

Le *Free Light Chains* (FLCs) nella diagnostica liquorale della sclerosi multipla

Leonardo Sinisi

UOC di Neurologia e Centro SM, Ospedale San Paolo, ASL Napoli 1 Centro

Introduzione

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia demielinizante immuno-mediata del sistema nervoso centrale (SNC), nel cui determinismo sono coinvolti sia fattori genetici che ambientali. La diagnosi è talora complessa a causa dell'elevata eterogeneità clinica e fisiopatologica della malattia.

I criteri diagnostici sono stati modificati più volte nel corso degli anni, includendo aspetti sintomatici, presenza di lesioni tipiche rilevate mediante *imaging* di risonanza magnetica (MRI) ed esami strumentali (risultati di laboratorio e neurofisiologici). La diagnosi di SM si basa sulla dimostrazione della disseminazione nello spazio (DIS), ovvero il coinvolgimento di diverse aree del SNC, e nel tempo (DIT), ovvero il verificarsi di almeno due ricadute, o, nel caso di SM progressiva primaria (SM-PP), progressione della disabilità per almeno 1 anno.

L'analisi del liquido cerebrospinale (CSF, *cerebrospinal fluid*) con-

sente una valutazione dei processi infiammatori circoscritti al sistema nervoso centrale e riflette cambiamenti nel modello immunologico dovuti alla patologia, fondamentali nella diagnosi e nel monitoraggio della SM.

La ricerca di bande oligoclonali (OCB) IgG specifiche esclusivamente liquorali è riconosciuta nell'ambito dei criteri diagnostici come lo "standard di riferimento" per la diagnostica di laboratorio della SM, sebbene presenti limiti analitici. In effetti, i protocolli attuali per il dosaggio delle OCB richiedono molto tempo ed un'interpretazione operatore-dipendente.

Negli ultimi anni è emersa, quale metodica di più rapida ed economica attuazione, la quantificazione delle catene leggere libere (*Free Light Chains*, FLCs) nel liquor cefalorachidiano come indice surrogato per la definizione diagnostica di malattie infiammatorie del SNC, inclusa la SM⁽¹⁾.

Criteri diagnostici

Gli attuali criteri diagnostici, basati principalmente sulla valutazione dei dati clinici, di *imaging* e di laboratorio, sono stati verificati nella pratica clinica, convalidati e progressivamente aggiornati nel corso degli anni, in considerazione delle criticità nell'identificazione e della più precoce conferma della malattia nei pazienti con sospetta patologia demielinizante.

L'aggiornamento dei criteri di McDonald sottolinea la necessità di differenziare il primo episodio clinico (sindrome clinicamente isolata, CIS) da altre malattie neurologiche mediante la verifica di DIS e DIT, valutando i dati clinici, di RM ed i risultati di laboratorio⁽¹⁾. L'ultima revisione di questi criteri, del 2017, ha riportato in auge il ruolo dell'analisi del liquor, affermando che la presenza di 2 o più OCB, esclusivamente presenti nel liquor, può sostituire il criterio DIT e consentire quindi di determinare la diagnosi di SM nei pazienti con il primo episo-

dio indicativo di CIS.

La diagnosi differenziale tra sospetta SM e altre patologie demielinizzanti del SNC può essere effettuata mediante valutazione sierologica degli autoanticorpi IgG anti-acquaporina-4 (AQP4) e degli autoanticorpi IgG diretti contro la glicoproteina della mielina oligodendrocitica (MOG-IgG). Entrambi questi test sono utili quando la presentazione clinica, l'*imaging* o i risultati di laboratorio sono atipici nei pazienti sospetti di SM. In particolare, l'autoanticorpo AQP4 è un biomarcatore specifico per i disturbi dello spettro della neuromielite ottica (NMOSD).

