

## L'analisi del liquido cefalorachidiano

Gaetano Bernardi<sup>1</sup>, Pietro Brunati<sup>2</sup>, Tiziana Biagioli<sup>3</sup>, Sabrina Buoro<sup>4</sup>, Ivana Cataldo<sup>5</sup>, Emilio Ciusani<sup>1</sup>, Elena Corsini<sup>1</sup>, Mariarita Dessi<sup>6</sup>, Alessandra Fanelli<sup>3</sup>, Maria Teresa Muratore<sup>7</sup>, Gabriella Passerini<sup>8</sup>, Giuseppe Previtali<sup>9</sup> a nome del Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "Biochimica clinica dei liquidi biologici non ematici"

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Congregazione delle Suore dell'Addolorata "Ospedale Valduce", Como

<sup>3</sup>Laboratorio Generale, Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

<sup>4</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>5</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale SS. Annunziata, Chieti

<sup>6</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

<sup>7</sup>Laboratorio di Analisi, Ospedale Belcolle, Azienda Unità Sanitaria Locale, Viterbo

<sup>8</sup>Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Ospedale San Raffaele, Milano

<sup>9</sup>Dipartimento di Patologia Clinica, Presidio Ospedaliero di Fidenza, Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma

### ABSTRACT

**Cerebrospinal fluid (CSF) analysis.** The laboratory investigation of CSF has been developed over the years as a diagnostic tool for many neurological diseases. Although minimally invasive, CSF is obtained with a traumatic procedure; therefore, the whole laboratory process should be established to maximize the analytical performance. Based on the review of international guidelines and on the experience developed by members of the SIBioC Working Group, the present document provides practical information for laboratory professionals to better address the CSF analysis in different diagnostic situations. The report faces the pathophysiologic meaning of the determination of biochemical parameters, such as glucose, lactate, albumin, immunoglobulins,  $\beta$ -amyloid, tau protein, and the cellular content, providing also evidence on the proper methodological approach. Quantitative and qualitative CSF parameters useful to diagnose an inflammatory process of the central nervous system are discussed, particularly with reference to multiple sclerosis. Indications on how laboratory data should be presented to meet international recommendations are also included.

### INTRODUZIONE

Il liquor o liquido cefalorachidiano (LCR) è un materiale che la modalità di prelievo rende "unico". La sua peculiarità di essere a stretto contatto con lo spazio extravascolare del sistema nervoso centrale (SNC) e isolato dagli altri liquidi corporei lo rende indispensabile per la diagnostica di molte patologie del SNC.

Nonostante l'esistenza di linee guida generali e specifiche per i vari argomenti, l'esame del LCR risente di un approccio troppo spesso non standardizzato che, attraverso una gestione confusa e frammentata, può ripercuotersi sull'esito clinico. Questo documento, preparato dal Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di

Laboratorio "Biochimica clinica dei liquidi biologici non ematici", è nato con l'intento di dare indicazioni di corretto comportamento per la gestione dell'analisi liquorale, desunte dalla letteratura esistente e sostenute dall'esperienza in questo campo specifico. Nel documento si sottolinea l'importanza di tutte le fasi delle indagini liquorali, che impongono una preparazione culturale specifica e un addestramento adeguato degli operatori. Vengono date indicazioni sulle fasi preanalitiche, analitiche e postanalitiche dell'indagine e affrontati i principali quesiti diagnostici per i quali è richiesta l'analisi liquorale. Il documento non affronta nella sua interezza e complessità il tema delle indagini microbiologiche, che in un secondo tempo sarà

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](mailto:gaetano.bernardi@istituto-besta.it)

Ricevuto: 30.01.2014

Revisionato: 15.02.2014

Accettato: 24.02.2014

approfondito in collaborazione con le società scientifiche di microbiologia.

### LA RICHIESTA DI ANALISI LIQUORALI

È compito dello specialista di laboratorio definire il protocollo di gestione delle analisi liquorali per garantire l'utilizzo degli esami più efficaci (1-3); tale protocollo deve specificare le caratteristiche di tutte le fasi del processo analitico.

Per garantire l'appropriatezza della richiesta e la gestione adeguata delle analisi è necessario che il laboratorio condivida con le unità di diagnosi e cura, ed eventualmente con altri enti esterni, i protocolli e gli algoritmi diagnostici applicati a fronte di precisi quesiti diagnostici e che definisca il pannello degli esami disponibili e dei relativi tempi di refertazione (Tabella 1) (4-7).

In funzione del modello organizzativo del laboratorio, del "case mix" e dell'"expertise" del personale sono percorribili due possibili iter per lo sviluppo del processo analitico: a) in presenza di protocolli diagnostici condivisi con il clinico sono eseguiti gli esami previsti seguendo l'algoritmo concordato, compresi gli eventuali esami "reflex"; b) in assenza di protocolli condivisi, gli esami devono essere preventivamente concordati con il laboratorio. La prosecuzione delle analisi è guidata dai risultati degli esami preliminari e dal colloquio tra clinico e laboratorista.

Il campione di LCR in laboratorio deve essere accompagnato da una richiesta in cui siano presenti, oltre a dati anagrafici, data, ora e sede del prelievo, indicazioni di sospetto diagnostico, con eventuali notizie anamnestiche, e indicazioni di una figura clinica di riferimento (nome, telefono, indirizzo di posta elettronica) (1-3).

#### Tabella 1

##### Esami su liquido cefalorachidiano e livelli di esecuzione

Esami di base fruibili in urgenza:

- analisi macroscopica (aspetto e colore);
- conteggio elementi nucleati totali e differenziazione morfologica;
- proteine totali e glucosio (rapporto  $Glu_{LCR}/Glu_{siero}$ );
- colorazione di Gram e semina su terreno di coltura;
- marcatori di emorragia sub-aracnoidea.

Esami di base non sempre fruibili in urgenza:

- lattato;
- albumina e calcolo del quoziente albuminico;
- IgG e calcolo di indice IgG ed equazione di Reiber;
- marcatori di liquorrea.

Esami di approfondimento:

- isoelettrofocalizzazione IgG e/o indici catene leggere libere;
- indici anticorpali specifici;
- marcatori tumorali e calcolo sintesi intratecale;
- marcatori di malattie neurodegenerative.

### RACCOLTA, TRATTAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il LCR è un campione prezioso la cui raccolta deriva principalmente dalla rachicentesi, una procedura invasiva che può causare complicanze e pertanto raramente viene ripetuta. La contaminazione ematica legata alla puntura lombare traumatica (TLP), presente nel 14-20% dei casi (8), rappresenta l'interferenza più rilevante dal punto di vista analitico, ma non deve impedire al laboratorio di accettare comunque il materiale e cercare di utilizzarlo al meglio (4, 7, 9). Solo nel caso di alcuni marcatori (indici liquorali,  $\beta$ -amiloide) o alcune metodiche come l'"isoelettrofocusing" (IEF) o la spettrometria di massa ("matrix assisted laser desorption/ionization-time of flying spectrometry", MALDI-TOF/MS), influenzati dalla presenza di proteine ematiche, le analisi non possono essere eseguite (8).

#### Raccolta del campione

La rachicentesi viene di norma eseguita al mattino (la concentrazione di alcuni marcatori risente dei ritmi circadiani), a digiuno, in sede lombare (L3-L5). E' consigliato l'uso di aghi atraumatici (20-22 gauge) per il minor rischio di complicanze (complicanza principale è la cefalea, presente nel ~12% dei casi pur utilizzando aghi atraumatici) (8). Il LCR deve essere raccolto in quantità adeguata al numero e tipo di analisi che si prevede di eseguire ed è buona norma raccoglierlo in 3-4 provette consecutive (2). Si raccomanda di utilizzare la prima provetta per l'esame biochimico, la seconda per l'esame microbiologico e le ultime per l'esame citometrico e l'eventuale stoccaggio; se fosse disponibile un'unica provetta verrà seguito il seguente ordine di priorità: esame microbiologico se richiesto, esame citometrico, esame biochimico, aliquota per stoccaggio.

In caso di TLP o sospetto di emorragia subaracnoidea (ESA), il LCR deve essere raccolto in tre provette consecutive numerate (4). Le analisi in caso di TLP devono essere effettuate sulla terza provetta, la meno inquinata. È consigliabile la raccolta di volumi di LCR variabili tra 6 e 12 mL (1, 2, 4, 7, 8). Poiché la concentrazione delle proteine di provenienza ematica aumenta lungo la via di scorrimento (gradiente rostro-caudale), con concentrazioni più basse nel LCR ventricolare rispetto al LCR lombare (10, 11), bassi volumi riflettono la concentrazione del LCR lombare e alti volumi quella del LCR spinale, rostrale fino a quello ventricolare (8).

Il LCR deve essere raccolto in provette di polipropilene sterili, per evitare l'adesione delle cellule e delle proteine alle pareti (1, 2, 5, 12); materiali diversi influenzano la concentrazione di alcune proteine ( $\beta$ -amiloide, proteina tau) (6, 8). Non devono essere utilizzate provette di vetro non-siliconato poiché favoriscono l'adesione cellulare, soprattutto dei monociti (7, 8).

Il campione di LCR deve essere accompagnato da almeno una provetta di siero e/o plasma (1, 2, 4, 5, 7, 8). In caso di utilizzo di plasma è preferibile l'uso di plasma-

EDTA (8). Il campione di siero/plasma non deve essere emolisato o fortemente lipemico (8).

### Trasporto, consegna e gestione del campione

I campioni, trasportati a temperatura ambiente per evitare l'eventuale inibizione della crescita di alcuni microrganismi patogeni, devono pervenire rapidamente in laboratorio ed essere processati entro un'ora dalla raccolta, per minimizzare i processi di degenerazione cellulare (1, 2, 8).

Il LCR va centrifugato a 400g per 10 min a temperatura ambiente (2000g, se non è necessario conservare l'integrità cellulare); per alcuni analiti ( $\beta$ -amiloidi) è consigliata la centrifugazione a 3-5 °C (8).

### Aliquotazione e conservazione

Se non analizzato immediatamente, il LCR può essere mantenuto per brevi periodi a 4-8 °C e a -80 °C per lungo termine. Per l'analisi microbiologica, ricerche con tecniche di biologia molecolare, ricerche di antigeni e anticorpi può essere conservato a 4-8 °C per 24-48 ore (5). Per aliquotarlo sono consigliabili provette in polipropilene sterili da 1-2 mL con tappo a vite; si consiglia di preparare almeno due aliquote di LCR e di siero, meglio un numero maggiore, per non essere costretti a cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. Le provette, identificate con etichette resistenti all'acqua e alle basse temperature (-80 °C), devono avere un riempimento >75% per prevenire il criocessamento. La temperatura di conservazione dipende dagli analiti da ricercare. Le immunoglobuline (Ig) possono essere misurate a distanza di molti anni dopo conservazione a -20 °C; molte altre proteine, se non analizzate entro 2 mesi, necessitano di una temperatura di conservazione di -80 °C. Onde assicurare la stabilità di tutti i marcatori è consigliata la temperatura di conservazione di -80 °C (3, 12).

