

# **Il ruolo del laboratorio nella diagnosi della Sclerosi Multipla**

Federica Fraenza, PhD Erika Di Zazzo, PhD





# Indice

- 1) **Sclerosi Multipla (SM): patogenesi e diagnosi**
- 2) **Rilevanza clinica delle bande oligoclonali (OCB)**
- 3) **Biomarcatori emergenti: K-index e altri**
- 4) **Conclusioni**

# Sclerosi Multipla (SM)

*Patogenesi e  
diagnosi*



SCLEROSI MULTIPLA:

# Sclerosi Multipla

- La sclerosi multipla (SM) è un disturbo cronico immuno-mediato del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzato da **demielinizzazione, perdita assonale e neuroinfiammazione**, responsabile di disabilità fisiche e cognitive progressive.
- È la **condizione neurologica più comune nei giovani adulti** (viene comunemente diagnosticata tra i 20 e i 40 anni di età).
- La maggior parte delle terapie mira a ridurre l'infiammazione in modo aspecifico nelle prime fasi della malattia, senza tuttavia arrestare la progressione della stessa. Inoltre, se somministrate a lungo termine, tali terapie sono spesso associate a reazioni avverse anche gravi.

# Epidemiologia (I)

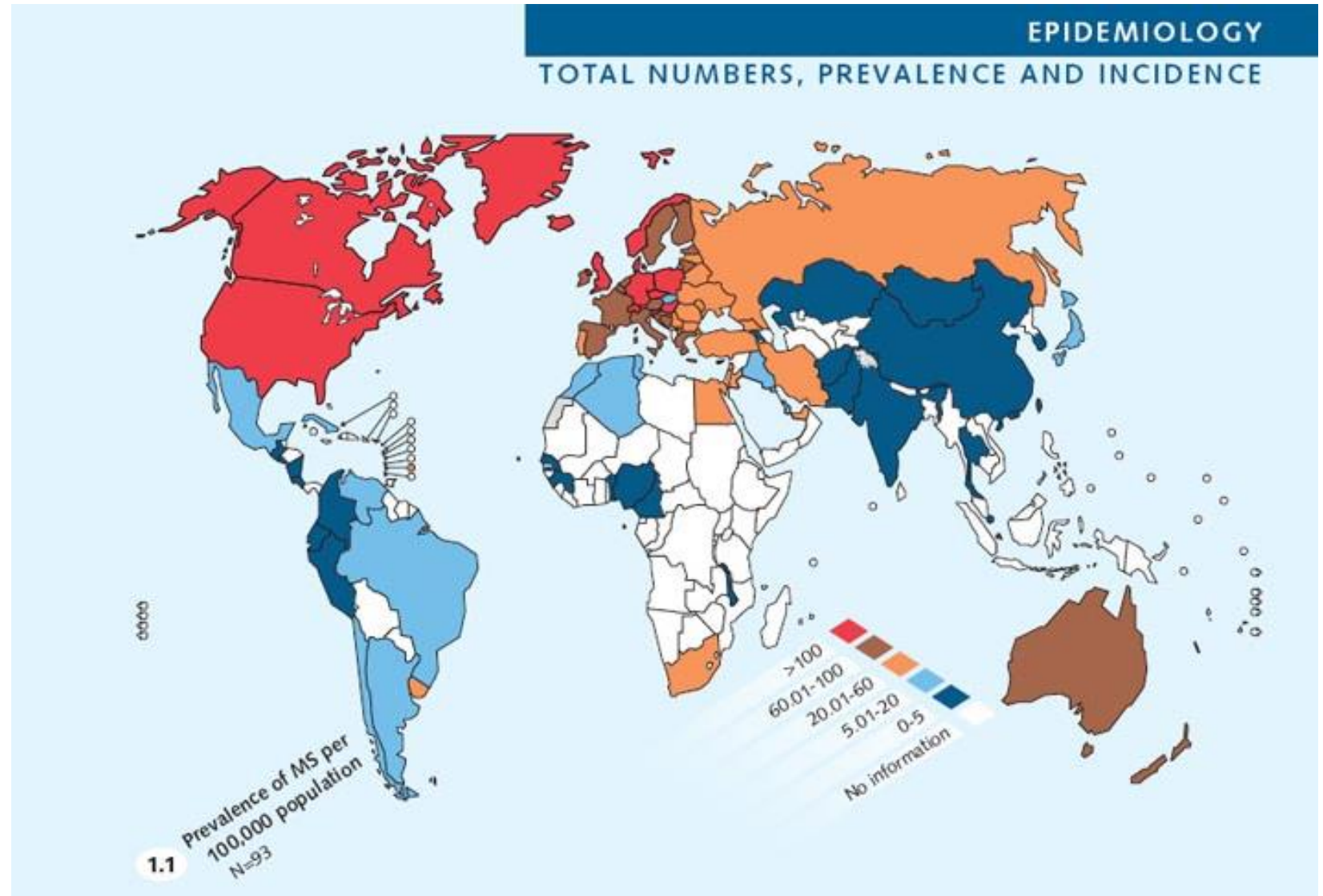
- Secondo l'ultimo progetto congiunto *Multiple Sclerosis Atlas*, **2,8 milioni di persone soffrono di SM in tutto il mondo** e in Italia il numero oscilla tra 68.000 e 75.000.
- Nell'ultimo decennio si è osservato un **aumento globale dell'incidenza**, attribuito a fattori come l'aumento dell'aspettativa di vita, la crescita della popolazione globale, la migliore raccolta di dati e il miglioramento della diagnosi.
- Età: 20-40 anni, ma anche nei bambini (3-10%) e con esordio tardivo oltre i 50 anni.
- Sesso: donne:uomini → 3:1

# Epidemiologia (II)

È stata osservata una *distribuzione geografica disomogenea* in base alla quale le diverse aree sono classificate come a “basso, medio e alto” rischio di malattia.

Vi è una *correlazione positiva tra la frequenza della malattia e l'aumento della latitudine geografica*: la SM mostra una progressiva riduzione della frequenza con l'avvicinarsi all'equatore.

La SM è prevalente tra le *popolazioni caucasiche*, in particolare nel Nord-Ovest europeo, in Nord America, in Nuova Zelanda e Sud-Est dell'Australia, in Sud Africa e in America Meridionale.



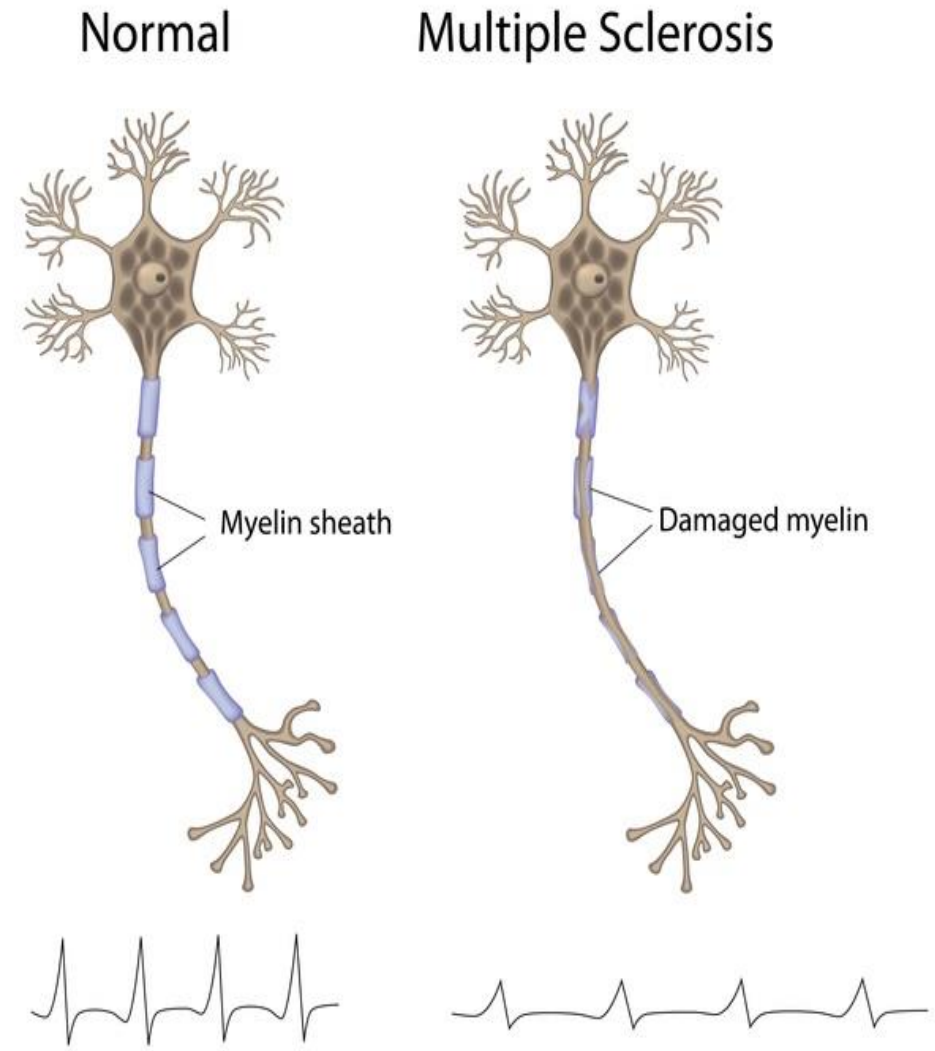
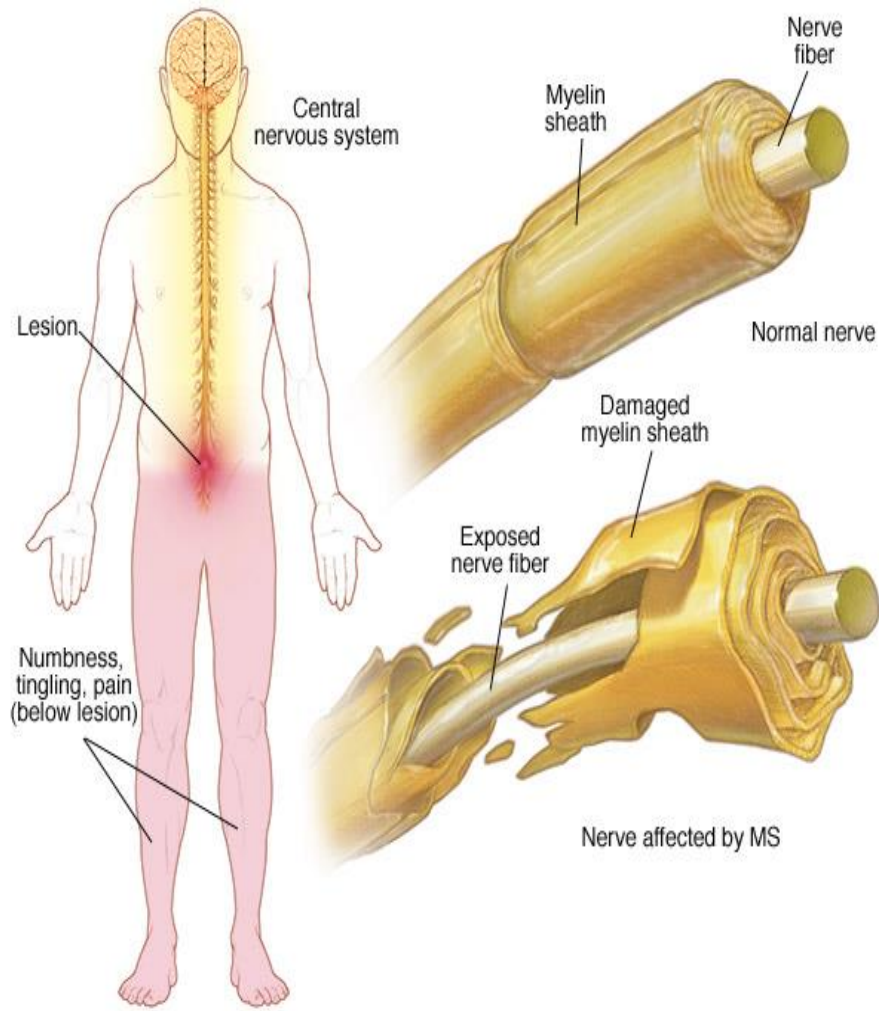
# Eziopatogenesi della SM

La SM è caratterizzata da aree multifocali di infiammazione, demielinizzazione e gliosi all'interno della materia bianca e grigia del cervello e del midollo spinale, note come **placche** o **lesioni**.

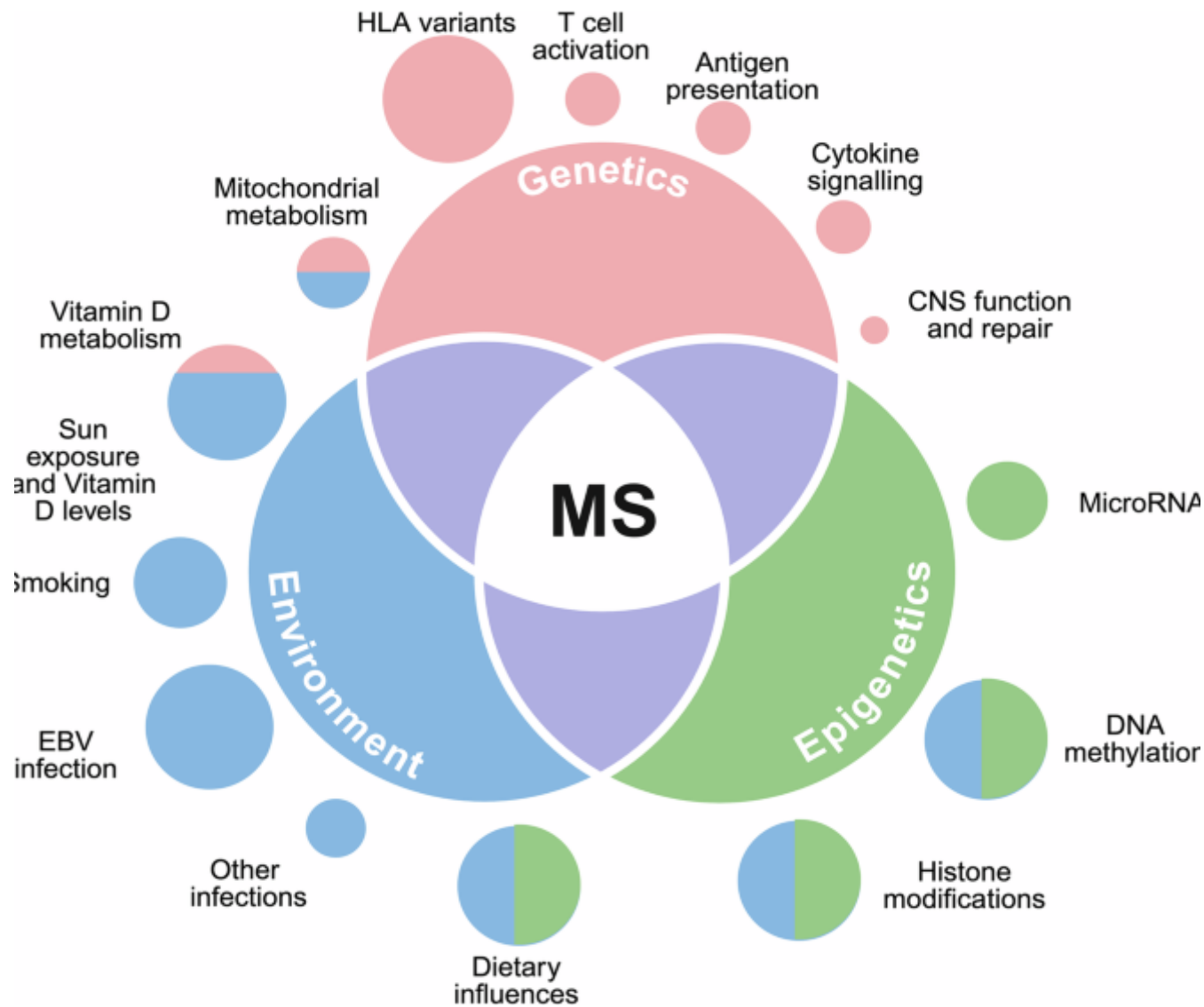
La perdita delle guaine mieliniche interrompe la funzione neuronale, compromettendo la normale trasmissione del segnale nervoso.



# Trasmissione del segnale elettrico in un soggetto normale e con SM



## L'interazione di fattori genetici, ambientali ed epigenetici nel rischio di SM



Sebbene l'eziologia della SM non sia stata ancora chiarita, il rischio di sviluppare SM dipende da complesse interazioni genetiche, epigenetiche ed ambientali. Tali fattori svolgono ruoli significativi nell'insorgenza e nella progressione della malattia.

La **genetica** contribuisce alla suscettibilità ereditaria, determinando variazioni nei geni immuno-correlati.

I **fattori ambientali**, come infezioni, livelli di vitamina D e fumo, possono influenzare il rischio di malattia.

L'**epigenetica** rappresenta i meccanismi regolatori dinamici che mediano gli effetti dell'ambiente sull'espressione genica, modellando le risposte immunitarie e la progressione della malattia.

# Fattori genetici

Tra le oltre 230 varianti genetiche associate al rischio di SM, la maggior parte sembrano essere correlate o direttamente collegate alla **funzione del sistema immunitario**.

L'associazione genetica più consolidata con la SM coinvolge la regione dell'antigene leucocitario umano (HLA) di classe II, in particolare l'allele **HLA-DRB1\*1501**.

Questo allele, implicato nella presentazione dell'antigene e nella regolazione della risposta immunitaria, si associa ad un **aumento significativo della suscettibilità alla SM**.



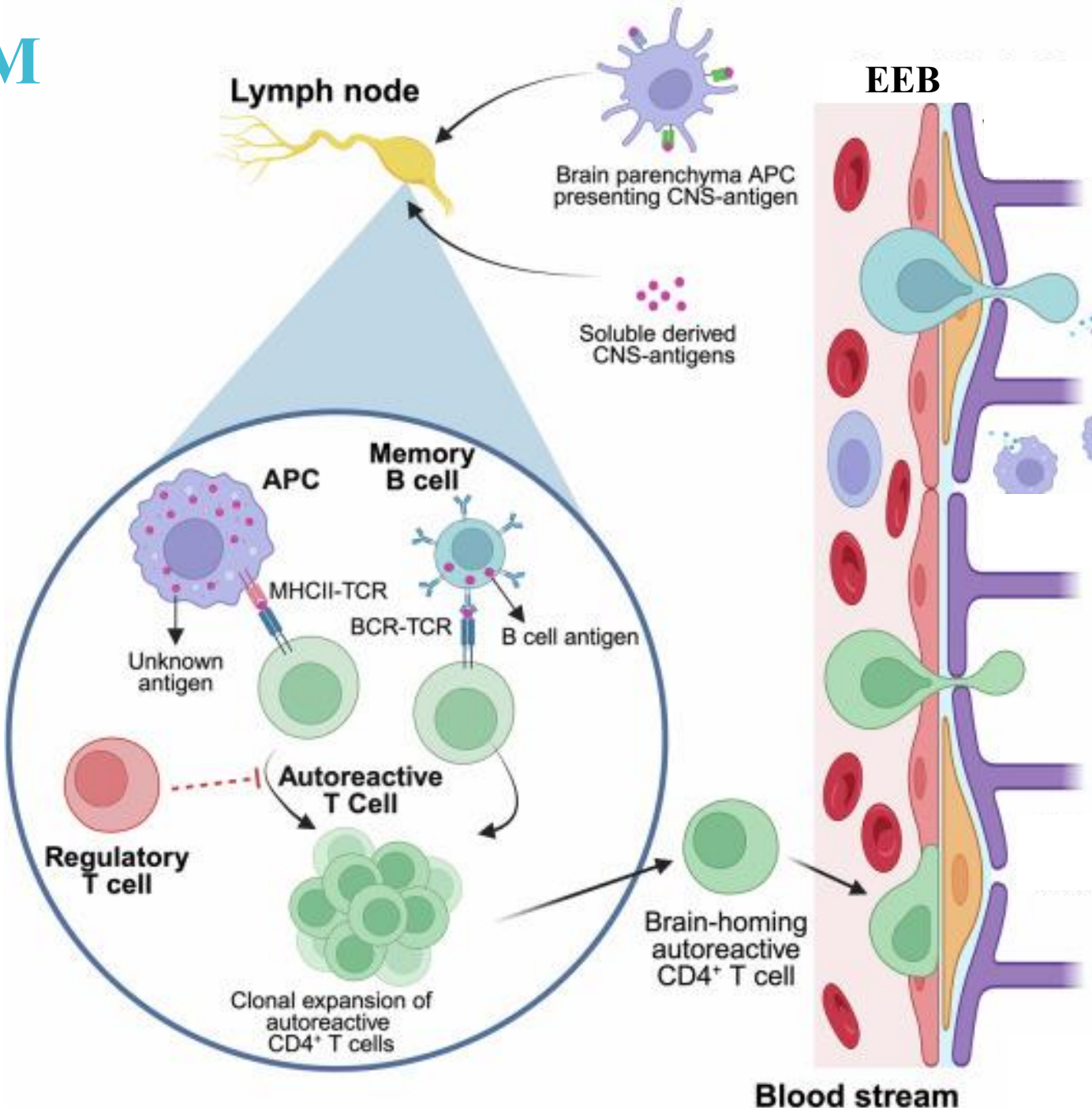
# Fattori ambientali

Diversi studi epidemiologici hanno fornito prove convincenti che vari fattori ambientali interagiscono con la predisposizione genetica per influenzare il rischio di SM.

