

## L'evoluzione dei criteri diagnostici per la sclerosi multipla non ha modificato la quota di pazienti con bande oligoclonali nel liquor

Emilio Ciusani<sup>1</sup>, Monica Lazzaroni<sup>1</sup>, Francesca Gilardoni<sup>1</sup>, Fulvio Baggi<sup>2</sup>, Paolo Confalonieri<sup>2</sup>, Rita Frangiamore<sup>2</sup>, Renato Mantegazza<sup>2</sup>, Andrea Salmaggi<sup>3</sup>, Gaetano Bernardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica e <sup>2</sup>UO Neurologia IV, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Milano

<sup>3</sup>Dipartimento di Neurologia, Ospedale Alessandro Manzoni, Lecco

### ABSTRACT

**The evolution of diagnostic criteria for multiple sclerosis (MS) did not change the rate of patients displaying oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid (CSF).** The early diagnosis of MS, an inflammatory disease of the central nervous system, can be difficult. Although a specific laboratory test is lacking, the presence of CSF-restricted oligoclonal bands has been reported in the majority of patients (80-95%); as a consequence, this test has been included in the diagnostic criteria for many years. However, after each revision of the diagnostic criteria, the relevance of this test has progressively lost in importance, while magnetic resonance imaging has gained a central role. In the present study, two groups of MS patients diagnosed with McDonald (2001 and subsequent revisions) or with Poser (1983) criteria (176 and 82, respectively) were compared with regard to the frequency of the presence of oligoclonal bands in CSF. The same method for the oligoclonal pattern detection, based on isoelectric focusing followed by blotting and immunodetection of IgG, was used on both groups. Results showed that the rate of patients displaying CSF-restricted oligoclonal bands was 89.0% and 89.8% in the two groups, respectively ( $P=0.57$ ). Our data suggest that the percentage of MS patients with CSF-restricted oligoclonal bands was unchanged and independent of the diagnostic criteria. Furthermore, the results suggest that the different MS diagnostic criteria considered (Poser vs. McDonald) identify patients with a similar immunological background.

### INTRODUZIONE

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria del sistema nervoso centrale (SNC) non sempre di rapida identificazione, la cui diagnosi deve integrare aspetti clinici e strumentali. Vista la mancanza di un esame diagnostico specifico, la comunità scientifica ha adottato dei criteri diagnostici multiparametrici che, nel corso del tempo, sono stati modificati e aggiornati. Infatti, ai criteri di Schumacher del 1965 (1) sono seguiti quelli proposti da Poser nel 1983 (2), che nel 2001 sono stati sostituiti da quelli che sono divenuti noti come i "criteri di McDonald", ai quali peraltro sono seguite varie revisioni (3-5).

Sostanzialmente, gli attuali criteri riaffermano la necessità di mostrare la presenza di disturbi neurologici e lesioni infiammatorie del SNC, con una disseminazione nel tempo e nello spazio e, contemporaneamente, di escludere altre possibili cause, che possano altrimenti spiegare i deficit neurologici e i sintomi riscontrati. La

diagnosi di SM richiede pertanto la prova di lesioni multiple della sostanza bianca, evidenziabili mediante risonanza magnetica (RM). Si consideri, tuttavia, che, rispetto a 10 anni fa, le tecniche di RM sono significativamente migliorate sia in termini di qualità delle immagini che in diffusione e disponibilità presso le strutture sanitarie e ciò ha in parte contribuito alla crescita della sua rilevanza diagnostica (5).

Per quanto riguarda l'utilizzo diagnostico del liquido cefalorachidiano (LCR) in questa malattia, Kabat et al. (6) dimostrarono per primi nel 1942 che nel LCR dei pazienti con SM le "gammaglobuline" erano significativamente aumentate e, con tecniche elettroforetiche, ne dimostrò la "limitata eterogeneità" ovvero la presenza di bande oligoclonali (BO) nel LCR, ma non nel siero dei pazienti (6). Da allora moltissime pubblicazioni hanno dimostrato il valore diagnostico dell'analisi del LCR che in certe situazioni cliniche può anche avere valore predittivo (7, 8).

