

09
GIUGNO
2017

CREMONA

AUDITORIUM
Museo del Violino
Piazza Marconi

**LE PATOLOGIE
DELLA MIELINA:
GLI STRUMENTI
PER LA DIAGNOSI
DIFFERENZIALE**

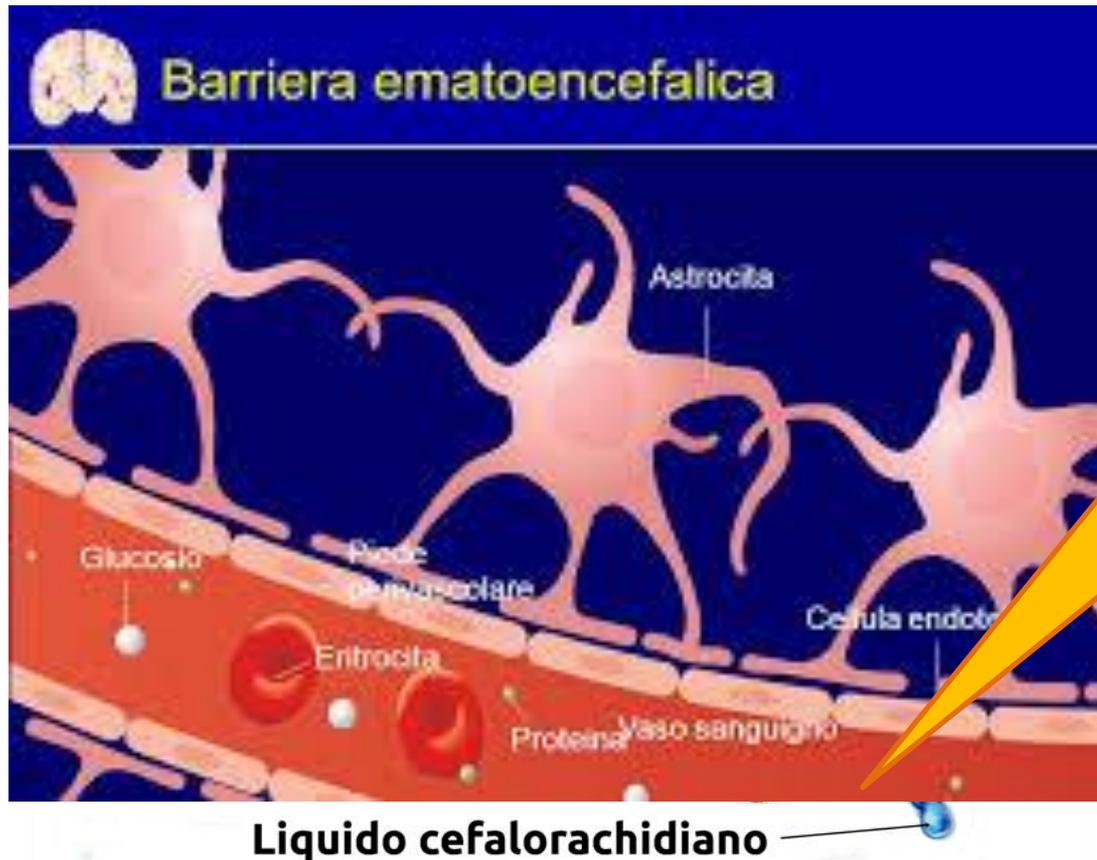
DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLA MALATTIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE:

IL RUOLO DELLA DIAGNOSTICA LIQUORALE

Nicola De Rossi

Centro Sclerosi Multipla - Spedali
Civili di Brescia

Il Liquor cefalorachidiano



L'integrità della barriera determina il contenuto qualitativo e quantitativo totale delle molecole liquorali

- Volume totale 125-150 ml
- Il liquor viene rinnovato circa 4 volte al giorno
- La produzione giornaliera di liquor è di 600 mL
- Il Turnover del LCR nel SNC è di circa 6 ore
- Il Turnover del LCR lombare è di circa 3 giorni

Rapporto di concentrazione

Index= Q (Sostanza)/ Q (Albumina)

