

UNIVERZITA PALACKÉHO v OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

HABILITAČNÍ PRÁCE

Laboratorní diagnostika roztroušené sklerózy

RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.

Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava

Katedra biomedicínských oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

OLOMOUC 2021

Prohlášení o původnosti práce a poděkování

Prohlašuji, že jsem předloženou habilitační práci na téma „Laboratorní diagnostika roztroušené sklerózy“ vypracovala samostatně a tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá použitá literatura a další zdroje jsou řádně citovány, uvedeny v seznamu použité literatury. Současně přehled vlastních prací prezentovaných v odborných časopisech, na něž se odkazují, je uveden jako seznam příloh.

Mé velké poděkování patří zejména mému dlouholetému kolegovi MUDr. Ing. Davidu Zemanovi, Ph.D., který mě přivedl k problematice likvorové diagnostiky a od něhož jsem se řadu věcí naučila. Mezi kolegy, kteří mě v této práci podporovali, musím zmínit doc. RNDr. Kristiana Šafarčíka, Ph.D., přednostu Ústavu laboratorní medicíny prof. MUDr. Davida Stejskala, Ph.D., MBA, primáře Oddělení klinické biochemie RNDr. Zdeňka Švagera, Ph.D. a vedoucího lékaře Centra pro roztroušenou sklerózu MUDr. Pavla Hradílka, Ph.D. Bez těchto kolegů by nebylo možné pracovat na projektech zabývajících se laboratorní diagnostikou roztroušené sklerózy a díky dosaženým závěrům dané metody implementovat do rutinní laboratorní praxe. Zároveň musím zmínit všechny naše laboratorní pracovnice Ilonu Faruzelovou, Lenku Fürstovou, Renátu Malečkovou, Mgr. Renátu Vytiskovou a Mgr. Blanku Strakošovou, v čele s paní vrchní Bc. Olgou Michnovou, bez kterých by laboratorní diagnostika mozkomíšního moku nebyla možná. V neposlední řadě pak musím poděkovat řediteli FNO a představitelům Útvaru náměstka ředitele pro vědu, výzkum a výuku FNO, kteří nám projekty uvnitř naší nemocnice umožnili realizovat.

Současně bez podpory mého manžela Tomáše, toleranci dcer Nelly a Valery a pomoci mých rodičů při mé vědecké práci by řada odborných článků ani tento rukopis nemohl vzniknout.

Tato práce vznikla s laskavou podporou grantového projektu MZ ČR, RVO – FNOs/2014 a RVO – FNOs/2017.

V Ostravě dne 7.4.2021

Pavλίna Kušnlerová

OBSAH

SOUHRN	1
SUMMARY	2
ÚVOD.....	3
CÍLE PRÁCE	4
1 EPIDEMIOLOGIE RS	5
2 PATOLOGIE RS.....	8
3 PATOGENEZE RS	9
4 DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA RS	11
5 MARKERY RS.....	13
5.1 ZOBRAZOVACÍ METODY.....	13
5.2 LABORATORNÍ BIOMARKERY RS	13
5.2.1 <i>Odběr a skladování likvoru</i>	<i>13</i>
5.2.2 <i>Možnosti hodnocení klinických parametrů.....</i>	<i>14</i>
5.2.3 <i>Přehled základních a speciálních vyšetření.....</i>	<i>15</i>
5.2.3.1 Kvalitativní cytologické vyšetření	16
5.2.3.2 Stanovení albuminu a imunoglobulinů	19
5.2.3.3 Detekce intrathekální protilátkové odpovědi	20
5.2.3.4 Biomarkery zánětu.....	31
5.2.3.5 Biomarkery tkáňového poškození.....	33
5.2.3.6 Biomarkery poškození neuronů/axonů	35
6 DISKUZE	38
ZÁVĚR.....	43
REFERENCE	44
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
SEZNAM TABULEK	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	56
SEZNAM PŘÍLOH.....	57

SOUHRN

Habilitační práce je předkládána jako komentovaný soubor publikovaných prací. Všechny práce jsou věnovány problematice laboratorní diagnostiky roztroušené sklerózy. Roztroušená skleróza jako onemocnění s vysokou incidencí u mladých lidí je velmi intenzivně studována. Možným prostředkem, který může přispět k včasné diagnostice, sledování průběhu onemocnění a zlepšení její terapie, je výzkum na úrovni laboratorních biomarkerů. Současná laboratorní diagnostika RS je založena na detekci oligoklonálních IgG pásů. Snahou bylo těmito pracemi přispět k rozšíření laboratorní diagnostiky RS. Věnovali jsme se problematice intrathekální protilátkové odpovědi u pacientů s RS pomocí kvantitativních výpočtových vztahů pro intrathekální tvorbu IgG, IgM, IgA a FLC a detekci oligoklonálních IgG, IgM a FLC pásů. Současně jsme se zabývali studiem biomarkerů neurodegenerativního, resp. tkáňového poškození CNS. Celkový tau protein je posuzován jako marker neuronálního poškození. V rámci monitorování axonálního poškození různé etiologie byly studovány metody stanovení lehkých řetězců neurofilament v CSF a fosforylovaných těžkých řetězců neurofilament v CSF a séru, přičemž monitorování sérových koncentrací považujeme za perspektivní ukazatel progresu choroby. Z dalších biomarkerů byl studován chemokin CXCL13, který se jeví jako důležitý marker zánětlivé aktivity u pacientů s roztroušenou sklerózou. V neposlední řadě byla pozornost zaměřena na protein YKL-40, označovaný také jako chitinase 3 – like 1, který je spojován s reaktivní gliózou v různých neuropatologických stavech, zejména těch, které souvisejí s neurozánětem. Bylo prokázáno, že CHI3L1 v CSF je slibným prognostickým, i když etiologicky nespecifickým, biomarker RS. Do habilitační práce byly okrajově zahrnuty i práce týkající se detekce monoklonálních imunoglobulinů, neboť v rámci likvorové diagnostiky se s jejich nálezem poměrně často setkáváme.

SUMMARY

The habilitation thesis is presented as an annotated collection of published works. All works have been devoted to the issue of laboratory diagnosis of multiple sclerosis. Multiple sclerosis, as a disease with a high incidence in young people is being studied very intensively. Research at the level of laboratory biomarkers is a possible tool that can contribute to early diagnosis, monitoring of the progress of the disease and improvement of its therapy. Current laboratory diagnosis of MS is based on the detection of oligoclonal IgG bands. The purpose of these works was to contribute to the expansion of laboratory diagnostics of MS. We addressed the issue of intrathecal antibody response in MS patients using quantitative computational relationships for intrathecal IgG, IgM, IgA and FLC production and detection of oligoclonal IgG, IgM and FLC bands. At the same time, we have also studied biomarkers of neurodegenerative and tissue damage of the CNS, respectively. Total tau protein is considered as a marker of neuronal damage. Methods for the determination of light chains of neurofilaments in the CSF and phosphorylated heavy chains of neurofilaments in the CSF and in the serum have been studied in the monitoring of axonal damage of various etiologies, in which case monitoring of serum concentrations is considered as a promising indicator of disease progression. Among other biomarkers, the chemokine CXCL13 which appears to be an important marker of inflammatory activity in patients with multiple sclerosis, has also been studied. Last but not least, attention has been focused on the YKL-40 protein, also referred to as chitinase 3-like-1, which is associated with reactive gliosis in various neuropathological conditions, especially those associated with neuroinflammation. CHI3L1 in CSF has been shown to be a promising prognostic, albeit etiologically non-specific, biomarker of MS. The habilitation work marginally includes work related to the detection of monoclonal immunoglobulins, as their finding is relatively common in cerebrospinal fluid diagnostics.

ÚVOD

Roztroušená skleróza (RS; multiple sclerosis) je chronické zánětlivé a demyelinizační onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) s podílem autoimunitních i neurodegenerativních dějů v patogenezi. [1]. Postihuje více jak 2 miliony lidí na celém světě a je v současné době nevyléčitelná [2]. Na vzniku RS se podílejí faktory exogenní, environmentální a genetické [3]. V prvních letech onemocnění je patrná vysoká zánětlivá aktivita, v pozdějších stádiích míra zánětu klesá a klinický stav je dán mírou axonální ztráty v důsledku destrukce tkáně [4]. Původně byly rozlišovány 4 formy RS, relaps-remitující roztroušenou sklerózu (RRRS), sekundární progresivní roztroušenou sklerózu (SPRS), primární progresivní roztroušenou sklerózu (PPRS) a progresivní-relapsující roztroušenou sklerózu (RPRS). RRRS byla charakterizována epizodami neurologické dysfunkce střídané různě dlouhými obdobími stability; SPRS, s progresivním neurologickým postižením později v průběhu onemocnění, naopak PPRS, s progresivním neurologickým postižením od samého počátku; a RPRS s postupným nárůstem neurologického deficitu vedoucím během několika let k těžké invalidizaci pacienta. Od roku 2013 se přistupuje k dělení RS pouze na dvě základní skupiny, a to relapsující-remitující a progresivní formu RS. Další dělení je podle aktivity a progresu onemocnění, což daleko lépe odpovídá současným představám o patofyziologii RS [5]. Axonální ztráta je hlavním determinantem akumulace nevratného (progresivního) postižení v důsledku zánětu během relaps-remitující a progresivní fáze roztroušené sklerózy, nicméně i neurodegenerace se na ní podílí velkou měrou [3].

Diagnóza RS je založena na revidovaných McDonaldových diagnostických kritériích [6], která spojují klinické projevy s charakteristickými lézemi prokázanými magnetickou rezonancí (MRI) a analýzou mozkomíšního moku (CSF). Mezi laboratorní metody používané v diagnostice RS je řazena detekce oligoklonálních IgG pásů metodou izoelektrické fokusace a výpočet intrathekální syntézy imunoglobulinů IgG, IgA, IgM podle Reibera [7].

Přes obrovský pokrok týkající se diagnostiky RS a rovněž vzhledem k stále větší dostupnosti diagnostických metod je nutno podotknout, že toto onemocnění stále představuje velikou diagnostickou výzvu především z důvodů různorodého klinického průběhu.

CÍLE PRÁCE

Cílem tohoto vědecko-výzkumného úsilí bylo podrobněji popsat intrathekální protilátkovou odpověď u pacientů s RS pomocí kvantitativních výpočtových vztahů pro intrathekální tvorbu IgG, IgM, IgA a volných lehkých řetězců (FLC) a detekcí oligoklonálního IgG, IgM a FLC, a korelovat její typ a intenzitu s klinickými daty.

Současně z řady potenciálních biomarkerů RS vybrat takové biomarkery, jejichž stanovení by mohlo být v rutinní praxi s přihlédnutím k omezenému množství vzorku, které je k dispozici, realizovatelné a zároveň přínosné pro predikci průběhu RS a/nebo reakci na léčbu. Posoudit korelaci těchto biomarkerů s typem a intenzitou intrathekální protilátkové odpovědi a s klinickými daty získanými retrospektivně (ataka/remise, délka trvání onemocnění od 1. příznaků do provedení lumbální punkce, pohlaví, věk, předchozí léčba, vstupní tíže postižení, MRI nález) i prospektivně (doba od odběru vzorku do následující ataky, počet atak za 1 a 2 roky po odběru vzorku a jejich tíže, progresu MRI nálezu).

1 EPIDEMIOLOGIE RS

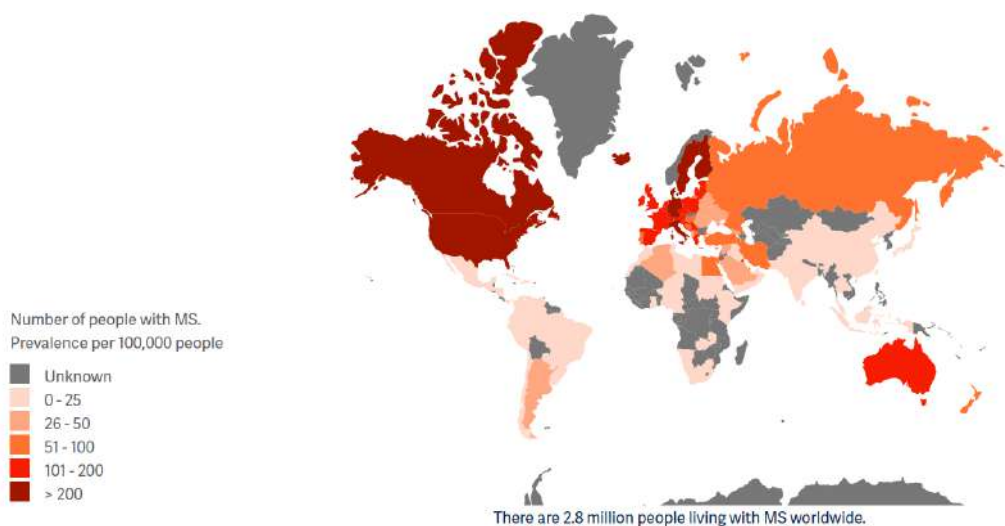
Prevalence RS se liší v závislosti na geografii a rase. Je nejvyšší u kavkazské rasy. V Evropě a Severní Americe je prevalence jedna na 800 osob s roční incidencí 2 až 10 na 100 000 obyvatel, v České republice 100 až 150 na 100 000 obyvatel, což z roztroušené sklerózy činí nejčastější příčinu neurologického postižení u mladých dospělých, Obrázek 1-3. Věk nástupu je široký a vrcholí mezi 20. a 40. rokem věku života s průměrem okolo 31,7 let. V 10 % případů je však toto onemocnění diagnostikováno ještě před 20. rokem života a přibližně v 5 % případů po 50. roce života [8]. Častější výskyt této nemoci byl pozorován u žen, a to v poměru 2:1 [9].

Příčina roztroušené sklerózy zůstává nejasná. Byly prokázány různé genetické a environmentální rizikové faktory, jako je např. infekce virem Epstein-Barrové (EBV). Antigeny EBV jsou v mozkomíšním moku a séru některých pacientů s RS exprimovány ve významně vyšších hladinách ve srovnání s kontrolami. [10] Nicméně, absence intrathekální syntézy protilátek anti-EBV u téměř 93 % pacientů s RS se staví proti této hypotéze [11]. Proto je třeba určit její roli v patogenezi. Další virové látky, jako je varicella zoster a zarděnky, jsou považovány za další možné rizikové faktory, nikoli však původce RS [12], [13].

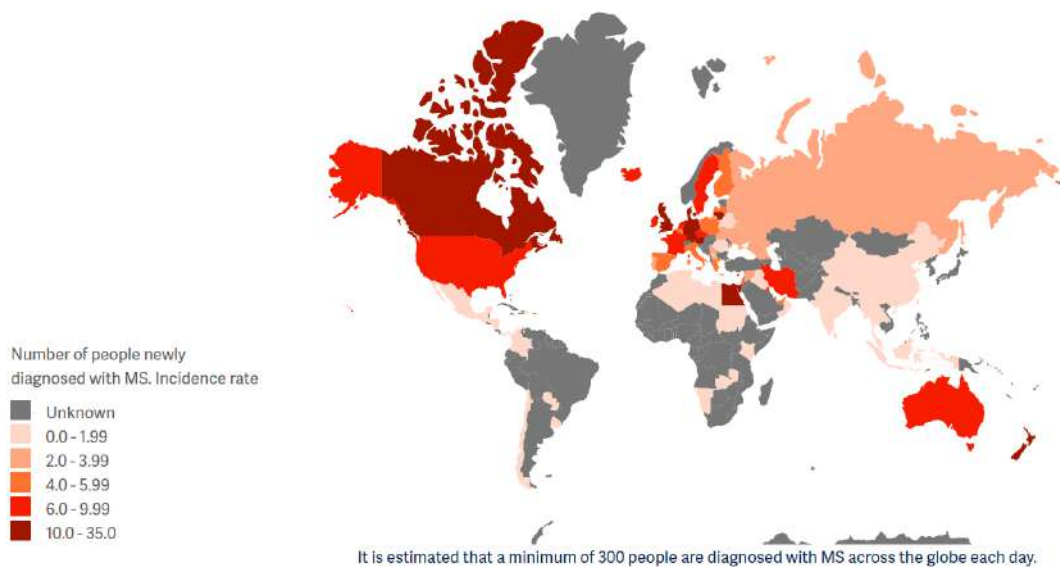
Také nedostatek vitamínu D je spojován s vyšším rizikem rozvoje RS, především relabujících forem nemoci. Vitamin D hraje roli v regulaci imunitní odpovědi, je na něj pohlíženo jako na protektivní faktor [14], [15]. Řada studií se zabývala vztahem mezi intenzitou UVB záření, které indukuje tvorbu vitamínu D v kůži a prevalencí RS. V oblastech s vysokou intenzitou UVB záření je pozorován nižší výskyt RS [1].

Dalším rizikovým faktorem přispívajícím k rozvoji RS je také kouření cigaret.

Z genetických faktorů byla popsána zvýšená vnímavost k rozvoji RS u alely HLA systémů, varianty HLA-DRB1*1501 [16], [17], genů pro receptor T-buněk (TCR), některých složek komplementu, genů pro příslušné komponenty myelinu nebo tumor nekrotizujícího faktoru [1].



Obrázek 1: Prevalence RS na 100 000 obyvatel, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: <http://www.atlasofms.org/>



Obrázek 2: Počet nově diagnostikovaných pacientů s RS každý rok, incidence na 100 000 obyvatel/rok, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: <http://www.atlasofms.org/>



Obrázek 3: Počet dětí s RS (do 18 let), prevalence na 100 000 dětí, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: <http://www.atlasofms.org/>

2 PATOLOGIE RS

Diagnostickým znakem RS je přítomnost velkých splývajících demyelinizovaných lézí v bílé a šedé hmotě CNS [18]. Nejdůležitější vlastností je selektivní a primární povaha demyelinizace s poškozením a apoptózou oligodendrocytů [19], [20]. Ačkoli může být myelin zcela zničen, axony jsou do značné míry zachovány a míra axonální destrukce je u různých pacientů variabilní, dokonce i mezi různými lézemi u stejného pacienta [21], [22], [23]. Léze se vyskytují na pozadí zánětu, na kterém se podílí T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky. Zánětlivá reakce je zahájena kolem postkapilárních žilek a žil [18]. V počátečních stádiích lézí je tedy patrná perivenózní demyelinizace s následnou fúzí jednotlivých lézí na splývající demyelinizované plakky, které na svém okraji expandují do okolní normálně vypadající bílé hmoty. To vede k typickému perivenóznímu rozšíření vzniklých lézí, tzv. Dawsonovým prstům [24], které v obraze MRI korespondují s ovoidním tvarem plak. Demyelinizační proces je spojen s aktivací astrocytů během stavu aktivního poškození tkáně a tvorbou gliotických jizev v neaktivních lézích. Léze RS mohou být částečně remyelinizovány v důsledku náboru a diferenciací progenitorových buněk oligodendrocytů [25].

Podobné perivenózní a splývající demyelinizované léze se tvoří také v šedé hmotě, včetně mozkové a mozečkové kůry, jádrech mozkového kmene a v šedé hmotě míchy. Kromě toho je v mozkové kůře přítomna rozšířená subpiální kortikální demyelinizace, zejména v progresivním stadiu onemocnění, a aktivní subpiální demyelinizace je orientována na zánětlivé infiltráty v leptomeningách [26], [27]. Zánět v okolí lézí RS je patrný ve všech stádiích onemocnění, a je tedy přítomen nejen v mozku pacientů, kteří zemřeli na časnou (relapsující) RS, ale také u primární nebo sekundární progresivní RS. Nejvýrazněji se projevuje v aktivně demyelinizačních lézích, ale je také pozorován v neaktivních nebo remyelinizovaných placích, stejně jako v normálně se objevující bílé hmotě [28].

3 PATOGENEZE RS

Poškození tkáně u RS je výsledkem složité a dynamické souhry mezi imunitním systémem, gliemi (oligodendrocyty vytvářející myelin a jejich prekursorů, mikroglie a astrocyty) a neurony.

Narušení vlastního imunitního systému u pacientů s RS (např. virovou infekcí) vede k rozvoji autoimunitní imunopatologické reakce. V popředí stojí autoreaktivní T-lymfocyty s receptory pro antigeny CNS aktivující hematoencefalickou bariéru řízeně propustnou pro buňky imunitního systému, přes kterou pronikají do mozkového parenchymu. Průnik je umožněn pomocí proteolytických enzymů produkovaných samotnými lymfocyty. Na jejich pohybu se podílí cytokiny produkované buňkami imunitního systému. Důležitou úlohu v tomto procesu mají také makrofágy a dendritické buňky. Autoreaktivní T-lymfocyty reagují na cílový antigen, aktivují mikroglie a spouští prozánětlivou reakci vedoucí k poškození myelinových obalů, smrti oligodendrocytů, axonální ztrátě, glióze a neurodegeneraci.

Hlavní složkou myelinu je myelinový bazický protein (MBP) mající shodnou sekvenci aminokyselin se sekvencí viru EBV, s polymerázou viru hepatitidy B, proteinů viru spalniček, herpes simplex viru, lidským herpes virem 6, virem chřipky i adenovirem. Dalšími vlastními autoantigeny neuronů nebo oligodendrocytů, podílejícími se na patogenezi RS, jsou myelinový oligodendrocytární glykoprotein, glykoprotein asociovaný s myelinem, proteolipidový protein a další. Na základě těchto zjištění se předpokládá, že T-lymfocyty rozpoznávají virovou částici a část myelinu jako „identickou strukturu“ [4], [8].

V aktivních lézích RS dominují cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty, pomocné indutorové CD4⁺ T-lymfocyty, monocyty a B-lymfocyty, v centrech léze se vyskytují i makrofágy [29], [30]. CD4⁺ se nacházejí převážně perivaskulárně, jsou zodpovědné za spouštění imunitní kaskády vedoucí k zánětlivé reakci v CNS, kdežto CD8⁺ hojně zastoupené v parenchymu se účastní destruktivních změn, řídí imunitní reakci a podílejí se na vytváření tolerance k vlastním tkáním.

V průběhu zánětlivé reakce jsou převládajícím subtypem lymfocytů v CNS Th1 a Th17 lymfocyty. Subtyp Th1 lymfocytů produkuje cytokin interferon gama, tumor necrosis factor β a interleukin 2. Je odpovědný za cytotoxickou reakci chránící před virovými agens či intracelulárně parazitickými bakteriemi za současnou spolupráci s makrofágy. Vedle toho subtyp Th2 lymfocytů produkující interleukiny 4 a 5 je odpovědný za regulaci B-lymfocytů a následnou produkci protilátek. Buňky Th1 a Th2 jsou antagonistické, navzájem se potlačují,

resp. slabost jedné skupiny rezultuje v posílení skupiny druhé. Dalším subtypem lymfocytů mající význam v imunopatogenezi RS jsou Th17 vyžadující k vyžívání přítomnost např. interleukinu 6, TGF- β (z angl. transforming growth factor β) a interleukinu-21. Byly nalezeny společně s CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocyty v aktivních lézích pacientů s RS.

Kromě toho přítomnost B-lymfocytů a specifických protilátek v mozkomíšním moku pacientů s RS ukazuje na jejich účast na imunopatogenezi onemocnění [31]. B-lymfocyty jsou syntetizovány v kostní dřeni, po kontaktu s antigenem dozrávají v sekundárních lymfatických orgánech, následně diferencují v plazmatické buňky produkující imunoglobuliny a paměťové buňky. Exprimují CD20. B-lymfocyty a plazmatické buňky jsou detekovány v lézích RS, v mozkomíšním moku, popř. i v periferní krvi. Průkaz oligoklonálních imunoglobulinů je důkazem intrathekální syntézy specifických protilátek [8].

Obzvláště důležitou úlohu v patogenezi RS mají buňky vrozeného imunitního systému [32]. NK buňky jsou studovány v periferní krvi i mozkové tkáni pacientů s RS. Experimentálně získaná data poskytují často protichůdné informace. Jejich interpretace je nutná v kontextu s klinickým vývojem nemoci [4].

Makrofágy vytvořené z monocytů v kostní dřeni a následně přenášené krví infiltrují aktivní léze RS a odstraňují zbytky myelinu a vedlejší produkty zánětu; u těchto lézí byly popsány klasicky a alternativně aktivované makrofágy, stejně jako smíšené populace. Mikroglie, primární endogenní fagocyty CNS, jsou hojné v RS lézích, ale jejich role, ať už patogenní, ochranná či obojí, zůstává nejistá [33].

Porucha hematoencefalické bariéry je důležitým krokem ve vývoji lézí bílé hmoty, důkazy o tom poskytuje extravazace gadolinia u MRI na počátku jejich vývoje. Abnormální vaskulární permeabilita předchází zánětlivé demyelinizaci u RS [34]. U časných lézí RS se cévy poblíž centra lézí stávají propustnými pro gadolinium, které pak pasivně difunduje do zvětšených intersticiálních prostor; o několik dní později se začne narušovat hematoencefalická bariéra, malé kapiláry na okraji lézí se stanou propustnými, možná jako součást procesu raného hojení ran [35]. Leptomeningeální zánět může také přispívat k vaskulární permeabilitě.

4 DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA RS

Historicky byla pro diagnostiku RS využívána Schumacherova kritéria z roku 1965, která byla v roce 1983 revidována a v platnost vešla nová, Poserova kritéria. V roce 2001 byla přijata McDonalldova kritéria, která již prošla několikrát revizí, první v roce 2005, poté 2010, následně v roce 2017 [6]. Tato kritéria platí primárně pro pacienty s výskytem prvních klinických příznaků, které by mohly odpovídat RS, definují, co je nutné k naplnění diseminace lézí v CNS v čase a prostoru.

Byly provedeny tyto změny. U pacientů s výskytem prvních klinických příznaků, které by mohly odpovídat RS a klinickou nebo MRI demonstrací diseminace v prostoru, umožňuje přítomnost specifických oligoklonálních pásmů v CSF potvrdit diagnózu roztroušené sklerózy; symptomatické léze lze použít k prokázání diseminace v prostoru nebo čase u pacientů se supratentoriálním, infratentoriálním nebo míšním syndromem; a kortikální léze mohou být použity k prokázání diseminace v prostoru. Přehled v tabulce 1.

Tabulka 1. Revidovaná McDonalldova diagnostická kritéria z roku 2017 [6].

Klinická kritéria (počet atak)	Objektivní léze	Další potřebné údaje pro stanovení definitivní diagnózy RS
2 nebo více	Objektivní klinický průkaz ≥ 2 lézí nebo objektivní klinický průkaz 1 léze s přijatelným anamnestickým průkazem předchozí ataky z odlišné anatomické lokalizace	Žádné
2 nebo více	Objektivní klinický průkaz 1 léze	Diseminace v prostoru způsobená další klinickou atakou NEBO pomocí MRI

1	Objektivní klinický průkaz ≥ 2 lézí	Diseminace v čase způsobená druhou klinickou atakou nebo pomocí MRI NEBO průkazem specifických oligoklonálních pásů v CSF
1	Objektivní klinický průkaz 1 léze	Diseminace v prostoru způsobená další klinickou atakou z jiné lokalizace CNS nebo pomocí MRI a zároveň Diseminace v čase způsobená další atakou nebo pomocí MRI NEBO průkazem specifických oligoklonálních pásů v CSF
0 (progrese choroby od počátku, primárně progresivní RS)		1 rok progrese choroby (retrospektivně nebo prospektivně nezávisle na klinických relapsech) a nejméně 2 další kritéria: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 hyperintenzivní léze v jedné nebo více charakteristických lokalitách pro RS; periventrikulárně, kortikálně nebo juxtakortikálně nebo, infratentoriálně • ≥ 2 hyperintenzivní léze v míše • přítomnost oligoklonálních pásů v CSF

5 MARKERY RS

5.1 Zobrazovací metody

Mezi nejdůležitější diagnostické a prognostické biomarkery RS, zvláště na počátku onemocnění, je řazena magnetická rezonance (MRI), pomocí níž jsou zánětlivá demyelinizace, stejně jako změny hematoencefalické bariéry, které doprovázejí její raný vývoj, snadno pozorovatelné. MRI je klíčovým paraklinickým diagnostickým testem. Současně je zásadním nástrojem monitorace průběhu onemocnění při vývoji nových léků modifikujících onemocnění, protože nové léze jsou řádově častější než klinické relapsy [36].

Neurodegenerace u RS je nejlépe zachycena na MRI měřením volumetrických parametrů mozku nebo míchy. Abnormálně nízká „frakce parenchymu mozku“, míra objemu mozku ve vztahu k intrakraniální kapacitě, může být považována za náhradní důkaz mozkové atrofie související s tímto onemocněním.

Jelikož konvenční biomarkery MRI nedosáhly silné korelace s klinickým stavem na populační úrovni, pravděpodobně kvůli heterogenní prezentaci a průběhu RS a současně inherentní variabilitě klinických opatření, existuje trend směrem k využití těchto technologií k vyšetřování patologie a patogeneze RS, včetně perivaskulárního zánětu, vývoje kortikálních a míšních lézí, ztráty a regeneraci myelinu, vrozené imunitní aktivace, leptomeningeálního zánětu a síťových funkcí [37]. Takový výzkum byl usnadněn příchodem zařízení MRI se silou magnetického pole 7 Tesla a v menší míře molekulárními indikátory detekovatelnými pozitronovou emisní tomografií. Nově se začala používat i optická koherentní tomografie k rychlému hodnocení sítnice při rozlišení na mikronové úrovni. Ztráta axonů gangliových buněk sítnice má za následek ztenčení sítnice, které odpovídá axonální ztrátě v oblasti optického nervu a společně se změnami MRI v mozku může předvídat vývoj postižení na úrovni kohorty [38], [39].

5.2 Laboratorní biomarkery RS

5.2.1 Odběr a skladování likvoru

V klinické praxi je možné laboratorní biomarkery využít ke stanovení diagnózy, k určení či upřesnění prognózy onemocnění a současně k monitorování léčebné odpovědi.

Nejvěrněji nám patologické pochody v CNS odráží vyšetření mozkomíšního moku (CSF), který je v bezprostřední souvislosti s kompartmentem CNS.

Odběr likvoru provádíme nejčastěji lumbální punkcí u ležícího či sedícího pacienta mezi trny dolních bederních obratlů (v meziobratlovém prostoru L3/4, L4/5 nebo L5/S1) a to do čistých skleněných nebo plastových polypropylenových zkumavek bez obsahu protisrážlivých činidel [40]. Transport do laboratoře je nutné provést bezprostředně po odběru, zvláště pokud jsou požadována časově citlivá vyšetření jako je spektrofotometrické vyšetření při podezření na krvácení do likvorových cest, popř. analýza buněčného složení při podezření na infekční a zánětlivá onemocnění CNS. Současně s odběrem CSF je v řadě případů doporučeno odebrat i vzorek krve, neboť koncentraci řady analytů v CSF je nutno posuzovat vzhledem ke koncentraci v séru.

Vzhledem k vzácnosti této biologické tekutiny je ideální, pokud se alespoň část odebrané porce CSF rozdělí na jednotlivé díly a zamrazí pro případné další vyšetření či vědecko-výzkumné aktivity. Za tímto účelem musí odběr CSF splňovat etické náležitosti, především podpis informovaného souhlasu pacienta s uskladněním biologického materiálu a možným využitím pro studijní či vědecko-výzkumné účely. Tento proces, biobankovnictví, byl popsán v roce 2009 [41]. Autoři popsali zásady odběru, zpracování a uchování mozkomíšního moku a séra/plazmy pro výzkumné účely. Z důvodů budoucích studií je také vhodné rozdělení vzorků CSF, séra/plazmy do jednotlivých diagnostických kategorií, např. dle autorů Teunissen C et al. [42]. Jde o kategorie zdravé kontroly, pacienty podstupující spinální anestezii bez organického neurologického onemocnění a s normálním neurologickým nálezem, zánětlivá onemocnění CNS, zánětlivá onemocnění periferního nervového systému, nezápětlivá onemocnění CNS a symptomatické kontroly.

5.2.2 Možnosti hodnocení klinických parametrů

Současně s doručením likvoru do laboratoře je nutné znát základní klinické charakteristiky pacienta, typ RS v době odběru, datum prvních příznaků, datum diagnózy podle McDonaldových kritérií, datum první a druhé ataky, hodnotu Kurtzkeho škály Expanded Disability Status Scale (EDSS) v době odběru, která hodnotí vizus, mozkový kmen, pyramidový, mozečkový a senzitivní systém, sfinktery a mentální stav pacienta, popř. hodnotu škály Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) v době odběru, kterou tvoří tři testy. Prvním testem je Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT), což je orientační test paměti

a koncentrace, dále 9-Hole Peg Test (9-HPT) hodnotící jemnou motoriku horních končetin a test rychlosti chůze na 25 stop (7,6 m). Pomocí těchto škál lze usuzovat na komplexní obraz klinického stavu pacienta s RS a na jeho skutečné schopnosti. Dále je vhodné mít informaci o počtu a datech relapsů 2 roky před odběrem; o době mezi počátkem poslední ataky a odběrem; o atace v době odběru podle Schumacherových kritérií (vzestup EDSS o ≥ 1 stupeň trvající > 24 hodin); počtu a popř. datu relapsů během každého roku sledování, léčbě při odběru a rok před odběrem (např. glukokortikoidy aj.). Všechny tyto události využívané k hodnocení průběhu RS jsou pro nemocného negativní. NEDA koncept (no evidence of disease activity) je novým způsobem hodnocení stavu pacientů s RS. Využívá principu tzv. „freedom of the disease“. Hodnotí se období, během kterého nebyla u pacienta prokázána žádná aktivita nemoci, tedy pacient nebyl zatěžován relapsy, nedošlo u něj ke zhoršení neurologického nálezu nebo aktivitě na MRI [43].

V současné době se využívá principu NEDA-4, který zahrnuje pro posouzení stability RS čtyři parametry, absenci relapsů choroby, progresi EDSS, změny na magnetické rezonanci (nové léze, aktivní léze) a míru atrofie mozku. Právě mozková atrofie probíhající u pacientů s RS nepřiměřeně rychle je důsledkem neurodegenerace probíhající současně se zánětem. Tento koncept nám tedy umožňuje adekvátní posouzení jak fokální, tak i difúzní patologie. Jeho nedosažení může být důvodem případné změny terapie. Přijetí tohoto konceptu může přispět k personalizované léčbě pacientů [43].

5.2.3 Přehled základních a speciálních vyšetření

Za základních vyšetření likvoru je pro diagnostiku RS důležité kvalitativní a kvantitativní cytologické vyšetření, výpočet albuminového kvocientu (Q-ALB) jako biomarkeru funkce hemato-likvorové bariéry a detekce intrathekální protilátkové odpovědi. Z MRI charakteristik pak MRI mozku a míchy, jeho datum, počet a objem MRI lézí, objemy T1 a T2 lézí, informaci o atrofii mozku/míchy, popř. follow-up MRI.

Zmiňované biochemické markery můžeme rozdělit na *biomarkery zánětu*, kam řadíme počet buněk v likvoru, Q-ALB, intrathekální syntézu imunoglobulinů a volných lehkých řetězců (výpočty a/nebo detekci oligoklonality) vč. specifických protilátek (protilátek proti measles, rubella, varicela zoster, tzv. MRZ reakce; a herpes simplex aj.), cytokinů a chemokinů. Mezi *biomarkery neurodegenerace, resp. tkáňového poškození* řadíme specifické proteiny CNS jako je neuron specifická enoláza (NSE) poukazující na poškození neuronů, gliální fibrilární

acidický protein (GFAP) a protein S100B prokazující poškození mozku, bílkoviny neurofilament naznačující poškození axonů a celkový tau protein. Hyperfosforylovaná forma tau proteinu a amyloid β_{1-42} svědčí pro neurodegenerativní poškození. V případě *biomarkerů bariérové poruchy* jsou využívány matrixové metaloproteinázy (MMP), ninjurin-1, solubilní intercelulární adhesivní molekula-1 (sICAM-1), endothelin-1 a další; jako *biomarkery oxidačního stresu* molekula oxidu dusnatého (NO) a reaktivní kyslíkové radikály (ROS). Jako *biomarker demyelinizace lze použít* myelinový bazický protein (MBP) a jako *biomarkery remyelinizace či reparace* lze stanovovat neurotrofní faktory, neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (GDNF), neurotrofní nervový růstový faktor (NGF) a neurotrofický faktor odvozený od mozku (BDNF), popř. další [40].

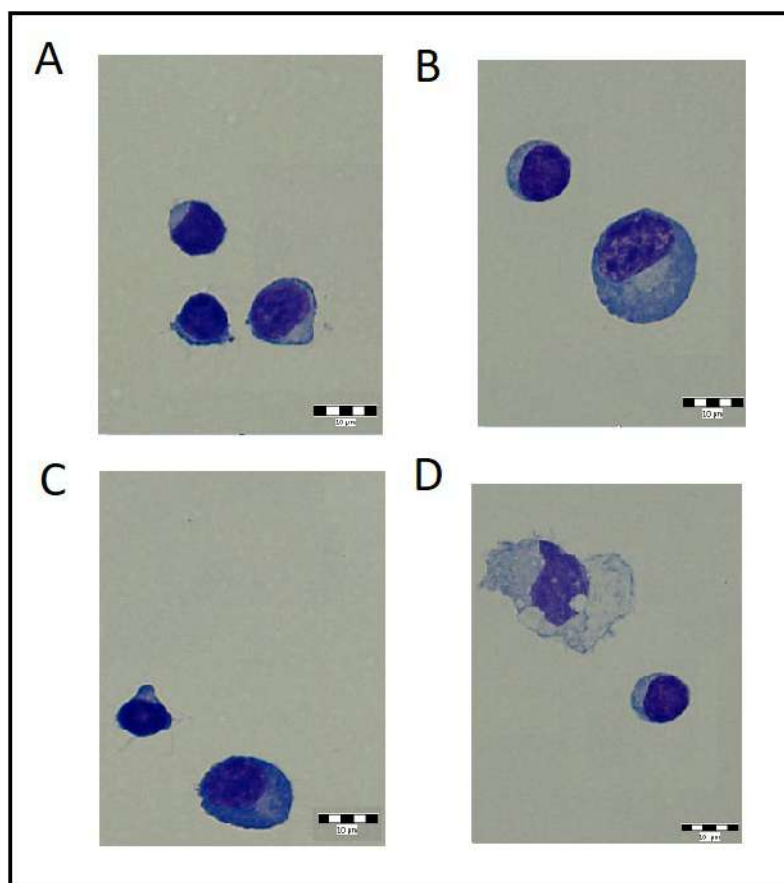
5.2.3.1 Kvalitativní cytologické vyšetření

Cílem kvalitativního cytologického vyšetření je posouzení relativního zastoupení jednotlivých buněčných elementů v CSF. Vzhledem k poměrně nízkému počtu buněk je doporučováno zakoncentrování vzorků cytocentrifugací. Takto připravené preparáty jsou následně obarveny. Klasickým postupem je barvení podle May-Grünwald a Giemsy, které bývá v rutinním provozu nahrazováno rychlejším postupem, např. pomocí soupravy Diff Quik či Hemacolor. V případě podezření na přítomnost bakterií, hemosiderinu, látek tukové povahy či nádorových buněk se využívá dalších speciálních barvicích postupů [40].

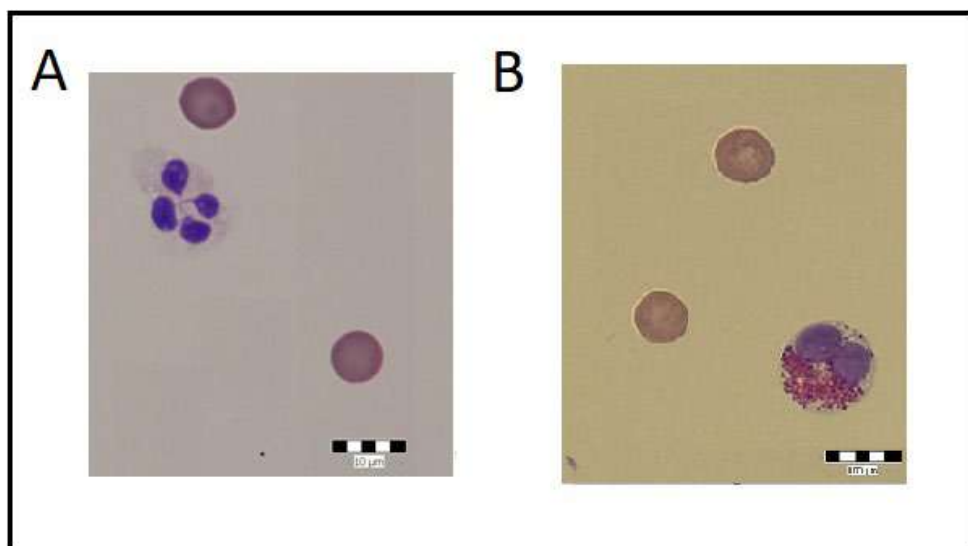
Při hodnocení cytologického nálezu rozlišujeme mezi fyziologickým a patologickým nálezem, přičemž za fyziologický nález považujeme likvoru s obsahem do 4 elementů / 1 μ l. Z buněčných typů se zde můžeme setkat s malými lymfocyty, monocyty, ojediněle s buňkami choroidálního plexu, ependymálními buňky, buňkami arachnoidey a piálními buňkami [44], [40]. Za patologických podmínek nacházíme v likvoru aktivované lymfocyty, plazmatické buňky, aktivované monocyty, makrofágy, granulocyty neutrofilní, eozinofilní či bazofilní, popř. i nádorové buňky.

Pro RS je typický cytologický obraz lymfocytární oligocytózy nebo lymfocytární pleocytózy zpravidla nižšího stupně. Lze pozorovat i aktivované lymfocytární formy a ojediněle buňky plazmatické, Obrázek 4. Při remisi onemocnění zastoupení aktivovaných lymfocytů klesá, mohou vymizet i buňky plazmatické a cytologický obraz se normalizuje. Naopak při atace choroby lze pozorovat vyšší počet aktivovaných elementů. Současně lze u RS pozorovat také granulocyty, častěji eozinofilní svědčící pro chronicky probíhající patologický proces,

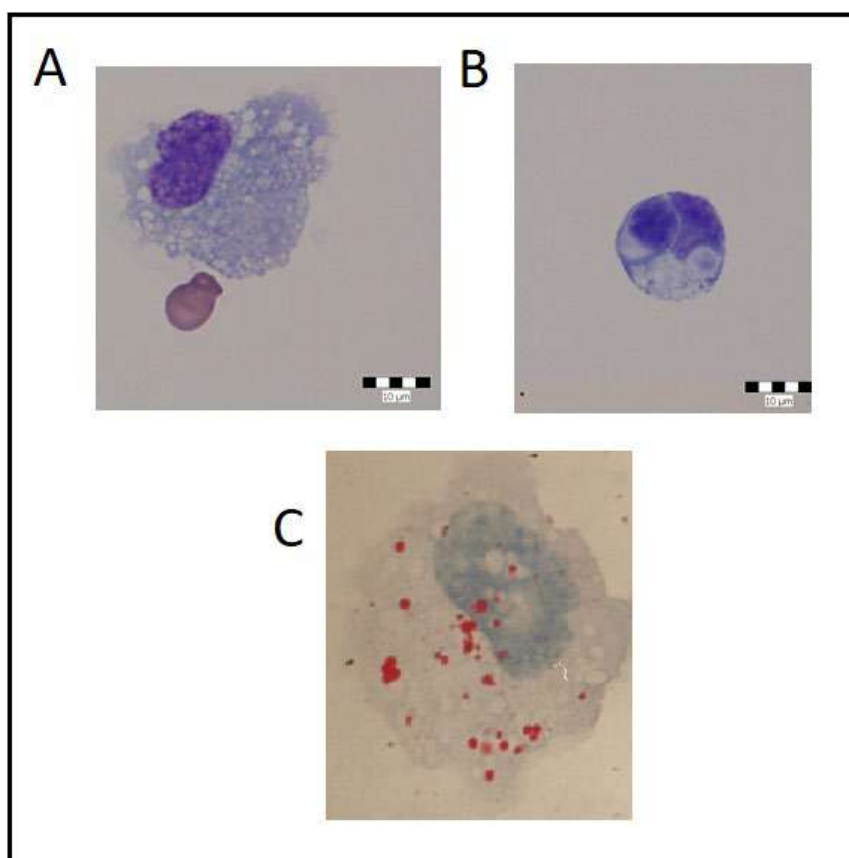
Obrázek 5. Neutrofilní granulocyty se mohou vyskytovat v době akutní ataky, stejně tak jako aktivované monocytární či makrofagické formy, z nich nejčastěji pozorujeme lymfofágy, vzácněji leukofágy fagocytující neutrofilní a eosinofilní granulocyty, méně často i lipofágy fagocytující demyelinizovanou bílou hmotu mozku, viz Obrázek 6 [45].



Obrázek 4. Cytologický obraz pacienta s RS v době ataky. A – dva klidové lymfocyty a aktivovaný lymfocyt; B - klidový lymfocyt a plazmatická buňka; C – klidový lymfocyt a zralá plazmatická buňka, D – aktivovaný monocyt a klidový lymfocyt.



Obrázek 5. Cytologický obraz pacienta s RS svědčící pro chronicky probíhající patologický proces. A – neutrofilní granulocyt a dva erythrocyty; B – eosinofilní granulocyt a dva erythrocyty.



Obrázek 6. Cytologický obraz pacienta s RS v době akutní ataky. A - aktivovaný monocyt a erythrocyt, B - lymfocyt, C – lipofág (barven olejovou červení).

5.2.3.2 Stanovení albuminu a imunoglobulinů

Zeman D, Kušnierová P, Gottwaldová J, Kloudová A, Lochman I, Ženková J, Švagera Z, Bartoš V, Všianský F. Úskalí kvantifikace IgM v likvoru, *Klin. Biochem. Metab.*, 20 (41), 2011, 136–144. Příloha 1.

