

Valutazione del kappa index nelle patologie infiammatorie del sistema nervoso centrale nella popolazione pediatrica

Giulia Gioiello¹, Federica Lombardo¹, Monica Mangioni¹, Selene Limoncelli¹, Carlotta Canavese², Giulio Mengozzi¹, Paola Caropreso¹

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

²SSD Neurologia pediatrica AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

Questo contributo è stato in parte presentato al 54° Congresso nazionale SIBioC di Genova, 4-7 ottobre 2022, sotto forma di Comunicazione Orale

ABSTRACT

Evaluation of the kappa index in inflammatory diseases of the central nervous system in a pediatric population

Introduction: the analysis of cerebrospinal fluid (CSF) and the determination of free light chains (FLC) are routinely used in the clinical laboratory. We investigated the utility of kappa index (Qkappa FLC/Qalb) as a specific biomarker for the differential diagnosis of multiple sclerosis and inflammatory neurological disorders in a pediatric population.

Methods: among 978 patients enrolled from January 2019 to May 2022, we analyzed 53 pediatric samples (0-17 years old). Albumin, IgG and kappa FLC in serum and CSF were measured by turbidimetric method, while isoelectrofocusing was performed to check for the presence of oligoclonal bands. The related CSF/serum indices (kappa index and IgG index) are also calculated.

Results: according to the clinical diagnosis, four groups of patients have been identified: multiple sclerosis, inflammatory neurological disorders, non-inflammatory diseases, negative controls. The kappa index cut-off of 6.2, obtained from our previous study, yielded 83.3% sensitivity and 85.7% specificity in the comparison between multiple sclerosis patients and the other groups. The IgG index (showing 50% sensitivity and 45.5% specificity at a threshold of 0.50) confirmed its poor diagnostic performance. In the comparison between inflammatory and non-inflammatory disorders a kappa index cut-off of 3.3 was associated with 80.6% sensitivity and 76.5% specificity.

Conclusion: the kappa index cut off (6.2) in use in our laboratory for multiple sclerosis diagnosis in the adult population can be confirmed in a pediatric cohort. Moreover, a lower kappa index cut-off (3.3) seems useful to discriminate pediatric inflammatory diseases, as recently reported by other Authors, and can be applied in the differential diagnosis of inflammatory processes of the central nervous system.

Parole chiave: kappa index, popolazione pediatrica, liquido cefalo-rachidiano

INTRODUZIONE

L'analisi del liquido cefalorachidiano (LCR) è il passaggio chiave nella diagnosi di molte malattie neurologiche infiammatorie (1). Nella popolazione pediatrica i disordini neurologici più frequenti sono infiammatori, associati ad alterazione delle funzioni del sistema immunitario. Fra questi troviamo encefaliti autoimmuni ed infettive nonché meningiti batteriche o virali (2). La maggior parte ha un esordio acuto e mostra un decorso autolimitantesi, ma in taluni casi possono

rappresentare il primo episodio di condizioni croniche come le sindromi demielinizzanti infiammatorie, tra cui la sclerosi multipla (SM) ad esordio precoce. La discriminazione tra queste condizioni è complessa, poiché altri disturbi possono simulare la SM. L'uso dei criteri del Pediatric International Study Group (IPMSSG) aiuta a definire le sindromi demielinizzanti, inclusa la SM pediatrica, la neurite e neuromielite ottica, la mielite trasversa, la sindrome clinicamente isolata e l'encefalopatia acuta disseminata (3,4).

Corrispondenza a: Giulia Gioiello, Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino. E-mail: giulia.giuliagioiello98@gmail.com

Ricevuto 06.11.2023

Revisionato: 22.11.2023

Accettato: 10.01.2024

Publicato on-line: 29.01.2024

DOI: 10.19186/BC_2024.002

Le analisi che vengono richieste nel sospetto di patologie neurologiche infiammatorie sono molteplici, ma l'analisi del LCR è un esame imprescindibile, fondamentale per capire la fisiopatologia legata ad un deficit di formazione, circolazione, assorbimento dello stesso oppure ad alterazioni delle componenti proteiche e cellulari. Il prelievo viene eseguito tramite rachicentesi e successivamente vengono condotte analisi macroscopiche e microscopiche, microbiologiche e biochimiche come la determinazione del glucosio, lattato, proteine totali ed immunoglobuline. Possono, inoltre, essere aggiunti esami di approfondimento di secondo livello utili a discriminare la presenza di sintesi intratecale di anticorpi oligoclonali, segno di attività di cloni di cellule B. Considerata la aspecificità della misura delle proteine totali, è importante, in campo diagnostico, la determinazione di albumina e IgG (le proteine del liquor che risultano essere di maggior interesse clinico). Le determinazioni quantitative di albumina e IgG, così come la ricerca delle bande oligoclonali, vanno effettuate contemporaneamente nel LCR e nel siero in quanto ciò consente di calcolare gli indici di funzione di barriera e di sintesi intratecale. Il rapporto fra albumina liquorale e sierica, definito quoziente di albumina (QAlb), viene utilizzato come indice di funzionalità della barriera ematoencefalica. Se quest'ultima presenta alterazioni, variazioni dell'albumina plasmatica si ripercuotono sull'albumina liquorale ma non sul rapporto LCR/siero; il QAlb, essendo un rapporto tra due grandezze omogenee, risulta essere un numero puro, indipendente dall'unità di misura prescelta e ciò consente di utilizzare valori di riferimento comuni anche nel caso in cui i metodi di misura risultano essere differenti.

