

## **Linee guida per l'analisi liquorale e la determinazione di bande oligoclonali nelle neuropatologie infiammatorie**

Questo documento presenta le linee guida per l'analisi del liquido cerebrospinale (CSF) e la determinazione di bande oligoclonali (OCB) come test cardine nella neuropatologie infiammatorie del sistema nervoso centrale. Le linee guida sono state sviluppate come risultato di un consenso basato su sondaggi, questionari, scambi digitali e in presenza mediante workshop durante i congressi dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI) e sono state pubblicate nel 2017 su *Neurological Sciences (Neurol Sci)* (2017) 38 (Suppl 2):S217–S224 DOI 10.1007/s10072-017-3034-2). Di quella pubblicazione queste linee guida sono la fedele traduzione con pochissime integrazioni.

Sono indicate a beneficio di neurologi e patologi clinici informazioni cliniche essenziali sulle patologie in cui è indicata l'analisi del liquido cerebrospinale e, in particolare, su quelle caratterizzate dalla presenza di OCB nel compartimento intratecale, indicazioni e limiti dell'analisi del liquido cerebrospinale e determinazione delle OCB, infine le istruzioni per l'interpretazione dei risultati e i protocolli di laboratorio concordati (Appendice).

### **Introduzione**

L'esame del liquido cerebrospinale (CSF) ha prodotto e continua a produrre una grande quantità di dati senza sostanziale standardizzazione di procedure e tecniche. Il consenso europeo sul liquido cerebrospinale nella diagnosi di sclerosi multipla (MS) [1] non ha risolto completamente le questioni relative alle procedure e alla standardizzazione delle metodiche e ha evidenziato la necessità di individuare linee guida tecniche e interpretative condivise [2]. Dal 2000, anno in cui l'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI) ha iniziato a promuovere e gestire il processo di standardizzazione dei metodi e di produzione di linee guida, il giudizio sulla qualità delle analisi del liquido cerebrospinale è cambiato da “quasi sufficiente”, come riportato nel 1995 in una indagine della Società Italiana di Biochimica Clinica [3], a “molto bene”, come estrapolato dai dati degli schemi di controllo qualità esterni AINI tra il 2000 e il 2014. In sintesi, i centri AINI (a) hanno applicato i principali principi metodologici e procedurali del Consenso del 1994 [1]; (b) utilizzano attualmente metodi standardizzati e certificati per le determinazioni di albumina e IgG, che consentono la valutazione del danno alla barriera emato-liquorale e della produzione intratecale di IgG; e (c) hanno sfruttato i miglioramenti dell'automazione nella focalizzazione isoelettrica (IEF), utilizzate da un numero crescente di centri. Nonostante gli strumenti semiautomatici per IEF utilizzino mini-gel che potrebbero funzionare in modo non ottimale [4], i controlli AINI mostrano che la qualità delle corse IEF sta migliorando negli anni.

Anche altri biomarcatori del liquido cerebrospinale necessitano di standardizzazione. In sclerosi multipla, ad esempio, la mancanza di standardizzazione è uno dei principali motivi che impediscono l'ingresso di nuovi biomarcatori nella diagnostica di routine. Altri motivi includono studi in cui i valori di cutoff per discriminare tra pazienti e controlli sono stati ottimizzati e poi applicati alle stesse coorti, aumentando così artificialmente la sensibilità e la specificità del test, e valutazioni di singoli biomarcatori invece di un insieme di biomarcatori, che avrebbero consentito di valutare il vero potere diagnostico di ciascuno di essi. Di conseguenza, una recente e completa la revisione della letteratura dimostra che non sono entrati nella routine diagnostica nuovi biomarcatori della SM, nonostante il test delle bande oligoclonali IgM nel liquido cerebrospinale siano il marker più promettente [5]. Ancora una volta, però, il test non ha mai subito un processo completo di validazione e standardizzazione.

### **Aspetti clinici e di laboratorio**

La valutazione delle prestazioni diagnostiche dei test del liquido cerebrospinale è complesso per i seguenti motivi: la puntura lombare è solitamente non ripetuta, i volumi di CSF ottenuti sono limitati, i campioni di liquor da controlli sani non sono facilmente disponibili e le anomalie del liquido cerebrospinale sono specifiche della malattia solo in pochi casi. Pertanto, oltre a bassi livelli di standardizzazione, i test del liquido cerebrospinale spesso mostrano una variabilità medio-alta tra gli studi in termini di sensibilità e specificità. Tutte queste considerazioni dovrebbero dettare richieste razionali per l'analisi del liquido cerebrospinale, che dovrebbe seguire una scrupolosa valutazione del contesto clinico e della prevalenza della malattia (Teorema di Bayes). Le principali condizioni patologiche per in cui è indicata la puntura lombare sono elencati in Tabella 1.