Koncentrace albuminu v CSF a séru pro výpočet kvocientu albuminu za účelem posouzení funkce hemato-likvorové bariéry by měla být stanovována imunoturbidimetry či imunonefelometricky reakcí se specifickou protilátkou. Doporučována je stejná analytická metoda pro oba typy biologického materiálu, v případě použití různých metod hrozí klinicky závažná odchylka při výpočtu albuminového kvocientu. Podobně je tomu i v případě stanovení imunoglobulinů v likvoru a séru. V případě IgG je využívána jedna reagensie pro stanovení v CSF i séru se stejným kalibračním rozsahem ale rozdílným ředícím schématem pro konkrétní biologický materiál, v případě IgM a IgA je vzhledem k výrazně nižším koncentracím v CSF doporučeno na rozdíl od stanovení v séru použití imunonefelometrie s využitím vazby protilátek na latexové částice. Současně v minulosti německá likvorologová škola doporučovala provedení stanovení konkrétních biomarkerů v CSF a séru za účelem výpočtu jejich kvocientů na stejné kalibrační křivce, likvorové, což ale vzhledem k řádově rozdílným koncentracím v CSF a séru bylo ekonomicky nevýhodné (v séru musel být vzorek několikastupňově ředěn, než bylo dosaženo definitivního výsledku) a postupně se od toho upustilo [40].

V rámci rutinního stanovení koncentrace imunoglobulinů byly na našem pracovišti využívány různé analytické systémy pro jejich stanovení v CSF a séru. Prvním z nich byl imunonefelometr Image firmy Beckman Coulter. Tento analyzátor využíval místo preferované 6-bodové kalibrace adjustaci na jeden roztok o známé koncentraci, což pro imunochemické stanovení není zcela ideální. V případě IgM v CSF to mohl být jeden z důvodů vedoucí k odlišným výsledkům ve srovnání s hodnotami získanými pomocí systému firmy Siemens (BN ProSpec). Na toto téma byla na našem oddělení provedena studie srovnávající různé metody stanovení IgM v likvoru a séru, *Příloha 1*. Bylo do ní zařazeno 75 náhodně vybraných párových vzorců likvorů a sér. Na pracovišti FN Ostrava byly koncentrace IgM stejně jako ve FN Plzeň a FN Brno-Bohunice stanoveny na analyzátoru Image, resp. Image 800 metodou poměrové kinetické nefelometrie. Ve FNO a FN Plzni byla pro analýzu sér využita sérová kalibrační křivka, pracoviště v Brně stanovilo IgM v párových vzorcích likvorů a sér za použití likvorové kalibrační křivky. Současně bylo provedeno stanovení IgM na nefelometrech firmy Siemens,

na BN ProSpec ve FNO a na BN II na ZÚ Ostrava metodou end-point nefelometrie. Kromě toho byla použita ke stanovení IgM ve FNO „home-made“ sendvičová ELISA metoda s použitím kozích protilátek proti lidskému IgM.

Hodnoty sérových koncentrací IgM získané nefelometricky na různých přístrojích vykazovaly minimální rozdíly, zatímco sérové koncentrace IgM stanovené metodou ELISA byly oproti nefelometrickému stanovení o 10 – 15 % vyšší. Vedle toho likvorové koncentrace IgM se překvapivě výrazně lišily v závislosti na použité metodě stanovení, přičemž hodnoty pro analyzátor Immage byly v oblasti fyziologických nebo jen hraničně zvýšených likvorových koncentrací až několikanásobně vyšší ve srovnání s hodnotami získanými stanovením na analyzátoch řady BN nebo metodou ELISA. To vedlo k diskrepantním výsledkům intrathekální syntézy IgM získaným měřením na analyzátoch Immage ve srovnání s výsledky ostatních metod.

5.2.3.3 Detekce intrathekální protilátkové odpovědi

Stanovení či průkaz intrathekální protilátkové odpovědi lze na základě znalostí koncentrace albuminu a imunoglobulinů G, A a M (IgG, IgA, IgM) v likvoru a paralelně odebraném séru, současně detekcí oligoklonálních pásů v třídě IgG. Detekce oligoklonálních IgM, IgA a FLC již patří mezi vysoce specializované vyšetření stejně tak jako detekce intrathekální syntézy specifických protilátek reagujících s příslušným antigenem [40].

Výpočet intrathekální syntézy imunoglobulinů

Pro výpočet intrathekální syntézy imunoglobulinů se nejčastěji využívá Reiberova hyperbolická funkce [46], která popisuje závislost kvocientu imunoglobulinu na kvocientu albuminu, přičemž jednotlivé koeficienty jsou tabelovány pro imunoglobuliny IgG, IgA a IgM a to jak pro průměrný kvocient imunoglobulinů (Q_{mean}), tak i jeho limitní hodnotu ($Q_{\text{lim}} = Q_{\text{mean}} + 3 \text{ SD}$) či dolní limitní hodnotu ($Q_{\text{lower lim}} = Q_{\text{mean}} - 3 \text{ SD}$), Tabulka 2:

$$Q_{\text{Ig}} = \frac{a}{b} \sqrt{(Q_{\text{Alb}}^2 + b^2)} - c$$

Tabulka 2. Parametry Reiberovy rovnice pro IgG, IgA a IgM [46].

	Parametr	a/b	b ²	c
Q_{lim}	IgG	0,93	0,000006	0,0017
	IgA	0,77	0,000023	0,0031
	IgM	0,67	0,000120	0,0071
Q_{mean}	IgG	0,65	0,000008	0,0014
	IgA	0,47	0,000027	0,0021
	IgM	0,33	0,000306	0,0057
Q_{lower lim}	IgG	0,33	0,000002	0,0003
	IgA	0,17	0,000074	0,0013
	IgM	0,04	0,000442	0,00082

Výpočet intrathekální syntézy imunoglobulinu a jeho výpovědní hodnota je však do značné míry závislá na řadě faktorů. Především se předpokládá, že se vzorkem CSF byl paralelně odebrán vzorek séra (předpoklad ustálené rovnováhy mezi krevním a likvorovým kompartmentem), vzorek CSF nebyl kontaminován krevní příměsí, pacient neměl infuzi albuminu či intravenózních imunoglobulinu, a nepodrobil se plazmaferéze. Za fyziologických okolností by mělo platit, že:

$$Q_{ALB} > Q_{IgG} > Q_{IgA} > Q_{IgM}$$

V případě, že jedna z těchto nerovností je obrácená, nález svědčí pro intrathekální syntézu příslušného imunoglobulinu.

Detekce intrathekální syntézy imunoglobulinu IgG

Zeman D, Kušnierová P, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Oligoklonální IgG a volné lehké řetězce – srovnání izoelektrické fokusace v agarózovém a polyakrylamidovém gelu. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82/115(1): 1–8. *Příloha 2*

Senzitivnější metodou pro průkaz intrathekální syntézy imunoglobulinů je izoelektrická fokusace (IEF). Nález 2 a více oligoklonálních IgG pásů (oIgG) v likvoru a zároveň nepřítomných v séru je základním McDonaldovým kritériem pro diagnostiku RS. Pro tyto účely

je možné v laboratorní medicíně využít 2 metody, izoelektrickou fokusaci s následnou imunofixací (IMF), anebo izoelektrickou fokusaci s následným afinitním imunoblotingem (AIB), která je mnohem citlivější. Současně je možné použít 2 typy gelů, agarózový či polyakrylamidový gel.

V rutinní laboratorní praxi řady laboratoří je za tímto účelem využívána izoelektrická fokusace bílkovin na agarózovém gelu prováděná na poloautomatickém systému Hydrasys 2^{SCAN} Focusing, následována imunofixací s anti-IgG antisérem značeným peroxidázou. Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování vzorků, nicméně vyžaduje naředění vzorků séra na likvorovou koncentraci.

Při vizuálním hodnocení nálezů posuzujeme přítomnost oligoklonálních IgG pásů v likvoru a séru téhož pacienta, přičemž IEF nález klasifikujeme podle doporučení mezinárodních expertů do jednoho z 5 typů [47], [48], viz Obrázek 7.

Typ 1: normální nález; v likvoru ani v séru se nevyskytují oIgG pásy, barví se pouze polyklonální IgG;

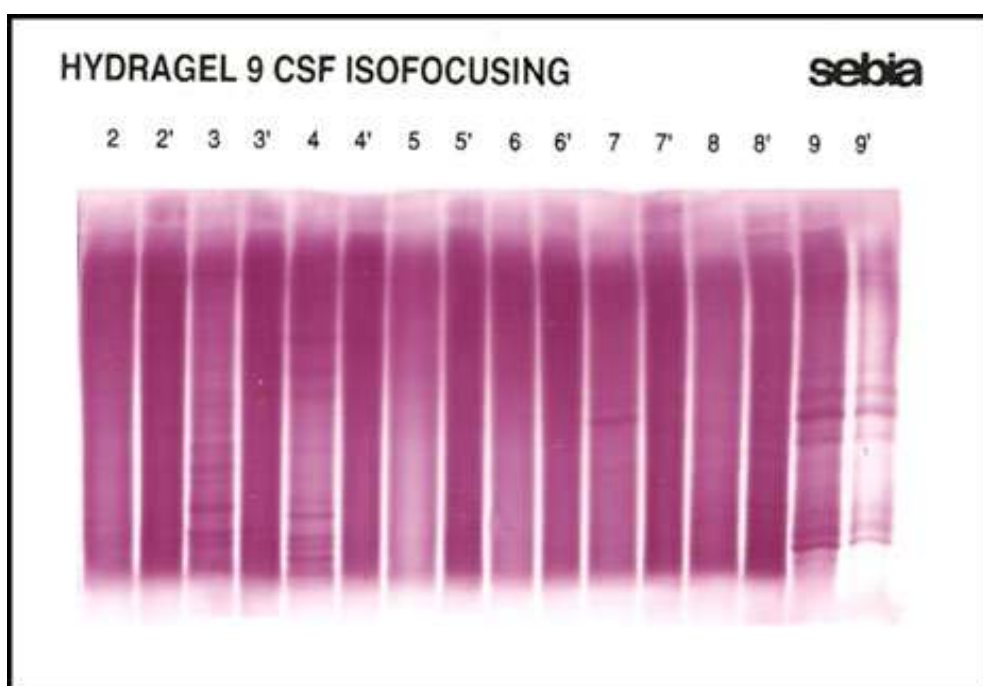
Typ 2: v likvoru se vyskytují alespoň 2 oIgG pásy, které chybějí v séru, nález nasvědčuje lokální syntéze IgG typické pro roztroušenou sklerózu, ale může se vyskytovat i u jiných chronických zánětlivých onemocnění CNS (neuroborrelióza, paraneoplastické neurologické syndromy aj.);

Typ 3: v likvoru se vyskytují oIgG pásy, z nichž nejméně 2 nemají korelát v séru a naopak alespoň 2 mají své ekvivalenty v séru; tento typ se vyskytuje u pacientů s roztroušenou sklerózou a pacientů s infekcí CNS, se záněty CNS spojenými se systémovými onemocněními, např. sarkoidózou, neuroborreliózou, u systémových infekcí apod.

(Poznámka: neexistuje ostrý přechod mezi typy 2 a 3, velmi záleží na citlivosti detekční metody pro oIgG);

Typ 4: v likvoru i séru se vyskytují alespoň 2 společné oIgG pásy, nález typický u systémových zánětů, např. borreliózy, vaskulárních onemocnění na autoimunitním podkladě, ale i u syndromu Guillaina-Barrého, periferních neuropatií a degenerativních onemocnění.

Typ 5: nahuštěné intenzivní pásy s klesající intenzitou vybarvení směrem od katody k anodě, charakteristický obraz monoklonálního imunoglobulinu třídy IgG, nacházíme zejména u paraproteinových neuropatií; IEF prokazuje monoklonální IgG již v době, kdy je pod detekčním limitem klasické elektroforézy; IEF umožňuje stanovení heterogenity – proto je pásů více, i když jde o produkt 1 klonu B-lymfocytů.



Obrázek 7. Jednotlivé typy oIgG pásů získané metodou izoelektrické fokusace s následnou imunofixací. 2, 2', oIgG pásy nepřítomny; 3, 3', 4, 4', 7, 7', oIgG pásy přítomny v likvoru, nepřítomny v séru, typ 2; 5, 5', 6, 6', oIgG pásy nepřítomny v likvoru i séru, typ 1; 8, 8', oIgG pásy přítomny v likvoru i séru, zrcadlový obraz, typ 4; 9, 9', obraz monoklonálního IgG v likvoru i séru, typ 5.

Další metodou, kterou lze pro tyto účely použít, je izoelektrická fokusace s následným imunoblotingem. Vzhledem k publikovaným údajům o mnohem vyšší citlivosti této metody [49] jsme se rozhodli obě metody porovnat, *Příloha 2*. Pro detekci oIgG po separaci izoelektrickou fokusací v agarózovém gelu s následnou imunofixací byl použit komerční kit Hydrigel 9 CSF Isofocusing Kit firmy Sebia na přístroji Hydrasys téže firmy. Pro izoelektrickou fokusaci v polyakrylamidovém gelu (PAG) byly použity komerčně dostupné gely s pH gradientem v rozmezí 6-11 firmy EDC na přístroji EDC Flatbed Professional. K imunodetekci byla použita senzitivní metoda s využitím alkalickou fosfatázou značené anti-IgG protilátky. Srovnání bylo provedeno ve 106 konsektivních vzorcích. Pouze tři vzorky (2,8 %) byly klasifikovány neshodně. Jediný intrathekálně syntezovaný IgG pás byl nalezen v 7/106 (6,6 %) vzorcích při použití IEF na agarózovém gelu s následnou imunofixací. Na PAG IEF/IB nebyl ve čtyřech z těchto případů nalezen žádný pás, ve dvou případech byl nalezen rovněž jeden pás a v jednom případě byly nalezeny čtyři pásy. Na PAG IEF/IB byl jediný intrathekálně syntezovaný IgG pás

nalezen v 10 případech (9,4 %). Na IEF/IMF nebyl v šesti z těchto případů nalezen žádný pás, ve dvou případech byl nalezen rovněž jediný pás a v dalších dvou případech byly nalezeny dva, resp. tři pásy. Porovnali jsme také výsledky podrobnější klasifikace nálezu do typů 1-5 podle dvou konsenzuálních doporučení [47], [48]. Shody bylo dosaženo v 75 vzorcích (70,8 %), podle Cohena koefficientu (0,503) se jedná o průměrnou shodu. Typ 1 při použití jedné z obou metod byl hodnocen jako typ 4 při použití alternativní metody v 19 případech; analogické neshodné hodnocení typů 2 a 3 přispělo dalšími osmi neshodně klasifikovanými výsledky. Počet intrathekálně syntezovaných IgG pásů byl porovnán pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ($r_s = 0,861$; $P < 0,0001$) a vážené hodnoty kappy (0,795). Výsledky indikují dobrou shodu mezi metodami. Wilcoxonovým testem nebyl zjištěn žádný systematický rozdíl mezi metodami v počtu intrathekálně syntezovaných IgG pásů ($P = 0,8442$). Při korelaci výsledků oIgG s klinickými daty (vedlejší výstup studie) byla u všech pacientů s diagnózou RS ($n = 12$) prokázána pozitivita oIgG při agarózové IEF/IMF; jeden z nich byl negativní na PAG IEF/IB (jediný intrathekálně syntezovaný IgG pás). Všichni pacienti s diagnózou CIS ($n = 3$) měli pozitivní oIgG oběma metodami. U všech 27 pacientů s jinými diagnózami byl oIgG test negativní. Při srovnání výpočtových metod intrathekální syntézy IgG s IEF v agarózovém gelu s imunofixací nebyly zjištěny žádné falešně pozitivní výsledky výpočtu podle Reibera [7], Auera et al. [50] ani Öhmana et al. [51]; jeden falešně pozitivní výsledek byl pozorován v případě IgG indexu (při použití konvenčního kritéria $> 0,7$). Senzitivita všech výpočtů však byla nízká (43,5 % pro IgG index a vztahy Reibera a Auera et al. a 52,2 % pro vztah Öhmana et al.).

Studie potvrdila, že mezi IEF na agarózovém gelu a polyakrylamidu bylo dosaženo velmi dobré shody. Obě metody považujeme za vhodné pro rutinní praxi. Současně bylo zjištěno, že výpočtové metody jsou pro průkaz intrathekální syntézy IgG méně senzitivní než detekce oligoklonálního IgG.

Jak již bylo uvedeno výše, metodou izoelektrické fokusace je možné v CSF a séru odhalit také přítomnost monoklonálních imunoglobulinů. S touto situací se lze běžně setkat v rutinním provozu. Pacient přichází do neurologické ambulance s dlouhotrvajícími bolestmi zad nejasné etiologie. Lékař mu indikuje odběr mozkomíšního moku a výsledkem IEF je nález typu 5 svědčící pro přítomnost paraproteinu charakteristického pro monoklonální gamapatie. Tento výsledek je dále potvrzen elektroforetickým vyšetřením séra. V případě potvrzení a kvantifikace přítomného monoklonálního imunoglobulinu je doporučeno vyšetření specializovaným hematologem.

Poznámka:

Elektroforetické a imunofixační vyšetření séra a moči společně s kvantitativním stanovením koncentrace volných lehkých řetězců (FLC) v séru patří mezi základní metody v diagnostice mnohočetného myelomu a řady dalších lymfoproliferativních onemocnění. Nadstavbovou metodou je pak stanovení poměru těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinů, Hevylite (HLC). V rámci této problematiky byly publikovány práce v tuzemských i zahraničních časopisech. Vzhledem k částečné souvislosti s laboratorními metodami využívajícími i v této problematice bude jejich přehled zařazen do seznamu příloh. *Příloha 3-5*

Výpočet a detekce intrathekální syntézy imunoglobulinu IgM

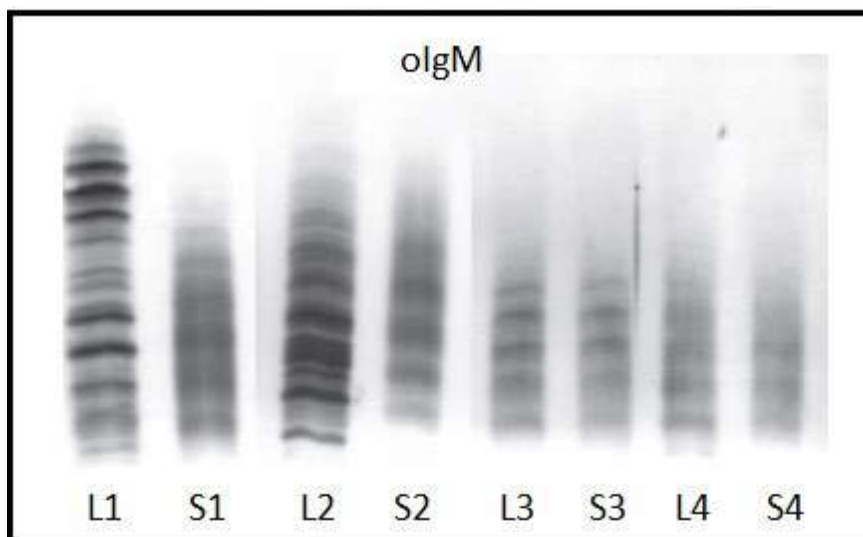
Zeman D., Kušniero P. Detekce oligoklonálních IgM pásů v likvoru. *Klin. Biochem. Metab.*, 24 (45), 2016, No. 3, p. 141–146. *Příloha 6*

Zeman, D., Kušniero P., Všianský, F., Regulio P., Škutová, M., Woznicová, I., Zapletalová, O., Hradílek, P., Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM test in routine practice: Comparison with quantitative assessment of intrathecal IgM synthesis. *Clin. Chim. Acta* 508 (2020), 137-145. *Příloha 7*

Detekce oligoklonálního IgM (oIgM) byla popsána před více než 20 lety [52], [53], [54], do popředí zájmu neuroimunologů se však dostala až po zjištění, že intrathekální syntéza oIgM může predikovat agresivní průběh RS [55]. Preferovanou metodou je izoelektrická fokusace s následným afinitním imunoblottingem (IEF/AIB). Upravená metoda detekce oligoklonálních IgM pásů v likvoru a séru byla publikována také našim pracovištěm v roce 2016, *Příloha 6*. Za tímto účelem bylo vyšetřeno 35 párových vzorků likvorů a sér. Zlepšení separace IgM bylo dosaženo při použití pH gradientu (4-8), prefokusací a katodickou aplikací vzorku. Separace nativního IgM se nepodařila, pro dosažení přijatelných výsledků byl vzorek před separací podroben působení redukčního činidla, v našem případě dithiothreitolu. Intrathekální syntéza oligoklonálního IgM byla prokázána u 11 z 35 vyšetřených vzorků pacientů. U 9 vzorků pacientů s diagnózou neznámého onemocnění nervového systému a u 30 symptomatických kontrol (n = 3) byly výsledky negativní. Průkaz oIgM statisticky významně koreloval s výpočtem intrathekální syntézy IgM podle Reibera (P = 0,007) i podle Auera et al.

($P = 0,026$). Námi upravená metoda IEF/AIB umožňuje citlivou a reprodukovatelnou detekci oIgM, Obrázek 8.

V následujících letech se naše práce ubírala směrem k posouzení vztahu mezi výpočtem intrathekální syntézy IgM a detekcí oIgM, *Příloha 7*. Do studie bylo zařazeno celkem 432 vzorků CSF a séra, u nichž byla provedena detekce oIgM a oIgG současně s výpočtem intrathekální syntézy podle Reibera, Auera a Öhmana. V případě použití běžných cut-off hodnot (≥ 2 oligoklonální pásy v CSF nepřítomné v séru) byl nelineární vztah pro výpočet intrathekální syntézy specifický ($> 94 \%$), ale málo senzitivní ($< 40 \%$ i při cut-off hodnotě ≥ 4 oligoklonální pásy v CSF nepřítomné v séru) ve srovnání s oIgM. Současně nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými algoritmy použitými pro výpočet intrathekální syntézy IgM. Při cut-off hodnotě ≥ 4 pásy v CSF nepřítomné v séru, byla u 61 % pacientů prokázána pozitivní intrathekální syntéza oIgM. Lze tedy konstatovat, že nelineární vztahy pro výpočet intrathekální syntézy IgM jsou sice specifické, ale s nízkou senzitivitou vzhledem k oIgM. Z důvodů zabránění falešně pozitivním výsledkům oIgM jsme navrhli hodnotit přítomnost 2 nebo 3 oligoklonálních pásů v CSF nepřítomných v séru jako hraniční výsledek, pouze u vzorků s ≥ 4 oIgM pásy v CSF nepřítomnými v séru hodnotit výsledek jako jednoznačně pozitivní.



Obrázek 8. Oligoklonální IgM pásy získané metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem. L, likvor; S, sérum; L1, S1, L2, S2, vzorky pacientů s RS, průkaz oIgM v likvoru, nepřítomny v séru, L3, S3, L4, S4, negativní nález.

Stanovení volných lehkých řetězců, výpočet a odhad intrathekální syntézy

Zeman D, Kušnierová P, Bartoš V, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O. Quantitation of free light chains reliably predicts their intrathecal synthesis. *Ann Clin Biochem* 2016; 53: 174-6. doi: 10.1177/0004563215579110. *Příloha 8*

Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, Všianský F, Byrtusová M, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O, Bartoš V., Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting. *PLoS One*. 2016 Nov 15: doi: 10.1371/journal.pone.0166556. *Příloha 9*

Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clin Chim Acta*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.027>. *Příloha 10*

Zeman D, Hradílek P, Kušnierová P, Píža R, Reguliová K, Woznicová I, Zapletalová O. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomedical papers*. 2015, vol. 159, no. 1, p. 104-113. ISSN 1213-8118. *Příloha 11*

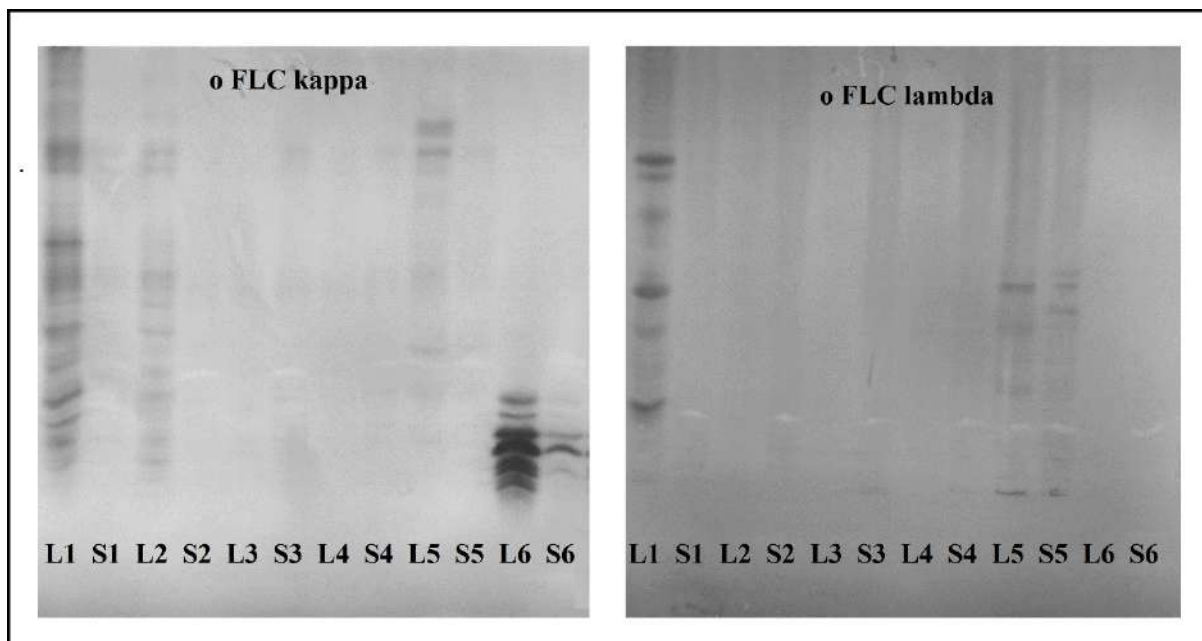
Další z metod doporučovaných pro diagnostiku RS je stanovení volných lehkých řetězců (FLC) v likvoru, přičemž upřednostňovány jsou volné lehké řetězce kappa. Byly publikovány práce, které hodnotí FLC kappa jako cenný marker intrathekální syntézy mající prediktivní hodnotu srovnatelnou s oligoklonálním IgG [56] , [57], [58], [59].

Pro účely kvantitativní stanovení je možno využívat diagnostické soupravy firmy The Binding Site, Siemens, SEBIA a další. Bohužel výsledky získané různými diagnostickými soupravami jsou často nesrovnatelné, což vyplývá i z našich výsledků, *Příloha 4* a výsledků mezilaboratorního porovnání (www.sekk.cz). Zásadním problémem při jejich stanovení je absence primárního standardu. Zdrojem většiny komerčně dostupných purifikovaných FLC jsou séra anebo moče pacientů s paraproteinémií nebo Bence-Jonesovou paraproteinurií. V případě diagnostické soupravy firmy The Binding Site jsou jako primární standardy použité

lehké řetězce purifikované z intaktních imunoglobulinů redukcí a acetylací. V důsledku použití různých diagnostických souprav jsou samozřejmě různé normální hodnoty v séru i CSF, proto je nutné při sledování např. progresi choroby zasílat vzorky pacientů stále do stejné laboratoře. Dalším přetrvávajícím problémem při stanovení FLC je křížová reaktivita protilátek s navázanými lehkými řetězci, což vede k výraznému nadhodnocení FLC v biologickém materiálu. Současně některé protilátky použité v testech FLC detekují lépe FLC dimery než monomery, zatímco stupeň FLC dimerizace se může měnit za různých patologických podmínek. Dále je nutno podotknout, že všechny testy FLC byly primárně vyvinuty s cílem pomoci při diagnostice a monitorování dyskrázie plazmatických buněk, zatímco jejich stanovení v jiných indikacích nebylo dostatečně validováno. Současně vzhledem k často velmi nízkým koncentracím FLC v normálním CSF nelze stanovit přesnou koncentraci, která je nezbytná pro následující výpočet kvocientu FLC a posouzení intrathekální syntézy FLC.

Vedle metody kvantitativního stanovení FLC v likvoru byly četné publikace věnovány posouzení intrathekální syntézy FLC metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem. Z tohoto důvodu jsme se i my rozhodli zabývat srovnáním kvantitativního stanovení FLC s oIgG a oFLC kappa a oFLC lambda, *Příloha 8*.

Do studie bylo zařazeno 75 párových vzorků CSF a séra. Ke stanovení koncentrace FLC byly použity diagnostické soupravy Freelite™ (The Binding Site) určené pro stanovení v CSF (REF LK016.L.S a LK018.L.S). Oligoklonální FLC byly stanoveny metodou IEF/AIB jak je popsáno v *Příloze 11*, Obrázek 9. Ve studovaném souboru nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly mezi koncentrací FLC v CSF, kvocientem FLC (CSF-FLC/S-FLC) a indexem FLC (Q-FLC/Q-ALB) pro predikci intrathekální syntézy volných lehkých řetězců. Každý parametr byl schopen predikovat výskyt oligoklonálních FLC pásů v CSF (AUC 0,932-0,999). Zaznamenali jsme však zvýšenou koncentraci volných lehkých řetězců v CSF u vzorků s nepřítomnými oFLC u dvou pacientů s velmi vysokými hodnotami FLC v séru. Bylo potvrzeno, že kvantifikace FLC v CSF spolehlivě předpovídá jejich intrathekální syntézu. Přesto v případě vysokých koncentrací FLC v séru je upřednostňován kvocient FLC.



Obrázek 9. Oligoklonální FLC kappa a lambda získané metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem. L, likvor; S, sérum; L1, S1, průkaz oFLC kappa i lambda v likvoru, nepřítomny v séru; L2, S2, průkaz oFLC kappa v likvoru, v séru nepřítomny, oFLC lambda nepřítomny v likvoru i séru; L3, S3, L4, S4, nepřítomny oFLC kappa i oFLC lambda v likvoru i séru; L5, S5, přítomny oFLC kappa i oFLC lambda v likvoru i séru; L6, S6, monoklonální FLC kappa přítomny v likvoru i séru, oFLC lambda nepřítomny.

Současně v další rozšiřující studii (*Příloha 9*) byl posuzován vztah mezi koncentracemi FLC kappa a FLC lambda v CSF a séru u různých diagnostických skupin. Celkem bylo analyzováno 166 párových vzorků CSF a séra metodami Freelite™ (The Binding Site), N Latex FLC (Siemens) a dvěma ELISA metodami. Výsledky byly porovnány s oFLC detekovanými metodou IEF/AIB. I přesto, že použité metody kvantifikace FLC spolu korelovaly, byly mezi jednotlivými metodami pozorovány proporcionální i systematické rozdíly. Nicméně, žádné zásadní rozdíly nebyly pozorovány v predikci positivity oFLC. Překvapivě poměr FLC kappa/FLC lambda v CSF byl nižší než v séru přibližně u 75 % vzorků s negativním oFLC testem. U poloviny pacientů s RS a CIS byly v CSF nalezeny výrazně zvýšené poměry FLC kappa/FLC lambda. Výsledky této studie ukazují, že s použitím vhodných mezních hodnot specifických pro danou metodu stanovení lze pro predikci intrathekální syntézy použít různé metody kvantifikace FLC v CSF. Důvod neočekávaně nízkých poměrů FLC kappa/FLC lambda v CSF v normálních CSF zůstal neobjasněný. Zatímco u většiny pacientů s RS a CIS byly hodnoty FLC kappa zvýšené, hodnoty FLC lambda v CSF vykazovaly velkou interindividuální

variabilitu a měly by být dále zkoumány z hlediska imunopatologického a prognostického významu.

Současně, jak je patrné z výše uvedeného, kvantitativní stanovení FLC kappa v CSF je často srovnáváno s detekcí oIgG, která je považována v laboratorní diagnostice RS za zlatý standard. Nicméně chybějící konsenzus při interpretaci údajů kvantitativního stanovení FLC v CSF brání spolehlivým závěrům. Tento problém by mohl pomoci vyřešit teoreticky odvozený hyperbolický vztah pro výpočet intrathekální syntézy FLC podle Reibera, *Příloha 10*. Za tímto účelem byly na základě níže uvedené hyperbolické funkce vypočteny kvocienty FLC kappa a albuminu u 433 zdravých biochemicky definovaných kontrol.

$$Q_{\text{FLC kappa}}(\text{mean}) = a/b * (Q_{\text{Alb}}^2 + b^2)^{0.5} - c$$

S využitím kvocientu FLC kappa ($Q_{\text{FLC kappa}}$), variačního koeficientu (22,5 %) a referenčního intervalu, který byl odvozen jako $Q_{\text{FLC kappa}} \pm 3 \text{ CV}$, byla odvozena diskriminační funkce pro limitní kvocient FLC kappa:

$$Q_{\text{FLC Kappa}}(\text{lim}) = (3.27(Q_{\text{Alb}}^2 + 33)^{0.5} - 8.2) \times 10^{-3}.$$

Na základě těchto vztahů byla intrathekální syntéza FLC kappa vypočtena v 8 % případů zdravých kontrol bez přítomných oIgG pásů ($n = 388$). Současně při použití tohoto vztahu nebyla prokázána intrathekální syntéza FLC kappa u 7 % pacientů s RS ($n = 95$). U pacientů s RS byla vypočtena průměrná intrathekální syntéza 3x větší pro FLC kappa (95 %) ve srovnání s celkovým IgG (36 %).

Tato odvozená hyperbolická funkce pro posouzení intrathekální syntézy FLC kappa je lepší než lineární index FLC kappa (10 až 15 % falešných negativit) či exponenciální funkce (30 % falešných pozitivit u kontrolních vzorků) v analytickém rozsahu dat získaných od pacientů s RS, s excelentními výsledky až pro desetinásobně vyšší hodnoty kvocientu albuminu. Dynamika této malé molekuly (FLC kappa) přispívá k pochopení bariérových funkcí závislých na velikosti molekul.

Poznámka:

Dlouhy O., Kusnierova P., Kurasova I., Cisarikova M., Zeman D. Chemiluminescent detection of oligoclonal immunoglobulins after isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2018 Jun;162(2):107-115. doi: 10.5507/bp.2018.003. *Příloha 12*

Při využití izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblottingem, jak pro detekci oIgG, oIgM, tak oFLC kappa, je z důvodu dostupnějšího vybavení využívána chromogenní detekce. Naším cílem, v rámci studentské grantové soutěže, bylo zjistit, zda by využití chemiluminiscenční detekce nevedlo k možnému zcitlivění této metody. *Příloha 12*

Byl proveden soubor experimentů za účelem detekce oIgG s využitím BCIP/NBT substrátu (BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; NBT: p-nitroblue tetrazolium chloride) značeného alkalickou fosfatázou pro chromogenní detekci a s peroxidázou pro chromogenní detekci. Na základě vizuálního hodnocení signálu bylo zjištěno, že chemiluminiscenční detekce vyžaduje přibližně 4x nižší množství aplikovaného proteinu než velmi citlivá chromogenní detekce. Mezi testovanými metodami detekce oIgG byla nalezena velmi dobrá korelace. V případě průkazů antigen specifických oIgG lze použít obě metody, avšak profil oIgG byl jasnější metodou chemiluminiscence. U jednoho pacienta byly chemiluminiscenční detekci prokázány oligoklonální IgD pásy, které metodou chromogenní detekce byly jen stěží viditelné. Lze tedy konstatovat, že chemiluminiscenční detekce je proveditelnou volbou pro detekci oIgG a lze ji využít v případech, kdy je nutno zvýšit citlivost detekce.

5.2.3.4 Biomarkery zánětu

Kušnierová, P., Zeman, D., Hradílek, P., Zapletalová, O., Stejskal, D. Determination of chitinase 3-like 1 in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological diseases. PLoS One. 2020 May 21: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519>. *Příloha 13*

Pro posouzení míry zánětlivého procesu lze využít kvantitativní stanovení běžně dostupných zánětlivých biomarkerů, jako např. interleukinu 6 (IL6), tumor nekrotického faktoru (TNF) a dalších. U zdravých jedinců, stejně tak velmi často i u pacientů s RS, jsou však hladiny IL6 pod mezí stanovitelnosti většiny dostupných metod. Fyziologické koncentrace, a hladiny jednotlivých cytokinů u zánětlivých onemocnění CNS popsal Maier et al. [60]. Z tohoto důvodu je stanovení tohoto biomarkeru velmi diskutabilní.

Nicméně v posledních letech se pozornost upírá směrem k homeostatickému chemokin, CXCL13, který je silným chemoatraktantem B-buněk. V mozkomíšním moku je exprimován monocyty a zejména makrofágy v perivaskulárních zánětlivých lézích a rozptýlených parenchymálních buňkách [61]. Byly publikovány práce, které hodnotily tento chemokin jako

velmi důležitý marker zánětlivé aktivity u pacientů s roztroušenou sklerózou [62]. Autoři prokázali statisticky významnou korelaci zvýšených hladin CXCL13 s konverzí CIS do klinicky definované RS. Současně popsali korelaci s počtem buněk, počtem plazmocytů, B i T lymfocytů a slaběji i monocyty, kvocientem IgG [61] a přítomností oIgG i oIgM [63]. Hodnoty CXCL13 v CSF $\geq 15,4 \text{ ng.L}^{-1}$ vykazovaly dobrou pozitivní prediktivní hodnotu a specifitu pro diagnostiku RS a pro klinický relaps do jednoho roku od nástupu ve srovnání s diagnostikou neuroborreliózy s cut-off hodnotami > 100 nebo $> 250 \text{ ng.L}^{-1}$ [63]. CXCL13 je také jedním z prediktorů dobré léčebné odpovědi na léčbu rituximabem [64]. Tato zjištění potvrzují i naše pozorování, *Příloha 13*. Byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi koncentrací CXCL13 a přítomností, resp. nepřítomností oIgG, oFLC kappa a oFLC lambda.

Dalším potenciálním biomarkerem zánětlivé odpovědi by mohl být protein YKL-40, označovaný také jako chitinase 3 – like 1 (CHI3L1). Tento protein patří do rodiny chitinových glykosylhydroláz, ale na rozdíl od chitináz postrádá enzymatickou aktivitu. Jedná se o glykoprotein, který je produkován širokou škálou buněk, jako jsou makrofágy, chondrocyty, synoviální buňky, osteoblasty, neutrofily a astrocyty [65], [66], [67]. CHI3L1 je exprimován v astrocytech v mozkové tkáni pacientů s RS a je spojován s reaktivní gliózou v různých neuropatologických stavech, zejména těch, které souvisejí s neurozánětem. CHI3L1 je uvolňován in vitro z makrofágů, ale vlastní protein CHI3L1 je přítomen in vivo v okolí mikrogliaálních uzlin v určitých astrocytech. mRNA CHI3L1 je exprimována reaktivními astrocyty obklopujícími mikrogliaální uzliny, což naznačuje, že makrofágy uvolňují zánětlivé mediátory, které mohou indukovat expresi CHI3L1 v okolních astrocytech, ale ne v neuronech. Transkripce CHI3L1 makrofágy je pravděpodobně inhibována až po vstupu do mozku, což může být příčinou rozdílných pozorování u jiných tkáňových patologií. [68], [69]

V obecném úvodu této práce popisujeme RS jako demyelinizační onemocnění spojené s různou mírou zánětlivé aktivity, gliózou a variabilní ztrátou axonů. Očekáváme tedy, že i tento biomarker, CHI3L1 se bude vyskytovat u pacientů s RS ve zvýšené koncentraci. Cílem našeho bádání bylo ověřit fyziologické koncentrace CHI3L1 v CSF a porovnat hladiny tohoto markeru v různých diagnostických skupinách, včetně RS, i s dalšími biomarkery axonálního poškození nebo neurozánětu.

Do studie bylo zařazeno celkem 132 vzorků neurologických pacientů, kteří byli rozděleni do jednotlivých diagnostických skupin, RS (n = 42), CIS (n = 14), jiná nezánětlivá neurologická onemocnění (OIND; n = 11), nezánětlivá neurologická onemocnění (NIND; n = 46), zánětlivé onemocnění periferního nervového systému (IDPNS; n = 4) a kontrolní

skupina (n = 15). Pacienti s diagnózou RS byli dále rozděleni dle revidovaných McDonaldových kritérií z roku 2017, přičemž 26 pacientů bylo diagnostikováno jako RR-RS, 14 pacientů jako PP-RS; u zbývajících dvou pacientů nebylo možné průběh RS vyhodnotit, protože nebyla k dispozici žádná následná dokumentace. Žádný z pacientů ze skupin s RS a CIS nebyl v době odběru vzorku léčen léky modifikujícími průběh onemocnění (DMD). V rámci studie byly odhadnuty referenční meze pro CHI3L1 v CSF pohybující se mezi koncentracemi 28,6 – 182,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Byly prokázány statisticky významné rozdíly v koncentracích CHI3L1 v CSF mezi jednotlivými diagnostickými skupinami. Současně byla nalezena statisticky významná korelace mezi hladinami CHI3L1 a lehkými řetězci neurofilament (NFL) ve skupině RS ($r_s = 0,460$; $P = 0,002$) a mezi CHI3L1 a fosforylovanými těžkými řetězci neurofilament (pNFH) ve skupině RS ($r_s = 0,691$; $P < 0,001$). Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen při kategorickém porovnání CHI3L1 pomocí Fisherova exaktního testu ve skupině RS a dalšími diagnostickými skupinami. Stejně tak nebyl nalezen statisticky významný rozdíl při použití Mann-Whitneyho U testu mezi CHI3L1 a dalšími parametry a přítomnými či nepřítomnými oligoklonálními pásy. Lze uzavřít, že koncentrace CHI3L1 v CSF se lišila v závislosti na diagnóze a významně korelovala s koncentracemi biomarkerů axonálního poškození (NFL i pNFH), ani nikoliv s biomarkerem zánětlivé reakce CXCL13. CHI3L1 v CSF se tedy jeví jako slibný prognostický, i když etiologicky nespecifický, biomarker RS.

5.2.3.5 Biomarkery tkáňového poškození

Kušnierová P., Zeman D., Slepčanová H., Všianský F., Michnová O., Bártová P., Stejskal D. Porovnání dvou analytických metod stanovení neurodegenerativních markerů β -amyloidu 1-42, celkového tau-proteinu a fosforylovaného tau-proteinu 181. *Labor Aktuell* 2020, 24 (2), 21-26. *Příloha 14*

Neurodegenerativní poškození CNS je u pacientů s RS přítomno od nejranějších fází této nemoci. V rámci likvorové diagnostiky tkáňového poškození CNS je v posledních letech pozornost zaměřena na amyloid β (Ab). Tato molekula vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu, který je fyziologickou součástí buněčné membrány. V klinické praxi se využívá převážně stanovení izoformy Ab₄₂ končící alaninem na rozdíl od kratší izoformy Ab₄₀ končící valinem, která za fyziologických okolností převažuje, je solubilní a tělem vylučována. Rychle agregující izoforma Ab₄₂ je tak dominující formou amyloidu β uloženého v placích. Jeho

snížená koncentrace u pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD) je tak vysvětlována právě jeho zvýšenou adherencí v perineuronálních neuritických placích [70]. Podobně i u pacientů s RS byly pozorovány snížené koncentrace amyloidu β [71], [72], [73]. Pietroboni et al. studovali 40 nově diagnostikovaných pacientů s RR-RS, přičemž pacienty rozdělili do dvou skupin, na pacienty s hladinou $Ab_{1-42} < 813 \text{ ng.L}^{-1}$ (Ab_{low}) a $Ab_{1-42} > 813 \text{ ng.L}^{-1}$ (Ab_{high}). Současně u všech subjektů bylo provedeno vstupně neurologické a MRI vyšetření. U 29 z nich poté opakované MRI vyšetření po 1 roce. Při porovnání cerebelární parenchymální frakce (GM + WM / celkový objem mozečku %) byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinami Ab_{high} and Ab_{low} při vstupu ($P < 0,0001$) a při následujícím vyšetření ($P = 0,02$). Obdobně i porovnání cerebelární GM frakce (GMF) ukázalo významné rozdíly mezi skupinami Ab_{high} and Ab_{low} při vstupu ($P = 0,002$) a rok poté ($P = 0,04$). Vícenásobná regresní analýza prokázala, že koncentrace Ab je nejlepším prediktorem GMF. Autoři se tedy domnívají, že časná cerebelární atrofie se jeví jako zásadní pro predikci špatné prognózy u RS mnohem více než globální atrofie mozku, která se objevuje v relativně pozdější fázi [74].

Za účelem stanovení koncentrace tohoto biomarkeru je možné použít ELISA soupravy různých firem (Fujirebio Europe, IBL, Analytica Jena a Euroimmun) a současně plně automatizovanou metodu firmy Roche, která však sebou přináší mnoho úskalí, především spojených s množstvím odebraného CSF a dalšími preanalytickými podmínkami. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli vybrané diagnostické soupravy porovnat, *Příloha 14*. Do studie bylo zařazeno 42 vzorků pacientů s podezřením na neurodegenerativní onemocnění. Při porovnání studovaných diagnostických souprav (Euroimmun vs. Roche) byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými metodami stanovení. Diagnostické soupravy firmy Roche a Euroimmun nejsou navzájem zastupitelné. Nicméně uspokojivá shoda z hlediska klinické interpretace byla prokázána mezi všemi testovanými diagnostickými soupravami. Pro rutinní analýzu lze tedy doporučit obě metody stanovení, nicméně je nutné mít stále na paměti sledování hladiny příslušných biomarkerů ve stejné laboratoři používající stále stejnou metodu stanovení a hladinu konkrétního biomarkeru interpretovat vzhledem k referenčním mezím konkrétní laboratoře.

