunoglobuline complete. Le FLC presenti nel siero passano la barriera ematoliquorale e sono sempre misurabili nel liquor con metodiche con elevata sensibilità, perché presenti in una concentrazione ancora più bassa di quella del siero: a questa quota presente nel liquor per semplice passaggio, nel caso di processo infiammatorio, si aggiunge la quota di sintesi intratecale che, come dimostrato dai nostri dati, può essere superiore di diversi ordini di grandezza. Le FLC sono da considerarsi quindi proteine liquorali di origine mista, cioè sia di derivazione plasmatica che di sintesi cerebrale, e per poter interpretare correttamente il dato analitico la risposta deve essere espressa come "indice" della FLC κ o λ , applicando il calcolo descritto nella sezione "Materiali e metodi". È interessante notare come Reiber, l'autore che ha maggiormente studiato il passaggio delle proteine attraverso la barriera emato-liquorale (14), in una recente pubblicazione (15), critichi aspramente questo approccio usato da Arneth e Birklein in una precedente pubblicazione (7) e consigli di usare i valori assoluti, dato lo scarso valore dell'apporto plasmatico. Noi, pur condividendo le ragioni della risposta data successivamente da Arneth (16) in difesa dell'uso degli indici FLC, abbiamo scelto di elaborare i dati non solo come "indice", ma anche come concentrazione assoluta, tenendo in considerazione il fatto che una singola determinazione ha dei costi inferiori alla coppia di determinazioni eseguite nel siero e nel liquor. L'uso degli indici migliora, anche se non di molto, i risultati forniti dalle concentrazioni assolute delle FLC κ e λ . Bisogna anche tenere presente che la presenza di componenti monoclonali nel siero e un eventuale danno di barriera possono aumentare in modo fuorviante i risultati dei valori assoluti. Parametro indispensabile per il calcolo degli "indici" è il quoziente albuminico che dovrebbe essere sempre richiesto in caso di ricerca di processo infiammatorio nel sistema nervoso centrale.

L'uso delle curve ROC ha permesso di calcolare il

Tabella 2

Livelli decisionali proposti in letteratura per le catene leggere libere (FLC) κ e λ liquorali a confronto con i valori derivati dall'esperienza descritta nel presente lavoro

Autore (rif.)	FLC κ (mg/L)	Indice FLC κ	FLC λ (mg/L)	Indice FLC λ
Fisher (4)	0,47	6,77	ND	6,77
Desplat-Jego (5)	ND	20	ND	ND
Presslauer (6)	ND	5,9	ND	ND
Arneth (7)	0,41	6,77	ND	6,77
Villar (8)	0,53	ND	ND	ND
Presente lavoro saggio Freelite	0,56	7,82	0,31	4,36
Presente lavoro saggio N Latex FLC	0,22	2,72	0,15	2,04

ND, non disponibile.

livello decisionale ottimale per la discriminazione tra i due gruppi (casi e controlli) delle varie determinazioni eseguite nel laboratorio del centro 1 e delle stime derivate. Nella Tabella 2, i livelli decisionali così ottenuti sono comparati con quelli disponibili in letteratura, tutti ottenuti utilizzando il saggio Freelite, e come si può constatare i valori sono molto simili tra loro. Unico dato discordante è l'elevato cut-off per l'indice FLC κ ottenuto da Desplat-Jego et al. (5), nonostante un corretto protocollo di arruolamento e di valutazione che ha coinvolto 33 pazienti NIND, con una corrispondente sensibilità molto bassa, pari a 69,7%. A parte questa anomalia, i lavori condotti con il saggio Freelite forniscono risultati tra loro comparabili, mentre non lo sono assolutamente i risultati dei lavori precedenti utilizzando saggi di diverso tipo, come dimostrano i livelli decisionali di 50 mg/L per le FLC κ e di 240 mg/L per le FLC λ suggeriti nel lavoro di Fagnart et al. del 1988 (17). I lavori citati sono purtroppo poco confrontabili per quanto concerne la metodica utilizzata per la ricerca delle bande oligoclonali: Fisher et al. (4), Desplat-Jego et al. (5) e Arneth e Birklein (7) hanno usato un metodo elettroforetico in gel di agarosio (Hydrigel 6 CSF, Sebia) poco sensibile e ormai abbandonato, mentre Pressauler et al. (6) e Villar et al. (8) hanno usato IEF con immunorivelazione.