Una analisi urgente del liquido cerebrospinale, che include conta cellulare, glucosio, e la determinazione dell'albumina nel siero e nel liquido cerebrospinale (proteina totale del liquido cerebrospinale in alternativa), è obbligatoria in caso di sospetta meningite/meningoencefalite infettiva.

Determinazioni dell'albumina sierica e liquorale, con calcolo del quoziente di albumina, consentono la misurazione più accurata del grado di permeabilità della barriera emato-liquorale (che non corrisponde al danno della barriera emato-encefalica), e dovrebbe sostituire le proteine totali del liquido cerebrospinale nei disordini caratterizzati da produzione intratecale di IgG [1].

La standardizzazione completa dell'IEF è intrinsecamente impossibile a causa di fattori incontrollabili (conducibilità del gel, elettrodi, differenze da lotto a lotto per anfoliti, fenomeni di elettro endosmosi, temperatura/grado di umidità ambientale).

### **Encefaliti autoimmuni**

Per la diagnosi differenziale si raccomanda il test per gli autoanticorpi diretti contro gli antigeni neuronali di membrana/sinaptici di encefalite [6, 7]. Il test dei campioni di liquido cerebrospinale è obbligatorio per la rilevazione di anticorpi anti recettore del N-metil-D-aspartato (NMDAR), poiché sono stati riportati risultati falsi negativi nel 14% dei casi testando solo campioni di siero [8]. Risultati preliminari suggeriscono che ripetute titolazioni del liquido cerebrospinale di questi anticorpi possono fornire informazioni sulla prognosi e sulla risposta alla terapia [8].

### **Sclerosi multipla e bande oligoclonali**

Il consenso del 1994 contiene elementi seminali e principi ancora validi per l'analisi del liquido cerebrospinale ([1]; Appendice). Una raccomandazione fondamentale si riferisce all'uso della immunofissazione dopo la fase di focalizzazione isoelettrica per il rilevamento delle OCB. Nel 2005, il messaggio è stato rafforzato da un consenso congiunto nordamericano-europeo [9]. Lo schema che identifica cinque pattern per l'interpretazione del IEF rappresenta un altro essenziale contributo all'interpretazione delle OCB [1]. Sono state suggerite modifiche minori a questo schema (Appendice). La revisione del 2010 dei criteri di McDonald per la diagnosi di SM ha minimizzato il ruolo diagnostico dell'esame del liquido cerebrospinale, considerato come criterio di supporto solo per la diagnosi di SM primaria-progressiva [10]. I criteri considerano equivalenti CSF OCB e valori anormali dell'indice IgG, sebbene l'indice IgG sia meno sensibile delle OCB per la sintesi intratecale di IgG ed esista quindi un rischio di risultati falsi positivi in presenza di danno moderato/grave della barriera emato-liquorale [11]. La sostanziale esclusione dell'analisi del liquido cerebrospinale dai criteri diagnostici della SM ha generato pareri contrastanti (rivisto in [12]). In particolare, nei pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS), le OCB del liquido cerebrospinale aiutano a definire il rischio di conversione della SM con una sensibilità del 91% e una specificità del 94% [13], con una maggiore accuratezza rispetto al criterio di disseminazione spaziale della RM (70 vs 58%) e

con un miglioramento dell'accuratezza diagnostica globale [14]. Ancora più importante, l'esclusione di diagnosi alternative è fondamentale nei pazienti con CIS e in generale nei pazienti con sospetto di malattie infiammatorie del SNC e richiede l'analisi del liquido cerebrospinale [15]. In base a queste considerazioni le OCB sono state re-introdotte nella revisione 2017 dei criteri di McDonald come indice di disseminazione temporale anche nelle forme a ricadute e remissioni [16].