5.2.3.6 Biomarkery poškození neuronů/axonů

Kušnierová P., Zeman D., Hradílek P., Čábal M., Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. J Clin Lab Anal. 2019 Jun 14:e22948. doi: 10.1002/jcla.22948. *Příloha 15*

Mezi markery poškození neuronů a axonů lze řadit tau protein, neuron specifickou enolázu (NSE), bílkoviny neurofilament a případně další molekuly.

Tau protein jako nízkomolekulární neurocytoskeletální protein se může vyskytovat až v 6 různých izoformách, které se liší délkou polypeptidového řetězce [75]. Účastní se výstavby mikrotubulů, která je řízena fosforylací a defosforylací. Defosforylovaný tau protein přispívá k polymerizaci a stabilizaci mikrotubulů, kdežto fosforylovaný tau protein se z jejich vazby uvolňuje a tím vede k jejich rozpadu. Za fyziologických okolností je mezi těmito dvěma pochody udržována rovnováha zajišťující potřebnou stabilitu mikrotubulů [76]. Za patologických podmínek se fosforylované formy tau proteinu uvolňují za tvorby párových helikálních filament agregujících za vzniku neurofibrilárních klubíček [77]. Přítomnost těchto obtížně odbouratelných intracelulárních depozit tau proteinu je typická pro neurodegenerativní onemocnění označované jako tauopatie, jejíž hlavním představitelem je AD. Následkem může být rozpad buňky se současným uvolněním tau proteinu do extracelulárního prostoru. Zvýšená koncentrace celkového tau proteinu společně s fosforylovaným tau proteinem v CSF tak patří k ukazatelům AD.

Současně vzhledem k prokázané přítomnosti tau proteinů v mikrotululech axonů, byl studován tau protein u RS, která je výsledkem demyelinizace a následné axonální léze vedoucí ke ztrátě motorických a senzorických funkcí. Terzi et al. ve studii zahrnující 45 pacientů s RS prokázali statisticky významně zvýšené hladiny tau proteinu ve srovnání s kontrolní skupinou a považují tento biomarker za časný ukazatel poškození axonů [78]. Vedle toho Jaworski et al. prokázali významně zvýšenou hladinu tau proteinu v CSF u pacientů s PP-RS ve srovnání s SP-RS, současně frakce parenchymu (BPF) byla významně snížena u skupiny pacientů s SP-RS. BPF v celé populaci nepřímo korelovalo s EDSS a MSSS skórem. Tau protein v CSF v celé populaci inverzně koreloval s EDSS. Výsledky této studie naznačily, že tau protein v CSF u RS klesá v průběhu onemocnění a odráží stupeň ztráty mozkového parenchymu [79]. Mirzaei-Dizgah et al. studovali hladinu tau proteinu v séru a slinách pacientů s RS, přičemž prokázali sníženou expresi tau proteinu v séru pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou.

Hladina tau proteinu negativně korelovala s EDSS. Tau protein ve slinách nekoreluje s tau proteinem v séru ani EDSS skórem. Zdá se tedy, že na rozdíl od tau proteinu ve slinách, je tau protein v séru potenciální biomarker RS [80].

Podobně jak bylo prezentováno výše, i tento laboratorní marker je možné stanovovat různými diagnostickými soupravami. Dvě nejvhodnější soupravy byly testovány, viz. *Příloha 14*.

Další z intenzitně studovaných biomarkerů jsou neurofilamenta (NF). Jedná se o hlavní strukturální proteiny neuronů patřící mezi intermediární filamenta IV. třídy, která jsou selektivně exprimována v nervovém systému a nejvíce jsou zastoupena v dlouhých projekčních axonech. Skládají se ze 4 podjednotek s různou molekulovou hmotností; lehké řetězce neurofilament (NFL), střední řetězce neurofilament (NFM), těžké řetězce neurofilament (NFH) a nestabilní α -internexiny. Tyto podjednotky mají různou molekulovou hmotnost a funkční vlastnosti. Gen pro NFL se nachází na chromozomu 8p21, jeho protein má molekulovou hmotnost 61,5 kDa a skládá se z 543 aminokyselin. Gen pro NFM se nachází také na chromozomu 8p21; skládá se z 916 aminokyselin a je důležitý pro radiální axonální růst. Gen pro NFH je na chromozomu 22q12.2, jeho protein má molekulovou hmotnost 111,5 kDa a skládá se z 1020 aminokyselin. NFH jsou důležité pro interakci protein-protein, které jsou lokálně regulovány v axonu fosforylací [81], [82]. Alfa-internexinový protein má molekulovou hmotnost 66 kDa a může tvořit homopolymery; kvůli nestabilitě je však tato podjednotka v laboratorní praxi obtížně detekovatelná. Jeho gen se nachází na chromozomu 10q24.33. Ke stanovení koncentrací NF lze použít ELISA metody (z ang. z angl. enzyme-linked immunosorbent assay) nebo citlivější technologie jako je elektrochemiluminiscenční imunotest SIMOA [83].

NF se uvolňují do extracelulárního prostoru v závislosti na axonálním poškození. Jejich koncentrace v mozkomíšním moku, popř. séru odráží stupeň axonálního poškození [84]. Zvýšené hladiny lehkých i těžkých řetězců neurofilament (NFL i NFH) byly pozorovány u pacientů s RS, což může odrážet poškození neuroaxonů v aktivních placích, které je zprostředkováno zánětem a neurodegenerací [85]. U pacientů s CIS korelují hladiny NFL s radiologickými známkami aktivity onemocnění (Gd-enhancující léze) a předpovídají konverzi na klinicky definovanou RS s horší prognózou [86], [87], [88]. Během progresu RS, hladiny NFH korelují s fyzickým postižením a změnami objemu mozku, ale ne s počtem lézí nebo objemem. Koncentrace NFH může indikovat pokračující neurodegeneraci [85], [87], [89]. Pacienti léčení natalizumabem vykazují trojnásobné snížení NFL, což naznačuje, že tato léčba má nejen imunomodulační účinek, ale může také snížit poškození axonů [90]. Tyto účinky jsou

také pozorovány u pacientů s RS, kteří byli léčeni rituximabem, mitoxantronem nebo fingolimodem. Studie však přesvědčivě neprokázaly, že pokles axonálního poškození není sekundární a že hladiny anti-NF protilátek nekorelují s klinickými variantami RS [91], [92]. Díky zkušenosti těchto autorů jsme se rozhodli posoudit vztah mezi koncentracemi lehkých a těžkých řetězců neurofilament v likvoru a séru u různých diagnostických skupinách včetně RS, *Příloha 15*. Do studie bylo zařazeno celkem 172 pacientů moravskoslezského regionu zaslaných do naší laboratoře k vyšetření likvoru. Na základě získaných klinických informací byli pacienti (n = 101) dále rozděleni do příslušných diagnostických skupin, RS (n = 19), CIS (n = 11), OIND (n = 10), IDPNS (n = 5), NIND (n = 38) a kontrolní skupina (n = 33). Pro diagnostiku RS byla použita revidovaná McDonaldova kritéria z roku 2017. Při hodnocení vzájemného vztahu mezi NFL a pNFH (fosforylované těžké řetězce neurofilament) byla prokázána statisticky významná korelace ($r_s = 0,748$; n = 89; $P < 0,001$). Současně pomocí Passing-Bablokovy regrese byl nalezen statisticky významný bias mezi koncentracemi NFL a pNFH v CSF. Pro koncentrace okolo 300 ng.L^{-1} byl bias 28,1 %, pro koncentrace okolo 5000 ng.L^{-1} byl bias více než 50 %. To naznačuje, že při vysokých koncentracích NFL v CSF nabývala koncentrace pNFH v CSF přibližně polovičních hodnot NFL v CSF, z čehož plyne, že metody jsou vzájemně nezaměnitelné. Dále byla prokázána pouze nízká korelace mezi likvorovou a sérovou koncentrací pNFH, pravděpodobně z důvodů rozdílného biologického materiálu. Pomocí kappa statistiky byla posuzována klinická shoda testovaných parametrů. Hodnota vážené kappy se pohybovala okolo 0,556, což svědčí pro dobrou shodu.

Byla posuzována také korelace NF s klinickými daty. Koncentrace NFL v CSF ve skupinách RS či CIS byla významně vyšší v podskupině pacientů, kteří měli EDSS skóre 2,5 nebo vyšší (medián NFL $1208,5 \text{ ng.L}^{-1}$) 6 měsíců po lumbální punkci ve srovnání s podskupinou s EDSS skórem 0 až 2 (medián NFL 488 ng.L^{-1} ; $P = 0,0269$). NFL se tak jeví jako slibný marker predikce závažnosti postižení. Současně obě testované diagnostické soupravy NFL a pNFH poskytují konzistentní výsledky, nicméně metoda NFL vzhledem k nižší citlivosti je vhodná pro měření v CSF, kdežto metoda pNFH pro CSF i sérum. Výsledky současně potvrdily, že NF, ať už NFL nebo pNFH, představují nespecifický indikátor poškození tkání.

6 DISKUZE

Za účelem doplnění palety vyšetření umožňující zpřesnění diagnostiky roztroušené sklerózy, stanovení prognózy onemocnění a současně k monitorování léčebné odpovědi byly do rutinní laboratorní praxe zavedeny výše uvedené metody. Vlastní diskuze k jednotlivým biomarkerům a studovaným souborům jsou součástí jednotlivých publikací, které byly prezentovány v odborných českých i zahraničních časopisech. Přesto k jednotlivým metodám přikládám několik dalších komentářů.

K průkazu intrathekální syntézy volných lehkých řetězců kappa a lambda a IgM byly zavedeny metody izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem. Současně spektrum laboratorních metod bylo doplněno o metody kvantitativního stanovení volných lehkých řetězců kappa a lambda v CSF současně s výpočtem kvocientu a indexu volných lehkých řetězců kappa a lambda. Tato vyšetření mají význam především v případech negativního či nejednoznačného výsledku detekce oligoklonálních IgG pásů jako zlatého standardu v hodnocení intratekální syntézy imunoglobulinů u pacientů s roztroušenou sklerózou. Nutno však podotknout, že pozitivní výsledek není specifický pro roztroušenou sklerózu; intrathekální syntéza volných lehkých řetězců, podobně jako IgG, může provázet i jiná zánětlivá onemocnění nervového systému. Tímto tématem se zabývali také autoři Crespi I. et. al [93]. Studovali index volných lehkých řetězců kappa (index FLC-K) jako alternativní biomarker RS. Došli k závěru, že obě metody, IEF oIgG pásů i index FLC-K vykazují podobnou přesnost a díky vysoké citlivosti a specificitě spojené s nižšími náklady na stanovení FLC-K v CSF a výpočtem indexu FLC-K navrhli použití tohoto testu jako testu číslo jedna a IEF jako potvrzující metodu. V roce 2020 se autoři Ferraro D. et al. [94] pokusili retrospektivně odhadnout hodnoty indexu kappa a lambda ($\text{CSF FLC} / \text{sérové FLC} / (\text{CSF albumin} / \text{sérový albumin})$) k predikci diagnózy RS u skupiny pacientů s negativním nálezem oIgG pásů a suspektním podezřením na RS. Zjistili, že u 61 % pacientů se hladiny FLC-K v likvoru pohybovali pod detekčním limitem dané diagnostické soupravy ($0,27 \text{ mg.L}^{-1}$, The Binding Site Group, Birmingham, UK). Současně stanovili mezní hodnotu indexu FLC-K pro predikci RS na 5,8 a dospěli k závěru, že index FLC-K by mohl přispět k identifikaci oIgG negativních pacientů, u nichž je diagnóza RS vysoce pravděpodobná. Naše data publikována v roce 2019 (*Příloha 2*) využívající cut-off hodnot 6,07 pro FLC-K index a 6,27 pro FLC-L index prokázala 100 % shodu mezi kvalitativními (průkaz oFLC metodou IEF/AIB) a kvantitativními výsledky pro FLC-K, 90 % pro FLC-L a 80 % pro FLC-L index. Nicméně i přesto navrhuje, že testy FLC by měly být spíše používány jako doplňkové metody než jako náhrada za analýzu oIgG.

Další metodou používanou v rámci diagnostiky a stanovení prognózy u pacientů s RS je metoda detekce oligoklonálních IgM pásů. Tato metoda je intenzivně studována i zahraničními skupinami. Capuano Rocco et. al. [95] posuzovali tento biomarker s ohledem na dlouhodobé sledování pacientů s RS v kontextu s užíváním léků modifikujících onemocnění (DMD). Prokázali, že přítomnost oIgM byla spojena s 33 % zvýšením anualizované míry relapsu, vyšší pravděpodobností pro použití vysoce účinných DMD a vyšší hodnotou EDSS. Došli k závěru, že přítomnost oIgM je spojena s nepříznivými dlouhodobými výsledky.

Další ze studovaných biomarkerů zavedených do rutinní biochemické praxe byli chemokin CXCL13 a neurofilamenta, těžké a lehké řetězce. Kromě využití CXCL13 jako slibného markeru neuroborreliózy reflektující aktivitu nemoci, byla prokázána jeho dobrá pozitivní prediktivní hodnota a specifita pro diagnostiku RS a pro klinický relaps do jednoho roku od nástupu nemoci. Autoři DiSano KD. et al. [96] posuzovali prediktivní hodnotu indexu CXCL13 (poměr CSF/S koncentrace CXCL13) ve srovnání s přítomnými oIgG pásy a koncentrací NFL v CSF, přičemž zkoumali schopnost každého biomarkeru předvídat budoucí aktivitu onemocnění u klinicky a radiologicky izolovaných syndromů, recidivujících - remitující RS a progresivní RS. Prokázali, že index CXCL13 je nejlepším prediktorem budoucí aktivity onemocnění u pacientů s RS a jako jediný prediktor překonal v citlivosti, specifitě a pozitivní i negativní prediktivní hodnotě pro budoucí aktivitu onemocnění u pacientů s RS oIgG a NFL v CSF. Současně kombinace obou biomarkerů, indexu CXCL13 a NFL v CSF, zlepšila citlivost a prediktivní hodnotu aktivity onemocnění u pacientů s RS. Index CXCL13 lze tedy považovat za vynikající prognostický biomarker aktivity RS.

Neurofilamenta, ať už lehké (NFL) či těžké řetězce (pNFH), v mozkomíšním moku, resp. séru odráží stupeň axonálního poškození zprostředkovaného zánětem a neurodegenerací. Tyto biomarkery je možné využívat při podezření na diagnózu amyotrofické laterální sklerózy, při závažném podezření na diagnózu roztroušené sklerózy, popř. pro sledování průběhu onemocnění RS a odpovědi na léčbu DMD. Kapoor R. et al. [97] prokázali, že koncentrace NFL v séru u skupiny s relabující a progresivní formou RS koreluje se zobrazovacími metodami a disabilitou a mohou předpovídat budoucí průběh onemocnění a predikovat reakci na léčbu.

Delcoigne B. et al. [98] se snažili stanovit faktory (včetně role DMD, alemtuzumabu, dimethyl fumaratu, fingolimodu, natalizumabu, rituximabu a teriflunomidu) spojené s výchozí koncentrací NFL, léčbou a změnou (od zahájení léčby po hodnocení léčby) koncentrace NFL v plazmě u skupiny pacientů s RR-MS. Výchozí koncentrace NFL v plazmě pozitivně korelovala s mírou relapsu, skórem EDSS, závažností RS související s věkem a stupnicí dopadu RS (MSIS-29) a negativně s SDMT (Symbol Digit Modalities Test) a počtem dříve použitých DMD. Autoři zdůrazňují rozdíly ve snížení koncentrace NFL v plazmě od výchozí koncentrace při léčbě v závislosti na typu DMD. Pacienti začínající léčbu alemtuzumabem vykazovali nejvyšší snížení koncentrace NFL a nejnižší koncentrace NFL při léčbě, zatímco ti, kteří začínali s teriflunomidem, měli nejmenší pokles a nejvyšší hladiny NFL při léčbě, ale také začínali od nižších hodnot. Jak NFL během léčby, tak pokles koncentrací NFL závisí na výchozích koncentracích NFL, z toho plyne, že volba DMD u RR-MS pacientů je významně spojena se stupněm redukce NFL, což podporuje roli NFL jako markeru odpovědi na léčbu.

Bohužel, v současné době nemáme k dispozici diagnostickou soupravu, kterou bychom mohli rutinně použít pro stanovení NFL v séru, jedinou možností, obtížně dostupnou v ČR je stanovení NFL v séru metodou SIMOA. Z tohoto důvodu se naše pozornost zaměřila na stanovení pNFH v séru, kde jsou již diagnostické soupravy pro stanovení v séru dostupné a dle našich výsledků vhodné pro rutinní testování. V současné době probíhá na našem pracovišti další výzkum, zabývající se studiem informací o dynamice potenciálních prognostických sérových biomarkerů, tedy i pNFH, u pacientů s RS v čase a naším cílem je korelovat tato data s klinickými i MRI parametry signalizujícími úspěšnost či neúspěšnost léčby.

Stanovení celkového tau proteinu, fosforylovaného tau proteinu 181 a amyloidu β_{1-42} v mozkomíšním moku je indikováno především v diferenciální diagnostice kognitivních poruch v jejich časném stadiu. Snížená koncentrace amyloidu β v likvoru je časným markerem Alzheimerovy nemoci. Kombinace tohoto vyšetření se stanovením celkového tau proteinu, fosforylovaného tau proteinu významně zvyšuje diagnostickou přesnost. Zvýšení celkového tau proteinu je nespecifickou známkou neuronálního poškození. Extrémně vysoké koncentrace celkového tau proteinu nacházíme u Creutzfeld-Jakobovy nemoci, ale i jiných těžkých postižení CNS, např. rozsáhlých iktů či těžkých mozkových traumat.

Vedle kvantitativního stanovení výše uvedených biomarker je řada prací věnována zobrazovacím markerům neurodegenerativních onemocnění. Na toto téma byla u pacientů s RS publikována studie autorů Zeydan B. et al. [99]. Zkoumali depozice amyloidu β a tau proteinu pomocí Pittsburghské sloučenina B (PiB) pozitronovou emisní tomografií (PET) a AV1451 tau

PET zobrazením u stárnoucích pacientů s RS, přičemž PiB PET je biomarker β -amyloidní náplně v placích a AV1451 tau PET je biomarker posttranslačně modifikované akumulace tau proteinu spojené s AD. Autoři prokázali, že ačkoli jsou amyloid β i tau protein biomarkery kognitivního stárnutí a AD, kortikální depozice amyloidu β byly u pacientů s RS nižší než u věkově odpovídající kontrolní skupiny, což naznačuje, že některý aspekt patofyziologie RS zpomaluje akumulaci amyloidu β , ale nikoli akumulaci tau proteinu. Kromě této práce zabývající se využíváním tzv. „stopovačů amyloidu“ u RS publikovali průkopnickou práci autoři Stankoff et al. [100]. Tyto indikátory („stopovače amyloidu“) mohou být užitečné pro hodnocení demyelinizace a remyelinizace, které patří mezi nejdůležitější události v patofyziologii RS a nejsou vhodně zachyceny standardní MRI. Snížené vychytávání „stopovačů amyloidu“ v poškozené bílé a šedé hmotě bylo prokázáno experimenty na zvířecí a lidské mozkové tkáni. Dle názorů Jordi et al. [101] závěry publikované ve výše uvedené práci nastolují velmi zajímavou otázku ohledně specifity PiB a derivátů fluorovaného stilbenu pro depozici amyloidů a poškození myelinu. Protože depozice amyloidu je s přibývajícím věkem častější, může být interpretace absorpce amyloidu PET v šedé hmotě limitující u pacientů s RS ve vyšším věku. Navíc se zdá, že protein amyloidového prekursoru a jeho kaskáda také hrají roli v procesech demyelinizace a remyelinizace.

Cílem naší další vědecko-výzkumné aktivity je studium biomarkerů roztroušené sklerózy a neurodegenerativních onemocnění a jejich korelace s výsledky MRI. Jak bylo uvedeno výše, kortikální léze RS mohou přispět ke snížení absorpce PiB v kortikální oblasti u pacientů s RS, a právě MRI může lépe detekovat kortikální RS léze. Celkově lze říci, že dlouhodobá studie s větší velikostí vzorku se širokým věkovým rozpětím, s MRI s vysokým polem může poskytnout více informací o základních mechanismech patofyziologie RS a jejich vztahu k průběhu klinického onemocnění.

Posledním z intenzivně studovaných biomarkerů je chitinase 3-like 1 exprimována v astrocytech v mozkové tkáni pacientů s RS, spojována s reaktivní gliózou a neurozánětem u různých neuropatologických stavů. Naše data naznačují, že hladiny CHI3L1 v CSF jsou v různých diagnostických skupinách odlišné a statisticky významně korelují s koncentracemi biomarkerů axonálního poškození (NFL i pNFH), nikoliv však s biomarkerem zánětlivé reakce CXCL13. Z toho lze usuzovat na jeho možné využití jako etiologicky nespecifického biomarkeru RS. Nicméně další uplatnění tohoto biomarkeru je otázkou širšího studia.

Také Pérez-Miralles F. et al [102] posuzovali roli CHI3L1 a CHI3L2 v predikci průběhu PP-RS. Prokázali korelaci zvyšujících se hladin CHI3L1 s vyšším EDSS skórem na počátku a ve

12. měsíci a tendenci spojenou s vyšším rizikem progresu postižení podle EDSS. Zvyšující se hladiny CHI3L2 také měly tendenci korelovat s nižšími výchozími hodnotami EDSS. Jejich výsledky tedy podporují souvislost mezi hladinami CHI3L1 v CSF a neurologickým postižením podle EDSS u pacientů s PP-MS.

Všechny ze zmiňovaných biomarkerů jsou v rámci diagnostiky RS na našem pracovišti pravidelně stanovovány a doufáme, že v průběhu dalších let se nám podaří získat podrobnější informace o jejich dynamice v čase a korelaci s klinickými a MRI parametry signalizujícími úspěšnost, popř. neúspěšnost léčby.

ZÁVĚR

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému autoimunitní povahy, vedoucí k demyelinizaci a ireverzibilnímu axonálnímu poškození. Je nejčastější příčinou neurologického postižení u mladých dospělých. V posledních letech se objevují první praktické výstupy naznačující možnost individualizované léčby s využitím laboratorních markerů predikujících průběh onemocnění roztroušenou sklerózou. Mozkomíšní mok jako tekutina bezprostředně související s tkáněmi CNS poskytuje nejvěrohodnější zdroj laboratorních informací o typu zánětlivé odpovědi, aktivitě zánětlivého procesu i míře tkáňového poškození.

Habilitační práce (předkládaná jako komentovaný soubor prací) se věnuje problematice vybraných laboratorních biomarkerů RS. Práce se snažila přispět k rozšíření poznatků o laboratorních metodách využívaných v diagnostice RS, k určení či upřesnění prognózy onemocnění a současně k monitorování léčebné odpovědi. V jednotlivých kapitolách jsou popsány výsledky našich studií věnovaných intrathekální protilátkové odpovědi u pacientů s RS pomocí kvantitativních výpočtových vztahů pro intrathekální tvorbu IgG, IgM, IgA a FLC a detekci oligoklonálních IgG, IgM a FLC pásů. Tato vyšetření nám slouží k získání informací o procesech probíhajících na úrovni mozkového kompartmentu nejen u pacientů s RS. V případě průkazů intrathekální syntézy IgG i FLC je nutno mít na paměti, že pozitivní výsledek může provázet i jiná zánětlivá onemocnění nervového systému. V další části se věnujeme biomarkerům neurodegenerativního, resp. tkáňového poškození CNS. Lehké a těžké řetězce neurofilament představují biomarker poškození axonů CNS různé etiologie, celkový tau protein je posuzován jako marker neuronálního poškození a CHI3L1 jako slibný, ale etiologicky nespecifický marker RS.

Do habilitační práce byly okrajově zahrnuty i práce týkající se detekce monoklonálních imunoglobulinů, neboť i v rámci likvorové diagnostiky se s jejich nálezem poměrně často setkáváme.

Výsledky výše uvedených prací nás povzbuzují v další studii, z níž bychom chtěli získat informace o dynamice potenciálních prognostických sérových biomarkerů u pacientů s RS v čase a korelaci s klinickými i MRI parametry o úspěšnosti či neúspěšnosti léčby.

REFERENCE

- [1] KAŇOVSKÝ, Petr a Andrea BÁRTKOVÁ. *Speciální neurologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. ISBN 978-80-244-5611-9.
- [2] LONGO, Dan, Daniel REICH, Claudia LUCCHINETTI a Peter CALABRESI. Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2018, **378**(2), 169-180. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMr1401483
- [3] KAMIŇSKA, Joanna, Olga KOPER, Kinga PIECHAL a Halina KEMONA. Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2017, **71**(1), 0-0. ISSN 0032-5449. Dostupné z: doi:10.5604/01.3001.0010.3836
- [4] HAVRDOVÁ, E. Roztroušená skleróza. *Cesk Slov Neurol N*. 2008, **71104**(2), 121-132.
- [5] LUBLIN, F., S. REINGOLD, J. COHEN et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*. 2014, **83**(3), 278-286. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0000000000000560
- [6] THOMPSON, Alan, Brenda BANWELL, Frederik BARKHOF et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018, **17**(2), 162-173. ISSN 14744422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- [7] REIBER, Hansotto, Markus OTTO, Christian TRENDELENBURG a Arno WORMEK. Reporting Cerebrospinal Fluid Data: Knowledge Base and Interpretation Software. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2001, **39**(4). ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2001.051
- [8] VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 1. Praha: Maxdorf, 2018. Jessenius. ISBN 978-80-7345-573-6.
- [9] NICHOLAS, R a W RASHID. *Multiple sclerosis*. 2013, **87**(10), 712-714.
- [10] CEPOK, Sabine, Dun ZHOU, Rajneesh SRIVASTAVA, Stefan NESSLER, Susanne STEI, Konrad BÜSSOW, Norbert SOMMER a Bernhard HEMMER. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(5), 1352-1360. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI23661
- [11] VILLEGAS, Enrique, Olivia SANTIAGO, Jose CARRILLO, Antonio SORLÓZANO, Miguel GUERRERO, Oscar FERNÁNDEZ a José GUTIÉRREZ. Low intrathecal immune response of anti-EBNA-1 antibodies and EBV DNA from multiple sclerosis patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011, **70**(1), 85-90. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.11.013
- [12] EFTEKHARIAN, Mohammad, Masoud GHANNAD, Mohammad TAHERI, Ghodratollah ROSHANAIE, Mehrdokht MAZDEH, Mehrnoosh MUSAVI a Mona HORMOZ. Frequency of viral infections and environmental factors in multiple sclerosis. *Human Antibodies*. 2016, **24**(1-2), 17-23. ISSN 10932607. Dostupné z: doi:10.3233/HAB-150289
- [13] SHAYGANNEJAD, Vahid, Nooshin REZAIE, Zamzam PAKNAHAD, Freshteh ASHTARI a Helia MAGHZI. The environmental risk factors in multiple sclerosis susceptibility: A case-control study. *Advanced Biomedical Research*. 2016, **5**(1). ISSN 2277-9175. Dostupné z: doi:10.4103/2277-9175.183665

- [14] TOGHIANIFAR, Nafiseh, Fereshteh ASHTARI, Sayyed ZARKESH-ESFAHANI a Marjan MANSOURIAN. Effect of high dose vitamin D intake on interleukin-17 levels in multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Neuroimmunology*. 2015, **285**, 125-128. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2015.05.022
- [15] GOLAN, Daniel, Basheer HALHAL, Lea GLASS-MARMOR et al. Vitamin D supplementation for patients with multiple sclerosis treated with interferon-beta: a randomized controlled trial assessing the effect on flu-like symptoms and immunomodulatory properties. *BMC Neurology*. 2013, **13**(1). ISSN 1471-2377. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2377-13-60
- [16] DENDROU, Calliope, Lars FUGGER a Manuel FRIESE. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*. 2015, **15**(9), 545-558. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3871
- [17] WAUBANT, E., E. MOWRY, L. KRUPP et al. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology*. 2011, **76**(23), 1989-1995. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0b013e31821e552a
- [18] Charcot JM. 1880. *Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetriere [Lectures about the diseases of the nervous system done at the Salpetriere]*,.
- [19] BABINSKI, J. Research on the anatomic pathology of multiple sclerosis and a comparative study on different forms of scarring of the spinal cord. *Arch Physiol. Paris*, **1885**(5-6), 186-207.
- [20] PRINEAS, JW. *The neuropathology of multiple sclerosis. In Handbook of clinical neurology (ed. Koetsier JC)*. Vol. 47. Elsevier, New York, 1985, s. 337–395.
- [21] FERGUSON, B. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. **120**(3), 393-399. ISSN 14602156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/120.3.393
- [22] TRAPP, Bruce, John PETERSON, Richard RANSOHOFF, Richard RUDICK, Sverre MÖRK a Lars BÖ. Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1998, **338**(5), 278-285. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199801293380502
- [23] KORNEK, Barbara a Hans LASSMANN. Axonal Pathology in Multiple Sclerosis. A Historical Note. *Brain Pathology*. 1999, **9**(4), 651-656. ISSN 10156305. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3639.1999.tb00547.x
- [24] DAWSON, JW. The histology of disseminated sclerosis. *Trans R Soc*. 1916, **50**, 517-540.
- [25] PRINEAS, J., R. BARNARD, E. KWON, L. SHARER a E.-S. CHO. Multiple sclerosis: Remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology*. 1993, **33**(2), 137-151. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.410330203
- [26] Bø, Lars, Christian VEDELER, Harald NYLAND, Bruce TRAPP a Sverre Mørk. *Subpial Demyelination in the Cerebral Cortex of Multiple Sclerosis Patients*. 2003, **62**(7), 723-732. ISSN 0022-3069. Dostupné z: doi:10.1093/jnen/62.7.723
- [27] KUTZELNIGG, Alexandra, Claudia LUCCHINETTI, Christine STADELMANN et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005, **128**(11), 2705-2712. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awh641
- [28] FRISCHER, Josa, Stephan BRAMOW, Assunta DAL-BIANCO et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009, **132**(5), 1175-1189. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awp070

- [29] LUCCHINETTI, C, W BRÜCK, J PARISI, B SCHEITHAUER, M RODRIGUEZ a H LASSMANN. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000, **47**(6), 707-717.
- [30] FROHMAN, Elliot, Michael RACKE a Cedric RAINE. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *New England Journal of Medicine*. 2006, **354**(9), 942-955. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra052130
- [31] QIN, Y, P DUQUETTE, Y ZHANG, P TALBOT, R POOLE a J ANTEL. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1998, **102**(5), 1045-1050. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI3568
- [32] MISHRA, Manoj a V. YONG. Myeloid cells — targets of medication in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2016, **12**(9), 539-551. ISSN 1759-4758. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2016.110
- [33] PRINZ, Marco, Josef PRILLER, Sangram SISODIA a Richard RANSOHOFF. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*. 2011, **14**(10), 1227-1235. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/nn.2923
- [34] ABSINTA, Martina, Govind NAIR, Pascal SATI, Irene CORTESE, Massimo FILIPPI a Daniel REICH. Direct MRI detection of impending plaque development in multiple sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2015, **2**(5). ISSN 2332-7812. Dostupné z: doi:10.1212/NXI.0000000000000145
- [35] GAITÁN, María, Colin SHEA, Iordanis EVANGELOU, Roger STONE, Kaylan FENTON, Bibiana BIELEKOVA, Luca MASSACESI a Daniel REICH. Evolution of the blood-brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*. 2011, **70**(1), 22-29. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.22472
- [36] HARRIS, Jonathan, Joseph FRANK, Nicholas PATRONAS, Dale MCFARLIN a Henry MCFARLAND. Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: Implications for clinical trials and natural history. *Annals of Neurology*. 1991, **29**(5), 548-555. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.410290515
- [37] ABSINTA, Martina, Pascal SATI a Daniel REICH. Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions. *Nature Reviews Neurology*. 2016, **12**(6), 358-368. ISSN 1759-4758. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2016.59
- [38] SAIDHA, Shiv, Omar AL-LOUZI, John RATCHFORD et al. Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: A four-year study. *Annals of Neurology*. 2015, **78**(5), 801-813. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.24487
- [39] MARTINEZ-LAPISCINA, Elena, Sam ARNOW, James WILSON et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *The Lancet Neurology*. 2016, **15**(6), 574-584. ISSN 14744422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(16)00068-5
- [40] ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. ISBN 978-80-244-5262-3.
- [41] TEUNISSEN, C., A. PETZOLD, J. BENNETT et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*. 2009, **73**(22), 1914-1922. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2

- [42] TEUNISSEN, Charlotte, Til MENGE, Ayse ALTINTAS et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013, **19**(13), 1802-1809. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458513488232
- [43] HRADÍLEK, Pavel. NEDA-koncept jako výsledek léčby pacientů s roztroušenou sklerózou: NEDA-4 concept as a treatment outcome in multiple sclerosis patients. *Neurologia pre prax*. Bratislava: SOLEN, 2016, **17**(3), 148-150. ISSN 1335-9592.
- [44] DUŠKOVÁ, Jaroslava a Ondřej SOBEK. Cytologické vyšetření mozkomíšního moku. *Cesk Patol*. 2018, **55**(3), 145-157.
- [45] ADAM, P. *Cytologie likvoru*. Pardubice, Stapro, 1995, s. 26-27.
- [46] REIBER, Hansotto a Klaus FELGENHAUER. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clinica Chimica Acta*. 1987, **163**(3), 319-328. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/0009-8981(87)90250-6
- [47] ANDERSSON, M., J. ALVAREZ-CERMENO, G. BERNARDI et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994, **57**(8), 897-902. ISSN 0022-3050. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.57.8.897
- [48] FREEDMAN, Mark, Edward THOMPSON, Florian DEISENHAMMER et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*. 2005, **62**(6), 865-870. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneur.62.6.865
- [49] SÁDABA, M.C., P. GONZÁLEZ PORQUÉ, J. MASJUAN, J.C. ÁLVAREZ-CERMEÑO, A. BOOTELLO a L.M. VILLAR. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *Journal of Immunological Methods*. 2004, **284**(1-2), 141-145. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2003.09.018
- [50] AUER, M., H. HEGEN, A. ZEILEIS a F. DEISENHAMMER. Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis - a new empirical formula. *European Journal of Neurology*. 2016, **23**(4), 713-721. ISSN 13515101. Dostupné z: doi:10.1111/ene.12924
- [51] ÖHMAN, Sten, Pia FORSBERG, Nina NELSON a Magnus VRETHEM. An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage. *Clinica Chimica Acta*. 1989, **181**(3), 265-272. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/0009-8981(89)90232-5
- [52] KAISER, R. Affinity immunoblotting: Rapid and sensitive detection of oligoclonal IgG, IgA and IgM in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing. *Journal of the Neurological Sciences*. 1991, **103**(2), 216-225. ISSN 0022510X. Dostupné z: doi:10.1016/0022-510X(91)90167-6
- [53] SINDIC, C.J.M., P. MONTEYNE a E.C. LATERRE. Occurrence of oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of neurological patients: An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *Journal of the Neurological Sciences*. 1994, **124**(2), 215-219. ISSN 0022510X. Dostupné z: doi:10.1016/0022-510X(94)90329-8
- [54] RIJCKEN, C.A.W, E.J THOMPSON a A.W TEELKEN. An improved, ultrasensitive method for the detection of IgM oligoclonal bands in cerebrospinal fluid. *Journal of Immunological Methods*. 1997, **203**(2), 167-169. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-1759(97)00023-9
- [55] VILLAR, Luisa, Jaime MASJUAN, Pedro GONZÁLEZ-PORQUÉ, José PLAZA, María SÁDABA, Ernesto ROLDÁN, Alfredo BOOTELLO a José ALVAREZ-

- CERMEÑO. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2003, **53**(2), 222-226. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.10441
- [56] FISCHER, Christian, Borros ARNETH, Jürgen KOEHLER, Johannes LOTZ a Karl LACKNER. Kappa Free Light Chains in Cerebrospinal Fluid as Markers of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis. *Clinical Chemistry*. 2004, **50**(10), 1809-1813. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2004.033977
- [57] ARNETH, B. a F. BIRKLEIN. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2009, **119**(1), 39-44. ISSN 00016314. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0404.2008.01058.x
- [58] PRESSLAUER, Stefan, Dejan MILOSAVLJEVIC, Wolfgang HUEBL, Silvia PARIGGER, Gabriele SCHNEIDER-KOCH, Thomas BRUECKE a Pablo VILLOSLADA. Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS. *PLoS ONE*. 2014, **9**(2). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0089945
- [59] HASSAN-SMITH, G., L. DURANT, A. TSENTEMEIDOU, L.K. ASSI, J.M. FAINT, S. KALRA, M.R. DOUGLAS a S.J. CURNOW. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2014, **276**(1-2), 175-179. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2014.08.003
- [60] MAIER, Bernd, Helmut-Leopold LAURER, Stefan ROSE, W.A. BUURMAN a Ingo MARZI. Physiological Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Mediators in Cerebrospinal Fluid and Plasma: A Normative Study. *Journal of Neurotrauma*. 2005, **22**(7), 822-835. ISSN 0897-7151. Dostupné z: doi:10.1089/neu.2005.22.822
- [61] KRUMBHOLZ, Markus, Diethilde THEIL, Sabine CEPOK et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*. 2006, **129**(1), 200-211. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awh680
- [62] KHADEMI, Mohsen, Ingrid KOCKUM, Magnus ANDERSSON et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple Sclerosis Journal*. 2011, **17**(3), 335-343. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458510389102
- [63] FERRARO, Diana, Veronica GALLI, Francesca VITETTA et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in clinically isolated syndrome patients: Association with oligoclonal IgM bands and prediction of Multiple Sclerosis diagnosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2015, **283**, 64-69. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.011
- [64] ALVAREZ, Enrique, Laura PICCIO, Robert MIKESELL, Kathryn TRINKAUS, Becky PARKS, Robert NAISMITH a Anne CROSS. Predicting optimal response to B-cell depletion with rituximab in multiple sclerosis using CXCL13 index, magnetic resonance imaging and clinical measures. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*. 2015, **1**. ISSN 2055-2173. Dostupné z: doi:10.1177/2055217315623800
- [65] LLORENS, Franc, Katrin THÜNE, Waqas TAHIR et al. YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Molecular Neurodegeneration*. 2017, **12**(1). ISSN 1750-1326. Dostupné z: doi:10.1186/s13024-017-0226-4
- [66] LEE, Chun, Carla DA SILVA, Charles DELA CRUZ et al. Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury.

- Annual Review of Physiology*. 2011, **73**(1), 479-501. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142250
- [67] CANTÓ, Ester, Mar TINTORÉ, Luisa VILLAR et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. 2015, **138**(4), 918-931. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awv017
- [68] BURMAN, Joachim, Raili RAININKO, Kaj BLENNOW, Henrik ZETTERBERG, Markus AXELSSON a Clas MALMESTRÖM. YKL-40 is a CSF biomarker of intrathecal inflammation in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2016, **292**, 52-57. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.013
- [69] BONNEH-BARKAY, Dafna, Guoji WANG, Adam STARKEY, Ronald HAMILTON a Clayton WILEY. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 2010, **7**(1). ISSN 1742-2094. Dostupné z: doi:10.1186/1742-2094-7-34
- [70] BLENNOW, Kaj. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRX*. 2004, **1**(2), 213-225. ISSN 1545-5343. Dostupné z: doi:10.1602/neurorx.1.2.213
- [71] PIETROBONI, Anna, Francesca SCHIANO DI COLA, Marta SCARIONI et al. CSF β -amyloid as a putative biomarker of disease progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017, **23**(8), 1085-1091. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458516674566
- [72] MATTSSON, N, M AXELSSON, S HAGHIGHI et al. Reduced cerebrospinal fluid BACE1 activity in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2009, **15**(4), 448-454. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458508100031
- [73] MATÍAS-GUIU, Jordi, Celia OREJA-GUEVARA, María CABRERA-MARTÍN, Teresa MORENO-RAMOS, José CARRERAS a Jorge MATÍAS-GUIU. Amyloid Proteins and Their Role in Multiple Sclerosis. Considerations in the Use of Amyloid-PET Imaging. *Frontiers in Neurology*. 2016, **7**. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2016.00053
- [74] PIETROBONI, Anna, Francesca SCHIANO DI COLA, Annalisa COLOMBI et al. CSF β -amyloid predicts early cerebellar atrophy and is associated with a poor prognosis in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2020, **37**. ISSN 22110348. Dostupné z: doi:10.1016/j.msard.2019.101462
- [75] FIALOVÁ, L, A BARTOŠ, J ŠVARCOVÁ, D DOLEŽIL a I MALBOHAN. Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma supravami ELISA. *Klin Biochem Metab*. 2011, **19**(2), 113–118.
- [76] JOHNSON, G. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*. 2004, **117**(24), 5721-5729. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.01558
- [77] SHAHANI, N. a R. BRANDT. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002, **59**(10), 1668-1680. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/PL00012495
- [78] TERZI, M., A. BIRINCI, E. ÇETINKAYA a M. ONAR. Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2007, **115**(5), 325-330. ISSN 0001-6314. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0404.2007.00782.x

- [79] JAWORSKI, Jacek, Marek PSUJEK, Marzena JANCZAREK, Małgorzata SZCZERBO-TROJANOWSKA a Halina BARTOSIK-PSUJEK. Total-tau in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis decreases in secondary progressive stage of disease and reflects degree of brain atrophy. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2012, **117**(3), 284-292. ISSN 0300-9734. Dostupné z: doi:10.3109/03009734.2012.669423
- [80] MIRZAI-DIZGAH, Mohammad-Hossein, Mohammad-Reza MIRZAI-DIZGAH a Iraj MIRZAI-DIZGAH. Serum and saliva total tau protein as a marker for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Medical Hypotheses*. 2020, **135**. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2019.109476
- [81] GRANT, Philip a Harish PANT. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *Journal of Neurocytology*. **29**(1112), 843-872. ISSN 03004864. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010999509251
- [82] SLAWSON, C. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003, **13**(5), 631-636. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2003.08.003
- [83] KUHLE, Jens, Christian BARRO, Giulio DISANTO et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Multiple Sclerosis Journal*. 2016, **22**(12), 1550-1559. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458515623365
- [84] PETZOLD, Axel. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *Journal of the Neurological Sciences*. 2005, **233**(1-2), 183-198. ISSN 0022510X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jns.2005.03.015
- [85] KUHLE, J., D. LEPPERT, A. PETZOLD et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011, **76**(14), 1206-1213. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0b013e31821432ff
- [86] SALZER, Jonatan, Anders SVENNINGSSON a Peter SUNDSTRÖM. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2010, **16**(3), 287-292. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458509359725
- [87] KHALIL, M, C ENZINGER, C LANGKAMMER et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013, **19**(4), 436-442. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458512458010
- [88] MARTÍNEZ, M, Bob OLSSON, Laura BAU et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015, **21**(5), 550-561. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458514549397
- [89] TEUNISSEN, Charlotte a Michael KHALIL. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012, **18**(5), 552-556. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458512443092
- [90] GUNNARSSON, Martin, Clas MALMESTRÖM, Markus AXELSSON et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of Neurology*. 2011, **69**(1), 83-89. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.22247
- [91] BARTOŠ, A., L. FIALOVÁ, J. SOUKUPOVÁ, J. KUKAL, I. MALBOHAN a J. PI?HA. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2007, **116**(2), 100-107. ISSN 0001-6314. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00794.x

- [92] BARTOŠ, Aleš, Lenka FIALOVÁ, Jiřina SOUKUPOVÁ, Jaromír KUKAL, Ivan MALBOHAN a Jiří PÍTHA. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2007, **254**(1), 20-25. ISSN 0340-5354. Dostupné z: doi:10.1007/s00415-006-0185-0
- [93] CRESPI, Ilaria, Maria SULAS, Riccardo MORA, Paola NALDI, Domizia VECCHIO, Cristoforo COMI, Roberto CANTELLO a Giorgio BELLOMO. Combined use of Kappa Free Light Chain Index and Isoelectrofocusing of Cerebro-Spinal Fluid in Diagnosing Multiple Sclerosis: Performances and Costs. *Clinical Laboratory*. 2017, **63**(032017). ISSN 1433-6510. Dostupné z: doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160930
- [94] FERRARO, D., A. TROVATI, R. BEDIN et al. Cerebrospinal fluid kappa and lambda free light chains in oligoclonal band-negative patients with suspected multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2019, **27**(3), 461-467. ISSN 1351-5101. Dostupné z: doi:10.1111/ene.14121
- [95] CAPUANO, Rocco, Irati ZUBIZARRETA, Salut ALBA-ARBALAT et al. Oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing MS to inform long-term MS disability. *Multiple Sclerosis Journal*. ISSN 1352-4585. Dostupné z: doi:10.1177/1352458520981910
- [96] DISANO, Krista, Francesca GILLI a Andrew PACHNER. Intrathecally produced CXCL13: A predictive biomarker in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*. 2020, **6**(4). ISSN 2055-2173. Dostupné z: doi:10.1177/2055217320981396
- [97] KAPOOR, Raju, Kathryn SMITH, Mark ALLEGRETTA et al. Serum neurofilament light as a biomarker in progressive multiple sclerosis. *Neurology*. 2020, **95**(10), 436-444. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.00000000000010346
- [98] DELCOIGNE, Bénédicte, Ali MANOUCHEHRINIA, Christian BARRO et al. Blood neurofilament light levels segregate treatment effects in multiple sclerosis. *Neurology*. 2020, **94**(11), 1201-1212. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.00000000000009097
- [99] ZEYDAN, Burcu, Val LOWE, Ross REICHARD et al. Imaging Biomarkers of Alzheimer Disease in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*. 2020, **87**(4), 556-567. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.25684
- [100] STANKOFF, Bruno, Leorah FREEMAN, Marie-Stéphane AIGROT et al. Imaging central nervous system myelin by positron emission tomography in multiple sclerosis using [methyl-11C]-2-(4'-methylaminophenyl)- 6-hydroxybenzothiazole. *Annals of Neurology*. 2011, **69**(4), 673-680. ISSN 03645134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.22320
- [101] MATÍAS-GUIU, Jordi, María CABRERA-MARTÍN, Vanesa PYTEL, Paloma MONTERO, José CARRERAS a Jorge MATÍAS-GUIU. Amyloid Positron Emission Tomography in Multiple Sclerosis: Between Amyloid Deposition and Myelin Damage. *Annals of Neurology*. 2020, **87**(6), 988-988. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.25759
- [102] PÉREZ-MIRALLES, Francisco, Daniel PREFASI, Antonio GARCÍA-MERINO et al. CSF chitinase 3-like-1 association with disability of primary progressive MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2020, **7**(5). ISSN 2332-7812. Dostupné z: doi:10.1212/NXI.00000000000000815