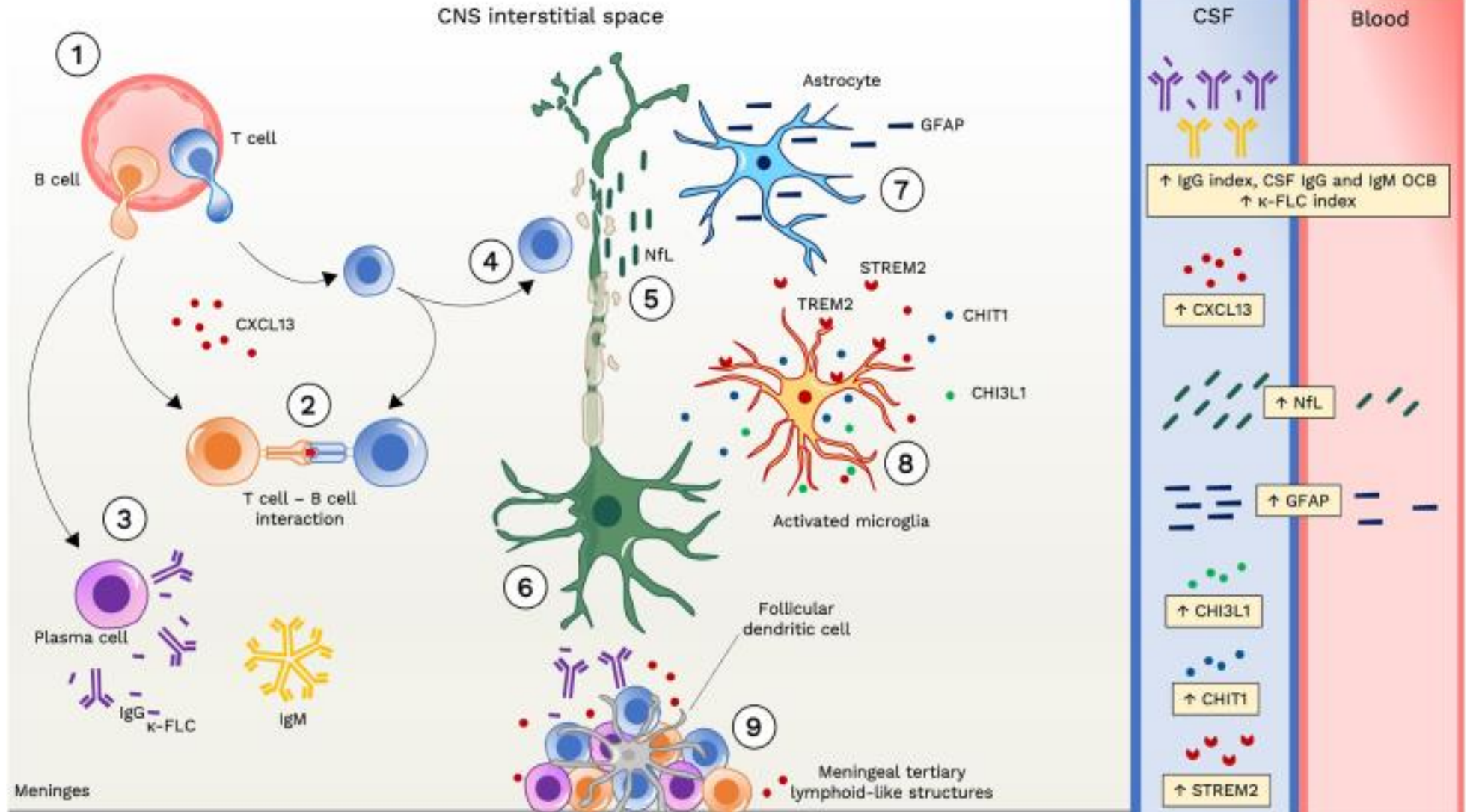
- Una delle osservazioni meglio documentate è il gradiente latitudinale dell'incidenza della SM che ha spinto i ricercatori a studiare la **carenza di vitamina D** come potenziale fattore determinante.
- Gli **agenti infettivi** sono stati anche proposti come fattori ambientali scatenanti della SM, con l'Epstein-Barr Virus (**EBV**) quale candidato più studiato. Come dimostrato da alcuni studi, quasi tutti gli individui che hanno sviluppato la SM erano positivi all'EBV al momento dell'insorgenza. Altre infezioni, tra cui l'herpesvirus umano 6 (HHV-6), il citomegalovirus (CMV) e i retrovirus endogeni umani (HERV), rivestono un ruolo potenziale nella SM.
- Anche il **fumo** è stato associato a un aumento del rischio di SM, probabilmente a causa dei suoi effetti sull'attivazione del sistema immunitario e sull'infiammazione cronica.
- L'**obesità**, in particolare nella prima infanzia, è stata collegata ad un aumento del rischio di SM e di neuroinfiammazione, a causa della modulazione immunitaria indotta dalle adipochine.

# Immuno-patogenesi della SM

Sebbene l'antigene responsabile della reazione autoimmune alla base della SM non sia stato ancora descritto, si ipotizza che gli antigeni derivati dal SNC raggiungessero la periferia e sarebbero presentati alle cellule T CD4+ autoreattive nei linfonodi. In alternativa, altri autoantigeni, peptidi microbici patogeni o intestinali che condividono un'alta omologia con gli antigeni mielinici, sono stati postulati come candidati per la SM. Il pool di cellule T CD4+ autoreattive, che si sono espanse clonalmente, attraversano la barriera ematoencefalica (EEB). Raggiunto il SNC, le cellule T CD4+ autoreattive vengono riattivate dalle cellule locali che presentano l'antigene e si differenziano in cellule effettrici T helper, avviando una serie di eventi che portano alla demielinizzazione e al danno neuronale...



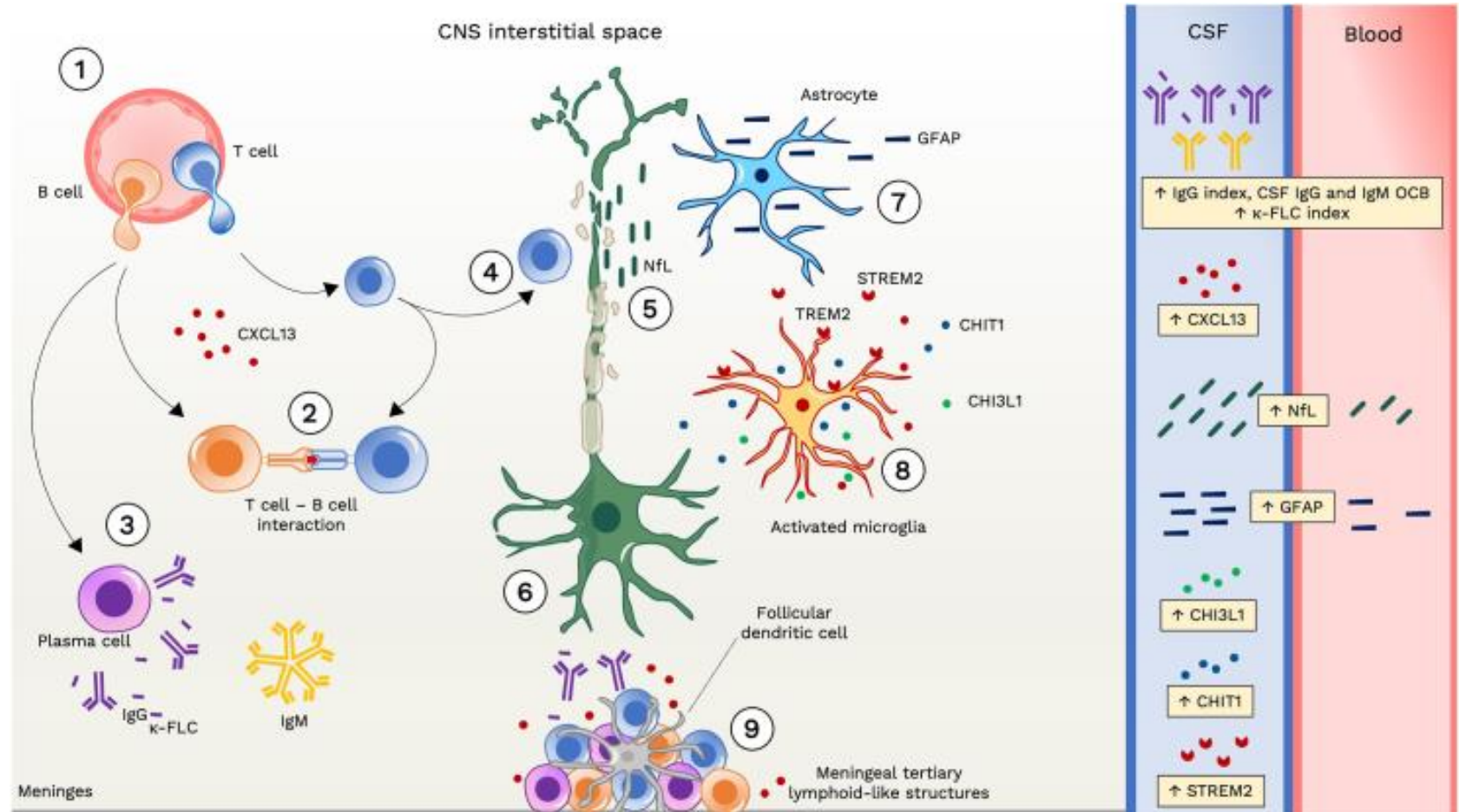
# Nello specifico...



**Abbreviations.** CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NFL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2. TREM2: cell surface triggering receptor expressed on myeloid cells 2

(1) Nelle fasi iniziali della malattia, le cellule immunitarie infiltrano il SNC attraverso la barriera emato-encefalica. Tra queste, macrofagi, linfociti T CD8+, linfociti T CD4+, linfociti B e plasmacellule. I linfociti T e B vengono attivati in periferia e attratti nel SNC da fattori chemiotattici, come il ligando 13 della chemochina (motivo C-X-C) (CXCL13) per i linfociti B.

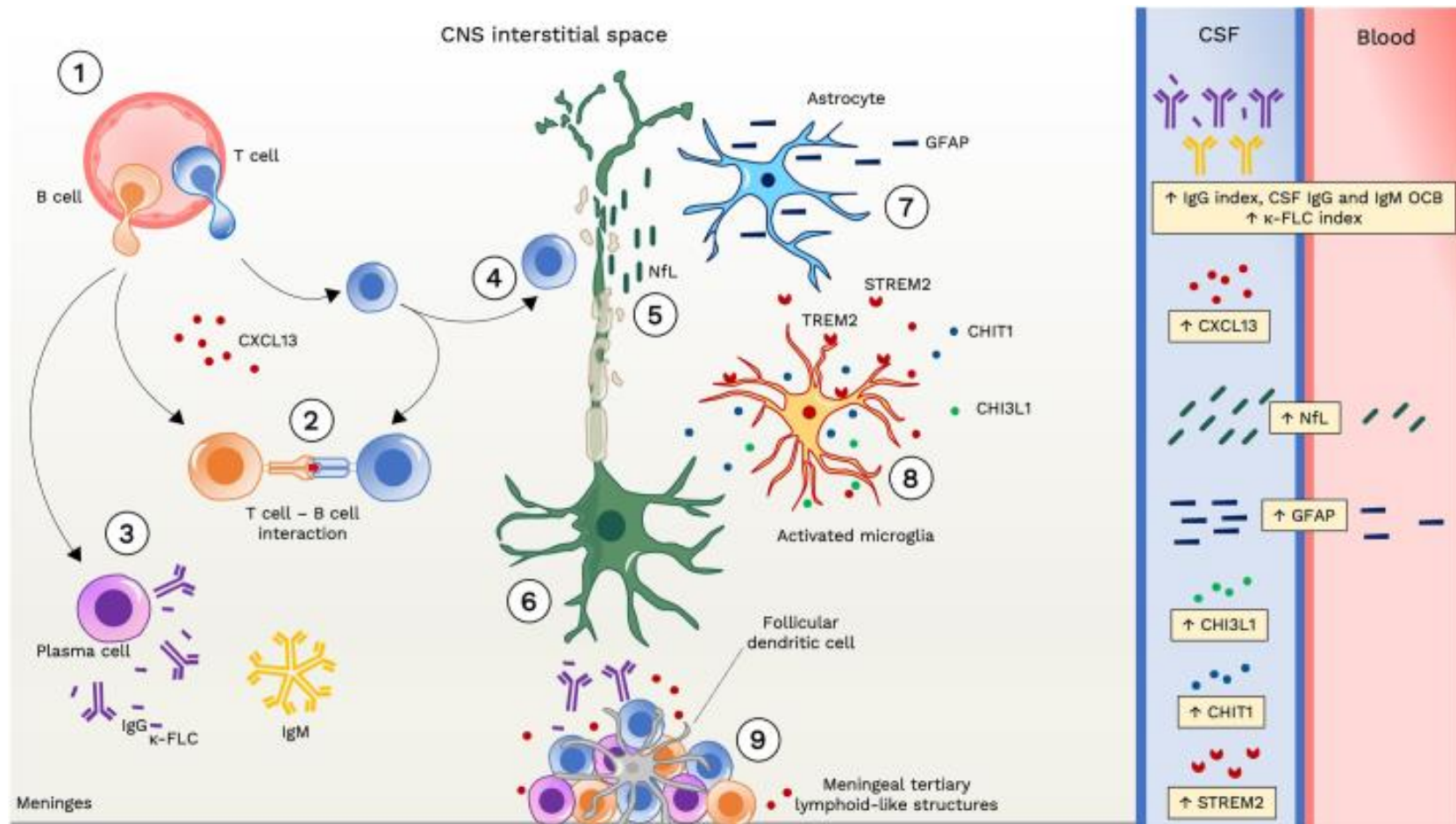
(2) Nel SNC, i linfociti T e B interagiscono strettamente, con i linfociti B che fungono da cellule presentanti l'antigene.



- **Abbreviations.** CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NFL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2. TREM2: cell surface triggering receptor expressed on myeloid cells 2

(3) I linfociti B attivati possono maturare in plasmacellule, secernendo anticorpi IgM e IgG nello spazio intratecale. Questo processo provoca anche il rilascio di catene leggere libere (FLC) a causa di una discrepanza tra la sintesi delle catene leggere e pesanti delle immunoglobuline.

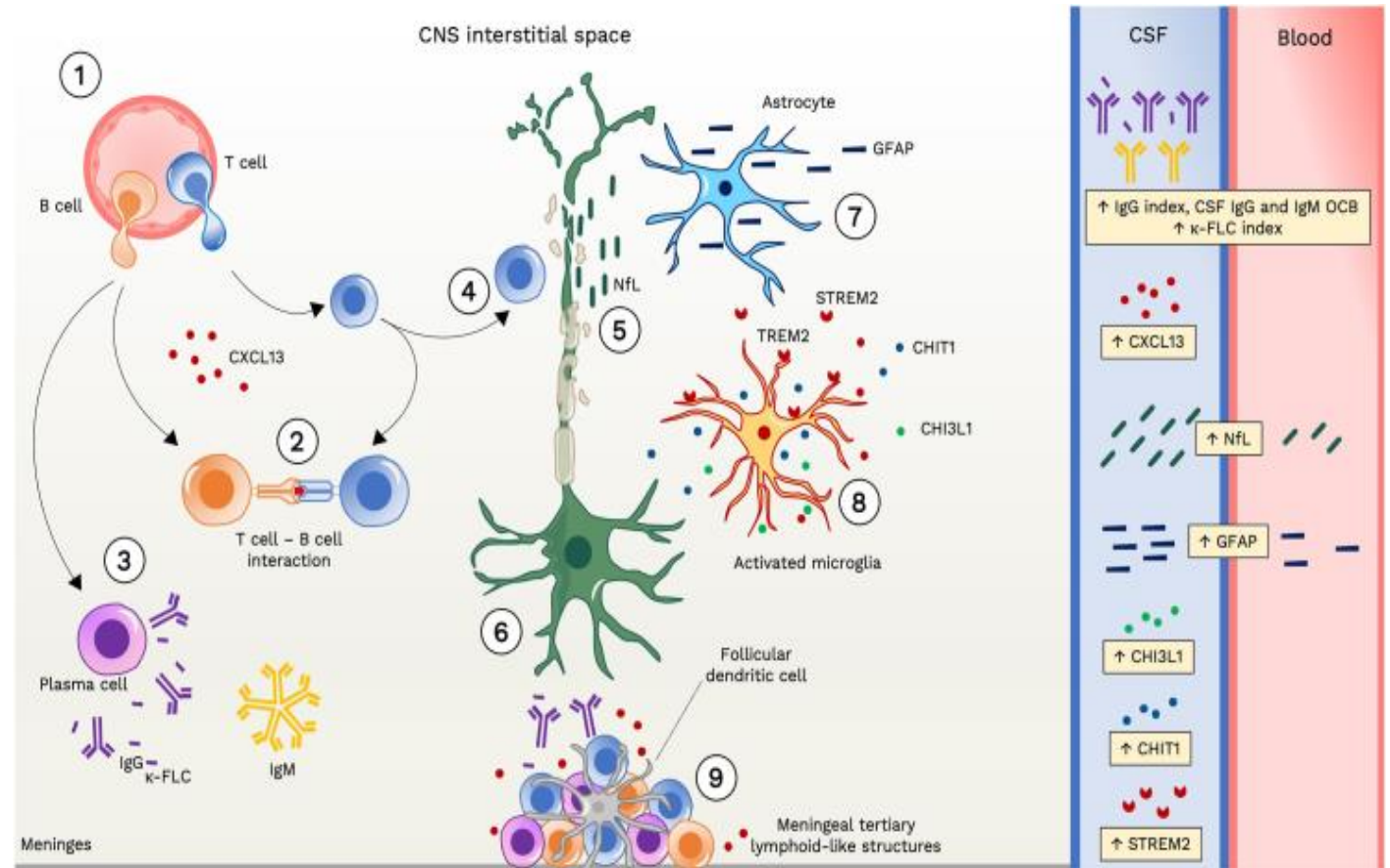
(4–5) Il processo infiammatorio porta al danno assonale e al rilascio di marcatori neuronali come la catena leggera dei neurofilamenti (NfL) nello spazio interstiziale, nel liquido cerebrospinale (CSF) e nel flusso sanguigno.



- **Abbreviations.** CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NfL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2. TREM2: cell surface triggering receptor expressed on myeloid cells 2

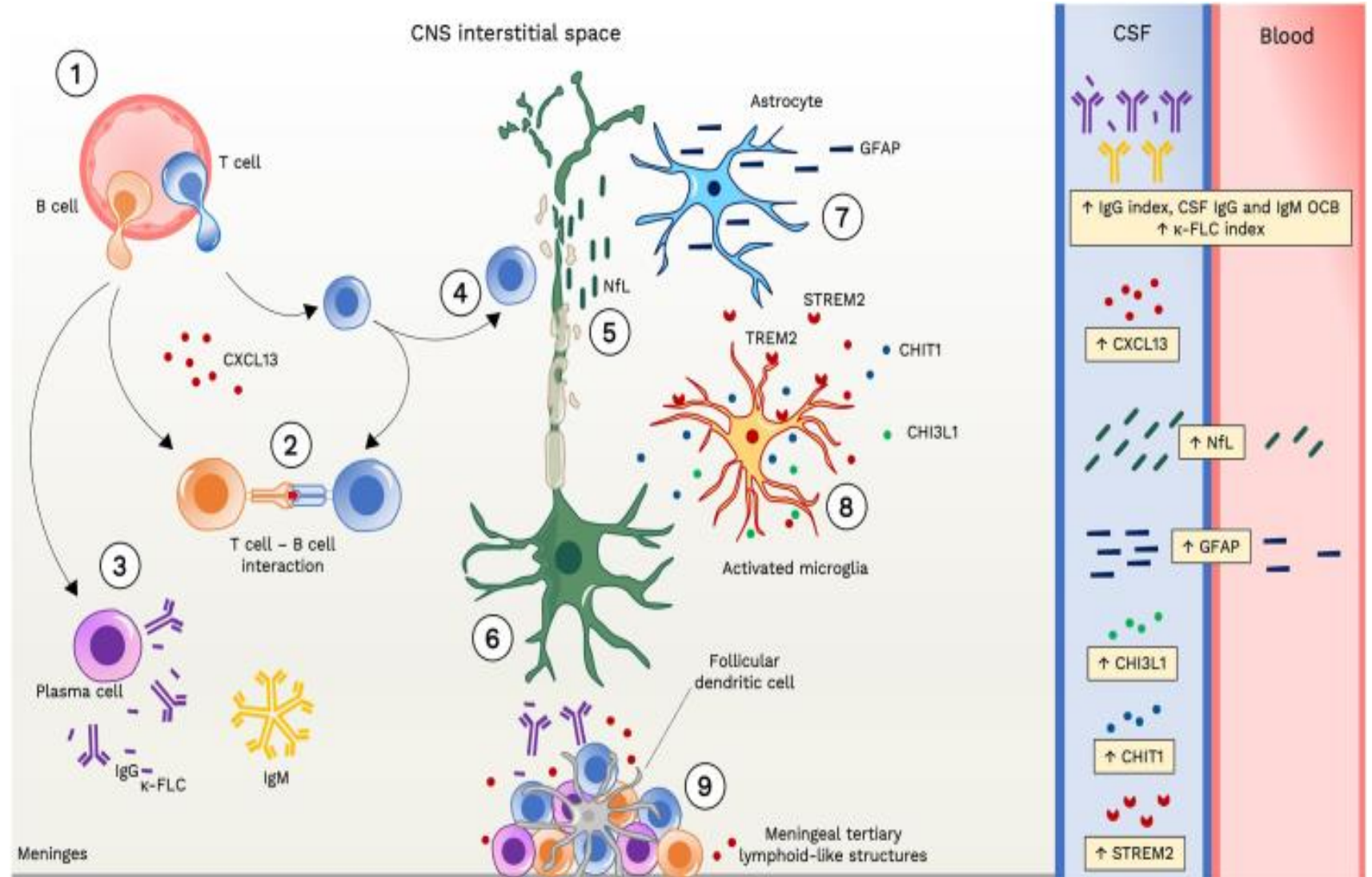
(6) Il danno assonale focale induce il *die-back* assonale o la degenerazione retrograda, nonché la degenerazione walleriana o anterograda, contribuendo alla perdita neuronale.

(7–8) Le cellule immunitarie residenti nel SNC, come la microglia e gli astrociti, si attivano, compromettendo l'integrità e la funzione assonale e sinaptica. La microglia e gli astrociti attivati rilasciano vari mediatori nel CSF, tra cui il recettore solubile di attivazione espresso sulle cellule mieloidi 2 (sTREM2), la chitinasi 1 (CHIT1) e la proteina 1 simile alla chitinasi 3 (CHI3L1). Inoltre, il danno astrocitario provoca il rilascio di proteine strutturali come la proteina acida fibrillare gliale (GFAP) sia nel CSF che nel flusso sanguigno.



- **Abbreviations.** CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NfL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2. TREM2: cell surface triggering receptor expressed on myeloid cells 2

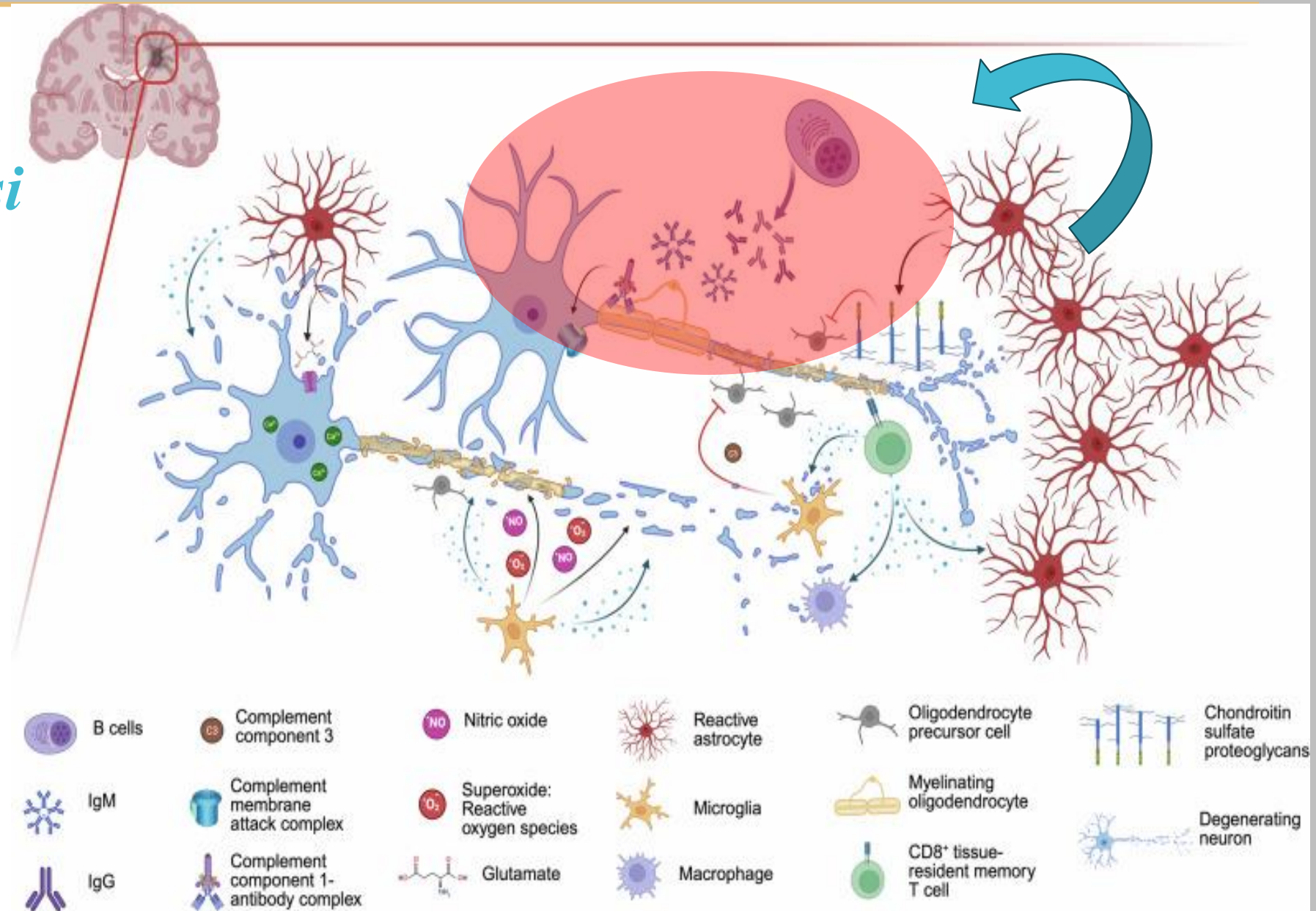
(9) L'incapacità di risolvere adeguatamente l'infiammazione nel tempo porta a una risposta immunitaria sostenuta, con conseguente infiammazione meningea persistente con formazione di strutture linfoidi.