### L'ANALISI BIOCHIMICA DI BASE

Per un corretto inquadramento clinico è consigliabile che l'esame biochimico di base, associato all'analisi della cellularità, preceda sempre ulteriori indagini, indipendentemente dal sospetto diagnostico. Questa analisi comprende le determinazioni di glucosio, lattato, proteine totali, albumina e Ig.

Il glucosio rappresenta la maggiore sorgente di energia per il tessuto nervoso; il suo superamento della barriera ematoencefalica (BEE) avviene mediante un sistema di trasporto attivo. La concentrazione di glucosio liquorale (glicorrachia) è direttamente proporzionale a quella ematica e una sua corretta valutazione richiede la determinazione contemporanea dell'analita nel LCR e nel siero con il calcolo del rapporto LCR/siero (Qglu). La concentrazione di glucosio nel LCR è 50-60% dei valori sierici (13) e un Qglu <0,4-0,5 è considerato patologico (14). Valori elevati di glicorrachia sono presenti nei diabetici, mentre concentrazioni ridotte (esclusa la condizione d'ipoglicemia) sono dovute a ostruzioni del

flusso (tumori spinali), a consumo (meningiti batteriche, neoplastiche ed ESA) e a ischemia cerebrale. In rari casi, una bassa glicorrachia può essere causata da un'alterazione genetica a carico del trasportatore di glucosio (sindrome da deficienza di GLUT-1 o malattia di De Vivo) (15).

Il lattato origina dal metabolismo del glucosio in condizioni anaerobiche e viene prodotto dalla normale attività metabolica cerebrale. Non attraversa la BEE; pertanto la sua concentrazione nel LCR è indipendente dalla concentrazione plasmatica (16). I livelli di lattato nel LCR correlano in maniera inversamente proporzionale ai valori di Qglu. Valori elevati si osservano nella meningite batterica (diagnosi differenziale con la meningite virale), nell'ESA, nelle carcinomatosi meningee, nell'ictus e nelle encefalopatie mitocondriali (17).

La concentrazione di proteine totali (protidorrachia) e albumina nel LCR dipende principalmente dalla concentrazione proteica sierica e dalla funzionalità della barriera emato liquorale (BEL) e della BEE. Il contenuto proteico del LCR è fisiologicamente compreso fra 0,20-0,45 g/L contro i 60-80 g/L del siero. La protidorrachia varia con l'età ed è particolarmente elevata nel neonato e nell'anziano (5). Valori elevati si osservano nelle meningiti batteriche: una concentrazione >1,5 g/L è specifica al 99%, anche se poco sensibile (55%) (18). Alte concentrazioni si riscontrano nelle infezioni da criptococco (0,3-3,1 g/L), da micobatteri tubercolari (0,2-1,5 g/L) e nelle neuroborreliosi (19, 20). Nelle infezioni virali le proteine liquorali sono aumentate in maniera modesta, con concentrazioni <0,95 g/L (20) e nelle encefaliti da herpes simplex rimangono nei limiti fisiologici durante la prima settimana di malattia (21). Valori elevati di protidorrachia possono essere presenti anche in patologie non infettive (ESA, vasculite del SNC) e tumorali, primitive e metastatiche (22). Un aumento di protidorrachia con un normale conteggio cellulare (dissociazione albumino-citologica) si ritrova nelle polineuropatie demielinizzanti acute e croniche, come la sindrome di Guillain-Barrè (23, 24).

L'albumina sintetizzata esclusivamente a livello epatico deriva completamente dal plasma e costituisce ~57 % delle proteine liquorali. Il rapporto fra albumina liquorale e sierica costituisce il Qalb, che fornisce indicazioni sull'integrità della BEL (25). Il Qalb presenta il vantaggio di essere indipendente dai metodi di misura e consente l'uso degli stessi valori di riferimento (26, 27).

Le immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) nel LCR sono di provenienza plasmatica, ma in alcune patologie possono essere prodotte a livello intratecale, evidenziando un'attivazione immunologica del SNC. Un incremento della concentrazione di Ig nel LCR può essere ricondotto a varie cause: ipergammaglobulinemia, danno della BEL, alterato flusso liquorale, sintesi intratecale (SI) (28). Per tale motivo la sola determinazione delle Ig liquorali non è sufficiente, ma è necessario identificare anche la quota di SI. Si raccomanda di determinare albumina e IgG, sieriche e liquorali, con lo stesso metodo, possibilmente su calibratura liquorale diluendo il siero e nella stessa seduta analitica (29). Per la

determinazione quantitativa si utilizzano gli indici liquorali, IgG index ed equazione iperbolica di Reiber per IgG, IgA e IgM.

I metodi di analisi e i rispettivi intervalli di riferimento dei parametri biochimici di base sono riportati nella Tabella 2. L'imprecisione delle metodiche deve essere monitorata mediante un programma di CQI, la loro accuratezza mediante adesione a programmi di VEQ. Non esistono traguardi analitici per gli analiti liquorali, basati sulla variabilità biologica; esistono solo specifiche di qualità basate su raccomandazioni di gruppi professionali o su norme statali, come quelle del "Royal College of Pathologist of Australasia" (Tabella 3) e del Rilibäk ("Richtlinien der Bundesärztekammer" - Linee guida del comitato della Federazione medica tedesca), che propongono come traguardo un errore totale variabile in base all'analita compreso tra 5% e 20% (30).

## LE CELLULE NEL LCR

### Esame citometrico

L'esame citometrico consiste nel conteggio delle cellule (EN) e delle emazie (RBC) presenti nel LCR e

nella differenziazione degli EN in funzione delle caratteristiche morfologiche. Esso è fondamentale per l'inquadramento diagnostico, poichè un'alterata cellularità è sempre indicativa di un processo patologico in atto. La cellularità fisiologica nell'adulto è  $<5 \text{ EN}/\mu\text{L}$  e  $<5 \text{ RBC}/\mu\text{L}$  (2); i valori variano in età neonatale e pediatrica (Tabella 4).

Il metodo in microscopia ottica (MO) con camera di conta rappresenta il metodo di riferimento per il conteggio delle cellule nel LCR e la loro differenziazione (2, 3, 31). I suoi limiti sono l'elevata imprecisione, la variabilità intra- e inter-operatore, la necessità di personale altamente qualificato e il tempo necessario (32-36). I fattori che possono influire sulla qualità analitica sono il tipo di camera di conta (per il conteggio a bassa cellularità sono adeguate le camere di Fuchs Rosenthal, di Nageotte e di Neubauer), il fattore di diluizione del LCR con opportuno colorante (liquido di Turk) e le modalità di esecuzione del conteggio.

Per il conteggio delle cellule liquorali in automazione sono utilizzati gli analizzatori automatici impiegati per l'analisi citometrica di sangue e urine (32-42). L'automazione dell'esame ha vantaggi di rapidità e standardizzazione, ma presenta limiti di accuratezza e

**Tabella 2**

*Parametri biochimici di base determinati nel liquido cefalorachidiano (LCR): metodi e intervalli di riferimento*

Analita	Metodo	Intervallo di riferimento
Glucosio	Enzimatico-colorimetrici (glucosio ossidasi/perossidasi o esochinasi)	$Q_{\text{Glu}}$ : 0,5-0,6
Lattato	Enzimatico-colorimetrico perossidasi/lattato ossidasi	Adulti: 25-31 mg/dL (2,77-3,44 mmol/L) Bambini: 10-25 mg/dL (1,11-2,77 mmol/L)
Proteine totali	Colorimetrici: rosso Ponceau S, blu di Coomassie; Immunoturbidimetrici o immunonefelometrici: Acido tricloroacetico, acido solfosalicilico, cloruro di benzetonio	0,20-0,45 g/L
Albumina	Immunoturbidimetrici o immunonefelometrici	$Q_{\text{Alb}}$ ( $\text{Alb}_{\text{LCR}}/\text{Alb}_{\text{siero}} \times 10^3$ ) >15 anni: <5,0 >40 anni: <6,5 >60 anni: <8,0
Immunoglobuline	Immunoturbidimetrici o immunonefelometrici*	Rapporto LCR/siero IgG: 1/400 IgA: 1/800 IgM: 1/3400

\*A causa delle basse concentrazioni nel LCR di IgA e IgM sono necessari metodi immunonefelometrici o immunoturbidimetrici con sensibilità amplificata da particelle di lattice.

**Tabella 3**

*Traguardi analitici (errore totale ammissibile) per gli analiti liquorali stabiliti dal "Royal College of Pathologist of Australasia"*

Analita	Traguardo per valori bassi	Traguardo per valori alti
Glucosio	$\pm 0,2 \text{ mmol/L}$ ( $\leq 2,0 \text{ mmol/L}$ )	$\pm 10\%$ ( $> 2,0 \text{ mmol/L}$ )
Lattato	$\pm 0,3 \text{ mmol/L}$ ( $\leq 3,0 \text{ mmol/L}$ )	$\pm 10\%$ ( $> 3,0 \text{ mmol/L}$ )
Proteine totali	$\pm 0,02 \text{ g/L}$ ( $\leq 0,45 \text{ g/L}$ )	$\pm 5\%$ ( $> 0,45 \text{ g/L}$ )
Albumina	$\pm 0,02 \text{ g/L}$ ( $\leq 0,45 \text{ g/L}$ )	$\pm 20\%$ ( $> 0,45 \text{ g/L}$ )
IgG	$\pm 0,02 \text{ g/L}$ ( $\leq 0,1 \text{ g/L}$ )	$\pm 20\%$ ( $> 0,1 \text{ g/L}$ )

**Tabella 4**

*Intervalli di riferimento per la cellularità nel liquido cefalorachidiano. Adattato da rif. 2*

Emazie (RBC)	
- nei neonati pretermine	<1000 RBC/ $\mu$ L
- nei neonati fino a una settimana	<800 RBC/ $\mu$ L
- nei neonati fino a 3 mesi di vita	<50 RBC/ $\mu$ L
- nel resto della popolazione (neonati con età >3 mesi, soggetti in età pediatrica e adulti)	<5 RBC/ $\mu$ L
Elementi nucleati (EN) totali	
- nei neonati da 0 a 1 mese	<27 EN/ $\mu$ L
- nei soggetti in età pediatrica da 2 mesi a 16 anni	<7 EN/ $\mu$ L
- nei soggetti adulti	<5 EN/ $\mu$ L
Differenziazione EN neonati	
- linfociti	2-38%
- monociti	50-94%
- istiociti	1-9%
- neutrofilii	0-8%
- cellule neuroectoderma	rare
Differenziazione EN adulti	
- linfociti	63-99%
- monociti	3-37%
- istiociti	rari
- neutrofilii	0-2%
- cellule neuroectoderma	rare

sensibilità al valore soglia di positività. Nella Tabella 5 sono riportate le caratteristiche strumentali delle tecnologie più diffuse.