Inoltre, più recentemente, è emerso che l'analisi del liquor ha un grande potenziale come fonte di biomarcatori emergenti (ad esempio, neurofilamenti a catena leggera, NfL), perché offre l'opportunità di valutare direttamente specifici processi infiammatori del SNC e di identificare i cambiamenti nel modello immunologico dovuti alla progressione della patologia demielinizzante.

Un aumento intratecale di immunoglobuline (Ig) può essere osservata in alcune malattie del sistema nervoso centrale e può essere attribuibile a diversi meccanismi, come un'alterata permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE), una sintesi intratecale o una combinazione di entrambi. Durante i processi infiammatori, i linfociti B possono migrare nel sistema nervoso centrale, sintetizzando Ig che contribuiscono al *pool* del liquor, comprese quelle derivate dalla diffusione attraverso la BEE. In questo contesto, l'esame del liquido cerebrospinale comprende le misurazioni quantitative di Ig ed albumina, ed un'analisi qualitativa delle Ig del liquor rispet-

to alle Ig sieriche. Quest'ultimo si basa sul rilevamento di OCB mediante *isoelettrofocusing* (IEF) seguito da *immunoblotting* specifico per IgG. Il rilevamento di un profilo oligoclonale di IgG specifico nel liquido cerebrospinale, non rilevato nel siero, rimane il principale marcatore diagnostico biochimico per la SM perché indica specificamente la sintesi intratecale di IgG. Tuttavia, questo approccio presenta diversi limiti, come l'interpretazione dei risultati dipendente dall'operatore, la necessità di protocolli dispendiosi in termini di tempo e costi elevati. Inoltre, non vi è consenso sulla definizione di valori soglia per la positività. Va anche notato che le OCB possono essere osservate in pazienti affetti da altre malattie neurologiche ed in una piccola percentuale di individui apparentemente sani.

La quantificazione delle catene leggere libere kappa (κ -FLCs) e lambda (λ -FLCs) nel liquor sembra essere un test promettente per l'identificazione delle patologie infiammatorie del SNC. La maggior parte degli Autori ha concentrato il proprio interesse sulle κ -FLCs, scelta supportata dall'osservazione di un aumento più elevato di κ -FLCs nei soggetti con SM rispetto a λ -FLCs, suggerendo una maggiore idoneità come test a possibile scopo clinico ⁽¹⁾.

Le determinazioni delle κ -FLCs forniscono, secondo diversi Autori, prestazioni equivalenti a quelle delle OCB, almeno in termini di sensibilità, nel *work-up* delle malattie demielinizzanti ^(2,3). Sostituire l'indice OCB e IgG con le κ -FLCs eliminerebbe la necessità di dosare IgG e albumina sieriche, IgG liquor e albumina ed indici calcolati. Ciò consentirebbe al laboratorio di ridurre spese e tempi di esecuzione dei tec-

nici ed eliminando costosi kit per l'IEF. Inoltre, la determinazione delle κ -FLCs potrebbe sostituire l'interpretazione soggettiva con valori quantitativi, superando le difficoltà tecniche ed interpretative associate ai test per le OCB. La misurazione delle κ -FLCs, tecnicamente meno impegnativa e meno costosa, è stata suggerita come il miglior test di laboratorio singolo per supportare la diagnosi di SM, fornendo oltretutto una misura quantitativa per seguire le variazioni di sintesi intratecale di Ig ⁽³⁾. Allo stesso tempo, altri Autori hanno proposto di eseguire la ricerca delle OCB selettivamente sulla base dei risultati delle misurazioni delle κ -FLCs, utilizzando algoritmi diversi ⁽⁴⁾.