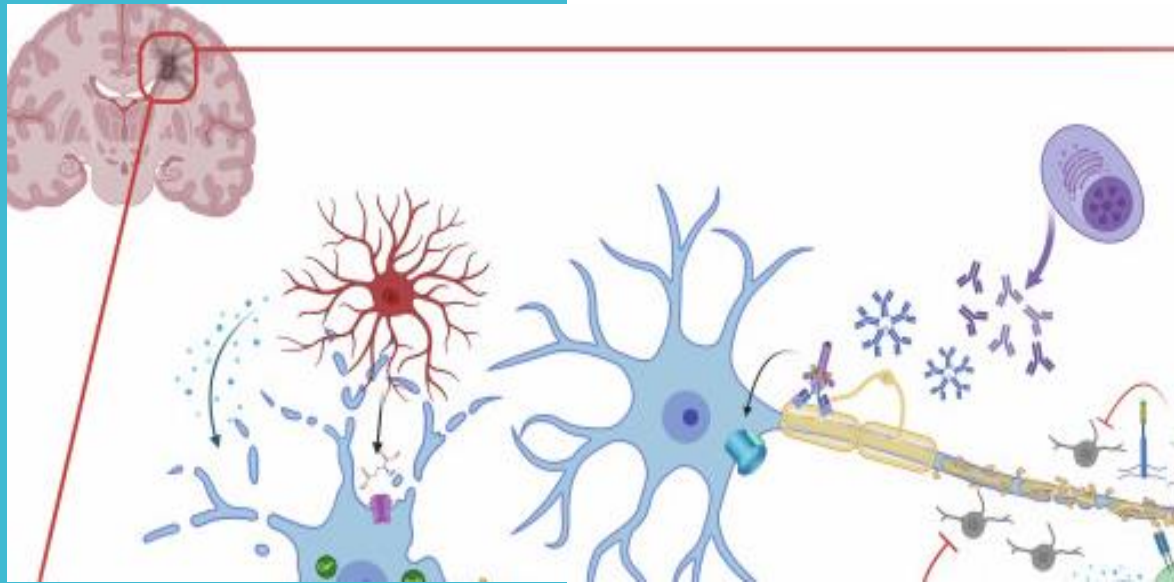


- **Abbreviations.** CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NfL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2. TREM2: cell surface triggering receptor expressed on myeloid cells 2

# Neuro-patogenesi della SM

La neuropatogenesi sottostante la SM è molto complessa e coinvolge una combinazione di **disregolazione del sistema immunitario, neurodegenerazione e attivazione delle cellule gliali.**





È stato dimostrato che l'**immunità umorale** contribuisce alla demielinizzazione nella SM attraverso la deposizione di anticorpi e l'attivazione del complemento. Gli anticorpi IgM e IgG, prodotti da cellule B espansive clonalmente nel SNC, prendono di mira i componenti della mielina, inducendo demielinizzazione e attivando la via classica del complemento, con conseguente infiammazione e formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC), che danneggia gli oligodendrociti.

Nel corso del tempo, i neuroni cronicamente demielinizzati sono vulnerabili alle lesioni assonali e allo stress metabolico, contribuendo alla neurodegenerazione e alla progressione della malattia.

Il meccanismo alla base della neurodegenerazione nella SM sono ancora oggetto di studio.

Poiché la SM manca di un marcatore biologico specifico, la sua **diagnosi** si basa sulla **combinazione di caratteristiche cliniche, di laboratorio e radiologiche** incorporate nei cosiddetti «criteri McDonald».

# McDonald diagnostic criteria

Clinical presentation – what evidence for MS is already present?	Objective lesions	What additional data is required for an MS diagnosis?
2 or more relapses	2 or more	None, clinical evidence will suffice (additional evidence desirable but must be consistent with MS)
2 or more relapses	1	<b>Dissemination in space (DIS)</b> shown by one or more MRI detected lesions typical of MS <b>OR</b> a further relapse showing damage to a different part of the CNS
1 relapse	2 or more	<b>Dissemination in time (DIT)</b> shown by oligoclonal bands <b>OR</b> MRI evidence of new lesions since previous scan <b>OR</b> a further relapse
1 relapse	1 (known as Clinically Isolated Syndrome (CIS))	<b>Dissemination in space (DIS)</b> shown by one or more MRI detected lesions typical of MS <b>OR</b> a further relapse showing activity in a different part of the CNS. <b>Dissemination in time (DIT)</b> shown by oligoclonal bands <b>OR</b> MRI showing new lesions since a previous scan <b>OR</b> a further relapse
Neurological progression is suggestive of MS. This is typical for a diagnosis of primary progressive MS (PPMS)		<b>Continued progression for one year (from previous symptoms or by ongoing observation) plus any two of these</b>  One or more MRI detected lesions in the brain typical of MS, two or more MRI detected lesions in the spinal cord, oligoclonal bands in the spinal fluid

## Caratteristiche cliniche (I)

- La SM si presenta tipicamente con episodi di **disfunzione neurologica** (ricadute), con sintomi diversi a seconda della posizione delle lesioni demielinizzanti nel SNC.
- Le manifestazioni cliniche più comuni includono **compromissione visiva unilaterale, neurite ottica, deficit sensoriali o motori unilaterali, diplopia, squilibrio o vertigini** (sindrome infratoriale). Occasionalmente, la SM può presentarsi come multifocale, colpendo contemporaneamente varie regioni del SNC.
- I sintomi si sviluppano tipicamente in modo acuto o subacuto, entro ore o giorni, persistono per almeno 24 ore e di solito si risolvono nell'arco di giorni o settimane.

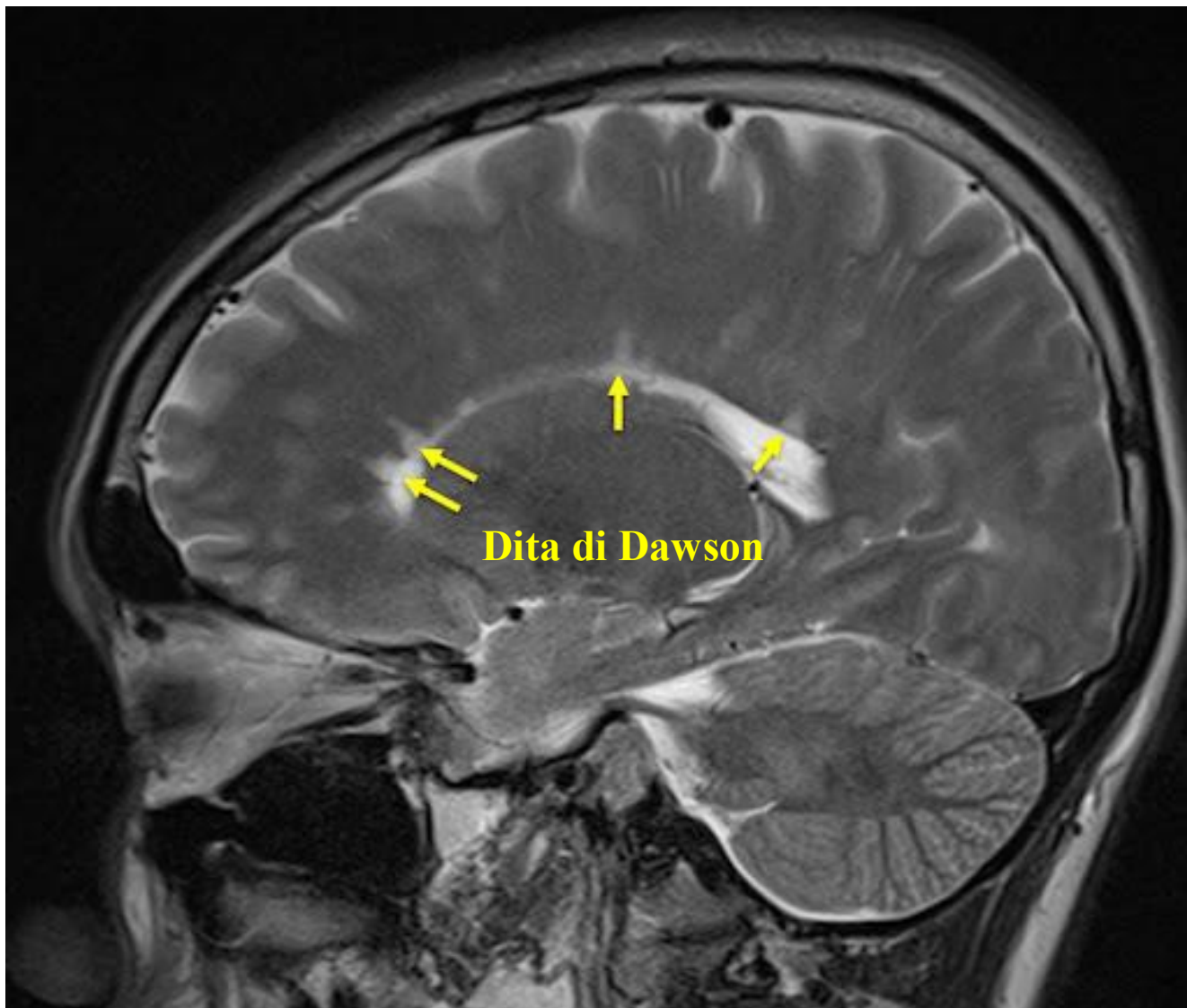


## Caratteristiche *cliniche* (II)

Alcune presentazioni atipiche o "**red flags**" includono l'insorgenza di sintomi iperacuti o cronici, **neurite ottica bilaterale, grave neurite ottica unilaterale con scarso recupero visivo, mielite completa con sintomi motori o sensoriali bilaterali, accompagnati da disfunzione dello sfintere, nausea intrattabile, vomito, singhiozzo, encefalopatia o oftalmoplegia.**

**Table 1.** Typical and atypical ("Red Flags") characteristics in multiple sclerosis

Feature	Typical MS characteristics	Atypical ("red flags") characteristics
<b>Clinical</b>	Subacute onset Unilateral optic neuritis Incomplete spinal cord syndrome Internuclear ophthalmoplegia	Hyperacute or chronic onset Bilateral severe optic neuritis Complete transverse myelitis Encephalopathy, headache Persistent nausea, vomiting or hiccups Prominent ophthalmoplegia



## Caratteristiche di *imaging (I)*

L'inclusione della risonanza magnetica (RM) nei criteri McDonald ha fornito un supporto decisivo alla diagnosi di SM, in quanto permette di monitorare l'attività della malattia.

Alcune caratteristiche chiave della RM sono state proposte per essere altamente suggestive di SM e potrebbero aiutare nella diagnosi di casi incerti: orientamento perpendicolare dell'asse principale della lesione ai ventricoli laterali ("dita di Dawson"), lesioni localizzate nel lobo temporale inferiore e lesioni juxtacorticali che coinvolgono le fibre U.

A supporto della diagnosi di SM sono stati proposti due segni distintivi: il segno della vena centrale (CVS) e la presenza di lesioni paramagnetiche del bordo (PRL). Il CVS è caratterizzato da lesioni incentrate su una piccola vena rilevabile su immagini RM ad alta risoluzione. I PRL riflettono invece lesioni attive croniche, con un bordo di infiammazione in lenta espansione, che sono associate all'attività e alla progressione della malattia.

## Caratteristiche di *imaging* (II)

Alcune presentazioni atipiche o "**red flags**" includono...

---

Atypical ("red flags") characteristics

Large tumefactive, ill-defined lesions

Longitudinally extensive spinal cord lesions ( $\geq 3$  vertebral segments)

Prominent cortical involvement

Leptomeningeal enhancement, persistent enhancement

## Caratteristiche di *laboratorio* (I)

Le indagini di laboratorio aiutano nella diagnosi della SM, anche se **nessun singolo test è diagnostico di per sé**.

L'analisi del liquor (CSF) rivela spesso la presenza di bande oligoclonali (OCB) nel CSF ma non nel siero, indicando la produzione di anticorpi intratecali. Mentre le OCB sono presenti nel 90% dei pazienti con SM, **non sono specifiche per la malattia e possono comparire anche in altre condizioni**, come la neurosarcoidosi, la vasculite e la malattia di Behçet.

Si può anche osservare un **elevato indice IgG** e una lieve pleocitosi, con predominanza linfocitica.

Recentemente, l'indice della **catena leggera senza kappa (KFLC)** è stato sempre più riconosciuto come un prezioso biomarcatore nella diagnosi di SM. Gli studi suggeriscono che l'indice KFLC può essere più sensibile e specifico rispetto alle OCB tradizionali nell'identificazione della SM precoce, offrendo un'alternativa diagnostica più rapida e meno soggettiva.

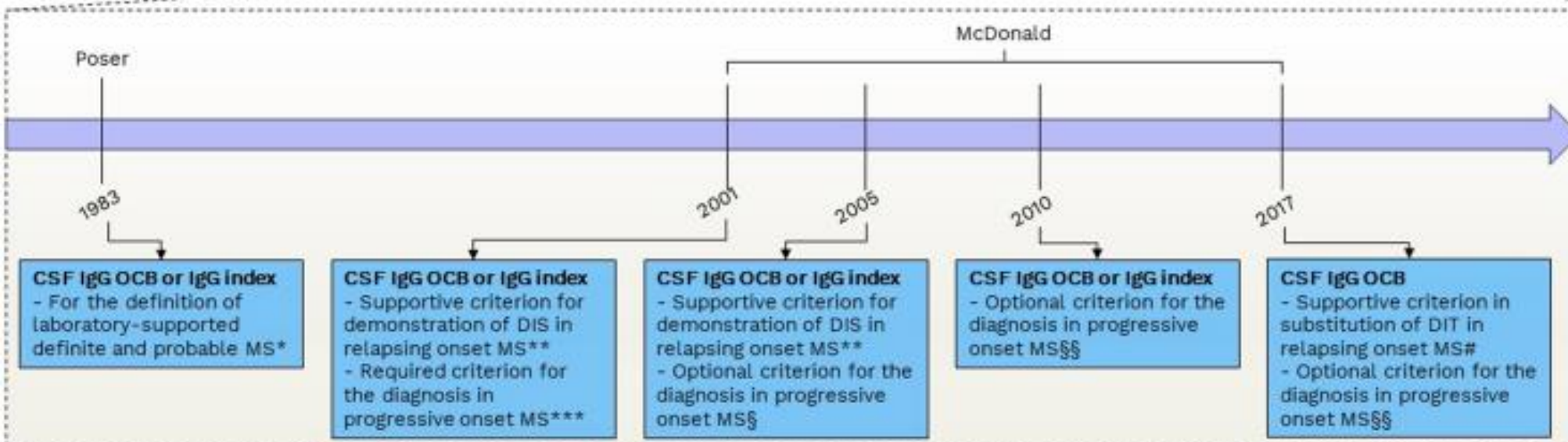
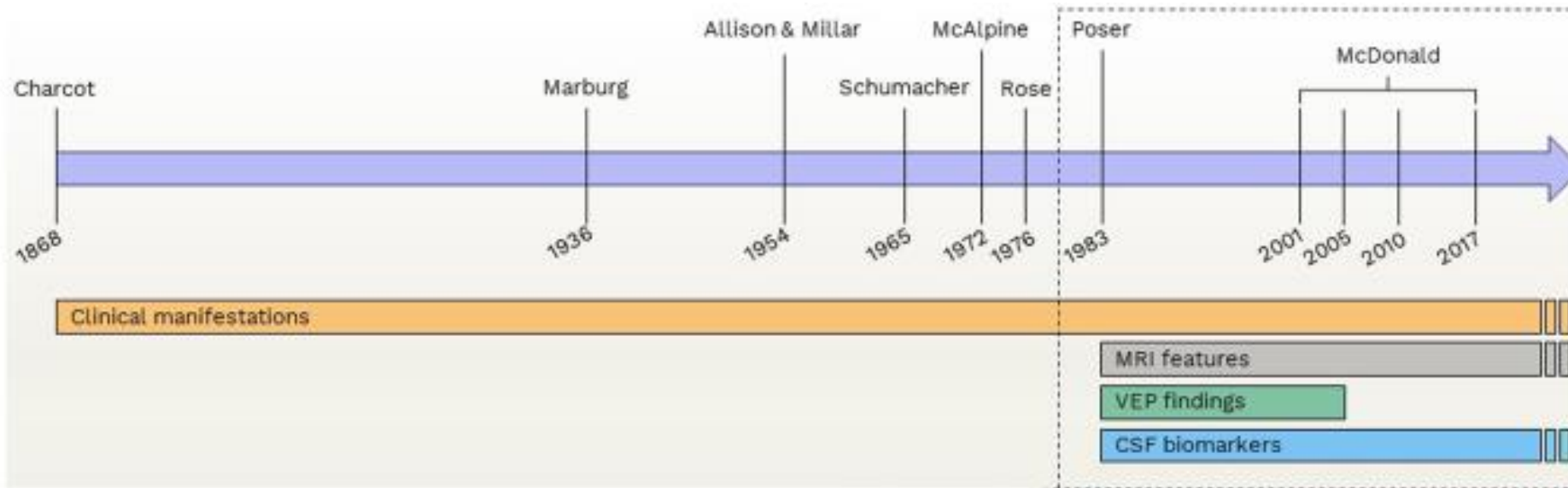
## Caratteristiche di *laboratorio* (II)

Confronto tra caratteristiche tipiche e atipiche dell'esame del liquor.

**Table 1.** Typical and atypical ("Red Flags") characteristics in multiple sclerosis

Feature	Typical MS characteristics	Atypical ("red flags") characteristics
<b>CSF</b>	CSF-restricted oligoclonal bands, elevated KFLC, and elevated IgG index Mild lymphocytic pleocytosis	Marked pleocytosis ( $> 50$ cells/mm <sup>3</sup> ), polymorphonuclear predominance Significantly elevated proteins Hypoglycorrhachia Absence or transient CSF-restricted oligoclonal bands

# Criteria diagnostici della SM: evoluzione nel tempo



CSF: Cerebrospinal fluid.  
 DIS: Dissemination in space. DIT: Dissemination in time. IgG: Immunoglobulin G. MRI: Magnetic resonance imaging. MS: Multiple sclerosis. OCB: Oligoclonal bands. VEP: Visual evoked potentials.

# Criteria diagnostici

È essenziale dimostrare un **danno infiammatorio immunomediato** che abbia interessato almeno due regioni distinte (“disseminazione nello spazio”) del SNC in momenti diversi (“disseminazione nel tempo”).

**Table 2.** McDonald 2017 diagnostic criteria for multiple sclerosis

Category	Diagnostic criteria
<b>Dissemination in space (DIS)</b>	≥2 clinical attacks with objective evidence of ≥2 lesions OR MRI lesions in ≥2 characteristic CNS regions: - Periventricular - Cortical/Juxtacortical - Infratentorial - Spinal cord
<b>Dissemination in time (DIT)</b>	≥2 clinical attacks separated by ≥1 month OR MRI evidence of the simultaneous presence of gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions OR New T2 lesions appearing on follow-up MRI OR Presence of CSF-restricted oligoclonal bands (in patients with clinical and radiological evidence of DIS)
<b>Diagnosis of RRMS</b>	Evidence of both DIS and DIT demonstrated clinically, via MRI, or with supportive CSF findings (oligoclonal bands)
<b>Diagnosis of PPMS</b>	≥1 year of disability progression independent of clinical relapses PLUS 2 of the following: - ≥1 T2-hyperintense lesions characteristic of MS in periventricular, cortical/juxtacortical, or infratentorial regions - ≥2 T2-hyperintense spinal cord lesions - Presence of CSF-restricted oligoclonal bands

*MRI* magnetic resonance imaging, *CNS* central nervous system, *CSF* cerebrospinal fluid, *RRMS* relapsing–remitting multiple sclerosis, *PPMS* primary progressive multiple sclerosis, *DIS* dissemination in space, *DIT* dissemination in time

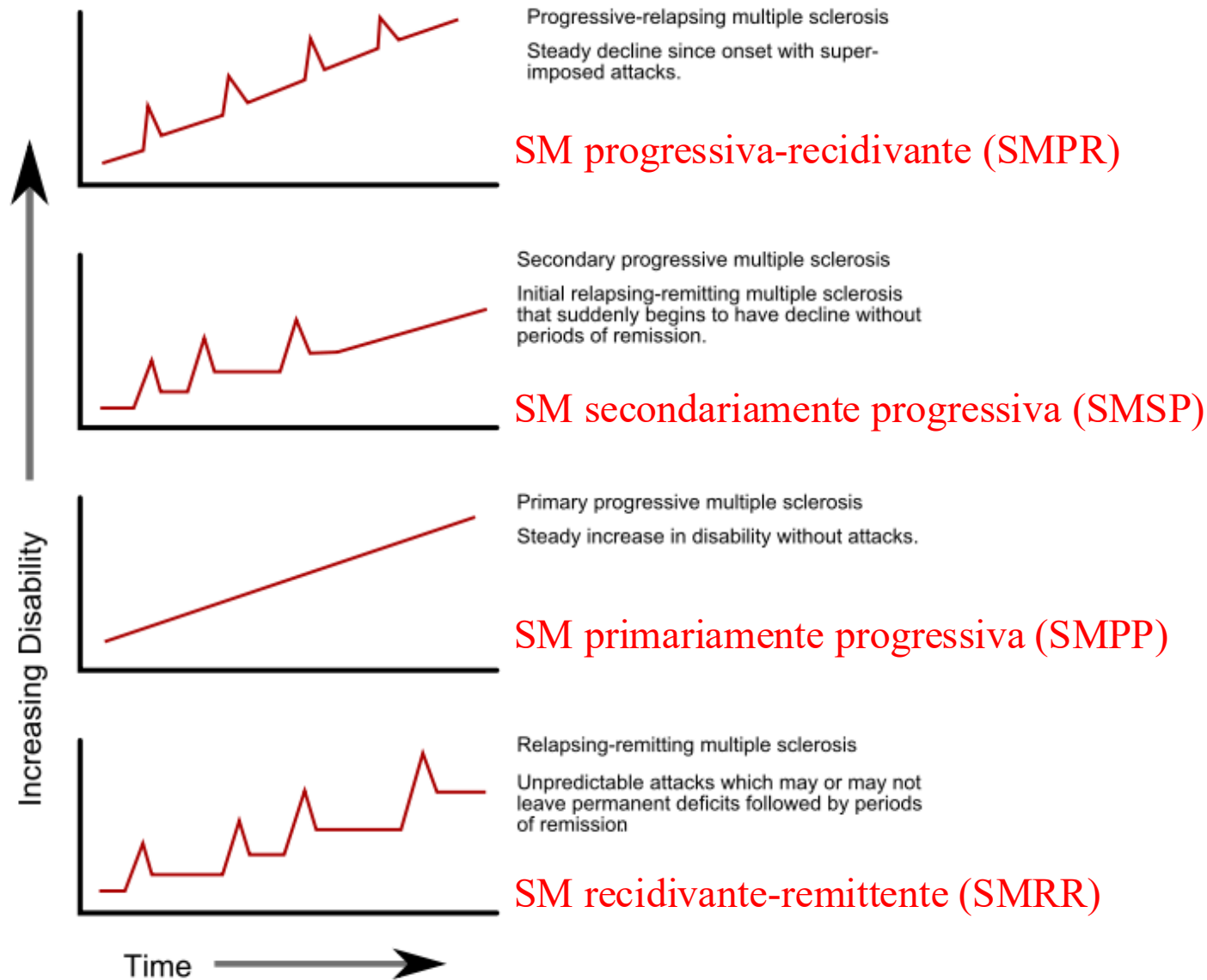
## Criteria diagnostici

Nel 2024, un gruppo internazionale di esperti ha proposto criteri diagnostici aggiornati per la SM, con l'obiettivo di aumentare l'accuratezza diagnostica e ridurre i tempi di diagnosi. Questi criteri McDonald proposti per il 2024 includono diversi importanti cambiamenti:

- (1) **la possibilità di diagnosticare la sindrome radiologicamente isolata (RIS) come SM** in specifici scenari ad alto rischio;
- (2) **inclusione formale del nervo ottico come quinta regione del SNC** per valutare il DIS;
- (3) **eliminazione del requisito per DIT in casi selezionati**;
- (4) **accettazione di CSF KFLC come alternativa alle OCB** per stabilire l'infiammazione intratecale e soddisfare il DIT;
- (5) **incorporazione di biomarcatori MRI avanzati, come CVS e PRL**, come caratteristiche di supporto per migliorare la specificità.