Dal lato prognostico, l'associazione tra assenza di OCB nel liquido cerebrospinale e prognosi benigna di SM [17], non è stata confermata [18]. Inoltre, alcuni studi hanno suggerito che le OCB del liquido cerebrospinale dell'isotipo IgM si associano a (a) forme di SM aggressive [19], (b) migliori risposte alle immunoterapie [20], (c) minori rischi di sviluppare una leucoencefalopatia multifocale progressiva in pazienti in trattamento con natalizumab [21], e (d) maggiore probabilità di raggiungere punteggi EDSS di 3.0/4.0 10 anni dopo l'esordio [22]. I dati sono in attesa di ulteriori conferme e consenso più ampio prima che il test IgM OCB entri nella pratica di routine [23].

### **Disturbi dello spettro della neuromielite ottica**

Il liquido cerebrospinale è meno sensibile del siero per la rilevazione di AQP4-IgG [24]. Il test del liquor è limitato ai pazienti sieronegativi con NMOSD in comorbilità con altre malattie autoimmuni, poiché queste malattie sistemiche possono essere associate alla circolazione di autoanticorpi che possono interferire con il rilevamento dell'anticorpo anti-AQP-4 [25].

### **Neuropatie infiammatorie**

Aumento dei valori delle proteine totali del liquido cerebrospinale o del quoziente di albumina con normale conta delle cellule del liquido cerebrospinale (dissociazione albumino-citologica) si riscontrano spesso in pazienti con sindrome di Guillain-Barré [27] o poliradicoloneuropatia demielinizzante infiammatoria cronica, in cui sono considerati uno dei criteri di supporto per la diagnosi [28].

## **Appendice**

### *1.0 Procedure preanalitiche*

- 1.1 La puntura lombare viene solitamente eseguita al mattino su pazienti a digiuno.
- 1.2 Il liquido cerebrospinale deve essere raccolto in vetro siliconato sterile/tubi in polipropilene (i tubi di vetro favoriscono l'adesione dei monociti).
- 1.3 I volumi di liquido cerebrospinale prelevato dalla zona lombare devono essere standardizzati (4–5 ml) e preferibilmente raccolti in un'unico tubo, a causa di quanto segue: i) Esiste un gradiente di concentrazione proteica tra il primo e l'ultimo millilitro di prelievo CSF [31]; volumi CSF standardizzati consentono confronti accurati sull'analisi di follow-up e nei contesti di ricerca. ii) la raccolta delle cellule del liquido cerebrospinale è massimizzata.
- 1.4 Quando sono richiesti test microbiologici, priorità assoluta viene data alla sterilità e allo scopo dovrebbe essere raccolta una ulteriore singola aliquota di CSF.
- 1.5 L'utilizzo di aghi atraumatici (ad es. Sprotte® 25S) può ridurre al minimo la frequenza della cefalea post-puntura lombare e consentire una raccolta sicura fino a 20 ml di CSF [30], utile per studi cellulari.
- 1.6 Un campione di sangue viene sempre prelevato contemporaneamente alla puntura lombare.
- 1.7 I campioni di sangue e CSF accoppiati devono essere inviati al laboratorio il prima possibile (entro 2 h dal prelievo).
- 1.8 Le procedure per l'invio dei campioni a laboratori esterni (microbiologia, patologia, ecc.) dovrebbero essere concordate preventivamente.
- 1.9 I campioni di sangue non devono essere emolizzati o lipemici.
- 1.10 In caso di puntura lombare traumatica o sospetta emorragia subaracnoidea:
  - i) Raccogliere campioni di liquido cerebrospinale in tre provette.
  - ii) Utilizzare la provetta meno contaminata per l'analisi.
  - iii) Una contaminazione non decrescente in tre tubi potrebbe indicare un'emorragia subaracnoidea, senza escludere una puntura lombare traumatica.
- 1.11 Campioni di liquido cerebrospinale contaminato da sangue:
  - i) Se è impossibile ottenere un campione non contaminato, campioni di liquido cerebrospinale contaminato da sangue vengono comunque analizzati (se non ci sono coaguli e sono chiare e incolori dopo centrifugazione).
  - ii) La correzione dei parametri del liquido cerebrospinale tenendo conto del numero di eritrociti non è accurata. Nessun risultato anormale può suggerire un CSF normale, d'altro canto le anomalie eventualmente riscontrate richiedono una interpretazione critica caso per caso in relazione ai reperti clinici e paraclinici.
  - iii) I campioni dovrebbero essere esclusi dai protocolli di ricerca.