Un incremento della concentrazione di immunoglobuline (Ig) nel LCR, può essere ricondotto a varie cause: ipergammaglobulinemia, danno della barriera ematoencefalica, alterato flusso liquorale oppure sintesi intratecale. Per questo motivo la sola determinazione delle Ig liquorali non è sufficiente, ma è necessario applicare metodi che consentano la differenziazione fra la frazione di Ig proveniente dal sangue e la frazione proveniente dalla sintesi intratecale. I primi test applicati furono l'indice di Link ottenuto dal rapporto fra il quoziente di IgG (LCR-IgG/S-IgG, QIgG) ed il QAlb. Il valore calcolato è un numero puro e ha significato patologico per valori maggiori di 0,7. Quando la barriera ematoencefalica è gravemente danneggiata e la quantità di proteine è eccessiva, questa formula perde di specificità con un conseguente alto tasso di falsi positivi. Pertanto, è preferibile fare riferimento ad indicatori più accurati che descrivano il passaggio delle proteine plasmatiche nel LCR. Di recente è stata impiegata la misura delle catene leggere libere kappa delle immunoglobuline (kCLL), che in caso di processo patologico infiammatorio intratecale, possono essere sintetizzate in grandi quantità nel LCR e qui trattenute per la presenza della barriera ematoencefalica e per la mancanza di un sistema di clearance (5). L'incremento di sintesi intratecale di anticorpi aumenterà di molto le CLL nell'ambiente liquorale (5,6). L'indice kCLL, conosciuto come kappa index, può essere calcolato come rapporto

tra il quoziente di kCLL (LCR-kCLL/S-kCLL) e il QAlb (7,8). La misura dei parametri per ottenere i rapporti è automatizzata e rapida, quantitativa e non-operatore dipendente. Per queste peculiarità, il kappa index sta assumendo importanza come analisi di secondo livello ed è stato proposto in determinati contesti clinici anche come indagine da associare agli esami di screening (9,10).

L'esame che ad oggi rappresenta il gold standard per la verifica di sintesi intratecale è l'isoelettrofocalizzazione (IEF) su gel d'agarosio seguita da una rivelazione immunologica con anticorpo anti-IgG su LCR e siero per la ricerca delle bande oligoclonali IgG (OCB). Questa tecnica è manuale ed essendo un esame morfologico richiede personale qualificato ed esperto sia per l'esecuzione sia per la refertazione (11). L'approfondimento diagnostico mediante IEF su LCR viene solitamente richiesto nel sospetto di una patologia infiammatoria acuta del sistema nervoso centrale (SNC). In particolare, quando vi sono segni neurologici acuti, spesso multifocali ma anche monofocali non sostenuti da un chiaro evento infettivo (non febbre né rialzo indici di flogosi su sangue) né da un accidente cerebrovascolare (ictus). Spesso, inoltre, la richiesta è sostenuta anche dal riscontro alla risonanza magnetica di lesioni di natura infiammatoria con impregnazione contrastografica.

Lo scopo di questo studio è confermare l'utilità del kappa index come biomarcatore specifico per identificare, oltre alla SM, anche i disturbi neurologici infettivo-infiammatori e malattie neurologiche non infiammatorie in una coorte pediatrica. Un valore decisionale del kappa index pari a 6,2, precedentemente validato in altri studi (12) e adottato presso il nostro laboratorio nella popolazione adulta, è stato oggetto di verifica. Va sottolineato che questo è uno studio preliminare per la definizione di un valore decisionale ottimale da applicare nella quotidiana routine diagnostica, contribuendo così alla diagnosi differenziale dei processi immuno-infiammatori del SNC nella popolazione pediatrica.

METODI

Popolazione esaminata

Lo studio è stato effettuato presso la Struttura Complessa di Biochimica Clinica della Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, nel periodo compreso fra gennaio 2019 e maggio 2022 per un arco temporale complessivo di 3 anni e 5 mesi. In tale periodo sono pervenute al laboratorio 978 richieste di IEF, di cui 53 per pazienti pediatriche, con un'età compresa fra 0 e 17 anni, 20 di sesso maschile e 33 di sesso femminile. Sulla base delle notizie ricavate dalla consultazione della cartella clinica informatizzata e dopo revisione dei neurologi pediatri, i pazienti sono stati suddivisi, in relazione alla diagnosi alle dimissioni, seguendo il modello di Ganelin-Cohen (13) e ottenendo 4 gruppi distinti: (I) sclerosi multipla (SM; n=6), (II) malattie neurologiche infiammatorie (NID; n=25), comprendente sindrome di Guillain-Barré (n=4), mielite (n=2), cerebellite (n=2), encefalite (n=11), sindrome di Rasmussen-like (n=1), neurite ottica (n=2), neuromielite ottica (n=2) e

sindrome da risposta infiammatoria sistemica (n=1), e (III) malattie neurologiche non infiammatorie (NNID; n=12), tra cui epilessia (n=5), tumori (n=3), ischemia cerebrale (n=1), sindrome di Bannayan Riley-Ruvalcaba (n=1), sindrome di Nicolaides-Baraitser (n=1), *pseudotumor cerebri* (n=1). Infine, il quarto gruppo (IV) rappresenta il controllo negativo (NC; n=10). Tale gruppo comprende pazienti con sintomatologia neurologica ma senza un'evidenza di patologie demielinizzanti, infiammatorie, autoimmuni o neoplastiche.