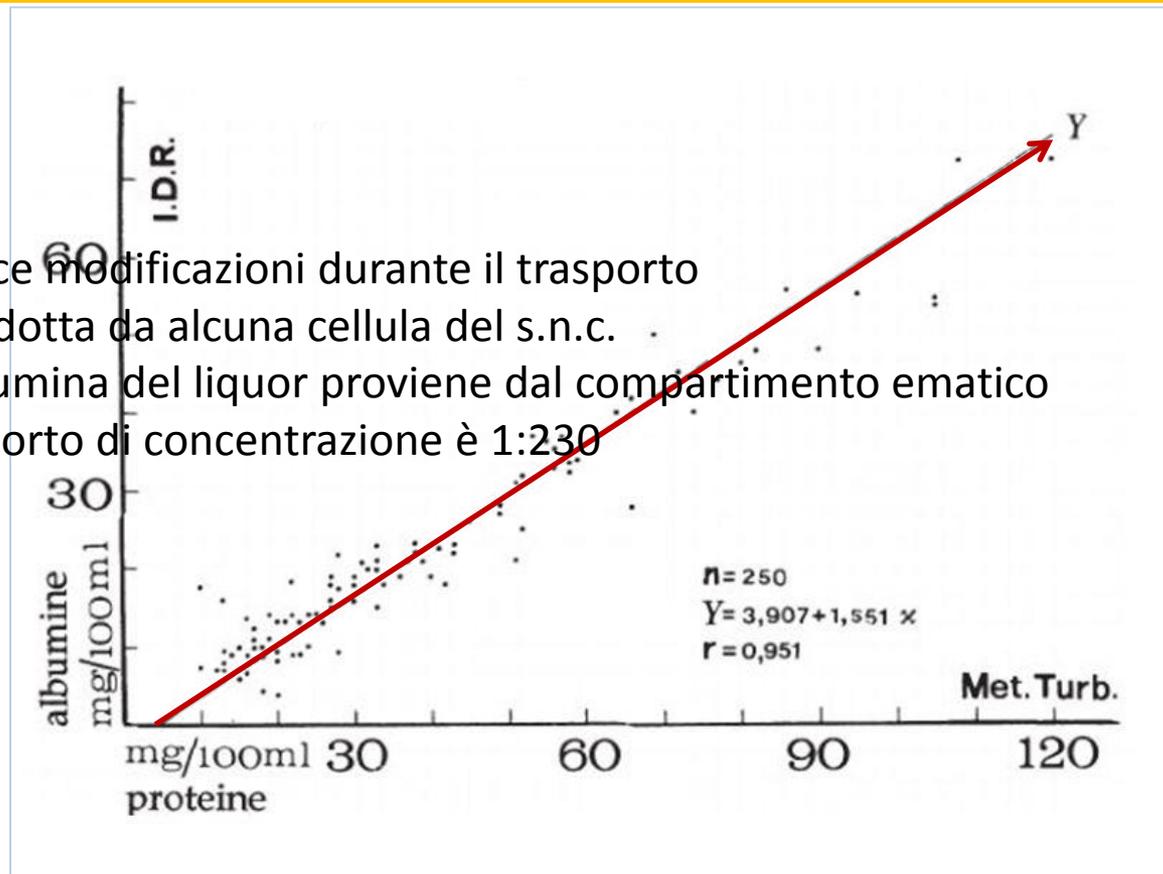
Dove

Quoziente (Sostanza) = liquor/siero x 100

Quoziente (Albumina) = Albumina Liquor / Albumina Siero x 100 (v.n. < 0,7)

Albumina:

- Non subisce modificazioni durante il trasporto
- Non è prodotta da alcuna cellula del s.n.c.
- Tutta l'albumina del liquor proviene dal compartimento ematico
- Il suo rapporto di concentrazione è 1:230



Sintesi intratecale di IgG

Un aumento patologico della concentrazione di una sostanza nel liquor dipende dal verificarsi di due situazioni:

- Danno di barriera
- Sintesi intratecale

- Le IgG nel liquor provengono dal plasma dopo il transito attraverso la barriera emato-liquorale
- L'incremento delle IgG nel liquor dei pazienti con Sclerosi Multipla può essere definito in termini assoluti e in rapporto al contenuto proteico
- Il rapporto di concentrazione medio esistente tra i due compartimenti, per le IgG, è 1:369

Formule per il calcolo della sintesi intratecale delle IgG

Tutte le formule proposte per stabilire l'entità della sintesi intratecale delle IgG calcolano la concentrazione delle IgG in funzione del rapporto di concentrazione tra i compartimenti liquorale e plasmatico dell'albumina

IgG index (Delpech & Lichtblau, 1972)

$$Q_{\text{IgG}}/Q_{\text{alb}}$$

IgG synthesis rate (Tourtellotte, 1975)

$$[(\text{IgG}_{\text{liq}} - \text{IgG}_{\text{sie}}/369) - (\text{alb}_{\text{liq}} - \text{alb}_{\text{sie}}/230) \times (\text{IgG}_{\text{sie}}/\text{alb}_{\text{sie}}) \times 0.43] \times 5$$

IgG hyperbolic functions (Reiber & Felgenhauer, 1987)

$$\text{IgG}_{\text{loc}} = [Q_{\text{IgG}} - Q_{\text{lim}}(\text{IgG})] \times \text{IgG}_{\text{sie}}$$

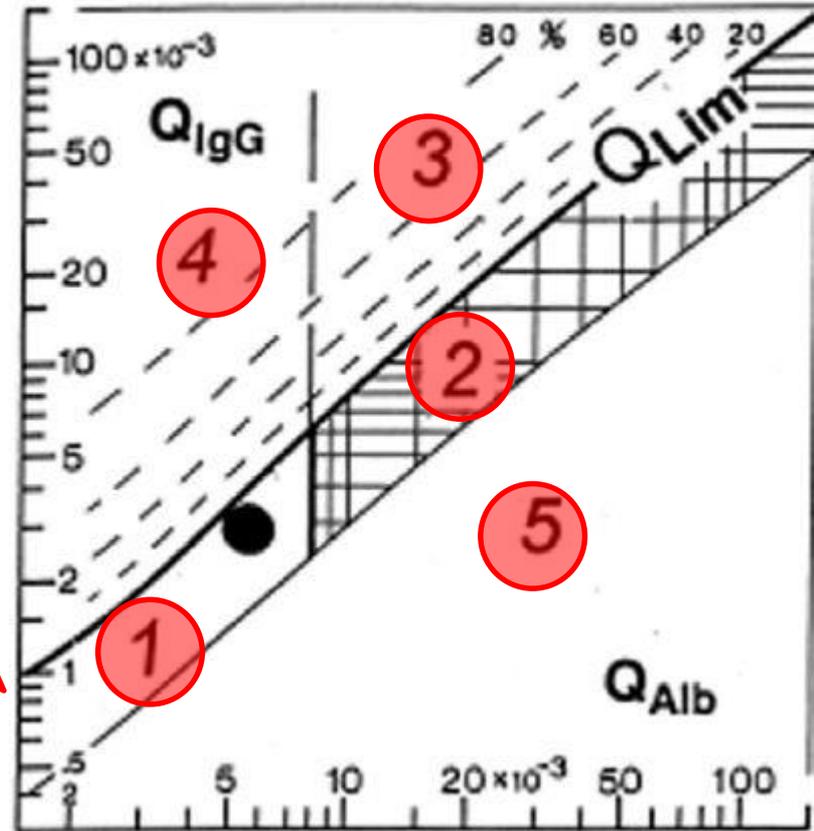
$$\text{dove } Q_{\text{lim}}(\text{IgG}) = 0.93 \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 6 \times 10^6} - 1.7 \times 10^3$$

L'espressione quantitativa della sintesi intratecale di IgG si ottiene utilizzando funzioni non lineari (iperboliche), come la formula di Reiber, oppure lineari (Formula di Link)

Formula di **Tourtellotte**: si riferisce alla produzione giornaliera

Formula di **Reiber** e Indice di **Link**: si riferiscono alla situazione presente al momento del prelievo

ATT: La funzione iperbolica evita i falsi positivi che si ottengono con le funzioni lineari in presenza di moderato o grave danno di barriera



Bande Oligoclonali

Clin. exp. Immunol. (1970) 7, 365–372.