### *2.0 Procedure analitiche*

- 2.1 Valutazione visiva e analisi spettrofotometrica
  - 2.1.1 Valutare l'aspetto e il colore prima e dopo la centrifugazione a 1500–3000 giri/min (circa 500×g) per 10 minuti.
  - 2.1.2 Per la raccolta di pellet cellulari, centrifugare campioni di liquido cerebrospinale con rotori basculanti.
  - 2.1.3 Le scale qualitative dovrebbero essere usate per l'aspetto (ad es. limpido, sublimpido, torbido) e il colore (ialino, xantocromico, eritrocromico).
  - 2.1.4 La spettrofotometria deve essere eseguita solo in sospetto emorragia subaracnoidea o per dimostrare precedenti emorragie [31]. Una TAC encefalo normale non esclude l'emorragia subaracnoidea.
    - i) Utilizzare campioni di liquido cerebrospinale centrifugato.
    - ii) Picchi spettrofotometrici a 415 e 460 nm indicano alti livelli di proteine totali (di solito a causa di danni alla barriera emato-liquorale).

iii) Picchi spettrofotometrici dei prodotti di degradazione dell'emoglobina (Hb): i primi metaboliti (4-8 giorni) Hb-ossidata e meta-Hb: 415, 540 e 580 nm indicano emorragia subaracnoidea recente; i metaboliti tardivi (15-20 giorni) bilirubina e composti della bilirubina: 350, 400 e 460 nm, indicano emorragia subaracnoidea tardiva.

## 2.2 cellule del liquido cerebrospinale

2.2.1 L'analisi delle cellule del liquido cerebrospinale deve essere eseguita entro 2 h dalla raccolta del liquido cerebrospinale [32].

2.2.2 Utilizzare almeno 100  $\mu$ L di campione di liquido cerebrospinale per il conteggio delle cellule, dopo una leggera agitazione del tubo.

2.2.3 Camere di conteggio consentite: Fuchs-Rosenthal, Bürker e Nageotte.

2.2.4 La soluzione di Turk (diluizione 1:1) aiuta a lisare gli eritrociti e a contrastare la colorazione delle cellule del liquido cerebrospinale.

2.2.5 Identificazione delle cellule del liquido cerebrospinale: dopo la prima centrifugazione del campione di liquido cerebrospinale, i pellet cellulari risultanti vengono ottenuti con citocentrifughe (citospin) o camere di sedimentazione (la ricerca di cellule tumorali dovrebbe essere eseguita da anatomopatologi).

2.2.6 Fissare i pellet cellulari con formaldeide al 10% (50  $\mu$ L) per una successiva analisi.

2.2.7 Colorare le cellule del liquido cerebrospinale con May-Grünwald-Giemsa (conta differenziale).

2.2.8 L'analisi morfologica delle cellule del liquido cerebrospinale è obbligatoria in sospetta carcinomatosi meningea anche in assenza di pleiocitosi.

2.2.9 La segnalazione della conta differenziale dei leucociti è facoltativa, se non richiesto dal sospetto clinico.

2.2.10 I citometri a flusso, utili per il conteggio e la fenotipizzazione delle cellule del liquido cerebrospinale, sono indispensabili per la valutazione clonalità delle cellule B in sospetti linfomi del SNC.

2.2.11 Nei campioni di liquido cerebrospinale contaminato da sangue, il numero degli eritrociti non aggiunge informazioni sul grado di contaminazione delle cellule del sangue.

## 2.3 Analisi biochimiche

2.3.1 Eseguire analisi biochimiche sui surnatanti di campioni di liquido cerebrospinale centrifugati.

2.3.2 Analizzare campioni accoppiati di siero e liquido cerebrospinale.

2.3.3 Test di base (glucosio, albumina, IgG)

2.3.3.1 Il rapporto siero-CSF del glucosio (glucosio CSF/glucosio sierico  $\times$  100) dovrebbe sostituire la glicorrachia (i livelli di glucosio nel liquido cerebrospinale dipendono fisiologicamente dai livelli di glucosio nel siero).

2.3.3.2 Il glucosio viene misurato con saggi colorimetrici negli analizzatori automatici.

2.3.3.3 Il danno alla barriera emato-liquorale può essere espresso come rapporto di albumina (Alb serum/Alb CSF), o quoziente di albumina (AlbCSF/Albserum)  $\times 10^3$  o  $\times 10^2$  [33].