# Fenotipi clinici

Sulla base dell'andamento temporale sono state individuate diverse forme/sottotipi di SM...



*Monitoraggio  
dei pazienti  
affetti da  
sclerosi  
multipla*



## **Basi fisiopatologiche dei biomarcatori nella SM**

- In uno scenario così complesso, **diversi biomarcatori rilevabili nei fluidi bioogici sono emersi come indicatori efficaci dei principali processi sottostanti la fisiopatologia della SM.**
- Soprattutto nelle fasi iniziali della malattia, i sintomi insorgono a causa di episodi di infiammazione focale acuta, demielinizzazione e danno assonale, causati dall'invasione di cellule dell'immunità adattativa, che possono causare una disconnessione funzionale e strutturale delle aree del SNC. Questo fenomeno può essere tipicamente rilevato dalla RM convenzionale, che mostra la comparsa di nuove lesioni nelle sequenze pesate in T2 e/o di lesioni captanti il gadolinio nelle sequenze pesate in T1.
- La disabilità dovuta a tali manifestazioni acute dell'attività della malattia tende a migliorare o a risolversi completamente.
- Durante questa fase recidivante della malattia, si ripresentano episodi di infiammazione focale che si estendono nel tempo e nello spazio nel SNC, come conseguenza dell'infiltrazione di cellule del sistema immunitario dalla periferia al SNC.

## **Basi fisiopatologiche dei biomarcatori nella SM**



- Le cellule infiammatorie infiltranti, inclusi macrofagi, linfociti T CD8+, linfociti T CD4+ e linfociti B, rilasciano diversi mediatori, come citochine e chemochine nel tessuto del SNC, nel CSF e nel sangue.
- Purtroppo, **la maggior parte delle chemochine e citochine derivate dai linfociti T misurabili nei fluidi biologici non ha mostrato un forte potenziale come biomarcatori di malattia.**
- **Al contrario, l'attivazione dei linfociti B ha storicamente fornito i biomarcatori più affidabili per la SM.**

## Basi fisiopatologiche dei biomarcatori nella SM



- **I linfociti B attivati differenziano infatti nel SNC in plasmacellule che producono immunoglobuline intratecali, sia immunoglobuline M (IgM) che G (IgG).**
- Queste immunoglobuline sintetizzate in sede intratecale sembrano **riconoscere antigeni specifici che attualmente non sono ancora completamente noti** e variano nei diversi studi scientifici nonchè nelle diverse coorti di pazienti.
- **IgM e IgG e intratecali e catene leggere possono essere rilevate nel CSF.**
- Un'altra molecola interessante legata all'attività delle cellule B è il ligando 13 della chemochina (C-X-Cmotif) (**CXCL13**), presente in concentrazioni elevate nel CSF e nei fluidi periferici degli individui affetti da SM.

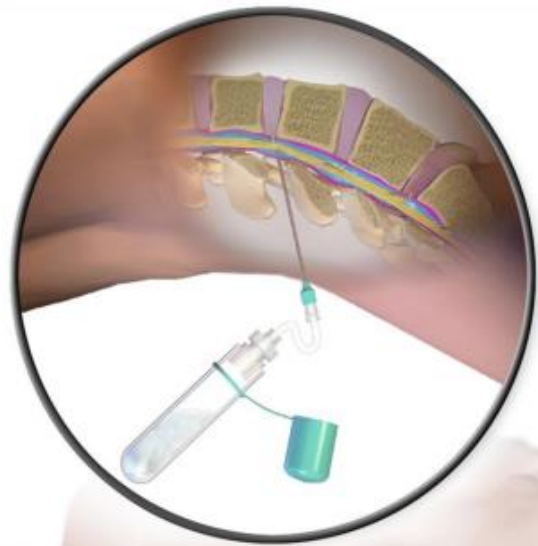
## **Basi fisiopatologiche dei biomarcatori nella SM**

- Nel tempo, il danno neuroassonale si accumula, la riserva funzionale diminuisce e i sintomi neurologici persistono e peggiorano progressivamente.
- Il peggioramento della disabilità e l'accumulo di deficit neurologici nella SM in assenza di ricadute concomitanti sono definiti come "progressione indipendente dall'attività di ricaduta" (PIRA).

## Diagnosi di SM

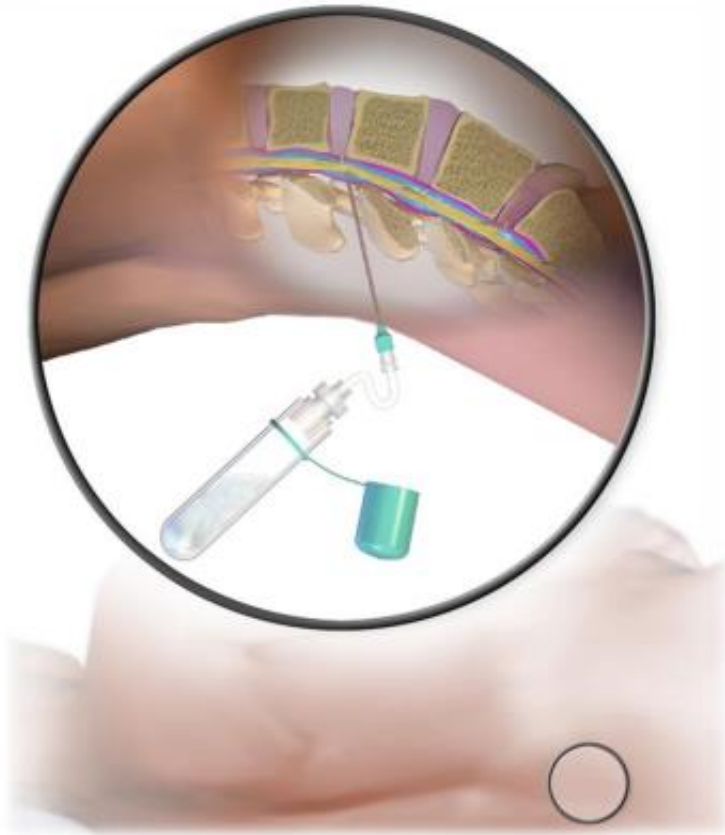
- Per integrare la neuroimmagine e offrire ulteriori spunti nella pratica clinica della SM, i biomarcatori presenti nei fluidi biologici sono stati ampiamente studiati e alcuni di essi fanno già parte delle indagini clinicamente utili da eseguire nel sospetto di malattia.





## Analisi del CSF

- Tra i vari fluidi corporei adatti alla misurazione dei biomarcatori, il liquido cerebrospinale (CSF) si distingue per la sua stretta associazione con lo spazio extravascolare del sistema nervoso centrale (SNC).
- La sua peculiarità di essere a stretto contatto con il SNC e isolato dagli altri liquidi corporei lo rende indispensabile per la diagnostica di molte patologie del SNC.

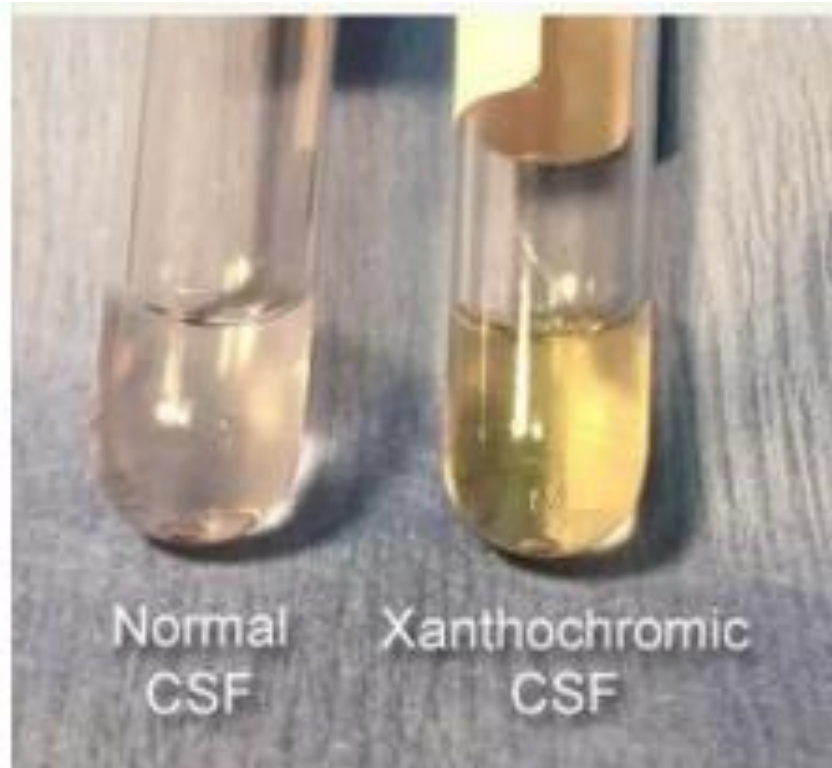


## Analisi del CSF

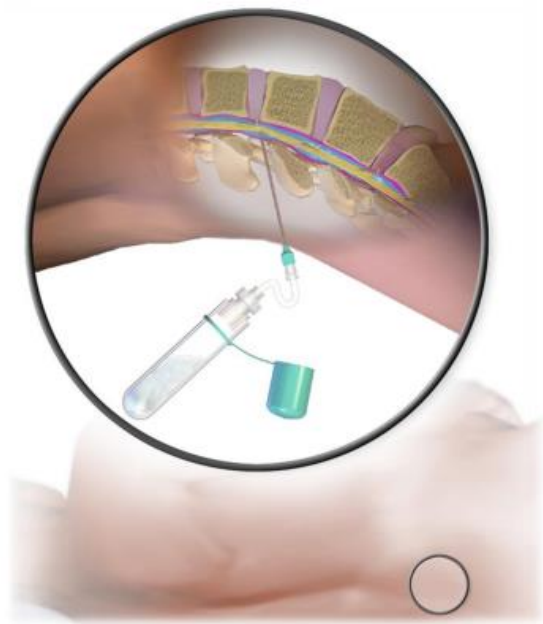
L'analisi del liquido cerebrospinale è rilevante in numerose condizioni:, tra cui:

- Emorragia subaracnoidea (in particolare con TC negativa);
- Meningite e meningoencefalite;
- Malattia neurodegenerativa (encefalopatia spongiforme);
- Poliradicoloneurite;
- **Sclerosi multipla (SM)**

# Analisi del CSF



- Il prelievo di CSF prevede una puntura lombare, una procedura che, sebbene invasiva, se eseguita secondo protocolli appropriati, è sicura e semplice e consente il prelievo di volumi adeguati di CSF con effetti collaterali minimi.
- Il CSF deve essere raccolto in quantità adeguata al numero e al tipo di analisi che si prevede di eseguire;
- è buona norma raccoglierlo in 3-4 provette (numerata in base alla sequenza della raccolta) di polipropilene sterili per evitare l'adesione delle cellule e delle proteine alle pareti;
- Il campione di LCR deve essere accompagnato da almeno una provetta di siero;
- **Esame macroscopico:** La prima analisi del liquor prevede una valutazione visiva di colore e aspetto. Il CSF normale è limpido e incolore ed ha una viscosità simile a quella dell'acqua. La torbidità può indicare infezione (numero elevato di globuli bianchi/elevata concentrazione di proteine) e un colore rosso/giallo (xantocromia) suggerisce sanguinamento.



## Analisi del CSF

L'**esame citometrico** consiste nel conteggio delle cellule nucleate (EN) e delle emazie (RBC) presenti nel CSF 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.

# Analisi del CSF

- L'analisi biochimica di base include la determinazione della concentrazione del glucosio (glicorrachia), delle proteine (protidorrachia), dell'albumina e delle immunoglobuline

	Normal value
Glucose	50-80 mg/dL
Chloride	115-130 mEq/L
Lactic acid	9-25 mg/dL
Total proteins	15-45 mg/dL
Cell count	0-5 cell / $\mu$ L

# Glicorrachia

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 CSF e nel siero con il calcolo del rapporto CSF /siero (Qglu).

La concentrazione di glucosio nel CSF è 50-60% dei valori sierici e un  $Q_{glu} < 0,4-0,5$  è considerato patologico

# Lattato

- Il lattato origina dal metabolismo del glucosio in condizioni anaerobiche e viene prodotto dalla normale attività metabolica cerebrale. Non attraversa la BEE;
- la sua concentrazione nel CSF è indipendente dalla concentrazione plasmatica;
- I livelli di lattato nel LCR correlano in maniera inversamente proporzionale ai valori di  $Q_{glu}$ .

## Le proteine liquorali



Il CSF è caratterizzato da una bassa concentrazione proteica, 0,5-1% della concentrazione plasmatica in quanto il passaggio delle proteine viene ostacolato dalla barriera ematoencefalica (BEE).

Un loro aumento può essere dovuto a due cause principali: aumento della frazione proteica che deriva dal sangue ed indica un danno di barriera ematoencefalica

# Protidorrachia



- La concentrazione di proteine totali (**protidorrachia**) e albumina nel CSF dipende principalmente dalla concentrazione proteica sierica e dalla funzionalità della barriera ematoliquorale (BEL) e della BEE.
- Il contenuto proteico del CSF 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.

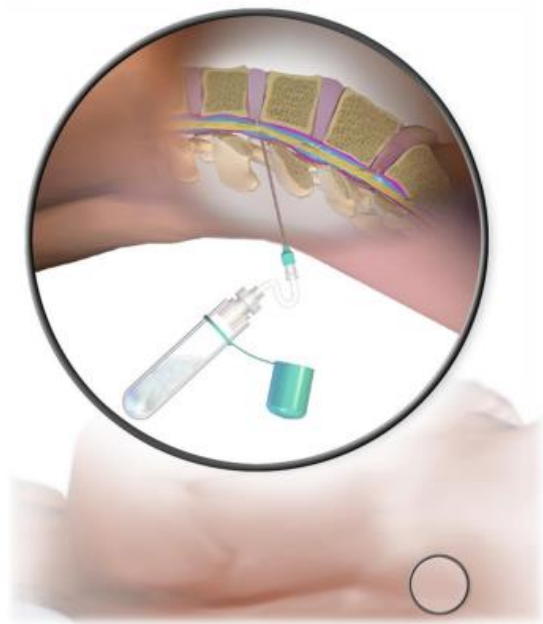
## Quoziente albuminico

- 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.

## Immunoglobuline



- Le immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) presenti nel CSF possono essere di provenienza plasmatica, o essere prodotte a livello intratecale, evidenziando un'attivazione del sistema immunitario a livello del SNC.
- Un incremento della concentrazione di Ig nel CSF può essere ricondotto a varie cause: ipergammaglobulinemia, danno della BEL, alterato flusso liquorale, sintesi intratecale (SI).
- 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.
- .



## Analisi del CSF

- In genere, l'analisi biochimica e la conta cellulare nelle persone con SM appaiono normali o presentano al massimo una lieve pleiocitosi linfomonocitaria;
- Una conta cellulare superiore a circa 50 cellule/ $\mu$ L dovrebbe far sospettare una patologia alternativa del SNC, richiedendo ulteriori accertamenti;
- L'analisi del CSF è quindi rilevante per escludere diagnosi differenziali, soprattutto quando il quadro clinico e i reperti della risonanza magnetica sono atipici.

## Diagnosi di SM

Il test di laboratorio più utilizzato per diagnosticare la SM valuta la presenza di IgG nel liquido cerebrospinale (sintesi intratecale)

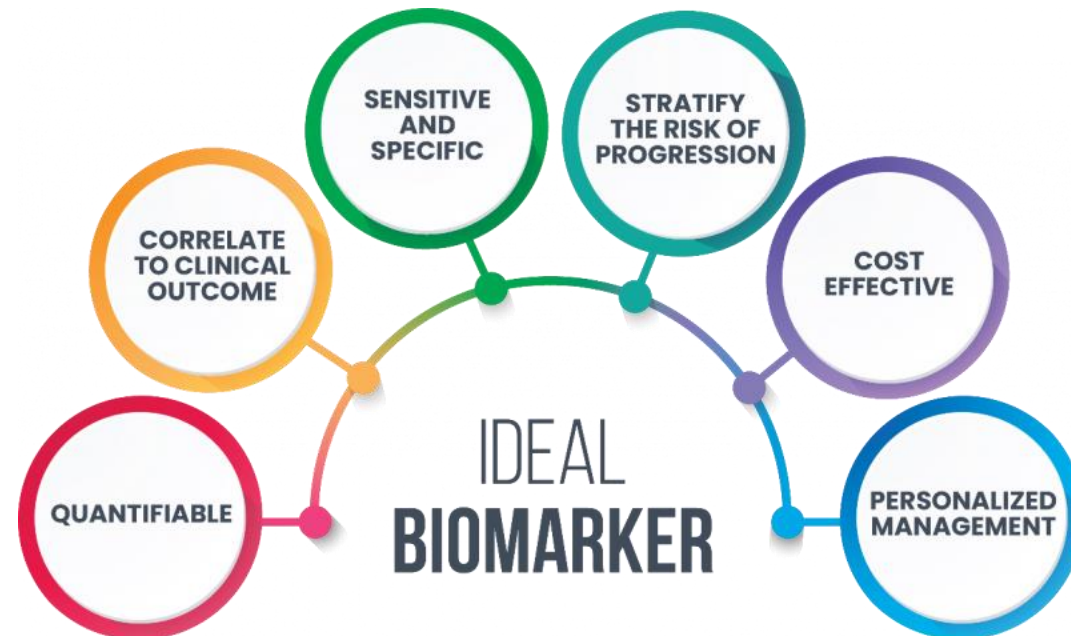
Tuttavia, diversi biomarcatori sierici e del CSF di recente proposta, utili nella diagnosi e nella prognosi della SM, e nei diversi stadi della malattia, sono già utilizzati sperimentalmente.



# Toolbox dei biomarcatori per la SM

## *Definizione di biomarcatore*

- Indicatori misurabili di un processo biologico sottostante che possono aiutare nella diagnosi, progressione, prognosi e risposta al trattamento di una malattia.
- **"In un contesto patologico, i biomarcatori sono tutto ciò che può fornirci informazioni significative sull'endpoint clinico di interesse."**



# Toolbox dei biomarcatori per la SM

- Nell'ultimo decennio, il panorama dei biomarcatori nella SM ha subito una notevole evoluzione.
- Tra i tratti distintivi dell'immunità adattativa, i marcatori che riflettono l'attività delle cellule B si distinguono come le bande oligoclonali prototipiche delle IgM e delle IgG (OCB), le catene leggere libere delle immunoglobuline (FLC) e la chemochina CXCL13.
- I biomarcatori associati all'immunità innata e alle cellule gliali rappresentano una promettente frontiera per i progressi futuri.
- Stanno emergendo biomarcatori indicativi dell'attivazione degli astrociti e della microglia (GFAP, CHI3L1, CHIT1 e sTREM2).
- La catena leggera dei neurofilamenti (NfL) fornisce una chiara rappresentazione dello stato del danno assonale e dell'intensità della malattia.

# Toolbox dei biomarcatori per la SM

- Le IgG OCB e le catene leggere libere delle immunoglobuline (FLC) sono utilizzate per la diagnosi di SM.
- I marcatori mancano di specificità per la SM e non possono essere utilizzati come strumento diagnostico differenziale per discriminare tra SM e altre malattie immunomediate del SNC, come il disturbo dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD), la malattia associata ad anticorpi anti-glicoproteina oligodendrocitaria mielinica, l'encefalomielite acuta disseminata o l'encefalite autoimmune. Essi mostrano il potenziale ruolo nella caratterizzazione molecolare e nel monitoraggio della malattia.

## Danno di barriera

Il parametro con cui si misura la permeabilità della BEE e quindi di un possibile danno della stessa è il quoziente albuminico (QAlb). L'albumina, infatti, sintetizzata esclusivamente a livello epatico deriva solo dal plasma e costituisce circa il 57% delle proteine liquorali

$$\text{QAlb} = \frac{\text{LRC Alb}}{\text{Siero Alb}} \times 100 < 0,7 \text{ (v.n.)}$$

Il valore normale di QAlb è  $< 0,7$  ma può essere aumentato nei soggetti anziani e nei bambini molto piccoli a causa di un fisiologico aumento della permeabilità della BEE (2).

## Sintesi Intratecale

- **Con il termine Sintesi intratecale (SI) ci si riferisce a qualsiasi condizione comporti una sintesi di una determinata proteina a livello del SNC.**
- Molti disturbi del sistema nervoso centrale sono associati ad una maggiore concentrazione di proteine del Fluido Cerebrospinale (CSF) a causa di una maggiore permeabilità della barriera ematico-CSF o alla sintesi di immunoglobuline, principalmente IgG, all'interno del sistema nervoso centrale (SNC).
- La presenza di sintesi IgG intratecale suggerisce malattie infiammatorie del SNC, come la sclerosi multipla (SM).
- Sebbene l'individuazione delle bande monoclonali banda oligoclonale non sia né diagnostica né specifica per la SM, è ampiamente utilizzata come informazione di supporto e considerato un test essenziale dal consensus europeo e dalle linee guida internazionali. Consente di confermare la diagnosi in pazienti con episodi clinici di SM ed è indicativo nei pazienti con pochi episodi o sintomi clinici inconcludenti.

# **Indice IgG e bande oligoclonali IgG del liquido cerebrospinale**

- Oltre il 90% dei pazienti con SM presenta un aumento della produzione intratecale di IgG.
- Può essere misurato quantitativamente attraverso un'aumentata sintesi locale di IgG.
- Può essere rilevato qualitativamente dalla presenza di IgG OCB.

## Rilevamento della sintesi intratecale di IgG

- Sono stati sviluppati diversi approcci metodologici per la rilevazione della sintesi intratecale di IgG.
- Molti studi si sono concentrati su diversi metodi quantitativi per misurare le concentrazioni di IgG nel CSF e nel siero, per poi procedere al calcolo di formule come quella dell'indice IgG.
- Per la determinazione quantitativa si utilizzano gli indici liquorali, IgG index ed equazione iperbolica di Reiber per IgG, IgA e IgM.