ELECTROPHORETIC DISTRIBUTION OF KAPPA AND LAMBDA IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN DETERMINANTS IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID IN MULTIPLE SCLEROSIS

O. ZETTERVALL AND H. LINK

Department of Neurology,

Nella maggior parte dei pazienti con Sclerosi Multipla, la zona gamma del tracciato elettroforetico liquorale presentava numerose bande, assenti nel tracciato sierico dello stesso paziente

The electrophoretic distribution of Kappa and Lambda light chain antigenic determinants were studied in cerebrospinal fluid (CSF) and serum from cases with abnormal Immunoglobulin G patterns on agar gel electrophoresis of CSF. Electrophoretically homogeneous immunoglobulin fractions containing an excess of either Kappa or Lambda determinants were found in CSF but not in serum. The findings indicate the production of monoclonal immunoglobulins within the central nervous system in multiple sclerosis.

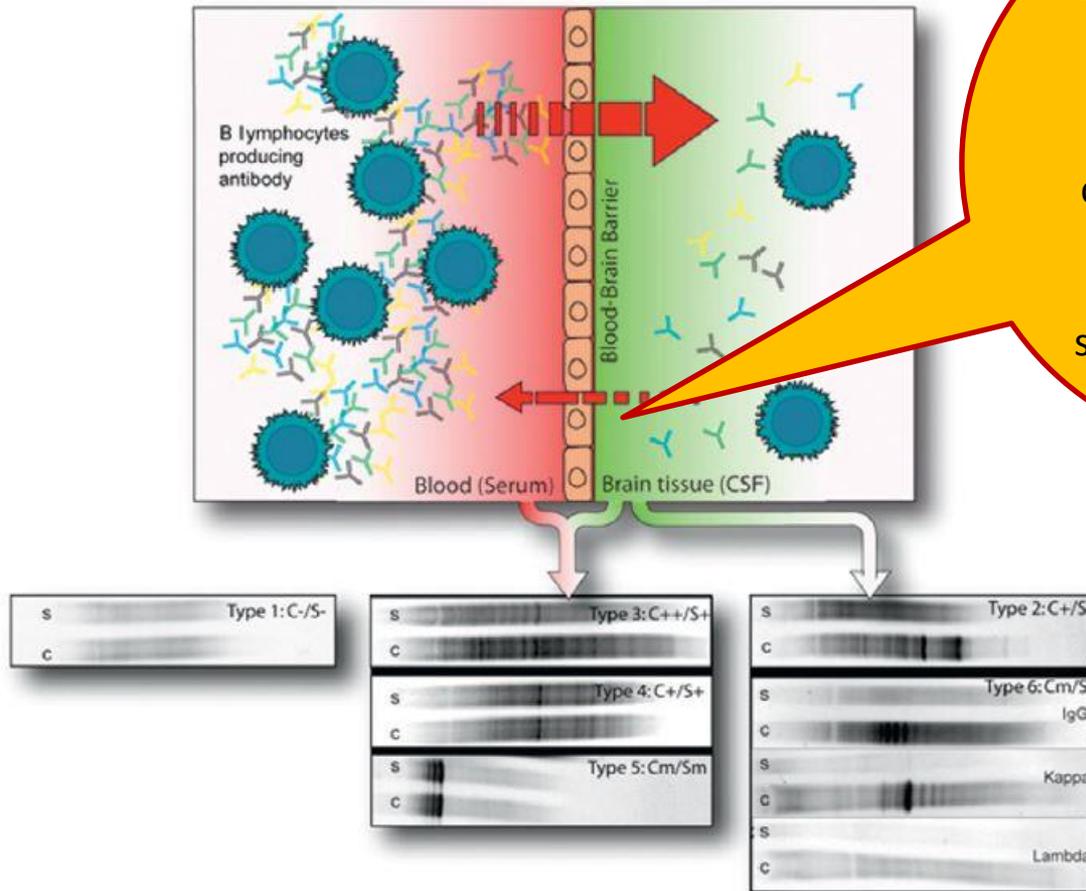
Determinazione qualitativa liquorale

Le Bande Oligoclonali liquorali sono formate da immunoglobuline, generalmente IgG, che migrano nella regione γ in elettroforesi o nella regione catodica dell'isoelettrofocusing

Identificano la sintesi immunoglobulinica intratecale con maggior sensibilità rispetto agli indici calcolati (Reiber e Link) → dato essenziale per confermare o escludere un'attivazione immunitaria all'interno del s.n.c.

La tecnica di separazione raccomandata per la determinazione delle bande oligoclonali IgG è l'isoelettrofocusing (Consensus Europeo 1994)

Elettroforesi proteica



Le Bande Oligoclonali sono l'espressione dell'attività di pochi cloni plasmacellulari che si espandono nel compartimento liquorale, in quello sierico od in entrambi

Elettroforesi proteica

Tipo 1:
Normale



Tipo 6: Pattern monoclonale di IgG solo liquorale, indicando una sintesi intratecale monoclonale di IgG (rappresenta spesso una fase precoce di un'evoluzione oligoclonale; raramente un linfoma a cellule B intratecale)

Tipo 4 («Mirror Pattern»): Le B.O. nel liquor sono identiche a quelle sieriche; ciò è indicativo di un trasferimento passivo di IgG oligoclonali in risposta ad una infiammazione sistemica (Guillain-Barrè)

A multicenter study on the diagnostic significance of a single cerebrospinal fluid IgG band

Diana Ferraro¹  · Diego Franciotta² · Roberta Bedin¹ · Claudio Solaro³ · Eleonora Cocco⁴ · Mario Santangelo⁵ · Paolo Immovilli⁶ · Alberto Gajofatto⁷ · Massimiliano Calabrese⁷ · Massimiliano Di Filippo⁸ · Riccardo Orlandi⁷ · Anna Maria Simone¹ · Francesca Vitetta¹ · Elisabetta Capello⁹ · Debora Giunti⁹ · Alessandra Murialdo¹⁰ · Jessica Frau⁴ · Sara Mariotto⁷ · Antongiulio Gallina⁸ · Claudio Gasperini¹¹ · Patrizia Sola¹ · On behalf of the RIREMS group (Rising Italian Researchers in Multiple Sclerosis)