Il miglioramento nella precisione del conteggio di RBC a soglie di 1000/ $\mu$ L ha permesso di rivalutarne il ruolo diagnostico soprattutto per il calcolo reale degli EN in caso di TLP. La formula per calcolare la contaminazione è la seguente:

$WBC_{aggiunti} = WBC_{sangue} / RBC_{sangue} \times RBC_{liquor}$ , dove WBC indica il numero dei leucociti.

Il principale vantaggio degli emocitometri è la possibilità di ottenere la differenziazione delle cellule.

I sistemi che coniugano la citofluorimetria con l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati permettono un'accurata differenziazione delle cellule e forniscono informazioni sulle sottopopolazioni di mononucleati (38, 39). I citofluorimetri a flusso in uso per la valutazione degli elementi corpuscolati nelle urine possono fornire il conteggio di RBC ed EN, un'indicazione qualitativa di quest'ultimi e un conteggio diretto dei batteri eventualmente presenti (43). I sistemi di microscopia urinaria automatizzata, oltre al conteggio delle cellule, possono fornire una parziale differenziazione degli EN (40, 42); l'applicazione di questi sistemi attualmente non trova però ampia diffusione.

Qualora la strumentazione disponibile non sia dichiarata idonea dal produttore per le specifiche di sensibilità e accuratezza richieste per la citometria

liquorale, può essere comunque utilizzata a fronte di un percorso di validazione sviluppato dal laboratorio (2). Lo specialista di laboratorio deve documentare le regole di accettazione/validazione del conteggio automatizzato, prevedendo le eventuali ripetizioni e gli esami "reflex", come la revisione microscopica.

### Esame citologico

L'esame citologico liquorale consiste nell'identificazione delle cellule secondo criteri morfologici mediante lettura al microscopio di vetrini opportunamente colorati (May Grunwald-Giemsa). La tecnica più utilizzata per la preparazione delle cellule da analizzare è la citocentrifugazione, con o senza pre-arricchimento del campione (5, 44). Il pre-arricchimento, che consiste nel centrifugare il campione a bassa velocità, prelevarne il sovrantante conservandolo per le altre indagini non cellulari e risospenderne il fondello, permette di concentrare gli elementi corpuscolati del campione, ma può contribuire al danneggiamento delle cellule.

L'analisi citologica contribuisce al processo diagnostico in molte patologie neurologiche e nelle carcinomatosi leptomeningee ne costituisce il cardine (5, 45). L'esame citologico è sempre indicato quando si riscontra una pleiocitosi, quando si sospetta un'ESA o nel sospetto di una disseminazione neoplastica (45). Non esiste un consenso sulla classificazione delle

**Tabella 5**

Strumentazioni disponibili per i conteggi cellulari nel liquido cefalorachidiano in automazione e loro caratteristiche funzionali

	Coulter serie LH DxH800	Siemens Advia 120/2120i	Sysmex XE-2100	Sysmex XE-5000	Sysmex serie XN	Abott Cell Dyn Sapphire	Horiba ABX Pentra	Mindray BC-6800	UF-1000i	Iris IQ200
"Software" dedicato	SI	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI
Approvazione FDA	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO
Preparazione campione	NO	SI	NO	NO	NO	?	?	?	NO	SI
Preparazione strumento	LH SI DxH800 NO	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI
CQI	SI	SI (obbligato)	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI
Referto dedicato	SI	SI	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI
Reattivi dedicati	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Sensibilità funzionale (cellule/ $\mu$ L)	EN=200 (LH serie) EN=20 (DxH800) RBC=1000	EN=10 RBC=10	EN=30 RBC ?	EN=10 RBC=600	EN=5	EN=50 RBC=3000	?	?	EN<3 RBC ?	EN=35 RBC=342
Differenziazione cellulare	NO	SI: PMN, MN, NEUT, LINF, MO, EOS	SI: NEUT, LINF, EOS	SI: PMN, MN, EOS, HF-BF	SI: NEUT, LINF, MO, EOS, HF-BF	Parziale	SI: PMN, MN	NO	NO	Parziale
Riferimento bibliografico	155	35	37	156	157	158, 159	160	161	43, 162	40, 42

FDA, "Food and drug administration"; PMN, polimorfonucleati; MN, mononucleati; NEUT, neutrofilii; LINF, linfociti; MO, monociti; EOS, eosinofili; HF-BF, "high fluorescent-body fluid cells".

cellule presenti nel LCR, ma esistono linee guida emesse da diverse società (5, 44, 46) o indicazioni in manuali dedicati (41). La classificazione delle cellule prevede l'identificazione di:

- leucociti: granulociti neutrofilii, eosinofili, elementi delle serie istiomonocitoide, monociti attivati, cellule in fagocitosi (eritrofagi, siderofagi, lipofagi, ecc.), linfociti, linfociti attivati, plasmacellule, altre cellule (forme immature);
- elementi epiteliali che tappezzano gli spazi subaracnoidei e condrociti (da rachicentesi traumatica); anche se sono reperti non patologici devono essere descritti nel referto;
- cellule tumorali presenti o sospette: da segnalare sempre, anche se non previste nel sospetto diagnostico. Il tipo di tumore può essere difficilmente identificato su semplici basi morfologiche, è sempre necessaria un'analisi immunocitochimica.

La lettura del vetrino permette di valutare la percentuale di ciascun tipo cellulare; associando i dati qualitativi con i dati quantitativi forniti dalla citometria si completa il quadro citologico (Tabella 6). La presenza di eritrofagi e siderofagi è indicativa di ESA; i primi compaiono 12-18 ore dopo l'evento emorragico, i secondi 1-2 giorni dopo, con persistenza per ~2

settimane. I lipofagi sono indice di distruzione del tessuto nervoso. I macrofagi senza materiale intracellulare identificabile sono reperti infiammatori aspecifici.

## LA VALUTAZIONE DEL PROCESSO INFIAMMATORIO DEL SNC

La letteratura recente sostiene con sempre maggiori evidenze che il processo infiammatorio del SNC è presente praticamente in tutte le malattie neurologiche (47, 48). I più comuni parametri utilizzati per la valutazione dell'infiammazione del SNC sono:

- aumento del Qalb;
- aumento della cellularità;
- aumento della SI di Ig valutata con metodi quantitativi (indice Ig e funzione iperbolica, indici catene leggere libere) oppure mediante analisi qualitative che dimostrano la presenza di bande oligoclonali (BO).

### Quoziente albuminico

L'aumento del Qalb è il parametro biochimico riconosciuto per diagnosticare il danno di barriera, sempre presente nelle malattie infiammatorie del SNC. Per la diagnosi di processo infiammatorio il Qalb è tuttavia relativamente specifico e sensibile: infatti, è

**Tabella 6**

Sospetto diagnostico sulla base dell'esame cellulare del liquido cefalorachidiano

Pleiocitosi	Tipo di cellule prevalenti	Sospetto diagnostico
Molto elevata	Granulociti neutrofili	Meningite batterica
Elevata	Elementi mononucleati	Meningite/encefalite virale
Moderata	Elementi mononucleati	Patologia infiammatoria non infettiva del sistema nervoso centrale
Presente	Presenza di polimorfonucleati eosinofili	Infezione da parassiti, patologia tumorale, reazione a farmaci o all'applicazione di dispositivi come "shunt" ventricolo-peritoneali

sempre aumentato nelle meningiti, nelle encefaliti e poliradicolonevriti, ma può aumentare anche in processi non infiammatori, come tumori ed ESA. Nella sclerosi multipla (SM), che è la malattia infiammatoria più diffusa del SNC, il Qalb è tuttavia quasi sempre nei limiti fisiologici (25).

### Sintesi intratecale

Con il termine SI ci si riferisce a qualsiasi condizione comporti una sintesi di una determinata proteina a livello del SNC. Tuttavia, delle molte proteine di cui è stata riportata SI, solo la sintesi di IgG riveste attualmente un importante ruolo diagnostico nelle patologie del SNC. La produzione anomala di IgG può essere valutata con:

- indice IgG (noto come indice di Link) (49);
- funzione iperbolica (nota come funzione di Reiber) (50).

L'Indice IgG è il più utilizzato in quanto semplice da calcolare; è dato dal rapporto tra quoziente di IgG (QIgG) e Qalb. È un numero adimensionale, patologico per valori  $>0,7$ . Un incremento dell'indice IgG è riscontrabile nel 70-90% dei pazienti con SM, anche se tale alterazione non è specifica della malattia.

Il secondo approccio quantitativo si basa sull'uso di grafici in cui i valori di Qalb e QIgG, che si trovano rispettivamente sulle ascisse e sulle ordinate, servono come coordinate per individuare il punto del grafico in cui si posiziona il campione in esame. Il grafico è caratterizzato da una linea discriminante calcolata sperimentalmente dall'analisi di numerosi campioni con danno di barriera senza SI di Ig, detta quoziente limite (QLim): se il punto del campione si posiziona al di sopra di tale linea è presente SI (Figura 1). Il grafico di Reiber è stato interpretato matematicamente e la linea trasformata in una funzione iperbolica che discrimina la concentrazione di Ig presenti per semplice diffusione da quelle di sintesi locale. La funzione iperbolica ha la stessa sensibilità dell'indice IgG, ma è più specifica perché, non essendo lineare, corregge le sovrastime presenti in caso di danno di barriera. La funzione iperbolica ha delle costanti e delle variabili che sono caratteristiche di ogni proteina considerata, così si hanno formule specifiche per IgG, IgA e IgM (50).

La determinazione delle catene leggere libere, espressa come indice catene leggere libere  $\kappa$  e indice catene leggere libere  $\lambda$ , rappresenta un promettente

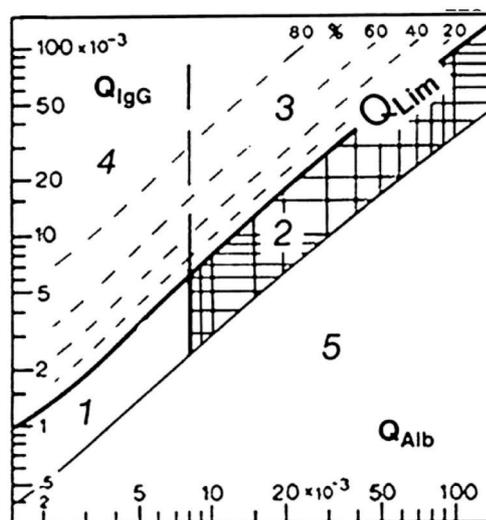
**Figura 1**

Grafico di Reiber. Se il punto ricavato dai dati del paziente cade sopra la linea del quoziente limite (QLim), è presente sintesi intratecale (SI). La parte del grafico contrassegnata dal numero 1 corrisponde all'area di normalità; l'area 2 caratterizza il danno di barriera senza SI (ad es., meningite batterica). Le aree di SI sono invece quelle contrassegnate dai numeri 4 - quando cioè il punto si trova al di sopra della linea per valori di QAlb  $<8$  (assenza di danno di barriera) - e 3 - quando si trova al di sopra della linea con valori di QAlb  $>8$ . Se le coordinate (QAlb e QIgG) individuano un punto in area 5, è possibile che si sia verificato un errore nel dosaggio di uno dei 4 parametri.

marcatore quantitativo di SI. Sono stati pubblicati lavori che utilizzano nuovi anticorpi altamente specifici per la frazione libera delle catene leggere: gli autori concordano per una sensibilità dell'analisi analoga a quella della ricerca di BO. Alcuni riportano una specificità del 86% e una sensibilità del 96% per la diagnosi di SM (51); altri, valori di 91% e 95%, rispettivamente (52). La maggior parte degli autori ha ricercato principalmente le catene  $\kappa$ , sintetizzate più frequentemente nel SNC (51-54); altri hanno dosato sia  $\kappa$  che  $\lambda$  (55, 56). L'uso combinato degli indici  $\kappa$  e  $\lambda$  aumenta la sensibilità diagnostica (57). A oggi una prevalente sintesi di catene leggere libere  $\kappa$  o  $\lambda$  non è stata correlata ad alcuna patologia specifica.