Dopo le indagini, la maggior parte dei pazienti ha ricevuto una prima diagnosi di patologia, mentre alcuni sono stati valutati con condizioni già conosciute.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue ed alla rachicentesi per la raccolta del LCR secondo le procedure standard nell'ambito dell'iter diagnostico.

Prima di ogni procedura, tutti i genitori dei pazienti hanno firmato il Consenso Informato per la rachicentesi e l'esecuzione degli esami di laboratorio. Lo studio retrospettivo è stato condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki e le buone norme di pratica clinica.

Analisi di laboratorio

I valori per calcolare gli indici di Link (Albumina ed IgG) e kappa index sono stati ottenuti mediante determinazione in turbidimetria dei parametri (albumina, IgG, CLL kappa) nel siero e nel LCR dei pazienti. Per tutte le determinazioni è stato utilizzato lo strumento automatico Optilite® e per le CLL kappa un antisiero automatico Freelite®, basato su anticorpi policlonali coniugati a particelle al lattice (The Binding Site, Birmingham, UK).

In tutti i gruppi di pazienti, la ricerca delle OCB è stata effettuata mediante IEF in gel di agarosio seguita da blotting e identificazione delle IgG, applicando un antisiero anti-IgG. È stato utilizzato il sistema semi-automatico Hydrasys® (Sebia, Francia). Con opportune diluizioni, le concentrazioni di IgG nel siero e nel LCR sono state uniformate per ogni paziente; i campioni di siero e LCR sono stati esaminati all'interno della stessa sessione analitica sullo stesso gel. Per la separazione delle proteine è stato impiegato un gel di agarosio arricchito di anfoline, che assicura un gradiente di pH compreso tra 3 e 10. Dopo la fase di elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana mediante la tecnica di blotting. Per evidenziare le IgG, è stata effettuata una reazione antigene/anticorpo utilizzando un antisiero specifico anti-IgG coniugato a perossidasi. Le immagini ottenute sono state ispezionate visivamente da due operatori in maniera indipendente.

Analisi statistica

In questo lavoro sono stati utilizzati due test per il calcolo del valore di P. Per le variabili quantitative, le differenze tra più di due gruppi sono state valutate tramite test non parametrico di Kruskal-Wallis e test di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni. Per quanto riguarda la valutazione del numero di OCB positive, invece, è stato applicato il test esatto di Fisher. Inoltre,

è stata eseguita un'analisi di concordanza e sono stati calcolati i kappa di Cohen. Per calcolare il valore soglia ottimale per discriminare le patologie neurologiche infiammatorie dalle non-infiammatorie è stato applicato l'indice di Youden. Sono stati considerati statisticamente significativi parametri con $p < 0,05$.

RISULTATI

Nella Tabella 1 è rappresentata la distribuzione dei risultati dell'IEF relativi ai quattro gruppi clinici studiati (SM, NID, NNID, NC). Due pazienti, inclusi nei gruppi rispettivi nella descrizione della popolazione, non hanno ottenuto al momento dell'analisi la diagnosi e non sono stati inclusi nella Tabella. Inoltre, non è stato possibile effettuare l'IEF a due pazienti poiché il materiale biologico è risultato insufficiente. I risultati presentati, mostrano che il gruppo SM presenta al 100% il pattern positivo di tipo 2 (PP2, OCB presenti nel liquor e assenti nel siero), mentre il gruppo NID ne contiene un numero molto minore. Il pattern negativo di tipo 1, (NP1, OCB assenti sia nel liquor che nel siero) è molto rappresentato nel gruppo NID (n=20) e nel gruppo NNID (n=10), nonché nel gruppo NC (n=6). Il pattern positivo di tipo 3 (PP3, OCB unicamente liquorali in aggiunta ad alcune bande identiche liquorali e sieriche (indice di presenza di sintesi intratecale dovuta a processi immuno-infiammatori acuti del SNC) non è stato riscontrato in nessuno dei gruppi, mentre si sono osservati due pattern negativi di tipo 4 (NP4, OCB identiche sieriche e liquorali, con un aspetto a specchio, condizione dovuta a processi immuno-infiammatori sistemici) (uno in NID e uno in NNID). Inoltre, è stato osservato un pattern negativo di tipo 5

Tabella 1

Distribuzione dei risultati dell'isoelettrofocalizzazione relativi ai gruppi clinici studiati.