Received: 13 March 2017 / Accepted: 30 March 2017

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Table 3 Studies exploring the frequency and diagnostic meaning of single cerebrospinal fluid-restricted IgG bands

Authors	N/total (%)	MS N (%)	CNS inflammatory/autoimmune/paraneoplastic disease N (%)	PNS inflammatory disease N (%)	CNS infection N (%)	CNS tumour N (%)	Seemingly unrelated disease N (%)
McCombe et al. [8]	3/1490 (0.2%)	–	1 (33)	1 (33)	–	1 (33) (lymphoma)	–
Ben-Hur et al. [4]	33/6000 (0.6%) (20 with diagnosis)	7 (35)	9 (45)	3 (15) (1 had MS too)	–	–	2 (10) ^a
Franciotta et al. [7]	61/3273 (1.9%)	27 (44)	8 (13)	1 (2)	16 (26)	–	9 (15) ^b
Davies et al. [5]	31 (27 with diagnosis)	3 (11)	7 (26)	–	4 (15)	1 (4) (lymphoma)	12 (44) ^c

- Approssimativamente 1/3 dei pazienti con singola banda IgG converte a pattern oligoclonale entro 6 mesi
- Questi casi tipicamente hanno una Sclerosi Multipla in fase precoce (CIS) o una forma progressiva
- Nel caso di riscontro di singola banda IgG si consiglia la ripetizione dell'analisi liquorale dopo 6-12 mesi

Caratteristiche del liquor nella Sclerosi Multipla

Alterazione del CSF

- Presenza di bande oligoclonali
- Aumento dell'indice di Link
- Aumento delle IgG/albumina

Un aumento delle proteine del CSF si trova in ¼ dei pazienti con SM, sebbene livelli >1 g/L siano veramente rari (Tourtellotte, 1970)

Un numero di leucociti <5 cell/mm³ si riscontra in circa 1/3 dei pazienti con SM, soprattutto se con lesioni acute midollari (Freedman et al. 2005). Valori superiori a 50 cellule/mm³ dovrebbero suggerire una diagnosi differente

80%
70%
60%
50%
30%

Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria

Chris H. Polman, MD, PhD,¹ Stephen C. Reingold, PhD,² Brenda Banwell, MD,³ Michel Clanet, MD,⁴ Jeffrey A. Cohen, MD,⁵ Massimo Filippi, MD,⁶ Kazuo Fujihara, MD,⁷ Eva Havassy, MD,¹⁰

Emmanuel
New evidence
The use of
simplified,
revisions simplify
populations

TABLE 1: 2010 McDonald MRI Criteria for

TABLE 2: 2010 McDonald MRI Criteria for Demonstration of DIT

DIT Can Be Demonstrated by:

1. A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, with reference to a baseline scan, irrespective of the timing of the baseline MRI
2. Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time

Based on Montalban et al 2010.²⁴
MRI = magnetic resonance imaging; DIT = lesion dissemination in time.

y, MD¹⁸
le sclerosis.
e has been
can. These
ility across
:69:292-302

Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria

Chris H. Polman, MD, PhD,¹ Stephen C. Reingold, PhD,² Brenda Banwell, MD,³ Michel Clanet, MD,⁴ Eva Havrdová,⁵ et al. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2011;82:1973-1978

TABLE 3: 2010 McDonald Criteria for Diagnosis of MS in Disease with Progression from Onset

2. Plus 2 of the 3 following criteria^a:
- A. Evidence for DIS in the brain based on ≥ 1 T2^b lesions in at least 1 area characteristic for MS (periventricular, juxtacortical, or infratentorial)
 - B. Evidence for DIS in the spinal cord based on ≥ 2 T2^b lesions in the cord
 - C. Positive CSF (isoelectric focusing evidence of oligoclonal bands and/or elevated IgG index)

^aIf a subject has a brainstem or spinal cord syndrome, all symptomatic lesions are excluded from the Criteria.
^bGadolinium enhancement of lesions is not required.
MS = multiple sclerosis; PPMS = primary progressive MS; DIS = lesion dissemination in space; CSF = cerebrospinal fluid; IgG = immunoglobulin G.

E' in corso la revisione dei criteri di McDonald del 2010, con evidenza di nuovi dati di utilità del CSF nella diagnosi di SM e con la necessità di enfatizzarne il suo valore (Cohen et Lublin F.D., maggio 2017)

Gli ultimi studi suggeriscono che una liquor negativo occorre differenziare rispetto alle forme di PPMS con liquor positivo

New evidence and consequences
The use of imaging for diagnosis
simplified, and in some cases
revisions simplify the Criteria
populations, and may allow

Bande Oligoclonali nelle malattie autoimmuni

L'assenza di BO nel liquor suggerisce la possibilità di una diagnosi differente, la presenza supporta fortemente la diagnosi di SM

Disorder	Approximate incidence of oligoclonal bands (%)
Multiple sclerosis	95
Autoimmune	
Neuro-SLE	50
Neuro-Behçet's	20
Neuro-sarcoid	<5
Harada's meningitis- uveitis	60
Infectious	
Acute viral encephalitis	<5

Reference	Total number of cases	Number of MS cases	Sensitivity	Specificity
Kostulas et al. (1987)	1114	58	100%	—
McLean et al. (1990)	1007	82	95%	—
Ohman et al. (1992)	558	112	96%	—
Beer et al. (1995)	189	98	—	87%
Paolino et al. (1996)	44	26	—	86%

Hereditary

Ataxia-telangiectasia	60
Adrenoleukodystrophy	100

SLE, systemic lupus erythematosus; AIDS, acquired immunodeficiency syndrome.

Reproduced from [Giovannoni et al. \(1998\)](#).