2.3.3.4 Il grado di danno alla barriera emato-liquorale può essere espresso semiquantitativamente: normale per valori del quoziente di albumina fino allo 0,7%; modesto fino al 2,0%; moderato, fino al 5,0%; severo  $>5,0\%$  [34].

2.3.3.5 Per ridurre imprecisioni, albumina e IgG insiero e liquido cerebrospinale devono essere misurati con lo stesso metodo e sulla stessa corsa analitica.

2.3.3.6 Dovrebbe essere calcolata la sintesi di IgG intratecale con funzioni non lineari, come la formula di Reiber [11], che tengono conto del danno alla barriera emato-liquorale. L'indice IgG, o indice di Link, può dare risultati falsi positivi in presenza di danno moderato/grave della barriera emato-liquorale [35].

2.3.3.7 I metodi consentiti per la misurazione dell'albumina e delle IgG sono i seguenti: nefelometria, turbidimetria e immunodiffusione radiale.

#### 2.3.4 Altri test

2.3.4.1 La determinazione del lattato nel liquido cerebrospinale è facoltativa (utile in sospetta meningite/meningoencefalite settica, quando la terapia antibiotica eseguita prima della puntura lombare potrebbe aver normalizzato il rapporto glucosio nel liquido cerebrospinale/glucosio nel siero). A causa della idrofobicità del lattato, le concentrazioni di lattato nel liquido cerebrospinale sono indipendenti dai livelli sierici.

2.3.4.2 Le determinazioni di IgA e IgM nel liquido cerebrospinale sono facoltative (nessuna indicazione specifica).

#### 2.3.5 Calcolo della sintesi intratecale di anticorpi antigene-specifici

2.3.5.1 A partire da 3 a 4 settimane dopo l'insorgenza di meningoencefalite virale, le formule per la sintesi intratecale di anticorpi specifici per virus possono diventare positive e risultare di utilità diagnostica [35]. Nella neuroborreliosi e nelle encefaliti da West Nile virus, le determinazioni anticorpali sono obbligatorie dal punto di vista diagnostico, poiché le PCR sono spesso negative [36, 37].

2.3.5.2 In sospetta SM, il test per gli anticorpi anti-morbillo-varicella nel siero e CSF (reazione MRZ) dovrebbe essere limitato a casi atipici [38].

2.3.5.3 I test per gli anticorpi antigene-specifici dovrebbero essere preferibilmente eseguiti in laboratori specializzati di Centri di Malattie Infettive.

2.3.5.4 La sintesi intratecale di anticorpi antigene-specifici può essere calcolata come segue [39]:

i) Determinare la concentrazione totale di IgG in siero e liquido cerebrospinale.

ii) Diluire i campioni di siero in modo che la concentrazione sierica totale di IgG eguagli la concentrazione totale di IgG nel liquido cerebrospinale.

iii) Testare campioni di siero e liquor su ELISA per IgG antigene-specifiche; esprimere risultati in densità ottica (OD); diluire e ripetere il test dei campioni se i valori di assorbanza sono al di fuori delle parti lineari della curva standard.

iv) Indice di anticorpi antigene-specifici: Il rapporto  $OD_{CSF}/OD_{siero} > 1,5-2,0$  indica la sintesi intratecale di anticorpi antigene-specifici (il cutoff tiene conto della imprecisione nella misurazione delle IgG totali e di quelle antigene-specifiche).

2.3.5.5 È possibile utilizzare il blotting capillare per immunoaffinità per la rilevazione di OCB antigene-specifici [40]. Richiede molto lavoro, grandi quantità di proteine/peptidi/lisati virali dà risultati di limitata utilità nella pratica di routine.

#### 2.4 Determinazione delle bande IgG oligoclonali

2.4.1 Gel di agarosio o poliacrilammide per IEF (intervallo di pH, 3.0–10.0; sono consentite dimensioni standard, intermedie (midigel) e piccole (mini-gel)), sia artigianali che commerciali.

2.4.2 Sono consentiti sia gli apparati IEF automatizzati che non automatizzati.

2.4.3 Devono essere caricati sulle corsie adiacenti del gel uguali quantità di IgG del siero e del corrispondente CSF.

2.4.4 La quantità di IgG del siero e del liquido cerebrospinale da caricare sul gel variano in base alle diverse sensibilità dei metodi di colorazione (non è consentito concentrare il campione di liquido cerebrospinale).