	SM (n=6)	NID (n=25)	NNID (n=12)	NC (n=6)
NP1	0	21	10	6
PP2	6	3	0	0
PP3	0	0	0	0
NP4	0	1	1	0
NP5	0	0	1	0

NP1, pattern negativo di tipo 1, assenza di bande oligoclonali nel siero e liquor; PP2, pattern positivo di tipo 2, presenza di bande oligoclonali nel liquor e assenti nel siero; PP3, pattern positivo di tipo 3, presenza di bande oligoclonali nel liquor in aggiunta ad alcune bande identiche sieriche; NP4, pattern negativo di tipo 4, bande oligoclonali identiche nel siero e nel liquor, con aspetto a specchio; NP5, pattern negativo di tipo 5, bande identiche sieriche e liquorali con spaziatura regolare ed intensità decrescente, dovuto alla presenza di una immunoglobulina IgG monoclonale sierica; SM, gruppo I sclerosi multipla; NID, gruppo II patologie neurologiche infiammatorie; NNID, gruppo III patologie neurologiche non infiammatorie; NC, gruppo IV controlli negativi.

(NP5, OCB sieriche e liquorali identiche con spaziatura regolare ed intensità decrescente, indicativo di assenza di sintesi intratecale e dovuto alla presenza di una immunoglobulina IgG monoclonale sierica nel gruppo NNID.

La Tabella 2 riporta i dati dei pazienti suddivisi nei quattro differenti gruppi. La popolazione dei pazienti NID presenta valori di IgG sieriche e liquorali leggermente più elevati rispetto alla popolazione NNID. Si può constatare che i valori di kappa index del gruppo SM presentano una maggiore dispersione e sono molto più elevati rispetto a quelli osservati negli altri gruppi. Sono stati rispettivamente trovati i seguenti valori mediani di kappa index per ciascun gruppo clinico: 31,4 (SM), 5,4 (NID), 3,1 (NNID) e 3 (NC). È stata inoltre riscontrata una differenza significativa tra i gruppi ($p=0,001$ con il test Kruskal-Wallis: SM *versus* NID, $p=0,0047$; SM *versus* NNID, $p=0,0118$; SM *versus* NC, $p=0,0459$ dopo comparazione multipla con Bonferroni's post-hoc test). Successivamente sono stati analizzati i valori di kappa index con i relativi pattern ottenuti dall'IEF. Si può affermare che pazienti con riscontro di pattern PP2 mostrano valori molto elevati di kappa index rispetto alle

altre categorie. Nella popolazione con pattern negativo per OCB (NP1) è presente un valore molto sopra la media (kappa index=15,2); analogamente a quanto osservato nel gruppo con pattern positivo per OCB (PP2) (kappa index=262) (Figura 1).

Ulteriori valutazioni sono state condotte per indagare l'efficacia diagnostica del kappa index e dell'Indice di Link nella popolazione studiata. Nella Figura 2 sono presentate due curve ROC: nel pannello 2a è considerato il gruppo SM nei confronti degli altri tre gruppi (NID+NNID+NC); nel pannello 2b invece sono considerati il gruppo patologie infiammatorie (includendovi la SM) (SM+NID) rispetto al gruppo non-infiammatorio (NNID+NC). Nel pannello 2a, scegliendo un valore decisionale per il kappa index pari a 6,2 l'esame presenta una area sotto la curva (AUC) pari a 0,91 con una sensibilità di 83,3% e una specificità di 85,7% (riga verde); l'IgG index (indice di Link), con valore soglia di 0,5 e si è dimostrato al contrario di non essere discriminante tra le due popolazioni in esame poiché dall'analisi della curva ROC si ricava un AUC di 0,58, con una sensibilità del 50% e una specificità del 45,5% (riga blu). Nel pannello 2b dall'analisi della curva ROC, è stato

Tabella 2

Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione oggetto dello studio suddivisa nei 4 gruppi clinici. Sclerosi multipla (SM), gruppo patologie neurologiche infiammatorie (NID), patologie neurologiche non infiammatorie (NNID) e controlli negativi (NC). Per le variabili qualitative (OCB e genere) è stato utilizzato il test esatto di Fisher, mentre per le variabili quantitative è stato utilizzato il test di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni.

Caratteristica	SM (n=6)	NID (n=25)	NNID (n=13)	NC (n=6)	p	SM vs NID (p, Bonferroni post-hoc test)	SM vs NNID (p, Bonferroni post-hoc test)	SM vs NC (p, Bonferroni post-hoc test)
Età in anni, mediana (IQR)	17 (12,9-17)	8 (6,6-11,3)	8 (6-10)	12 (11,7-16,1)	0,002	0,0019	0,0044	
Maschi (%)	3 (50)	11 (44)	4 (30,8)	0 (0)	0,133			
Positività OCB (%)	6 (100)	3 (12)	0 (0)	0 (0)	<0,0001			
S-IgG (g/L), mediana (IQR)	8,4 (7,3-10,3)	11 (6,9-12,9)	7,3 (4,8-10,5)	9,5 (8,5-10,0)	0,2437			
LCR-IgG (mg/dL) mediana (IQR)	2,9 (2,5-3,5)	2,0 (0,9-3,9)	1,7 (0,9-2,2)	1,7 (1,4-4,2)	0,3349			
S-Albumina (g/L), mediana (IQR)	43,0 (38,7-44,4)	41,0 (36,7-44,3)	44,0 (40,7-47,3)	41,5 (34,2-44,1)	0,2278			
Albumina LCR (mg/dL), mediana (IQR)	25,8 (17,8-32,3)	15,1 (9,3-29,4)	14,0 (9,7-24,6)	14,0 (12,7-26,7)	0,5901			
CLL K siero (mg/L), mediana (IQR)	6,94 (6,18-7,61)	9,57 (7,36-10,14)	7,81 (5,81-10,28)	10,75 (10,22-10,85)	0,228 8			
CLL K CSF (mg/L), mediana (IQR)	0,1 (0,1-0,287)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-0,81)	0,017 0			
Indice di Link, mediana (IQR)	0,5 (0,5-0,7)	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	0,8648			
kappa index mediana (IQR)	31,4 (9,4-77,4)	5,4 (2,9-6,1)	3,1 (2,3-3,4)	3,0 (2,1-3,5)	0,001	0,0047	0,0118	0,0459