Recentemente, è stato consigliato l'uso in ambito clinico dell'Indice K $[(\text{CSF FLC}/\text{Serum FLC})/(\text{CSF Albumin}/\text{Serum Albumin})]$ invece della sola determinazione delle catene κ CSF, poiché l'indice K tiene conto dell'integrità della BEE e ha mostrato una maggiore accuratezza diagnostica con un tasso inferiore di risultati falsi positivi. L'indice K, in particolare, ha mostrato sensibilità più elevate nella previsione delle OCB e nella diagnosi della SM. Infatti, tale parametro ha identificato il 96,1% dei pazienti con SM, mentre l'indice IgG solo il 59,1%, a parità di specificità. Gli Autori concludevano che l'indice K era più efficiente dell'indice IgG (*Link index*) come test quantitativo per la sintesi intratecale ⁽⁵⁾.

Questi risultati hanno confermato la proposta di utilizzare l'indice K come *marker* di prima linea altamente sensibile e facile da rilevare nell'analisi del liquor per la sintesi intratecale. Se l'indice K è elevato, questa prima analisi dovrebbe

essere seguita da IEF. Al contrario, l'indice di IgG non dovrebbe essere scelto per questo ruolo, poiché ha mostrato prestazioni diagnostiche inferiori. Questo test sequenziale può essere una procedura ottimale per diagnosticare la SM con prestazioni accurate e basso costo^(5,6).

Gli attuali criteri di McDonald raccomandano l'analisi delle bande di IgG oligoclonali per la valutazione di pazienti con sospetta SM, ma non includono la quantificazione delle κ -FLCs come possibile biomarcatore diagnostico. Inoltre, i criteri aggiornati sottolineano la mancanza di un singolo test di laboratorio con prestazioni diagnostiche adeguate per la diagnosi della SM.

L'analisi quantitativa delle κ -FLCs nel liquor è appena entrata nella *routine* clinica in alcuni laboratori. La domanda per il prossimo futuro è se il test OCB IgG possa fornire utili informazioni aggiuntive; in caso contrario, potrebbe essere abbandonato poiché è sia più costoso che laborioso delle misurazioni delle κ -FLCs. Secondo il parere di alcuni Autori, la prossima revisione dei criteri di McDonald potrebbe menzionare la sintesi intratecale di κ -FLCs come alternativa adeguata alle IgG oligoclonali⁽⁵⁾.

Rischio di conversione

Un altro aspetto importante è il valore prognostico delle FLCs rispetto al rischio di conversione di CIS in SM. Alcuni studi che utilizzano il test nefelometrico FLC hanno mostrato che un'alta concentrazione di κ -FLCs nel liquor potrebbe prevedere la conversione della CIS in SM⁽⁷⁾, mentre in altri non sono state riscontrate differenze significative nei livelli di κ -FLCs tra i pazienti CIS stabili e quelli che si sono conver-

titi in SM⁽⁴⁾. Secondo alcuni Autori, la concentrazione di FLCs nel CSF prevederebbe la conversione in SM entro due anni dalla CIS⁽⁸⁾. In particolare, i valori di κ -FLCs e Q- κ hanno migliori caratteristiche diagnostiche rispetto ai valori di λ -FLCs e Q- λ . I pazienti OCB positivi con conversione precoce hanno concentrazioni più elevate di FLCs nel liquor⁽⁸⁾. In pazienti OCB negativi è stata riscontrata aumentata produzione di FLCs, principalmente con sottotipo λ .

Un indice elevato di κ -FLCs ($> 5,9$) è stato riscontrato in 79/83 pazienti (95%) con SM diagnosticata al basale, leggermente meno frequente delle OCB (98,8%). Inoltre, 18/25 pazienti (72%) che si sono convertiti da CIS a SM definita hanno mostrato un elevato indice di κ -FLCs rispetto a 20/25 pazienti (80%) con OCB positive. Nei pazienti con CIS stabile, in 7/41 (17%) è stato evidenziato un elevato indice di κ -FLCs rispetto a 11/41 (27%) pazienti con OCB positive⁽⁹⁾.