I metodi qualitativi si basano sul frazionamento delle IgG del LCR e del siero dello stesso paziente in base al

loro pl. Il confronto dei due tracciati elettroforetici permette di evidenziare eventuali IgG nel LCR del paziente che non sono presenti nel suo stesso siero. Questa analisi è il metodo di riferimento per la diagnosi di un processo infiammatorio del SNC. Le IgG di SI appaiono come BO all'indagine di tipo elettroforetico.

La tecnica più sensibile e specifica per la rivelazione delle BO è l'IEF seguita da rivelazione immunologica con anticorpo anti-IgG ("immunoblotting" o immunofissazione) coniugato con enzima (5, 58). Di tale tecnica esistono diversi metodi sia messi a punto nei laboratori di ricerca sia commerciali. L'esperienza dell'operatore è assolutamente centrale sia in fase analitica sia interpretativa; possono infatti essere presenti artefatti, dovuti alla non uniforme stratificazione degli anfoliti trasportatori (anfoline) nel gel, che simulano la presenza di BO speculari su LCR e siero, che si ripetono alla stessa altezza in tutto il gel. Per il loro riconoscimento è preferibile utilizzare gel con non meno di 3 campioni e un controllo negativo (oltre al controllo positivo). In presenza di risultati incerti, dovuti a elevato segnale di fondo delle IgG policlonali, è possibile utilizzare antisieri anti- $\kappa$  e anti- $\lambda$  anziché anti-IgG (59).

Nonostante l'elevata sensibilità, la presenza delle BO non è specifica per alcuna malattia del SNC. Infatti le BO sono presenti nel 90-95% dei casi di neurosifilide (60), nel 5-50% dei casi di meningite (61), oltre che in malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico, la sindrome di Sjögren o nelle sindromi paraneoplastiche (62, 63).

Anche se recentemente esclusa dai principali criteri diagnostici, la presenza di BO nel LCR è di sicuro ausilio nella diagnosi di SM (64, 65). Dibattuto è invece il significato diagnostico e prognostico del numero di bande osservate. Alcuni autori indicano che l'assenza (o il basso numero) di bande sia associata a una prognosi più favorevole (66, 67), mentre altri non hanno confermato tale ipotesi (68, 69). Secondo i dati di un recente studio, la positività alle BO è associata a una prognosi a lungo termine peggiore (66). Il numero di BO osservate dipende dalla sensibilità del metodo e dall'esperienza dell'operatore e non è un valido criterio diagnostico.

La presenza di una singola banda nel LCR è di incerto significato. Tale condizione è stata osservata in corso di sindromi cliniche isolate ("clinically isolated syndrome", CIS) in seguito evolute verso forme definite di

SM, che mostravano presenza di BO a una seconda rachicentesi (70). Questo profilo è stato però riscontrato anche in pazienti con neuro-lupus, encefaliti paraneoplastiche, neuropatie periferiche o linfomi.

Si ritiene utile al processo diagnostico anche la segnalazione di una singola banda liquorale: tale reperto di inequivocabile SI non è tuttavia sufficiente per diagnosticare una reazione oligoclonale. Ad oggi la maggior parte degli studi ha mostrato una stabilità del profilo delle BO nel tempo (71, 72). L'introduzione di nuove terapie immunomodulanti nel trattamento di SM potrebbe cambiare questo aspetto; recentemente è stata descritta la scomparsa di bande BO in ~20% dei pazienti in seguito a trattamento con natalizumab (73).

In assenza di materiali commerciali per CQI, si possono selezionare controlli positivi e negativi da materiale già analizzato, aliquotato e conservato a -80 °C. La partecipazione a programmi di VEQ nazionali e internazionali è indispensabile per valutare e validare le prestazioni di qualunque metodica si scelga di utilizzare.

Nella refertazione dell'analisi qualitativa è fondamentale riportare: commento interpretativo (presenza/assenza di reazione oligoclonale); il profilo rilevato [i profili possibili per consenso internazionale sono 5 (25, 65)], la segnalazione di eventuale singola banda liquorale indicando "positivo per SI, ma negativo per reazione oligoclonale".

Diverse malattie neurodegenerative presentano un alterato quadro infiammatorio: da qui la ricerca di nuovi marcatori liquorali e sierici per il loro monitoraggio. L'utilità di questi nuovi marcatori dovrà essere confermata in futuro, circoscrivendoli a specifiche patologie del SNC. (Tabella 7).

## LA DIAGNOSI DI EMORRAGIA SUBARACNOIDEA

L'ESA è un evento clinico iperacuto dovuto a invasione di sangue negli spazi subaracnoidei, per cause "spontanee" (da rottura di aneurismi delle arterie intracraniche), traumatiche o complicanze neurochirurgiche. E' spesso fatale, con mortalità >40%. Sono frequenti gli episodi di "cefalea-sentinella" con concomitante microsanguiamento.

L'esame di riferimento per la diagnosi di ESA è la tomografia assiale computerizzata (TAC) senza contrasto. Nel 10% di pazienti la TAC non evidenzia raccolte di sangue nelle cisterne e negli spazi

**Tabella 7**

*Nuovi potenziali marcatori d'infiammazione specifici per patologia neurologica*

Malattia	Mediatori infiammazione	Riferimenti bibliografici
Malattia di Alzheimer	MHC di classe II, Cox-2, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6	47, 163, 164
Morbo di Parkinson	ROS, NO, TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	47, 165
Sclerosi multipla	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-6	47, 166, 167
Sclerosi laterale amiotrofica	ROS, Cox-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1	47, 167, 168

*MHC, "major histocompatibility complex" o complesso maggiore di istocompatibilità; Cox-2, cicloossigenasi-2; MCP-1, "monocyte chemoattractant protein-1"; TNF- $\alpha$ , "tumor necrosis factor- $\alpha$ "; IL-1 $\beta$ , interleuchina-1 $\beta$ ; IL-6, interleuchina 6; ROS, specie reattive dell'ossigeno; NO, monossido di azoto; IL-17, interleuchina 17.*

subaracnoidei e l'esame del LCR può essere diagnostico. Per discriminare tra TLP ed ESA i neurologi ritengono estremamente affidabile il metodo della raccolta di LCR frazionata in 3 provette successive. Nel primo caso, il LCR si schiarisce dalla prima alla terza provetta e dopo centrifugazione appare limpido e incolore; nel secondo caso, il colore ematico permane anche dopo centrifugazione. L'emoglobina rilasciata dalle RBC dopo 12 ore viene convertita dai macrofagi in bilirubina, processo che avviene solo *in vivo*. La bilirubina determina la xantocromia del LCR, che può persistere fino a 3 settimane dall'evento nel 70% dei pazienti, periodo nel quale la TAC perde sensibilità (74). E' possibile fare diagnosi anche mediante ispezione visiva del LCR: alcuni studi hanno valutato questo criterio diagnostico dopo la formazione del personale addetto (75). Nel corso di ESA, i macrofagi fagocitano le emazie trasformandosi in eritrofagi; dopo la digestione dell'emoglobina si osservano nel citoplasma granuli di ferro e i macrofagi si trasformano in siderofagi, patognomoni di ESA.

La spettrofotometria del LCR è l'esame di riferimento per la diagnosi di ESA (9, 76). Nelle prime ore dopo l'emorragia si ricerca nel LCR la presenza di emoglobina e dopo 12 ore si determina la bilirubina, con picchi di assorbimento rispettivamente a 415 e 440-460 nm. Questo esame, introdotto quando lo spettrofotometro era presente in ogni laboratorio, attualmente è spesso di difficile esecuzione per la mancanza di questo strumento nei moderni laboratori (77). Secondo le recenti linee guida inglesi la spettrofotometria del LCR è un'analisi obbligatoria per i laboratori che sono tenuti a fare diagnosi di ESA (78). Recenti lavori dimostrano l'affidabilità della ricerca della bilirubina con strumenti automatici (79, 80).

## LA DIAGNOSI DI LIQUORREA

Per liquorrea s'intende perdita di LCR da cavità corporee naturali, come la cavità nasale (rinoliquorrea) o quella auricolare (otoliquorrea), oppure artificiali, come nel caso di perdita da ferita chirurgica. Le cause possono essere post-traumatiche, post-infettive, erosioni da tumori e post chirurgiche. E' una condizione critica perché comporta un elevato rischio di infezioni nel SNC con alto rischio di morbilità e mortalità.

Il più semplice esame di laboratorio proposto per diagnosticare una rinoliquorrea è il dosaggio del glucosio: un valore <10 mg/dL permette di escludere la presenza di LCR (81). La diagnostica più recente ricerca nel liquido in esame due proteine liquorali: l'isoforma asialilata della transferrina (Tf), presente nel LCR e assente nel siero, e la "β-trace protein" presente nel LCR in concentrazione 30-40 volte superiore rispetto al siero.

Il LCR nelle perdite da ferita è spesso commisto a sangue, pertanto la glicemia alzando il valore del glucosio non consente di utilizzarlo come marcatore. Un'eventuale commistione di secrezioni mucose nelle rinoliquorree può rendere il campione poco maneggevole. Nella maggior parte dei casi il materiale da analizzare è molto scarso.

## Isoforme della transferrina

La Tf è una glicoproteina a elevata eterogeneità per la struttura primaria e la diversa composizione delle catene glicaniche a essa legate (82). Nel sangue prevale la tetrasialo-Tf; nel LCR, accanto alla tetrasialo-Tf di derivazione ematica, è presente l'asialo-Tf (un tempo chiamata β<sub>2</sub>-Tf), prodotto di sintesi degli oligodendrociti (82, 83). Le isoforme della Tf vengono separate con metodi elettroforetici: ogni corsa deve includere con i liquidi da analizzare, un LCR come controllo positivo e un siero come controllo negativo. Il metodo di riferimento per l'analisi delle glicoforme della Tf nei liquidi biologici è l'IEF seguito da "immunoblotting" della Tf; con questo metodo si separano in modo netto tutte le isoforme della Tf e l'uso di anticorpi coniugati assicura la massima sensibilità e specificità. Il metodo, è complesso richiede personale specializzato e non permette di risolvere in tempi brevi un importante quesito diagnostico (26, 84).