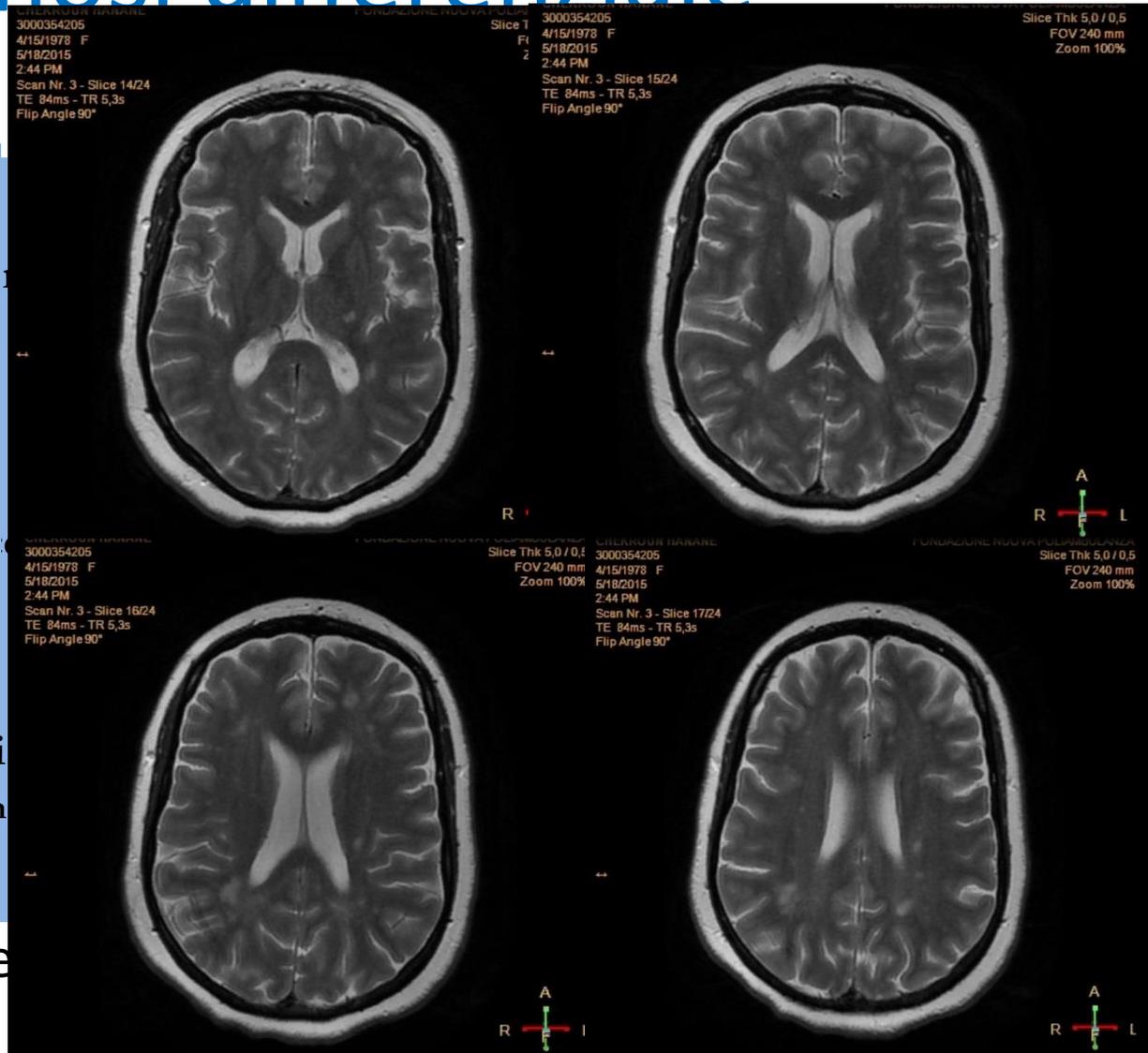
Diagnosi differenziale

Liquor: BO negative, Link 0,5, cellule 540 u/L; assenti bande oligoclonali ad esclusiva sintesi intratecale. Indice di Link 0,5 (esame ripetuto a 6 giorni di distanza con netta riduzione della componente cellulare)