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	amyloid β
AD	Alzheimerova choroba
AIB	afinitní imunobloting
ALB	albumin
BCIP	z angl. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BDNF	neurotrofický faktor odvozený od mozku
BPF	frakce parenchymu
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CNS	centrální nervová soustava
CSF	mozkomíšní mok, z angl. cerebrospinal fluid
DMD	léky modifikující průběh onemocnění, z angl. disease modifying drugs
EBV	Epstein-Barrové virus
EDSS	z angl. Disability Status Scale
ELISA	z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FLC	volné lehké řetězce
FLC-K	volné lehké řetězce kappa
FLC-L	volné lehké řetězce lambda
FN	Fakultní nemocnice
Gd	gadolinium
GDNF	neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk
GFAP	gliální fibrilární acidický protein
9-HPT	z angl. 9-Hole Peg Test
CHI31	z angl. chitinase 3-like 1
IDPNS	zánětlivá onemocnění periferního nervového systému

IEF	izoelektrická fokusace
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL6	interleukin 6
IMF	imunofixace
MBP	myelinový bazický protein
MMP	matrixové metaloproteinázy
MRI	zobrazení magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging)
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MRZ	measles, rubella, varicela zoster
MSFC	z angl. Multiple Sclerosis Functional Composite
NO	oxid dusný
NBT	z angl. p-nitroblue tetrazolium chloride
NFL	lehké řetězce neurofilament
NFM	střední řetězce neurofilament
NIND	nezánětlivá neurologická onemocnění
NSE	neuron specifická enoláza
oFLC	oligoklonální volné lehké řetězce
oIgG	oligoklonální IgG
oIgM	oligoklonální IgM
OIND	jiná nezánětlivá neurologická onemocnění
PAG	polyakrylamidový gel
PASAT	z angl. Paced Auditory Serial Addition Test
pNFH	fosforylované těžké řetězce neurofilament
PPRS	primární progresivní roztroušenou sklerózu

Q	kvocient
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RRRS	relaps-remitující roztroušenou sklerózu
sICAM-1	solubilní intercelulární adhesivní molekula-1
SIMOA	elektrochemiluminiscenční imunotest
SPRS	sekundární progresivní roztroušenou sklerózu
RPRS	progresivní-relapsující roztroušenou sklerózu
RS	roztroušená skleróza
TCR	receptor T-buněk
UVB	ultrafialové záření
ZÚ	Zdravotní ústav

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Revidovaná McDonaldova diagnostická kritéria, 2017.....11-12

Tabulka 2. Parametry Reiberovy rovnice pro IgG, IgA a IgM.....21

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Prevalence RS na 100 000 obyvatel, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: http://www.atlasofms.org/	6
Obrázek 2: Počet nově diagnostikovaných pacientů s RS každý rok, incidence na 100 000 obyvatel/rok, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: http://www.atlasofms.org/	6
Obrázek 3: Počet dětí s RS (do 18 let), prevalence na 100 000 dětí, výsledky Světové zdravotnické organizace (WHO), Multiple sclerosis International Federation [on-line; 2021-03-24]. Atlas roztroušené sklerózy, dostupné z: http://www.atlasofms.org/	7
Obrázek 4. Cytologický obraz pacienta s RS v době ataky.....	17
Obrázek 5. Cytologický obraz pacienta s RS svědčící pro chronicky probíhající patologický proces.....	18
Obrázek 6. Cytologický obraz pacienta s RS v době akutní ataky.	18
Obrázek 7. Jednotlivé typy oIgG pásů získané metodou izoelektrické fokusace s následnou imunofixací.....	23
Obrázek 8. Oligoklonální IgM pásy získané metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem.....	26
Obrázek 9. Oligoklonální FLC kappa a lambda pásy získané metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblotingem.....	29

SEZNAM PŘÍLOH

1. Zeman D, Kušnierová P, Gottwaldová J, Kloudová A, Lochman I, Ženková J, Švagera Z, Bartoš V, Všianský F. Úskalí kvantifikace IgM v likvoru. *Klin. Biochem. Metab.* 2011; 20 (41), 136–144.
2. Zeman D, Kušnierová P, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Oligoklonální IgG a volné lehké řetězce – srovnání izoelektrické fokuse v agarózovém a polyakrylamidovém gelu. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82/115(1): 1–8.
3. Kušnierová P, Zeman D, Jelínek T, Hájek R. Gamma-heavy chain disease. *Klin Onkol.* 2020 Summer;33(4):282-285. English. doi: 10.14735/amko2020280. PMID: 32894957.
4. Kušnierová P, Zeman D, Revendová K, Dlouhý O. Detection of monoclonal free light chains by immunofixation electrophoresis and isoelectric focusing - comparison with the quantitative method of determination. *Scand J Clin Lab Invest.* 2020 Aug 11:1-6. doi: 10.1080/00365513.2020.1804608. Epub ahead of print. PMID: 32779491.
5. Zeman D, Kušnierová P, Bojková J, Všianský F, Zapletalová O. Quantitation of IgG kappa and IgG lambda in the cerebrospinal fluid by sandwich ELISA method. *J Immunoassay Immunochem* 2016; Sep 9 [Epub ahead of print] (doi: 10.1080/15321819.2016.1233889)
6. Zeman D., Kušnierova P. Detekce oligoklonálních IgM pasů v likvoru. *Klin. Biochem. Metab.*, 24 (45), 2016, No. 3, p. 141–146.
7. Zeman, D., Kušnierová, P., Všianský, F., Reguliová, K., Škutová, M., Woznicová, I., Zapletalová, O., Hradílek, P., Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM test in routine practice: Comparison with quantitative assessment of intrathecal IgM synthesis. *Clin. Chim. Acta* 508 (2020), 137-145.
8. Zeman D, Kušnierová P, Bartoš V, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O. Quantitation of free light chains reliably predicts their intrathecal synthesis. *Ann Clin Biochem* 2016; 53: 174-6. doi: 10.1177/0004563215579110
9. Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, Všianský F, Byrtusová M, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O, Bartoš V., Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting. *PLoS*

One. 2016 Nov 15: doi: 10.1371/journal.pone.0166556

10. Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. Clin Chim Acta, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.027>
11. Zeman D., Hradílek P., Kušnierová P., Píža R., Reguliová K., Woznicová I. a Zapletalová O. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. Biomedical papers. 2015, vol. 159, no. 1, p. 104-113. ISSN 1213-8118.
12. Dlouhy O., Kusnierova P., Kurasova I., Cisarikova M., Zeman D. Chemiluminescent detection of oligoclonal immunoglobulins after isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2018 Jun;162(2):107-115. doi: 10.5507/bp.2018.003.
13. Kušnierová, P., Zeman, D., Hradílek, P., Zapletalová, O., Stejskal, D. Determination of chitinase 3-like 1 in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological diseases. PLoS One. 2020 May 21: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519>.
14. Kušnierová P., Zeman D., Hradílek P., Čábal M., Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. J Clin Lab Anal. 2019 Jun 14:e22948. doi: 10.1002/jcla.22948.
15. Kušnierová P., Zeman D., Slepčánová H., Všianský F., Michnová O., Bártová P., Stejskal D. Porovnání dvou analytických metod stanovení neurodegenerativních markerů β -amyloidu 1-42, celkového tau-proteinu a fosforylovaného tau-proteinu 181. Labor Aktuell 2020, 24 (2), 21-26.

Úskalí kvantifikace IgM v likvoru

Zeman D.¹, Kušnierová P.¹, Gottwaldová J.², Kloudová A.³, Lochman I.³, Ženková J.⁴, Švagera Z.¹, Bartoš V.¹, Všianský F.¹

¹Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

²Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice

³Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

⁴Ústav klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice Plzeň

SOUHRN

Cíl studie: Měření koncentrací albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru slouží v likvorové diagnostice k výpočtu intrathékální syntézy imunoglobulinů. Předpokládá se, že hodnotu kvocientu, tj. poměru koncentrací daného proteinu v likvoru a v séru, lze považovat za nezávislou na použité metodě, pokud je párový vzorek likvoru a séra analyzován současně na jedné (likvorové) kalibrační křivce. Pozorované diskrepance mezi likvorovými (ale nikoliv sérovými) koncentracemi IgM stanovenými nefelometricky na analyzátoru Immage a home-made sendvičovou ELISA metodou nás vedly k provedení rozsáhlejší studie srovnávající různé metody stanovení IgM v likvoru a séru.

Typ studie: Porovnání výsledků různých metod používaných pro kvantifikaci IgM v likvoru.

Materiál a metody: Byly srovnány výsledky stanovení koncentrací IgM získané na nefelometrech Immage, Immage 800, BN II, BN ProSpec a metodou ELISA. Vedle likvorových a sérových koncentrací byly srovnány i kvocienty likvor/sérum a výsledek výpočtu intrathékální syntézy podle Reiberova vztahu. Výsledky byly vyhodnoceny metodami Passing-Bablokovy regrese a grafu dle Blanda a Altmana s využitím statistického programu MedCalc.

Výsledky: Zjistili jsme výrazné rozdíly v likvorových koncentracích IgM stanovených nefelometricky na analyzátoch Immage oproti nefelometrickému stanovení na analyzátoch řady BN a „home-made“ sendvičové ELISA metodě, které poskytly významně nižší hodnoty. Hodnoty získané ELISA metodou byly v dobré shodě s hodnotami získanými na analyzátoch řady BN. Sérové koncentrace IgM byly poněkud vyšší při použití ELISA metody. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi hodnotami sérových koncentrací a kvocientů likvor/sérum získanými analýzou séra na likvorové versus sérové kalibrační křivce. Hodnoty kvocientu likvor/sérum byly významně vyšší v případě stanovení na analyzátoch Immage oproti hodnotám získaným analýzou na nefelometrech řady BN i ELISA metodou. V důsledku toho byla z dat získaných na analyzátoch Immage vypočtena intrathékální syntéza IgM u 13 ze 71 vzorků, u kterých nebyla zjištěna z dat získaných na analyzátoru BN ProSpec ani ELISA metodou; u 8 z nich bylo možno považovat vypočtenou intrathékální syntézu za klinicky významnou (intrathékální frakce >10 %).

Závěr: Kvocient likvor/sérum je pro IgM jednoznačně závislý na použité metodě stanovení a v některých případech může dojít i k rozdílnému hodnocení přítomnosti intrathékální syntézy IgM. Dokud se nepodaří příčinu tak výrazně odlišných výsledků koncentrace IgM v likvoru objasnit a odstranit, je žádoucí při měření na analyzátoru Immage hodnotit vypočtenou intrathékální syntézu IgM velmi opatrně a v kontextu celého likvorového nálezu. ELISA metoda je finančně nenákladná, vyžaduje minimální množství vzorku a jeví se jako jediná schopná kvantifikovat IgM prakticky v každém vzorku. Její použití v rutinní praxi je však limitováno vyššími nároky na manuální zpracování, jeví se však jako výhodná metoda minimálně pro experimentální studie, např. sledování rozložení likvorových koncentrací IgM v populaci.

Klíčová slova: mozkomíšní mok, IgM, intrathékální syntéza, nefelometrie, ELISA

SUMMARY

Zeman D., Kušnierová P., Gottwaldová J., Kloudová A., Lochman I., Ženková J., Švagera Z., Bartoš V., Všianský F.: Difficulties of IgM quantitation in cerebrospinal fluid

Objective: Quantitation of albumin and immunoglobulins in CSF and serum serves the purpose of calculation of intrathecal immunoglobulin synthesis. Quotient, i.e., concentration ratio of particular protein in CSF and serum, is assumed to be method-independent value, provided that paired CSF and serum sample is analyzed in parallel using one (CSF) calibration curve. We have observed that CSF (but not serum) IgM concentrations determined by nephelometry on Immage analyzer and by home-made sandwich ELISA were largely discrepant. This has lead us to perform a larger study comparing various methods of IgM determination in CSF and serum.

Design: Comparison of various methods used for IgM quantitation in cerebrospinal fluid.

Materials and Methods: Results of IgM determination on nephelometers Immage, Immage 800, BN II, and BN ProSpec, as well as by ELISA method, have been compared. Beside CSF and serum values, CSF/serum quotients and results of calculated intrathecal IgM synthesis according to Reiber's formula have been compared. Results have been evaluated by means of Passing-Bablok regression and Bland and Altman plots, using MedCalc software.

Results: We have found significant differences between CSF IgM concentrations determined by rate nephelometry on Immage analyzers and end-point nephelometry on BN analyzers or ELISA, the latter two giving significantly lower values. CSF IgM concentrations determined by ELISA were in good agreement with those determined on BN analyzers. Serum IgM concentrations were slightly higher using ELISA than using either nephelometric system. We have found no significant difference in either serum IgM or CSF/serum IgM quotient between serum analysis on CSF versus serum calibration curve. IgM quotient values were significantly higher using Immage analyzers than using either BN analyzers or ELISA method. As

a consequence, intrathecal IgM synthesis, based on the Immage data, was calculated in 13 of 71 samples considered negative if data of BN analyzer or ELISA were used; in 8 of these samples, intrathecal IgM synthesis could be considered as clinically significant (intrathecal fraction > 10 %).

Conclusions: CSF/serum IgM quotient is far from to be method-independent; in some cases, discrepant conclusion regarding the presence of intrathecal IgM synthesis can be obtained. Until the cause of this discrepancy is found and removed, the presence of intrathecal IgM synthesis should be judged very carefully and in the context of other CSF findings when using the Immage analyzer for measurement. ELISA method is inexpensive, requires very low amount of the sample, and is the only method able to quantify IgM in almost every CSF sample. Its use in routine practice is, however, limited by higher requirements for manual work. Nevertheless, it should be used at least in experimental studies, i.e. for the purpose of the determination of distribution of CSF IgM concentration within a population.

Keywords: cerebrospinal fluid, IgM, intrathecal synthesis, nephelometry, ELISA

Úvod

Stanovení albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru lze považovat, spolu s detekcí oligoklonálních IgG pásů, za základní imunochemický panel likvorové diagnostiky. Kvantifikace albuminu a IgG je i v likvoru snadno realizovatelná na většině běžných biochemických analyzátorů; pro kvantifikaci IgA a zejména IgM v likvoru je nutné nefelometrické stanovení s využitím zesílení signálu vazbou protilátek na latexové částice; alternativně lze použít metodu ELISA, která ovšem není komerčně dostupná. Z koncentrací albuminu a imunoglobulinů v likvoru a v séru lze usuzovat na přítomnost intrathékální syntézy imunoglobulinů. Různé likvorové školy preferují různé vztahy; ve střední Evropě je však nejvíce rozšířený výpočet intrathékální syntézy podle Reiberových rovnic [1]. Při jejich použití se vychází z předpokladu, že kvocient – tj. poměr likvorové a sérové koncentrace – je nezávislý na metodě stanovení, alespoň za předpokladu, že je analyt stanoven paralelně v likvoru i v séru na jedné (a to pochopitelně likvorové) kalibrační křivce [2-5]. Toto doporučení je v našich laboratořích většinou ignorováno, jistě i proto, že analýza „likvorovou“ metodou je nákladnější.

V likvorové laboratoři oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Ostravě jsme pro výzkumné účely zavedli ELISA metodu pro stanovení koncentrací IgM v likvoru. Zaujaly nás významně nižší hodnoty získané ELISA metodou oproti hodnotám získaným analýzou na nefelometru Immage. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli koncipovat rozsáhlejší studii srovnávající různé metody kvantifikace IgM v likvoru a v séru.

Materiál a metodika

V 75 náhodně vybraných párových vzorcích likvorů a sér zaslaných k vyšetření na oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Ostravě, byly srovnány nejméně dvě metody stanovení IgM. Šlo o následující metody:

1. **Stanovení na analyzátoru Immage** (FN Ostrava, FN Plzeň), resp. Immage 800 (FN Brno-Bohunice) metodou poměrové kinetické nefelometrie. Pracoviště v Ostravě a v Plzni používají pro analýzu sér sérovou kalibrační křivku, pracoviště v Brně stanovuje IgM v párových vzorcích likvorů a sér paralelně na stejné, a to likvorové, kalibrační křivce. Mez stanovitelnosti metodou IGMLC v séru je 64,8 mg/l, v li-

kvoru 0,30 mg/l, CV je 6,0 % (údaje firmy Beckman Coulter Česká republika s.r.o.).

2. **Stanovení na analyzátoru BN ProSpec** (FN Ostrava), resp. BN II (ZÚ Ostrava) metodou end-point nefelometrie. Pracoviště ve FN Ostrava stanovilo sérovou koncentraci IgM jak paralelně s likvorovou koncentrací na likvorové kalibrační křivce, tak za použití běžného stanovení v séru. Pracoviště ZÚ stanovuje koncentraci IgM v séru na sérové kalibrační křivce. Mez detekce metodou N Latex IgM je 0,13 mg/l, CV je 5,3 % (údaje firmy Siemens s.r.o.).
3. **„Home-made“ sendvičová ELISA metoda** (FN Ostrava) s použitím kozích protilátek proti lidskému IgM (AbD Serotec, kat. č. STAR 145 a STAR 145P). Potah destičky, promytí a blokování volných vazebných míst i ředění vzorků bylo provedeno manuálně, další kroky analýzy probíhaly automaticky na přístroji DSX (Dynex). Ke kalibraci byl použit materiál Human Serum Protein Calibrator (DAKO, kat. č. X0908) ředěný na koncentrace od 1,25 do 40 µg/l. Likvory byly analyzovány v ředění 1/20 a 1/200, séra v ředění 1/100000. Jako chromogen byl použit tetramethylbenzidin (TMB one-step substrate system, DAKO, kat. č. S1599). Mez stanovitelnosti byla 1,25 µg/l, detekční limit 0,625 µg/l. Inter-assay variační koeficient stanovený analýzou kontrolních materiálů Liquichek Spinal Fluid Level 1, Liquichek Spinal Fluid Level 2 (BioRad, kat. č. 751 a 752) a Human Serum Protein Low Control (DAKO, kat. č. X0939) se pohyboval mezi 7,8 a 8,4 %; CV pro kvocient CSF/sérum činil 7,2 %.

Výsledky měření byly vyhodnoceny regresí dle Passing-Babloka a rozdílovým grafem dle Blanda a Altmana s využitím statistického programu MedCalc. Rozdíly mezi metodami byly považovány za významné, pokud 95% interval spolehlivosti pro směrnici neobsahoval jedničku a/nebo 95% interval spolehlivosti pro úsek neobsahoval nulu.

Výsledky a diskuse

Hodnoty sérových koncentrací IgM získané nefelometricky na různých přístrojích vykazovaly minimální rozdíly, zatímco sérové koncentrace IgM stanovené metodou ELISA byly oproti nefelometrickému stanovení o 10 – 15 % vyšší. Zato likvorové koncentrace IgM se překvapivě výrazně liší v závislosti na použité metodě stanovení, přičemž hodnoty pro analyzátor Immage

jsou v oblasti fyziologických nebo jen hraničně zvýšených likvorových koncentrací až několikanásobně vyšší ve srovnání s hodnotami získanými stanovením na analyzátoch řady BN nebo metodou ELISA (Tabulka 1, Tabulka 2). Likvorové koncentrace získané ELISA metodou jsou podobné hodnotám získaným na analyzátoch řady BN, přijatelná shoda mezi těmito metodami je i u kvocientu likvor/sérum (ELISA metodou vychází

nepatrně nižší vzhledem k poněkud vyšším sérovým hodnotám naměřeným ELISA metodou).

Zajímavá zjištění naší studie jsou přehledně shrnuta v Tabulce 1a - 1f, Tabulce 2 a na obr. 1a - 1f. Z hlediska likvorové diagnostiky je však nejdůležitějším výstupem provedených měření výpočet intratékální syntézy IgM. Proto jsme se na výsledky zaměřili i z tohoto úhlu pohledu (Tabulka 3).

Table 1: Comparison of different methods using Passing-Bablok regression

a) BN ProSpec (x)^a vs. Immage (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	55	72	55
Regression equation	$y=0.4741 + 1.2865 \cdot x$	$y=-0.0214 + 1.0625 \cdot x$	$y=0.1500 + 1.8569 \cdot x$
95% CI for intercept	0.3502 to 0.5724	-0.0799 to 0.0397	0.0116 to 0.3200
95% CI for slope	1.1550 to 1.5972	1.0077 to 1.1192	1.4150 to 2.2801
Range:	x: 0.15-8.77 mg/l y: 0.48-11.60 mg/l	x: 0.17-2.96 g/l y: 0.17-3.95 g/l	x: 0.076-9.977 y: 0.161-12.889

b) Immage (x)^b vs. Immage 800 (y)^a

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	18	20	18
Regression equation	$y=-0.0069 + 0.9363 \cdot x$	$y=0.0996 + 0.9473 \cdot x$	$y=-0.0035 + 0.9563 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.1018 to 0.1268	0.0575 to 0.1445	-0.1231 to 0.1127
95% CI for slope	0.8131 to 1.0379	0.8967 to 1.0068	0.8372 to 1.0858
Range:	x: 0.46-2.27 mg/l y: 0.44-1.96 mg/l	x: 0.17-2.18 g/l y: 0.26-2.26 g/l	x: 0.242-2.204 y: 0.259-2.159

c) BN ProSpec (x)^a vs. BN II (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	14	19	14
Regression equation	$y=-0.0111 + 1.0484 \cdot x$	$y=-0.0406 + 1.0843 \cdot x$	$y=0.0014 + 1.0524 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0865 to 0.0694	-0.1581 to 0.0392	-0.0419 to 0.0498
95% CI for slope	0.9063 to 1.3740	0.9828 to 1.1665	0.9111 to 1.1846
Range:	x: 0.15-3.20 mg/l y: 0.15-3.04 mg/l	x: 0.39-2.96 g/l y: 0.39-3.23 g/l	x: 0.076-4.618 y: 0.115-5.429

d) BN ProSpec (x)^a vs. ELISA (y)^a

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	55	72	55
Regression equation	$y=-0.0024 + 1.0203 \cdot x$	$y=-0.0693 + 1.1785 \cdot x$	$y=-0.0144 + 0.9352 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0381 to 0.0232	-0.1332 to 0.0162	-0.0458 to 0.0045
95% CI for slope	0.9531 to 1.0861	1.1077 to 1.2396	0.8805 to 1.0280
Range:	x: 0.15-8.77 mg/l y: 0.15-9.48 mg/l	x: 0.17-2.96 g/l y: 0.16-3.38 g/l	x: 0.076-9.977 y: 0.068-10.689

e) ELISA (x)^a vs. Immage (y)^b

	CSF-IgM	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	73	75	73
Regression equation	$y=0.4445 + 1.3399 \cdot x$	$y=0.0310 + 0.9110 \cdot x$	$y=0.2380 + 1.9086 \cdot x$
95% CI for intercept	0.3068 to 0.4827	-0.0100 to 0.0799	0.0765 to 0.2914
95% CI for slope	1.1752 to 1.5929	0.8704 to 0.9490	1.6119 to 2.5234
Range:	x: 0.03-9.48 mg/l y: 0.33-11.00 mg/l	x: 0.16-3.38 g/l y: 0.17-3.95 g/l	x: 0.035-10.689 y: 0.146-12.889

f) BN ProSpec CSF (x) vs. serum (y) assay for serum IgM and Q (CSF/serum)

	Serum-IgM	Q (CSF/Serum) . 10 ³
n	38	25
Regression equation	$y=0.0004 + 1.0556 \cdot x$	$y=-0.0010 + 0.9498 \cdot x$
95% CI for intercept	-0.0642 to 0.0737	-0.0398 to 0.0155
95% CI for slope	0.9866 to 1.1155	0.8945 to 1.0557
Range:	x: 0.20-2.96 g/l y: 0.20-3.16 g/l	x: 0.076-4.618 y: 0.072-5.442

^a CSF and serum analyzed together using CSF calibration curve

^b CSF and serum analyzed separately using different calibration curves

Table 2: Results of eight CSF samples analyzed on 3 different Immage analyzers, BN ProSpec analyzer, and by ELISA (concentrations in mg/l)

Sample	Immage1 (FN Ostrava)	Immage2 (FN Plzeň)	Immage 800	BN ProSpec	ELISA
1	0.412	<0.300	<0.300	<0.144	<0.025
2	<0.300	0.323	0.330	<0.144	0.041
3	1.29	0.900	1.20	0.802	0.698
4	0.613	0.520	0.443	<0.144	0.120
5	0.583	0.480	0.523	<0.144	0.294
6	1.58	1.50	1.09	0.716	0.812
7	1.16	1.03	0.695	0.152	0.173
8	0.756	0.740	0.803	0.426	0.362

Table 3: Cases with intrathecal IgM synthesis according to Reiber's formula

	Intrathecal IgM fraction (IgM _{IF}) [%]					
Sample	Immage ^b	Immage 800 ^a	BN ProSpec ^a	BN ProSpec ^b	BN II ^b	ELISA ^a
1	6.49	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
2	2.26	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
3	5.37	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
4	27.22	n.d.	negative	n.d.	n.d.	negative
5	64.49	n.d.	55.27	n.d.	n.d.	50.35
6	58.53	n.d.	46.43	n.d.	n.d.	50.00
7	58.01	n.d.	60.29	n.d.	n.d.	45.89
8	66.91	n.d.	52.27	n.d.	n.d.	55.80
9	46.18	32.45	negative	negative	n.d.	negative
10	74.79	negative	negative	negative	n.d.	negative
11	negative	68.13	negative	negative	n.d.	negative
12	9.49	23.39	negative	negative	n.d.	negative
13	41.24	41.20	negative	negative	n.d.	negative
14	5.20	negative	negative	negative	n.d.	negative
15	35.35	n.d.	negative	negative	negative	negative
16	1.08	n.d.	negative	negative	negative	negative
17	37.41	n.d.	negative	negative	negative	negative

^a CSF and serum analyzed together using CSF calibration curve

^b CSF and serum analyzed separately using different calibration curves

Ve 4 vzorcích byla detekována intratékální syntéza IgM všemi použitými metodami. Ve třech případech byla detekována při stanovení na analyzátoch Immage a Immage 800, ale nikoliv při stanovení na přístroji BN ProSpec (bez ohledu na to, zda byla sérová koncentrace stanovena na sérové nebo likvorové kalibrační křivce)

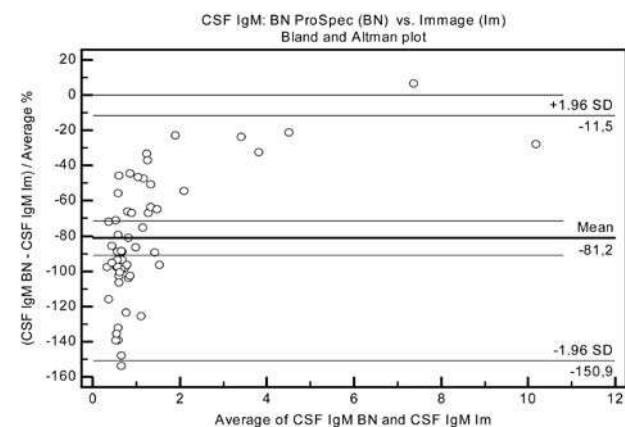
nebo ELISA metodou. V dalších třech případech byla intratékální syntéza IgM detekována při analýze na jednom ze dvou analyzátorů Immage a nikoliv na druhém; ani v jednom z těchto případů nebyla prokázána dalšími metodami (ELISA, BN ProSpec). Konečně v dalších 7(!) případech byla intratékální syntéza IgM detekována

pouze při stanovení na analyzátoru Immage a nikoliv při použití ostatních metod (ve 3 z těchto případů byl párový vzorek analyzován i na analyzátoru BN II).

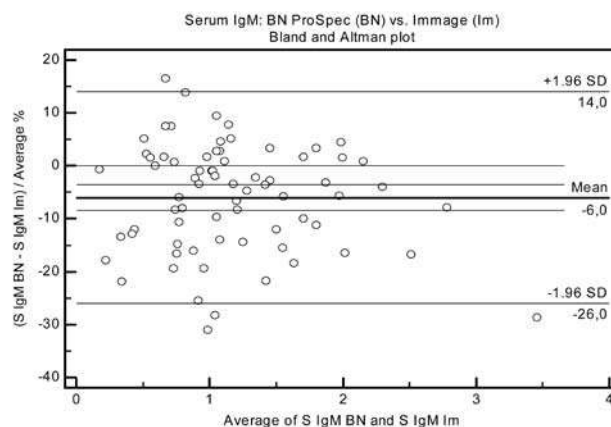
U části případů s diskrepantními výsledky byla vypočtená intrathékální frakce <10 %, což bývá považováno za nesignifikanční výsledek. Přesto zůstává 8 případů, v nichž byla při stanovení na některém z analyzátorů Immage zjištěna intrathékální syntéza IgM v rozporu s výsledky ostatních metod.

Za pozornost a kritické zamyšlení stojí i podíl výsledků nižších než dolní mez stanovitelnosti: analyzátor Immage vydal výsledek <0,300 mg/l ve 2 z 75 vzorků, zatímco analyzátor BN ProSpec <0,144 mg/l v 17 z 72 vzorků (!). ELISA metoda v základním ředění 1/20 „selhala“ v jediném případě (<0,025 mg/l v 1 ze 75 vzorků).

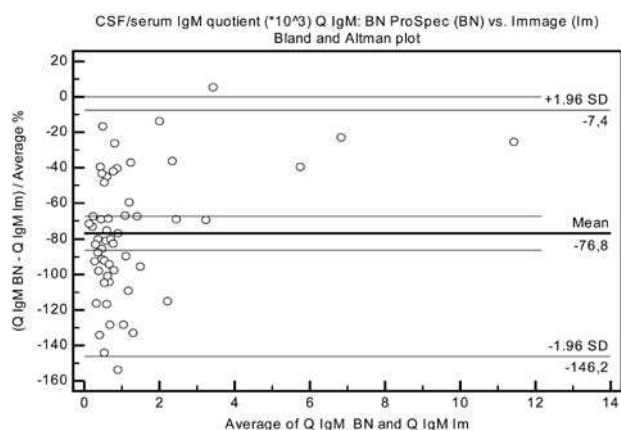
Hypotézu, že zjištěné diskrepance závisí na použitém analytickém systému a nikoliv na jiných faktorech, jsme ověřili srovnáním stanovení na různých analyzáto-



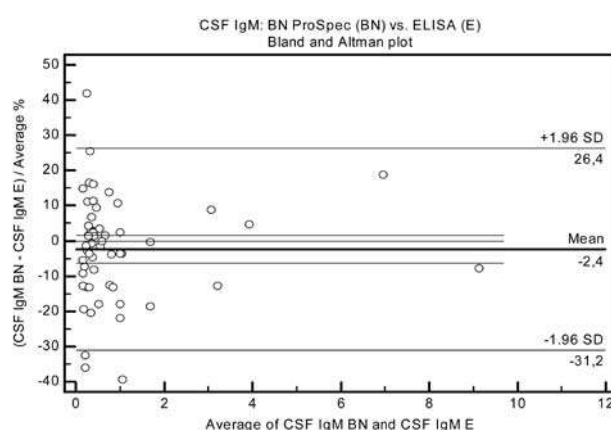
a)



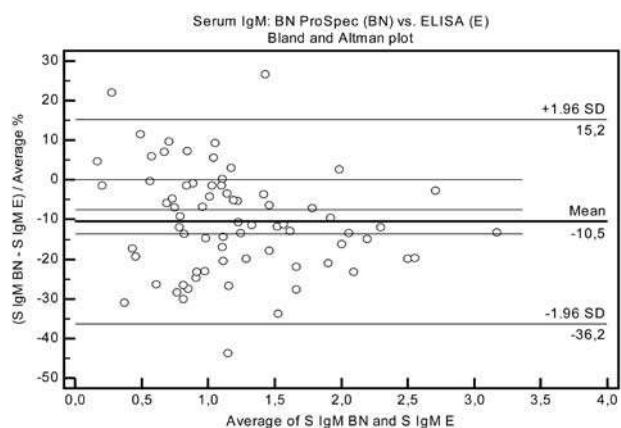
b)



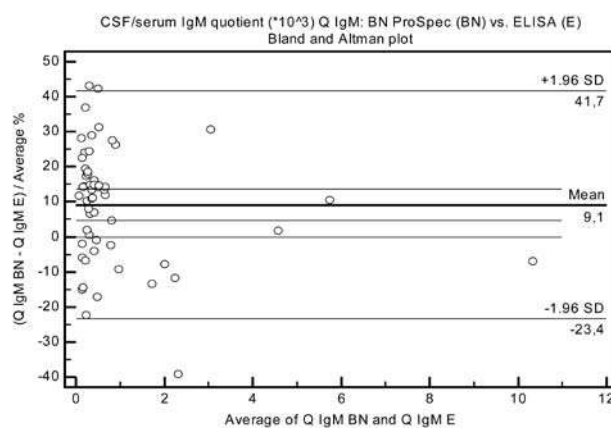
c)



d)



e)



f)

Fig. 1. Bland and Altman plots for comparison between results of CSF IgM, Serum IgM, and Q (CSF/Serum) IgM using different methods

rech Immage (n=20 pro srovnání Immage vs. Immage 800, n=8 vzorků likvoru pro srovnání na dvou analyzátořech Immage a analyzátoru Immage 800, Tabulka 2) a srovnáním stanovení na nefelometru BN ProSpec se stanovením na nefelometru BN II (v principu stejný systém) na omezeném počtu vzorků (n=19, Tabulka 1c), kde byl k dispozici dostatek likvoru pro takové srovnání. Při použití párových t-testů byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi výsledky stanovení na analyzátořech Immage (resp. Immage 800), ale hodnoty kvocientu likvor/sérum se statisticky významně nelišily, přestože byla séra měřena v jednom případě na likvorové, ve druhém případě na sérové kalibrační křivce. Mezi výsledky získanými na analyzátořech BN nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Zbývá pokusit se zodpovědět, proč nebyly diskutované diskrepance zjištěny v rámci kontrolních cyklů SEKK. Důvod vidíme v zaslání vzorků s mnohem vyšší koncentrací IgM v likvoru než je v naprosté většině reálných vzorků; zde se rozdíly mezi jednotlivými stanoveními již do značné míry stírají, což naznačují i naše výsledky (obr. 1a).

ELISA metody pro stanovení IgM v likvoru byly popsány již koncem 70. a počátkem 80. let minulého století [6, 7]. Stojí za zmínku, že v původní Reiberově práci [1], jejímž výsledkem byla formulace vztahů pro výpočet intrathékální syntézy, bylo pro stanovení koncentrací IgM použito enzymoimunoanalytického stanovení. V naší modifikaci ELISA metody jsme volbou optimální koncentrace protilátky k potahu (0,5 mg/l) a použitím tetramethylbenzidinu jako substrátu dosáhli meze stanovitelnosti 1,25 µg/l a meze detekce 0,625 µg/l; na rozdíl od nefelometrie tedy naše ELISA metoda umožňuje stanovení koncentrace IgM v prakticky každém likvorovém vzorku. Další udávanou předností ELISA metody je možnost jejího použití pro zamražené vzorky, kde může být nefelometrické stanovení problematické [5].

Naše studie je bezesporu významně limitována nízkým počtem likvorových vzorků s výrazně zvýšenými koncentracemi IgM, jakož i nízkým počtem vzorků použitých pro srovnání mezi jednotlivými pracovišti na stejném typu analyzátoru. To je dáno limitovaným množstvím materiálu pro vyšetření. Naproti tomu náhodný výběr vzorků dobře odráží zastoupení koncentrací IgM v reálné praxi a tedy podle našeho názoru věrohodně reflektuje problém, s nímž je třeba při analýze IgM v likvorové diagnostice počítat.

Závěr

Výsledky naší studie odporují předpokladu, že kvocient likvor/sérum je nezávislý na použité metodě, a to i tehdy, jsou-li párové vzorky likvorů a sér analyzovány paralelně na stejné kalibrační křivce. Naopak doporučení analyzovat sérum pro výpočet kvocientu na likvorové a nikoliv sérové kalibrační křivce, jakkoliv je intuitivně dobře pochopitelné, výsledky naší práce nepodporují. To má svůj praktický dopad, protože analýza séra na sérové kalibrační křivce je u obou použitých

nefelometrických systémů levnější. ELISA metoda má oproti nefelometrickému stanovení výhodu možnosti měření podstatně nižších koncentrací, a tedy stanovení koncentrace IgM v téměř všech vzorcích likvoru. Proto zaslouží přednost v experimentálních pracích, např. při zkoumání rozložení hodnot likvorových koncentrací IgM v populaci. Přes částečnou automatizaci však zůstává mnohem pracnější než nefelometrické stanovení a mj. i v souvislosti s procesem de facto povinné akreditace a velmi obtížně splnitelných podmínek nastavených pro validaci „home-made“ metod nelze reálně očekávat její používání v rutinním provozu. Pokud se nepodaří problém rozdílných koncentrací IgM mezi oběma na trhu dominujícími systémy stanovení uspokojivě vyřešit a předejít tak „falešně“ pozitivním výsledkům výpočtu intrathékální syntézy, přicházela by teoreticky v úvahu možnost zpracování rozsáhlého souboru pacientů s předpokládanou nepřítomností intrathékální syntézy IgM s následnou empirickou úpravou parametrů a/b , b^2 a c Reiberovy hyperbolické funkce pro limitní kvocient v případě analýzy na systémech Immage. V každém případě považujeme při použití tohoto systému v případě nízkých koncentrací IgM v likvoru (<1,5 mg/l) za žádoucí hodnotit výpočet intrathékální syntézy velmi zdrženlivě, popřípadě nahradit komentářem „nelze spolehlivě stanovit“. Je také možné, že v blízké budoucnosti dozná rozšíření detekce oligoklonálních IgM pásů [8], doporučená v recentním přehledném článku i našimi autory [9]. Metoda však zdaleka není přijímána bez výhrad [10-12] a pro optimální provedení teoreticky vyžaduje předběžnou kvantifikaci IgM, aby mohlo být aplikováno adekvátní a v likvorovém i sérovém vzorku srovnatelné množství IgM pro separaci v gelu.

Literatura

1. **Reiber, H.** Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 1994, 122, p. 189-203.
2. **Reiber, H.** External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/Serum quotients. *Clin. Chem.* 1995, 41/2, p. 256-263.
3. **Reiber, H., Peter, J. B.** Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs. *J. Neurol. Sci.* 2001, 184, p. 101-122.
4. **Reiber, H., Thompson, E. J., Grimsley, G. et al.** Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: International consensus by an internet-based group discussion. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41 (3), p. 331-337.
5. **Wick, M. (Ed.).** Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie, 2. vydání, 2004, <http://www.uke.de/extern/dgln/pdf/Methodenkatalog.pdf>
6. **Dinesen, B., Saxtrup Nielsen, O.** A sensitive enzyme immunoassay for the quantitation of human IgM. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1979, 39, p. 449-454.
7. **Hirohata, S., Yamada, A., Inoue, T.** A sensitive and simple method for determination of IgM in cerebrospinal fluid by a solid-phase enzyme immunoassay. Comparison of two different methods. *J. Neurol. Sci.* 1985, 67, p. 115-118.

8. **Villar, L. M., González-Porqué, P., Masjuán, J., Álvarez-Cermeño, J. C., Bootello, A., Keir, G.** A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J. Immunol. Methods* 2001, 258, p. 151-155.
9. **Sobek, O., Adam, P., Koudelková, M., Štourač, P., Mareš, J.** Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České lékařské společnosti JEP. *Čes. a Slov. Neurol. Neurochir.* 2012, 75 (2), p. 159-163.
10. **Wurster, U.** Oligoklonale Banden IgG, IgA, IgM – Methodische Probleme und klinische Wertigkeit. 4. *Dresdner Liquorsymposium*, 2010. dostupné na: http://www.uke.de/extern/dgln/pdf/Oligoklonale_Banden.pdf
11. **Stauch, C., Reiber, H., Rauchenzauner, M. et al.** Intrathecal IgM synthesis in paediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Mult. Scler.* 2010, 12, p. 327-334.
12. **Reiber, H., Rostasy, K.** Response to the letter of Villar et al. „Quantitative and qualitative IgM analysis in CSF“. *Mult. Scler.* 2012, 18, p. 252-253.

Práce byla zčásti podpořena firmami Beckman Coulter Česká republika s.r.o. a Siemens s.r.o. formou poskytnutí originálních reagentů pro část prováděných analýz.

Autoři také děkují laborantkám Úseku analýzy likvoru Ústavu laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie FN Ostrava I. Faruzelové, L. Fürstové, Z. Jakimové a L. Ježkové za pečlivě a nad rámec pracovních povinností provedená srovnávací nefelometrická měření.

Do redakce došlo 22. 5. 2012

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Ing. David Zeman, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie
Ústav laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790
708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: david.zeman@fno.cz

Erratum

Mikulášová, A., Kuglík, P., Smetana, J., Grešliková, H., Říhová, L., Klincová, M., Hájek, R.: Úloha chromozomových aberací v patogenezi monoklonální gamapatie nejasného významu. *Klin. Biochem. Metab.* 20 (41), 2012, No. 2, p. 91–96.

Chybná dedikace: Tato práce byla podpořena výzkumnými záměry Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434 a MSM0021622415, grantem Grantové agentury České republiky GAP304/10/1395 a granty Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví: NT11154-4, NS10406-3 a NT12130-4. Autor práce je stipendista programu Brno Ph.D. talent – financuje statutární město Brno.

Korekce: Tato práce byla podpořena výzkumnými záměry Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434 a MSM0021622415, grantem Grantové agentury České republiky GAP304/10/1395 a granty Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví: NT13492, NT11154, NS10406 a NT12130. Autor práce je stipendista programu Brno Ph.D. talent – financuje statutární město Brno.

Oligoklonální IgG a volné lehké řetězce – srovnání izoelektrické fokusace v agarózovém a polyakrylamidovém gelu

Oligoclonal IgG and free light chains – comparison between agarose and polyacrylamide isoelectric focusing

Souhrn

Cíl: Porovnání izoelektrické fokusace v agarosovém a polyakrylamidovém gelu pro detekci oligoklonálních pásů imunoglobulinu G (o-IgG) a oligoklonálních volných lehkých řetězců (oligoclonal free light chains; o-fLC). **Soubor a metody:** Detekce oligoklonálních pásů byla provedena v sérii 106 (o-IgG), resp. 48 (o-fLC) konsekutivních párových vzorků likvorů a sér. Pro srovnání obou metod a shody mezi hodnotícími byla použita statistika kappa. **Výsledky:** Při rozdělení nálezů na negativní a pozitivní byly rozdílně hodnoceny jen tři vzorky (2,8 %) pro o-IgG, tři vzorky (6,2 %) pro o-fLC kappa a jediný vzorek (2,1 %) pro o-fLC lambda. V těchto diskrepantních případech byl pozorován rozdíl nejvýše tří pásů. Shoda mezi hodnotícími pro o-fLC byla velmi dobrá ($\kappa = 0,906–1,000$). **Závěry:** Přestože polyakrylamidový gel může být teoreticky výhodnější vzhledem k menší velikosti pórů a lepšímu rozlišení, naše výsledky byly jak pro o-IgG, tak pro o-fLC velmi podobné jako při separaci v agarózovém gelu. Obě metody hodnotíme jako dobře použitelné a rozdíly mezi nimi byly omezeny na hraničně pozitivní případy.

Abstract

Aim: To compare agarose and polyacrylamide isoelectric focusing for oligoclonal immunoglobulin G (o-IgG) and oligoclonal free light chains (o-fLC) detection. **Patients and methods:** Oligoclonal bands were detected in 106 (o-IgG) and 48 (o-fLC), resp. consecutive paired cerebrospinal fluid and serum samples. Kappa statistics was used for method comparison and inter-observer agreement. **Results:** When results were expressed as negative or positive, only three samples (2.8%) for o-IgG, three (6.2%) for o-fLC kappa and one (2.1%) for o-fLC lambda were evaluated differently. Maximum difference between methods was 3 bands in these discrepant cases. Inter-observer agreement for o-fLC was very good ($\kappa = 0.906–1.000$). **Conclusions:** Although polyacrylamide gel might be advantageous due to smaller pore size and hence better resolution, results for both o-IgG and o-fLC were very similar to agarose isoelectric focusing in our series. Both methods performed equally well and discrepancies were restricted to borderline positive cases only.