Un approccio analitico più semplice e praticabile in tempi brevi è l'immunofissazione della Tf dopo elettroforesi in gel di agarosio. Il profilo immunoelettroforetico nel siero evidenzia la banda della tetrasialo-Tf, mentre nel LCR si separano due bande, la tetrasialo-Tf in posizione anodica e l'asialo-Tf in posizione più catodica. Confrontando il quadro del liquido biologico con quello dei controlli (LCR e siero) si può confermare o escludere la condizione di liquorrea (85). Con separazione elettroforetica ad altissima risoluzione e immunofissazione con antisiero anti-Tf coniugato con perossidasi, nel profilo immunoelettroforetico si evidenziano 5-6 glicoforme: nel siero pentasialo-Tf, tetrasialo-Tf e trisialo-Tf; nel LCR anche le glicoforme catodiche a ridotta sialilazione, disialo-Tf e asialo-Tf (86). L'analisi richiede un volume minimo di campione di 10 μL e si completa in meno di tre ore. La contaminazione ematica non ostacola l'interpretazione dell'analisi per tracce di LCR fino al 5% del volume del liquido (87).

## "β-Trace protein"

La "β-trace protein", così definita per la posizione che assume nella migrazione in elettroforesi zonale, è una glicoproteina di ~27 kDa a singola catena polipeptidica con attività enzimatica prostaglandina D-sintetasi. I luoghi di sintesi sono l'epitelio dei plessi corioidei e le leptomeningi nel SNC, le cellule di Leydig e l'epididimo nel resto del corpo. Per la misura quantitativa della "β-trace protein" sono disponibili metodi analitici automatizzati su strumentazione nefelometrica. L'elevata sensibilità analitica permette di valutare la contaminazione di LCR nei liquidi fino al 1-2%. Il valore soglia proposto per diagnosticare una liquorrea è >1,31 mg/L. Nel caso di secrezioni molto viscosi o scarse è consigliabile eseguire una prediluizione manuale 1:100 del campione (87, 88).

## GLI INDICI ANTICORPALI SPECIFICI

Gli anticorpi specifici presenti nel LCR seguono le stesse regole di passaggio delle BEL della classe di Ig

cui appartengono (89). La concentrazione di un anticorpo specifico liquorale dipende quindi dalla sua concentrazione nel siero, dalla sua classe di Ig e dallo stato di integrità della BEL del paziente. La presenza di un determinato anticorpo nel LCR è quindi obbligatoria se ne è documentata la presenza nel siero: nel caso in cui nel LCR dello stesso paziente risultasse non misurabile, la causa deve essere attribuita unicamente all'insufficiente sensibilità del metodo usato. Se la concentrazione di uno specifico anticorpo nel LCR supera quella prevista per semplice passaggio caratteristica della sua classe di Ig, si può affermare che è presente una SI dello stesso che, nel caso di anticorpi diretti contro agenti infettivi, documenta indirettamente un'avvenuta infezione cerebrale (90).

La risposta analitica si esprime come indice anticorpale specifico ["antibody index" (AI)]. Come tutti gli indici liquorali l'AI è un rapporto tra due quozienti: il quoziente delle misure degli anticorpi specifici su LCR e siero diviso per il quoziente delle misure delle Ig della classe ricercata su LCR e siero (per convenzione tutti i risultati dei rapporti proteici LCR/siero vengono moltiplicati per 1000):

$$AI = \frac{Ab \text{ specifico}_{(LCR)} / Ab \text{ specifico}_{(siero)} \times 10^3}{Ig \text{ totali}_{(LCR)} / Ig \text{ totali}_{(siero)} \times 10^3}$$

AI ha valore uguale a 1 se l'anticorpo trovato è presente per semplice passaggio (quindi negativo per SI), >1 se c'è SI. Se il quoziente di Ig totali del paziente è superiore al suo QLim, il QLim deve essere messo al denominatore. Non è corretto esprimere il risultato in concentrazione liquorale e confrontarlo con un empirico valore di soglia, perché il semplice dato liquorale non considera tutte le variabili sopra citate; solo il calcolo dell'AI del paziente permette di sapere con esattezza se nel paziente in esame ci sia stata o meno SI di quell'anticorpo specifico.

Gli anticorpi specifici IgG possono essere ricercati anche con metodo qualitativo ("blotting" di affinità) (91, 92). Tale metodica dimostra che gli anticorpi, separati in singole bande, sono in grado di legare gli antigeni specifici; essendo di difficile applicabilità clinica, tale metodica non è però consigliata dalle linee guida dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI) (4). L'AI ha una sensibilità paragonabile al corrispondente metodo qualitativo. Le misure su LCR e siero degli anticorpi specifici sono confrontate con quelle degli anticorpi totali della stessa classe di Ig su LCR e siero dello stesso paziente e quindi si ottiene una misura diretta di quanto è realmente passato attraverso la barriera.

### Malattie infettive

Tradizionalmente la sierologia si applica ai processi infettivi soprattutto di eziologia virale. La produzione di anticorpi specifici è una prova indiretta di avvenuta infezione e compare dopo un periodo di latenza di giorni. Al dosaggio di anticorpi specifici, oggi generalmente si preferiscono tecniche di amplificazione genica (PCR) per genomi virali o di altri agenti infettivi. In realtà, le due

tecniche si integrano, come dimostrato per l'encefalite erpetica, nella quale la PCR è positiva nelle fasi iniziali di infezione e poi si negativizza entro 10 giorni. Trascorso tale tempo, la diagnosi può solo essere supportata dalla dimostrazione di una SI di anticorpi specifici (93). Calvario e Scarasciulli hanno specificamente studiato la diagnostica virologica su LCR mediante "real-time" PCR (94).

Nel documento dell'"European Federation of Neurological Societies" (EFNS) del 2006 (5) sono elencate le patologie infettive per le quali la sierologia liquorale ha a tutt'oggi utilità diagnostica. Si enfatizza la grande importanza dell'analisi liquorale per diagnosticare la neurologia: una SI di anticorpi anti-antigeni treponemici dimostrata con AI positivi a "Treponema pallidum hemoagglutination assay" (TPHA) o esami immunoenzimatici analoghi o a "fluorescent treponemal antibody absorption" (FTA) documenta una pregressa infezione cerebrale da *Treponema pallidum*, mentre una SI con AI positivi per "veneral disease research laboratory" (VDRL) o una SI con AI IgM anti-treponema positivi depongono per una fase attiva di malattia.

Una risposta specifica verso un agente infettivo comporta elevati AI per l'agente patogeno. Nella SM è spesso presente una risposta polispecifica verso più agenti infettivi, con AI che tendono a essere più bassi di quelli trovati nelle forme post-infettive. Questo fenomeno si ricerca calcolando gli AI IgG specifici per morbillo, rosolia e herpes zoster (MRZ) ed è stato definito come reazione MRZ (28). La reazione MRZ, che non documenta una pregressa infezione, ma una generica e aspecifica attivazione dei linfociti B, è altamente sensibile e specifica per SM e si considera positiva se almeno due AI sono positivi (95).

### Malattie autoimmuni

Nelle numerose malattie autoimmuni da anticorpi verso antigeni del SNC, la SI di autoanticorpi rimane controversa. I pochi dati pubblicati documentano solo l'alta frequenza di reperti liquorali di tipo infiammatorio in questi pazienti (63). La SI di anticorpi anti-tiroide è stata proposta e documentata come criterio diagnostico per l'encefalite di Hashimoto (96). Studi successivi, in cui non è stata fatta una corretta ricerca di SI di anticorpi anti-tiroide, non hanno tuttavia confermato questi dati (97). Approcci proteomici per la valutazione dell'assetto immunitario di questa encefalopatia sono attualmente oggetto di studio (98).

### Classi anticorpali da ricercare

Secondo la teoria di Reiber, ampiamente condivisa nei paesi del Nord Europa, la risposta anticorpale liquorale non seguirebbe le cinetiche di classe tipiche del sistema immunitario sistemico; la presenza di IgM non sarebbe un fenomeno che caratterizza un'infezione recente ma un marcatore del tipo di patogeno coinvolto (99, 100). Secondo questa teoria la sola ricerca della sintesi delle tre classi di Ig sarebbe in grado di indirizzare

la diagnosi per un agente specifico. In particolare:

- un quadro liquorale con aumento predominante delle IgA è suggestivo di una forma tubercolare;
- un aumento limitato alle IgM con numerose cellule, lattato nel LCR nei limiti fisiologici e danno di barriera è tipico della neuroborreliosi acuta;
- la neurosifilide è caratterizzata da una risposta intratecale prevalentemente di tipo IgG, più rara la SI di IgM;
- una risposta IgG associata a una risposta IgA è tipica della persistenza di un'infezione batterica;
- un aumento delle sole IgG con BO evidenti e negatività degli altri parametri infiammatori è tipico della SM.

La ricerca di SI di IgM specifiche è raccomandata nelle fasi precoci di neuroborreliosi (101), nella neurolue e, fino a tempi recenti, lo era anche nella diagnosi di encefalite acuta da West Nile virus, prima che fosse messa a punto la ricerca del genoma virale con PCR (102). Per altri casi la SI di anticorpi IgM specifici ha in letteratura solo segnalazioni sporadiche.

## DIAGNOSI DELLE DISSEMINAZIONI NEOPLASTICHE LEPTOMENINGEE

Le disseminazioni neoplastiche leptomeningee (DNL) sono complicanze neurologiche che si verificano nel 5-15% dei pazienti affetti da tumore quando cellule neoplastiche raggiungono gli spazi subaracnoidei (5, 45). Le cellule tumorali possono derivare da tumori primitivi del SNC, da tumori solidi o da tumori ematologici. Nel 5-10% dei pazienti si tratta della prima manifestazione del tumore (sede primitiva non nota). La prognosi è generalmente infausta, ma una rapida diagnosi permette l'avvio di terapie aggressive, che hanno lo scopo di prevenire un ulteriore deterioramento neurologico. I sintomi neurologici sono molteplici; la diagnosi di DNL dovrebbe essere considerata in tutti i casi di interessamento multifocale del sistema nervoso e in caso di comparsa di sintomi/segni neurologici in pazienti con neoplasie note.

L'esame citologico è l'esame di riferimento per DNL (2, 44, 46, 103). Si tratta di un esame altamente specifico, ma poco sensibile (104-108). Quando il primo esame citologico è negativo, vi è l'indicazione a eseguire una seconda rachicentesi sulla quale ripetere l'esame. Con il secondo citologico si raggiunge una sensibilità prossima al 90% (109, 110). La specificità dell'esame citologico con esito positivo per cellule neoplastiche in un paziente con un tumore primitivo noto è del 100% (111, 112). L'identificazione certa anche di una sola cellula tumorale è sufficiente per porre diagnosi di DNL (113).