Alcuni Autori hanno dimostrato l'importanza diagnostica dell'analisi dei monomeri e dimeri FLCs nella diagnosi della SM pediatrica. Questo metodo ha mostrato una maggiore sensibilità (90,5%) e specificità (91,4%) nella differenziazione della SM da altre malattie neurologiche (non SM) rispetto al test di *routine* delle OCB eseguito utilizzando elettroforesi su gel di agarosio accoppiato con immunofissazione (81% e 65,7%, rispettivamente)⁽¹⁰⁾. Nel loro insieme, livelli elevati nel liquor di FLCs di per sé sono indicativi di SM, ma non sono sufficienti per la diagnosi precisa; tuttavia, la determinazione e l'uso combinato di diversi parametri FLC, inclusa la valutazione della dimerizzazione di

FLC, potrebbero essere diagnostici e persino di importanza prognostica. Strutturalmente, i dimeri FLCs assomigliano alla regione Fab di Ig intere, quindi le capacità di legame dei dimeri possono prevalere su quella dei monomeri. Le FLCs in forma dimerica potrebbero interagire con i linfociti B come mini autoanticorpi patogeni ed essere in grado di sensibilizzare i mastociti. Sebbene i meccanismi precisi della formazione avanzata di dimeri di FLCs covalenti non siano ancora compresi nella SM, recenti risultati suggerirebbero che sia le peculiarità strutturali della FLC, sia le condizioni ambientali legate alla malattia, come lo stress ossidativo, possono svolgere un ruolo patogeno⁽¹⁰⁾.

Alcuni Autori hanno sviluppato una nuova tecnica per analizzare le FLCs monomeriche e dimeriche nella saliva dei pazienti con SM. L'applicazione di questa tecnica ha rivelato la deviazione dal normale profilo monomero-dimero di FLCs nella saliva dei pazienti con SM attiva, mentre questi cambiamenti patologici erano assenti in un gran numero di pazienti con SM in remissione. Tale tecnica potrebbe rappresentare una metodica semplice e non invasiva per seguire il decorso della malattia⁽¹¹⁾.

Rischio di progressione

Di recente, alcuni Autori hanno dimostrato un'associazione tra κ -FLCs e il grado di disabilità irreversibile nei pazienti con SM. In particolare, i pazienti con SM con elevati livelli di κ -FLCs hanno raggiunto la disabilità più velocemente rispetto ai pazienti con bassi livelli di κ -FLCs, suggerendo che può essere un buon *marker* prognostico nella SM. Le concentrazioni di κ -FLCs nel liquor

hanno dimostrato di avere un significato prognostico per la disabilità futura a 2 anni ^(6,7).

Altri Autori hanno riportato che il rapporto $\kappa:\lambda$ FLC misurato al momento della rachicentesi diagnostica prevede la disabilità dell'EDSS a 5 anni dalla diagnosi. Infatti, i pazienti che presentano un rapporto $\kappa:\lambda$ FLC basso, hanno un profilo combinato di maggiore rischio di conversione da CIS, tassi di ricaduta più elevati, aumento della progressione della disabilità e maggiore richiesta di intervento terapeutico. Tali dati suggeriscono che questa caratteristica immunologica nella SM è altamente predittiva di malattia aggressiva e a prognosi sfavorevole, anche se vale la pena notare che solo la progressione della disabilità era significativamente diversa ⁽¹²⁾.

I dati sollevano un'intrigante possibilità che la diffusione del repertorio di anticorpi, a partire dall'uso predominante di catene leggere κ e portando a una miscela di κ e λ , possa essere coinvolta nella progressione della malattia e quindi nella patogenesi, con le restanti domande sulla specificità dell'antigene di questi anticorpi. La disponibilità di un *marker* prognostico nel CSF al momento della diagnosi sarebbe di chiara utilità.