# IgG index

È dato dal rapporto tra il quoziente delle IgG (QIgG) e il quoziente albuminico (Qalb)

$QIgG / Qalb$

$QIgG = IgG \text{ Liquor} / IgG \text{ siero}$

$QAlb = Alb \text{ Liquor} / Alb \text{ siero}$

- La sintesi intratecale di IgG nel SNC viene calcolata utilizzando diverse formule che distinguono la componente prodotta nel SNC da quella derivata dal siero.
- La misura più comunemente utilizzata è l'indice di Tibbling e Link (ovvero l'indice IgG), ottenuto dividendo il rapporto tra IgG nel CSF e IgG nel siero per l'albumina nel CSF e l'albumina nel siero.
- Il rapporto tra albumina nel CSF e albumina nel siero è un marcatore consolidato della funzione di barriera sangue-liquido cerebrospinale. L'albumina non viene sintetizzata nel SNC e si può presumere che la sua presenza nel CSF derivi esclusivamente dal siero.
- Il rapporto tra IgG nel CSF e IgG nel siero corregge la concentrazione assoluta di IgG nel siero. Inoltre, le IgG possono migrare dal siero al CSF, con una concentrazione media circa 500 volte inferiore nel liquido cerebrospinale rispetto al siero.

# IgG index

$$\text{Indice IgG} = \frac{\text{LRC IgG / Siero IgG}}{\text{LRC Alb / Siero Alb}} < 0,7 \text{ (v.n.)}$$

- È una funzione lineare ed un suo incremento è riscontrabile nel 70-90% dei pazienti con SM, anche se tale alterazione non è specifica della malattia.
- Un valore superiore a 0,7 indica l'esistenza di un aumento della sintesi intratecale di IgG ed è considerato patologico.
- L'indice IgG è stato incorporato nelle versioni precedenti dei criteri diagnostici di McDonald per la SM, ma il suo utilizzo come strumento diagnostico è limitato a causa della bassa sensibilità.
- Sebbene sia stata documentata un'associazione tra l'indice IgG e il futuro peggioramento della disabilità, la sua correlazione con la gravità della SM rimane inconcludente. Di conseguenza, la sua utilità come indicatore prognostico è alquanto limitata.

## Formule di Reiber

- Le formule di Reiber considerano la relazione tra i quozienti di concentrazione liquorale-siero delle tre immunoglobuline, IgG, IgA e IgM, e l'aumento del rapporto albumina in modo non lineare con il progressivo deterioramento della barriera emato-encefalica. In presenza di tale danno, questa formula produce meno risultati falsi positivi rispetto all'indice IgG.

Differential diagnostic question **Inflammatory process?** Punct. date: 6 / 5 / 99  
Physician:

Puncture (LP) CP VP Visual inspection (turbid, xanth., bloody, artif. bl.) Hgb (0, +, ++, +++), Vol. (6 mL), TP (Pandy) (0, +, ++)

**Cells**

Cellcount	3	/mm <sup>3</sup>	RBC	/mm <sup>3</sup>
Lymphoc.	80 %	Mononucl.c.	20 %	PMNR (n.) %
				Plasmac. few

**Other Cells**

Activ. B-Cells	% of Lymphocytes
----------------	------------------

**Proteins**

	CSF	Serum	Q(CSF/Ser) · 10 <sup>3</sup>	Intrathec. fraction
Tot. Prot.	270 mg/L			
Albumin	111 mg/L	41.4 g/L	Q <sub>Alb</sub> = 2.7	
IgG	56 mg/L	8.8 g/L	Q <sub>IgG</sub> = 6.3	73 %
IgA	1.9 mg/L	2.2 g/L	Q <sub>IgA</sub> = 0.9	%
IgM	2.1 mg/L	2.0 g/L	Q <sub>IgM</sub> = 1.0	56 %

**Oligoclonal IgG – Bands in CSF (Type 2)**

**Specific Antibodies**

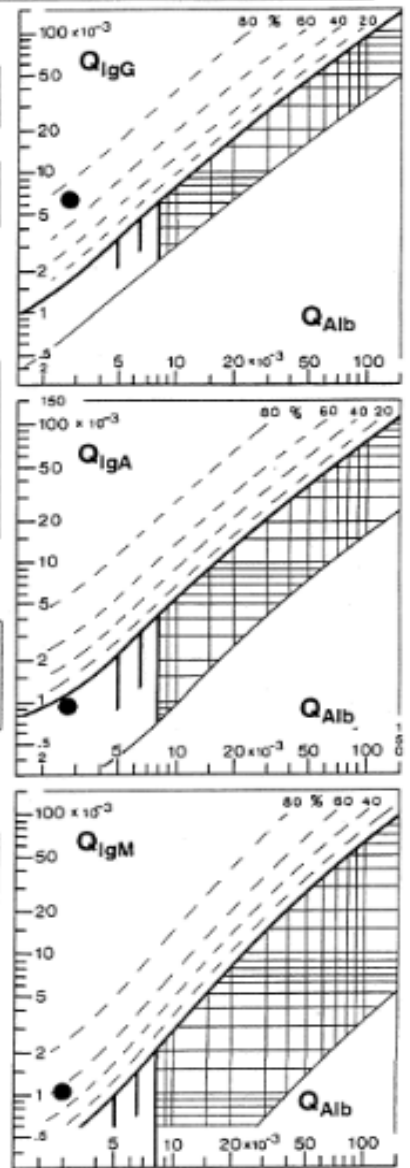
Measles-AI = 9.2	HIV-AI =	Borrel.-AI(IgG) =
Rubella-AI = 12.3	CMV-AI =	Borrel.-AI (IgM) =
VZV-AI = 8.1	Toxopl.-AI =	.....-AI =
HSV-AI = 1.0	.....-AI =	.....-AI =

**Lactate** 1.6 mmol/L CSF

**Interpretation**

Normal CSF	<input type="checkbox"/>	Normal CSF proteins	<input type="checkbox"/>
B-CSF Barrier dysfunction	<input type="checkbox"/>	Cellcount increased	<input type="checkbox"/>
Inflammatory proc. in CNS	<input checked="" type="checkbox"/>	Spec. Ab-Synthesis in CNS	<input checked="" type="checkbox"/>

**Comment:**  
Chronic inflammatory process. DD: Multiple sclerosis or autoimmune disease with involvement of CNS



# Reibergrams

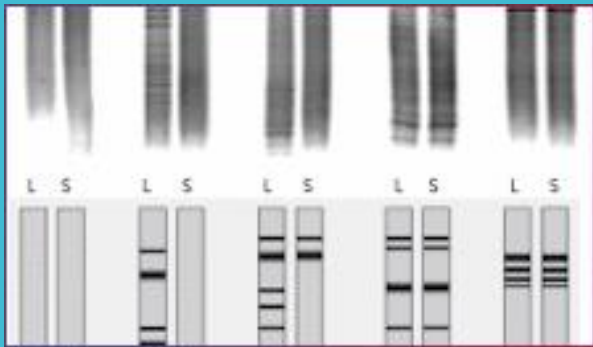
Queste rappresentazioni grafiche mostrano la concentrazione di IgG, IgA e IgM nel liquido cerebrospinale in rapporto alla corrispondente concentrazione nel siero, tenendo conto della disfunzione della barriera emato-liquorale. I reibergrammi presentano vari intervalli, da normale a sintesi intratecale di Ig con o senza disfunzione della barriera emato-liquorale.

# Biomarcatori e procedure attuali in ambito clinico

## *Applicazione delle bande oligoclonali (OCB)*

- L'importanza dello studio delle bande oligoclonali (OCB) risale alla metà del secolo scorso, quando uno studio ha messo in evidenza che l'80% dei pazienti con SM presentava elevati livelli di gammaglobuline nel liquido cerebrospinale.
- È stata osservata una correlazione positiva tra il livello di IgG nelle placche demielinizzanti e nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM, ipotizzando così una sintesi locale di IgG nel SNC dei pazienti con SM e la designazione di queste specifiche bande di IgG come OCB.

# Bande oligoclonali

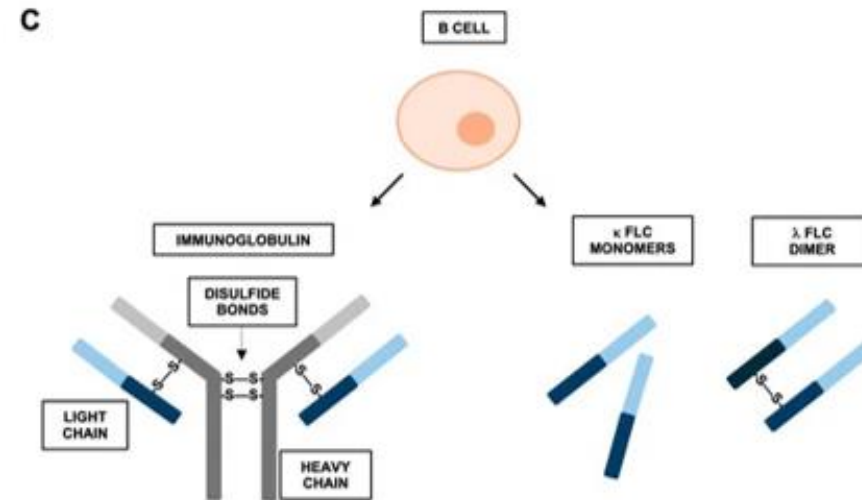


Il termine «bande oligoclonali» si riferisce alla presenza di immunoglobuline G (IgG) ristretta al compartimento intratecale, poiché la sintesi di immunoglobuline IgG è effettuata da diversi cloni di cellule B attivati principalmente nel SNC.

Il 95% dei pazienti con SM presenta OCB.

Pattern oligoclonale specifico.

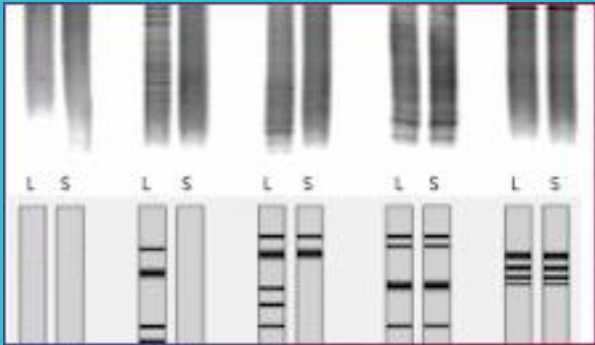
Non sono stati identificati antigeni specifici → risposta immunitaria secondaria alla diffusione dell'epitopo.



## Intrathecal IgG oligoclonal band (OCB)

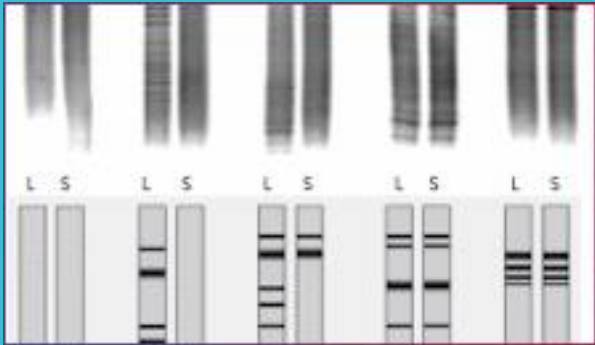
- La rilevazione delle bande oligoclonali intratecali delle IgG (OCB) mediante focalizzazione isoelettrica (IEF) seguita da immunoblotting rappresenta l'attuale gold standard per la diagnosi di sclerosi multipla.
- L'IEF ha migliorato la risoluzione della separazione proteica in base al diverso punto isoelettrico;
- I metodi di immunorilevazione (immunofissazione o immunoblotting) hanno permesso di aumentare la sensibilità e la specificità della rilevazione delle OCB.
- Sono analizzati sia i campioni di liquido cerebrospinale che quelli di siero di ciascun paziente.
- La rilevazione di bande di IgG (OCB) nel liquido cerebrospinale e non nel siero implica una sintesi intratecale di IgG.
- La presenza di due o più bande di IgG nel liquido cerebrospinale che non si riscontrano nel siero è considerata indicativa di sintesi intratecale di IgG. È possibile identificare un pattern oligoclonale per bande specifiche.

# OCB



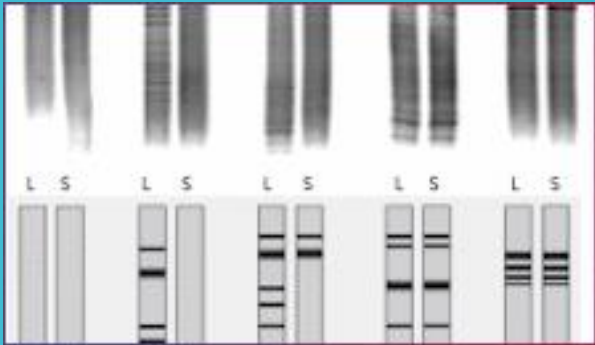
- Il pattern di OCB rimane costante nello stesso individuo e non è influenzato dal trattamento con corticosteroidi.
- La presenza di OCB mostra un'elevata sensibilità e la sua assenza mostra un elevato valore predittivo negativo per la SM.
- Tuttavia, un risultato negativo non esclude la SM.
- L'identificazione di IgG OCB al primo episodio clinico di SM, ovvero la sindrome clinicamente isolata, è stata associata a una maggiore probabilità (odds ratio di 9,88) di futura conversione a SM e a una maggiore probabilità (odds ratio di 1,96) di raggiungere esiti di disabilità.
- A causa di questo chiaro effetto prognostico, la presenza di sintesi intratecale di IgG documentata da OCB offre un'alternativa all'evidenza di disseminazione nel tempo nei criteri diagnostici della SM del 2017.

# OCB



- I limiti principali degli OCB includono la loro mancanza di specificità, poiché possono presentarsi anche in altre patologie neurologiche infiammatorie o infettive.
- La positività intratecale delle immunoglobuline può essere osservata anche in malattie neuroinfiammatorie del SNC diverse dalla SM, come neurite ottica, encefalite autoimmune, neurosarcoidosi, neuromielite ottica (NMO) e malattia da anticorpi anti-glicoproteina oligodendrocitaria mielinica (MOG), e può essere dovuta a diversi meccanismi, tra cui l'alterata permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE), la sintesi intratecale di immunoglobuline o una combinazione di entrambi.
- È importante distinguere la sintesi intratecale di immunoglobuline da quelle che entrano nel liquido cerebrospinale dal sangue attraverso la BEE. Infatti, durante i processi infiammatori, le cellule B possono migrare nel SNC e produrre immunoglobuline che si aggiungono a quelle appena sintetizzate.
- Il rilevamento dell'OCB (non specifico della malattia) dovrebbe essere valutato insieme ad altri fenotipi clinici della malattia

# OCB



- Dal punto di vista tecnico, la rilevazione delle OCB è complessa, presentando diverse criticità metodologiche.
- È tecnicamente laborioso, richiede molto tempo, è costoso e dipende dall'esaminatore.
- Richiede un'interpretazione corretta da parte di operatori specializzati, il che ne limita l'uso a centri specializzati, mancando di obiettività e standardizzazione; la standardizzazione del metodo è difficile considerando che l'IEF è una procedura complessa e articolata, con diverse variabili che influenzano i risultati e costi elevati.
- Questo test ha un'elevata sensibilità e specificità di circa il 90%; tuttavia, consente solo un'analisi qualitativa della sintesi intratecale di IgG.

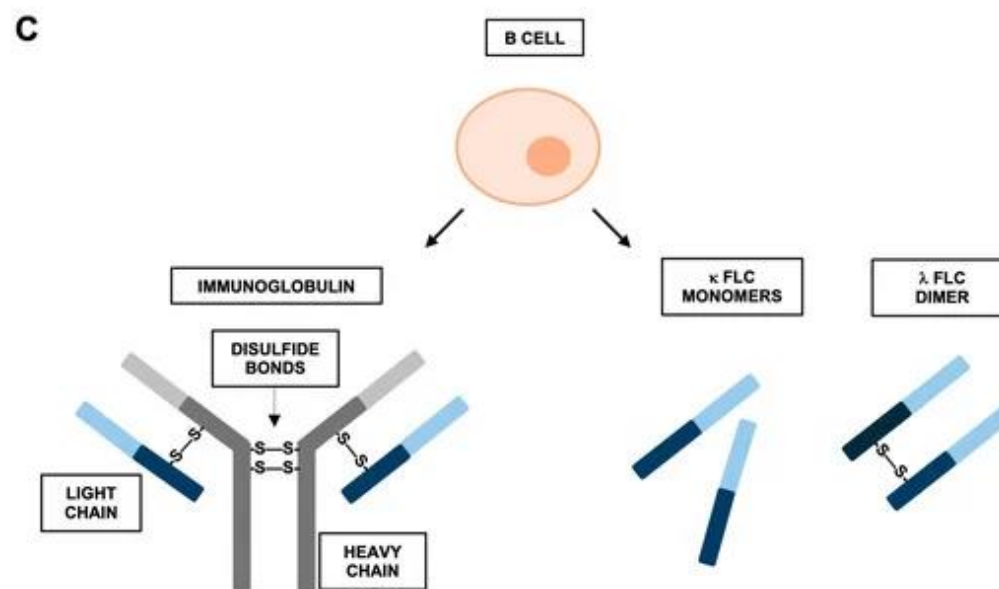
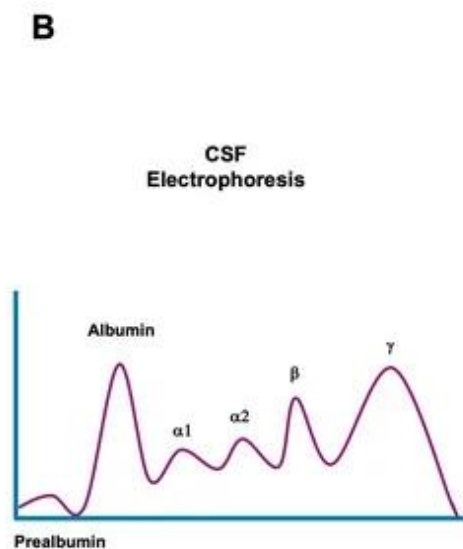
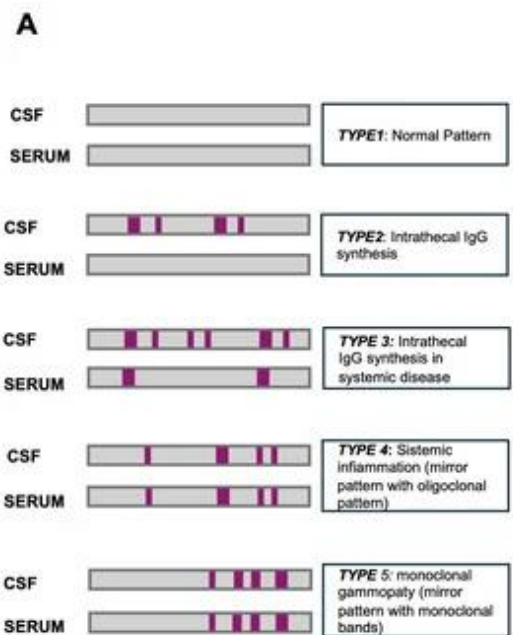
## Analisi qualitativa

Prima di eseguire l'analisi qualitativa, è **obbligatorio** quantificare le IgG presenti in entrambi i liquidi biologici (CSF e siero) al fine di analizzare la stessa concentrazione di IgG.

Ciò consente una confrontabilità ottimale all'interno della coppia siero-liquor, tra coppie differenti e con i controlli positivo e negativo.

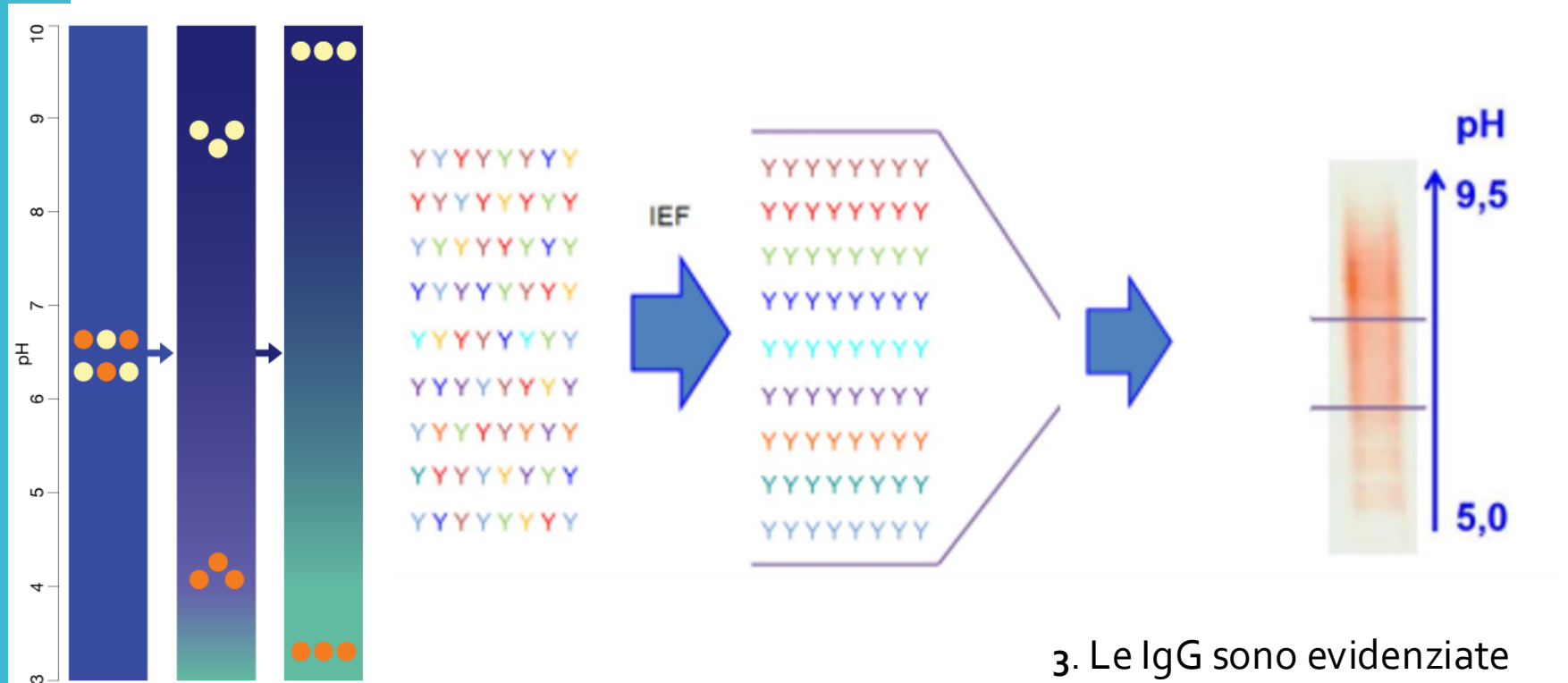
# Tecnica di rilevamento delle OCB

La tecnica più sensibile e specifica per il rilevamento delle OCB è l'immunolettrofocusing (IEF) seguita da rilevazione immunologica con anticorpo anti IgG (immunoblotting o immunofissazione) coniugato con enzima.



# Tecnica di rilevamento delle OCB

- Il siero e i campioni di CSF del paziente vengono analizzati in parallelo (in corsie adiacenti) per confrontare la distribuzione delle IgG.