OCB, bande oligoclonali; IQR, intervallo inter-quartile; LCR, liquido cefalo-rachidiano. SM, sclerosi multipla; NID, gruppo patologie neurologiche infiammatorie; NNID, patologie neurologiche non infiammatorie; NC, controlli negativi;

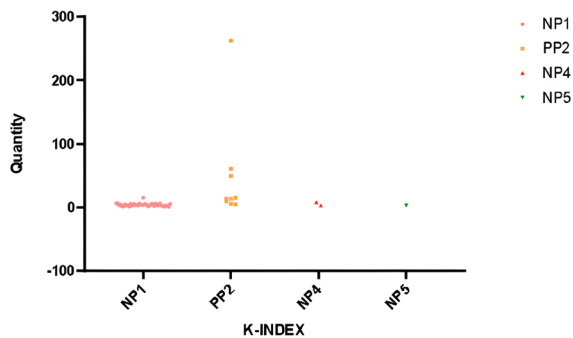


Figura 1
Dot plot dei valori di kappa index (asse y) rispetto ai pattern di isoelettrofocalizzazione (asse x). NP1, negativo pattern 1; PP2, positivo pattern 2; NP4, negativo pattern 4; NP5, negativo pattern 5.

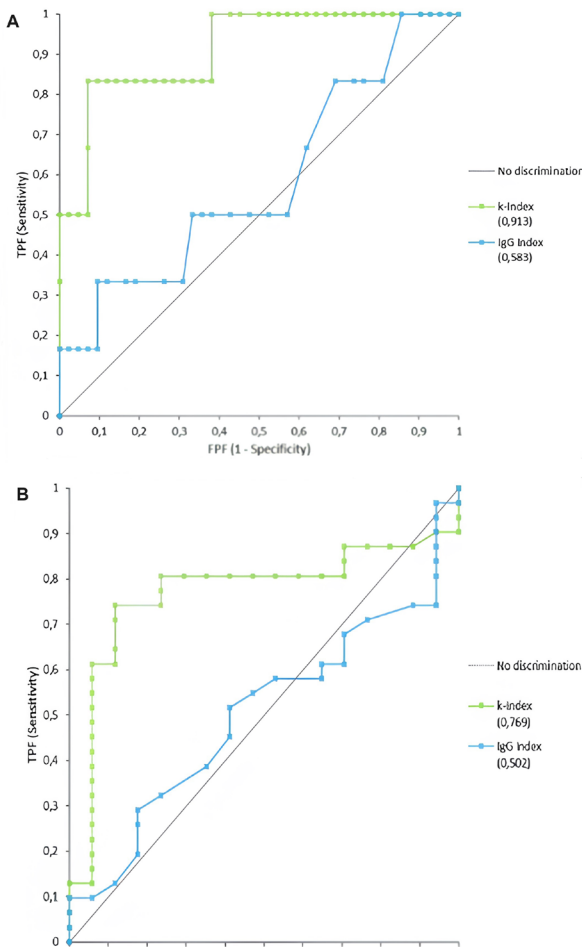


Figura 2
A. Curva ROC per kappa index e IgG index (Indice di Link) nella diagnosi differenziale di sclerosi multipla rispetto agli altri gruppi di studio (gruppo patologie neurologiche infiammatorie, gruppo patologie neurologiche non infiammatorie e controlli negativi);
B. Curva ROC per kappa index e IgG index per la diagnosi differenziale di malattie infiammatorie, comprendente anche il gruppo sclerosi multipla, rispetto ai gruppi non infiammatori, comprendente gruppo patologie neurologiche non infiammatorie e gruppo controlli negativi.

ricavato tramite l'indice di Youden, il valore decisionale di kappa index pari a 3,3, che mostra un AUC di 0,77, con una sensibilità di 80,6% e una specificità di 76,5. Anche in questo caso l'IgG index (indice di Link), con un valore di 0,5, mantiene le stesse caratteristiche del confronto precedente: non discriminante tra le due popolazioni.

L'analisi dei dati presenti nella Tabella 2, rileva che il gruppo SM presenta un'età mediana più alta (17 anni) rispetto alle altre categorie. La percentuale di positività delle OCB, fissata dai criteri di McDonald ≥ 2 OCB (14), è stata del 100% nei pazienti SM e solo 12% nei casi NID. La differenza fra i gruppi rispetto al gruppo SM è significativa poiché mostra un $p < 0,001$. Per quanto riguarda le Ig sieriche, si è osservato un aumento nel gruppo NID presumibilmente per aumento della risposta immuno-infiammatoria, mentre le Ig liquorali sono più elevate nella SM per la presenza di sintesi intratecale.