2

Gli anticorpi anti affetti da SM (Barn

— Embolie



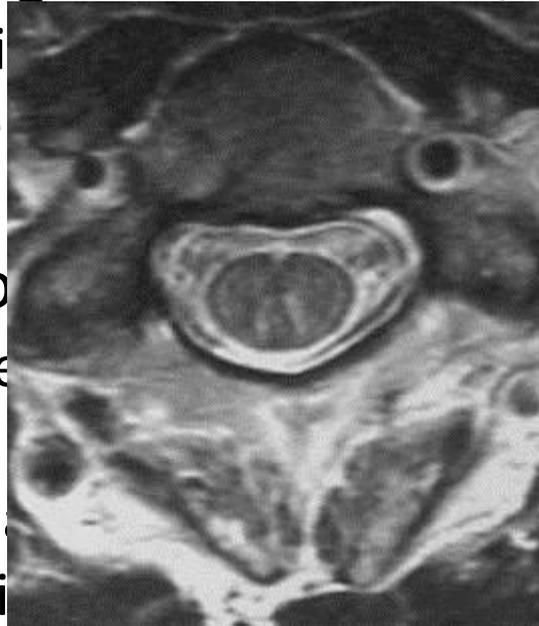
Diagnosi differenziale

3. Patologie metaboliche/nutrizionali

- Defi
- Mie onte

4. Patolo

- Asce
- HIV
- Mal
- Sifili

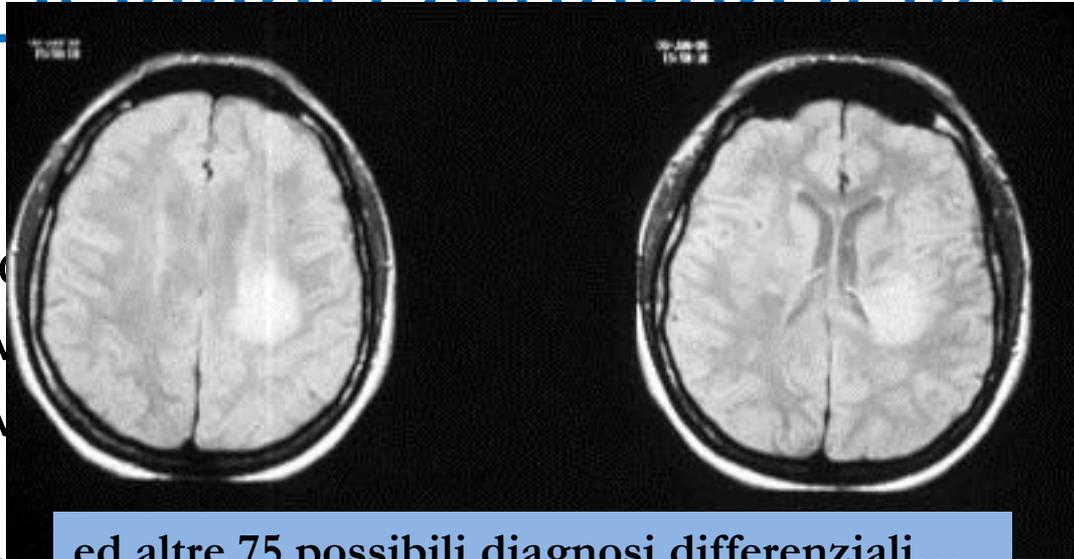


5. Patologie postinfettive

Diagnosi differenziale

6. Lesioni

- M
- M



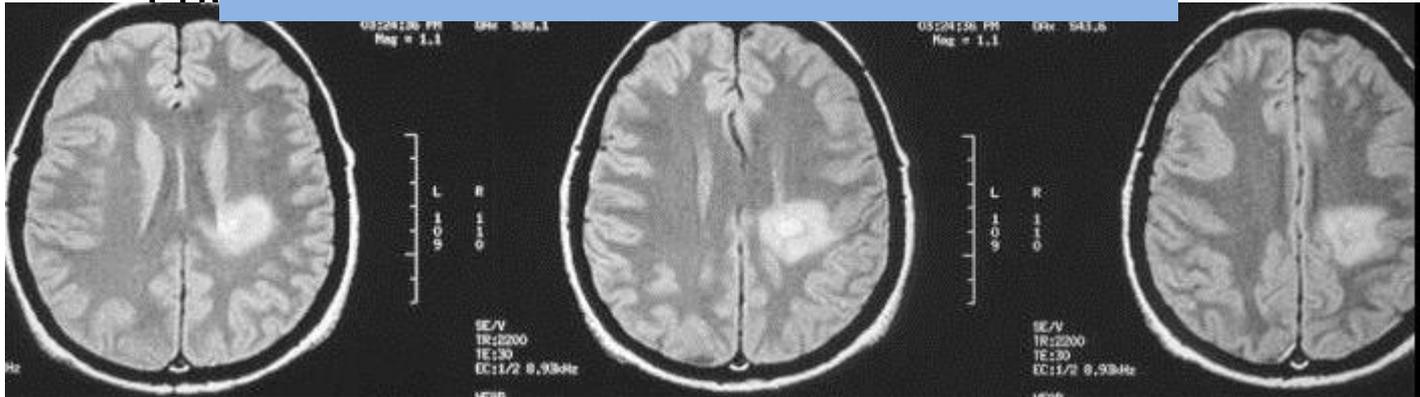
7. Patologia

- Encefaliti

ed altre 75 possibili diagnosi differenziali...

Rolak 2004

8.



- Encefaliti paraneoplastiche (ataxia cerebellare subacuta)

Biomarkers liquorali

A dispetto della scoperta delle immunoglobuline oligoclonali liquorali nel 1947, il loro significato e il ruolo nella patogenesi



RESEARCH ARTICLE

Vitamin D Binding Protein Isoforms and Apolipoprotein E in Cerebrospinal Fluid as Prognostic Biomarkers of Multiple Sclerosis

Simona Perga^{1,4*}, Alessandra Giuliano Albo^{2,3}, Katarzyna Lis³, Nicoletta Minari³, Sara Falvo^{2,3}, Fabiana Marnetto^{1,4}, Marzia Caldano^{1,4}, Raffaella Reviglione^{2,3}, Paola Berchiolla⁵, Marco A. Capobianco¹, Maria Malentacchi¹, Davide Corpillo^{2,3}, Antonio Bertolotto^{1,4}

1 Neurology Unit 2 & Regional Referral Multiple Sclerosis Centre (CReSM), San Luigi University Hospital, Orbassano, Italy, 2 ABLE Biosciences, Bioindustry Park Silvano Fumero SpA, Collettero Giacosa, Italy, 3 LIMA, Bioindustry Park Silvano Fumero SpA, Collettero Giacosa, Italy, 4 Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), c/o San Luigi University Hospital, Orbassano, Italy, 5 Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin, Italy



axonal recovery
(remyelination)

pazienti con SM
(Takano et al, 2010)

central
(plasticity)

ATT!! La maggioranza degli studi non sono condotti in modo standardizzato, e i dati pubblicati hanno dettagli insufficienti per permettere una loro valutazione critica