Ora ci sono molte terapie altamente efficaci per la sclerosi multipla, che rendono difficile una scelta razionale per ogni singolo paziente, in particolare perché alcuni sono associati a un significativo profilo di eventi avversi. L'uso delle misurazioni del test κ e λ nel CSF alla diagnosi può aiutare ad identificare i pazienti con prognosi sfavorevole, che giustifica l'uso di terapie altamente efficaci, con potenziali benefici sugli esiti a lungo termine ⁽¹²⁾.

Conclusioni

L'analisi delle FLCs nel liquor riflette la sintesi intratecale di immunoglobuline. Il recente interesse per le FLCs è stato principalmente supportato dalla disponibilità di test automatizzati di facile e rapida esecuzione ⁽¹³⁾. Tuttavia, al momento il loro utilizzo clinico è limitato da fattori analitici e dall'assenza di valori di riferimento e di valori limite validati clinicamente ⁽¹⁴⁾.

D'altra parte, la valutazione delle OCB, considerata il *gold standard* per la dimostrazione della sintesi intratecale di Ig secondo le linee guida internazionali, è certamente una metodica laboriosa ed operatore-dipendente. Un'interpretazione fuorviante dei risultati del liquor può verificarsi, specialmente quando vengono rilevati *pattern* ambigui di OCB. In questi casi, la diagnosi di SM dovrebbe essere considerata con cautela e sarebbe auspicabile l'introduzione di un biomarcatore accurato, di più semplice esecuzione, e che fornisca anche valutazioni quantitative a supporto ^(14,15).

Già diversi anni or sono alcuni Autori hanno studiato 33 pazienti con SM clinicamente sospetta senza OCB e hanno riferito che il 54% di essi era positivo per κ -FLCs. Gli Autori concludevano che il rilevamento di κ -FLCs avrebbe potuto sostituire la ricerca delle OCB IgG specifiche nel liquor ⁽¹⁾. In effetti, il rilevamento della sintesi di FLC intratecale per scopi clinici di *routine* è significativo solo quando il test OCB IgG è negativo o *borderline* ⁽²⁾. Altri Autori hanno suggerito che un indice K elevato può, in effetti, essere un *marker* sensibile, anche se meno specifico, rispetto alla sintesi di IgG intratecale di OCB ^(16,17). Inoltre, nei pazienti con una sin-

gola banda di IgG CSF, l'indice K mostra un'eccellente specificità e un potere predittivo positivo per le condizioni in cui una sintesi intratecale di IgG è plausibile ⁽¹⁸⁾. Molto recentemente, nell'ottica di migliorare le *performance* diagnostiche delle FLCs, sono stati analizzati e comparati diversi parametri ad esse relativi, oltre la concentrazione totale, quali il quoziente FLC (FLC Q), FLC *index* e FLC *intrathecal fraction* (FLC-IF). Tutti mostravano una correlazione con la positività delle OCB, anche se FLC *index* e FLC-IF risultavano superiori per caratteristiche operative ⁽¹⁹⁾. Infine, altri Autori hanno sottolineato che solo la costruzione di un sistema di valutazione interpretativa non lineare, sulla base di più ampie coorti di pazienti affetti da SM ed altre malattie infiammatorie del SNC, potrà fornire la validazione definitiva di tale metodica ⁽²⁰⁾.

Dunque, i profili FLCs nei singoli pazienti con SM potrebbero essere utili nelle decisioni terapeutiche e nella generazione di nuove intuizioni sull'immunopatologia della SM. Grazie ai progressi della tecnologia, l'indice K può essere misurato rapidamente utilizzando un sistema automatizzato, in modo che questo test possa essere facilmente incorporato nella *routine* quotidiana dei laboratori di immunologia. Questo sarebbe un cambiamento rivoluzionario, che per essere accettato dovrebbe vedere i laboratoristi lavorare a stretto contatto con i clinici, affinché il dosaggio delle κ -FLCs possa essere incorporato nelle linee guida di consenso come alternativa alle OCB ⁽¹³⁾. Più in generale, sarebbe utile che i chimici clinici in collaborazione con i neurologi unissero i loro sforzi per impostare un pan-

nello di pochi, validati, biomarcatori con il miglior valore combinato possibile, sia diagnostico che prognostico, da utilizzare alla definizione diagnostica della SM ⁽⁴⁾.