Corrispondenza a: Emilio Ciusani, Laboratorio di Patologia Clinica e Genetica Medica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta, Via Celoria 11, 20133 Milano. Tel. 0223943026, Fax 0223942535, E-mail [eciusani@istituto-besta.it](mailto:eciusani@istituto-besta.it)

Ricevuto: 28.11.2013

Revisionato: 07.01.2014

Accettato: 24.01.2014

**Tabella 1**

Caratteristiche dei pazienti con sclerosi multipla (SM) dei due gruppi studiati. Tutti i pazienti del gruppo I erano affetti da SM nella forma clinica "relapsing-remitting" (SM-RR) e nessuno aveva la forma di SM primariamente progressiva. I pazienti del gruppo II erano tutti classificabili come affetti da SM definita: la suddivisione dei pazienti in base alla forma clinica della malattia non era in uso al tempo del reclutamento di questi pazienti

Forma clinica	No.	Età (anni)	Genere	Età all'esordio (anni)	Durata di malattia (anni)
Gruppo I SM-RR	176	33,5±10	115F/61M	30,7±9,9	2,7±4,9
Gruppo II SM definita	82	34,6±11,6	47F/35M	24,7±5,8	10,7±5,8

F, femmine; M, maschi.

A 70 anni di distanza dall'originale scoperta, è oggi noto che il 70-80% dei pazienti con SM clinicamente definita (SMCD) ha un "IgG-index" aumentato, cioè è aumentato il rapporto tra le IgG del LCR e quelle del siero, quando corretto per l'analogo rapporto dell'albumina; questo dato è già di per sé un indicatore di sintesi anticorpale all'interno del SNC. Nella grande maggioranza dei pazienti con SM (85-95%) è dimostrabile inoltre la presenza di BO nel LCR, a patto che l'analisi sia condotta con il metodo internazionalmente riconosciuto come il più sensibile [isoelettrofocalizzazione (IEF) e immunorivelazione delle IgG] (9). L'elevata frequenza di BO portò all'introduzione di questo esame nei criteri diagnostici di Poser (2), secondo i quali la sola copresenza di due attacchi clinici e delle BO era considerata criterio sufficiente per la diagnosi di probabile SM; se a queste condizioni era possibile associare altre evidenze cliniche o paracliniche poteva essere fatta la diagnosi di SM clinicamente definita, supportata da evidenze di laboratorio (2).

Nel corso degli anni, altri biomarcatori ematici e liquorali sono stati proposti con l'obiettivo di ottenerne una risposta più specifica delle BO per la diagnosi di SM: per una recente revisione sull'argomento si veda Awad et al. (10). Tuttavia, nelle elaborazioni che si sono susseguite, nessuno di essi è stato ritenuto sufficientemente valido da poter essere incluso nei criteri diagnostici. D'altra parte, anche la ricerca delle BO ha perso molta della sua rilevanza, sebbene esperti internazionali si siano recentemente interrogati sull'opportunità di ripristinarne il valore diagnostico (11-13).

Vista la diversa rilevanza che la ricerca delle BO ha assunto nei vari criteri applicati negli ultimi 25 anni, lo scopo del presente lavoro è stato di verificare che la percentuale di pazienti con SM positivi alle BO fosse costante nel tempo indipendentemente dal cambiamento dei criteri diagnostici della malattia. Abbiamo pertanto confrontato la frequenza del reperto di positività alle BO liquorali in due gruppi di pazienti con SM, la cui diagnosi era stata fatta con un intervallo temporale di ~20 anni, utilizzando i criteri diagnostici in uso nel periodo considerato. Seppure in tempi diversi, la ricerca delle BO è stata condotta utilizzando la medesima metodica per entrambi i gruppi.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti

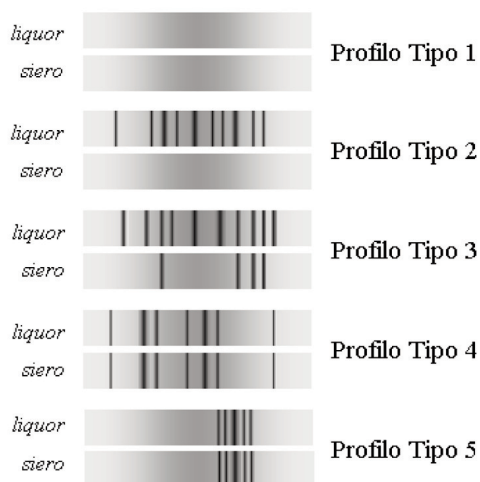
Nello studio sono stati inclusi due gruppi di pazienti (Tabella 1). Il primo era composto di 176 pazienti con SM "relapsing-remitting" (RR). Tutti i pazienti erano reclutati presso la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C. Besta di Milano tra il 2004 e il 2012 e la diagnosi era ottenuta secondo i criteri di McDonald e successive revisioni (3-5). Le analisi erano eseguite dopo il rilascio del consenso informato scritto da parte di ciascun paziente. Il secondo gruppo era composto di 82 pazienti con SM definita secondo i criteri di Poser (2), reclutato presso la medesima Fondazione tra il 1983 e il 1988. Per questo gruppo di pazienti, i risultati riportati in questo studio si riferiscono ad analisi eseguite al tempo della diagnosi, quando il rilascio di consenso informato scritto non era richiesto.

Tutti i pazienti inclusi nello studio erano sottoposti a un prelievo di sangue e a rachicentesi per la raccolta del LCR secondo procedure standard; LCR e siero erano analizzati in giornata o conservati a -20 °C fino all'analisi.

### Isoelettrofocalizzazione

In entrambi i gruppi di pazienti, la ricerca delle BO è stata effettuata mediante IEF in gel di agarosio seguita da "blotting" e identificazione delle IgG (14). Tale metodica è stata sviluppata presso il laboratorio analisi della Fondazione Besta alla fine degli anni '80 ed è rimasta sostanzialmente invariata negli anni, tranne che per il sistema di rivelazione ("silver staining" all'inizio e chemiluminescenza in seguito). Brevemente, i campioni di LCR (senza preventiva concentrazione) e di siero di ciascun paziente sono portati alla medesima concentrazione di IgG (concentrazione ottimale, 20 mg/L in soluzione salina) e analizzati nella stessa seduta analitica in corse elettroforetiche adiacenti. I campioni sono sottoposti a frazionamento elettroforetico a temperatura controllata (10 °C) mediante IEF in gel di agarosio 1,3% addizionato di opportuna miscela di anfiliti, necessaria per generare un gradiente di pH compreso tra 3 e 10,5 (Pharmalite). Dopo IEF, le proteine vengono trasferite dal gel di agarosio su una membrana di polivinildifluoruro (PVDF) (Immobilon P) mediante "blotting" capillare per 30 min a temperatura ambiente. Le IgG sono in seguito evidenziate mediante una reazione antigene/anticorpo utilizzando due metodi

leggermente diversi che tuttavia garantiscono la massima sensibilità analitica. Nel caso dei pazienti del gruppo I la membrana di PVDF era immersa in una soluzione di anticorpo anti-IgG umane direttamente coniugato a perossidasi (Dako) a una concentrazione di 0,1 mg/L in soluzione salina per 30 min a temperatura ambiente. La membrana era in seguito lavata 4 volte per immersione in soluzione salina contenente Tween 20 0,1% per 10 min a temperatura ambiente. L'attività perossidasi era rivelata mediante chemiluminescenza (Immobilon Western, Millipore) e immagini di varia intensità erano ottenute utilizzando un acquisitore d'immagini (Syngene). Nel caso dei pazienti del gruppo II, la cui analisi era eseguita negli anni '80, la membrana di PVDF veniva immersa in una soluzione di anticorpo anti-IgG umane biotinilato (Dako) per 30 min a temperatura ambiente, seguita da streptavidina coniugata a oro colloidale (BioRad) e successiva intensificazione argentea. Le immagini ottenute venivano ispezionate visivamente da due operatori indipendenti. I pazienti del gruppo I sono stati classificati in uno dei 5 profili previsti secondo quanto indicato dalle recenti raccomandazioni (Figura 1) (7, 9). I campioni di LCR nei quali è stata riscontrata presenza di una singola banda liquorale non presente nel siero sono stati considerati "negativi per reazione oligoclonale", ma sono stati analizzati come gruppo indipendente. I pazienti del gruppo II, invece, erano semplicemente classificati in due categorie (positivo o negativo per sintesi intratecale),