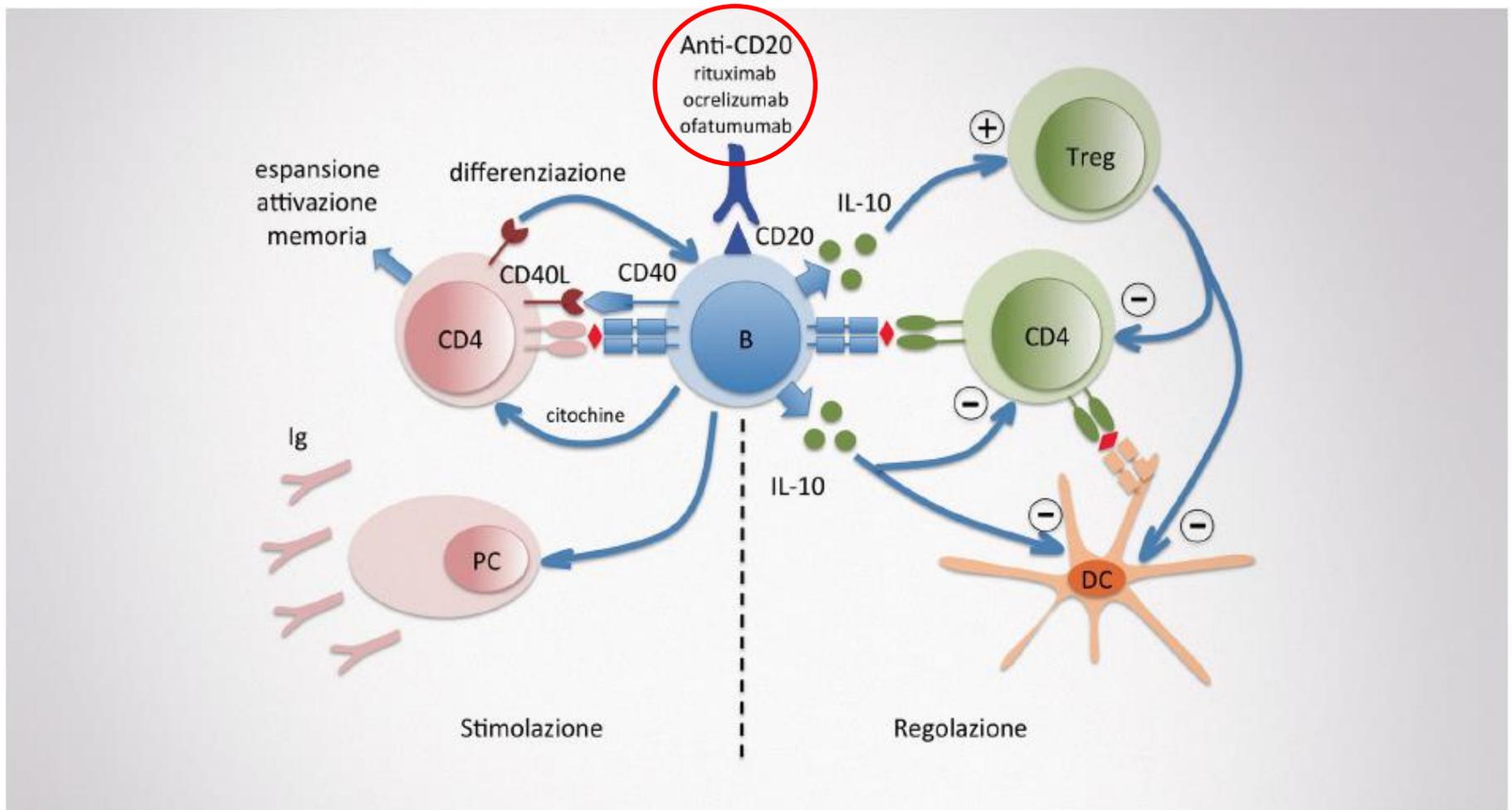


Figura 2. La deplezione dei linfociti B mediante anticorpo monoclonale anti-CD20 (rituximab, ocrelizumab, ofatumumab) non determina solo una soppressione della produzione di immunoglobuline (Ig), ma anche il venire meno di alcune azioni svolte dai linfociti B sui linfociti T e sulle cellule dendritiche, con meccanismi contrapposti. Se da un lato, infatti, il linfocita B agisce stimolando l'espansione e la differenziazione dei CD4 – venendo a sua volta stimolato da questi – dall'altro esercita un'azione globalmente soppressoria [in gran parte mediata dall'interleuchina-10 (IL-10)] sia stimolando le Treg che inibendo i CD4 e le cellule dendritiche.

- 
- Valore predittivo e prognostico delle BO

- 
- Reazione MRZ

- 
- Valore prognostico delle IgM

- 
- Nuovi approcci terapeutici
Alemtuzumab

Valore prognostico delle BO



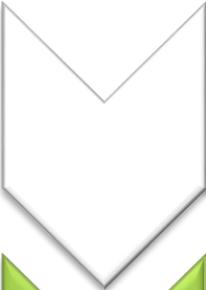
- E' stato segnalato che pazienti con SM BO-negativi hanno un decorso di malattia più benigno (Annunziata et al., 2006; Lecher-Scott et al., 2012)
- In pazienti BO-negativi hanno lesioni più frequentemente iuxtacorticali rispetto ai BO-positivi
- L'allele HLA-DRB1*1501 è strettamente associato con la positività alle BO; la sua presenza aumenta il rischio di trovare BO positive di 2.1 volte (Wu et al. 2010)

E' verosimile considerare le forme di SM BO-negative come una entità clinica distinta, con caratteristiche atipiche (cefalea, disturbi psichiatrici, immagini di RM non specifiche, etc.. (Joseph et al 2009)

Valore predittivo delle BO



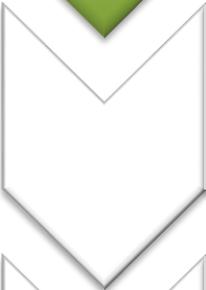
- La probabilità che una SM si sviluppi in un soggetto con una CIS e con una MRI e CSF analisi normale è bassa (<5%)(Rojas et al., 2010)
- In un soggetto con CIS e risonanza non informativa, se il CSF è positivo la probabilità di sviluppare SM è >25% (Rojas et al., 2010)
- Il riscontro di BO in CIS ha un'alta sensibilità (0,84), relativa specificità (0,54) e una valore predittivo positivo (0,66) e negativo (0,77)



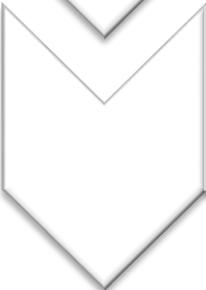
• Valore predittivo e prognostico delle BO



• **Reazione MRZ**



• Valore prognostico delle IgM



• Nuovi approcci terapeutici
Alemtuzumab

Reazione MRZ

- Circa il 90% dei pazienti con SM hanno un'elevata reazione anticorpale intratecale nei confronti di virus neurotropi quali il Morbillo, la Rosolia e la Varicella-Zoster (Reiber et al., 1998) → Mimetismo antigenico?
- E' meno sensibile ma più specifica delle BO nella SM

Frequencies of mono-, bi-, tri- and quadrispecific intrathecal antiviral immune responses in control and MS patients.