2.4.5 Fare riferimento ai protocolli pubblicati per il blotting e le procedure di rilevamento specifiche per IgG [41]. Per gli strumenti semiautomatici, seguire le istruzioni del produttore.

2.4.6 È obbligatorio utilizzare tecniche di colorazione per IgG molto sensibili (ad esempio, perossidasi, avidina-biotina, chemiluminescenza).

2.4.7 Gli standard di pH sono utili per l'impostazione dell'IEF.

2.4.8 La corsa ad alto voltaggio richiede un efficiente raffreddamento della piastra IEF. Arresta l'esecuzione dell'IEF quando i valori bassi di amperaggio sono stabili per 10 min. L'arresto

anticipato può causare focalizzazione OCB parziale, mentre il protrarsi eccessivo può risultare in distorsione delle OCB.

2.4.9 Gel di agarosio: asciugare regolarmente l'area catodica, dove i fenomeni di elettroendosmosi producono acqua, per prevenire la mancanza di focalizzazione o la distorsione delle OCB.

2.5 Interpretazione dei pattern di bande IgG oligoclonali

2.5.1 Interpretazione IEF, che non richiede densitometri (gli occhi umani sono migliori nella discriminazione del contrasto), deve essere eseguita da due operatori esperti. Particolare attenzione dovrebbe essere prestata alle bande artefatte prodotte dalla mancanza di omogeneità del gradiente di pH, a causa della debolezza regionale della conduttività all'interno del gel; i controlli OCB-negativi consentono il riconoscimento di tali bande.

2.5.2 Adottare il seguente modello di classificazione: [1]

i) Tipo 1, distribuzione IgG policlonale diffusa sia nel liquido cerebrospinale che nel siero (assenza di sintesi intratecale di IgG, pattern normale).

ii) OCB di tipo 2, univoche per CSF (presenza di sintesi intratecale di IgG, tipica di processi immunoinfiammatori subacuti/cronici del SNC con compartimentalizzazione intratecale della risposta immunitaria).

iii) Tipo 3, il cosiddetto schema misto, OCB univoche nel CSF in aggiunta ad OCB uguali in siero e liquido cerebrospinale (presenza di sintesi IgG intratecale, tipica di processi immunoinfiammatori acuti/subacuti del SNC con persistenza della risposta immunitaria a livello sistemico).

iv) Tipo 4, il cosiddetto schema a specchio, OCB uguali nel siero e nel liquido cerebrospinale (assenza di sintesi intratecale di IgG, tipico di processi immuno-infiammatori sistemici, con o senza coinvolgimento del SNC e con produzione sistemica di OCB).

v) Tipo 5, il pattern delle paraproteine, OCB uguali nel siero e nel liquido cerebrospinale in modo simile al pattern 4, ma con spaziatura regolare e periodica ed intensità decrescente (assenza di sintesi IgG intratecale, presenza di gammapatia monoclonale).

2.5.3 Un test OCB positivo è definito dalla presenza di almeno due bande oligoclonali.

2.5.4 Non considerato nel consenso del 1994 [1], singole bande nel CSF, con o senza bande uguali nel siero e CSF, possono essere rilevate e devono essere segnalate. Potrebbero associarsi alla SM [42-44]. È consigliabile, in questo caso, una ulteriore analisi del liquido cerebrospinale successiva.

2.5.5 Dati i limiti degli occhi umani, l'interpretazione di "bande deboli" non possono essere standardizzate. Un riesame con quantità di IgG aumentate (sebbene comporti anche un aumento del fondo IgG policlonale), è consigliabile.

2.5.6 Danno moderato/severo della barriera emato-liquorale o campioni di liquido cerebrospinale contaminato da sangue possono ridurre la possibilità di rilevare OCB, a causa dell'aumentata quantità di IgG policlonali derivate dal sangue (per essere rilevabili, gli OCB devono emergere da sfondi IgG policlonali).

2.5.7 Non considerato nel consenso del 1994 [1], OCB uguali nel siero e nel liquido cerebrospinale, ma più intense nel liquido cerebrospinale potrebbero indicare la sintesi intratecale di IgG, poiché vengono confrontate quantità uguali di IgG sieriche e liquorali. Tuttavia, le misurazioni delle IgG e la diluizione dei campioni possono essere imprecise, rendendo così inaffidabile il confronto di diverse intensità delle OCB nel CSF vs il corrispondente siero. È consigliabile, anche in questo caso, una ulteriore analisi del liquido cerebrospinale successiva.