I risultati ottenuti in questo lavoro con la determinazione delle FLC liquorali ci portano a prevedere la prossima introduzione di questo dosaggio tra gli esami di diagnostica liquorale da utilizzare nel laboratorio clinico. Va però tenuto in debito conto che, anche se i dati ottenuti nello studio con il saggio N Latex FLC sono in sostanza sovrapponibili a quelli ottenuti con il saggio Freelite, il numero più esiguo di casi analizzati consiglia prudenza nella valutazione delle inferenze statistiche. Sottolineamo che lo scopo di questo lavoro non è stato tanto di confrontare due differenti metodi per misurare le FLC nel liquor, quanto di confrontare le prestazioni diagnostiche della determinazione delle FLC liquorali in due esperienze simili, ma indipendenti. I risultati ottenuti nei casi di SM e nei controlli arruolati nei

due centri sono concordanti, seppure ottenuti su pazienti diversi e con metodi diversi. I valori mediani delle FLC liquorali sono comunque risultati molto simili nei soggetti di controllo. Stranamente risultano meno concordanti gli indici derivati che, essendo adimensionali e meno dipendenti dalle curve di calibrazione, dovrebbero invece essere tendenzialmente più concordanti.

La diffusione dei metodi per la determinazione delle FLC su siero e la facile applicabilità di queste metodiche al liquor permetterà di progettare e realizzare studi multicentrici su un ampio numero di casi e di definire valori di riferimento condivisi, sulla base dei quali sarà possibile valutare con più sicurezza i risultati discordanti tra IEF e FLC, tenendo presente che l'IEF è specifico solo per le IgG, mentre le FLC documentano sintesi intratecale di tutte le classi di immunoglobuline, anche IgA e IgM, che in Italia purtroppo sono poco ricercate. Una maggiore casistica di campioni di pazienti con infarto cerebrale potrebbe anche risolvere la controversa segnalazione di Arneth sull'aumento di sintesi intratecale di FLC λ in questi casi (7). Sarà difficile, se non impossibile, sostituire la ricerca delle bande oligoclonali nel liquor, anche se la soggettività dell'interpretazione dei risultati resterà sempre un problema intrinsecamente legato a questa tecnica. La VEQ condotta dal gestore INSTAND ("Institute for standardization and documentation in medical laboratories") nel novembre 2012, su un campione che avrebbe dovuto risultare positivo per SM, ha ricevuto solo 78 risposte esatte su 175 partecipanti, pari al 45%. Dato che in letteratura la risposta specifica κ o λ non è mai stata correlata a una specifica patologia, anche se nei casi di SM la risposta κ è predominante per le FLC, ci sentiamo di raccomandare la determinazione di entrambe le FLC nel liquor, anche perché nella nostra casistica il loro uso combinato ha fornito le migliori prestazioni diagnostiche. Un'ottimale integrazione di due metodiche liquorali ad alta sensibilità, come IEF e FLC, permetterà in futuro di formulare diagnosi sempre più precoci, al fine di operare interventi terapeutici sempre più mirati, rapidi ed efficaci.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Bracco F, Gallo P, Menna R, et al. Free light chains in the CSF in multiple sclerosis. *J Neurol* 1987;234:303-7.
2. DeCarli C, Menegus MA, Rudick RA. Free light chains in multiple sclerosis and infections of the CNS. *Neurology* 1987;37:1334-8.
3. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673-80.
4. Fischer C, Arneth B, Koehler J, et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004;50:1809-13.
5. Desplat-Jégo S, Feuillet L, Pelletier J et al. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol* 2005;25:338-45.

6. Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, et al. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:1508-14.
7. Arneth B, Birklein F. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 2009;119:39-44.
8. Villar LM, Espiño M, Costa-Frossard L, et al. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 2012;413:1813-6.
9. Hildebrandt B, Müller C, Pezzutto A, et al. Assessment of free light chains in the cerebrospinal fluid of patients with lymphomatous meningitis - a pilot study. *BMC Cancer* 2007;7:185.
10. Schroers R, Baraniskin A, Heute C, et al. Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas. *Eur J Haematol* 2010;85:520-8.
11. MacDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
12. Bernardi G, Ciusani E, Croci D, et al. Le proteine liquorali. In: *Trattato italiano di medicina di laboratorio*. Spandrio L, ed. Vol. II. Padova: Piccin Nuova Libreria, 2006:15-30.
13. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000;102:322-5.
14. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, et al. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:324-32.
15. Reiber H. Free light chains in CSF – pushing a method with biased interpretations. *Acta Neurol Scand* 2009;120:445-6.
16. Arneth B. In reply to comment on "High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid". *Acta Neurol Scand* 2009;120:451-2.
17. Fagnart OC, Sindic CJ, Laterre C. Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 1988;19:119-32.