Rádi bychom poděkovali laborantkám L. Furstové, I. Faruzelové, R. Malečkové, R. Výtiskové, B. Strakošové a O. Michnové za vynikající technickou spolupráci; prof. D. Stejskalovi, doc. K. Šafářčikovi a dr. Z. Švagerovi (Ústav laboratorní diagnostiky, FN Ostrava), dr. J. Jurčíkové a dr. K. Vítkové (Útvar náměstka ředitele pro vědu a výzkum, FN Ostrava) za jejich podporu a Mgr. M. Hradecké za jazykovou korekturu.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

D. Zeman^{1,2}, P. Kušnierová¹,
P. Hradílek², M. Čábal²,
O. Zapletalová²

¹ Ústav laboratorní diagnostiky,
FN Ostrava

² Neurologická klinika FN Ostrava



Ing. MUDr. David Zeman, Ph.D.
Ústav laboratorní diagnostiky FN
Ostrava
17. Listopadu 1790
708 52 Ostrava
e-mail: david.zeman@fno.cz

Přijato k recenzi: 4. 10. 2018

Přijato do tisku: 10. 12. 2018

Klíčová slova

mozkomíšní mok – volné lehké řetězce –
imunoglobulin G – izoelektrická fokusace –
agaróza – polyakrylamid

Key words

cerebrospinal fluid – free light chains –
immunoglobulin G – isoelectric focusing –
agarose – polyacrylamide

Úvod

Detekce oligoklonálních pásů imunoglobulinu G (o-IgG) je hlavním testem používaným k průkazu intratékální protilátkové odpovědi u chronických zánětlivých onemocnění CNS, zejména u RS [1]. Přestože v recentních pracích bylo doporučeno nahradit detekci o-IgG snadnější kvantifikací volných lehkých řetězců (free light chains; fLC) typu kappa (free kappa light chains; fKLC) [2,3], nabyla detekce o-IgG formálního významu pro diagnózu RS v recentní revizi McDonaldových diagnostických kritérií [4]. Bude tedy pravděpodobně nadále prováděna vždy, kdy je pro podporu diagnózy RS požadováno vyšetření likvoru.

Kromě zvýšení koncentrace fKLC v likvoru mohou být senzitivním markerem intratékálního zánětu také oligoklonální fKLC (o-fKLC). Tento test se ukázal jako nepatrně senzitivnější než o-IgG [5–7]. V současnosti však není dostupné žádné srovnání metod pro detekci oligoklonálních fLC (o-fLC). Tento test je používán vzácně vzhledem ke své větší pracnosti, zejména ve srovnání s novými automatizovanými kvantitativními metodami. U RS byla popsána také intratékální syntéza fLC typu lambda (free lambda light chains; fLLC) a přestože je nacházena vzácněji než intratékální syntéza IgG a fKLC [5,7,8], recentní studie ukazují, že současná analýza fKLC a fLLC může mít prognostický význam [9–11].

Detekce o-fLC získala mezi klinickými lékaři zasílajícími vzorky do naší laboratoře značnou popularitu, kterou neztrácí ani po zavedení kvantitativní analýzy fLC. Po obdržení informace o ukončení výroby elektroforetického přístroje Multiphor II (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Velká Británie) jsme proto hledali adekvátní náhradu a zvolili jsme přístroj EDC Flatbed Professional (Electrophoresis Development and

Consulting, Tübingen, Německo). Následně jsme se rozhodli vyzkoušet použití výrobcem dodávaných polyakrylamidových gelů (PAG) pro separaci o-IgG a o-fLC. Zaměřili jsme se také na vyhodnocení shody výsledků o-fLC mezi dvěma hodnotícími.

Soubor a metodika

Vzorky

V konsekutivních párových vzorcích likvorů a sér byly detekovány o-IgG (n = 106) a o-fLC (n = 48) podle požadavků klinického lékaře. U pacientů zaslaných k vyšetření z jiných nemocnic nebyla k dispozici žádná klinická data. Pacienti sledovaní na našem pracovišti s dostupnými klinickými daty (n = 42) byli diagnostikováni jako RS (n = 12, šest z nich po klinicky izolovaném syndromu [CIS] podle poslední revize McDonaldových diagnostických kritérií), CIS (n = 3, nesplňující diagnostická kritéria RS), jiná zánětlivá onemocnění CNS (po jednom případě herpetické encefalitidy, meningoencefalitidy způsobené virem varicella zoster a neuromyelitis optica), zánětlivá onemocnění periferního nervového systému (po jednom případě akutní zánětlivé demyelinizační polyneuropatie, multifokální motorické neuropatie a paraproteinemické neuropatie), nezářlivá onemocnění nervového systému (demenace, n = 4; vertigo, n = 2; migréna, n = 2; kryptogenní polyneuropatie, n = 2; a po jednom případě psychózy, CMP, Parkinsonovy nemoci, stenózy páteřního kanálu, cervikální myelopatie a steroidní myopatie) nebo jako symptomatické kontroly (n = 5).

Detekce oligoklonálních pásů IgG a volných lehkých řetězců

Pro detekci o-IgG po separaci izoelektrickou fokusací (IEF) v agarózovém gelu s následnou imunofixací (IF) byl použit komerční kit Hydragel 9 CSF Isofocusing Kit (Sebia, Evry

Cedex, Francie) na přístroji Hydrasys (Sebia, Evry Cedex, Francie) podle instrukcí výrobce. IEF v PAG byla provedena v komerčně dostupných gelech pH 6–11 40S (EDC, Tübingen, Německo) na přístroji EDC Flatbed Professional (EDC, Tübingen, Německo) (krok 1: 500 V, 25 mA, 10 W, 20 min; krok 2: 1350 V, 25 mA, 22 W, 90 min; krok 3: 1750 V, 20 mA, 26 W, 20 min). Vzorky likvorů a sér byly naředěny na 10 mg/l IgG 0,1% NaCl a do jamek v gelu bylo aplikováno po 10 µl. K imunodetekci byla použita senzitivní metoda alkalickou fosfatázou značené anti-IgG protilátky, jež byla popsána v práci Sádabou et al [12]. Po kapilárním blottingu (50 min) byla membrána 45 min blokována 3% hovězím sérovým albuminem (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Německo) a poté inkubována s alkalickou fosfatázou značenou kozí protilátkou proti Fc části lidského IgG (Bio-Rad, Praha, Česká republika) po dobu 75 min. K barevné reakci byl použit substrát BCIP/NBT (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Izoelektrická fokusace v agarózovém gelu pro průkaz o-fLC byla provedena na přístroji Multiphor II (GE Healthcare Life Sciences, Helsinky, Finsko) dříve popsaným postupem [7,8]. IEF v PAG byla provedena v gelech pH 3–10 na přístroji Flatbed Professional za podmínek doporučených výrobcem (krok 1: 500 V, 12 mA, 10 W, 30 min; krok 2: 1 700 V, 12 mA, 18 W, 90 min; krok 3: 2 000 V, 8 mA, 20 W, 30 min). Pro oba typy separace byly vzorky sér ředěny 1/80 0,7% NaCl a na gel bylo aplikováno 7 µl likvorů a ředěných sér. Následná blotovací a imunodetekční procedura byla identická jako v případě IEF v agarózovém gelu.

Hodnocení o-IgG bylo provedeno jedním z autorů, zatímco o-fLC byly hodnoceny nezávisle dvěma autory za účelem posouzení shody. IgG pásy v likvoru bez protějšku v séru nebo jasně výraznější v likvoru než v séru byly považovány za intratékálně syntezované; pásy výrazně slabší v séru oproti likvoru nebyly brány v potaz při klasifikaci nálezů do typů 1–5. Pásy fLC byly považovány za intratékálně syntezované pouze v případě, že neměly žádný sérový protějšek, neboť v tomto testu nejsou v párových vzorcích likvorů a sér aplikována stejná množství fLC. Byly hodnoceny počty a procenta diskrepantně klasifikovaných nálezů; pro posouzení shody mezi metodami a mezi hodnotícími byly použity chí-kvadrát test a statistika kappa. Pro porovnání počtu intratékálně syntezovaných pásů byly pou-

Tab. 1. Srovnání mezi agarózovou IEF/IF a PAG IEF/IB. Chi-kvadrát 88,052; $p < 0,0001$; $\kappa = 0,9154$, 95% CI 0,8211–1,0000.

		o-IgG PAG (EDC) IEF/IB		
		negativní	pozitivní	celkem
o-IgG agaróza (Sebia Hydrasys) IEF/IF	negativní	82	1	83 (78,3 %)
	pozitivní	2	21	23 (21,7 %)
	celkem	84 (79,2 %)	22 (20,8 %)	106

IB – imunoblotting; IEF – izoelektrická fokusace; IF – imunofixace; PAG – polyakrylamidový gel; o-IgG – oligoklonální imunoglobulin G

† alespoň dva intratékálně syntezované o-IgG pásy

žity Spearmanův korelační koeficient, vážená kappa a Wilcoxonův test. Ke statistickým analýzám byl využit statistický program MedCalc, verze 18.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgie).

Stanovení albuminu, IgG a volných lehkých řetězců

Albumin a IgG v likvoru a séru byly měřeny na nefelometru BN ProSpec (Siemens Healthcare, Praha, Česká republika). fLC byly kvantifikovány turbidimetricky na analyzátoru SPAPLUS kity certifikovanými pro měření v likvoru a séru (LK016.L.S and LK018.L.S) (The Binding Site, Birmingham, Velká Británie).

Souhlas etické komise

Všichni pacienti sledovaní v naší nemocnici podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena etickou komisí nemocnice jako součást projektu Likvorové biomarkery roztroušené sklerózy (č. j. 400/2017).

Výsledky

Oligoklonální IgG

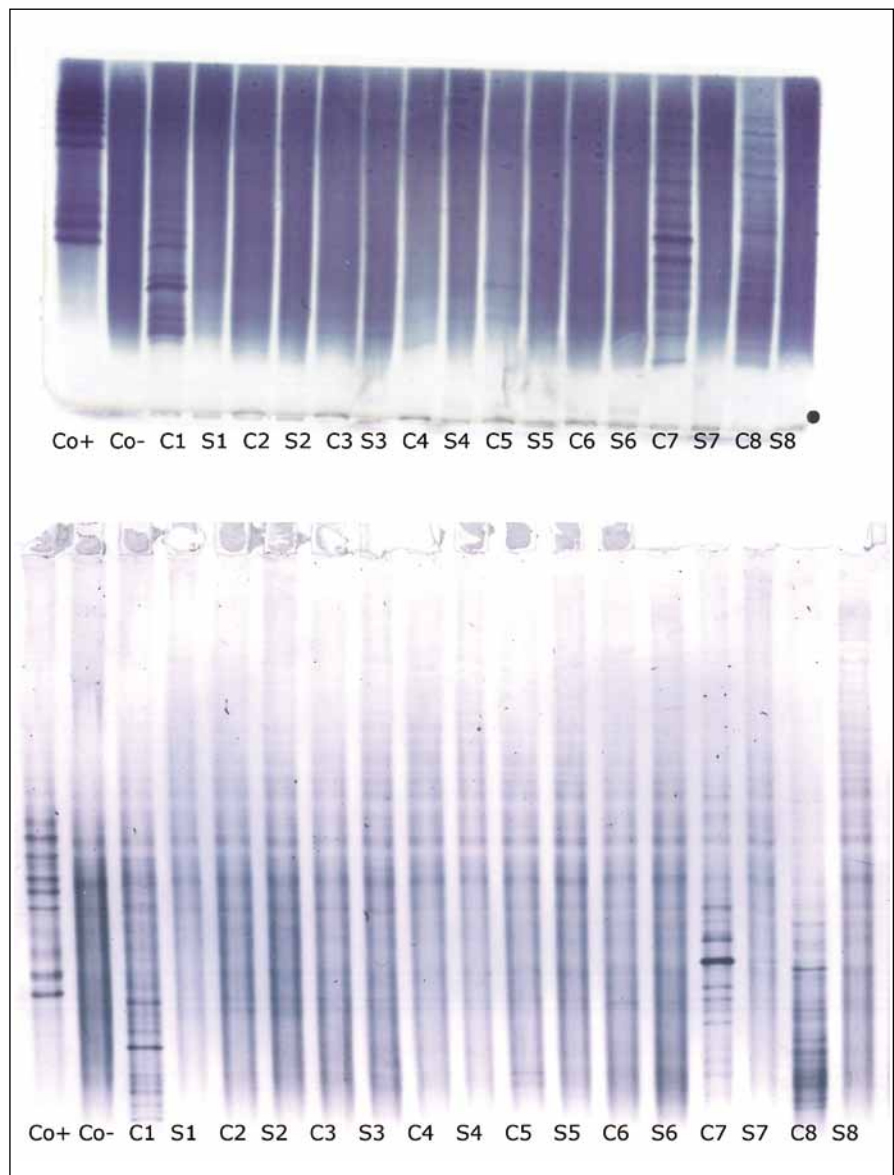
Srovnání bylo provedeno ve 106 konsekutivních vzorcích. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1 a reprezentativní příklad na obr. 1. Celkem tři vzorky (2,8 %) byly klasifikovány neshodně. Počty intratékálně syntezovaných IgG pásů v těchto případech uvádí tab. 2.

Jediný intratékálně syntezovaný IgG pás byl nalezen v 7/106 (6,6 %) vzorcích při použití IEF v agaróze s následnou imunofixací. Na PAG IEF/immunoblotting (IEF/IB) nebyl ve čtyřech z těchto případů nalezen žádný pás, ve dvou případech byl identifikován rovněž jeden pás a v jednom případě byly zjištěny čtyři pásy.

Na PAG IEF/IB byl jediný intratékálně syntezovaný IgG pás nalezen v 10 případech (9,4 %). Na IEF/IF nebyl v šesti z těchto případů nalezen žádný pás, ve dvou případech byl nalezen rovněž jediný pás a v dalších dvou případech byly nalezeny dva, resp. tři pásy.

Porovnali jsme také výsledky podrobnější klasifikace nálezu do typů 1–5 podle dvou konsenzuálních doporučení [13,14]. Shody bylo dosaženo u 75 vzorků (70,8 %). Hodnota κ činila 0,503, což znamená jen průměrnou shodu. Typ 1 při použití jedné z obou metod byl hodnocen jako typ 4 při použití alternativní metody v 19 případech; analogické neshodné hodnocení typů 2 a 3 přispělo dalšími osmi neshodně klasifikovanými výsledky.

Počet intratékálně syntezovaných IgG pásů byl porovnán pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ($\rho = 0,861$; 95% in-



Obr. 1. Oligoklonální IgG – IEF v agaróze s imunofixací (nahore) a PAG IEF s imunoblottingem (dole). Anoda je nahore. Ve zobrazených vzorcích nebyly pozorovány žádné kvalitativní diskrepance (negativní versus pozitivní) mezi metodami.

C1–8 – párové vzorky likvorů; Co+ – pozitivní kontrola (CSF Control, Sebia, Evry Cedex, Francie); Co– – negativní kontrola (intravenózní IgG preparát Flebogamma®, Instituto Grifols, Barcelona, Španělsko); IEF – izoelektrická fokusace; IgG – imunoglobulin G; PAG – polyakrylamidový gel; S1–8 – párové vzorky séra

Fig. 1. Oligoclonal IgG on agarose IEF/immunofixation (top) and PAG IEF/immunoblotting (bottom). Anode is at the top. No qualitative discrepancies (negative versus positive) between the two methods were noted in these samples.

C1–8 – paired cerebrospinal fluid samples; Co+ – positive control (CSF Control, Sebia, Evry Cedex, France); Co– – negative control (intravenous IgG remedy Flebogamma®, Instituto Grifols, Barcelona, Spain); IEF – isoelectric focusing; IgG – immunoglobulin G; PAG – polyacrylamide gel; S1–8 – paired serum samples

terval spolehlivosti [confidence interval; CI] 0,802–0,903; $p < 0,0001$) a vážené κ (0,795; 95% CI 0,7432–0,8473). Výsledky indikují dobrou shodu mezi metodami. Wilcoxonovým

testem nebyl zjištěn žádný systematický rozdíl mezi metodami v počtu intratékálně syntezovaných IgG pásů (16 kladných a 17 záporných diferencí; $p = 0,8442$).

Oligoklonální fLC

Detekce o-fLC byla provedena ve 48 vzorcích. Výsledky uvádí tab. 3 a 4 a reprezentativní příklad je na obr. 2. Bylo dosaženo výborné shody jak mezi metodami, tak mezi hodnotícími ($\kappa = 0,9064$ a $0,9091$ pro o-fKLC v agaróze a PAG; $0,9286$ a $1,000$ pro o-fLLC v agaróze a PAG).

Neshodně klasifikovány byly tři vzorky (6,2 %) v případě o-fKLC a jeden vzorek (2,1 %; hodnotící A) resp. dva vzorky (4,2 %; hodnotící B) v případě fLLC. Počet nalezených intratékálně syntezovaných pásů fKLC v těchto diskrepantních případech je uveden v tab. 2. V případě fLLC jediný diskrepantně hodnocený nálezy nevykazoval žádné pásy fLLC v agarózovém gelu a dva pásy v PAG.

Počet intratékálně syntezovaných pásů byl porovnán pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ($\rho = 0,847$ – $0,978$; $p < 0,0001$ pro všechna srovnání) a vážené κ ($0,804$ – $0,912$). Zjištěné hodnoty indikují velmi dobrou shodu. Je pozoruhodné, že jsme pozorovali vyšší počet intratékálně syntezovaných fKLC pásů při použití PAG ve srovnání s agarózou (Wilcoxonův test, $p = 0,0063$ a $p = 0,0023$ pro hodnotícího A, resp. B) a tendenci k vyššímu počtu intratékálně syntezovaných fLLC pásů (Wilcoxonův test signifikantní pouze v případě hodnotícího B, $p = 0,0137$).

Srovnání s výpočty intratékální syntézy IgG a fLC

Při srovnání výpočtových metod intratékální syntézy IgG s IEF v agaróze a imunofixaci nebyly zjištěny žádné falešně pozitivní výsledky výpočtu podle Reibera [15], Auera et al [16] ani Öhmana et al [17]. Jeden falešně pozitivní výsledek byl pozorován v případě IgG indexu (při použití konvenčního kritéria $> 0,7$). Senzitivita všech výpočtů však byla nízká (43,5 % pro IgG index a vztahy Reibera a Auera et al a 52,2 % pro vztah Öhmana et al).

Přestože kvantifikace fLC byla požadována jen u 10 z těchto vzorků, domníváme se, že výsledky jsou dostatečně pozoruhodné, aby byly prezentovány (tab. 5). Při použití cut-off hodnot pro přítomnost intratékální syntézy fLC dříve určených v naší laboratoři (CSF fKLC $0,54$ mg/l; CSF fLLC $0,30$ mg/l; fKLC index $6,07$; fLLC index $6,27$) jsme našli 100% shodu mezi kvalitativními a kvantitativními výsledky pro fKLC, 90% pro CSF fLLC a 80% pro fLLC index. Jeden pacient s normální koncentrací CSF fLLC, ale zvýšeným fLLC indexem neměl žádné intratékálně syntezované fLLC pásy, zatímco jeden pacient

Tab. 2. Oligoklonální IgG a fKLC – neshodně hodnocené vzorky.

oligoklonální IgG	počet intratékálně syntezovaných pásů (hodnotící A)	
	agaróza	PAG
případ		
1	1	4
2	2	1
3	3	1

oligoklonální fKLC	počet intratékálně syntezovaných fKLC pásů			
	hodnotící A (hodnotící B)		hodnotící B (hodnotící A)	
případ†	agaróza	PAG	agaróza	PAG
1	1 (1)	3 (2)	1 (1)	2 (3)
2	2 (1)	1 (0)	1 (2)	2 (2)
3	4 (4)	1 (2)	1 (0)	3 (0)

† Pouze v případě 1 byla identická diskrepance pozorována mezi agarózou a PAG IEF/AIB oběma hodnotícími. Jako případ 2 a 3 jsou očíslovány různé vzorky pro hodnotícího A, resp. B. AIB – afinitní imunoblotting; IEF – izoelektrická fokusace; fKLC – volné lehké řetězce typu kappa; IgG – imunoglobulin G; PAG – polyakrylamidový gel

s normální koncentrací CSF fLLC a normálním fLLC indexem měl dva intratékálně syntezované fLLC pásy v PAG a jeden (hodnotící B) resp. dva (hodnotící A) slabé pásy při separaci v agaróze. Stojí za zmínku, že oba nelineární výpočtové vztahy pro intratékální syntézu fKLC [18,19] byly 100% shodné s kvalitativním testem, zatímco recentně navržená cut-off hodnota $4,2$ pro index fLLC nebo vztah pro výpočet intratékální syntézy fLLC [19] vedl ke třem, resp. dvěma falešně pozitivním výsledkům.

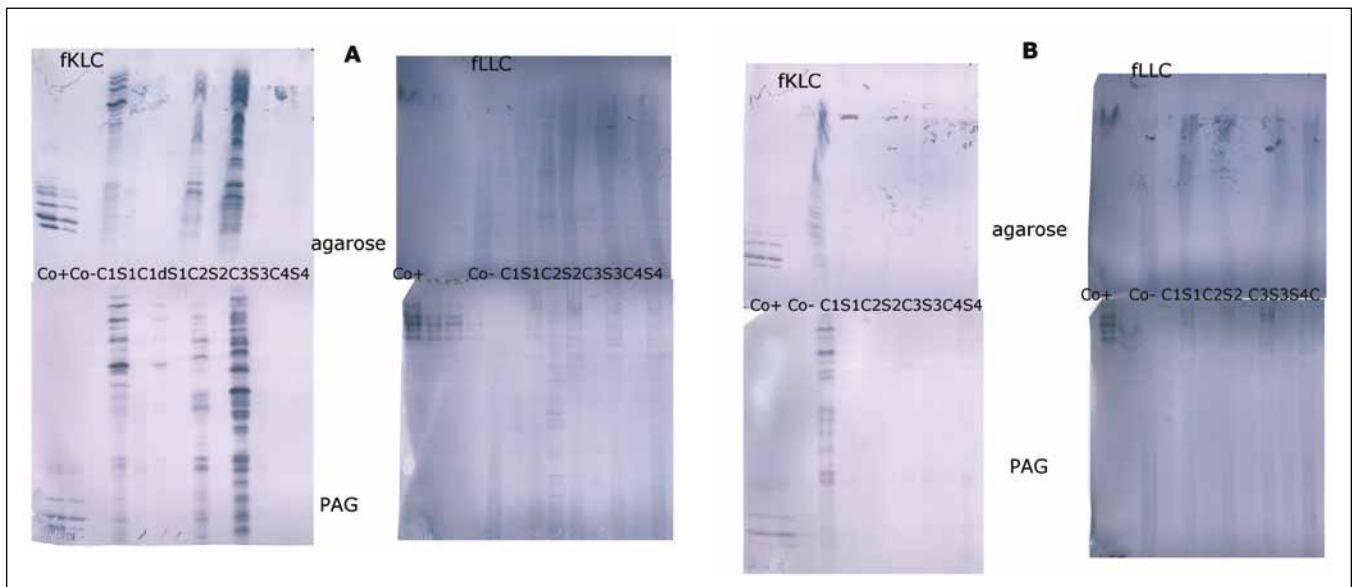
Korelace s klinickými daty

Přestože tato studie nebyla primárně zaměřena na korelaci výsledků o-IgG a o-fLC s klinickými daty, analyzovali jsme výsledky u pacientů s dostupnými klinickými diagnózami ($n = 42$ pro o-IgG; $n = 22$ pro o-fLC) jako další test plauzibility našich laboratorních nálezů. Všechny 12 pacientů s diagnózou RS mělo pozitivní o-IgG při agarózové IEF/IF; jeden z nich byl negativní na PAG IEF/IB (jediný intratékálně syntezovaný IgG pás). Tento pacient vykazoval tři intratékálně syntezované o-IgG pásy při agarózové IEF/IF, ale měl negativní o-fKLC i o-fLLC. Všichni tři pacienti s diagnózou CIS měli pozitivní o-IgG oběma metodami. U všech 27 pacientů s jinými diagnózami byl o-IgG test negativní. Z šesti pacientů s RS, u kterých byla provedena detekce o-fLC, byly o-fKLC pozitivní v pěti a negativní v jednom případě. Tři z těchto pacientů měli také pozitivní o-fLLC.

Oba pacienti s CIS, u nichž byla provedena detekce o-fLC, měli pozitivní o-fKLC i o-fLLC (u jednoho byly o-fLLC patrné jen v PAG; jinak zde bylo dosaženo úplné shody mezi metodami i hodnotícími). Ze 14 pacientů s jinými diagnózami mělo 3–5 pozitivní o-fKLC (max. 5 pásů v PAG a 7 pásů v agaróze u pacienta s multifokální motorickou neuropatií; při použití PAG resp. agarózy byli jeden, resp. dva pacienti klasifikováni rozdílně oběma hodnotícími), ale jen jediný pacient (s diagnózou kryptogenní polyneuropatie) měl pozitivní o-fLLC. Je zajímavé, že při použití vyšší cut-off hodnoty ≥ 6 intratékálně syntezovaných pásů o-fKLC, která byla v literatuře navržena [7], by při separaci v agaróze byl jako pozitivní nálezy klasifikován jen jeden pacient s jinou diagnózou než RS nebo CIS, ale také jen tři pacienti s RS. Naopak stejná cut-off hodnota aplikovaná na PAG IEF/AIB zachovala pozitivitu o-fKLC u všech pěti pacientů s RS, zatímco všech 14 pacientů s jinými diagnózami než RS nebo CIS by zůstalo negativních. Shoda mezi hodnotícími byla u těchto vzorků 100%.

Diskuze

Srovnání různých metod separace a specifické detekce o-IgG, které jsou v současnosti používány, bylo publikováno v několika studiích [12,20–23], ale použití IEF v agaróze vs. v polyakrylamidu nebylo v tomto kontextu systematicky studováno. Pro analýzu o-fLC



Obr. 2. Oligoklonální volné lehké řetězce.

A) Shodné výsledky v agaróze a PAG IEF/AIB. V C1, C2 a C3 jsou jasně pozitivní oligoklonální fKLC, ale jen v C2 jsou jasně pozitivní oligoklonální fLLC. Ve vzorku C1 byly nalezeny dva slabé fLLC pásy při PAG IEF/AIB, zatímco hodnocení při agarózové IEF/IF bylo neshodné (dva pásy – hodnotící A, jeden pás – hodnotící B). Vzorek C4 je negativní.

AIB – afinitní imunoblotting; C1–4 – párové vzorky nativních likvorů; C1d – likvor 1 ředěný 1/10 (jen pro fKLC); Co+ – pozitivní kontrola (monoklonální volné lehké řetězce [Bio-Rad – AbD Serotec, Praha, ČR] ředěné na 0,25 a 0,10 mg/l pro fKLC a 1,0; 0,5; 0,25 a 0,10 mg/l pro fLLC); Co– – negativní kontrola (preparát intravenózního imunoglobulinu G ředěný na koncentraci 250 mg/l IgG); fKLC – volné lehké řetězce typu kappa; fLLC – volné lehké řetězce typu lambda; IEF – izoelektrická fokusace; IF – imunofixace; PAG – polyakrylamidový gel; S1–4 – párové vzorky nativních sér ředěných 1/80 (kromě S1 vedle nativního C1, který byl pro analýzu fKLC ředěn 1/20)

B) Příklad diskrepantního výsledku oligoklonální fLLC mezi agarózou a PAG IEF/AIB. V C1 jsou četné fKLC pásy, zatímco slabé fLLC pásy jsou tu patrné pouze na PAG IEF/AIB (dva pásy – hodnotící A, tři pásy – hodnotící B). Co+ je zde naředěna na 0,25 a 0,10 mg/l pro fKLC a 1,0 a 0,25 mg/l pro fLLC.

AIB – afinitní imunoblotting; fKLC – volné lehké řetězce typu kappa; fLLC – volné lehké řetězce typu lambda; IEF – izoelektrická fokusace; PAG – polyakrylamidový gel

Fig. 2. Oligoclonal free light chains.

A) Concordant results between agarose and PAG IEF/AIB. C1, C2 and C3 are clearly positive for oligoclonal fKLC while only C2 is clearly positive for oligoclonal fLLC. In C1 sample, two faint cerebrospinal fluid-restricted fLLC bands were found on the membrane after PAG IEF/AIB, while the evaluation was discrepant for agarose IEF/IF (two bands by observer A, one band by observer B). Sample C4 is negative.

AIB – affinity immunoblotting; C1–4 – paired undiluted cerebrospinal fluid samples; C1d – cerebrospinal fluid 1 diluted 1/10 (for fKLC only); Co+ – positive control (monoclonal free light chains [Bio-Rad – AbD Serotec, Prague, Czech Republic] diluted to 0.25 and 0.10 mg/l for fKLC and 1.0, 0.5, 0.25 and 0.10 mg/l for fLLC); Co– – negative control (intravenous immunoglobulin G remedy at a concentration of 250 mg/l IgG); fKLC – free kappa light chains; fLLC – free lambda light chains; IEF – isoelectric focusing; IF – immunofixation; PAG – polyacrylamide gel; S1–4 – paired serum samples diluted 1/80 (except for S1 next to neat C1 that was diluted 1/20 for fKLC analysis)

(B) Example of a discordant result of fLLC between agarose and PAG IEF/AIB. There are numerous fKLC bands in sample C1, whereas faint fLLC bands were only found on PAG IEF/AIB (two bands by observer A, three bands by observer B). Co+ is diluted to 0.25 and 0.10 mg/L for fKLC and 1.0 and 0.25 mg/L for fLLC.

AIB – affinity immunoblotting; fKLC – free kappa light chains; fLLC – free lambda light chains; IEF – isoelectric focusing; PAG – polyacrylamide gel

jsme nenalezli ani jednu takovou srovnávací studii.

Zaměřili jsme se na porovnání dvou komerčně dostupných metod pro o-IgG a na porovnání separace o-fLC v agarózovém vs. PAG při použití identické detekční procedury zavedené pro o-fLC [7,8]. Přínos naší studie spatřujeme ve zpracování konsektivní série vzorků zaslaných k analýze o-IgG a o-fLC, což zamezuje možnému bias a umožňuje také

do určité míry odhadnout očekávaný podíl pozitivních vzorků. Nedostatkem studie je absence klinických informací u více než 50 % vyšetřených vzorků. Nicméně korelace mezi různými testy detekujícími intratékální syntézu imunoglobulinů byla velmi dobrá a výsledky v podskupině pacientů se známými diagnózami jsou konzistentní s dřívějšími publikacemi. Proto považujeme naše výsledky za spolehlivé. Přesto musí být klinicko-la-

boratorní korelace pozorované v naší studii interpretovány s opatrností, neboť výsledky o-IgG a o-fLC byly klinickým lékařům dostupné, a mohly tak ovlivnit jejich diagnostické rozhodování. Ač je nutné pamatovat na to, že intratékální syntéza imunoglobulinů není nálezem specifickým pro konkrétní diagnózu, ale může se vyskytovat u mnoha zánětlivých onemocnění CNS, zdá se, že v neselektované populaci pacientů in-

Tab. 3. Oligoklonální fKLC. Hodnotící A: Chí-kvadrát 34,960, $p < 0,0001$; $\kappa = 0,8615$, 95% CI 0,7101–1,0000. Hodnotící B: Chí-kvadrát 35,656, $p < 0,0001$; $\kappa = 0,8621$, 95% CI 0,7124–1,0000.

		hodnotící A			hodnotící B		
		o-fKLC PAG IEF/AIB		celkem	o-fKLC PAG IEF/AIB		celkem
		negativní	pozitivní†		negativní	pozitivní†	
o-fKLC agaróza IEF/AIB	negativní	30	1	31 (66,7 %)	30	3	33 (68,8 %)
	pozitivní†	2	15	17 (33,3 %)	0	15	15 (31,2 %)
celkem		32 (68,9 %)	16 (31,1 %)	48	30 (62,5 %)	18 (37,5 %)	48

† alespoň dva intratékálně syntezované o-fKLC pásy

AIB – afinitní imunoblotting; o-fKLC – oligoklonální volné lehké řetězce typu lambda; IEF – izoelektrická fokusace; PAG – polyakrylamidový gel

Tab. 4. Oligoklonální fLLC. Hodnotící A: Chí-kvadrát 41,215, $p < 0,0001$; $\kappa = 0,9344$, 95% CI 0,8075–1,0000. Hodnotící B: Chí-kvadrát 37,520, $p < 0,0001$; $\kappa = 0,8636$, 95% CI 0,6803–1,0000.

		hodnotící A			hodnotící B		
		o-fLLC PAG IEF/AIB		celkem	o-fLLC PAG IEF/AIB		celkem
		negativní	pozitivní†		negativní	pozitivní†	
o-fLLC agaróza IEF/AIB	negativní	38	1	39 (81,20 %)	38	2	40 (83,30 %)
	pozitivní†	0	9	9 (18,80 %)	0	8	8 (16,70 %)
celkem		38 (79,20 %)	10 (20,80 %)	48	38 (79,20 %)	10 (20,80 %)	48

† alespoň dva intratékálně syntezované o-fKLC pásy

AIB – afinitní imunoblotting; o-fLLC – oligoklonální volné lehké řetězce typu lambda; IEF – izoelektrická fokusace; PAG – polyakrylamidový gel

Tab. 5. Porovnání likvorových koncentrací a indexů volných lehkých řetězců a počtu intratékálně syntezovaných o-fLC pásů.

číslo případu	CSF fKLC (mg/l)	CSF fLLC (mg/l)	fKLC index	fKLC IF (%)†	fLLC index	fLLC IF (%)‡	o-IgG ith (agaróza; PAG)	o-fKLC ith§		o-fLLC ith§	
								agaróza	PAG	agaróza	PAG
1	6,08	0,99	49,47	90; 83	12,18	66	1; 4	19; 20	21; 22	12; 10	12; 11
2	0,09¶	0,14	2,54	0; 0	4,57	0	0; 1	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
3	0,22	0,22	5,43	0; 0	8,45	43	1; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
4	0,32	0,29	1,50	0; 0	2,61	0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
5	0,09¶	0,16	1,94	0; 0	4,93	10	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
6	3,84	8,07	28,77	85; 73	103,32	96	13; 12	15; 16	20; 19	23; 22	19; 22
7	5,39	0,23	97,88	95; 91	5,58	24	2; 1	18; 23	24; 24	2; 1	2; 2
8	0,09¶	0,17	1,88	0; 0	3,66	0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 1	0; 0
9	24,34	1,02	241,34	98; 97	17,25	76	19; 14	21; 12	30; 23	14; 10	15; 13
10	0,51	0,24	2,75	0; 0	1,83	0	0; 0	0; 1	0; 3	0; 0	0; 0

¶ nedetekovatelné (<0,10 mg/l); pro výpočet fKLC indexu byla použita arbitrární hodnota 0,09 mg/l; V rutinní praxi však indexy v případech s likvorovou koncentrací fLC pod detekčním limitem nepočítáme, neboť ve vzácných případech kombinace nízké koncentrace fLC v séru a nízké hodnoty albuminového kvocientu mohou poskytnout falešně pozitivní hodnoty (vlastní nepublikované pozorování)

CSF – likvor; fKLC – volné lehké řetězce typu kappa; fLLC – volné lehké řetězce typu lambda; IF† – intratékální frakce vypočtená podle Presslauera et al [18] nebo Hegena et al [19]; IF‡ – intratékální frakce vypočtená podle Hegena et al [19]; ith§ – intratékální frakce: hodnotící A, hodnotící B; o-fKLC – oligoklonální volné lehké řetězce typu kappa; o-fLLC – oligoklonální volné lehké řetězce typu lambda; PAG – polyakrylamidový gel

dikovaných k detekci o-IgG je pozitivita tohoto testu nejen vysoce senzitivním, avšak také poměrně specifickým nálezem pro RS.

K odhalení malých, ale významných rozdílů mezi porovnávanými testy by byl zapotřebí mnohem rozsáhlejší soubor. Hodnocení pomocí statistiky κ nám však umožňuje vyslovit závěr, že bylo dosaženo velmi dobré shody ($\kappa > 0,80$) ve všech srovnáních vyjma srovnání klasifikace o-IgG nálezů do typů 1–5. Navíc ojedinělá neshodná hodnocení positivity/negativity nálezu o-IgG i o-fLC byla pozorována pouze v hraničních případech.

Shoda v klasifikaci typu o-IgG nálezu byla vyjádřena méně, ve shodě s předchozími studiemi [20,22,23]. Význam této detailnější klasifikace je diskutován kontroverzně [1,24,25]. Domníváme se, že pouze průměrná shoda v klasifikaci do těchto pěti typů (na rozdíl od velmi dobré shody při jednoduchém hodnocení negativní/pozitivní) může být hlavním důvodem omezujícím klinickou užitečnost této podrobnější klasifikace.

Je důležité zmínit se o významu hraničních nálezů. Jsou-li laboratoří vydány, mohou přispět k nejistotě a stresu pacienta. Jediný intratékálně syntezovaný pás může představovat „vrchol ledovce“ u monoklonální i oligoklonální odpovědi [25]. V běžné praxi je takový nález považován buď za negativní, nebo za hraniční. Tento výsledek jsme u o-IgG pozorovali v 7, resp. 9 % vzorků, což je incidence vyšší než uváděná v předchozích studiích [26–29]. Přestože takový nález, na rozdíl od jiných autorů [1], hodnotíme jako negativní, ve shodě s výsledky recentní multicentrické studie [29] nález jediného pásu na výsledkovém listu uvádíme. Je-li v těchto případech podezření na RS, doporučuje se pečlivé sledování, neboť se ukázalo, že část těchto pacientů časem vyvine oligoklonální profil [26,27,29]. Jako pozitivní je pro o-IgG i o-fLC hodnocen nález alespoň dvou pásů. V několika publikacích však byl navržen vyšší cut-off tří [30,31] nebo čtyř [3,7,28,32] intratékálně syntezovaných IgG pásů nebo šesti pásů fKLC [7]. Další studie srovnávající současné separační/detekční metody pro o-IgG a o-fLC by měly zahrnovat srovnání s kvantifikací fLC a zaměřit se více na „kritické vzorky“ s nálezem jednoho nebo několika málo intratékálně syntezovaných pásů.

Studie potvrdila, že výpočtové metody jsou pro průkaz intratékální syntézy IgG méně senzitivní než o-IgG. Ohledně kvantifikace fLC nemůžeme vyslovit určitější závěry vzhledem k malému počtu analyzo-

vaných vzorků. Naše výsledky nicméně naznačují možnost falešně negativních i falešně pozitivních výsledků kvantitativního testu. Kvantifikace fLC pomocí rozdílných reagensí/přístrojů nemusí poskytovat srovnatelné hodnoty umožňující univerzální použití jediné cut-off hodnoty pro výpočet intratékální syntézy fLC. Diskrepantní výsledky mezi kvantitativními a kvalitativními testy pro fKLC byly publikovány v recentní studii [33]. Přestože se ukázalo, že detekce o-fLC může být nepatrně senzitivnějším testem než o-IgG pro průkaz intratékálního zánetu, může být také méně specifická pro RS než o-IgG [5–8]. Proto souhlasíme s Bayarrem et al [33], že testy fLC by měly být používány spíše jako doplněk než jako náhrada za analýzu o-IgG, jejíž klíčové postavení je zakotveno i v doporučeních českých odborných společností [34,35].

Izoelektrická fokusace v polyakrylamidu může být zvláště výhodná pro menší molekuly fLC vzhledem k menší velikosti pórů gelu. Skutečně jsme pozorovali vyšší počet intratékálně syntezovaných pásů fLC oproti IEF v agaróze. Navíc jsme pozorovali, že v PAG byly pásy fLC rovnější a celkový o-fLC obraz ostřejší než v agaróze, kde jsou pásy často nerovné. Nutno ovšem připustit, že tyto rozdíly nemusí být způsobeny jen separačním médiem, ale také různými programy použitými pro IEF. Tak či onak se tyto malé rozdíly nejeví jako kritické pro konečné kvalitativní zhodnocení výsledků o-fLC.

Uzavíráme tedy s tím, že mezi IEF v agaróze a polyakrylamidu bylo dosaženo velmi dobré shody. Obě metody považujeme za vhodné pro rutinní praxi. Shoda výsledků o-fLC mezi dvěma hodnotícími byla stejná dobrá, jako bylo dříve prokázáno u o-IgG.

Literatura

- Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180(1–2): 17–28. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.07.006.
- Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study. *Mult Scler* 2016; 22(4): 502–510. doi: 10.1177/1352458515594044.
- Gurtner KM, Shosha E, Bryant SC et al. CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison with oligoclonal banding and other CSF indexes. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(7): 1071–1080. doi: 10.1515/cclm-2017-0901.
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018; 17(2): 162–173. doi: 10.1016/S1473-4422(17)30470-2.
- Sindic CJM, Laterre E. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with

multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991; 33(1): 63–72.

- Goffette S, Schluep M, Henry H et al. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75(2): 308–310.
- Zeman D, Hradilek P, Kušnierová P et al. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *BioMed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2015; 159(1): 104–113.
- Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z et al. Assessment of intrathecal free light chain synthesis: Comparison of different quantitative methods with the detection of oligoclonal free light chains by isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166556. doi: 10.1371/journal.pone.0166556.
- Voortman MM, Stojakovic T, Pirpamer L et al. Prognostic value of free light chains lambda and kappa in early multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017; 23(11): 1496–1505. doi: 10.1177/1352458516681503
- Ganelin-Cohen E, Golderman S, Yeskaraev R et al. Search for new biomarkers of pediatric multiple sclerosis: application of immunoglobulin free light chain analysis. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(7): 1081–1089. doi: 10.1515/cclm-2017-0911.
- Rathbone E, Durant L, Kinsella J et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 89(10): 1044–1049. doi: 10.1136/jnnp-2018-317947.
- Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J et al. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004; 284(1–2): 141–145.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57(8): 897–902.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. A consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62(6): 865–870. doi: 10.1001/archneur.62.6.865.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994; 122(2): 189–203.
- Auer M, Hegen H, Zeileis A et al. Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula. *Eur J Neurol* 2016; 23(4): 713–721. doi: 10.1111/ene.12924.
- Öhman S, Forsberg P, Nelson N et al. An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage. *Clin Chim Acta* 1989; 181(3): 265–272.
- Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W et al. Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS. *PLoS One* 2014; 9: e89945. doi: 10.1371/journal.pone.0089945.
- Hegen H, Milosavljevic D, Schnabl C et al. Cerebrospinal fluid free light chains as diagnostic biomarker in neuroborreliosis. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(8): 1383–1391. doi: 10.1515/cclm-2018-0028.
- Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56(2): 135–143.
- Abraira V, Alvarez-Cermeño JC, Arroyo R et al. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice. *J Immunol Methods* 2011; 371(1–2): 170–173. doi: 10.1016/j.jim.2011.06.009.

22. Nováčková L, Zeman D. Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: comparison between commercial immunofixation method and home-made affinity immunoblotting method and evaluation of interobserver agreement. *Klin Biochem Metab* 2011; 19(4): 229–233.
23. Dlouhy O, Kusnierova P, Kurasova I et al. Chemiluminescent detection of oligoclonal immunoglobulins after isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czech Repub* 2018; 162(2): 107–115.
24. Franciotta D, Lolli F. Interlaboratory reproducibility of isoelectric focusing in oligoclonal band detection. *Clin Chem* 2007; 53(8): 1557–1558. doi: 10.1373/clinchem.2007.089052.
25. Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D. An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17(1): 31–46. doi: 10.1080/14737159.2017.1262260.
26. Davies G, Keir G, Thompson EJ et al. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band. A follow-up study. *Neurology* 2003; 60(7): 1163–1166.
27. Franciotta D, Zardini E, Lolli F. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2004; 62(4): 675–676.
28. Wurster U. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2004; 62(7): 1237.
29. Ferraro D, Franciotta D, Bedin R et al. A multicenter study on the diagnostic significance of a single cerebrospinal fluid IgG band. *J Neurol* 2017; 264(5): 973–978. doi: 10.1007/s00415-017-8480-5.
30. Bourahoui A, De Seze J, Gutierrez R et al. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 2004; 11(8): 525–529. doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.00822.x.
31. Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in the CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005; 12(7): 527–530. doi: 10.1111/j.1468-1331.2005.00997.x.
32. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(5): 672–675. doi: 10.1309/EM7K-CQR4-GLMH-RCX4.
33. Bayart JL, Muls N, van Pesch V. Free kappa light chains in neuroinflammatory disorders: complement rather than substitute? *Acta Neurol Scand* 2018; 138(4): 352–358. doi: 10.1111/ane.12969.
34. Sobek O, Adam P, Koudelková J et al. Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České neurologické společnosti JEP. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(2): 159–163.
35. Mrázová K, Zeman D, Božecká K. Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. *Klin Biochem Metab* 2017; 25(1): 43–47.

Na webu csnn.eu naleznete rozšířenou verzi tohoto článku a také verzi v angličtině.