In conclusione, la determinazione di FLC e indice K è un promettente ed economico approccio diagnostico per valutare la sintesi di immunoglobuline intratecali ⁽⁵⁾.

Ciononostante, le OCB presentano un'elevata prevalenza nella SM, a prova della sintesi intratecale delle IgG anche quando il valore delle FLCs è inferiore alla soglia, facendo considerare ragionevole, allo stato attuale, l'uso sequenziale di entrambi i metodi ^(6, 9). L'integrazione tra esame fisico, *imaging* e un indice FLC intratecale adeguatamente va-

lidato, insieme alle OCB del liquor, rappresenta una strategia promettente per guidare i medici verso una diagnosi precoce ed al tempo stesso supportata da valutazioni prognostiche, per la scelta sempre più precisa di trattamenti adeguati, al fine di migliorare la qualità della vita dei pazienti con SM e limitare la loro disabilità nel tempo ■

Bibliografia

- Goffette S, Schlupe M, Henry H, et al. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(2):308-10.
- Zeman D, Hradilek P, Kusnierova P, et al. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015;159(1):104-13.
- Passerini G, Dalla Costa G, Sangalli F, et al. Free Light Chains and Intrathecal B Cells Activity in Multiple Sclerosis: A Prospective Study and Meta-Analysis. *Mult Scler Int*. 2016;2016:2303857.
- Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study. *Mult Scler*. 2016;22(4):502-10.
- Zeman D. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Do we still need oligoclonal IgG? *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(7):1011-4.
- Crespi I, Vecchio D, Serino R, et al. K Index is a Reliable Marker of Intrathecal Synthesis, and an Alternative to IgG Index in Multiple Sclerosis Diagnostic Work-Up. *J Clin Med*. 2019;8(4). pii: E446.
- Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, et al. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2015;1:2055217315620935.
- Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, et al. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143375.
- Schwenkenbecher P, Konen FF, Wurster U, et al. The Persisting Significance of Oligoclonal Bands in the Dawning Era of Kappa Free Light Chains for the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12). pii: E3796.
- Kaplan B, Golderman S, Ganelin-Cohen E, et al. Immunoglobulin free light chains in saliva: a potential marker for disease activity in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2018;192(1):7-17.
- Ganelin-Cohen E, Golderman S, Yeskaraev R, et al. Search for new biomarkers of pediatric multiple sclerosis: application of immunoglobulin free light chain analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(7):1081-9.
- Rathbone E, Durant L, Kinsella J, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(10):1044-9.
- Gurtner KM, Shosha E, Bryant SC, et al. CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison with oligoclonal banding and other CSF indexes. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(7):1071-80.
- Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, et al. Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis Diagnosis: An Update. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(6). pii: E245.
- Senel M, Mojib-Yezdani F, Braisch U, et al. CSF Free Light Chains as a Marker of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in Multiple Sclerosis: A Blood-CSF Barrier Related Evaluation in a Large Cohort. *Front Immunol*. 2019;10:641.
- Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: a large multicenter study. *Mult Scler*. 2019;1352458519845844.
- Ferraro D, Bedin R, Natali P, et al. Kappa index versus cerebrospinal fluid IgG oligoclonal bands in everyday clinical practice: preliminary results of a prospective study. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;25(S2):357-580.
- Ferraro D, Bedin R, Natali P, et al. Evaluation of the kappa index in patients with a single cerebrospinal fluid IgG band. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;25(S2):357-580.
- Hegen H, Walde J, Milosavljevic D, et al. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(10):1574-86.
- Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, et al. Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid - The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clin Chim Acta*. 2019;497:153-62.