Per aumentare la sensibilità si raccomanda di processare rapidamente il campione (106, 114), in quanto la vitalità delle cellule dipende dal tempo che intercorre tra la rachicentesi e la preparazione dei vetrini (dopo 30 min sono vitali solo il 50% delle cellule, dopo 90 min solo il 10%) e di raccogliere un volume opportuno di LCR, possibilmente  $\geq 10$  mL (106, 115).

Per quanto l'esame citologico rappresenti il cardine

diagnostico delle DNL, altre metodiche come l'immunocitochimica, la citogenetica e la biologia molecolare possono confermare la natura tumorale delle cellule e indirizzare la diagnosi in caso di tumori primitivi non noti (41, 45, 103, 116), mentre la citofluorimetria è indispensabile nella diagnostica delle DNL di tumori ematologici (117, 118). Per il monitoraggio mediante citofluorimetria dei pazienti affetti da tumori ematologici con DNL in terapia è necessario riferirsi a linee guida specifiche (38).

Nei pazienti con DNL si osserva l'alterazione aspecifica in >90% dei casi di almeno uno dei parametri liquorali comunemente analizzati: vi è un aumento della pressione liquorale nel 46% dei pazienti, pleiocitosi in ~60%, aumento delle proteine totali nel 80%, diminuzione della glicorrachia nel 55% (110). Alcuni autori inoltre riportano elevati valori di lattico deidrogenasi (LDH) nel LCR o anomalie nel quadro dei suoi isoenzimi (119, 120). Tuttavia, si tratta di reperti aspecifici.

A causa dell'insoddisfacente sensibilità dell'esame citologico, da anni si è alla ricerca di marcatori che possano supportare la diagnosi di DNL (121). Tra i marcatori emergenti, vi sono i fattori proangiogenici, come il "vascular endothelial growth factor" (VEGF) e lo "stromal cell-derived factor 1" (SDF1) (122), o della fibrinolisi, come l'"urokinase-type plasminogen activator" (uPA) e il "tissue-type plasminogen activator" (tPA) (123). Tuttavia, non ci sono ancora evidenze convincenti, soprattutto per l'insufficiente specificità di tali molecole.

## Marcatori tumorali per la diagnosi di DNL

La determinazione di marcatori tumorali (MT) su LCR deve essere validata in ciascun laboratorio, in base al tipo di analizzatore utilizzato (124). In letteratura non c'è ancora un accordo sull'utilità della determinazione dei MT su LCR e su come esprimere e interpretare i dati. Questo è dovuto all'uso di approcci non corretti, come l'analisi del semplice dato numerico della concentrazione del marcatore nel LCR confrontato in modo empirico con il valore su siero o il calcolo di un valore soglia per il solo dato del LCR senza tenere conto del valore del siero e dello stato della BEL (22, 124-126).

Il solo dato da utilizzare per la diagnosi è quello derivante dal calcolo della SI del MT stesso. Per il calcolo della frazione di SI dei marcatori antigene carcinoembrionario (CEA), antigene carboidratico 125 (CA125), CA15.3 e CA19.9 è stata proposta con successo la formula di Reiber per le IgA (50, 124), dato che il PM dei marcatori mucinici è molto simile a quello delle IgA:

$$MT_{SI} = (Q_{MT} - Q_{Lim_{MT}}) \times MT_{siero} / 1000$$

$$\text{dove } Q_{MT} = MT_{LCR} / MT_{siero} \times 1000$$

$$Q_{Lim_{MT}} = 0,77 (Q_{alb}^2 + 23 \times 10^{-6})^{1/2} - 3,1 \times 10^{-3}$$

## Marcatori tumorali per tumori germinali intracranici

I tumori germinali intracranici sono un gruppo

eterogeneo di neoplasie derivanti da un'aberrante migrazione e differenziamento delle cellule germinali durante l'embriogenesi. In alcuni di essi, i tumori "secernenti", a prognosi peggiore, si ha sintesi di gonadotropina corionica umana  $\beta$ ,  $\alpha$ -fetoproteina o di entrambi. La determinazione di questi MT sia nel siero che nel LCR può contribuire al processo diagnostico e al successivo monitoraggio (127-129). Secondo alcuni autori, la misura su LCR sarebbe più sensibile di quella su siero (130-132). Anche in questo caso è però necessario stimare la SI.

## DIAGNOSI DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

La demenza è una sindrome clinica caratterizzata da un deficit della memoria che, associata a un progressivo deterioramento delle funzioni cognitive, causa una significativa riduzione della capacità di svolgere le comuni attività della vita quotidiana e una crescente incompetenza sociale (133). Le demenze si possono classificare in forme degenerative primarie [malattia di Alzheimer (MA), demenza vascolare, demenza fronto-temporale, demenza a corpi di Lewy] e forme secondarie a disordini metabolici ed endocrini, a deficit nutrizionali, a infezioni, traumi, neoplasie, abuso di alcol, uso di farmaci e sostanze tossiche.

La MA è la patologia neurodegenerativa più diffusa; costituisce il 50-60% delle forme di demenza diagnosticate clinicamente (134) ed è preceduta da uno stadio clinico precoce, definito deterioramento cognitivo lieve ("mild cognitive impairment" o MCI). Il rischio di progressione a MA è stimato nei diversi studi dal 6% al 15% all'anno (135, 136). La diagnosi è essenzialmente clinica e si basa su criteri standardizzati (137-139). Criteri di supporto sono costituiti da indagini radiologiche [tomografia a emissione di positroni (PET), tomografia a emissione di fotone singolo (SPECT), risonanza magnetica nucleare (MRI)] e da dosaggi di marcatori proteici nel LCR (137, 138). Attualmente sono valutati:

- proteina  $\beta$ -amiloide<sub>(1-42)</sub>, derivante dalla proteolisi di un precursore amiloideo e costituente le placche amiloidi;
- proteina tau totale (h-tau), associata ai microtubuli e localizzata prevalentemente nell'assone, espressione del danno neuronale;
- proteina tau fosforilata<sub>(181P)</sub>, forma iperfosforilata della proteina tau, espressione della degenerazione neurofibrillare (140).

Per la scarsa stabilità dei marcatori, soprattutto della  $\beta$ -amiloide, si raccomandano le seguenti procedure preanalitiche (8, 141-143):

- raccolta in provette di polipropilene sterile;
- esclusione dei campioni con RBC  $>500/\mu\text{L}$ ;
- centrifugazione a 2000g per 10 min a 4° C;
- conservazione a -80 °C in provette di polipropilene con riempimento  $>75\%$ , evitando ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

I metodi di analisi attualmente in commercio sono degli ELISA per la determinazione del singolo analita e il

Luminex xMAP ("microbead-based multianalyte profiling") per la determinazione parallela dei 3 biomarcatori (140). I metodi ELISA determinano concentrazioni più elevate del metodo xMAP, nonostante l'equivalente accuratezza diagnostica per MA (144-146). Alcuni autori segnalano una marcata variabilità tra lotti di reagenti, più elevata per  $\beta$ -amiloide, e un forte impatto dell'esperienza dell'operatore (146). Attualmente la mancanza di standardizzazione delle procedure determina un'elevata variabilità intra-laboratorio (CV intraserie tra 5% e 10% e interserie tra 8% e 15%) (133, 147) e inter-laboratorio (CV tra 20% e 30%), più elevata per  $\beta$ -amiloide (147, 148). Tale variabilità nella misura dei biomarcatori rende al momento problematica l'introduzione di valori soglia unici per tutte le metodiche (149). Sorprendentemente, utilizzando valori soglia metodo-specifici predefiniti per diagnosi di MA, si osserva una notevole concordanza nell'esito clinico tra i vari laboratori ( $>90\%$  per utilizzatori ELISA) (147). L'imprecisione intraserie, ridotta analizzando controlli e campioni in doppio, si considera accettabile per CV  $<20\%$ . L'imprecisione interserie si monitora includendo nelle sedute analitiche un CQI preparato con un pool di LCR. Per la verifica dell'accuratezza delle misurazioni eseguite si consiglia l'adesione a un programma di VEQ (ad es., Instand o "Alzheimer's Association QC program").

Sono stati condotti molti studi clinici sulle singole analisi e sulla combinazione dei 3 marcatori, ottenendo sensibilità e specificità diagnostiche elevate (80-90%) (6, 144, 150, 151). L'utilizzo combinato di  $\beta$ -amiloide e h-tau ha mostrato un'elevata capacità di discriminare tra MA e altre forme di demenza, con sensibilità e specificità variabili tra 80% e 90% (152). Il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo, con una prevalenza pari al 45%, sono risultati rispettivamente del 90% e del 95% (153). Il dosaggio della tau fosforilata aumenta la specificità nei confronti della demenza a corpi di Lewy e della demenza frontotemporale (6).

La determinazione combinata dei 3 analiti nel LCR può individuare i casi di MCI che presumibilmente evolveranno in MA e discriminare soggetti sani da pazienti affetti da MA o da altre forme di demenza. L'utilizzo a fini prognostici dei marcatori liquorali è condizionato da problemi etici e pratici (144). L'utilità diagnostica è controversa: in alcuni documenti se ne riconoscono i potenziali benefici, in altri invece viene sconsigliata (154). L'indicazione principale è, ad oggi, la diagnosi differenziale tra i diversi tipi di demenza, come mostrato nella Tabella 8.

## IL REFERTO

Il referto dell'analisi del LCR deve contenere informazioni sufficienti e chiare per consentire al clinico la corretta interpretazione (1-3). Oltre ai contenuti standard (identificazione del laboratorio, anagrafica paziente e numero identificativo del campione, identificativo e indirizzo del richiedente, data e ora del prelievo e ora di ricevimento in laboratorio, tipo di campione biologico e modalità di prelievo, tipo di esame

**Tabella 8**

Utilizzo dei marcatori proteici nella diagnosi differenziale delle demenze

Malattia	Deposizione di amiloide (↓ β-amiloide <sub>1-42</sub> )	Patologia neurofibrillare (↑ tau fosforilata)	Danno assonale corticale (↑ tau totale)
Malattia di Alzheimer	SI	SI	SI
Demenza vascolare	NO	NO	SI (infarto)
Demenza frontotemporale	NO	SI	SI
Demenza a corpi di Lewy	SI	NO	SI
Malattia di Parkinson	NO	NO	NO
Paralisi progressiva sopranucleare	NO	SI (no se dosata nel LCR)	NO
Creutzfeld-Jakob	NO	NO	SI (elevata)
Forme depressive	NO	NO	NO
Infarto cerebrale	NO	NO	SI
Invecchiamento	NO	NO	NO

LCR, liquido cefalorachidiano.

eseguito, intervalli di riferimento in funzione dell'età, risultati espressi in unità SI o unità riconducibili a SI, data e ora di rilascio del referto, identificazione e firma della persona che ne autorizza il rilascio), per la diagnostica liquorale è consigliabile riportare le seguenti informazioni aggiuntive (1-3):

- sede anatomica di prelievo (soprattutto se non avvenuto in sede lombare);
- aspetto e colore prima e dopo la centrifugazione;
- segnalazione di anomalie osservate sul campione o in fase preanalitica (inquinamento ematico);
- commenti esplicativi e interpretativi standardizzati, condivisi da laboratorista e clinico.

### CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. CLSI. Analysis of body fluids in clinical chemistry. Approved guideline. CLSI document C49-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
2. CLSI. Body fluid analysis for cellular composition. Approved guideline. CLSI document H56-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
3. International Organization for Standardization (ISO) 15189:2012. Medical laboratories requirements for quality and competence. Geneva: ISO, 2012.
4. Associazione Italiana di Neuroimmunologia AINI. Standardizzazione delle metodiche: esame del liquido cerebrospinale, 2005. [www.aini.it](http://www.aini.it).
5. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006;13:913-22.
6. Deisenhammer F, Egg R, Giovannoni G, et al. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *Eur J Neurol* 2009;16:760-70.
7. Andreani P, Bianco I, Botta F, et al, eds. *Vademecum per l'esame del liquor cerebrospinale in urgenza*. Milano: Medimed, 2009.
8. Teunissen CE, Tumani H, Bennett JL, et al. Consensus guidelines for CSF and blood biobanking for CNS biomarker studies. *Mult Scler Int* 2011;2011:246412.
9. Cruickshank AM. Revision of national guidelines for cerebrospinal fluid analysis in suspected subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem* 2008;45:236-7.
10. Fishman RA and Dillon WP. Dural enhancement and cerebral displacement secondary to intracranial hypotension. *Neurology* 1993;43:609-11.
11. Thompson EJ and Keir G. Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Ann Clin Biochem* 1990;27:425-35.
12. Teunissen CE, Tumani HT, Bennett JL, et al. Short commentary on 'a consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking'. *Mult Scler* 2010;16:129-32.
13. Jerrard DA, Hanna JR, Schindelheim GL. Cerebrospinal fluid. *J Emerg Med* 2001;21:171-8.
14. Feigin RD, Wong M, Shackelford PG, et al. Countercurrent immunoelectrophoresis of urine as well as of CSF and blood for diagnosis of bacterial meningitis. *J Pediatr* 1976;89:773-5.
15. Wang D, Pascual JM, De Vivo D. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington, 1993-2014.
16. Watson MA, Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995;41:343-60.
17. Leen WG, Willemsen MA, Wevers RA, et al. Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PLoS One* 2012;7:e42745.
18. Lindquist L, Linne T, Hansson LO, et al. Value of cerebrospinal fluid analysis in the differential diagnosis of meningitis: a study in 710 patients with suspected central nervous system infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:374-80.
19. Kaiser R. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease. *Int J Med Microbiol* 2002;291(suppl 33):58-61.
20. Negri B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis. *Pediatrics* 2000;105:316-9.
21. Koskiniemi M, Vaheri A, Taskinen E. Cerebrospinal fluid alterations in herpes simplex virus encephalitis. *Rev Infect Dis* 1984;6:608-18.

22. Twijnstra A, Ongerboer De Visser BW, Van Zanten AP, et al. Serial lumbar and ventricular cerebrospinal fluid biochemical marker measurements in patients with leptomeningeal metastases from solid and hematological tumors. *J Neurooncol* 1989;7:57-63.
23. Segurado OG, Kruger H, Mertens HG. Clinical significance of serum and CSF findings in the Guillain-Barre syndrome and related disorders. *J Neurol* 1986;233:202-8.
24. Seneviratne U. Guillain-Barre syndrome. *Postgrad Med J* 2000;76:774-82.
25. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
26. Blennow K, Fredman P. Detection of cerebrospinal fluid leakage by isoelectric focusing on polyacrylamide gels with silver staining using the PhastSystem. *Acta Neurochir* 1995;136:135-9.
27. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995;41:256-63.
28. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998;4:111-7.
29. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:331-7.
30. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
31. College of American Pathologists. Accreditation program hematology and coagulation checklist 07.29.2013. [www.cap.org](http://www.cap.org).
32. Aune MW, Becker JL, Brugnara C, et al. Automated flow cytometric analysis of blood cells in cerebrospinal fluid: analytic performance. *Am J Clin Pathol* 2004;121:690-700.
33. Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin Biochem* 2009;42:684-91.
34. De Jonge R, Brouwer R, De Graaf MT, et al. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:665-75.
35. Mahieu S, Vertessen F, Van Der Planken M. Evaluation of ADVIA 120 CSF assay (Bayer) vs. chamber counting of cerebrospinal fluid specimens. *Clin Lab Haematol* 2004;26:195-9.
36. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, et al. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int J Lab Hematol* 2011;33:629-37.
37. Buoro S, Ottomano C, Giustinetti R, et al. Evaluation of Sysmex XE-2100 for enumeration and differentiation of cellular elements in peritoneal and pleural fluids. *Clin Biochem* 2013;37:275-8.
38. De Graaf MT, De Jongste AH, Kraan J, et al. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:271-81.
39. De Graaf MT, Smitt PA, Luitwieler RL, et al. Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:43-50.
40. Glasser L, Murphy CA, Machan JT. The clinical reliability of automated cerebrospinal fluid cell counts on the Beckman-Coulter LH750 and Iris iQ200. *Am J Clin Pathol* 2009;131:58-63.
41. Kluge A, Wieczorek V, Linke E, et al. Atlas of CSF cytology. Stuttgart: Georg Verlag, 2007.
42. Walker TJ, Nelson LD, Dunphy BW, et al. Comparative evaluation of the Iris iQ200 body fluid module with manual hemacytometer count. *Am J Clin Pathol* 2009;131:333-8.
43. Buoro S, Ottomano C, Appassiti Esposito S, et al. Analytical and clinical evaluation of Sysmex UF1000i for automated screening of cerebrospinal fluids. *J Med Biochem* 2014;33:191-6.
44. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M, eds. *European handbook of neurological management*, Vol. 1. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.
45. Dutch Neuro-Oncology Working Group. *Nation-wide guideline, Version: 1.0 Leptomeningeal metastases*. 2006. [www.guideline.gov](http://www.guideline.gov).
46. Adam P, Sobek O, Taborsky L, et al., eds. *Cytology of cerebrospinal fluid*. Praha: MjF, 2003.
47. Glass CK, Saijo K, Winner B, et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010;140:918-34.
48. Akiyama H. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 1994;174:295-303.
49. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:397-401.
50. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-28.
51. Presslauer S, Milosavljevic D, Brucke T, et al. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:1508-14.
52. Duranti F, Pieri M, Centonze D, et al. Determination of kFLC and K Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013;263:116-20.
53. 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.
54. Villar LM, Espino 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.
55. Arneth B, Bircklein 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.
56. Desplat-Jego 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.
57. Bernardi G, Cataldo I. La determinazione delle catene leggere libere nel liquido cefalorachidiano: l'esperienza di due laboratori italiani. *Biochim Clin* 2013;37:389-94.
58. Fortini AS, Sanders EL, Weinschenker BG, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol* 2003;120:672-5.
59. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865-70.
60. Caudie C, Garel F, Bancel J, et al. Diagnosis and

- biological monitoring of 6 neurosyphilis cases: value of cerebrospinal fluid analysis. *Ann Biol Clin* 2003;61:563-9.
61. Sakuta R, Hiyoshi K, Yanagida K, et al. Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in children with CNS infectious diseases. *No To Hattatsu* 1990;22:160-5.
  62. Delalande S, De Seze J, Fauchais AL, et al. Neurologic manifestations in primary Sjogren syndrome: a study of 82 patients. *Medicine* 2004;83:280-91.
  63. Psimaras D, Carpentier AF, Rossi C. Cerebrospinal fluid study in paraneoplastic syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:42-5.
  64. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
  65. Ciusani E, Lazzaroni M, Gilardoni F, et al. L'evoluzione dei criteri diagnostici per la sclerosi multipla non ha modificato la quota di pazienti con bande oligoclonali nel liquor. *Biochim Clin* 2014;38:213-7.
  66. Lechner-Scott J, Spencer B, De Malmarche T, et al. The frequency of CSF oligoclonal banding in multiple sclerosis increases with latitude. *Mult Scler* 2012;18:974-82.
  67. Zeman AZ, Kidd D, Mclean BN, et al. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:27-30.
  68. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, et al. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology* 2006;67:1062-4.
  69. Koch M, Heersema D, Mostert J, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007;14:797-800.
  70. Davies G, Keir G, Thompson EJ, et al. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2003;60:1163-6.
  71. Confavreux C, Chapuis-Cellier C, Arnaud P, et al. Oligoclonal "fingerprint" of CSF IgG in multiple sclerosis patients is not modified following intrathecal administration of natural beta-interferon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49:1308-12.
  72. Yu X, Burgoon M, Green M, et al. Intrathecally synthesized IgG in multiple sclerosis cerebrospinal fluid recognizes identical epitopes over time. *J Neuroimmunol* 2011;240-241:129-36.
  73. Harrer A, Tumani H, Niendorf S, et al. Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler* 2013;19:1209-12.
  74. Shah KH, Edlow JA. Distinguishing traumatic lumbar puncture from true subarachnoid hemorrhage. *J Emerg Med* 2002;23:67-74.
  75. Linn FH, Voorbij HA, Rinkel GJ, et al. Visual inspection versus spectrophotometry in detecting bilirubin in cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1452-4.
  76. Beetham R. CSF spectrophotometry for bilirubin--why and how? *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:1-7.
  77. Perry JJ, Sivilotti ML, Stiell IG, et al. Should spectrophotometry be used to identify xanthochromia in the cerebrospinal fluid of alert patients suspected of having subarachnoid hemorrhage? *Stroke* 2006;37:2467-72.
  78. Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage (SAH). UK NEQAS Specialist Advisory Group for External Quality Assurance of CSF Proteins and Biochemistry. *Ann Clin Biochem* 2008;45:238-44.
  79. Ahmed DS, Larsson A, Hillered L, et al. Quantitative determination of cerebrospinal fluid bilirubin on a high throughput chemistry analyzer. *Clin Lab* 2009;55:283-8.
  80. Giavarina D. L'esame liquorale nella diagnosi di emorragia subaracnoidea. *Biochim Clin* 2014;38:191-7.
  81. Steedman DJ, Gordon M. CSF rhinorrhoeae: significance of the glucose oxidase strip test. *Injury* 1987;18:327-8.
  82. Stibler H, Allgulander C, Borg S, et al. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978;204:49-56.
  83. Bradbury MW. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem* 1997;69:443-54.
  84. 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;366:382-6.
  85. Arrer E, Gibitz HJ. Detection of beta 2-transferrin with agarose gel electrophoresis, immunofixation and silver staining in cerebrospinal fluid, secretions and other body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:113-6.
  86. Lescuyer P, Auer L, Converset V, et al. Comparison of gel-based methods for the detection of cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Clin Chim Acta* 2012;413:1145-50.
  87. Schnabel C, Di Martino E, Gilsbach JM, et al. Comparison of beta2-transferrin and beta-trace protein for detection of cerebrospinal fluid in nasal and ear fluids. *Clin Chem* 2004;50:661-3.
  88. Arrer E, Meco C, Oberascher G, et al. Beta-trace protein as a marker for cerebrospinal fluid rhinorrhea. *Clin Chem* 2002;48:939-41.
  89. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;310:173-86.
  90. Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 1991;37:1153-60.
  91. Franciotta D, Zardini E, Bono G, et al. Antigen-specific oligoclonal IgG in AIDS-related cytomegalovirus and toxoplasma encephalitis. *Acta Neurol Scand* 1996;94:215-8.
  92. Sindic CJ, Monteyne P, Laterre EC. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1994;54:75-80.
  93. Cinque P, Cleator GM, Weber T, et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:339-45.
  94. Calvario A, Scarasciulli M. Epidemiologia delle infezioni virali del sistema nervoso centrale nella regione Puglia. *Biochim Clin* 2014;38:203-7.
  95. Jarius S, Eichhorn P, Jacobi C, et al. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? *J Neurol Sci* 2009;280:98-100.
  96. Ferracci F, Moretto G, Candeago RM, et al. Antithyroid antibodies in the CSF: their role in the pathogenesis of Hashimoto's encephalopathy. *Neurology* 2003;60:712-4.
  97. Mijajlovic M, Mirkovic M, Dackovic J, et al. Clinical manifestations, diagnostic criteria and therapy of Hashimoto's encephalopathy: report of two cases. *J Neurol Sci* 2010;288:194-6.
  98. Farinazzo A, Gini B, Moretto G, et al. Un approccio proteomico per l'identificazione di autoantigeni nell'encefalopatia di Hashimoto. *Biochim Clin* 2014;38:222-6.