1. Mediante focalizzazione isoelettrica (IEF) delle IgG, le proteine del CSF e del siero vengono separate su gel di agarosio addizionato di opportuna miscela di anfolti, necessaria per generare un gradiente di pH. Le proteine cariche si spostano fino al punto in cui la loro carica elettrica netta è neutra, noto come punto isoelettrico (pI) delle proteine.

2. Dopo la separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico, il gel viene incubato con un antisiero anti-IgG coniugato con perossidasi.

3. Le IgG sono evidenziate mediante una reazione antigene/anticorpo con la soluzione di anticorpo anti-IgG umana direttamente coniugato a perossidasi

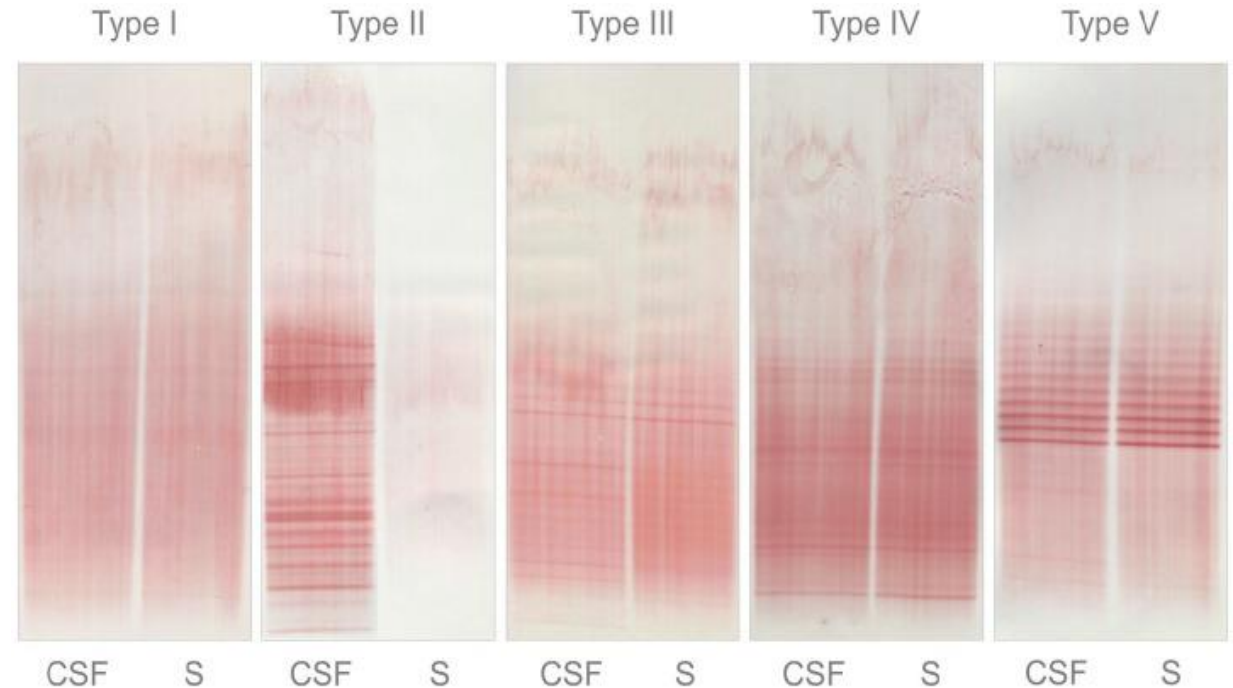
•4. il gel viene valutato visivamente.

- La migrazione, l'immunofissazione e il rilevamento diretto su gel di agarosio vengono eseguiti al fine di ottenere profili IgG per l'analisi qualitativa.
- Quando si sottopongono siero e liquor dello stesso paziente a IEF, l'eventuale produzione di di IgG è rilevata da una o più bande oligoclonali (OCB).
- L'eventuale differenza tra il numero di bande evidenziate sul siero e sul liquor indica se il paziente presenta un danno di barriera o se è in atto una sintesi intratecale di IgG.

# Pattern delle OCB IgG

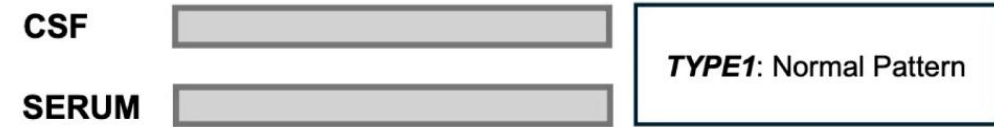
Dal confronto dell'analisi effettuata in parallelo di CSF e siero ci si possono attendere 5 profili:

- **Tipo I** Nessuna banda nel liquido cerebrospinale e nel siero.
- **OCB di tipo II** presenti nel liquido cerebrospinale senza bande corrispondenti nel siero.
- **OCB di tipo III** presenti sia nel liquido cerebrospinale che nel siero, con bande aggiuntive presenti nel liquido cerebrospinale.
- **OCB di tipo IV** presenti nel liquido cerebrospinale, identiche a quelle nel siero ("pattern a specchio" con pattern oligoclonale).
- **Bande di tipo V** presenti nel liquido cerebrospinale, identiche a quelle nel siero ("pattern a specchio" con bande monoclonali).
- **Liquido cerebrospinale:** liquido cerebrospinale;  
**OCB:** bande oligoclonali; **S:** siero.



# Pattern delle OCB IgG

Il profili 2 e 3 sono considerati positivi mentre i profili 1, 4 e 5 sono negativi per sintesi intratecale, che viene definita dalla presenza di almeno 2 OCB esclusivamente liquorali.



- 
- Healthy people
  - Neurological disease without inflammation
  - CNS Inflammatory diseases (MS)

- 
- CNS inflammatory diseases (especially MS)
  - Autoimmune, infective, neoplastic, degenerative disorders (neurosarcoidosis, neurosyphilis, lymphoma)

- 
- CNS inflammatory processes
  - Systemic immune response

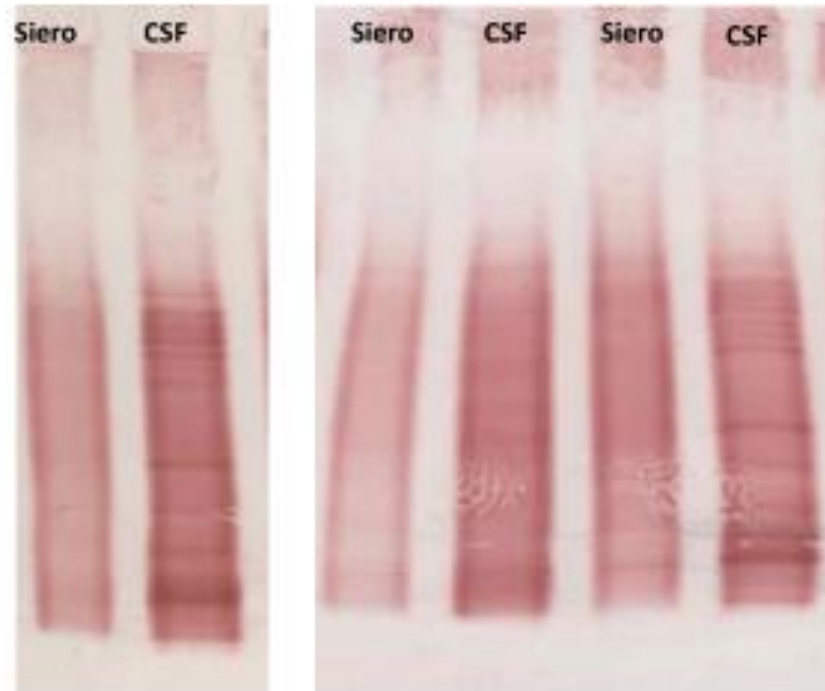
- 
- Systemic inflammatory processes with or without CNS involvement (OCBs originates by systemic circulation) → Guillain-Barrè syndrome, CIDP, peripheral neuropathy, LES, Behcet, autoimmune encephalitis

- 
- Monoclonal gammopathy (POEMS)



## Profilo MS

- La sintesi intratecale di OCB è essenzialmente definita come la presenza di bande solo nel liquido cerebrospinale o, in alternativa, come la presenza di bande sia nel siero che nel liquido cerebrospinale con bande aggiuntive nel campione di liquido cerebrospinale



- 
- Le principali raccomandazioni del Consensus Europeo per la diagnosi della sclerosi multipla sono:
- Isoelettrofocalizzazione (IEF) su gel di agarosio per la separazione delle immunoglobuline
- Utilizzo del campione di CSF non concentrato
- Analisi simultanea di siero e CSF del paziente
- identica concentrazione di IgG nelle coppie di campioni CSF-siero.

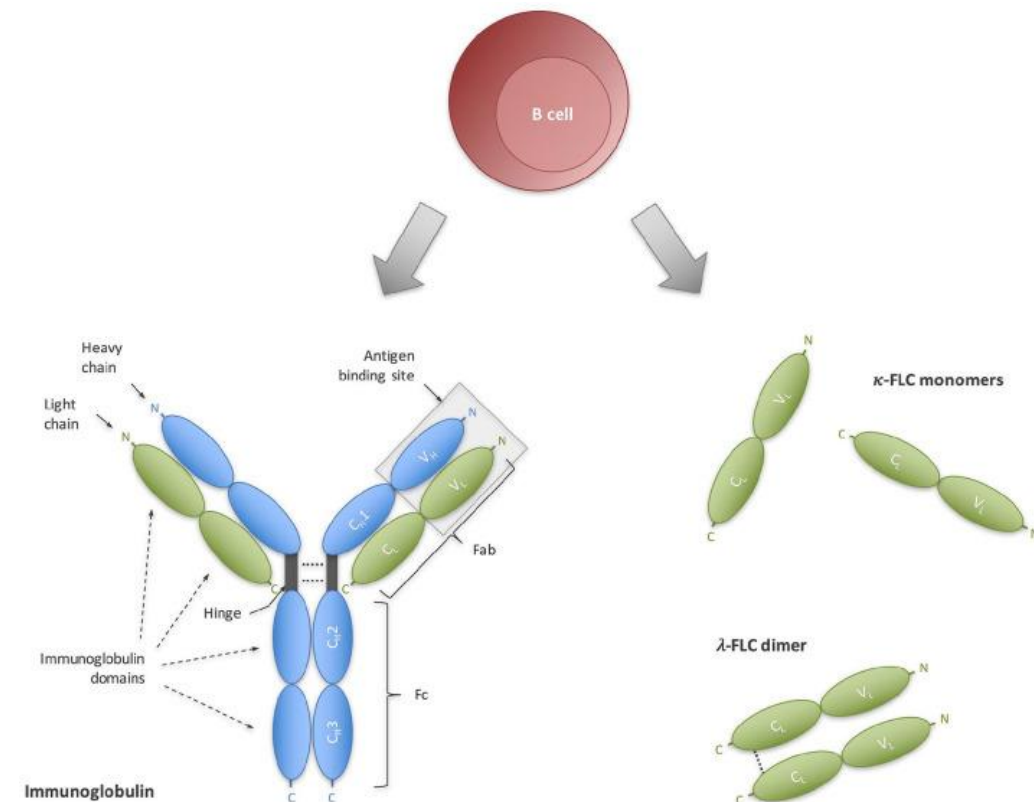
# Free Light Chain (FLC)

Durante la sintesi degli anticorpi, i linfociti B producono immunoglobuline intatte con catene leggere e pesanti legate tra loro tramite ponti disolfuro e interazioni non covalenti, e anche catene leggere libere (FLC) in eccesso rispetto alle catene pesanti, e le secernono nella circolazione sanguigna.

Queste FLC sono costituite da due domini immunoglobulinici, una regione costante che specifica gli isotipi delle catene leggere libere ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) e un dominio variabile;

Le  $\kappa$ FLC esistono principalmente come monomeri, mentre le  $\lambda$ FLC sono presenti come dimeri covalenti.

Sebbene la loro funzione non sia stata ancora completamente chiarita, è ampiamente riconosciuto che un aumento di entrambe le FLC ( $\kappa$  e  $\lambda$ ) può essere riscontrato nei pazienti con malattie sistemiche infiammatorie e autoimmuni, inclusa la SM.



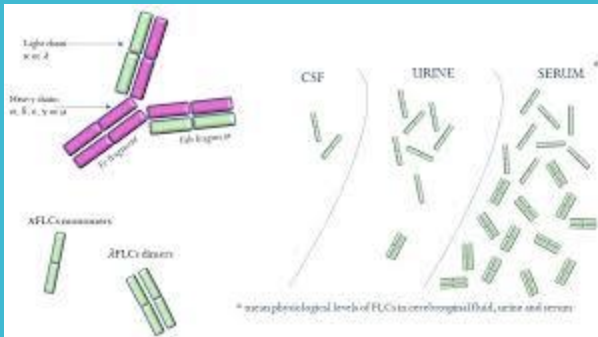
Immunoglobuline intatte con catene leggere e pesanti legate tra loro tramite ponti disolfuro e interazioni non covalenti

Catene leggere libere in eccesso (10-40%) rispetto alle catene pesanti

Monomeri K-FLC

Dimeri L-FLC

# Free Light Chain (FLC)



Diversi studi hanno proposto il loro possibile utilizzo come biomarcatori per l'attività intratecale delle cellule B nei pazienti con SM, principalmente per sostituire le immunoglobuline, in particolare per quei pazienti con segni e sintomi suggestivi di un evento demielinizzante ma senza una chiara banda IgG.

## Free Light Chain (FLC)

- È generalmente riconosciuto che i valori sia delle  $\kappa$ FLC che delle  $\lambda$ FLC aumentano nel liquido cerebrospinale dei pazienti con SM rispetto ai pazienti con malattie neurologiche non infiammatorie.
- Tuttavia, l'aumento relativo delle  $\lambda$ FLC è risultato inferiore a quello delle  $\kappa$ FLC.
- Inoltre, uno studio precedente ha riportato che i pazienti con SM presentavano livelli di  $\kappa$ FLC più elevati, ma livelli di  $\lambda$ FLC simili rispetto ai pazienti con malattie infettive del SNC, suggerendo quindi che livelli elevati di  $\lambda$ FLC potrebbero essere considerati un potenziale marcatore di infezione piuttosto che di SM.
- Ancora più recentemente, non è stato possibile ottenere dati affidabili per l'indice  $\lambda$ , poiché le  $\lambda$ FLC erano spesso al di sotto del limite di rilevamento e pertanto non potevano costituire un test valido per la diagnosi di CIS/SM.
- Le  $\kappa$ FLC mostrano una migliore correlazione nella diagnosi di SM e il loro indice ha una sensibilità e una specificità maggiori rispetto alle  $\lambda$ FLC.

# Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

- Per quanto riguarda le IgG, è essenziale determinare la quantità di frazione di  $\kappa$ FLC sintetizzata localmente nel liquido cerebrospinale.
- Pertanto, l'approccio più comune è stato l'implementazione della determinazione intratecale delle  $\kappa$ FLC con la permeabilità della BBB.
- Viene valutato l'indice  $\kappa$ FLC = ( $\kappa$ FLC\_CSF/ $\kappa$ FLC\_Siero/Qalb).
- L'indice  $\kappa$ FLC è il rapporto tra i livelli di  $\kappa$ FLC nel liquido cerebrospinale e nel siero, considerando la permeabilità alterata della BBB attraverso il quoziente CSF/albumina sierica (Qalb).

## Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

- La logica alla base dell'utilizzo delle concentrazioni assolute di  $\kappa$ FLC nel liquido cerebrospinale era che il contributo delle FLC derivate dal sangue alla concentrazione totale è molto basso in condizioni patologiche con sintesi intratecale; infatti, la frazione di  $\kappa$ FLC intratecale è superiore all'80% nella maggior parte dei pazienti con SM.
- Tuttavia, l'impatto dei livelli sierici di  $\kappa$ FLC e del Qalb potrebbe essere significativo nei pazienti con una produzione di  $\kappa$ FLC intratecale bassa o modesta.
- Inoltre, è ormai chiaro che possono verificarsi anche alcuni fattori confondenti, come livelli sierici elevati di FLC o un elevato grado di disfunzione della barriera emato-encefalica.
- Uno studio ha riportato diversi valori dell'indice  $\kappa$ FLC tra i pazienti con SM convertita e quelli senza conversione, mentre le concentrazioni assolute di  $\kappa$ FLC nel liquido cerebrospinale erano simili tra i gruppi, evidenziando così l'importanza di determinare la sintesi di  $\kappa$ FLC intratecale calcolando l'indice  $\kappa$ FLC.
- È importante notare che tutti i parametri menzionati hanno dimostrato un'accuratezza diagnostica per la diagnosi di SM simile o superiore alla presenza di OCB, anche nella previsione di malattie infiammatorie o infettive del sistema nervoso centrale.
- In una recente meta-analisi, sono state considerate diverse misure di  $\kappa$ FLC e confrontate con i risultati di rilevamento di OCB, sebbene sia stata riscontrata una potenza statisticamente sufficiente solo per l'indice  $\kappa$ FLC, rendendo impossibile dimostrare il potenziale utilizzo delle altre misure.
- In ogni caso, tutti gli approcci sono stati in grado di determinare la presenza della sintesi intratecale di  $\kappa$ FLC quando queste erano elevate, mentre l'indice  $\kappa$ FLC ha mantenuto elevate prestazioni diagnostiche anche in caso di valori bassi e borderline.

## Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

- Prove sempre più numerose suggeriscono che le FLC abbiano anche un valore prognostico.
- Infatti, la sintesi intratecale di  $\kappa$ FLC è associata alla conversione da CIS a SM clinicamente definita, e l'indice  $\kappa$ FLC può predire il tempo di conversione a SM e la progressione della disabilità.
- Tuttavia, non è ancora chiaro se questo valore prognostico rimanga valido anche dopo aver aggiustato per altri fattori prognostici attraverso un approccio multivariato.
- Questo problema è stato recentemente messo in discussione in uno studio su 88 pazienti con un primo evento demielinizzante del SNC, seguiti per un periodo di 4 anni. In questo studio, un'analisi multivariata eseguita dopo il primo evento demielinizzante ha rivelato un aumento dell'indice  $\kappa$ FLC di 10, indicando un aumento del rischio di un secondo attacco clinico, e la sua probabilità entro 12 mesi nei pazienti con un indice  $\kappa$ FLC elevato era maggiore rispetto ai pazienti con un indice  $\kappa$ FLC basso.
- Questi risultati sono di grande valore per la pratica clinica poiché potrebbero fornire un biomarcatore affidabile per identificare i pazienti con SM in fase iniziale e con un rischio più elevato di ulteriore attività della malattia, che potrebbero trarre beneficio dall'uso di terapie altamente efficaci.

## Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

- Deve ancora essere definito un approccio migliore per misurare la sintesi di  $\kappa$ FLC intratecali.
- Infatti, fino ad oggi, la maggior parte degli studi ha utilizzato la concentrazione assoluta di  $\kappa$ FLC nel liquido cerebrospinale, il quoziente  $\kappa$ FLC (Q- $\kappa$ FLC:  $\kappa$ FLC nel liquido cerebrospinale/ $\kappa$ FLC sierica) o l'indice  $\kappa$ FLC (come definito sopra).
- Inoltre, sono stati proposti ulteriori algoritmi, attualmente in fase di studio.
- Questi metodi calcolano la frazione di  $\kappa$ FLC intratecale (IF\_ $\kappa$ FLC) attraverso diverse formule che determinano il limite di riferimento superiore predefinito dipendente da QAlb.
- Tra questi, il più raccomandato è il diagramma di Reiber, poiché si basa sulla fisiopatologia e ha una bassa influenza da fattori preanalitici, oltre che per le sue eccezionali prestazioni di accuratezza.

## Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

**Table 1.** Parameters/algorithms for  $\kappa$ FLC measurement.

Parameter/Algorithm Used for $\kappa$ FLC Measurement	Formula
CSF $\kappa$ FLC concentration	Absolute concentration
$\kappa$ FLC quotient (Q- $\kappa$ FLC)	CSF $\kappa$ FLC/serum $\kappa$ FLC
$\kappa$ FLC index	Q $\kappa$ FLC/QAlb
* Presslauer's formula [49]	QLim-FLC = $0.9358 \times \text{QAlb}^{0.6687}$
* Hegen formula [50]	QLim-FLC = $3.1276 \times \text{QAlb}^{0.8001}$
* Reiber's formula [51]	QLim-FLC = $3.27 (\text{QAlb}^2 + 33)^{0.5} - 8.2 \times 10^{-3}$
* Senel's formula [52]	QLim-FLC = $14.85 + 2.41 \times \text{QAlb}$

QAlb: CSF/serum albumin quotient. \* These methods calculate the intrathecal fraction through different formulae determining the QAlb-dependent upper reference limit.

## Catene leggere libere delle immunoglobuline K del liquido cerebrospinale

- La determinazione della frazione intratecale di catene leggere libere kappa ( $\kappa$ -FLC) nel liquido cerebrospinale può superare alcuni dei limiti dell'indice IgG e dell'OCB IgG.
- La  $\kappa$ -FLC può essere facilmente misurata mediante nefelometria o turbidimetria, metodi automatizzati, meno costosi e meno dispendiosi in termini di tempo rispetto alla rilevazione dell'OCB nel liquido cerebrospinale.
- La lettura è quantitativa e non dipende dall'operatore.
- Una recente revisione sistematica e una meta-analisi hanno indicato che un indice  $\kappa$ -FLC elevato ha una sensibilità e specificità diagnostica di circa il 90% per differenziare i pazienti con SM da quelli con altre patologie neurologiche, in modo simile all'OCB.
- Inoltre, l'indice  $\kappa$ -FLC produce un risultato numerico compreso tra circa 1 e 500, discostandosi dalla natura binaria dello stato dell'OCB, che indica semplicemente un esito positivo o negativo. Gli ultimi criteri di McDonald aggiungono il rilevamento della sintesi intratecale di  $\kappa$ -FLC nel processo diagnostico della SM.
- L'OCB indica esclusivamente la sintesi intratecale di IgG, mentre l'indice  $\kappa$ -FLC è elevato anche in caso di sintesi intratecale di IgA e/o IgM.
- Diversi studi hanno dimostrato un valore prognostico dell'indice  $\kappa$ -FLC nelle fasi precoci della SM.
- Analisi multivariate che hanno incluso pazienti con un primo evento demielinizzante tipico del SNC hanno dimostrato che un elevato indice  $\kappa$ -FLC può predire una recidiva precoce indipendentemente da altri fattori di rischio noti, come il carico lesionale basale alla risonanza magnetica.
- L'indice  $\kappa$ -FLC consente un'ulteriore stratificazione del rischio di attività di malattia della SM nei pazienti OCB positivi.

Comparison of CSF-restricted OCB and intrathecal  $\kappa$ -FLC synthesis for diagnosis of MS.

**$\kappa$ -FLC synthesis** (e.g.  $\kappa$ -FLC index) reflects intrathecal IgG synthesis, but also IgA and IgM synthesis

PROs

- High diagnostic sensitivity and specificity
- High stability in CSF and serum
- Robustness (e.g., blood contamination)
- Easy and fast method
- Labour- and cost-effective
- Quantitative result
- Interpretation of results is rater-independent

CONTRA

- Does not differentiate between IgG clonality and distinct IgG synthesis patterns

**Oligoclonal bands** detect intrathecal IgG synthesis

PROs

- High diagnostic sensitivity and specificity
- High stability in CSF and serum
- Robustness
- Detection of IgG clonality in CSF and serum compartments (poly-, oligo-, monoclonal)
- Differentiation of 2 distinct patterns of intrathecal IgG synthesis

CONTRA

- Time-consuming and technically demanding method
- Labour-intensive and costly
- Qualitative result (i.e. either positive or negative)
- Interpretation of results is rater-dependent

CSF: cerebrospinal fluid; FLC: free light chain; Ig: immunoglobulin; OCB: oligoclonal bands.