Osservando la Tabella 3, inoltre, si può notare che la presenza di bande oligoclonali, le IgG sieriche e liquorali e i valori di kappa index hanno valori più elevati nel primo gruppo (SM + NID). La differenza di positività delle bande OCB è significativa fra i due gruppi in esame con $p = 0,004$; anche la mediana del kappa index è significativamente diversa con $p = 0,002$. Nella Tabella 4 sono riportate le informazioni di specificità e sensibilità di diversi parametri delle due indagini. Nel primo confronto (SM versus tutti gli altri gruppi) si può osservare che la presenza di OCB in numero ≥ 2 presenta una sensibilità del 100% e una specificità del 93,2%, il kappa index $\geq 6,2$ mostra valori di sensibilità (83,3%) e specificità (85,7%) in linea con i principali lavori di letteratura recentemente pubblicati (15,16).

Riguardo al confronto fra patologie neurologiche infiammatorie (comprendente SM + NID) verso gli altri due gruppi, la presenza delle OCB ha una sensibilità pari al 29% e una specificità del 100%. Considerando il valore decisionale $\geq 3,3$ per il kappa index, il parametro presenta valori di sensibilità pari a 80,6% e una specificità di 76,5%. Anche questo valore soglia è in linea con altri studi per la diagnosi differenziale delle patologie NID rispetto alla SM (17).

Una ultima analisi ha riguardato la concordanza fra positività dell'IEF (pattern elettroforetici di tipo 2 e 3, positivi per valore di OCB ≥ 2 bande) e valori di kappa index, rispettivamente con valori soglia di 6,2 e di 3,3. Il valore di concordanza complessiva nel primo studio secondo questi dati è dell'85%, con una k di Cohen di 0,58 (considerando anche la concordanza attesa per effetto del caso). La concordanza appare dunque moderata.

Osservando i dati del primo studio, esposti nella Tabella 5, sette pazienti hanno mostrato positività ad entrambi i test (15%), mentre due soltanto all'IEF (4%). Quasi la totalità dei pazienti è risultata negativa ai due test (71%), mentre cinque di essi presentano positività al kappa index ma non all'IEF (10%). Importante notare che meno del 15% dei pazienti mostra dati non concordi, e tra questi pochi ricadono due casi particolari: una paziente con una cerebellite di natura infiammatoria, con kappa index pari a 5,4, compatibile con il gruppo NID e il secondo paziente un ragazzo con SM conclamata. Gli individui con positività al kappa index ma negatività

Tabella 3

Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione oggetto dello studio suddivisa in due gruppi: patologie infiammatorie, più gruppo sclerosi multipla (NID + SM) e gruppo patologie non infiammatorie comprendente anche i controlli negativi (NNID + NC). Per le variabili qualitative (OCB e genere) è stato utilizzato il test esatto di Fisher, mentre per le variabili quantitative è stato utilizzato il test del di Mann-Whitney.

Caratteristica	NID + SM (n=31)	NNID + NC (n=22)	p
Età in anni, mediana (IQR)	10 (7-15)	9 (7-12)	0,9695
Maschi (%)	14 (45,2)	4 (21)	0,333
Positività OCB (%)	9 (29)	0	0,04
S-IgG (g/L), mediana (IQR)	9,4 (7,2-12,3)	8,9 (5,4-10,4)	0,0048
LCR-IgG (mg/dL) mediana (IQR)	2,5 (1,2-3,2)	1,7 (1,1-2,6)	0,4422
S-Albumina (g/L), mediana (IQR)	41,0 (37-44,0)	44,0 (40,0-47,0)	0,0745
Albumina LCR (mg/dL), mediana (IQR)	19,6 (11,29-29,63)	14,5 (9,93-21,91)	0,7380
CLL k siero (mg/L), mediana (IQR)	9,28 (6,46-10,02)	10,19 (6,22-0,1)	0,4610
CLL k LCR (mg/L), mediana (IQR)	0,1 (0,1-0,61)	0,1 (0,1-0,19)	0,1999
Indice di Link, mediana (IQR)	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	0,7095
kappa index mediana (IQR)	5,4 (3,5-7,7)	3,0 (2,1-3,7)	0,002

OCB, bande oligoclonali; IQR, intervallo inter-quartile; LCR, liquido cefalo-rachidiano.

Tabella 4

Sensibilità e specificità diagnostica dei parametri analizzati (presenza di bande oligoclonali, kappa index e IgG index) nei raggruppamenti considerati: gruppo sclerosi multipla versus gli altri 3 gruppi clinici (patologie neurologiche infiammatorie, patologie neurologiche non infiammatorie e controlli negativi. e gruppo patologie neurologiche infiammatorie, comprendente anche il gruppo sclerosi multipla versus gruppo patologie non infiammatorie.