99. Felgenhauer K. Differentiation of the humoral immune response in inflammatory diseases of the central nervous system. *J Neurol* 1982;228:223-37.
100. Felgenhauer K, Schädlich HJ. The compartmental IgM and IgA response within the central nervous system. *J Neurol Sci* 1987;77:125-35.
101. Henningsson AJ, Christiansson M, Tjernberg I, et al. Laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis: a comparison of three CSF anti-Borrelia antibody assays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; Epub DOI 10.1007/s10096-013-2014-6.
102. Tardei G, Ruta S, Chitu V, et al. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:2232-9.
103. Bigner S, Johnston W. *Cytopathology of the central nervous system*. Chicago: American Society of Clinical Pathologist, 1994.
104. Chamberlain MC. Leptomeningeal metastasis. *Semin Neurol* 2010;30:236-44.
105. Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, et al. Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment. *Semin Oncol* 2009;36:S35-45.
106. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, et al. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer* 1998;82:733-9.
107. Grossman SA, Krabak MJ. Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treat Rev* 1999;25:103-19.
108. Nakagawa H, Kubo S, Murasawa A, et al. Measurements of CSF biochemical tumor markers in patients with meningeal carcinomatosis and brain tumors. *J Neurooncol* 1992;12:111-20.
109. Thomas JE, Falls E, Velasco ME, et al. Diagnostic value of immunocytochemistry in leptomeningeal tumor dissemination. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:759-61.
110. Van Oostenbrugge RJ, Twijnstra A. Presenting features and value of diagnostic procedures in leptomeningeal metastases. *Neurology* 1999;53:382-5.
111. Glass JP, Melamed, M, Chernik NL, et al. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979;29:1369-75.
112. Straathof CS, De Bruin HG, Dippel DW, et al. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid cytology in leptomeningeal metastasis. *J Neurol* 1999;246:810-4.
113. Bocking A, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D. Towards a single cell cancer diagnosis. Multimodal and monocellular measurements of markers and morphology (5M). *Cell Oncol* 2004;26:73-9.
114. Dux R, Kindler-Rohrborn A, Annas M, et al. A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1994;121:74-8.
115. Demopoulos A. Leptomeningeal metastases. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2004;4:196-204.
116. Gleissner B, Chamberlain MC. Neoplastic meningitis. *Lancet Neurol* 2006;5:443-52.
117. Hegde U, Filie A, Little RF, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005;105:496-502.
118. Roma AA, Garcia A, Avagnina A, et al. Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 2002;27:271-5.
119. Van Zanten AP, Twijnstra A, Hart AA, et al. Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase activities in patients with central nervous system metastases. *Clin Chim Acta* 1986;161:259-68.
120. Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB. Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer* 1982;49:759-72.
121. Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Carcinomatous meningitis: leptomeningeal metastases in solid tumors. *Surg Neurol Int* 2013;4:S265-88.
122. Groves MD, Hess KR, Puduvalli VK, et al. Biomarkers of disease: cerebrospinal fluid vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell derived factor (SDF)-1 levels in patients with neoplastic meningitis (NM) due to breast cancer, lung cancer and melanoma. *J Neurooncol* 2009;94:229-34.
123. Van De Langerijt B, Gijtenbeek JM, De Reus HP, et al. CSF levels of growth factors and plasminogen activators in leptomeningeal metastases. *Neurology* 2006;67:114-9.
124. Corsini E, Bernardi G, Gaviani P, et al. Intrathecal synthesis of tumor markers is a highly sensitive test in the diagnosis of leptomeningeal metastasis from solid cancers. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:874-9.
125. Kang SJ, Kim KS, Ha YS, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid level of carcinoembryonic antigen in patients with leptomeningeal carcinomatous metastasis. *J Clin Neurol* 2010;6:33-7.
126. Shi Q, Pu CQ, Huang XS, et al. Optimal cut-off values for tumor markers in cerebrospinal fluid with ROC curve analysis. *Front Biosci* 2011;3:1259-64.
127. Qaddoumi I, Sane M, Li S, et al. Diagnostic utility and correlation of tumor markers in the serum and cerebrospinal fluid of children with intracranial germ cell tumors. *Childs Nerv Syst* 2012;28:1017-24.
128. Sghirlanzoni A, Boiardi A, eds. *La terapia dei tumori cerebrali maligni dell'adulto e del bambino*. Milano: Springer-Verlag Italia, 2002.
129. Fujimaki T. Central nervous system germ cell tumors: classification, clinical features, and treatment with a historical overview. *J Child Neurol* 2009;24:1439-45.
130. Allen J, Chacko J, Donahue B, et al. Diagnostic sensitivity of serum and lumbar CSF  $\beta$ HCG in newly diagnosed CNS germinoma. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:1180-2.
131. Keene D, Johnston D, Strother D, et al. Epidemiological survey of central nervous system germ cell tumors in Canadian children. *J Neurooncol* 2007;82:289-95.
132. Rogers PB, Sims EC, Plowman N. Blood to cerebrospinal fluid human chorionic gonadotropin-beta ratios in intracranial germ cell tumors. *Neurosurg Focus* 1998;5:e4.
133. Blennow K, De Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006;368:387-403.
134. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007;3:186-91.
135. Mariani E, Monastero R, Mecocci P. Mild cognitive impairment: a systematic review. *J Alzheimers Dis* 2007;12:23-35.
136. Mitchell AJ, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia--meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatr Scand* 2009;119:252-65.
137. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 2010;9:1118-27.
138. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007;6:734-46.
139. Mckhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical

- diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
140. Kang JH, Korecka M, Toledo JB, et al. Utilità clinica e problematiche analitiche nelle misure di amiloide- $\beta_{1-42}$  e proteine tau nel liquido cefalorachidiano come marcatori della malattia di Alzheimer. *Biochim Clin* 2014;58:255-67.
  141. Perret-Liaudet A, Pelpel M, Tholance Y, et al. Cerebrospinal fluid collection tubes: a critical issue for Alzheimer disease diagnosis. *Clin Chem* 2012;58:787-9.
  142. Sancesario GM, Esposito Z, Nuccetelli M, et al. Abeta1-42 detection in CSF of Alzheimer's disease is influenced by temperature: indication of reversible Abeta1-42 aggregation? *Exp Neurol* 2010;223:371-6.
  143. Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* 2012;8:65-73.
  144. Mattsson N, Zetterberg H, Blennow K. Lessons from multicenter studies on CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010 Jul 8;2010. pii: 610613. doi: 10.4061/2010/610613.
  145. Olsson A, Vanderstichele H, Andreasen N, et al. Simultaneous measurement of beta-amyloid(1-42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem* 2005;51:336-45.
  146. Reijn TS, Rikkert MO, Van Geel WJ, et al. Diagnostic accuracy of ELISA and xMAP technology for analysis of amyloid beta(42) and tau proteins. *Clin Chem* 2007;53:859-65.
  147. Mattsson N, Andreasson U, Persson S, et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement* 2013;9:251-61.
  148. Teunissen CE, Verwey NA, Kester MI, et al. Standardization of assay procedures for analysis of the CSF biomarkers amyloid beta (1-42), tau, and phosphorylated tau in Alzheimer's disease: Report of an International Workshop. *Int J Alzheimers Dis* 2010 Sep 27;2010. pii: 635053. doi: 10.4061/2010/635053.
  149. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009;302:385-93.
  150. Riemenschneider M, Klopp N, Xiang W, et al. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2004;63:364-6.
  151. Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2002;59:1729-34.
  152. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004;1:213-25.
  153. Shoji M. Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front Biosci* 2002;7:d997-1006.
  154. Mckhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:263-9.
  155. Brown W, Keeney M, Chin-Yee I, et al. Validation of body fluid analysis on the Coulter LH 750. *Lab Hematol* 2003;9:155-9.
  156. Paris A, Nhan T, Cornet E, et al. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2010;32:539-47.
  157. Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, et al. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1791-8.
  158. De Smet D, Van Moer G, Martens GA, et al. Use of the Cell-Dyn Sapphire hematology analyzer for automated counting of blood cells in body fluids. *Am J Clin Pathol* 2010;133:291-9.
  159. Keuren JF, Hoffmann JJ, Leers MP. Analysis of serous body fluids using the CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1285-90.
  160. Danise P, Maconi M, Rovetti A, et al. Cell counting of body fluids: comparison between three automated haematology analysers and the manual microscope method. *Int J Lab Hematol* 2013;35:608-13.
  161. Lippi G, Cattabiani C, Benegiamo A, et al. Evaluation of white blood cell count in peritoneal fluid with five different hemocytometers. *Clin Biochem* 2013;46:173-6.
  162. Nanos NE, Delanghe JR. Evaluation of Sysmex UF-1000i for use in cerebrospinal fluid analysis. *Clin Chim Acta* 2008;392:30-3.
  163. Blennow K, Zetterberg H. The application of cerebrospinal fluid biomarkers in early diagnosis of Alzheimer disease. *Med Clin North Am* 2013;97:369-76.
  164. Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM. Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006221.
  165. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, et al. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:16-42.
  166. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
  167. Wullschlegel A, Kapina V, Molnarfi N, et al. Cerebrospinal fluid interleukin-6 in central nervous system inflammatory diseases. *PLoS One* 2013;8:e72399.
  168. Mcgeer PL, Mcgeer EG. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002;26:459-70.