Antibody indices	NCAND	CAND	MS total	RRMS	SPMS	PPMS
quadrispecific	0/37 [0%]	0/16 [0%]	1/46 [2%]	0/26 [0%]	1/12 [8%]	0/8 [0%]
trispecific	0/37 [0%]	0/16 [0%]	2/46 [4%]	0/26 [0%]	2/12 [17%]	0/8 [0%]
bispecific	0/37 [0%]	0/16 [0%]	8/46 [17%]	2/26 [8%]	5/12 [42%]	1/8 [13%]
monospecific	3/37 [8%]	3/16 [19%]	10/46 [22%]	6/26 [23%]	0/12 [0%]	4/8 [50%]
negative	34/37 [92%]	13/16 [81%]	25/46 [54%]	18/26 [69%]	4/12 [33%]	3/8 [38%]

probabilità di reazione MRZ positiva (Jarius et al., 2008)



- Valore predittivo e prognostico delle BO



- Reazione MRZ



- **Valore prognostico delle IgM**



- Nuovi approcci terapeutici
Alemtuzumab

Valore prognostico delle IgM liquorali



- Hanno una struttura multimerica, fortemente attivante il complemento
- Si riscontrano in un 15-20% della popolazione in CIS e riducono il tempo di conversione a SMCD (Boscà L et al., 2010)
- Il loro riscontro nella CIS potrebbe predire un decorso a prognosi sfavorevole, soprattutto le IgM contro i lipidi (sembrano correlare con un carico lesionale più elevato e un'atrofia cerebrale più marcata al momento del primo evento demielinizzante) (Villar et al., 2003; Mafraner MJ et al, 2012)

Valore prognostico delle IgM liquorali



- La produzione di IgM sembra correlare con:
 - L'attività clinica della SM e l'intervallo inter-ricaduta (rischio calcolato di 40 volte superiore rispetto ai IgM negativi di avere una ricaduta precoce) (Boscà L et al., 2010)
 - Rischio di progressione di disabilità e di conversione a SMSP (Villar LM et al., 2003; Mandrioli J et al., 2008)
 - Durata di malattia (Sharief et al., 1991)



- Valore predittivo e prognostico delle BO



- Reazione MRZ



- Valore prognostico delle IgM

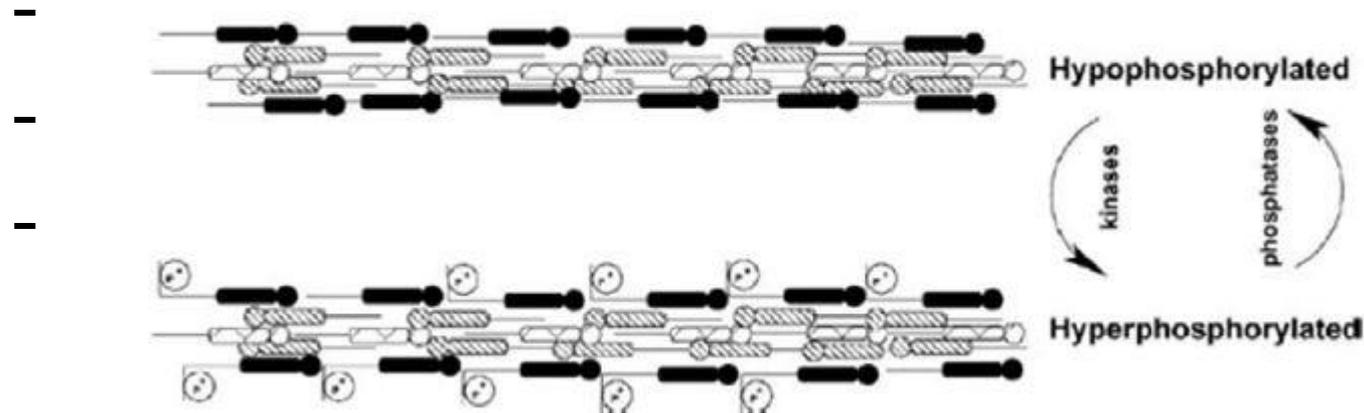


- **Neurofilamenti**



Neurofilamenti

- Sono proteine strutturali che formano il citoscheletro di sostegno del neurone, concorrendo in modo determinante alla stabilità dell'assone



Neurofilamenti



- NfL (a catena leggera)
 - Sono presenti nel 78% dei pazienti con SM e Aumentano nei 2-3 mesi dopo la ricaduta clinica(48% con SPMS, 44% SM stabili, 91% con SM e recente ricaduta (Lycke et al, 1998))
 - Correlano con un decorso clinico più grave (Salzer et al, 2010)
 - Sono un biomarker di incompleta remissione dopo NORB e predicono il mancato recupero clinico
- NfH (a catena pesante)
 - Predicono un decorso clinico più grave e un peggioramento della disabilità
 - Possono essere usati come markers neurodegenerativi (i pazienti trattati con natalizumab per 6-12 mesi hanno livelli di NfH nei limiti di norma) (Gunnarson et al., 2011)

JCv e diagnosi di PML

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy

Gary Bloomgren, M.D., Sandra Richman, M.D., Christophe Hotermans, M.D.,
Meena Subramanyam, Ph.D., Susan Goelz, Ph.D., Amy Natarajan, M.S.,
Sophia Lee, Ph.D., Tatiana Plavina, Ph.D., James V. Scanlon, Pharm.D.,
Alfred Sandrock, M.D., and Carmen Bozic, M.D.

09
GIUGNO
2017

CREMONA

AUDITORIUM
Museo del Violino
Piazza Marconi

**LE PATOLOGIE
DELLA MIELINA:
GLI STRUMENTI
PER LA DIAGNOSI
DIFFERENZIALE**



GRAZIE PER L'ATTENZIONE !