2.5.8 La riproducibilità inter-laboratorio per le OCB è bassa [2, 45], limitando così gli studi multicentrici.

3.0 *Controllo qualità e conservazione dei campioni*

3.1 Biochimica e proteine

- 3.1.1 Dovrebbero essere inclusi controlli interni (ad es. campioni di liquido cerebrospinale).
- 3.1.2 Controlli di qualità esterni: seguire le regole per l'accreditamento del laboratorio.
- 3.2 Focalizzazione isoelettrica
  - 3.2.1 Includere positivi (ad es. siero con monoclonale IgG) e controlli negativi.
  - 3.2.2 Il controllo di qualità esterno per le OCB dovrebbe essere pianificato almeno annualmente (es. controllo qualità AINI).
  - 3.2.3 I campioni di siero e liquor devono essere conservati in aliquote a -20 °C, preferibilmente a -80 °C.
- 4.0 *Referto*
  - 4.1. Devono essere riportate le seguenti informazioni:
    - 4.1.1 Data e ora della puntura lombare.
    - 4.1.2 Sito anatomico di origine del campione di CSF (lombare, ventricolare, cistico).
    - 4.1.3 Provetta su cui viene eseguita l'analisi (ad es. unica, terza).
    - 4.1.4 Aspetto e colore del liquor prima e dopo centrifugazione.
    - 4.1.5 Metodi utilizzati per le determinazioni biochimiche-immunologiche.
    - 4.1.6 Tipo di camera/citofluorimetro per conteggio delle cellule del liquido cerebrospinale.
    - 4.1.7 Valori di riferimento per ogni determinazione.
    - 4.1.8 Descrizione morfologica del CSF e interpretazione dell'IEF.
    - 4.1.9 Commenti (facoltativo).
  - 4.2 I valori di riferimento dei parametri del CSF dovrebbero essere valutati in appropriati gruppi di controllo (pazienti malati e controlli sani) per ciascun laboratorio. Possono essere adottati valori di riferimento dai dati pubblicati sia per pazienti adulti che pediatrici. Negli adulti con l'età >60 anni, la diminuzione fisiologica del flusso liquorale provoca aumenti dei valori del quoziente di albumina (QA), che può quindi essere non indicativo di danno della barriera emato-liquorale. Per una definizione più precisa del limite di riferimento del QA è stata proposta la formula  $QA = età/25 + 8$ .  
[46].
  - 4.3 Le OCB possono essere valutate semiquantitativamente come segue: (a) singola banda; (b) due bande; (c) alcune bande (n = 3–6); (d) numerose bande (n > 6).
  - 4.4 I rapporti possono contenere la frase: Questo laboratorio segue procedure e metodi standardizzati per conto dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (data dell'ultima revisione) e partecipa ai sistemi di controllo della qualità esterni promossi dall'Associazione.

## Referenze

1. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J et al (1994) Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:897–902
2. Sellebjerg F, Christiansen M (1996) Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 56:135–143
3. Nespolo A, Bernardi G (1995) Lo studio delle proteine liquorali: aspetti fisiopatologici e nuove prospettive diagnostiche. Corso CEFAR 1995: Le proteine dal laboratorio alla clinica
4. Reiber H (1995) External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 41:256–263
5. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J (2015) Body fluid biomarkers for multiple sclerosis—the long road to clinical application. *Nat Rev Neurol* 11:585–596
6. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D et al (2010) Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, populationbased prospective study. *Lancet Infect Dis* 10:835–844
7. Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA (2012) The frequency of autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis* 54: 899–904
8. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F et al (2014) Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 13:167–177
9. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G et al (2005) Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 62:865–870
10. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302
11. Reiber H, Felgenhauer K (1987) Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 163: 319–328
12. Hutchinson M (2013) CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: commentary. *Mult Scler* 19:719–720
13. Masjuan J, Alvarez-Cermeno JC, Garcia-Barragan N, DiazSanchez M, Espino M, Sadaba MC et al (2006) Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 66:576–578
14. Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M et al (2009) The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 15: 472–478
15. Milo R, Miller A (2014) Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13:518–524
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. (2017) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17:162-173.
17. Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ (2009) CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:292–296
18. Siritho S, Freedman MS (2009) The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 279:21–25