Nemoc těžkých řetězců imunoglobulinu gama

Gamma-heavy chain disease

Kušnierová P.^{1,2}, Zeman D.^{1,2}, Jelínek T.³, Hájek R.³

¹ Ústav laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, FN Ostrava

² Katedra biomedicínských oborů, LF OU, Ostrava

³ Hematoonkologická klinika, FN a LF OU, Ostrava

Souhrn

Úvod: Nemoc těžkých řetězců gama je vzácné onemocnění dosud popsané přibližně u 150 případů. Cílem práce byla laboratorní diagnostika nemoci těžkých řetězců imunoglobulinu. **Materiál a metody:** Do FN Ostrava byl referován 60letý pacient pro suspektní lymfom marginální zóny z biopsie žaludku. U pacienta byla doplněna stagingová vyšetření včetně trepanobiopsie kostní dřeně a PET/CT. Ze speciálních vyšetření byla požadována elektroforéza sérových proteinů, imunofixační elektroforéza, stanovení polyklonálních imunoglobulinů, volných lehkých řetězců a párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinů. Z důvodu nejasného nálezu byla doplněna izoelektrická fokusace v agarózovém gelu s následným afinitním imunoblottingem a SDS elektroforéza. **Výsledky:** V kostní dřeni bylo nalezeno 0,1 % plazmatických buněk, z toho 87 % klonálních (patologických) plazmocytů, s následujícím imunofenotypem: cyt LAMBDA+ CD38+ CD138+ CD45+ CD19+ CD56- CD27+ CD81- CD117-. V séru pacienta byly nalezeny monoklonální těžké řetězce gama. V moči monoklonální těžké ani lehké řetězce imunoglobulinu detekovány nebyly. PET/CT vyšetření prokázalo generalizovanou lymfadenopatii, splenomegalii a nehomogenní akumulaci FDG v axilárním i apendikulárním skeletu, nicméně bez přítomnosti typických osteolytických ložisek. **Závěr:** Monoklonální těžké řetězce imunoglobulinů jsou vzácným onemocněním. Pro jejich potvrzení je nutné použít na rozdíl od průkazu kompletní molekuly paraproteinu další pomocné metody. Nález monoklonálního těžkého řetězce gama v séru studovaného pacienta souvisí s přítomností lymfomu marginální zóny, který byl prokázán z biopsie žaludku.

Klíčová slova

nemoc těžkých řetězců imunoglobulinu – elektroforéza – imunofixační elektroforéza – izoelektrická fokusace – SDS elektroforéza

Summary

Background: Gamma-heavy chain disease is a rare disease, described so far in approximately 150 cases. The aim of this work was laboratory diagnostics of immunoglobulin heavy chain disease. **Materials and methods:** A 60-year-old patient was referred to the University Hospital in Ostrava for suspected marginal zone lymphoma from gastric biopsy. Staging examinations including bone marrow trepanobiopsy and PET/CT were added; special examinations required serum protein electrophoresis, immunofixation electrophoresis, determination of polyclonal immunoglobulins, free light chains, and immunoglobulin heavy/light chain pairs. Isoelectric focusing in agarose gel followed by affinity immunoblotting and SDS electrophoresis was added due to unclear findings. Results: 0.1 % of plasma cells were found in the bone marrow, of which 87 % were clonal (pathological) plasma cells, followed by the cyt cytotype LAMBDA + CD38 + CD138 + CD45 + CD19 + CD56- CD27 + CD81- CD117-. Monoclonal heavy chains were found in the patient's serum. No monoclonal immunoglobulin heavy or light chains were detected in urine. The PET/CT examination showed generalized lymphadenopathy, splenomegaly and inhomogeneous accumulation of FDG in axillary and appendicular skeleton, but without the presence of typical osteolytic lesions. **Conclusion:** Monoclonal heavy chains of immunoglobulins are a rare disease. In contrast to the detection of a complete paraprotein molecule, additional methods must be used to confirm them. The finding of monoclonal heavy chain gamma in the serum of the study patient is related to the presence of marginal zone lymphoma, which was proven from a gastric biopsy.

Key words

heavy chain disease – electrophoresis – immunofixation electrophoresis – isoelectric focusing – SDS electrophoresis

Studie byla podpořena projektem MZ ČR – RVO – FNOs /2017 (Biobanka ve Fakultní nemocnici Ostrava).

The study was supported by the project of MH CZ – DRO – FNOs /2017 (Biobank in Teaching Hospital Ostrava)

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie, Ústav
laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790/5
708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: pavlina.kusnierova@fno.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 2. 2020

Přijato/Accepted: 26. 4. 2020

doi: 10.14735/amko20201

Úvod

Nemoc těžkých řetězců imunoglobulinu (heavy chain disease – HCD) patří mezi vzácné B-buněčné lymfoproliferativní poruchy charakterizované produkcí strukturálně abnormálního monoklonálního imunoglobulinového těžkého řetězce postrádajícího vazebná místa lehkého řetězce, v důsledku čehož dochází k vytvoření neúplné molekuly imunoglobulinu bez odpovídajícího lehkého řetězce [1,2]. Toto onemocnění bylo poprvé popsáno Franklinem et al. v roce 1964 u pacienta s přítomností monoklonálních těžkých řetězců gama v séru a v moči [3]. Od té doby bylo popsáno přibližně u 150 případů nemocných. Klinické příznaky gama-HCD jsou heterogenní, připomínající lymfom marginální zóny, plazmocytom, lymfoplazmocytární lymfom a chronickou lymfocytární leukemii a většina pacientů s touto poruchou má generalizované a progresivní onemocnění [4–6]. Někteří pacienti s gama-HCD mají autoimunitní onemocnění, nejčastěji revmatoidní artritidu nebo systémový lupus erythematos. Onemocnění je jako samostatné nebo indolentní velmi výjimečné [6–8]. V našem souboru 470 hematonekologických

pacientů s prokázanou monoklonální gamapatií se jednalo o první případ podezření na nemoc těžkých řetězců imunoglobulinu. Cílem práce bylo u studovaného pacienta prokázat těžký řetězec imunoglobulinu vhodnou laboratorní metodou.

Metodika

Muž, 60 let, byl odeslán z hematologické ambulance okresní nemocnice k došetření na Hematoonkologickou kliniku FN Ostrava (FNO) pro suspektní lymfom marginální zóny / extramedulární plazmocytom z biopsie žaludku. Pacient byl primárně vyšetřen v okresní nemocnici v březnu 2019 pro mikrocytární anémii s hodnotami hemoglobinu 94 g/l a následně zaléčen přípravky železa. Současně bylo zahájeno sledování pro monoklonální gamapatii nejistého významu (MGUS) z důvodu prokázaného paraproteinu IgG kappa o koncentraci 7 g/l, ale bez prokázaných osteolytických ložisek. V květnu 2019 mu byla provedena biopsie žaludku a střev s podezřením na extramedulární plazmocytom, popř. B-lymfom z marginální zóny (výsledky biopsie sliznice střeva: plazmatické buňky CD31+ CD56–, lymfocyty B CD20+ a T CD3+).

Od června 2019 byl v péči Hematoonkologické kliniky FNO, kde současně podepsal informovaný souhlas schválený etickou komisí FNO. Bylo doplněno vyšetření kostní dřeně a PET/CT vyšetření. Z dalších laboratorních testů byly sledovány parametry krevního obrazu na automatickém analyzátoru Sysmex XN-9000 (Sysmex Co., Kobe, Japan), biochemické a imunologické parametry na analyzátoch AU 5800 a UniCel DxI 8006 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA), SPA Plus (The Binding Site s.r.o., England), Advia Centaur XPT, Immulite 2000Xpi a BN ProSpec (Siemens Healthcare, s.r.o., Česká republika). K průkazu monoklonálního imunoglobulinu byla použita standardní elektroforéza sérových proteinů (Hydragel 30 Protein B1-B2, kat. č. S-4141, Hydrasys 2SCAN Focusing, SEBIA) a imunofixační elektroforéza (Hydragel 4 IF, kat. č. S-4804, Hydrasys 2SCAN Focusing, SEBIA), doplněné o stanovení polyklonálních imunoglobulinů (N Antiser to Human Immunoglobulins IgG, IgA and IgM, kat. č. OSAS, OSAR, OSAT, BN ProSpec, Siemens), stanovení volných lehkých řetězců (Freelite Kappa SPA PLUS kit, kat. č. LK016.L.S; Freelite Lambda SPA PLUS kit, kat. č. LK018.L.S, The Binding Site Ltd.) a párů těžkých/lehkých řetězců.

Tab. 1. Laboratorní výsledky. Hodnoty krevního obrazu byly získány na analyzátoru Sysmex XN-90001, další biochemické a imunologické parametry na analyzátoch AU 58002, SPA Plus3, Advia Centaur XPT4, Immulite 2000Xpi5, UniCel DxI 8006 a BN ProSpec7 v červnu 2019.

Hematologické parametry		Biochemické parametry			
Metoda	Výsledek	Metoda	Výsledek	Metoda	Výsledek
bílé krvinky ¹	$7,47 \times 10^9/l$	urea ²	7,0 mmol/l	IgG ⁷	18,50 g/l
červené krvinky ¹	$4,0 \times 10^{12}/l$	krea ²	124 μ mol/l	IgM ⁷	0,35 g/l
hemoglobin ¹	105 g/l	eGFR	0,92 ml/s	NT-proBNP ⁴	404,0 ng/l
objem červených krvinek ¹	83 fl	Ca ²	2,39 mmol/l	monoklon. IgG	6,14 g/l
množství hemoglobinu v buňce ¹	27 pg	feritin ⁵	85,0 μ g/l	FLC kappa ³	
trombocyty ¹	$184 \times 10^9/l$	vitamin B12 ⁶	99 pmol/l	FLC lambda ³	46 mg/l
segmenty ¹	78,3 %	folát ⁶	17,5 nmol/l	FLC kappa ³	158,64 mg/l
lymfocyty ¹	10,4 %	CB ²	66,7 g/l	FLC poměr	0,30
monocyty ¹	3,9 %	albumin ²	45 g/l	HLC IgG kappa ³	1,32 g/l
eozinofily ¹	7,1 %	β 2-M ³	10,56 mg/l	HLC IgG lambda ³	0,42 g/l
bazofily ¹	0,3 %	IgA ⁷	0,56 g/l	HLC IgG poměr	3,14 g/l

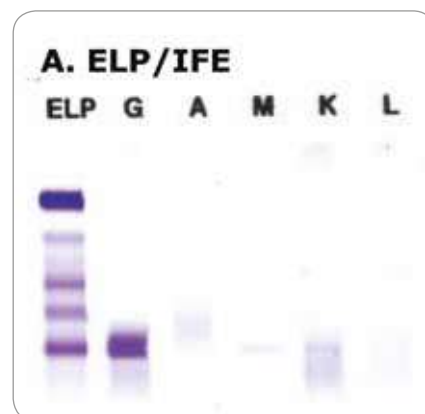
β 2-M – β 2-mikroglobulin, CB – celková bílkovina, FLC – volné lehké řetězce, HLC – těžké/lehké řetězce, NT-proBNP – N-terminální prohormon natriuretického peptidu B

těžců imunoglobulinů (Hevylite Human IgG Kappa Kit, REF NK621.S, Hevylite Human IgG Lambda Kit, REF NK622.S, Hevylite Human IgA Kappa Kit, REF NK623.S, Hevylite Human IgA Lambda Kit, REF NK624.S, Hevylite Human IgM Kappa Kit, REF NK625.S and Hevylite Human IgM Lambda Kit, REF NK626.S). Z důvodu nálezu anomálního gradientu pouze v zóně těžkých řetězců gama bez korelátu v zóně lehkých řetězců byla doplněna izoelektrická fokusace v agarózovém gelu s následným afinitním imunoblottingem s protilátkami proti těžkým řetězcům gama, lehkým řetězcům kappa a lambda (IEF/AIB, modifikovaná in-house metoda C. J. Sindica) [9]. Pro další potvrzení byla použita SDS elektroforéza za použití gelů ElphoGel SDS Kit 12,5 %, 25S, EQ-type (REF edc-4202, Electrophoresis Development & Consulting, Germany) na přístroji Flatbed Professional (Electrophoresis Development & Consulting).

Výsledky

Při vyšetření kostní dřeně bylo nalezeno 0,1 % plazmatických buněk, z toho 87 % klonálních (patologických) plazmocytů s následujícím imunofenotypem: cyt LAMBDA+ CD38+ CD138+ CD45+ CD19+ CD56– CD27+ CD81– CD117–, bez průkazu klonálních B-lymfocytů. V srpnu 2019 bylo provedeno PET/CT vyšetření s nálezem povšechné lymfadenopatie (některé lymfatické uzliny (LU) s akumulací fluorodeoxyglukózy (FDG) nad úroveň parenchymu jater), nehomogenně zvýšené akumulace FDG v kostní dřeni axiálního a apendikulárního skeletu s několika fokusy hyperakumulace FDG, nález byl velmi suspektní z maligní infiltrace. Případ byl uzavřen jako nemoc těžkých řetězců gama doprovázející lymfom marginální zóny diagnostikovaný z biopsie žaludku. Vzhledem k indolenci nemoci nebyla zahájena léčba, pouze „watch and wait“ strategie. Laboratorní výsledky, hodnoty krevního obrazu a dalších biochemických a imunologických parametrů jsou uvedeny v tab. 1. Elektroforéza sérových proteinů prokázala anomální gradient v gama-migrační zóně o koncentraci 6,14 g/l, následná imunofixační elektroforéza potvrdila nález anomálního gradientu tvořeného pouze těžkými řetězci

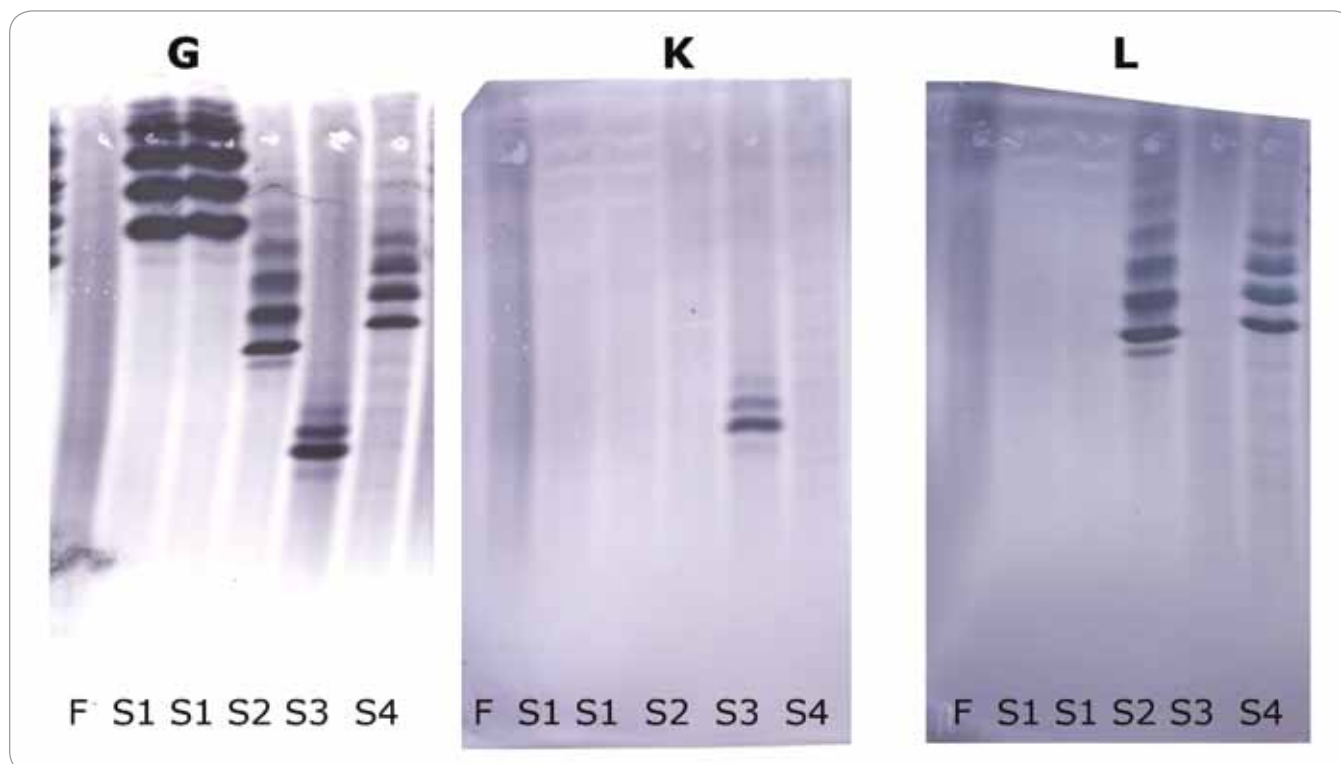
gama, čímž nález z okresní nemocnice, průkaz kompletní molekuly monoklonálního imunoglobulinu IgG kappa, vrátila (obr. 1). Po kontaktování příslušné laboratoře bylo zjištěno, že i jejich nález na elektroforéze a imunofixační elektroforéze, s průkazem výrazného anomálního gradientu v zóně těžkých řetězců gama a slabého gradientu v zóně lehkých řetězců kappa, spíše odpovídá monoklonálním těžkým řetězcům gama, ale z důvodu pochybnosti byl výsledek interpretován jako nález monoklonálního imunoglobulinu IgG kappa. Po tomto upřesnění byla provedena izoelektrická fokusace s následným afinitním imunoglobulinem s protilátkami proti těžkému řetězci gama, lehkým řetězcům kappa a lambda (obr. 2). Na obrázku lze pozorovat nález monoklonálních proužků pouze na membráně s protilátkami anti-gama, reakce s protilátkami proti volným lehkým řetězcům kappa a lambda byly negativní. Výsledky tedy nasvědčovaly přítomnosti pouze těžkých řetězců gama. Pro další potvrzení byla použita SDS elektroforéza, která umožňuje rozlišit molekuly dle molekulové hmotnosti (obr. 3). Výstupem byl nález řetězce gama, resp. zřejmě jen jeho části: pozorovaný proužek migroval o něco pomaleji než dimer volných lehkých řetězců, ale nepatrně rychleji než transferin. Jeho molekulovou hmotnost proto odhadujeme na 50–70 kDa. Výsledek SDS elektroforézy ukázal ještě jednu zajímavou skutečnost. Ve vzorku redukovaném dithiotreitem (DTT) byl patrný proužek migrující jen nepatrně pomaleji než monomer volných lehkých řetězců. Domníváme se proto, že paraprotein je nejspíše tvořen dvěma fragmenty gama řetězce (H2, zkrácený – truncated), a to jeho Fc části (proti níž je namířena použitá protilátka), alternativně by to mohl být s menší pravděpodobností jediný gama řetězec (H1). Současně, na membráně inkubované s protilátkou proti volným i vázaným lehkým řetězcům kappa je slabý, ale jasný (na scanu neviditelný) proužek v zóně odpovídající monomeru lehkých řetězců kappa; domníváme se, že jde o minoritní free kappa komponentu přináležející k stopovému monoklonálnímu IgM kappa, který byl u pacienta na imunofixaci také prokázán.



Obr. 1. Výsledek imunofixační elektroforézy s průkazem monoklonálního těžkého řetězce gama a stopového monoklonálního imunoglobulinu IgM kappa.

Diskuze

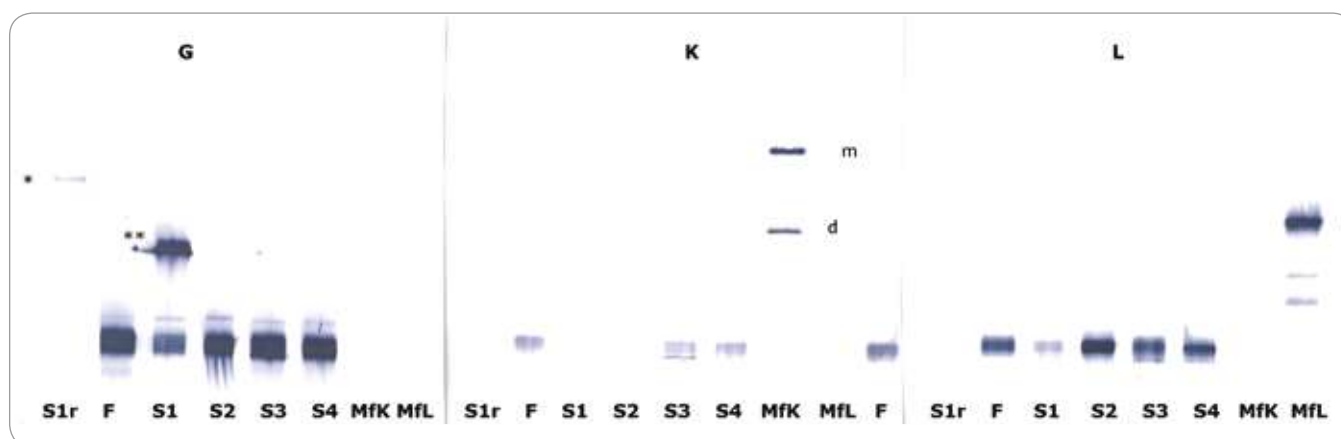
Nemoc těžkých řetězců imunoglobulinu gama je velmi vzácné B-lymfoproliferativní generalizované onemocnění zahrnující lymfatické uzliny, Waldeyerův okruh, gastrointestinální trakt, kostní dřeň, játra, slezinu a periferní krev a je často spojováno s autoimunitním onemocněním. K průkazu monoklonálních těžkých řetězců imunoglobulinů se standardně používá elektroforéza sérových proteinů doplněná o imunofixační vyšetření. Nález gradientu v zóně těžkých řetězců bez protějšku v zónách lehkých řetězců je vhodné vždy opakovat k vyloučení technické chyby. Jako doplňující vyšetření může sloužit stanovení polyklonálních imunoglobulinů turbidimetricky či nefelometricky, stejně tak jako stanovení volných lehkých řetězců a párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu, Hevylite (HLC). Tyto testy jsou cíleny na junkční epitopy, které pokrývají imunoglobulinové těžké a lehké řetězce; z toho plyne, že v případě monoklonálního proteinu tvořeného pouze těžkými řetězci není tato molekula HLC testy rozpoznána. V našem případě byla celková koncentrace polyklonálního IgG rovna 18,5 g/l, koncentrace Hevylite IgG kappa 1,32 g/l a koncentrace Hevylite IgG lambda 0,42 g/l. Z toho vyplývá, že koncentrace IgG stanoveného testy Hevylite představovala 9,4 % celkového IgG stanoveného nefelometricky. To ukazuje, že 90,6 % IgG nemá asociovaný lehký řetězec. Odečtení koncen-



Obr. 2. Výsledky detekce těžkých řetězců imunoglobulinu gama (G), lehkých řetězců imunoglobulinu kappa (K) a lambda (L) pomocí izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblottingem.

F – intravenózní preparát IgG (Flebogamma, Instituto Grifols, Barcelona, Španělsko), S1 – náš pacient, S2 a S4 – vzorky séra s monoklonálním IgG lambda, S3 – vzorek séra s monoklonálním IgG kappa.

V S1 lze nalézt pouze monoklonální pásy těžkého řetězce gama, lehké řetězce kappa a lambda jsou negativní. Výsledky naznačují pouze přítomnost těžkého řetězce gama. Pro další potvrzení jsme použili SDS elektroforézu (umožňuje rozlišit molekuly podle molekulové hmotnosti).



Obr. 3. Výsledky SDS elektroforézy následované blotováním na nitrocelulózovou membránu a imunodetekcí těžkých řetězců imunoglobulinu gama (G), lehkých řetězců kappa (K) a lambda (L). Anoda je nahoře. Kromě pruhu v S1r (vzorek redukovaný dithiotreitem) byly použity neredukční podmínky. Abnormální fragment řetězce gama migruje mírně pomaleji než fLC monomer v redukovaném vzorku (*) a je mírně pomalejší než fLC dimer v neredukovaném vzorku (**), současně zřetelně rychleji než monomery IgG (dole), které nereagovaly ani s jednou protilátkou proti lehkému řetězci kappa nebo lambda. Ve srovnání s pozicemi monomerů a dimerů fLC (MfK a MfL) a transferinu (v jiném experimentu, neuvedeno) je odhadovaná molekulová hmotnost fragmentu mezi 50 a 70 kDa.

fLC – volný lehký řetězec, m – monomer, d – dimer, MfK a MfL – monoklonální volné řetězce kappa a lambda, S1 – náš pacient, S2 – vzorky séra s monoklonálním IgG lambda, S3 – vzorek séra s monoklonálním IgG kappa.

Porovnáním chování redukovaného vs. neredukovaného vzorku se domníváme, že paraprotein se bude pravděpodobně sestávat ze dvou fragmentů řetězce gama (H2, zkrácený), jeho Fc části (proti které je protilátka namířena) spíše než z jednoduchého řetězce gama (H1).

trací HLC IgG kappa + HLC IgG lambda z celkového IgG je nepřímým měřítkem monoklonálního těžkého řetězce produkovaného nádorem. Vztah mezi koncentrací těžkého řetězce gama stanoveného turbidimetrickým testem (diagnostické soupravy Hevylite na analyzátoru SPA-PLUS) byl porovnán s koncentrací stanovenou pomocí elektroforézy sérových proteinů. Koncentrace monoklonálního proteinu stanovená turbidimetricky byla přibližně 2,7krát vyšší než hodnota stanovená pomocí elektroforézy sérových proteinů. Toto nadhodnocení může být v důsledku využití odlišného složení kalibrátoru s monoklonálním fragmentem těžkého řetězce. Podobně i Kaleta et al. [10] hodnotili použití IgG Hevylite testů u 15 pacientů s gama-HCD a došli k podobným výsledkům, koncentrace monoklonálního proteinu stanovená nefelometricky byla přibližně 2krát vyšší než hodnota stanovená pomocí elektroforézy sérových proteinů.

Stejnou problematikou se zabývali i Deighan et al. [11], kteří u pacienta s mnohočetným myelomem prokázali trojitou monoklonální gamapatií tvořenou paraproteinem IgG kappa, volnými lehkými řetězci kappa a těžkým řetězcem gama. Pacienta monitorovali kombinací elektroforézy sérových proteinů, měřením koncentrace volných lehkých řetězců pomocí diagnostických souprav Freelite a Hevylite testů (The Binding Site). Autoři zdůrazňují nutnost myslet při monitorování pacientů s mnohočetným myelomem na riziko chybné interpretace či dokonce úniku informace o přítomných monoklonálních volných lehkých či těžkých řetězcích imunoglobulinů.

Tichý et al. [12] prokázali monoklonální těžké řetězce μ v séru pacienta imunofixační elektroforézou a imunotypizací při kapilární elektroforéze na přístroji Capillarys. Koncentrace paraproteinu tvořeného těžkými řetězci μ byla 34,9 g/l. Jako pomocnou metodu k určení molekulární hmotnosti těžkého řetězce imunoglobulinu využili vysokorozlišovací dvojrozměrnou elektroforézu. Molekulární hmotnost byla 53 kD. Tato hodnota odpovídala dimérům těžkých řetězců μ .

Také Zushi et al. [13] studovali pacienta, který byl hospitalizován kvůli

oboustrannému subunguálnímu krvácení na palcích nohou. Výsledky fyzikálních a laboratorních vyšetření byly nespecifické a krvácení bylo vyhodnoceno jako traumatické. Sérová elektroforéza a imunofixace prokázaly malý monoklonální gradient tvořený pouze těžkými řetězci gama bez odpovídajícího korelátu v zóně lehkých řetězců. Definitivní diagnóza, nemoc těžkých řetězců gama, byla stanovena až na základě průtokové cytometrie, která v aspirátu kostní dřeně prokázala malý počet lymfoplazmatických buněk, které byly pozitivní na CD19, CD38, CD138 a cylgG, ale negativní na lehké řetězce cy kappa a lambda.

Další separační technologii využitelnou pro průkaz monoklonálních těžkých řetězců popsali Thoren et al. [14]. U pacienta s imunofixačně prokázaným monoklonálním těžkým řetězcem gama použili hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF. Po purifikaci specifické pro IgG odhalili ve spektru velké píky, jejichž m/z hodnoty byly mimo očekávané rozmezí jak pro normální těžké, tak lehké řetězce. Naopak odpovídající píky nebyly přítomny v hmotnostních spektrech po purifikacích specifických pro kappa nebo lambda řetězce. MS MALDI-TOF technologie potvrdila přítomnost monoklonálního těžkého řetězce bez přidružených lehkých řetězců u pacienta s monoklonální gamapatií.

Relativně jednoduchou metodou, která umožňuje prokázat abnormální molekulovou hmotnost těžkého řetězce, je SDS elektroforéza doplněná imunodetekcí. V našem případě jsme molekulovou hmotnost odhadli srovnáním rychlosti migrace paraproteinu s monomery a dimery volných lehkých řetězců (22,5 a 45 kDa) a transferinu (80 kDa); optimální je samozřejmě srovnání se sadou standardů o známých molekulových hmotnostech, kterými jsme však v aktuální situaci neměli k dispozici.

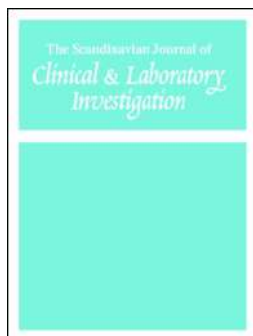
Závěr

Nemoc těžkých řetězců je vzácným onemocněním. Na jejich přítomnost poukazuje v imunofixační elektroforéze nálezy gradientu v zóně těžkých řetězců bez korelátu v zónách lehkých řetězců. Pro jejich potvrzení je nutné použít na rozdíl

od průkazu kompletní molekuly paraproteinu další pomocné metody / separační technologie, ať už SDS elektroforézu, vysokorozlišovací dvojrozměrnou elektroforézu nebo hmotnostní spektrometrii. Nález monoklonálního těžkého řetězce gama v séru studovaného pacienta souvisí s přítomností lymfomu marginální zóny, který byl prokázán z biopsie žaludku.

Literatura

- Kyle RA. The monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 1994; 40(11): 2154–2161.
- Seligmann M. Heavy chain disease. In: Multiple myeloma and other paraproteinemias. Edinburgh: Churchill Livingstone 1986: 263–285.
- Franklin EC. Structural studies of human 7S gamma-globulin (G immunoglobulin): further observations of a naturally occurring protein related to the crystallizable (fast) fragment. *J Exp Med* 1964; 120(1): 691–709. doi: 10.1084/jem.120.5.691.
- Tsunemine H, Zushi Y, Sasaki M et al. Gamma heavy chain disease (γ -HCD) as iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorder: Possible emergent subtype of rheumatoid arthritis-associated γ -HCD. *J Clin Exp Hematop* 2019; 59(4): 196–201. doi:10.3960/jslr.19025.
- Cook JR, Harris NL, Isaacson PG et al. Heavy chain diseases. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al; WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed, Lyon, IARC, World Health Organization 2017: 237–240.
- Wahner-Roedler DL, Witzig TE, Loehrer LL et al. Gamma-heavy chain disease: review of 23 cases. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82(4): 236–250. doi: 10.1097/01.md.0000085058.63483.7f.
- Fernand JP, Brouet JC, Danon F et al. Gamma heavy chain „disease”: heterogeneity of the clinicopathologic features. Report of 16 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68(6): 321–335.
- Husby G, Blichfeldt P, Brinch L et al. Chronic arthritis and gamma heavy chain disease: coincidence or pathogenic link? *Scand J Rheumatol* 1998; 27(4): 257–264.
- Zeman D, Kušnierová P, Bojková J et al. Quantitation of IgG kappa and IgG lambda in the cerebrospinal fluid by sandwich ELISA method. *J Immunoassay Immunochem* 2017; 38(2): 165–177. doi: 10.1080/15321819.2016.1233889.
- Kaleta E, Kyle R, Clark R et al. Analysis of patients with γ -heavy chain disease by the heavy/light chain and free light chain assays. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(5): 665–669. doi: 10.1515/cclm-2013-0714.
- Deighan WI, O’Kane MJ, McNicholl FP et al. Multiple myeloma and multiple plasmacytomas associated with free gamma heavy chain, free kappa light chain and IgGk paraproteins: an unusual triple gammopathy. *Ann Clin Biochem* 2016; 53(6): 706–711. doi: 10.1177/0004563216646594.
- Tichý M, Maisnar V, Stuchlík J et al. Nemoc z těžkých řetězců μ . *Klin Biochem Metab* 2007; 15(36): 78–81.
- Zushi Y, Sasaki M, Saitoh T et al. Gamma-heavy chain monoclonal gammopathy with undetermined significance (MGUS). *J Clin Exp Hematop* 2019; 59(3): 119–123. doi: 10.3960/jslr.19008.
- Thoren KL, Eveillard M, Chan P et al. Identification of gamma heavy chain disease using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem* 2020; 77: 57–61. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.12.010.



Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iclb20>

Detection of monoclonal free light chains by immunofixation electrophoresis and isoelectric focusing – comparison with the quantitative method of determination

Pavína Kušnierová , David Zeman , Kamila Revendová & Ondřej Dlouhý

To cite this article: Pavína Kušnierová , David Zeman , Kamila Revendová & Ondřej Dlouhý (2020): Detection of monoclonal free light chains by immunofixation electrophoresis and isoelectric focusing – comparison with the quantitative method of determination, Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, DOI: [10.1080/00365513.2020.1804608](https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1804608)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1804608>



Published online: 11 Aug 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 23



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ORIGINAL ARTICLE



Detection of monoclonal free light chains by immunofixation electrophoresis and isoelectric focusing – comparison with the quantitative method of determination

Pavína Kušnierová^{a,b}, David Zeman^{a,b}, Kamila Revendová^c and Ondřej Dlouhý^d

^aDepartment of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic; ^bInstitute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic; ^cFaculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic; ^dDepartment of Physics, Faculty of Natural Sciences, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

ABSTRACT

The study aimed to investigate free light chain (FLC) monoclonality in patients with an abnormal free kappa/lambda ratio (FLC ratio). Seventy serum samples with abnormal FLC ratio were examined using an immunoturbidimetry (Binding Site, SPA) and the two different enzyme-linked immunosorbent assays (1. Sebia diagnostic kit; 2. in house methods), the monoclonal or oligoclonal bands of (FLC) by immunofixation electrophoresis (IE) and isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (IEF/AIB). The reference interval was calculated by non-parametric percentile method. 5.7% of samples examined by IE were suspected of monoclonal character of FLCs, but subsequently monoclonality was refuted by more sensitive IEF/AIB method; 7%, resp. 2.9% of samples showed FLC kappa, resp. FLC lambda oligoclonal character of bands. A statistically significant dependence was found between FLC ratio (Sebia) and FLC ratio (SPA), $r_s = 0.510$, $p = .001$. Kappa statistic evaluated a fair conformity between the FLC ratio (Sebia) and IEF/AIB ($\kappa = 0.468$) and between FLC ratio (in house) and IEF/AIB ($\kappa = 0.300$). The verified reference interval for FLC ratio (Binding Site) is between 0.35 and 2.18. The IEF/AIB is the most sensitive method to discriminate between monoclonal and oligoclonal bands of FLC. The Binding Site and Sebia diagnostic kits do not give consistent results. The Binding Site diagnostic kit provides more results above reference interval of FLC ratios. For routine decision on monoclonality of the FLC ratio (SPA) it is advisable to use a verified reference interval.

ARTICLE HISTORY

Received 8 January 2020
Revised 17 July 2020
Accepted 29 July 2020

KEYWORDS

Free light chains; immunoturbidimetry; ELISA; monoclonality; oligoclonal bands

Introduction

The monoclonal gammopathy of free light chain (FLC) is a disorder associated with abnormal clonal proliferation of B lymphocytes that can lead to light chain deposition disease (LCDD), AL-amyloidosis or light chain multiple myeloma. An abnormal kappa free/lambda free ratio (FLC ratio; 99% reference interval 0.26–1.65; Binding Site) at an increased concentration of the relevant FLC type is useful for detecting these diseases [1–3]. In our previous studies involving neurological patients without other signs indicative of monoclonal gammopathy

(MG), the abnormal FLC ratio was found in approximately 11.7% (unpublished results), but only in one case, it was associated with the finding of monoclonal FLC by isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (IEF/AIB) detection.

We hypothesise that the reference intervals for FLC and especially for the FLC ratio need to be revised. We also assume that the current MG classification of free light chains leads to a significant percentage of false positives and needs to be clarified. In case of confirmation of our hypothesis in a prospective study, we will propose the introduction

of IEF/AIB as a ‘decision’ method in case of a negative finding of immunofixation electrophoresis in routine practice.

The aim of the study was to investigate free light chain monoclonality (FLC) in patients with abnormal FLC ratio and at the same time an increased concentration of the predominant type of free light chains in serum. Consecutive series of such specimens were examined by immunofixation electrophoresis and all these samples, where immunofixation electrophoresis was negative (absence of monoclonal FLC), were examined by isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (IEF/AIB).

Material and methods

The study has been approved by the Ostrava University Hospital Ethics Committee (reference number 13/2018). We examined 70 serum samples. The median age (2.5–97.5 percentile) of the entire group of subjects was 66 (25.2–83.0) years. The group consisted of 33 women (47.1%) with a median age of 66.5 (26.8–83.7) years and 37 men (52.9%) with a median age of 65 (21.8–82.6) years. FLCs were measured by immunoturbidimetry assay on SPA_{PLUS} with

Freelite Kappa SPA_{PLUS} kit and Freelite Lambda SPA_{PLUS} kit (FLC SPA), (Cat. No. LK016.L.S and LK018.L.S, respectively, The Binding Site Ltd., Birmingham, UK), by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the Sebia FLC kappa and the Sebia FLC lambda kit (FLC Sebia, Cat. No. 5100, 5101), respectively, BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Brno, Czech Republic) and by in-house ELISA method using polyclonal anti-free light chain antibodies (Cat. No. A0100 and A0101, Dako, Glostrup, Denmark) and appropriately diluted Freelite Calibrators (FLC in-house). To confirm monoclonality/oligoclonality we used immunofixation electrophoresis on Hydrasys 2^{SCAN} Focusing with Hydragel 4 IF (Cat. No. 4304, BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Brno, Czech Republic) and isoelectric focusing (IEF) in 1.2% agarose gels containing 12% sorbitol (interelectrode distance 8.5 cm, limits 200 V/cm, 100 mA, 10 W) on Multiphor II apparatus (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) at 10 °C for 1,200 Vh. Affinity immunoblotting was performed as previously described [4]. Briefly, two nitrocellulose membranes were precoated with 20 mg.L⁻¹ solution of anti-kappa and anti-lambda free light chain antibodies overnight, blocked with bovine serum albumin for 75 ± 15 min, washed and placed on the gel for 50 min. Subsequently, membranes were fixed in 0.25% glutaraldehyde solution (15 min), washed and reblocked (20 min), incubated in 4 mg.L⁻¹ solution of biotinylated anti-kappa and anti-lambda free light chain antibodies (105 ± 5 min), followed by alkaline-phosphatase streptavidin (50 min). Finally, colour reaction was developed using BCIP/NBT substrate (30 min).

Reference intervals (RI) were estimated based on the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI C28-A3) [5,6] on a group of 17 healthy probands and 142 disease controls (patients with neurological disease, but not with renal disease and hematologic malignancy). Statistical evaluation of results was performed using Excel and MedCalc software version 17.9.7 (Frank Schoonjans, Belgium).

Results

Results of qualitative analyses by serum protein electrophoresis (SPE), immunofixation electrophoresis (IE) and isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (IEF/AIB) are shown in Table 1 and Figure 1. Descriptive characteristics of the studied biochemical markers are provided in Table 2. Statistically significant relationship was not found between the individual FLC ratios using the Passing-Bablok regression analysis. Furthermore, the correlation between

the individual FLC ratios was evaluated using the nonparametric Spearman's correlation coefficient. A statistically significant correlation was found between FLC ratio (Sebia) and FLC ratio (SPA) using the nonparametric Spearman's correlation coefficient ($r_s = 0.510$, $p = .001$), Figure 2, Table 3.

Kappa statistic was used to compare methods based on clinical interpretation because the methods have different reference intervals, Table 4. A slight conformity was demonstrated between FLC ratio (SPA) and FLC ratio (in house) (kappa = 0.199) and FLC ratio (Sebia) and FLC ratio (in house) (kappa = 0.202).

The comparison of these qualitative results (positive/negative ratios) with the interpretation of isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (presence/absence of monoclonal or oligoclonal bands) showed the fair conformity between the FLC ratio (Sebia) and IEF/AIB (kappa = 0.384) and between FLC ratio (in house) and IEF/AIB (kappa = 0.300).

The reference interval for FLC ratio (The Binding Site) was verified, for healthy persons it was between 0.29 and 1.93; for disease controls between 0.35 and 2.18, Table 5. At the same time, since both 90% confidence intervals include the values of both estimates (robust and non-parametric method, respectively), it can be shown that the given estimates are not statistically different.

Discussion

In 2001 Bradwell et al. [9] developed a new, sensitive and fully automated immunoassay for FLC measurements on the IMMAGE protein analyzer (Beckman Coulter). Subsequently, these tests referred to as 'Freelite' (The Binding Site) were introduced into clinical practice for the diagnosis and follow-up of patients with monoclonal gammopathies in serum and urine on IMMAGE, SPA_{PLUS}, BN II and other biochemical analyzers.

Over time, other diagnostic kits have also appeared on the market, allowing the determination of serum free light chains, but results obtained by different diagnostic kits often provide incomparable results.

The fundamental problem is the absence of a primary standard. The source of most commercially available purified FLCs are the serums or urine of paraproteinemia patients or Bence Jones paraproteinuria. The Binding Site's primary standards are light chains purified from intact immunoglobulins by reductions and acetylations. By contrast, Sebia's diagnostic kit, which has been used for comparative measurements (ELISA determination), uses

Table 1. Results of qualitative analyses by serum protein electrophoresis (SPE), immunofixation electrophoresis (IE) and isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (IEF/AIB).

Methods	Number of negative results (%)	Number of positive results (%)	Interpretation of positive results	Detection limit
SPE	70 (100)	0 (0)	Presence of monoclonal immunoglobulin	0.21–0.44 g.L ⁻¹ (*)
IE	66 (94.3)	4 (5.7)	Presence of monoclonal immunoglobulin/oligoclonal profile	0.12–0.25 g.L ⁻¹ (*)
IEF/AIB	59 (84.3)	9 (12.8)	Oligoclonal FLC kappa	0.1 mg.L ⁻¹
		2 (2.9)	Oligoclonal FLC lambda	0.2 mg.L ⁻¹

(*) the value of the detection limit is given depending on the location of the monoclonal component and the level of the polyclonal background in the gamma zone.

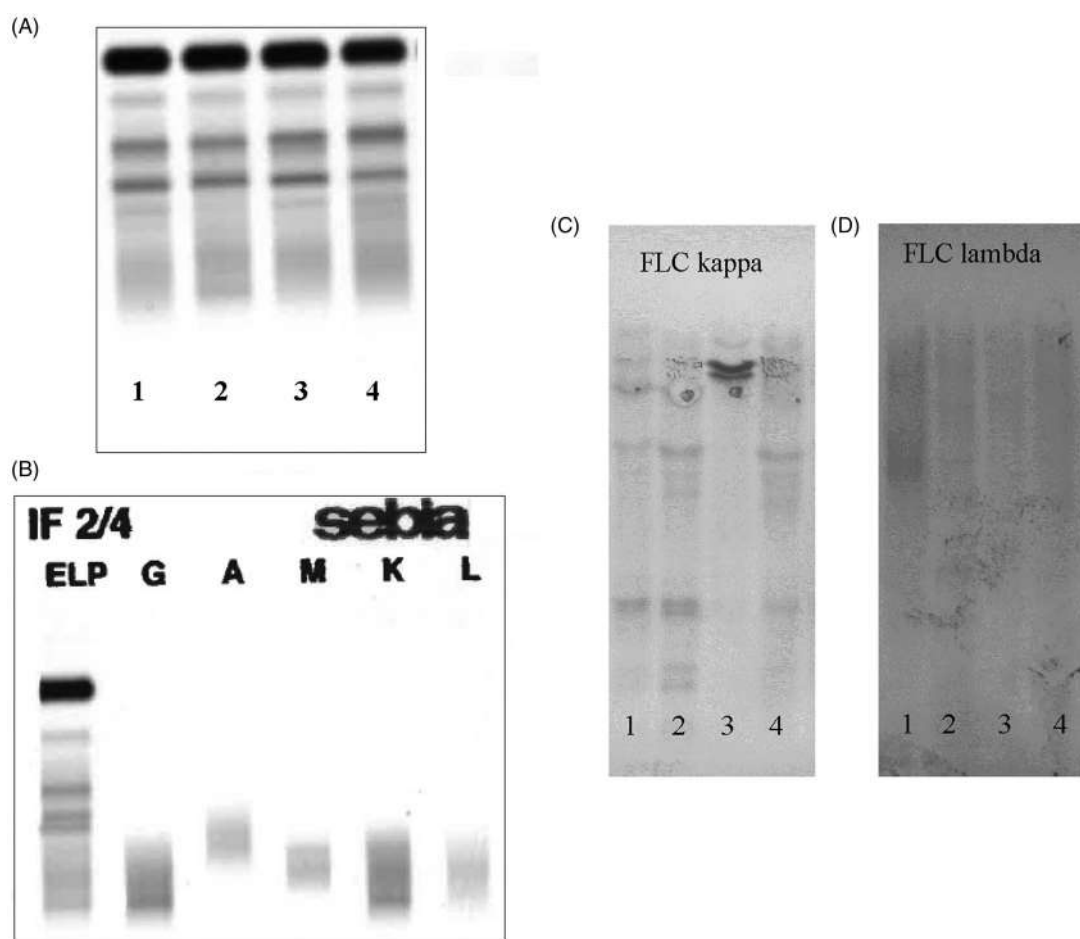


Figure 1. Demonstration of serum protein electrophoresis (A), immunofixation electrophoresis (B) and isoelectric focusing followed by affinity immunoblotting (C,D). (A) Undiluted serum samples 1-4. In samples No. 2 - migratory microheterogeneity of the gamma fraction was observed but no monoclonal immunoglobulin demonstrated. This sample was then subjected to immunofixation electrophoresis with the finding of an oligoclonal profile, which was also confirmed by the IEF/AIB (oligoclonal FLC kappa) method. Samples 1,3-4 with a negative finding were included in the study. (B) Result of immunofixation electrophoresis with antisera IgG, IgA, IgM, kappa and lambda with finding of oligoclonal profile. Serum samples were diluted 6x for reaction with IgG antiserum, traces of ELP and other antisera diluted 3x. (C) IEF/AIB of FLC kappa of 4 serum samples. Serum samples were diluted 1/80 (which translates into the detection limit of $\leq 8 \text{ mg.L}^{-1}$ for kappa FLC and $\leq 16 \text{ mg.L}^{-1}$ for lambda FLC). Sample No. 1, 2 and 4 = presence of oligoclonal FLC kappa bands. Sample No. 3 = presence of monoclonal FLC kappa bands, this sample was excluded from the study. (D) IEF/AIB of FLC lambda of 4 serum samples. The dilution was the same as in point C. All samples were negative for oligoclonal FLC lambda bands.