	AUC (IC95%)	Sensibilità (IC95%)	Specificità (IC95%)
SM versus (NID+NNID+NC)			
OCB ≥ 2		100	93,2 (81,0-97,5)
kappa index $\geq 6,2$	0,91 (0,79-1,00)	83,3 (43,6-97,0)	85,7 (70,6-92,1)
IgG index $\geq 0,5$	0,58 (0,31-0,86)	50,0 (18,8-81,1)	45,5 (31,7-59,9)
(NID+SM) versus (NNID + NC)			
OCB ≥ 2		29 (16,1-46,6)	100 (81,6-100)
kappa index $\geq 3,3$	0,77 (0,62-0,91)	80,6 (61,2-86,0)	76,5 (49,1-87,5)
IgG index $\geq 0,5$	0,50 (0,33-0,67)	45,2 (36,4-69,1)	58,8 (24,6-66,3)

SM, sclerosi multipla; NID, patologie neurologiche infiammatorie, NNID, patologie neurologiche non infiammatorie; NC, controlli negativi; AUC, area sotto la curva ROC; IC95%, intervallo di confidenza al 95%; OCB, bande oligoclonali.

per gli esami di oligoclonalità fanno parte della macrocategoria NID e il valore predittivo positivo per SM rimane da verificare con successivo monitoraggio.

Considerando un valore soglia di kappa index pari a 3,3, valore non specifico per SM, si riscontra una concordanza complessiva, calcolato come rapporto coppie concordanti/coppie totali, pari al 54% e una k di Cohen di 0,2.

Come esposto alla fine della Tabella 5 i pazienti sono così distribuiti: 22 pazienti mostrano un kappa index positivo ma negatività all'IEF (49%), due positività sono state riscontrate in 9 bambini (19%) mentre nel 35% dei casi entrambi gli esami sono negativi. L'abbassamento del valore soglia del kappa index permette l'inclusione di più pazienti, comprendendo un maggior numero di casi positivi, cosicché anche pazienti che presentano un valore definito "al limite" e non così elevato da ricadere nel gruppo SM, possono essere considerati in tale categoria e per tali pazienti è necessario un attento monitoraggio.

Tabella 5
Tabelle di concordanza fra pazienti con kappa index $\geq 6,2$ e $\geq 3,3$ e i risultati dell'isoelettrofocalizzazione (IEF) (positività pattern 2 e 3)

		IEF	
		Positivi	Negativi
kappa index $\geq 6,2$	Positivi	7	5
	Negativi	2	34
kappa index $\geq 3,3$	Positivi	9	22
	Negativi	0	17

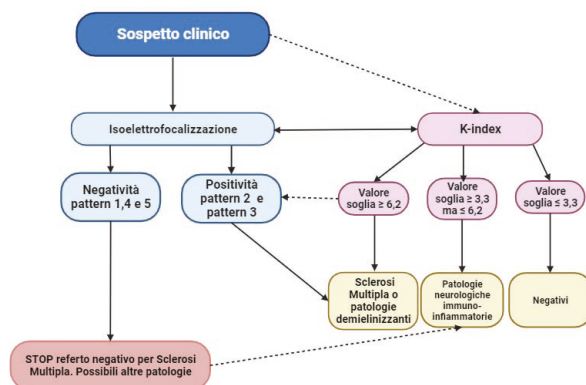


Figura 3
Algoritmo degli esami biochimici per determinare la sintesi intratecale di immunoglobuline nella diagnosi differenziale delle patologie infiammatorie del sistema nervoso centrale nella popolazione pediatrica. Possibile uso del kappa index in combinazione o sequenziale (freccie tratteggiate) con l'isoelettrofocalizzazione.

DISCUSSIONE

La disponibilità di anticorpi estremamente specifici e la diffusione di metodi automatizzati di determinazione delle CCL kappa di facile applicabilità al LCR, ha permesso di progettare e sviluppare indagini dettagliate su diversi gruppi di pazienti, inclusa la popolazione pediatrica.

È importante evidenziare che questo studio è preliminare, da valutare con la consapevolezza delle limitazioni derivanti dalla ridotta numerosità di casi disponibili e dalla significativa variabilità riscontrata tra i vari gruppi di pazienti. È intenzione degli Autori ampliare in futuro le casistiche, mediante l'inclusione di nuovi pazienti, al fine di arricchire e consolidare la portata delle osservazioni.

Da una prima analisi possiamo affermare che i dati ottenuti mostrano un aumento dei valori di kappa index nei processi infiammatori del SNC con risultati più netti per i pazienti pediatrici che hanno ricevuto una diagnosi definitiva di SM. Ancora più evidente è la corrispondenza tra elevati valori di kappa index e profili positivi per OCB dell'IEF, risultato che sottolinea l'alta efficacia e sensibilità di questo indice come marcatore di sintesi intratecale. Viene, quindi, confermata anche nella popolazione pediatrica l'importanza e l'efficacia del kappa index (con valore decisionale pari a 6,2) per la diagnosi di SM. Si deve tener conto che, come tutte le sindromi demielinizzanti infiammatorie in età pediatrica, anche tale patologia presenta una bassa frequenza in questa specifica popolazione. L'incidenza complessiva delle sindromi demielinizzanti varia da 0,6 a 1,7 per 100 000 pazienti pediatrici all'anno (2). Inoltre, questo studio propone un valore di 3,3 per una prima classificazione dei pazienti pediatrici che presentano un kappa index alterato, facenti parte della macrocategoria NID. Questo valore è stato ottenuto dalla combinazione dei pazienti SM, NID e NNID del presente studio ed è importante sottolineare che tale valore è strettamente legato alle dimensioni del campione nei quattro gruppi considerati.