19. Thangarajh M, Gomez-Rial J, Hedstrom AK, Hillert J, AlvarezCermeno JC, Masterman T et al (2008) Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:1208–1213
20. Garcia-Barragan N, Villar LM, Espino M, Sadaba MC, GonzalezPorque P, Alvarez-Cermeno JC (2009) Multiple sclerosis patients with anti-lipid oligoclonal IgM show early favourable response to immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol* 16:380–385
21. Villar LM, Costa-Frossard L, Masterman T, Fernandez O, Montalban X, Casanova B et al (2015) Lipid-specific immunoglobulin M bands in cerebrospinal fluid are associated with a reduced risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy during treatment with natalizumab. *Ann Neurol* 77:447–457
22. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E (2008) A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol* 255:1023–1031
23. Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D (2017) An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 17:31–46
24. Majed M, Fryer JP, McKeon A, Lennon VA, Pittock SJ (2016) Clinical utility of testing AQP4-IgG in CSF: guidance for physicians. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3:e231
25. Wingerchuk D, Banwell B, Bennett J, Cabre P, Carroll W, Chitnis T et al (2015) International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85:177–189
26. Stoeck K, Sanchez-Juan P, Gawinecka J, Green A, Ladogana A, Pocchiari M et al (2012) Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years. *Brain* 135:3051–3061
27. Fokke C, van den Berg B, Drenthen J, Walgaard C, van Doorn PA, Jacobs BC (2014) Diagnosis of Guillain-Barré syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain* 137:33–43
28. Joint Task Force of the EFNS and the PNS (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society—first revision. *J Peripher Nerv Syst* 15:1–9
- 29 32. Martino G, Grimaldi LM, Muiola L, Filippi M, Martinelli V, Comi G et al (1990) Discontinuous distribution of IgG oligoclonal bands in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 30:129–134
30. Bertolotto A, Malentacchi M, Capobianco M, di Sapio A, Malucchi S, Motuzova Y et al (2016) The use of the 25 Spotte needle markedly reduces post-dural puncture headache in routine neurological practice. *Cephalalgia* 36:131–138
31. Cruickshank AM (2001) ACP best practice no 166: CSF spectrophotometry in the diagnosis of subarachnoid haemorrhage. *J Clin Pathol* 54:827–830
32. Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR (1986) Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 23: 965–966
33. Tibbling G, Link H, Ohman S (1977) Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 37:385–390
34. Thompson E (1988) *The CSF proteins: a biochemical approach*. Elsevier, Amsterdam
35. Gregoire SM, van Pesch V, Goffette S, Peeters A, Sindic CJ (2006) Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 938–942

36. Koedel U, Fingerle V, Pfister HW (2015) Lyme neuroborreliosis epidemiology, diagnosis and management. *Nat Rev Neurol* 11:446–456
37. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB et al (2006) West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol* 60:286–300
38. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, Rauer S, Eckenweiler M, Huzly D et al (2015) The intrathecal, polyspecific antiviral immune response in neurosarcoidosis, acute disseminated encephalomyelitis and autoimmune encephalitis compared to multiple sclerosis in a tertiary hospital cohort. *Fluids Barriers CNS* 12:27
39. Reiber H, Lange P (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 37:1153–1160
40. Dorries R, Ter Meulen V (1984) Detection and identification of virus-specific, oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. *J Neuroimmunol* 7:77–89
41. Olsson T, Kostulas V, Link H (1984) Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling, and avidin-biotin amplification. *Clin Chem* 30:1246–1249
42. Davies G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G (2003) The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 60:1163–1166
43. Franciotta D, Bergamaschi R, Amato MP, Zardini E, Persico A, Portaccio E et al (2005) Clinical correlations of CSF single IgG bands. *J Neurol* 252:1274–1275
44. Ferraro D, Franciotta D, Bedin R, Solaro C, Cocco E, Santangelo M et al (2017) A multicenter study on the diagnostic significance of a single cerebrospinal fluid IgG band. *J Neurol* 264:973–978
45. Franciotta D, Avolio C, Lolli F (2005) Between-laboratory variability in oligoclonal IgG band numbering. *Clin Chem* 51:270–272
46. Hegen H, Auer M, Zeileis A, Deisenhammer F (2016) Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clin Chem Lab Med* 54:285–292