Table 2. Descriptive characteristics of the studied group ($n = 70$).

	Minimum	Maximum	Mean	Median	SD	Shapiro-Wilk test normality (p Value)
Age	19.0	84.0	62.8	66.0	15.8	.0027
Crea ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	57	127	79.8	80.0	14.66	.0057
eGFR (CKD-EPI) (ml.min^{-1})	61.2	130.8	87.36	85.8	16.5	.0150
FLC kappa (SPA)	8.790	301.940	51.180	34.725	48.131	<.0001
FLC kappa (Sebia)	9.941	213.762	38.036	33.867	29.370	<.0001
FLC kappa (in house)	12.020	397.550	60.134	49.177	54.116	<.0001
FLC lambda (SPA)	5.070	144.170	25.373	17.190	21.585	<.0001
FLC lambda (Sebia)	9.370	114.043	31.360	28.510	15.526	<.0001
FLC lambda (in house)	4.225	202.180	41.249	37.631	32.787	<.0001
FLC ratio (SPA)	1.246	4.056	1.980	1.868	0.507	<.0001
FLC ratio (Sebia)	0.544	4.314	1.178	1.079	0.484	<.0001
FLC ratio (in house)	0.601	4.506	1.593	1.454	0.580	<.0001

Crea, creatinine; eGFR, estimation of glomerular filtration rate according to CKD-EPI; SPA, turbidimetry using SPA_{PLUS} analyzer and a diagnostic kit from Binding Site; Sebia, ELISA using a diagnostic kit from Sebia; in house, an in house ELISA method.

standard solutions prepared from a pool of human serums. Of course, the consequence of using different primary standards is different normal serum values. In 2003, Nakano and Nagata [10] published physiological values of FLC kappa and FLC lambda, using samples obtained from

purification of FLC from a myeloma patient as primary standards.

The mean values obtained from 50 healthy volunteers were around $25.7 \pm 10.5 \text{ mg.L}^{-1}$ for FLC kappa, $4.34 \pm 2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ for FLC lambda and 6.25 ± 1.80 for FLC

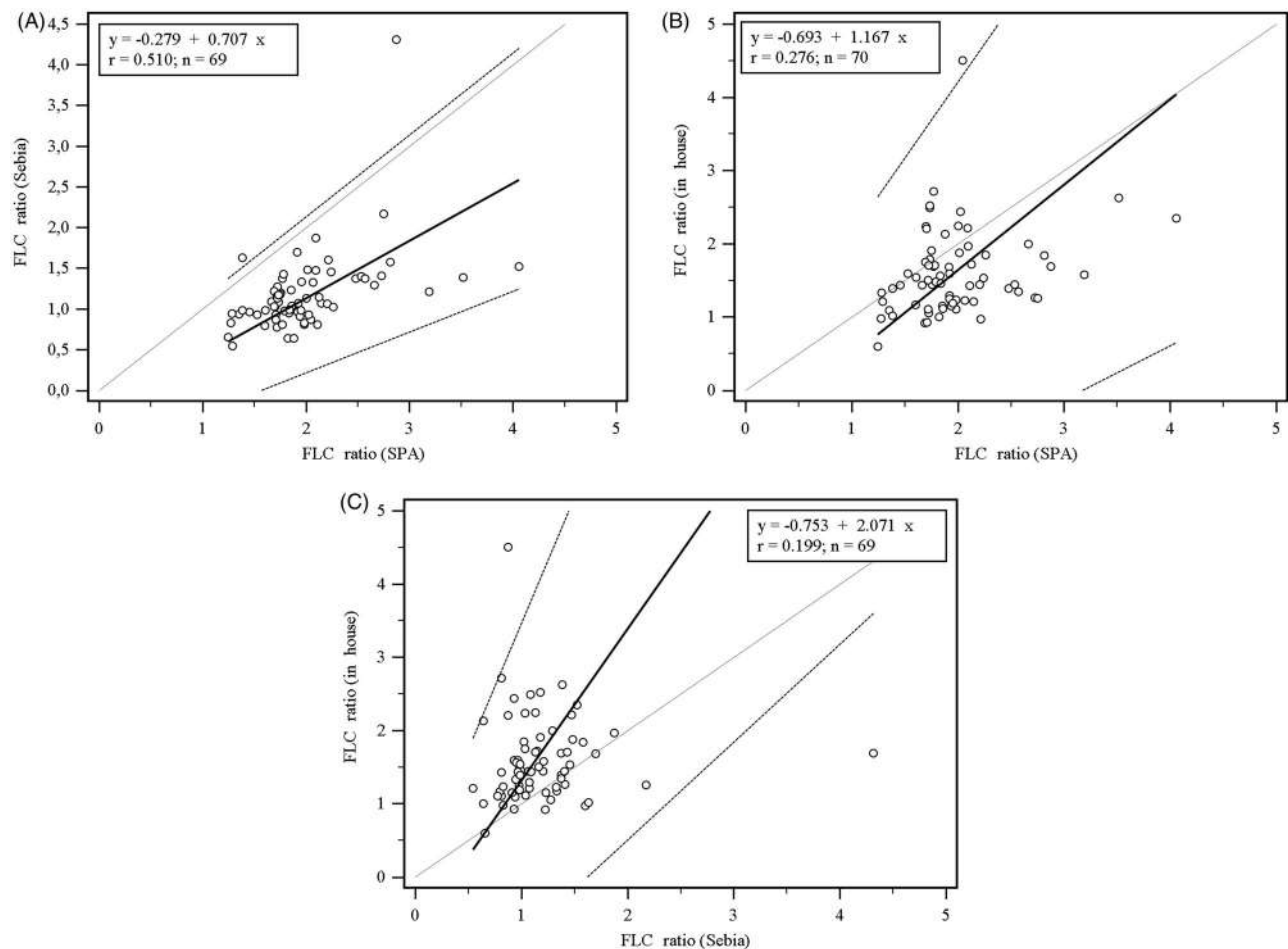


Figure 2. Correlation analysis between FLC ratio (SPA) and FLC ratio (Sebia) (A), FLC ratio (SPA) and FLC ratio (in-house) (B) and FLC ratio (Sebia) and FLC ratio (in-house) (C).

Table 3. The distribution of the correlations between the FLC ratios using the different diagnostic kits.

Methods	FLC ratio (SPA)	FLC ratio (Sebia)	FLC ratio (in house)
FLC ratio (SPA)			
r_s		0.510	0.276
P		<0.0001	0.0208
n		69	70
FLC ratio (Sebia)			
r_s	0.510		0.199
P	<0.0001		0.1019
n	69		69
FLC ratio (in house)			
r_s	0.276	0.199	
P	0.0208	0.1019	
n	70	69	

r_s ... Spearman rank correlation coefficient.

ratio, respectively. In addition, a year later the same authors published work [11] in which they used the same standards (monoclonal) but different methods of determination, ELISA with two specific anti- FLC antibodies and obtained completely different normal values, FLC kappa $3.11 \pm 1.18 \text{ mg.L}^{-1}$, FLC lambda $2.30 \pm 1.03 \text{ mg.L}^{-1}$ and FLC ratio 1.65 ± 1.23 . In 2006, Nakano T. *et al.* proposed, as the primary standard, using a sample obtained by purifying polyclonal FLCs from human urine [12]. This way, they estimated again different normal values for FLC kappa

$43.5 \pm 12.0 \text{ mg.L}^{-1}$, for FLC lambda $55.2 \pm 17.9 \text{ mg.L}^{-1}$ and for FLC ratio 0.90 ± 0.23 .

Cross-reactivity of light chain-linked antibodies may be another problem in the determination of FLC, potentially leading to significant overvaluation of FLC in biological material. [13]. At the same time, some antibodies used in FLC tests detect FLC dimers better than monomers, while the degree of FLC dimerisation may change under pathological conditions [14]. Moreover, all FLC tests were primarily developed to assist in the diagnosis and monitoring of plasma cell dyscrasia, while their determination in other indications was not sufficiently validated. Thus the different diagnostic kits to determine FLCs, not surprisingly, provide different results. In our study, we tried to interpret the laboratory data according to the reference intervals given to a particular diagnostic kit manufacturer and then compare the results with each other according to the Kappa statistics. However, even in this case we did not arrive at the same clinical interpretation of the finding. That is why we have resorted to the intention of subjecting all samples with pathological FLC ratio to immunofixation electrophoresis and even more sensitive detection of monoclonal bands by the isoelectric focusing method followed by affinity immunoblotting. We concluded that most of these positive FLC ratios obtained using the method from The Binding Site, as well as from Sebia, are false positive.

Table 4. Comparison of methods based on the conformity of clinical interpretation using Kappa statistics.

	FLC ratio (SPA) vs FLC ratio (SEBIA)	FLC ratio (SPA) vs FLC ratio (in house)	FLC ratio (Sebia) vs FLC ratio (in house)	FLC ratio (SPA) vs IEF/AIB (oFLC kappa)	FLC ratio (Sebia) vs IEF/AIB (oFLC kappa)	FLC ratio (in house) vs IEF/AIB (oFLC kappa)
Kappa statistics	0.0283	0.199	0.202	0.060	0.384	0.300
95% CI	−0.044 to 0.101	0.080 to 0.317	−0.010 to 0.414	0.011 to 0.110	0.089 to 0.679	0.092 to 0.508
Standard error	0.037	0.061	0.108	0.0251	0.150	0.106

The upper reference interval was used for classification into 'positive' and 'negative' groups, respectively. For FLC ratio (SPA) > 1.65 [1]; for FLC ratio (Sebia) > 1.44 [7–8]; for FLC ratio (in house) > 1.65 due to calibration to standard Binding Site (SPA); oFLC, oligoclonal FLC.

Table 5. Estimation of reference interval of FLC kappa, FLC lambda and FLC ratio for SPA (The Binding Site) according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI C28-A3).

Method	n	2.5th	90th confidence interval	97.5th	90 th confidence interval	Type of calculation
FLC kappa	17	6.27	3.73–8.80	20.36	17.82–22.89	Robust method
	142	5.42	4.88–6.47	33.74	29.04–44.90	Non-parametric percentile method
FLC lambda	17	7.42	4.90–9.95	37.27	27.13–47.42	Robust method
	142	3.62	2.97–4.61	42.36	37.24–49.99	Non-parametric percentile method
FLC ratio	17	0.29	0.19–0.39	1.93	1.60–2.26	Robust method
	142	0.35	0.24–0.48	2.18	1.99–2.81	Non-parametric percentile method

Therefore, it would be appropriate to use adjusted FLC ratio values for routine analysis. The normal FLC ratio values we obtained were from healthy probands and patients with various neurological diseases, but without evidence of kidney damage or proven haematological malignancies. However, in conclusion, it should be noted that if such complicated methods of determination are used, in each laboratory we should resort to verify the reference intervals of the method using specific standard material on the analyser.

Two aspects of our study could be considered as its weaknesses. First, our assumption that the distinction between monoclonal and oligoclonal FLC is always possible using IEF/AIB might not be true in exceptional cases. However, both the strong intensity and limited number of monoclonal bands enable the differentiation from less intense and often more numerous oligoclonal bands in most cases. In addition, we verified agarose IEF/AIB results with polyacrylamide IEF/AIB that we use for cerebrospinal fluid oligoclonal FLC detection since 2019 [15] with identical results. Second, all serum samples could be diluted to the same FLC concentration for IEF/AIB analysis to enable more exact assessment instead of using the same arbitrary dilution 1/80. However, we considered this approach (used neither for SPE nor IE) too complicated to be used in routine practice.

Conclusion

Two commercially available diagnostic kits, the Binding Site and Sebia do not give consistent results. The Binding Site diagnostic provides more results above reference interval of FLC ratios. For routine decision on monoclonality of the FLC ratio (SPA) it is advisable to use the verified reference interval.

Acknowledgments

The authors thank the laboratory technicians L. Fürstová, I. Faruzelová, R. Malečková, R. Výtisková, and B. Strakošová for their

expert technical assistance. The authors thank Ing. F. Všianský for help with the statistical analysis.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding

The study was supported by University of Ostrava, Faculty of Medicine, Czech Republic [project number SGS06/LF/2018-2019].

References

- [1] Katzman JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem*. 2002;48(9):1437–1444.
- [2] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15:538–548.
- [3] Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Clin Biochem*. 2018;51:38–47.
- [4] Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, et al. Assessment of intrathecal free light chain synthesis: Comparison of different quantitative methods with the detection of oligoclonal free light chains by isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166556.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. CLSI document C28–A3. 3rd ed. Wayne: PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- [6] Pavlov IY, Wilson AR, Delgado JC. Resampling approach for determination of the method for reference interval calculation in clinical laboratory practice. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17(8):1217–1222.
- [7] Sebia FLC. kappa (REF 5100), Parc Technologique Léonard de Vinci (France). Version: 2017/11.
- [8] Sebia FLC. lambda (REF 5101), Parc Technologique Léonard de Vinci (France). Version: 2017/11.

- [9] Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem*. 2001;47(4):673–680.
- [10] Nakano T, Nagata A. ELISAs for free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2003;275(1-2):9–17.
- [11] Nakano T, Nagata A. ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity by using two specific antibodies in a sandwich detection method. *J Immunol Methods*. 2004;293(1-2):183–189.
- [12] Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H, et al. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(5):522–532.
- [13] Robson E, Mead G, Bradwell A. To the editor: In reply to Nakano et al. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(5): 522–532. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(2):264–265.
- [14] Kaplan B, Livneh A, Sela BA. Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *Sci World J*. 2011;11:726–735.
- [15] Zeman D, Kušnierová P, Hradílek P, et al. Oligoclonal IgG and free light chains – comparison between agarose and polyacrylamide isoelectric focusing. *Cesk Slov Neurol N*. 2019;82/115(1):68–75.



Quantitation of IgG kappa and IgG lambda in the cerebrospinal fluid by sandwich ELISA method

David Zeman^{a,b}, Pavlína Kušnierová^c, Jana Bojková^d, František Všianský^c, and Olga Zapletalová^b

^aInstitute of Laboratory Diagnostics, Fakultni Nemocnice Ostrava, Ostrava, Czech Republic; ^bClinic of Neurology, Fakultni Nemocnice Ostrava, Ostrava, Czech Republic; ^cDepartment of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, Ostrava, Czech Republic; ^dInstitute for Healthcare Disciplines, St. Elizabeth University College of Health and Social Work in Bratislava, Bratislava, Slovakia

ABSTRACT

IgG kappa and IgG lambda concentrations were quantified in 96 paired CSF and sera using Hevylite™ antibodies in an in-house developed sandwich ELISA method. In 56 of these samples, the results were compared with a qualitative isoelectric focusing/affinity-mediated immunoblotting assay for oligoclonal IgG kappa and IgG lambda. Normal IgG kappa/lambda ratio in the CSF was the same as in serum. In 19/33 patients with intrathecal oligoclonal IgG synthesis, skewed IgG kappa/lambda ratio was observed (increased in 16 and decreased in 3 cases). The analysis of light chain composition of intrathecally synthesised immunoglobulins could contribute to our understanding of intrathecal humoral immune response, although its diagnostic utility is limited.

KEYWORDS

cerebrospinal fluid;
immunoglobulins;
kappa/lambda ratio; ELISA;
isoelectric focusing

Introduction

Already in 1970, altered cerebrospinal fluid (CSF) kappa/lambda ratios were described and suggested as a marker of intrathecal immunoglobulin synthesis in patients with multiple sclerosis (MS).^[1,2] Although in some MS patients, free kappa light chain concentrations reach values around 10 mg/L and could thus significantly contribute,^[3] mainly light chains bound in IgG can be anticipated to account for the disturbed kappa/lambda ratios observed since IgG is the most abundant immunoglobulin in CSF as well as in serum. Indeed, Araga et al. developed an ELISA system for the measurement of the kappa/lambda ratios in IgG, IgA, and IgM demonstrated abnormal IgG but not IgA or IgM kappa/lambda ratios in patients with multiple sclerosis.^[4] Unfortunately, their work did not receive wider attention, and it was not until 2009 when Bradwell et al. published a method of heavy/light chain pairs detection in the serum of patients with monoclonal gammopathies^[5] than new interest arose in individual Ig-bound light chain measurement.

CONTACT David Zeman ✉ david.zeman@fno.cz ✉ Institute of Laboratory Diagnostics and Clinic of Neurology, Fakultni Nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, Ostrava 70852, Czech Republic.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/ljii.

© 2016 Taylor & Francis

While we studied free light chain qualitative and quantitative profiles in the CSF,^[3] we decided to decipher whether similar changes in kappa/lambda ratios involve light chains bound in IgG. Our principal goal was to develop a quantitative method in hope that it might be more suitable for detection of a skewed IgG kappa/lambda ratio than a qualitative method (IEF/AIB) that can reveal only a gross abnormality.^[6,7]

Experimental

Samples

96 paired CSF and serum samples were studied by Hevylite ELISA. In 56 of these samples, oligoclonal IgG kappa and IgG lambda analysis was performed as well. Samples were selected from our larger study^[3] based on the availability of the material and to ensure comparable proportion of o-IgG positive and o-IgG negative samples (1:2 for quantitative and 1:1 for qualitative studies). Overall, 63 o-IgG negative and 33 o-IgG positive patients were studied. The diagnoses in the o-IgG positive group comprised multiple sclerosis (MS, $n = 7$), clinically isolated syndrome (CIS, $n = 17$), other inflammatory neurological diseases (OIND, $n = 3$), non-inflammatory neurological diseases (NIND, $n = 3$) and uncertain or unknown diagnoses ($n = 3$). In the o-IgG negative group, the diagnoses were MS ($n = 3$), CIS ($n = 4$), OIND ($n = 7$), NIND ($n = 30$), symptomatic controls according to the recent consensus proposal definition^[8] (patients with symptoms for which no organic cause could be discerned on thorough neurological evaluation; $n = 7$) and uncertain or unknown diagnoses ($n = 12$). Six CIS patients progressed to clinically definite MS during the time of the study; all of them were o-IgG positive. The study was approved by the local Ethics committee (Reference number 319/2014).

Routine albumin and IgG analysis was performed by nephelometry on BN ProSpec analyser (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, USA). Oligoclonal IgG was detected by means of isoelectric focusing followed by immunofixation (IEF/IF) using dedicated Sebia kit (Cat. No. 4355) on Hydrasys 2 instrument (Sebia, Évry Cedex, France). Oligoclonal free light chains (fLC) were detected by affinity-mediated immunoblotting after IEF (IEF/AIB) on Multiphor II apparatus as described earlier.^[6,7]

Reagents

Unlabeled sheep anti-human IgG kappa and IgG lambda (Hevylite™) antibodies were kindly donated for research use by The Binding Site Ltd. (Birmingham, United Kingdom). These antibodies were diluted with phosphate-buffered saline (PBS) to 1 g/L, exchanged into PBS using 5 mL Zeba Spin Desalting Columns (Cat. No. 89891) and biotinylated using EZ-Link NHS-PEG₄-Biotinylation Kit

(Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, Cat. No. 21455; the kit contains both PBS and desalting columns mentioned above). Average number of biotin molecules per protein molecule was determined using the 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA) assay using reagents supplied in the kit according to manufacturer's instructions.

Calibrators and controls from Hevylite Human IgG Kappa (Cat. No. NK621.S) and Lambda (Cat. No. NK622.S) kits for use on the SPA_{PLUS} (The Binding Site Ltd.) were prediluted 1/200 in PBS-0.05% Tween 20 (PBST)-0.2% bovine serum albumin (BSA; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany, Cat. No. 11924) and stored in aliquots frozen at -70°C. Calibrators 1-5 were used at 1/20,000 dilution; additionally, calibrator 1 was diluted to 1/40,000 to be used as the lowest calibrator of the assay.

Goat anti-human IgG Fc antibody was purchased from AbD Serotec (Oxford, UK, Cat. No. 5211-8004). ELISA-grade peroxidase conjugated (Cat. No. SA-5014), alkaline phosphatase conjugated (Cat. No. SA-5100) streptavidin as well as BCIP/NBT substrate kit (Cat. No. SK-5400) were from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). TMB One-Step Substrate System (Cat. No. S159985) was from DAKO (Glostrup, Denmark).

IgG kappa and IgG lambda ELISA

Each well of MaxiSorp 96 ELISA plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark, Cat. No. 442404) was coated with 110 µL of anti-human IgG Fc antibody diluted to 0.5 mg/L in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5 ± 0.1). Plates were covered with Parafilm sheet to prevent evaporation and stored at 4°C for 16–48 hr. After decantation, wells were washed twice with 350 µL of PBST and blocked with 1% BSA in PBST for 90 minutes. Next, the wells were washed four times with PBST, and samples, standards and controls were applied in duplicates. CSF and serum samples were diluted in PBST-0.2% BSA according to the total IgG concentration; usual dilution was 1/2,000 (in two consecutive steps) for CSF and 1/1,000,000 (in three steps) for serum. After 90 min incubation and washing as described above, biotinylated IgG kappa and IgG lambda antibodies were applied, diluted 1/10,000. After 75 min incubation and washing, ELISA grade HRP streptavidin diluted 1/900 was applied and plates were left for 40 minutes. Finally, TMB One-Step Substrate was used for visualisation, and the reaction was stopped after 15 min with 50 µL of 1M sulphuric acid. The plates were read in DSX ELISA automatic analyzer (Dynex, Buštěhrad, Czech Republic) at 450/620 nm. IgG kappa and IgG lambda concentrations were calculated from the mean optical density of the duplicates using a 4-parameter calibration curve constructed by the analyser software. CSF and serum IgG kappa/lambda ratios were then calculated, as well as CSF/Serum quotient of these ratios (referred to as Q-ratios in the following text).

Both high and low serum controls from the kits were analysed. In addition, we analyzed intravenous immunoglobulin preparations (Flebogamma, Instituto Grifols, Barcelona, Spain; Gamunex 10%, Grifols Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany; and Kiovig, Baxter, Austria) with a known concentration of IgG (50 g/L in Flebogamma and 100 g/L in Gamunex and Kiovig, respectively).

o-IgG kappa and IgG lambda test

The method has been described previously;^[6] only minor modifications were introduced since the original description. Briefly, Sartorius nitrocellulose membranes (pore size 0.45 μ m, Cat. No. 11306-41BL, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) were coated with anti-human IgG Fc antibody diluted to 10 mg/L in TBS. After washing, membranes were blocked with 3% BSA and washed twice in TBS. Samples were diluted to 2 mg/L IgG with 0.75% saline and subjected to IEF (limits 1200 Vh, 1700 V, 100 mA, 10 W). After IEF, membranes were laid over the gel, followed by one sheet of filter paper pre-wetted in TBS and 8 sheets of dry filter paper, a glass plate and a weight (approximately 1 kg). Affinity-mediated blotting was carried out for 50 minutes. Then, membranes were washed in PBS, and proteins were fixed in 0.25% glutardialdehyde in PBS for 15 min. After thorough washing with distilled water and three changes of TBS, membranes were re-blocked in 0.3% BSA for 20 min. Biotinylated Hevylite IgG kappa and lambda antibodies were diluted 1/500 and applied to the membrane for 90 min. Finally, alkaline phosphatase streptavidin diluted 1/750 was applied for 50 min and the proteins were visualized using BCIP/NBT reagent. Membranes were evaluated by visual inspection. CSF samples containing at least two bands absent in serum (or clearly fainter in serum than in CSF) were considered as positive. Predominance of the particular light chain type was assessed visually, taking into account both number and intensity of CSF-restricted bands.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using MedCalc Statistical Software version 14.12.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014).

Results and discussion

Methodological aspects

Using approximately 22 molar fold excess of biotin (110% of the amount recommended by the manufacturer), we have obtained average number of

2.2 biotin molecules per anti-IgG kappa and 2.4 per IgG lambda molecule, respectively.

Typical examples of calibration curves of our ELISA method are shown in Figure 1. Declared values as well as mean and standard deviations of the measured values of the control samples are shown in Table 1. Coefficients of variation (CV) for low and high control, Flebogamma, Gamunex and Kiovig were 15.0%, 15.8%, 17.7%, 4.2%, and 1.4% for IgG kappa; 4.4%, 9.7%, 14.9%, 8.3%, and 0.7% for IgG lambda, and 8.3%, 11.7%, 12.8%, 5.4%, and 0.7% for the sum of IgG kappa and IgG lambda, respectively. For IgG kappa, bias was +15.2% and -5.2% and for IgG lambda, -20.7% and -12.3% for low and high controls, respectively. For the sum of IgG kappa and IgG lambda compared to the total IgG concentration declared, bias was -5.0% for Flebogamma, -7.0% for Gamunex, and -5.7% for Kiovig.

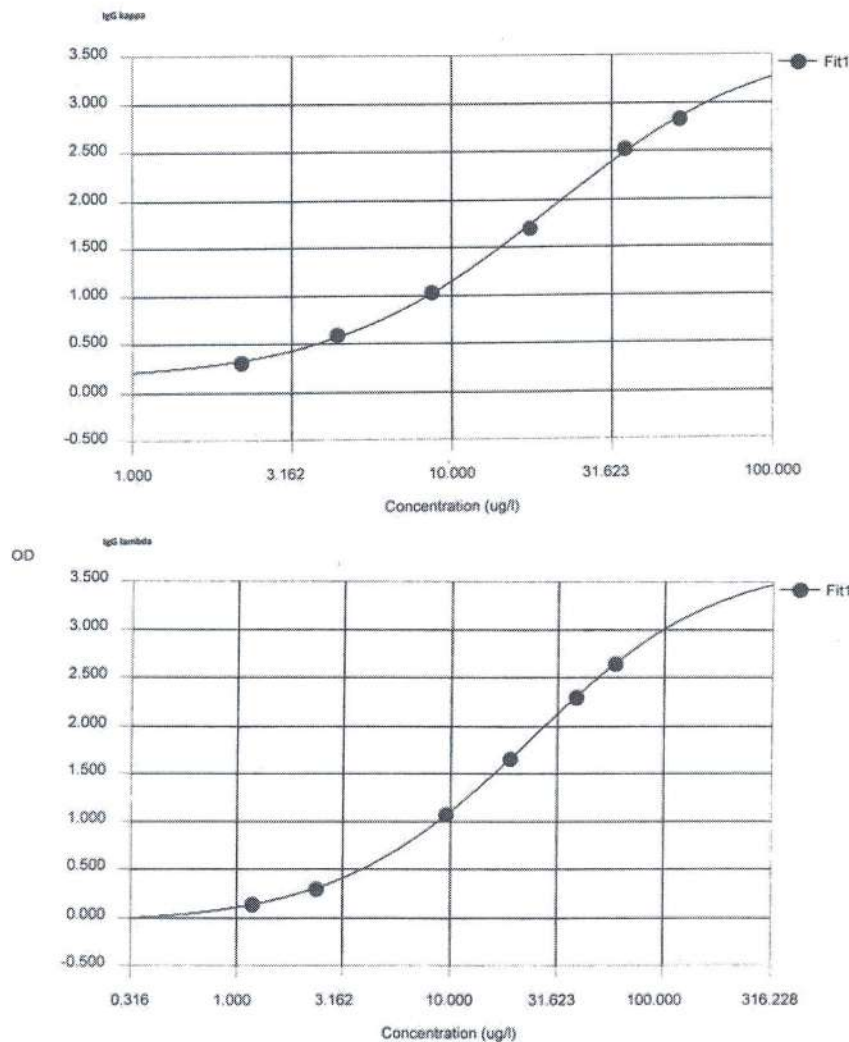


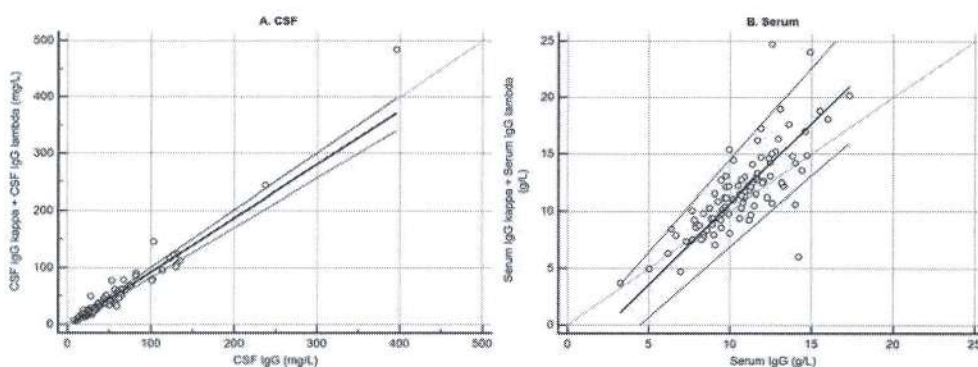
Figure 1. Examples of the calibration curves of the ELISA IgG kappa and IgG lambda assay.

Table 1. Declared and measured values of control samples.

		Low control (n = 8)	High control (n = 9)	Flebogamma (n = 9)	Gammunex (n = 3)	Kiovig (n = 2)
Declared values (g/L)	IgG kappa	3.776 (3.210–4.342)	15.109 (12.843–17.375)	n.a.	n.a.	n.a.
	IgG lambda	3.307 (2.811–3.803)	10.191 (8.663–11.719)	n.a.	n.a.	n.a.
	IgG kappa + IgG lambda	n.a.	n.a.	50	100	100
Measured values (g/L): mean (SD)	IgG kappa	4.352 (0.654)	14.318 (2.259)	31.708 (5.611)	64.656 (2.693)	63.207 (0.861)
	IgG lambda	2.621 (0.116)	8.939 (0.865)	15.768 (2.354)	28.331 (2.340)	31.111 (0.205)
	IgG kappa + IgG lambda	6.995 (0.580)	23.256 (2.720)	47.476 (6.091)	92.987 (5.029)	94.318 (0.656)

Note. n.a., not applicable; SD, standard deviation.

Passing-Bablok regression (Figure 2) revealed no significant differences between the sum of IgG kappa + IgG lambda and total IgG CSF concentrations (in mg/L; intercept -2.854, 95% confidence interval [CI] -4.577 to -0.558; slope 0.947, 95% CI 0.871 to 1.007; relative standard deviation [RSD] 10.942) but both systematic as well as proportional differences for serum concentrations (in g/L; intercept -3.496, 95% CI -5.590 to -1.707; slope 1.416, 95% CI 1.246 to 1.623; RSD 1.425). The comparison for serum was slightly worse than published by the manufacturer^[5] as well as our group^[9] for original serum Hevylite IgG assay. Nevertheless, serum IgG kappa: IgG lambda ratios measured in our study are in perfect agreement with Hevylite reference intervals published so far.^[10] Later on, we used the opportunity to compare the results of IgG kappa and IgG lambda quantification by our ELISA with those of routine determination using dedicated assay on SPA_{PLUS} in 26 serum samples (20 of them with known IgG paraprotein). Passing-Bablok regression did not reveal significant differences and the overall correlation was very good. Spearman's rho was 0.944 (95% CI 0.870–0.976) for IgG kappa, 0.975 (95% CI, 0.942–0.989) for IgG lambda and 0.986 (95% CI, 0.967–0.994) for IgG kappa:IgG lambda ratio.

**Figure 2.** Passing-Bablok regression lines for CSF (A) and Serum (B) ELISA IgG kappa and IgG lambda assays compared with total IgG measurements.

Concerning IEF/AIB method, minor modifications were introduced compared to our previous report.^[6] While evaluating the method for the purpose of detection of low concentrations of IgG paraproteins in serum and urine, it was shown that decreasing the coating antibody concentration from 20 to 10 mg/L or use of Sartorius nitrocellulose membranes instead of AmershamTM ProtranTM Premium membranes (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England, UK, Cat. No. 10600003) has no impact on the quality of the results for IgG, IgG kappa, and IgG lambda. In addition, both sides of these membranes gave equivalent results.^[11]

IgG kappa/lambda ratios in paired CSF and serum samples

In a group of o-IgG negative samples, the mean CSF IgG kappa/IgG lambda ratio was 1.814 (95% CI, 1.705–1.924) in the CSF and 1.828 (95% CI, 1.719–1.938) in serum. The mean value of the quotient of the ratios was 0.999 (95% CI, 0.972–1.025). In a group of o-IgG positive samples, CSF IgG kappa/lambda ratio as well as Q-ratios were significantly higher (Welch test, $P = 0.0047$ and $P = 0.0026$, respectively) while there was no difference in the serum IgG kappa/lambda ratio between the two groups (independent samples t-test, $P = 0.2727$). See Table 2 for detailed comparison and Figure 3 displaying Q-ratios in individual paired CSF and serum samples.

Considering 2.5 and 97.5 percentiles of the o-IgG negative group to be an estimate of the reference intervals, 13/33 o-IgG positive samples displayed altered CSF IgG kappa/lambda ratio (increased in 11 and decreased in 2). Alteration of the Q-ratios was detected in 19/33 o-IgG positive samples (increased in 16 and decreased in 3 cases) and thus proved to be more sensitive than assessment of IgG kappa/lambda ratio in the CSF only. It is

Table 2. IgG kappa/IgG lambda ratios in the CSF and serum, and quotient of the ratios in o-IgG negative and o-IgG positive patients.

	CSF		Serum		Q-ratios	
	o-IgG negative	o-IgG positive	o-IgG negative	o-IgG positive	o-IgG negative	o-IgG positive
n	63	33	63	33	63	33
Range (minimum – maximum)	0.856–3.062	0.857–10.333	0.962–3.219	1.058–2.637	0.393–1.186	0.495–5.026
Interquartile range	1.552–2.077	1.482–3.689	1.533–2.067	1.454–1.850	0.961–1.041	0.943–2.544
Median	1.765	2.045	1.795	1.738	0.998	1.096
Mean	1.814	3.061	1.828	1.731	0.999	1.762
SD	0.436	2.341	0.435	0.361	0.107	1.235

Note. CI, confidence interval; SD, standard deviation.

Estimated reference ranges of the IgG kappa/IgG lambda ratios, based on the calculated 2.5 and 97.5 percentiles in the o-IgG negative group, were 0.91–2.80 for CSF, 1.10 – 2.82 for serum and 0.80–1.16 for Q-ratios.

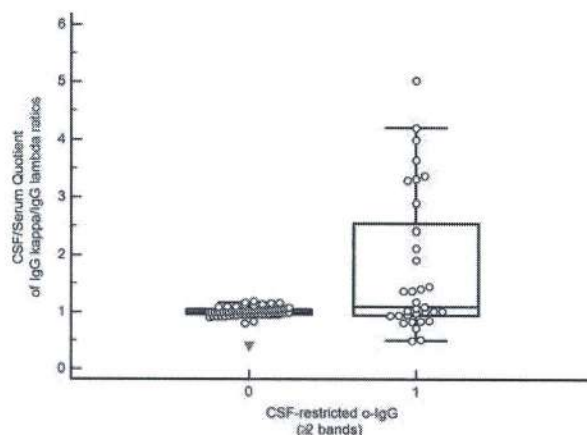


Figure 3. CSF/Serum Quotient of IgG kappa/lambda ratios in o-IgG negative ($n = 63$) and o-IgG positive ($n = 33$) group. It can be seen that all values in the o-IgG negative group except for one outlier are very close to 1.0 as theoretically expected.

of note that 1 of the 3 cases with decreased Q-ratios had MS and the other 2 had clinically isolated syndrome (CIS; one of them progressed to definite MS during the study). All of them had both IgG kappa and IgG lambda and both free kappa and free lambda CSF-restricted bands with no obvious preponderance of lambda chain on immunoblots. The only patient in whom free light chains were quantitated had, however, also an unusually low Q-ratios for FLC (0.317). Increased Q-ratios were detected in MS and CIS patients, but also in 1 patient with meningoencephalitis and 2 patients with neoplastic meningitis. It can be concluded that both elevated as well as decreased CSF IgG kappa/IgG lambda ratio compared to that in serum could be used as a sign of intrathecal Ig synthesis. Nevertheless, a substantial proportion of patients producing similar amounts of IgG kappa and IgG lambda could escape such detection.

Qualitative assessment of o-IgG kappa predominance was performed on 26 samples positive for o-IgG kappa and/or o-IgG lambda. An example of the IEF/AIB results is shown in Figure 4. We observed o-IgG kappa predominance in 11/26 cases and approximately equal proportions of o-IgG kappa and o-IgG lambda production in 13/26 cases. In the two remaining cases, only 3 and 2 o-IgG lambda bands were seen while CSF-restricted o-IgG kappa were not detected. All 11 patients with o-IgG kappa predominance had elevated Q-ratios (range, 1.370–4.209; median 3.297) while only 3/15 patients without o-IgG kappa predominance had elevated Q-ratios (range 1.180–1.914). We have also found significant correlation between oligoclonal IgG kappa and free kappa light chain predominance (Table 3).

No difference in Q-IgG kappa/lambda ratios was observed between 13 MS (7 plus 6 CIS patients that progressed into definite MS shortly after their initial

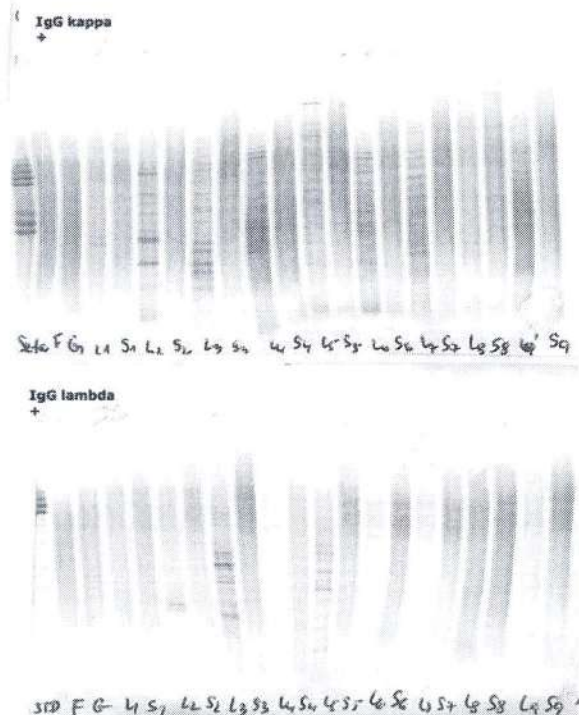


Figure 4. Representative example of a complete run of IEF/AIB for IgG kappa and IgG lambda. Anode (+) is at the top. Se Ko or STD, Sebia CSF control; F, Flebogamma; G, Gamunex; L1-L9, CSF samples; S1-S9, Serum samples. Both IgG kappa and IgG lambda CSF-restricted bands without obvious predominance of one type can be observed in samples 3 and 5, whereas predominantly IgG kappa bands can be observed in sample 2 and only IgG kappa bands (with reduced staining for CSF IgG lambda) in samples 4, 6, 7 and 9. Borderline positivity for IgG kappa (2 CSF-restricted bands) can be seen in sample 1 (not included in the study; this was an external sample sent for routine o-IgG detection but due to abnormally low CSF IgG concentration – 4.92 mg/L – we were not able to evaluate it adequately by a routine IEF/IF method) and only 1 CSF-restricted IgG lambda band in sample 8. 4 CSF-restricted IgG bands (either absent or less pronounced in serum compared to the CSF) were detected in the latter case using routine IEF/IF method, as well as numerous free kappa and free lambda bands by our IEF/AIB method.

Table 3. Correlation between o-IgG kappa and o-free kappa predominance.

		o-free kappa predominance		Total
		No	Yes	
o-IgG kappa predominance	No	12	2	14
	Yes	1	11	12
Total		13	13	26

Note. Only patients with ≥ 2 CSF-restricted bands were considered. No o-IgG kappa and/or o-IgG lambda positive patient had negative o-FLC test. The correlation was significant (chi squared 12.536, $P = 0.0004$).

presentation) and 6 non-MS patients (only those with confirmed diagnosis). Medians (interquartile ranges) were 1.096 (0.912–3.304) and 1.191 (0.934–1.408) in the MS and non-MS subgroups of o-IgG positives, respectively.

Theoretically, IgG kappa and IgG lambda intrathecal synthesis calculation according to Reiber's formula^[12] should be more sensitive than the calculation of total IgG intrathecal synthesis. Even though we were able to detect two patients negative for total IgG but positive for IgG lambda and one of them also for IgG kappa intrathecal synthesis, negative results were obtained in the other two patients positive for total IgG intrathecal synthesis. It is known that ELISA is more sensitive but less precise than nephelometry for CSF immunoglobulins;^[13] assay imprecision might account for these few discrepant results as well as for the fact that we failed to demonstrate significant advantage of such an approach (see Table 4 for details).

Diagnostic value of Ig kappa/lambda assays

Our results are in line with earlier observations that CSF kappa/lambda ratios are increased in substantial proportion of MS patients^[1,2,4,14-18] but also in many patients with other inflammatory neurological diseases (OIND).^[15-17] The reason for preferential IgG kappa synthesis within the CNS compartment remains unknown. Further studies are warranted to determine whether this could be related to the preferential recruitment of particular B cell clones into the CNS or to the peculiarities of B cell development (including receptor editing/revision and light chain replacement) within the CNS compartment. In addition, it should be investigated whether there is any significant correlation between disease outcome and proportion of intrathecally synthesized IgG kappa/IgG lambda. Be that as it may, our study supports the idea that IgG kappa intrathecal synthesis is simply more frequent than that of IgG lambda in both MS and OIND. At variance with some other studies,^[14,18,19] we therefore do not recommend the use of IgG kappa/lambda testing for the purpose of the differential diagnosis between MS and OIND.

o-IgG kappa/lambda IEF/AIB detection failed to increase sensitivity in the detection of intrathecal IgG synthesis, compared with o-IgG detection by a

Table 4. Patients with and without intrathecal IgG synthesis according to Reiber.

		IgG ith		Total
		Negative	Positive	
IgG kappa ith	Negative	71	4	75
	Positive	1	20	21
IgG lambda ith	Negative	70	14	84
	Positive	2	10	12
Total		72	24	96

Note. ith, intrathecal.

The correlation is obvious in both comparisons ($P < 0.0001$). Nine patients were positive for both IgG kappa and IgG lambda, 12 patients for IgG kappa only, and 3 patients for IgG lambda only. 72 patients were both IgG kappa and IgG lambda negative. Two patients with positive IgG intrathecal fraction were negative for both IgG kappa and IgG lambda intrathecal fraction. They had 6 and 14 CSF-restricted o-IgG bands, respectively. Conversely, from patients with negative total IgG intrathecal fraction, one was only IgG lambda positive and one was both IgG kappa and IgG lambda positive.

routine method (IEF/IF; see Table 5). This extends our previous studies on this subject^[6,20] showing no advantage of IEF/AIB against IEF/IF for total o-IgG detection, despite the former method has approximately 10-fold lower detection limit for monoclonal IgG. Rather than in cases of borderline IEF/IF results, we are currently using the IEF/AIB method in cases with exceptionally low CSF IgG concentration (<10 mg/L) when the signal on IEF/IF gels is weak and the evaluation problematic, as well as when problems arise in distinguishing Type 4 (systemic oligoclonal response) from Type 5 (monoclonal gammopathy). The use of kappa/lambda typing for the latter purpose has been already suggested.^[6,21]

It would be of interest to develop similar method for quantitation of IgA kappa/IgA lambda and IgM kappa/IgM lambda. While IgG kappa/IgG lambda test could in principle be automated, only ELISA would be able to reliably determine low IgA kappa/IgA lambda and IgM kappa/IgM lambda CSF concentrations. This test could be of value for inflammatory CNS diseases other than MS. Concerning the idea of detecting o-IgM and o-IgA kappa/lambda bands, we should be aware that total o-IgA and o-IgM detection methods are not sufficiently validated and many controversies remain. However, the use of heavy/light chain pair antibodies could possibly help in the improvement and validation of such methods.

Conclusions

The ELISA method using Hevylite™ antibodies is able to provide reliable estimates of IgG kappa/lambda ratios, as proved by the fact that the ratios are essentially the same in CSF and serum in patients without intrathecal oligoclonal IgG synthesis. IEF/AIB method confirmed the ELISA results, but seems to be neither more sensitive than routinely employed IEF/IF Sebia method for o-IgG demonstration nor more suitable to detect IgG kappa or IgG lambda predominance than the quantitative test. Since we observed skewed IgG kappa/IgG lambda ratios in various inflammatory CNS diseases, we do not consider the test useful in distinguishing MS from OIND. Similar tests for IgA and IgM kappa/lambda could be developed in the future.

Table 5. Oligoclonal IgG kappa and IgG lambda compared to total IgG.

		o-IgG kappa		o-IgG lambda	
		Negative	Positive	Negative	Positive
o-IgG	Negative	28	0	28	0
	Positive	4	24	11	17
o-IgG kappa	Negative	n.a.	n.a.	30	9
	Positive	n.a.	n.a.	2	15

Note. n.a., not applicable.

The correlations are highly significant for all comparisons ($P < 0.0001$). In the two o-IgG positive but both o-IgG kappa and o-IgG lambda negative samples, 2 and 4 CSF-restricted o-IgG bands were found. The first patient had 3 CSF-restricted o-fKLC bands, while the second had both o-fKLC and o-fLLC bands.