Da quanto si osserva dall'esame delle curve ROC possiamo affermare che viene confermata l'efficacia diagnostica del valore di kappa index pari a 6,2 come biomarcatore per la SM anche nella popolazione pediatrica, considerando gli ottimi valori di sensibilità e specificità dello stesso. Inoltre, in accordo con i dati ottenuti, un valore più basso di kappa index è già sufficientemente accurato per discriminare le patologie infiammatorie del SNC rispetto alle non infiammatorie. Con questa soglia, un valore aumentato anche lievemente, permette di individuare patologie NID. Un altro risultato del presente lavoro riguarda la scarsa affidabilità dell'IgG index, che si conferma così come un biomarcatore desueto e da utilizzare con molta attenzione nella pratica clinica.

In conclusione, il kappa index può essere applicato anche nella popolazione pediatrica, tenendo sempre peraltro ben presente l'importanza della positività alle OCB. La ricerca delle OCB prevede un percorso analitico lungo e articolato che può risultare in quadri dubbi e non di facile interpretazione sia laboratoristica che clinica. In questi casi è particolarmente utile il kappa index che rappresenta un valido supporto per una classificazione

iniziale tra i pazienti pediatrici con patologie immuno-infiammatorie e pazienti con eventi demielinizzanti come la SM pediatrica. L'indice ad oggi non è ancora inserito nelle linee guida, cioè nella revisione del 2017 dei criteri di McDonald e non sono stati proposti valori soglia unici e condivisi. Dunque, non è ancora applicabile nella pratica come indice per lo screening di tali patologie. È opportuno, quindi, integrare le informazioni cliniche, le indagini strumentali e l'uso di algoritmi diagnostici come il kappa index validato e standardizzato, eseguiti in parallelo con la ricerca delle OCB nel LCR e nel siero, al fine di permettere una tempestiva diagnosi di SM o per discriminarla da processi immuno-infiammatori. Un possibile utile algoritmo è proposto nella Figura 3.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Salmaggi A, Corsini E, Gelati M, Lamperti E. Fisiopatologia e diagnostica liquorale in clinica neurologica. *Riv Med Lab-JLM* 2002;3:27-30.
2. Matricardi S, Farello G, Savasta S, Verrotti A. Understanding childhood neuroimmune diseases of the central nervous system. *Front Pediatr* 2019;7:511.
3. Alroughani R, Boyko A. Pediatric multiple sclerosis: a review. *BMC Neurol* 2018;18:27.
4. Kornbluh AB, Kahn I. Pediatric multiple sclerosis. *Semin Pediatr Neurol* 2023;46:101054.
5. Bernardi G, Brunati P, Biagioli T, Buoro S, Cataldo I, Ciusani E, et al. L'analisi del liquido cefalorachidiano. *Biochim Clin* 2014;38:239-54.
6. Bernardi G, Corsini E, Ciusani E. L'interpretazione quantitativa dei dati liquorali. *Biochim Clin* 2002;3:31-3.
7. Albertini R, Merlini G. La misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero: aspetti analitici e clinici. *Biochim Clin* 2010;34:26-9.
8. Duranti F, Pieri M, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. Determination of kFLC and k Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol* 2013;15:116-20.
9. C.E. Teunissen, C. Verheul, E.A.J. Willemsse. The use of cerebrospinal fluid in biomarker studies. *Handb Clin Neurol* 2018;146:3-20
10. Giovannoni G. Cerebrospinal fluid analysis. *Handb Clin Neurol* 2014;122:681-702.
11. Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005;12:527-30.
12. Cavalla P, Caropreso P, Limoncelli S, Bosa C, Pasanisi M B, V Schillaci, et Al. Kappa free light chains index in the differential diagnosis of Multiple Sclerosis from Neuromyelitis optica spectrum disorders and other immune-mediated central nervous system disorders. *J Neuroimmunol* 2020;339:577122.
13. Ganelin-Cohen E, Golderman S, Yeskaraev R, Rozenberg A, Livneh A, Kaplan B. Search for new biomarkers of pediatric multiple sclerosis: application of immunoglobulin free light chain analysis. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1081-9.
14. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H P, Lublin F D, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
15. Bernardi G, Biagioli T, Malpassi P, De Michele T, Vecchio D, Repice A M, et al. The contribute of cerebrospinal fluid free light-chain assay in the diagnosis of multiple sclerosis and other neurological diseases in an Italian multicenter study. *Mult Scler* 2022;28:1364-72.
16. Cutellè C, Balducci C, Cereda D, Fusco M L, Iacobucci D, Perugini J, et al. K index utility as diagnostic and prognostic biomarker in the assessment of patients with suspected Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol* 2022;373:577992.
17. Marlas M, Bost C, Dorcet G, Delourme A, Biotti D, Ciron J, et al. Kappa-index: Real-life evaluation of a new tool for multiple sclerosis diagnosis. *Clin Immunol* 2022;241:109066.