**Figura 1**

La ricerca delle bande oligoclonali mediante isoelettrofocalizzazione e "immunoblotting" delle IgG può dare origine a 5 profili. Tipo 1: assenza di bande nel liquor e nel siero; Tipo 2: presenza di bande oligoclonali nel liquor e non nel siero, indicative di sintesi intratecale; Tipo 3: presenza di bande oligoclonali identiche nel liquor e nel siero con bande addizionali nel liquor non visibili nel siero e indicative di sintesi intratecale; Tipo 4: presenza di bande oligoclonali identiche nel liquor e nel siero; Tipo 5: presenza di componente monoclonale visibile sia nel siero sia nel liquor per semplice diffusione della stessa attraverso la barriera ematoliquorale.

secondo quanto suggerito in quegli anni dagli esperti internazionali (15). Nei pazienti in esame non sono stati identificati soggetti con profilo riconducibile al tipo 5 (presenza di componente monoclonale) (9).

### Analisi statistica

Per l'analisi statistica di comparazione dei due gruppi di pazienti è stato utilizzato il test chi quadrato.

### RISULTATI

In prima analisi abbiamo confrontato le frequenze di pazienti positivi per reazione oligoclonale nei due gruppi e non abbiamo riscontrato differenze significative. Infatti, la percentuale di pazienti positivi era 89,8% nel gruppo I e 89,0% nel gruppo II (chi quadrato=0,31; P=0,57). L'analisi è stata condotta considerando negativi per reazione oligoclonale anche i soggetti con presenza di singola banda liquorale, poiché questo dato era disponibile solo per i pazienti del gruppo I (2,3%); non è stato infatti possibile, a posteriori, verificare la frequenza di questa eventualità nel gruppo II di pazienti.

Dall'analisi dettagliata del gruppo I abbiamo osservato che il profilo riscontrato più frequentemente nei pazienti con SM era il tipo 2 (59,7%), seguito dal tipo 3 (30,1%). I pazienti negativi per reazione oligoclonale risultavano quasi ugualmente suddivisi tra il profilo 1 e il profilo 4 (4,6% e 3,4%, rispettivamente).

Considerando i due gruppi complessivamente, le BO erano presenti nel 89,5% dei pazienti.

### DISCUSSIONE

Sebbene la presenza di BO nel LCR non sia un esame specifico per la SM, il suo significato diagnostico in ambito clinico è riconosciuto in tutto il mondo (16). Recenti stime nei Paesi nordici suggeriscono che ~90-95% dei pazienti con SM clinicamente definita presentano BO aggiuntive nel LCR rispetto al siero (17, 18), anche se una certa variabilità nella frequenza delle BO è stata riportata tra Paesi e varie popolazioni, con una media globale di positività di ~80% (19). È probabile che tali differenze possano essere almeno in parte giustificate dalla variabilità genetica tra le popolazioni: è stato dimostrato che i pazienti con il genotipo HLA di classe II DRB1\*1501 hanno una frequenza maggiore di BO rispetto a pazienti con il genotipo DRB1\*04. Poiché la frequenza di questi alleli varia tra le popolazioni, è ragionevole che vari anche la percentuale di pazienti con SM con BO nel LCR (17, 18). Un recente lavoro multicentrico su 13.000 pazienti con SM provenienti da 37 centri di 19 Paesi, tutti analizzati mediante IEF, suggerisce un incremento della positività alle BO con l'aumentare della latitudine (19). Tuttavia, tra le cause di variabilità è doveroso annoverare anche le differenze nel metodo con il quale si identificano le BO e l'esperienza del laboratorio che esegue l'analisi. Numerose pubblicazioni e raccomandazioni di colleghi di esperti internazionali sottolineano, infatti, che la massima