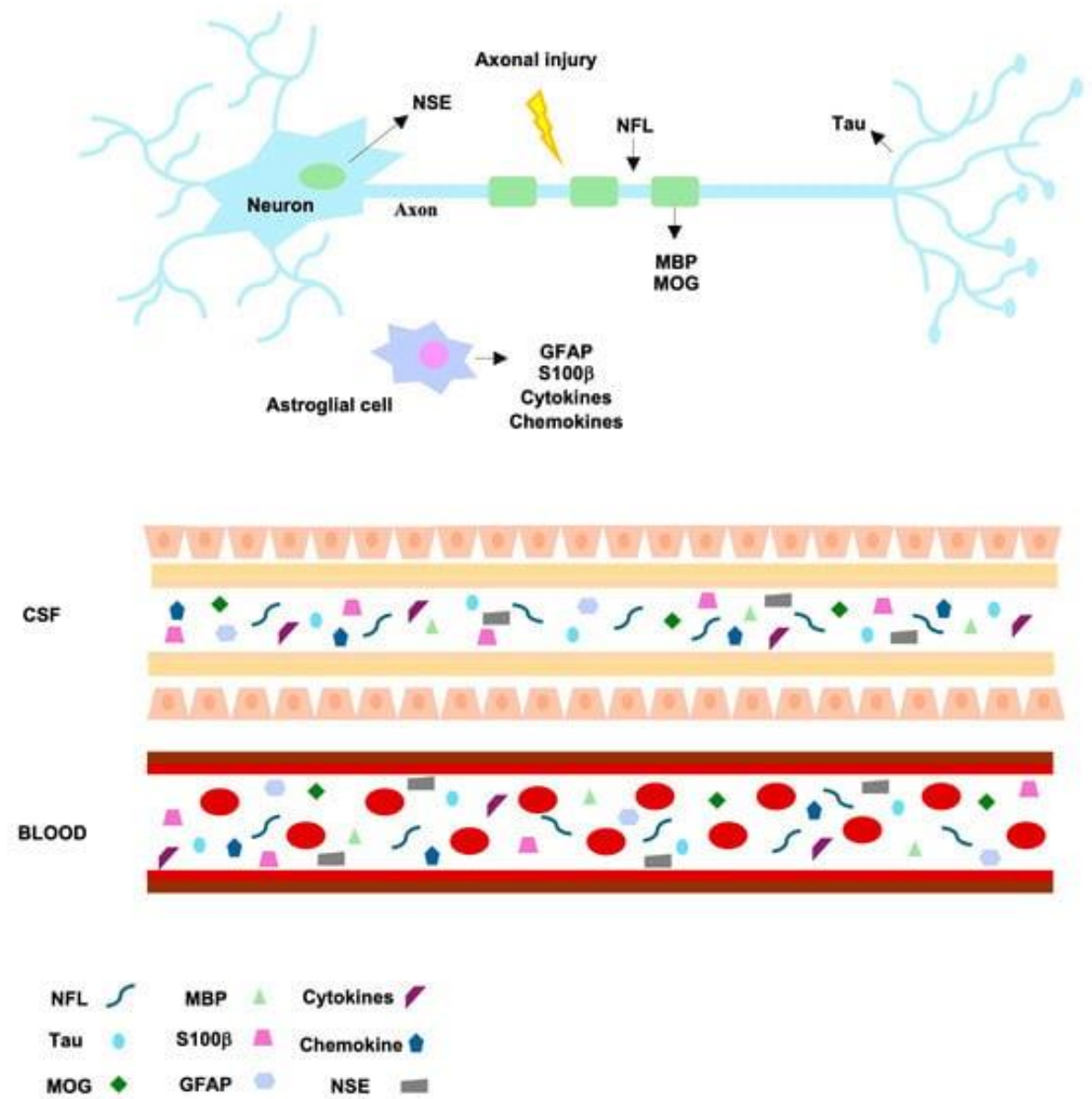
# Algoritmo reflex proposto



FLC: free light chain; MS: multiple sclerosis; OCB: oligoclonal bands.

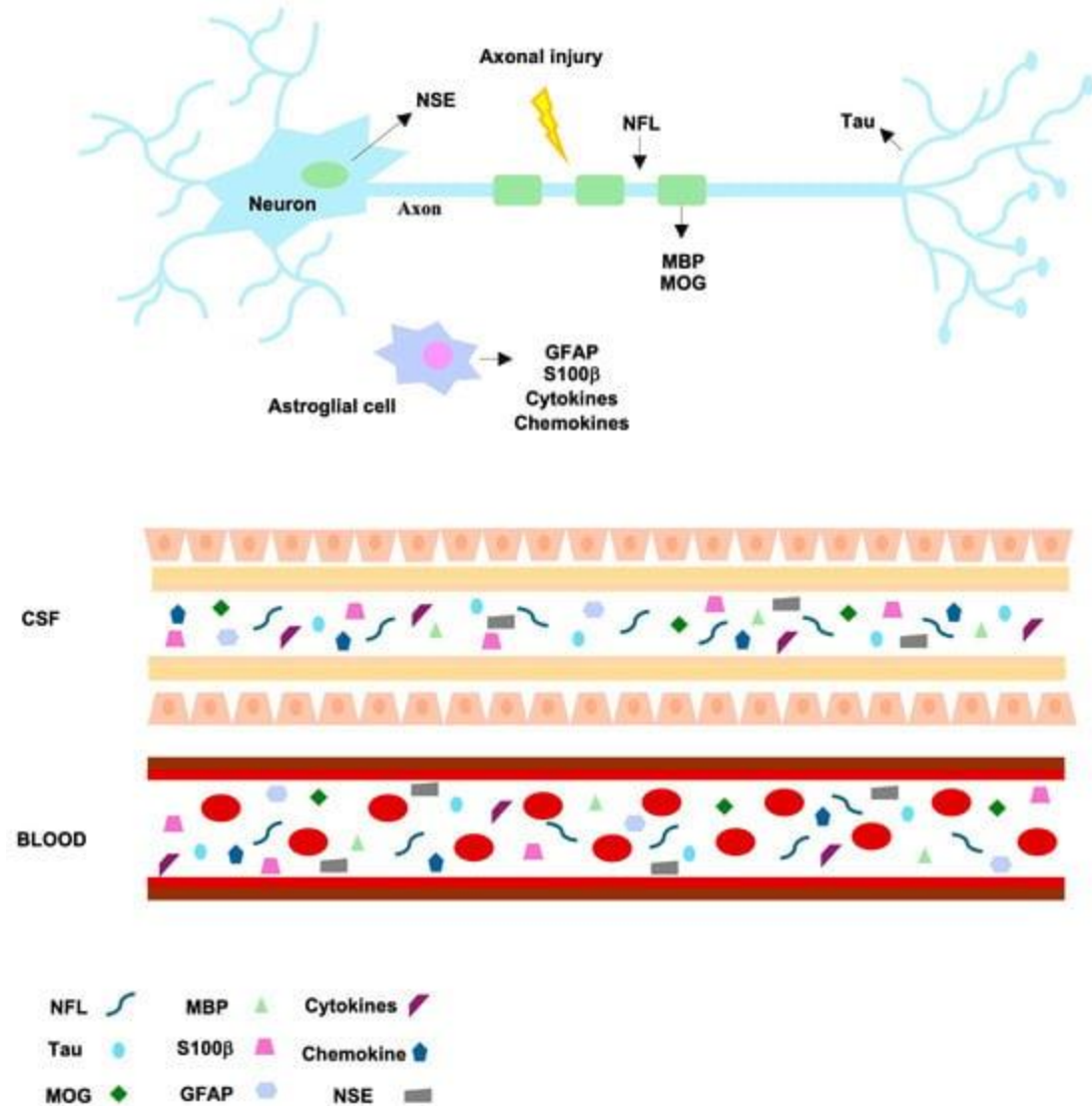
# La ricerca di nuovi potenziali biomarcatori di SM

- La SM presenta un decorso estremamente variabile che va da sintomi reversibili a disabilità permanente;
- Il trattamento terapeutico precoce può influenzarne significativamente la progressione, sebbene con potenziali effetti collaterali.
- Pertanto, l'identificazione precoce di biomarcatori diagnostici e prognostici è fondamentale per fornire trattamenti personalizzati e adeguati.
- Attualmente, sono in fase di studio diversi biomarcatori candidati per la SM che potrebbero essere utilizzati nel prossimo futuro per predire, diagnosticare e monitorare la risposta ai trattamenti terapeutici.
- Tali biomarcatori sono coinvolti in vari processi patologici come la demielinizzazione, la disfunzione gliale, il danno assonale e neuronale e la pro-infiammazione.



# Nuovi biomarcatori di MS

- In neurologia, molti test diagnostici sono piuttosto insensibili e spesso influenzati da altre variabili fisiologiche.
- Lo sviluppo di tecnologie ultrasensibili per il rilevamento di biomarcatori ha rappresentato un'innovazione rivoluzionaria che ha permesso la rilevazione di una serie di biomarcatori proteici nel sangue, come la catena leggera dei neurofilamenti (NfL), la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), la proteina tau fosforilata (pTau) e l'apolipoproteina E (ApoE).



# SM e danno assonale

Molti degli eventi patofisiologici che si verificano nel cervello e nel midollo spinale dei pazienti con SM durante il decorso della malattia (infiammazione focale ricorrente, attivazione diffusa delle cellule gliali, formazione di infiltrati meningei e lesioni in lenta espansione) portano fin dalle fasi iniziali della malattia a danno assonale, perdita neuronale e insufficienza della rete del SNC, che determinano la progressione della disabilità.

La rilevazione, la quantificazione e il monitoraggio del danno neuroassonale acuto e cronico potrebbero fornire informazioni rilevanti nella SM.

Tale dimostrazione può essere ottenuta misurando le proteine strutturali dei neuroni.



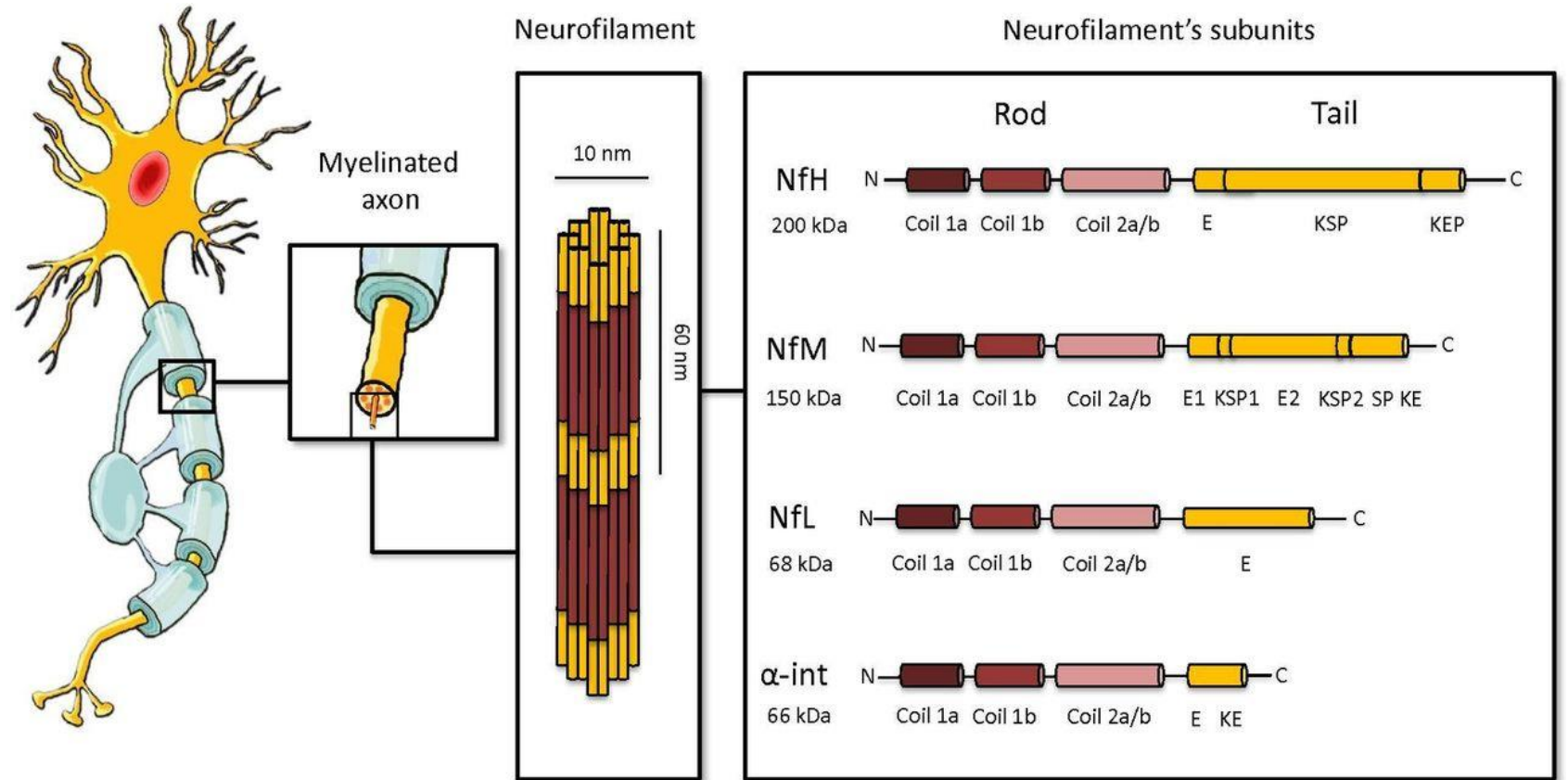
## CATENA LEGGERA DEI NEUROFILAMENTI (NfL)

- Il biomarcatore emergente della SM più studiato è rappresentato dalla catena leggera dei neurofilamenti (NFL), che può essere facilmente rilevato sia nel liquido cerebrospinale che nel siero/plasma.
- Rosengren et al. (1996) hanno dimostrato livelli elevati di NfL nel liquido cerebrospinale di vari disturbi neurodegenerativi, indicando il suo potenziale come biomarcatore del danno neuroassonale.

# Neurofilamenti

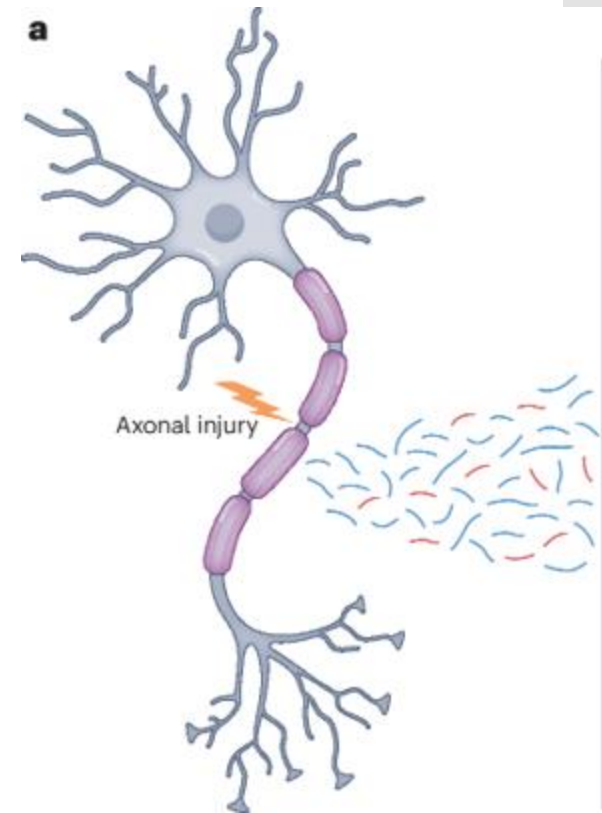
Uno dei componenti principali del citoscheletro assonale è il neurofilamento, un filamento di 10 nm che conferisce resistenza alla trazione a dendriti e assoni.

I neurofilamenti sono composti da tre polipeptidi principali con masse molecolari rispettivamente di 200, 150 e 68 kDa (kD), quest'ultimo dei quali è NfL.



# CATENA LEGGERA DEI NEUROFILAMENTI (NfL): UN IMPORTANTE MARCATORE DI DANNO NEUROASSONALE

- Le NfL sono proteine neuronali specifiche
- Le NfL sono proteine di supporto del citoscheletro assonale
- Le NfL sono le proteine neurofilamentari più abbondanti nell'assone
- Le NfL, durante il danno assonale, vengono rilasciate in grandi quantità nello spazio extracellulare, nel liquido cerebrospinale e nel siero;
- i loro livelli di concentrazione indicano l'entità del danno assonale, costituendo quindi un biomarcatore di neurodegenerazione.
- Poiché la NfL è altamente sensibile al danno assonale di grosso calibro, ha dimostrato di riflettere accuratamente il danno assonale nella sostanza bianca che si verifica nella SM, diventando così uno dei marcatori più promettenti tra quelli emergenti



**CATENA LEGGERA  
DEI  
NEUROFILAMENTI  
(NfL): UN  
IMPORTANTE  
MARCATORE DI  
DANNO  
NEUROASSONALE**

- Nel 1998, uno studio ha indicato un aumento significativo della concentrazione di NfL nel liquido cerebrospinale (NfL) nei soggetti con SM recidivante-remittente durante le fasi infiammatorie attive della malattia, rispetto ai controlli sani. Questa scoperta ha evidenziato il potenziale valore di NfL nel liquido cerebrospinale come biomarcatore per monitorare l'attività della malattia.
- Nel tempo, diversi studi hanno confermato che la concentrazione di NfL nel liquido cerebrospinale (NfL) aumenta sia nella SM recidivante-remittente che in quella primariamente progressiva.
- La concentrazione di NfL nel liquido cerebrospinale indica un danno assonale in corso e ne riflette l'intensità.
- Nei pazienti affetti da SM, a seguito di un trattamento clinicamente efficace, la concentrazione di NfL nel liquido cerebrospinale si normalizza entro 6-12 mesi.
- Pertanto, la concentrazione di NfL nel liquido cerebrospinale (NfL) è promettente come biomarcatore per l'intensità della malattia, la progressione e la risposta al trattamento.

**CATENE LEGGERE  
DEI  
NEUROFILAMENTI  
(NfL): UN  
IMPORTANTE  
MARCATORE DI  
DANNO  
NEUROASSONALE**

- Sebbene l'NFL cerebrospinale abbia mostrato una bassa specificità per la diagnosi di SM, è stata osservata una correlazione costante tra NFL sierico, attività di malattia e terapia, e un'associazione variabile con la disabilità.
- L'NFL può fornire nuove informazioni sull'attività di malattia nella SM sia a breve che a lungo termine e contribuire alla prognosi.
- L'NfL può orientare la gestione del paziente e il processo decisionale terapeutico.
- L'NfL è una proteina particolarmente stabile, il che rende il campione facile da maneggiare e conservare.
- L'NfL può essere influenzato da fattori confondenti come età, BMI e comorbidità.
- La possibile influenza delle comorbidità e dell'età ha limitato l'uso diagnostico di questo biomarcatore in ambito clinico, evidenziando la necessità di definire intervalli appropriati di valori soglia.

## CATENE LEGGERE DEI NEUROFILAMENTI (NfL)

- L'uso di NfL, insieme alla risonanza magnetica e alle misure cliniche della progressione della malattia, è uno strumento decisionale chiave per i pazienti con SM.
- Il monitoraggio regolare di NfL è utile per determinare le variazioni rispetto ai valori basali e predire l'attività subclinica della malattia, il rischio di recidiva e lo sviluppo di nuove lesioni Gd+.
- Le recidive clinicamente evidenti sono solo la punta dell'iceberg; sotto la superficie si nasconde una notevole attività subclinica, ad esempio, come vediamo nelle scansioni di risonanza magnetica.
- NfL funge da marcatore surrogato di questa attività nascosta, dove ha valore prognostico.
- Rilevare aumenti subclinici di NfL può fornire un segnale di allarme precoce, consentendo ai neurologi di intervenire proattivamente, alterando potenzialmente il decorso della malattia e prevenendo l'insorgenza di nuova infiammazione correlata alla recidiva.
- Il test NfL trae vantaggio dall'essere relativamente non invasivo e poco costoso, consentendo l'esecuzione di frequenti ripetizioni durante il decorso della malattia.
- Pertanto, "NfL offre l'opportunità di integrare i dati periodici di una risonanza magnetica

## CATENA LEGGERA DEI NEUROFILAMENTI (NfL)

- Lo sviluppo di tecnologie di immunodosaggio ultrasensibili ad alto rendimento ha portato alla comprensione dell'NfL come biomarcatore nella SM, consentendone un'accurata quantificazione nell'ordine dei pg/ml nel sangue (sia siero che plasma).
- I livelli sierici di NfL sono elevati nei pazienti con SM già prima dell'insorgenza dei sintomi clinici, il che suggerisce un potenziale futuro utilizzo clinico nel monitoraggio dei soggetti ad alto rischio di sviluppare la malattia.
- Livelli più elevati di NfL sono predittivi di esiti peggiori, come un rischio maggiore di conversione da sindrome clinicamente isolata a (più) future ricadute, attività lesionale, peggioramento dell'EDSS e atrofia cerebrale.
- Le terapie modificanti la malattia altamente efficaci normalizzano i livelli sierici di NfL a quelli dei controlli sani, mentre si osservano riduzioni minori dose-dipendenti con composti orali e di piattaforma.
- Nelle persone con SM con sclerosi multipla senza infiammazione attiva, come la SM progressiva o la SM recidivante-remittente sottoposte a terapie altamente efficaci, analisi retrospettive di studi clinici di fase 2/3 hanno mostrato evidenze di livelli sierici aumentati di NfL, predittivi di atrofia cerebrale e talamica, espansione di lesioni a lenta espansione e progressione clinica.
- In un'analisi combinata di due ampie coorti osservazionali di SM, le concentrazioni sieriche di NfL erano significativamente elevate 1-2 anni prima, ma non al momento della progressione della malattia, rispetto ai casi di SM stabile, e si sono dimostrate altamente predittive di progressione futura indipendentemente dagli eventi di attività di ricaduta, tenendo conto di questo intervallo di tempo.