sensibilità nella ricerca delle BO si ottiene frazionando le immunoglobuline del LCR (senza preventiva concentrazione) e del siero (diluito alla medesima concentrazione di immunoglobuline del LCR) mediante IEF in gel di agarosio seguita da "immunoblotting" delle IgG con anticorpo specifico (7, 9). Approcci metodologici alternativi hanno mostrato una sensibilità significativamente minore (20) e hanno contribuito all'aumento della variabilità riportato dalla letteratura scientifica nella frequenza di BO in coorti di pazienti con SM (21). E' possibile che questa alta variabilità sia da annoverare tra le cause della progressiva diminuzione della rilevanza dell'analisi liquorale nei criteri diagnostici della SM. Infatti, sebbene l'analisi del LCR sia ancora parte degli attuali criteri di McDonald per la diagnosi di SM, la sua rilevanza è stata ridotta solo a casi particolari (SM primariamente progressiva) (5).

La frequenza di BO che abbiamo riscontrato in questo studio è sostanzialmente in linea con quanto riportato precedentemente in letteratura. Per quanto ottenuti su un campione ridotto, i nostri dati mostrano inoltre che se non variano significativamente le caratteristiche dei pazienti con SM (età all'esordio, durata di malattia, "background" genetico) e non vi sono cambiamenti metodologici significativi, la frequenza di pazienti con BO è costante nel tempo. Con il presente studio abbiamo voluto verificare che la significativa differenza nei criteri diagnostici adottati nel tempo non avesse introdotto una differenza nella percentuale di pazienti con BO. Tale evenienza avrebbe suggerito una modifica della popolazione a cui è diagnosticata la SM, in conseguenza del minore utilizzo delle rachicentesi. Invece, i nostri dati indicano che, per quanto riguarda la frequenza di BO, la popolazione di pazienti selezionata con gli attuali criteri diagnostici non è diversa dalla popolazione selezionata con i criteri del 1983 (nei quali la reazione oligoclonale aveva un valore diagnostico superiore), suggerendo, seppure indirettamente, l'equivalenza dei due criteri diagnostici.

In aggiunta alla ricerca delle reazioni oligoclonali, un ulteriore promettente biomarcatore è rappresentato dalla determinazione della sintesi intratecale delle catene leggere libere ("κ/λ-free index"). I dati di letteratura disponibili, pur non esaustivi, concordano sull'elevata sensibilità di questo indice, che sarebbe simile a quella della ricerca delle BO (22, 23). I dati combinati recentemente ottenuti in modo indipendente in due laboratori confermano che l'uso dell'indice κ/λ può aumentare la sensibilità diagnostica (24).

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Angelo Nespolo per il fondamentale contributo che ha saputo dare allo sviluppo dell'analisi del LCR all'Istituto Neurologico C. Besta e per aver reso possibile questo e molti altri studi.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

- Schumacher FA, Beeve GW, Kibler RF, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965;122:552-68.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg LC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-31.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann Neurol* 2005;58:840-6.
- 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.
- Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 1942;21:571-7.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
- Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:909-14.
- 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.
- Awad A, Hemmer B, Hartung HP, et al. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;219:1-7.
- Sandberg-Wollheim M, Olsson T. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes. *Mult Scler* 2013;19:714-6.
- Tur C, Montalban X. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: No. *Mult Scler* 2013;19:717-8.
- Hutchinson M. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Commentary. *Mult Scler* 2013;19:719-20.
- Nespolo A, Bianchi G, Salmaggi A, et al. Immunoblotting techniques with picogram sensitivity in cerebrospinal fluid protein detection. *Electrophoresis* 1989;10:34-40.
- Thompson EJ, Keir G. Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. *Ann Clin Biochem* 1990;27:425-35.
- Bourahoui A, De Seze J, Gutierrez R, et al. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 2004;11:525-9.
- 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.
- Mero IL, Gustavsen MW, Sæther HS, et al. Oligoclonal band status in Scandinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PLoS ONE* 2013;8:e58352.
- 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.
20. Verbeek MM, de Reus HP, Weykamp CW. Comparison of methods for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: results of the Dutch Quality Control survey. *Clin Chem* 2002;48:1578-80.
  21. Keren DF. Optimizing detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by use of isoelectric focusing with IgG immunoblotting. *Am J Clin Pathol* 2003;120:649-51.
  22. Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, et al. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:1508-14.
  23. 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.
  24. 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.