## CATENE LEGGERE DEI NEUROFILAMENTI (NfL)

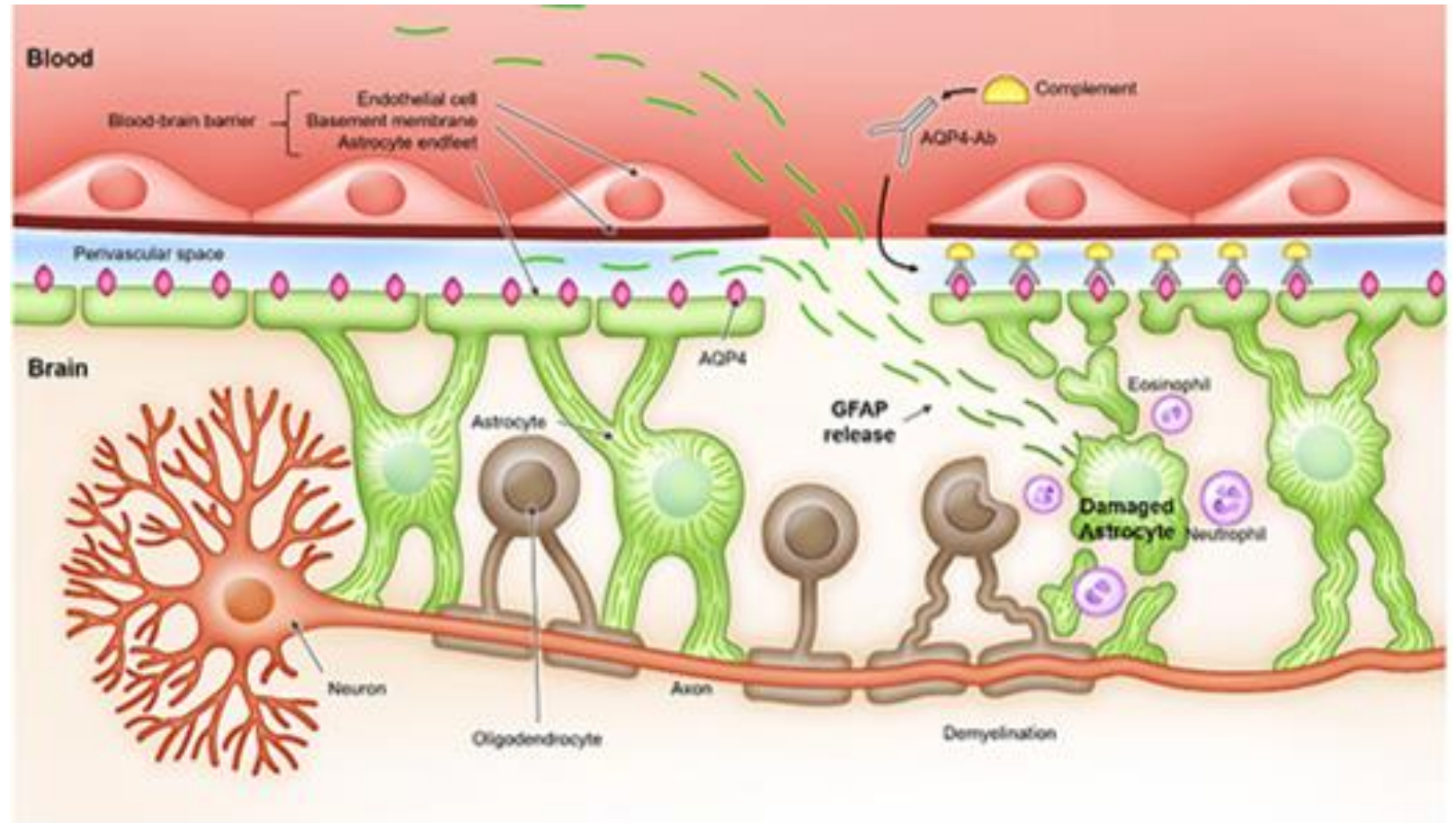
- Uno dei limiti dell'NfL sierico è la sua specificità per patologia (ad esempio, danno neuronale), ma non per una specifica malattia.
- Livelli elevati sono stati segnalati in condizioni acute come lesioni cerebrali traumatiche o ictus, e in malattie neurodegenerative croniche come il morbo di Alzheimer e la demenza frontotemporale.
- Pertanto, i valori individuali possono essere interpretati solo nel contesto clinico.
- Al contrario, la variazione fisiologica dei livelli sierici di NfL con l'età e il peso corporeo è stata affrontata con successo stabilendo valori normativi sia per gli adulti che per i bambini. Questi strumenti facilitano l'interpretazione dei livelli sierici di NfL nella pratica clinica: l'NfL sierico o plasmatico sta per diventare uno strumento essenziale per la medicina personalizzata nella pratica clinica della SM e potrebbe anche rappresentare un endpoint per accelerare lo sviluppo di farmaci di successo negli studi clinici. Tra le questioni cliniche urgenti da affrontare negli studi prospettici c'è la definizione di valori soglia per indicare "trattamento efficace" o "riattivazione della malattia".

# Nuovi biomarcatori

- Sono stati proposti altri promettenti biomarcatori che implicano demielinizzazione, disfunzione gliale e danno assonale e neuronale, tra cui la proteina Tau, la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), la proteina S100 $\beta$ , la proteina basica della mielina (MBP), la glicoproteina oligodendrocitaria della mielina (MOG) e l'enolasi neuronale specifica (NSE).

La proteina acida fibrillare gliale (GFAP), il principale filamento intermedio degli astrociti umani, funge da biomarcatore per la disfunzione, l'attivazione e il danno astrocitario. In risposta a un danno cerebrale, la GFAP viene rilasciata nel liquido interstiziale/extracellulare, nel liquido cerebrospinale e nel flusso sanguigno.

## Proteina acida fibrillare gliale (GFAP)



# Proteina acida fibrillare gliale (GFAP)

- Tra i marcatori specifici degli astrociti, la GFAP è il più promettente e potrebbe essere determinante nel delineare il complesso coinvolgimento degli astrociti nella neuroinfiammazione e nella neurodegenerazione.
- La GFAP nel liquido cerebrospinale è stata associata alla progressione della malattia nella SM da decenni, ma il suo potenziale come biomarcatore di progressione nella SM si è evoluto notevolmente negli ultimi anni, con l'emergere di tecnologie che hanno consentito un rilevamento accurato della GFAP nel sangue.
- I primi studi hanno dimostrato che i livelli di GFAP nel liquido cerebrospinale erano correlati a un aumento della disabilità neurologica, erano più elevati nei pazienti in progressione e meno associati alla fase clinica acuta della malattia.
- Si è scoperto che livelli più elevati di GFAP nel siero e nel liquido cerebrospinale prognosticano esiti peggiori di progressione e atrofia cerebrale, soprattutto nella sostanza grigia, e sono indipendenti dalla NfL sierica, il che supporta ulteriormente un ruolo nella fisiopatologia della progressione della SM.
- Nella SM, la GFAP sembra riflettere un insieme di danni tissutali causati dall'infiammazione, il che potrebbe spiegare la sua correlazione con i livelli di NfL, nonché la progressione della malattia probabilmente derivante da effetti strutturali come l'astrogliosi, la formazione di cicatrici gliali o il danno astrocitario.
- La GFAP è labile nel liquido cerebrospinale e molto sensibile al congelamento-scongelamento, mentre la proteina è stabile nel sangue.
- I livelli sierici di GFAP tendono ad aumentare durante le ricadute nella SM recidivante-remittente rispetto ai periodi di remissione.
- La GFAP sierica ha dimostrato la capacità di predire la progressione della disabilità confermata anche nei casi di SM non attiva, indicando un'associazione con meccanismi patofisiologici della SM che vanno oltre l'infiammazione focale acuta.

# Proteina acida fibrillare gliale (GFAP)

- È stata osservata una notevole diminuzione della GFAP sierica dopo l'inizio del trattamento, il che implica un'associazione tra i livelli di GFAP e l'attività infiammatoria della SM.
- I livelli sierici di GFAP non sono aumentati nei pazienti con SM che hanno manifestato progressione rispetto a quelli che sono rimasti stabili dodici mesi dopo l'inizio del trattamento.
- Al contrario, un altro studio ha rilevato livelli sierici di GFAP aumentati nei pazienti in progressione rispetto a quelli stabili e negli individui sottoposti a trattamento con deplezione delle cellule B, e ha identificato una correlazione tra l'aumento dei livelli di GFAP (misurati un anno dopo l'inizio del trattamento) e un effetto prognostico significativo sul tempo alla progressione della malattia.
- L'età è associata alle concentrazioni sieriche di GFAP, influenzando potenzialmente la varianza nei livelli dei biomarcatori quando si confrontano individui con fasi progressive e recidivanti di SM.
- In particolare, l'associazione tra i livelli sierici di GFAP e il rischio di progressione della disabilità nei pazienti con SM non attiva è persistita anche nei modelli aggiustati per età.
- Questi risultati promettenti sottolineano la necessità di una convalida incrociata e di ampi studi longitudinali che esaminino diversi aspetti dei livelli di GFAP, come i livelli basali, gli effetti dell'età e del sesso, il cambiamento longitudinale dopo diversi trattamenti in contesti diversi.

# MS e citochine pro-infiammatorie

- Poiché la SM è una malattia cronica immunomediata caratterizzata da infiammazione cronica, l'attivazione delle cellule B e T determina il rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie, che potrebbero essere utili nella diagnosi di SM e nella valutazione della progressione della malattia.
- In uno studio, i livelli sierici di IL-6 erano maggiori nei pazienti con SM rispetto ai controlli e sono stati correlati con l'età di esordio nei pazienti con SM.
- Inoltre, i pazienti con SM mostrano elevati livelli di espressione della IL-15 sia nel siero che nel liquido cerebrospinale.
- La chemochina CXCL13 è significativa nella conversione dalla sindrome clinica isolata (CIS) alla SM, poiché attiva le cellule B e T helper in un processo che coinvolge il suo recettore CXCR5 sulle lesioni demielinizzanti.
- Ulteriori promettenti mediatori della risposta immunitaria includono il ligando solubile di CD40, CD40L plasmatico solubile (sCD40L), il precursore della chitinasi-3-like-1 (CHI3L1), le proteine da shock termico (HSP) HSP70 e HSP90 e l'osteopontina (OPN.)

# CXCL13

- Il ligando 13 della chemiochina (C-X-Cmotif) (CXCL13), un'interessante molecola legata all'attività delle cellule B, è presente in concentrazioni elevate nel liquido cerebrospinale e nei fluidi periferici di individui con SM.
- Svolge un ruolo fondamentale nell'attrarre le cellule B che esprimono il suo ligando CXCR5 al SNC.
- I livelli di proteina e RNA di CXCL13 sono aumentati nelle lesioni della SM, mentre sono appena rilevabili al di fuori delle lesioni infiammate attive.
- Nel corso della malattia, l'inadeguata risoluzione dell'infiammazione è accompagnata da diverse alterazioni infiammatorie croniche, una delle quali è lo sviluppo di centri germinativi ectopici nelle meningi.
- CXCL13 è stata riscontrata nei centri germinativi ectopici delle meningi infiammate di individui con SM progressiva, principalmente nelle cellule dendritiche follicolari.
- L'aumento dei livelli di CXCL13 può aumentare l'accumulo di cellule B nelle meningi, causando il graduale raggruppamento delle cellule linfoidi.
- Il peggioramento dell'infiammazione meningea cronica, a sua volta, porta alla demielinizzazione subpiale, a una notevole perdita neuronale e a un gradiente patologico delle cellule corticali dalla superficie agli strati più profondi della corteccia.

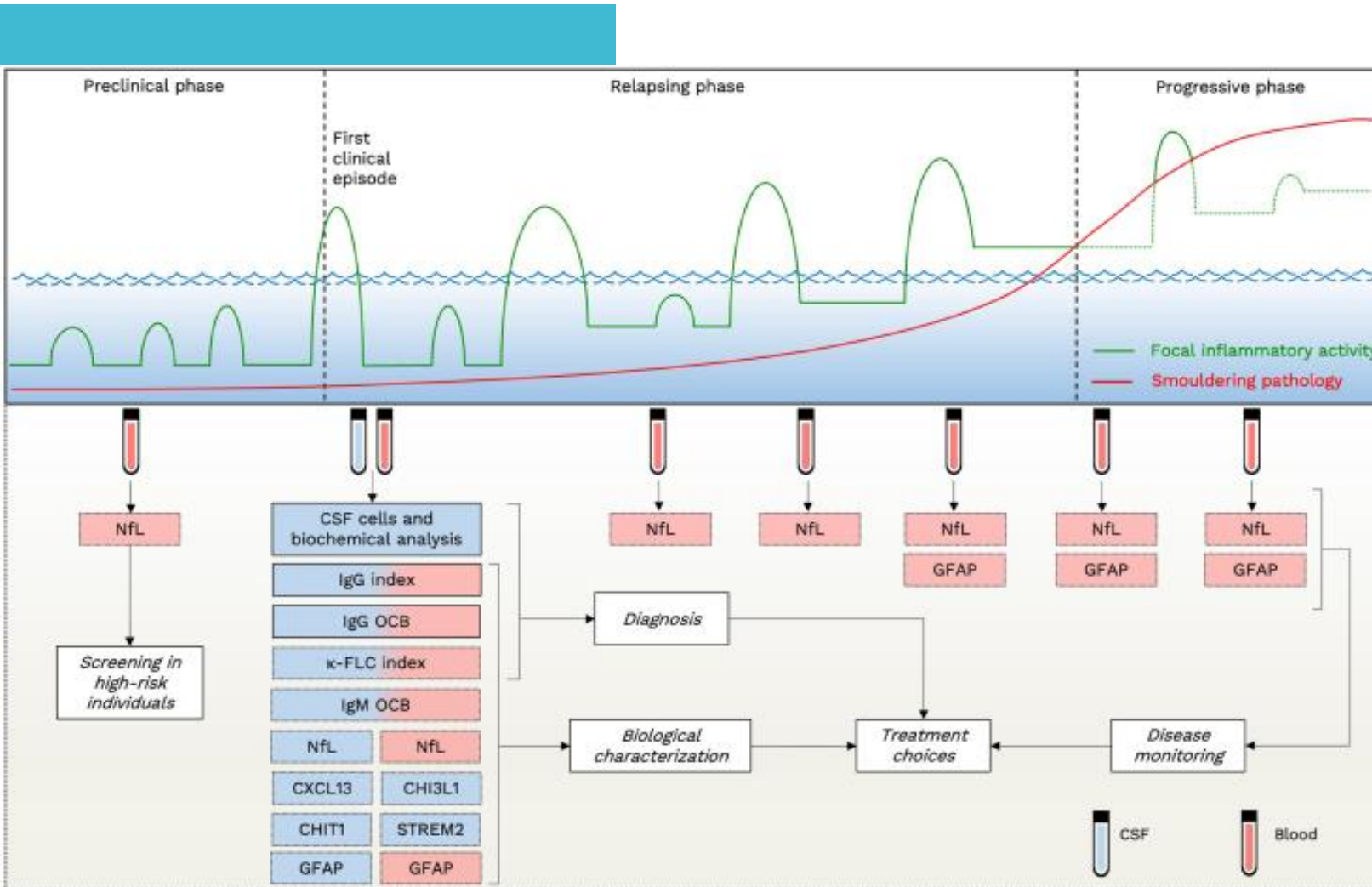
# CXCL13

- La concentrazione di CXCL13 nel liquido cerebrospinale è elevata nella SM, con livelli mediani fino a 4 volte superiori rispetto ai controlli.
- I maggiori aumenti dei livelli di CXCL13 nel liquido cerebrospinale si osservano nella fase iniziale della malattia attiva, ma i livelli sono elevati anche nella SM progressiva.
- La concentrazione di CXCL13 nel liquido cerebrospinale è correlata al numero di lesioni captanti il gadolinio, alla conta delle cellule B, alle concentrazioni intratecali di IgG, all'indice  $\kappa$ -FLC, al tasso di recidiva e all'attività della malattia, supportando un ruolo nella malattia infiammatoria attiva.
- I livelli sono generalmente non rilevabili nel liquido cerebrospinale dei controlli con malattie non infiammatorie.
- I livelli di questo marcatore nel liquido cerebrospinale, da soli o come indice CXCL13 (concentrazione di liquido cerebrospinale/siero o plasma), hanno un valore prognostico, ad esempio per la conversione da sindrome clinicamente isolata a SM in diversi studi indipendenti.
- CXCL13 è utile per valutare la risposta alla terapia
- Nonostante sia stato suggerito di calcolare un indice CXCL13 per quantificare le quantità sintetizzate intratecale e tenere conto delle disfunzioni della barriera emato-encefalica, recenti evidenze indicano che CXCL13 probabilmente non entra nel liquido cerebrospinale dal flusso sanguigno, anche in presenza di alterazioni della barriera emato-encefalica, nonostante il suo basso peso molecolare.
- Pertanto, livelli elevati di CXCL13 nel liquido cerebrospinale potrebbero derivare solo dal sistema nervoso centrale e indicare processi neuroinfiammatori. D'altro canto, i livelli sierici di CXCL13 sono elevati in varie malattie sistemiche autoimmuni, infiammatorie, infettive e neoplastiche, limitandone così l'utilità come biomarcatore dell'attività immunitaria intratecale quando misurato nel siero.

# Nuovi biomarcatori

- Nel complesso, l'uso di questi marcatori è limitato da criticità simili a quelle dei NFL.
- I nuovi biomarcatori indicano un danno che può essere rilevato anche in altre patologie neurodegenerative;
- inoltre, i risultati dei lavori scientifici sono talvolta contrastanti. Pertanto, è necessario condurre ulteriori studi al fine di chiarire il ruolo dei nuovi biomarcatori, ipotizzando l'ideazione di pannelli di analisi combinate dei diversi biomarcatori.
- È importante sottolineare che, attualmente, i test di laboratorio disponibili in commercio per la diagnosi di SM includono, insieme alle determinazioni di OCB e kFLC, la quantificazione dei livelli sierici di NFL e GFAP. Tuttavia, nonostante siano disponibili in commercio, questi test di laboratorio non hanno ottenuto un'ampia approvazione nella pratica clinica, avendo principalmente un valore prognostico piuttosto che fungere da strumenti diagnostici.

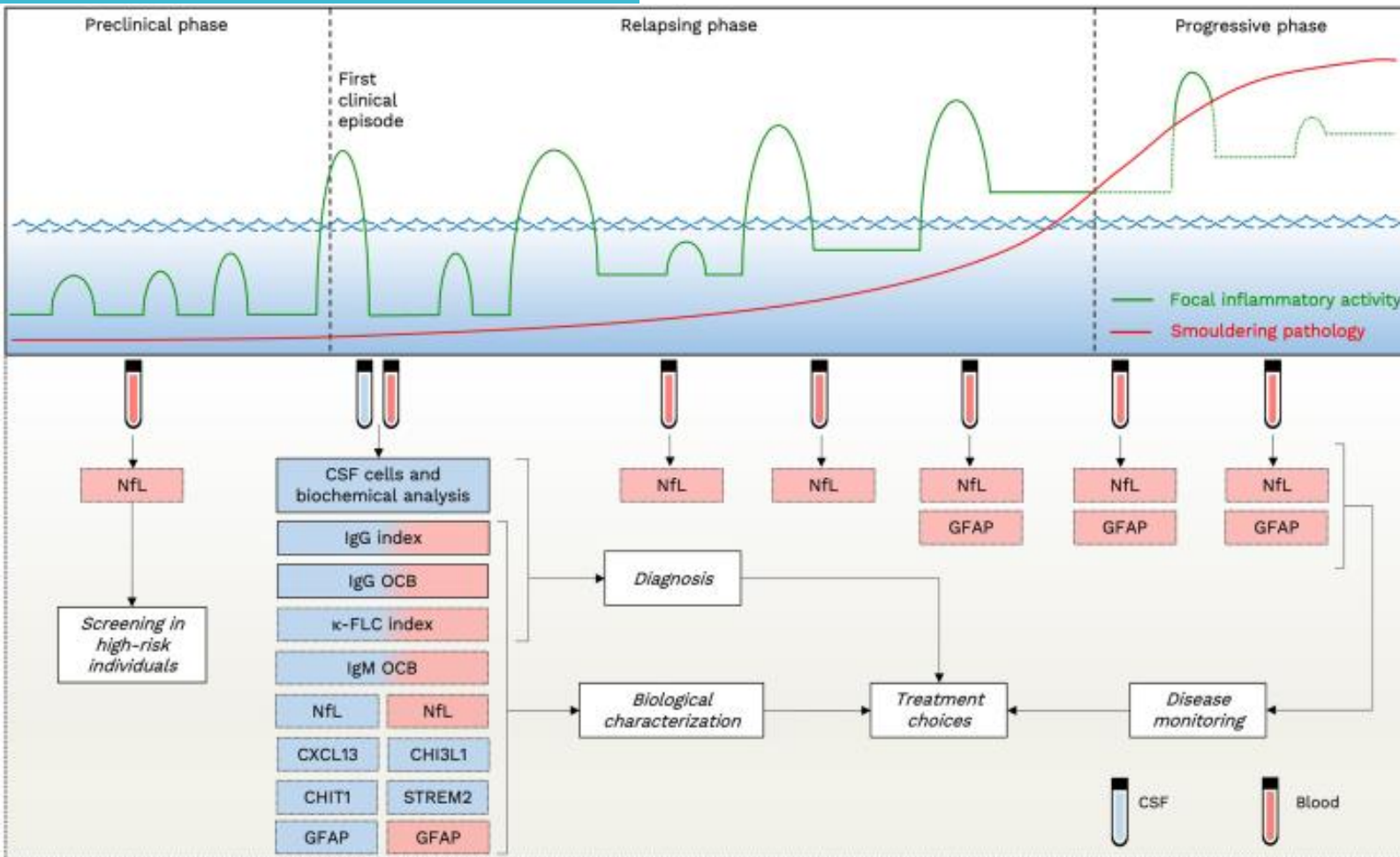
# Applicazioni dei biomarcatori nella gestione clinica della SM



Rappresentazione schematica del decorso clinico della sclerosi multipla (SM) e degli eventi sottostanti. L'asse verticale rappresenta il livello di disabilità clinica, mentre l'asse orizzontale rappresenta il tempo. Il "livello del mare" corrisponde alla soglia di rilevazione clinica. Le linee verdi rappresentano episodi di infiammazione focale acuta nel sistema nervoso centrale (SNC). L'infiammazione acuta può manifestarsi come asintomatica (al di sotto della soglia clinica) o sintomatica (al di sopra della soglia clinica). Durante la fase preclinica della malattia, si hanno episodi di infiammazione acuta asintomatica. Il primo episodio di infiammazione acuta che supera la soglia clinica rappresenta l'esordio clinico della malattia. Nel tempo, le ricadute cliniche possono essere seguite da una guarigione incompleta.

Abbreviations. CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CIS: clinically isolated syndrome. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. DMT: disease-modifying treatment. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NfL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

# Applicazioni dei biomarcatori nella gestione clinica della SM



- Parallelamente agli eventi ricorrenti di infiammazione focale acuta nel SNC, fin dalla fase iniziale della malattia si verifica un processo patologico "covante" di infiammazione persistente di basso grado (linea rossa), che porta infine a un peggioramento continuo della disabilità clinicamente rilevabile.
- Riquadro inferiore: Biomarcatori della SM e loro potenziale ruolo nelle diverse fasi della malattia. I biomarcatori all'interno delle barre con una cornice nera continua sono quelli attualmente utilizzati su larga scala nella pratica clinica.

Abbreviations. CHI3L1: chitinase-3-like protein 1. CHIT1: chitinase 1. CIS: clinically isolated syndrome. CNS: central nervous system. CSF: cerebrospinal fluid. CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13. DMT: disease-modifying treatment. FLC: free light chain. GFAP: glial fibrillary acidic protein. NfL: neurofilament light chain. sTREM2: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

## Conclusioni

La diagnosi di SM richiede un equilibrio tra il riconoscimento precoce della malattia e l'**elusione** di diagnosi errate, senza inutili complessità e tenendo conto della diversità dei contesti clinici in tutto il mondo.

# Conclusioni

- Il gold standard per la diagnosi di SM è la determinazione dell'OCB nel liquido cerebrospinale.
- La determinazione dell'indice  $\kappa$ FLC ha acquisito sempre maggiore rilevanza, rappresentando un metodo semplice, affidabile e rapido che consente di risparmiare tempo e costi.
- L'indice  $\kappa$ FLC mostra un'elevata specificità, come la rilevazione dell'OCB, ma con una sensibilità variabile dovuta a diversi valori di cut-off.
- L'indice  $\kappa$ FLC, caratterizzato da rapidità di esecuzione, costi contenuti e validità clinica, potrebbe essere utilizzato come primo test di screening e la rilevazione dell'OCB come test di conferma.
- La revisione del 2024 dei criteri di McDonald del 2017 rappresenta una svolta, suggerendo per la prima volta l'uso dell'indice  $\kappa$ FLC per la diagnosi di SM, in sostituzione della determinazione dell'OCB.
- Sono necessari ulteriori studi per identificare e/o validare nuovi biomarcatori molecolari per migliorare la diagnosi, il follow-up e il monitoraggio della SM.