Although we could not recommend the use of these tests on a routine basis, they might become attractive research tools. The analysis of light chain composition of intrathecally synthesised immunoglobulins could contribute to our understanding of intrathecal humoral immune response.

Acknowledgments

We would like to thank The Binding Site Ltd. (Birmingham, UK) for the kind donation of Hevylite IgG kappa and IgG lambda antibodies for research use. We are also greatly indebted to Dr. P. Hradílek (MS Centre, Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava) and Dr. Alexandra Lochmenová (Immunology and Allergology Laboratory, Public Health Institute, Ostrava) for fruitful discussions and to Dr. V. Procházka, Dr. K. Vítková and Dr. J. Jurčíková (Dept. of Science and Research, University Hospital Ostrava) for their continuous support.

Funding

Ministerstvo Zdravotnictví České Republiky (MHCZ-DRO-FNOs/2015).

References

1. Link, H.; Zettervall, O. Multiple Sclerosis: Disturbed Kappa: LambdaChain Ratio of Immunoglobulin G in Cerebrospinal Fluid. *Clin. Exp. Immunol.* **1970**, *6*, 435–438.
2. Zettervall, O.; Link, H. Electrophoretic Distribution of Kappa and Lambda Immunoglobulin Light Chain Determinants in Serum and Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **1970**, *7*, 365–372.
3. Zeman, D.; Kušnierová, P.; Bartoš, V.; Hradílek, P.; Kurková, B.; Zapletalová, O. Quantitation of Free Light Chains in the Cerebrospinal Fluid Reliably Predicts Their Intrathecal Synthesis. *Ann. Clin. Biochem.* **2016**, *53*, 174–176.
4. Araga, S.; Kagimoto, H.; Wada, A.; Funamoto, K.; Inoue, K.; Takahashi, K. Kappa/Lambda Ratios in IgG, IgA and IgM of Cerebrospinal Fluid and of Sera in Patients with Multiple Sclerosis. *Autoimmunity* **1989**, *5*, 133–137.
5. Bradwell, A.R.; Harding, S.J.; Fourrier, N.J.; Wallis, G.L.F.; Drayson, M.T.; Carr-Smith, H.D.; Mead, G.P. Assessment of Monoclonal Gammopathies by Nephelometric Measurement of Individual Immunoglobulin κ/λ Ratios. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1646–1655.
6. Zeman, D.; Hradílek, P.; Švagera, Z.; Mojžišková, E.; Woznicová, I.; Zapletalová, O. Detection of Oligoclonal IgG Kappa and IgG Lambda Bands in Cerebrospinal Fluid and Serum with Hevylite™ Antibodies. Comparison with the Free Light Chain Oligoclonal Pattern. *Fluids Barr. CNS* **2012**, *9*, 5.
7. Zeman, D.; Hradílek, P.; Kušnierová, P.; Píža, R.; Reguliová, K.; Woznicová, I.; Zapletalová, O. Oligoclonal Free Light Chains in Cerebrospinal Fluid as Markers of Intrathecal Inflammation. Comparison with Oligoclonal IgG. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2015**, *159*, 104–113.
8. Teunissen, C.; Menge, T.; Altintas, A.; Álvarez-Cermeño, J.C.; Bertolotto, A.; Berven, F. S.; Brundin, L.; Comabella, M.; Degn, M.; Deisenhammer, F.; Fazekas, F.; Franciotta, D.; Frederiksen, J.L.; Galimberti, D.; Gnanapavan, S.; Hegen, H.; Hemmer, B.; Hintzen, R.; Hughes, S.; Iacobaeus, E.; Kroksveen, A.C.; Kuhle, J.; Richert, J.; Tumani, H.; Villar, L.M.; Drulovic, J.; Dumjovic, I.; Khalil, M.; Bartos, A. Consensus Definitions and

- Application Guidelines for Control Groups in Cerebrospinal Fluid Biomarker Studies in Multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2013**, *19*, 1802–1809.
9. Kušnierová, P.; Zeman, D.; Šigutová, R.; Ploticová, V.; Všianský, F.; Švagera, Z. Contribution of Hevylite Assays by Patients with Monoclonal Gammopathy. *Chem. Listy* **2013**, *107*, s393–s395.
 10. The Binding Site Ltd. Hevylite Reference Intervals. In The Binding Site Group, Ltd. (Ed.), *Serum Free Light Chain Analysis plus Hevylite*. 7th ed.; The Binding Site Group, Ltd., Birmingham, UK, 2015; pp. 105–109.
 11. Bojková, J. Detection of Low Concentrations of Paraprotein in Serum and Urine by Isoelectric Focusing with Affinity Immunoblotting. Master's thesis. St. Elizabeth University College of Health and Social Work Bratislava, Institute for Healthcare Disciplines, Bratislava, 2015.
 12. Reiber, H. Flow Rate of Cerebrospinal Fluid (CSF) – A Concept Common to Normal Blood-CSF Barrier Function and to Dysfunction in Neurological Diseases. *J. Neurol. Sci.* **1994**, *122*, 189–203.
 13. Reiber, H. Immunglobuline. In *Neurologische Labordiagnostik*; Wildemann, B.; Oschmann, P.; Reiber, H. Eds.; Thieme: Stuttgart, 2006; p. 47.
 14. Link, H.; Müller, R. Immunoglobulins in Multiple Sclerosis and Infections of the Nervous System. *Arch. Neurol.* **1971**, *25*, 326–344.
 15. Roberts-Thomson, P.J.; Esiri, M.M.; Young, A.C.; MacLennan, I.C.M. Cerebrospinal Fluid Immunoglobulin Quotients, Kappa/Lambda Ratios, and Viral Antibody Titres in Neurological Disease. *J. Clin. Path.* **1976**, *29*, 1105–1115.
 16. Bollengier, F.; Rabinovitch, N.; Lowenthal, A. Oligoclonal Immunoglobulins, Light Chain Ratios and Free Light Chains in Cerebrospinal Fluid and Serum from Patients Affected with Various Neurological Diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1978**, *16*, 165–173.
 17. Eickhoff, K.; Heipertz, R.; Wikström, J. Determination of k/l Immunoglobulin Light Chain Ratios in CSF from Patients with Multiple Sclerosis and Other Neurological Diseases. *Acta Neurol. Scand.* **1978**, *57*, 385–395.
 18. Link, H.; Laurenzi, M.A. Immunoglobulin Class and Light Chain Type of Oligoclonal Bands in CSF in Multiple Sclerosis Determined by Agarose Gel Electrophoresis and Immunofixation. *Ann. Neurol.* **1979**, *6*, 107–110.
 19. Jenkins, M.A.; Cheng, L.; Ratnaike, S. Multiple Sclerosis: Use of Light-chain Typing to Assist Diagnosis. *Ann. Clin. Biochem.* **2001**, *38*, 235–241.
 20. Nováčková, L.; Zeman, D. Detection of Oligoclonal IgG Bands in Cerebrospinal Fluid and Serum: Comparison between Commercially Available Immunofixation Method and Home-made Affinity Immunoblotting Method and Evaluation of Interobserver Agreement. *Klin. Biochem. Metab.* **2011**, *19*, 229–233.
 21. Petzold, A. Intrathecal Oligoclonal IgG Synthesis in Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *262*, 1–10.

Detekce oligoklonálních IgM pásů v likvoru

Zeman D.^{1,2}, Kušnierová P.^{1,2}

¹Katedra biomedicinských oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

²Oddělení klinické biochemie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

SOUHRN

Cíl studie: Úprava postupu detekce oligoklonálních IgM pásů v likvoru a séru.

Typ studie: Metodická studie.

Materiál a metody: Izoelektrická fokusace (IEF) v agarózovém gelu s následným afinitním imunoblottingem. Po výběru nejlepší varianty z testovaných postupů bylo vyšetřeno 35 párových vzorků likvorů a sér.

Výsledky: Zlepšení separace IgM bylo dosaženo použitím užšího pH gradientu (4-8), prefokusací a katodickou aplikací vzorku. Separace IgM v nativních vzorcích likvoru a séra se nepodařilo dosáhnout. K uspokojivým výsledkům vedla před-úprava vzorků dithiothreitem, popř. následně akrylamidem. Intrathekální syntéza oligoklonálního IgM byla průkazná u 11 z 35 testovaných vzorků. Vzorky všech pacientů s potvrzenou diagnózou nezářlivého onemocnění nervového systému (n=9) i symptomatických kontrol (n=3) byly negativní. Průkaz oligoklonálního IgM statisticky významně koreloval s výpočtem intrathekální syntézy IgM podle Reibera (P=0,007) i podle Auera et al. (P=0,026).

Závěr: Upravená metoda umožňuje citlivou a reprodukovatelnou detekci oligoklonálního IgM. Další výzkum by měl směřovat jednak k optimalizaci předúpravy vzorku, jednak k pokusům dosáhnout separace IgM izoelektrickou fokusací v nativním (neupraveném) vzorku.

Klíčová slova: oligoklonální IgM, izoelektrická fokusace, afinitní imunoblotting, výpočet intrathekální syntézy.

SUMMARY

Zeman D., Kušnierová P.: Detection of oligoclonal IgM in cerebrospinal fluid

Objective: Improvement of the procedure used for cerebrospinal fluid (CSF) and serum oligoclonal IgM detection.

Design: Methodical study

Material and Methods: Isoelectric focusing (IEF) in agarose gel followed by affinity immunoblotting. After choosing the best variant from the protocols tested, 35 paired CSF and serum samples were examined.

Results: Improvement of IgM separation has been achieved by using narrower pH gradient (4-8), prefocusing step and cathodic application of samples. Efforts to separate IgM in native CSF or serum samples have been unsuccessful. Satisfactory results have been obtained using sample pretreatment with dithiothreitol, optionally followed by acrylamide pretreatment. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM was demonstrated in 11 out of 35 patients. Samples of symptomatic controls (n=3) or patients with a proved diagnosis of non-inflammatory neurological disease (n=9) were all negative. Oligoclonal IgM result correlated significantly with intrathecal IgM synthesis estimated either by Reiber's (P=0.007) or Auer's formula (P=0.026).

Conclusion: The method described in this article enables sensitive and reproducible detection of oligoclonal IgM bands separated by IEF. Further research should address the optimisation of sample pretreatment as well as experiments aimed at separation of IgM in untreated cerebrospinal fluid and serum samples.

Keywords: oligoclonal IgM, isoelectric focusing, affinity immunoblotting, calculation of intrathecal synthesis.

Úvod

Detekce oligoklonálního (o-) IgM v mozkomíšním moku (CSF) byla popsána již před více než 20 lety [1-3], do popředí zájmu neuroimunologů se však dostala až po zjištění, že intrathekální (ith.) syntéza o-IgM může predikovat agresivní průběh onemocnění roztroušenou sklerózou (RS) [4]. Metoda používaná v těchto studiích byla popsána skupinou L. M. Villarové r. 2001 [5]. Tato skupina později vypracovala i metodu detekce o-IgM specifických vůči myelinovým lipidům, které pravděpodobně predikují nepříznivý průběh RS ještě silněji [6].

Přestože klinický význam detekce o-IgM je referován v řadě recentních publikací, podrobnější popis metod v novější literatuře téměř chybí. V r. 2012 bylo publikováno doporučení Sekce pro likvorologii a neuroimunologii České neurologické společnosti [7] zahrnující mezi doporučená vyšetření i detekci o-IgM a o-IgA. Vzhledem k opakovaně prokázané vyšší senzitivitě

detekce o-IgG oproti výpočtům ith. syntézy IgG je tato myšlenka nepochybně opodstatněná. Existuje nicméně určitý rozpor mezi tímto doporučením a zahraničními směnicemi [8, 9], které uvádějí pouze detekci o-IgG, jakož i absencí publikovaných studií v tuzemské literatuře, kde dosud jediné sdělení na toto téma publikovali Kelbich et al. [10]. Použití komerčního kitu pro detekci o-IgM bylo popsáno pouze pro imunofixační elektroforézu [11].

Metoda izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblottingem (IEF/AIB) byla propracována C. J. Sindicem nejprve pro detekci oligoklonálních volných lehkých řetězců [12] a později také o-IgM [2]. Jejím výhodou je několikanásobně nižší detekční limit oproti klasickému imunoblottingu. S použitím metody pro detekci o-IgG a volných lehkých řetězců máme poměrně rozsáhlé zkušenosti [13-15]. Po úvodních pokusech s metodou Villarové et al. jsme zvolili toto uspořádání i pro studium o-IgM, neboť se nám nepodařilo dosáhnout detekčního limitu 0,02 mg/l

popsaného v původní práci [5]. I přes nesystematický experimentální přístup se nám podařilo vyvinout metodu poskytující přijatelné výsledky. Tuto metodu v našem sdělení podrobně popisujeme a nabízíme tak specializovaným laboratorům k použití, další optimalizaci, klinické validaci a ovšem také kritickým připomínkám.

Materiál a metody

IEF je prováděna na přístroji Multiphor II (GE Healthcare) se zdrojem EPS-3501XL a termostatickým cirkulátorem. Používáme agarózu pro IEF (kat. č. 17046801), amfolyty Pharmalyte 4-6,5 (kat. č. 17045201) a 5-8 (kat. č. 17045301), GelBond film (kat. č. 80112293), filtrační papír (kat. č. 80112952) a elektrodové stripy (kat. č. 18100440) firmy GE Healthcare; D-sorbitol (kat. č. 85529), DL-dithiothreitol (kat. č. 43815), akrylamid (kat. č. 23701) a tris(hydroxymethyl)aminomethan (kat. č. 252859) firmy Sigma Aldrich; proužky pro aplikaci vzorků (kat. č. 42899), Tween 20 (kat. č. 37470.01) a bovinní sérový albumin (BSA, kat. č. 11924) firmy Serva; nitrocelulózovou membránu s póry 0,45 μm firmy Sartorius (kat. č. 11306-41BL). Anolytem je kyselina octová (0,25 mol/l), katolytem hydroxid sodný (0,25 mol/l).

Pro potah membrán byla použita kozí protilátka proti lidskému IgM firmy Jackson ImmunoResearch (kat. č. 109-005-043). K detekci byl použit biotinem značený F(ab)_2 fragment kozí protilátky proti lidskému IgM též firmy (kat. č. 109-066-129) s následnou aplikací konjugátu streptavidinu s alkalickou fosfatázou firmy Vector (kat. č. SA-5100), popř. kozí protilátky proti lehkým řetězcům kappa a lambda firmy Bethyl značené přímo alkalickou fosfatázou (kat. č. A80-115AP a A80-116AP). K vizualizaci signálu byl použit substrát BCIP/NBT firmy Vector (kat. č. SK-5400).

Příprava roztoků pufrů Tris-Cl, pH 9,5, Tris-buffered saline (TBS) pH 7,6, TBS s 0,05% Tweenem 20 (TBS-T) a phosphate-buffered saline (PBS) pH 7,4 pro IEF a afinitní imunoblotting je podrobně popsána v práci Bojkové [16].

Po úpravě metody bylo testováno 35 vzorků likvorů a sér zaslaných k vyšetření oligoklonálních pásů. U všech byla provedena kvantifikace albuminu, IgG, IgM a IgA na nefelometru BN ProSpec (Siemens) a detekce o-IgG (IEF s imunofixací, Hydrasys, Sebia). Ith. syntéza imunoglobulinů byla vyhodnocena podle Reiberova vztahu [17] i vztahu nově navrženého Auerem et al. [18]. Ve 30 případech byla provedena také detekce oligoklonálních volných lehkých řetězců kappa a lambda (IEF/AIB). Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem MedCalc Statistical Software (verze 16.2.0). Významnost korelace mezi pozitivitou/negativitou jednotlivých testů byla posouzena Fisherovým exaktním testem.

Metoda

Agarózový gel připravíme rozpuštěním 2,6 g sorbitolu a 0,2 g agarózy ve 20 ml destilované vody. Roztok zahříváme k varu a pak po 5-10 minutách necháme

pomalou chladnout. Po poklesu teploty na 70°C přidáme 0,75 ml Pharmalytu 4-6,5 a 0,75 ml Pharmalytu 5-8. Po šetrném promíchání gel okamžitě nalijeme přehřátou pipetou do přehřáté masky mezi podložní sklo s GelBond filmem a sklo se „spacerem“ (0,5 mm) a necháme 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté šetrně odstraníme vrchní sklo a gel inkubujeme ve vlhké komůrce při 2-8°C 3-24 hodin.

Nitrocelulózové membrány (rozměr 7,5 × 12 cm; dvě membrány na jeden gel) inkubujeme 2-3 minuty v destilované vodě, poté 10-15 minut v TBS. Pak na membránu aplikujeme 8-10 ml nezačtené protilátky proti lidskému IgM ředěné v TBS na 10 mg/l. Necháme inkubovat na kývačce při pokojové teplotě 6-14 hodin.

Bezprostředně před prefokusací připravíme vzorky. Likvory s koncentrací IgM > 1 mg/l ředíme 0,75% NaCl na 1 mg/l a na stejnou koncentraci ředíme také séra. Likvory s nižší koncentrací IgM aplikujeme neředěné. Séra můžeme ředit na likvorovou koncentraci IgM, nicméně se nám osvědčilo ředění na 1 mg/l, popř. na 0,5 mg/l u vzorků s koncentrací IgM v likvoru $\leq 0,5$ mg/l. Je nutné dbát na dostatečný objem vzorku (min. 50 μl). Poté napipetujeme do eppendorfek 1 μl zásobního roztoku dithiothreitolu (DTT, 0,5 mol/l v 0,1 mol/l Tris-Cl pufru o pH 9,5) a přidáme 49 μl adekvátně zředěných vzorků likvoru, resp. séra. Důkladně promícháme a inkubujeme 20-30 minut při 37°C. Poté vzorky přemístíme do pokojové teploty. Fakultativně lze doplnit alkylační krok: do eppendorfek napipetujeme 1 μl roztoku akrylamidu (0,4 mol/l v destilované vodě) a přidáme 19 μl výše popsaným způsobem upravených vzorků; inkubujeme při pokojové teplotě v temnu po dobu 30-45 minut.

IEF provádíme při 10°C. Na gel přiložíme suchý filtrační papír a ihned sejmeme. Na keramickou desku přístroje aplikujeme cca 1,5 ml petroleje a poté na ni umístíme gel. Na něj položíme elektrodové stripy nasycené v roztocích anolytu, resp. katolytu (mezielektrodová vzdálenost 8,5 cm) a cca 1,5 cm zevně od nich proužek filtračního papíru. Prefokusace je jednokroková (250 Vh) s nastavenými maximálními hodnotami 600 V, 30 mA, 4 W. Po jejím ukončení vypneme přístroj a 2 cm od katody položíme aplikační proužek pro vzorky; do každé jamky pipetujeme 7 μl vzorku. Poté spustíme IEF program. Používáme gradientovou metodu, při které voltáž lineárně stoupá od hodnoty předchozí fáze až k naprogramované maximální hodnotě. Program má čtyři fáze: 1) 1 Vh, 300 V, 30 mA, 3 W; 2) 125 Vh, 300 V, 30 mA, 3 W; 3) 500 Vh, 1275 V, 30 mA, 8 W; 4) 575 Vh, 1275 V, 30 mA, 8 W.

Po uplynutí 110 Vh fáze 2) IEF přerušíme, vyměníme elektrodové proužky a odsávací papíry za nové a sejmeme aplikační masku. Poté pokračujeme v separaci.

Bezprostředně po této operaci omyjeme nitrocelulózové membrány v TBS a inkubujeme v roztoku 3% BSA v TBS (cca 75-90 minut). Krátce před koncem IEF membrány omyjeme dvakrát v TBS.

Po skončení IEF gel obložíme filtračním papírem navlhčeným v TBS a následně přiložíme nitrocelulózové membrány (stranou, na níž byla aplikována protilátka

ka, na gel). Přiložíme 1 filtrační papír navlhčený v TBS, dalších 5-7 suchých filtračních papírů, skleněnou desku a závaží (cca 1,5 kg). Ponecháme 50 ± 5 minut. Poté membrány promyjeme v PBS a inkubujeme v roztoku 0,25% glutardialdehydu v PBS po dobu 15-20 minut při 2-8°C; pak je opláchneme destilovanou vodou a třikrát promyjeme v TBS. Poté inkubujeme v roztoku TBS/0,3% BSA na kývačce po dobu 20 ± 5 minut, znovu promyjeme v TBS a aplikujeme roztok biotinem značené protilátky (ředíme 1/20 000 v TBS/0,3% BSA). Necháme inkubovat 2 – 2,5 hodiny na kývačce při pokojové teplotě. Membránu pak promyjeme v TBS, dvakrát v TBS-T, dvakrát v TBS. Následně aplikujeme roztok streptavidinu značeného alkalickou fosfatázou (ředíme 1/750 v TBS/0,3% BSA) a inkubujeme 50 ± 5 minut, promyjeme v TBS, TBS-T a TBS jak uvedeno výše a konečně detekujeme pomocí roztoku BCIP/NBT. Optimálního zbarvení je dosaženo po 30 až 40 minutách. Nakonec membránu promyjeme 5 minut v TBS a 1-2 minuty v destilované vodě a usušíme.

Výsledky

Ukázky IEF obrazů jsou na obr. 1 a 2. Z 35 vyšetřených pacientů byla ith. syntéza IgM zjištěna výpočtem podle Reibera u šesti a podle Auera et al. u pěti pacientů. Ith. syntéza o-IgM (alespoň dva zřetelné pásy v likvoru bez protějšku v séru) byla detekována u 11 pacientů (Tabulka 1). U pěti z nich byla prokázána ith. syntéza IgM podle Reibera a u čtyř i podle Auera et al. U jedné pacientky s vypočtenou výraznou ith. syntézou IgM (intrathekální frakce 48 %, resp. 28 %) vyzněla detekce o-IgM negativně i při opakovaném vyšetření. Mezi kvantitativní a kvalitativní metodou nacházíme statisticky významnou korelaci (Fisherův exaktní test, $P=0,007$ při použití Reiberova vztahu a $P=0,026$ při použití vztahu dle Auera et al.). Přítomnost ith. syntézy o-IgM významně koreluje s přítomností ith. syntézy o-IgG ($P=0,023$) a oligoklonálních volných lehkých řetězců typu lambda ($P<0,0001$), ale nikoliv typu kap-
pa ($P=0,246$).

Table 1. Clinical diagnoses and the frequency of positive results for intrathecal immunoglobulin synthesis

	o-IgG	o-IgM	IgG loc*	IgM loc*
Multiple sclerosis (n=6) or clinically isolated syndrome (n=7)	13 (100%)	8 (62%)	5 (38%)	5 ** (38%)
Radiologically isolated syndrome (n=3)	2	1	1	0
Other inflammatory neurological diseases (n=3)	2	1	0	1
Non-inflammatory neurological diseases (n=9)	1	0	1	0
Symptomatic controls (n=3)	0	0	0	0
Unknown (n=4)	3	1	0	0

*Ig loc = positive calculation of intrathecal synthesis according to the Reiber's formula or the formula of Auer et al. Qualitative interpretation of the results (positive/negative) was in perfect agreement for IgG, while one MS patient positive for o-IgM and positive by Reiber's formula was evaluated as negative using the formula of Auer et al.

** 5 positives by Reiber's formula and 4 positives by the formula of Auer et al.

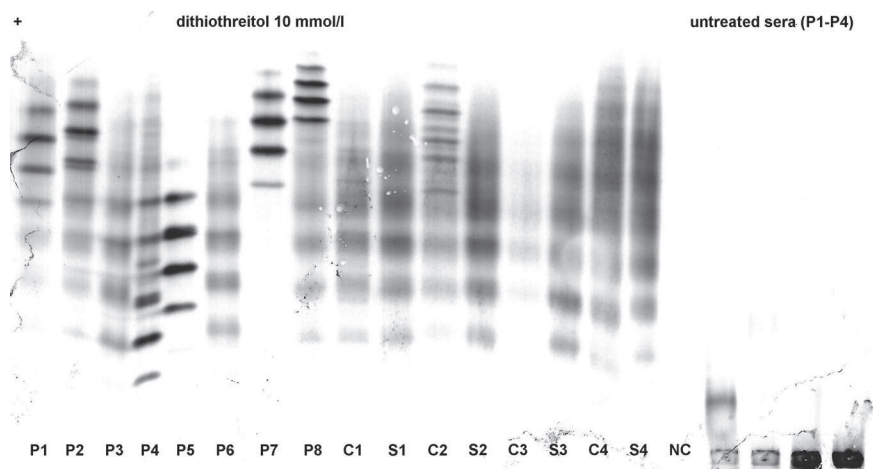


Fig. 1a. IEF/AIB of 8 serum samples with elevated IgM concentration and/or IgM paraprotein detected on immunofixation (P1-P8) and four CSF(C) – serum (S) pairs (C1-4 and S1-4). NC = negative control (intravenous IgG preparation diluted to 500 mg/l). At least 2 clear-cut IgM bands not present in serum can be seen in C1, while numerous CSF-restricted IgM bands could be counted in C2. C3 and C4 were evaluated as negative. On the right, it is demonstrated that samples (P1-P4) mostly do not enter the gel without dithiothreitol pretreatment.

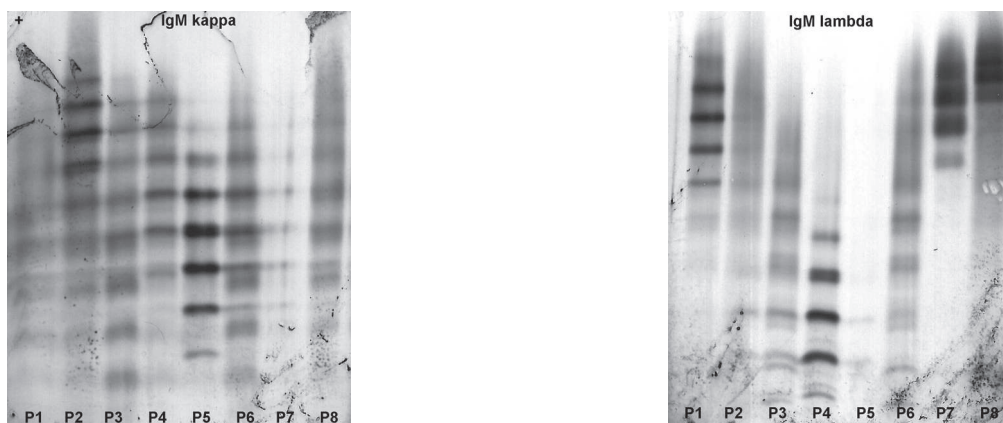


Fig. 1b, c. IgM kappa/lambda detection on immunoblots of 8 serum samples with elevated IgM concentration and/or IgM paraprotein detected on immunofixation. The same gel run as in Fig. 1a. The coating anti-human IgM antibody was the same as for total IgM detection, but biotin-labeled anti-human IgM detection antibody was replaced with alkaline phosphatase labeled anti-human kappa and lambda light chain antibodies, respectively. The background is less clear than in Figure 1a; this possibly suggests that trace amounts of immunoglobulins other than IgM might still be transferred onto the membrane and react with anti-kappa and anti-lambda antibodies. Although the results of IEF/AIB patterns are clearly not so straightforward as those of immunofixation electrophoresis, identical conclusions could be driven by using kappa and lambda light chain detection (P2 and P5, IgM kappa; P1, P7 and P8, IgM lambda; P4, IgM kappa and IgM lambda; P3 and P6, no paraprotein detected).

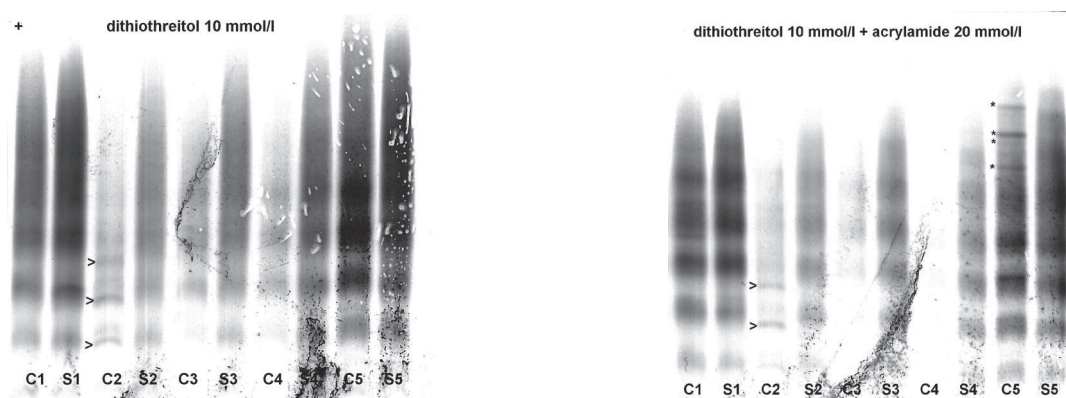


Fig. 2. IEF/AIB of five CSF (C) – serum (S) pairs (C1-5 and S1-5). Samples were separated within the same run without (2a) or with (2b) alkylation with acrylamide after incubation with dithiothreitol. C1, C3 and C4 were evaluated as negative, while CSF-restricted IgM bands could be seen in sample C2 (arrowheads). Sample C5 was evaluated as unequivocally positive (bands indicated by asterisks) only when alkylated. Interestingly, sample C1 was negative despite pronounced intrathecal IgM synthesis calculated by both formulas, while sample C2 was negative by quantitative testing and the actual CSF IgM concentration 0.17 mg/l represent the lowest CSF IgM value with positive o-IgM test that we have ever met.

Diskuse

Separace IgM v nativním vzorku likvoru a séra se nepodařilo dosáhnout ani při použití vyšší teploty (15, 25 nebo 35°C), ani použitím gelu obsahujícího nižší koncentraci agarózy (0,8 %), 0,5-1 % detergent (Nonidet P40-Substitute), ani aplikací vzorku při nízkém napětí 150 V podle doporučení Westermeiera [19]. Toto pozorování je v souladu s údaji publikovanými Sindicem [2] a Cornellem [20], přestože některým skupinám se v minulosti podařilo dosáhnout separace nativní molekuly IgM [21-24]. Variantou pro další pokusy může být velmi řídký agarózový gel (<0,8 %), popř. gel obsahující 5-10 % glycerol nebo kompozitní agarózový-polyakrylamidový gel, jehož použití bylo popsáno v práci [22].

V naší studii se separaci IgM podařilo realizovat pouze po předúpravě vzorků DTT, bez níž zůstala ve všech experimentech naprostá většina IgM na startu.

Použití redukčního činidla se tedy zdá nutné. Je zajímavé, že ve dvou případech byly o-IgM pásy zřetelné pouze ve vzorku inkubovaném v posledním kroku předúpravy s akrylamidem. Potřeba zařazení alkylačního kroku byla v literatuře diskutována [25], v případě námi zvolené kombinace může spolupůsobit i reakce akrylamidu s přebytkem DTT, a tím zabránění jeho interference při separaci. Zlepšení separace IgM bylo dosaženo vřazením prefokusačního kroku, katodickou aplikací vzorku a použitím užšího pH gradientu (4-8) připraveného kombinací Pharmalytů 4-6,5 a 5-8. Ten se jeví jako vhodnější než gradient 5-8, neboť některé práce uvádějí hodnoty izoelektrických bodů IgM mezi 4,5 a 8 [23, 24, 26].

Již v úvodu byl zmíněn potenciál metody pro podstatně citlivější detekci itH. syntézy oproti kvantitativním (výpočtovým) vztahům. Při výpočtu vycházíme z tzv. limitního kvocientu, který vyjadřuje maximální poměr koncentrací imunoglobulinu v likvoru a séru vysvětlitel-

ný difúzí přes hemato-likvorovou bariéru. Nejčastěji se používá Reiberův vztah, který je matematicky ve shodě s teoretickou představou o kinetice difúze proteinů z krve do likvoru [17] a má obecný tvar:

$$Q_{\lim \text{ Ig}} = \frac{a}{b} \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + b^2} - c$$

s hodnotami parametrů pro IgM: $a/b = 0,67$; $b^2 = 0,00012$, $c = 0,0071$.

Recentně publikovali Auer et al. [18] vztah:

$$Q_{\lim \text{ Ig}} = a \cdot Q_{\text{Alb}}^b$$

s hodnotami parametrů pro IgM: $a = 1,845$; $b = 1,34$.

Vlastní výpočet ith. syntézy je již shodný [17, 18]:

$$Ig_{\text{loc}} = (Q_{\text{Ig}} - Q_{\lim \text{ Ig}}) \cdot Ig_{\text{serum}} \text{ (mg/l)}$$

resp.

$$Ig_{\text{IF}} = \frac{Ig_{\text{loc}}}{Ig_{\text{CSF}}} \cdot 100 \text{ (\%)}$$

Na rozdíl od Reiberova vztahu je rovnice Auera et al. založena na čistě empirickém přístupu; další rozdíl spočívá v tom, že Reiber použil data z ELISA stanovení IgM, Auer et al. měřili IgM nefelometricky na analyzátoru Immage a uvádějí detekční limit 0,3 mg/l. Při použití této metody jsme však v minulosti našli v likvoru signifikantně vyšší hodnoty než hodnoty získané nefelometricky na analyzátořech řady BN nebo ELISA metodou [27]. Domníváme se proto, že rovnice Auera et al. může poskytovat falešně negativní hodnoty, resp. hodnoty jejich parametrů bude třeba validovat a upravit v případě použití jiných měřících systémů pro stanovení IgM v likvoru.

Výsledky kvalitativní a kvantitativní metody detekce ith. syntézy IgM i v malém souboru statisticky významně korelují, což je v částečném rozporu s výsledky publikovanými na mnohem větším souboru pacientů Kelbichem et al. [10] Navzdory částečně oprávněným výhradám vůči výpočtům ith. syntézy [28] je nutné si uvědomit, že ith. syntéza způsobuje přítomnost určitého množství imunoglobulinu v likvoru „navíc“ oproti množství, které by bylo za daných podmínek (Q_{Alb} a sérové koncentrace imunoglobulinu) přítomno při pouhém pasivním přestupu ze séra. Na tomto elementárním faktu jsou založeny všechny výpočty ith. syntézy. Úplná absence korelace mezi kvantitativní a kvalitativní metodou proto může upozorňovat i na analytické nedostatky jednoho či druhého postupu.

Metoda by mohla sloužit i pro detekci nízkých koncentrací monoklonálních imunoglobulinů, podobně jako u IgG [16, 20]. Klinický přínos takové aplikace je však zřejmě s ohledem na jiné možnosti monitorování monoklonálních gamapatií [29] zanedbatelný.

Potenciál pro významné snížení detekčního limitu vykazuje luminiscenční detekce. Schneiderovi et al. [30] její použití umožnilo ředit vzorky likvorů a sér na 0,05 mg/l a podíl pacientů s CIS a pozitivitou o-IgM je v jejich studii poněkud vyšší (74 %) než v práci Villaro-

vé et al. z r. 2005 (46 %). Mnohem nižší detekční limit luminiscenční detekce oproti chromogenním metodám by také mohl výrazně usnadnit detekci antigen-specifických o-IgM (popř. o-IgA, o-IgD) pásů v likvoru. Pořízení příslušného vybavení je u nás bohužel vzhledem k finanční nákladnosti zatím nemožné.

Závěr

Detekce o-IgM v likvoru je obtížná a stále ne zcela uspokojivě vyřešená metoda, která má nicméně významný diagnostický potenciál u zánětlivých onemocnění nervového systému a významný prognostický potenciál specificky u RS, kde intrathekální syntéza o-IgM může signalizovat agresivní průběh onemocnění. Popsaná metoda umožňuje detekovat o-IgM i ve vzorcích s nízkou koncentrací IgM v likvoru. Pro další metodický pokrok je nezbytné srovnání různých variant detekce o-IgM, ale také validace metod založená na klinických datech. Teprve potom bude možno uvažovat o standardizaci postupu, který se ukáže jako nejvhodnější.

Literatura

1. **Kaiser, R.** Affinity immunoblotting: rapid and sensitive detection of oligoclonal IgG, IgA and IgM in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing. *J. Neurol. Sci.* 1991, 103, p. 216-225.
2. **Sindic, C. J., Monteyne, P., Laterre, E. C.** Occurrence of oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of neurological patients: an immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J. Neurol. Sci.* 1994, 124, p. 215-219.
3. **Rijcken, C. A., Thompson, E. J., Teelken, A. W.** An improved, ultrasensitive method for the detection of IgM oligoclonal bands in cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Methods* 1997, 203, p. 167-169.
4. **Villar, L. M., Masjuán, J., González-Porqué, P. et al.** Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2003, 53, p. 222-226.
5. **Villar, L. M., González-Porqué, P., Masjuán, J., Alvarez-Cermeño, J. C., Bootello, A., Keir, G.** A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands. *J. Immunol. Methods* 2001, 258, p. 151-155.
6. **Villar, L. M., Sádaba, M. C., Roldán, E. et al.** Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, p. 187-194.
7. **Sobek, O., Adam, P., Koudelková, M., Štourač, P., Mareš, J.** Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České neurologické společnosti JEP. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 2012, 75/108 (2), p. 159-163.
8. **Deisenhammer, F., Bartoš, A., Egg, R. et al.** Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus, N.E., Basrnes, M.P., Brainin, M. (Eds.) *European Handbook of Neurological Management: Volume 1*, 2nd Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2011, p. 5-17.
9. **Wick, M. (Ed.).** *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie*, 3. vydání, 2014, dostupné na: www.dgln.de (sekce Empfehlungen – Methodenkatalog)

10. **Kelbich, P., Vachová, M., Kotalová, J., Vondráčková, S., Čujková, O.** Detekce intratékální syntézy imunoglobulinů – vlastní zkušenosti. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 2014, 77/110 (Suppl), p. S44.
11. **Richard, S., Miossec, V., Moreau, J. F., Taufin, J. L.** Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. *Clin. Chem.* 2002, 48, p. 165-173.
12. **Sindic, C. J., Laterre, E. C.** Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991, 33, p. 63-72.
13. **Zeman, D., Vaníčková, Z., Benáková, H., Havrdová, E.** Volné lehké řetězce typu kappa v likvoru a séru. *Klin. Biochem. Metab.* 2002, 10 (31), p. 98-102.
14. **Nováčková, L., Zeman, D.** Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: comparison between commercial immunofixation method and home-made affinity immunoblotting method and evaluation of interobserver agreement. *Klin. Biochem. Metab.* 2011, 19 (40), p. 229-233.
15. **Zeman, D., Hradílek, P., Kušnierová, P. et al.** Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc, Czech Repub.* 2015, 159, p. 104-114.
16. **Bojková, J.** Detekce nízkých koncentrací paraproteinů v séru a moči metodou izoelektrické fokusace s afinitním imunoblottingem. Diplomová práce. Ústav zdravotnických disciplín, Vysoká škola zdravotnictví a sociální práce sv. Alžbety, Bratislava, 2015, p. 1-77.
17. **Reiber, H.** Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 1994, 122, p. 189-203.
18. **Auer, M., Hegen, H., Zeileis, A., Deisenhammer, F.** Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula. *Eur. J. Neurol.* 2016, p. 713-721.
19. **Westermeier, R.** Agarose IEF. In: Westermeier R. *Electrophoresis in practice*. Fourth, revised and enlarged edition. Wiley-VCH, Weinheim 2005: p. 189-196.
20. **Cornell, F. N.** Isoelectric focusing, blotting and probing methods for detection and identification of monoclonal proteins. *Clin. Biochem. Rev.*, 2009, 30, p. 123-130.
21. **Rosén, A., Ek, K., Åman, P.** Agarose isoelectric focusing of native human immunoglobulin M and α 2-macroglobulin. *J. Immunol. Methods* 1979, 28, p. 1-11.
22. **Jackson, D. E., Skandera, C. A., Owen, J., Lally, E. T., Montgomery, P. C.** Isoelectric focusing of IgA and IgM in composite acrylamide-agarose gels. *J. Immunol. Methods* 1980, 36, p. 315-324.
23. **Chiodi, F., Sidén, Å., Ösby, E.** Isoelectric focusing of monoclonal immunoglobulin G, A and M followed by detection with the avidin-biotin system. *Electrophoresis* 1985, 6, p. 124-128.
24. **Schibeci, A., Wade, A. W., Depew, W. T., Szewczuk, M. R.** Analysis of serum antibody repertoires by isoelectric focusing and capillary blotting onto nitrocellulose paper. *J. Immunol. Methods* 1986, 89, p. 201-205.
25. **Herbert, B.** Some practices and pitfalls of sample preparation for isoelectric focusing in proteomics. In: Garfin D, Ahuja S (Eds.). *Handbook of Isoelectric Focusing*. Elsevier, Amsterdam 2005, p. 147-164.
26. **Wang, Z. Y., Hansen, K., Sidén, Å., Cruz, M.** Intrathecal synthesis of anti-Borrelia burgdorferi antibodies in neuroborreliosis: a study with special emphasis on oligoclonal IgM antibody bands. *Scand. J. Immunol.* 1993, 37, p. 369-376.
27. **Zeman, D., Kušnierová, P., Gottwaldová, J. et al.** Úskalí kvantifikace IgM v likvoru. *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20 (41), p. 136-144.
28. **Kelbich, P.** Jsem skeptický vůči výpočtům intratékální syntézy imunoglobulinů. (Editorial). *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20 (41), p. 133.
29. **Keren, D. F., Schroeder, L.** Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016, Feb 24. doi: 10.1515/cclm-2015-0862. [Epub ahead of print]
30. **Schneider, R., Euler, B., Rauer, S.** Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur. J. Neurol.* 2007, 14, p. 907-911.

Do redakce došlo 4. 4. 2016

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Ing. David Zeman, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie
Ústav laboratorní diagnostiky
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: david.zeman@osu.cz



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca

Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM test in routine practice: Comparison with quantitative assessment of intrathecal IgM synthesis

David Zeman^{a,b,c,*}, Pavlína Kušnierová^{a,c}, František Všianský^a, Katarína Reguliová^b,
Monika Škutová^b, Ivana Woznicová^b, Olga Zapletalová^{b,d}, Pavel Hradílek^b

^a Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic

^b Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic

^c Dept. of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 703 00 Ostrava, Czech Republic

^d Dept. of Neurology and Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 703 00 Ostrava, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Oligoclonal IgM
Cerebrospinal fluid
Intrathecal synthesis
Multiple sclerosis

ABSTRACT

Background: Intrathecal IgM synthesis demonstrated either as cerebrospinal fluid (CSF)-restricted oligoclonal (o-) IgM bands or calculated using various formulas has been linked to more aggressive multiple sclerosis (MS) course. However, the proportion of MS patients showing intrathecal IgM synthesis varies largely between studies. We aimed to explore the relation between different formulas and results of o-IgM, and to assess the frequency of o-IgM bands in an unselected series of samples.

Methods: 432 samples were analyzed for o-IgM, o-IgG and quantitative measures of IgM and IgG synthesis. IgM index and formulas of Reiber, Auer and Öhman were compared to the result of the o-IgM test.

Results: At the cut-off commonly used, the non-linear formulas for intrathecal synthesis were specific (> 94%) but rather insensitive (< 40% even at a cut-off of 4 CSF-restricted bands) compared to o-IgM. No significant difference was noted in the performance of different formulas. At a cut-off of 4 bands, 61% of MS patients, but none of the controls were positive for o-IgM.

Conclusions: Formulas for intrathecal IgM synthesis are insensitive compared to o-IgM. We propose to evaluate samples with 2 or 3 extra-CSF IgM bands as borderline and only samples with 4 or more as definitely positive.

1. Introduction

Oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid (CSF) demonstrate intrathecal immune response and are associated with chronic inflammatory central nervous system (CNS) diseases, multiple sclerosis (MS) in particular [1]. Oligoclonal IgG (o-IgG) test is important for early MS diagnosis according to the current diagnostic criteria [2]. Intrathecal IgM synthesis can be assessed by various calculations [3–5] or by an oligoclonal IgM (o-IgM) test using electrophoresis [6] or isoelectric focusing [7,8], and it has been claimed to have unfavorable prognostic significance in clinically isolated syndrome (CIS) and MS patients [9–19] although a few studies found the opposite [20–23]. The presence of CSF-restricted o-IgM bands was also related to a different

response to disease-modifying drugs [24,25], and the result of the test may thus influence early therapeutic decisions. Unlike o-IgG, however, o-IgM test is not commercially available. The possibility of using immunofixation electrophoresis kit with peroxidase-labeled antibody (Sebia) for o-IgM detection was mentioned in one study [26] but in the meantime this method has been largely replaced by isoelectric focusing (IEF).

One of early studies [27] claimed the o-IgM test to be superior to both IgM index and Reiber formula for intrathecal IgM synthesis, mainly because both of these latter tests gave a significant proportion of presumably false positive results in non-inflammatory neurologic disorders. By contrast, another study [28] found that Reiber formula had good sensitivity (86%) in the prediction of o-IgM positivity, while IgM

Abbreviations: o-IgM, oligoclonal immunoglobulin M; o-IgG, oligoclonal immunoglobulin G; CSF, cerebrospinal fluid; MS, multiple sclerosis; CNS, central nervous system; CIS, clinically isolated syndrome; IEF, isoelectric focusing; OID-CNS, other inflammatory CNS diseases; ID-PNS, inflammatory peripheral nervous system diseases; NIND, non-inflammatory neurologic diseases; AIB, affinity immunoblotting; IF, intrathecal fraction; ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve; CI, confidence interval; Q_{AIB} (Q_{IgM} , Q_{IgG}), ratio of CSF and serum albumin (IgM, IgG) concentrations; $Q_{lim\ IgM}$, $Q_{lim\ IgG}$, cut-off value of Q_{IgM} and Q_{IgG} , respectively, at a particular Q_{AIB} (values higher than Q_{lim} indicate intrathecal synthesis); EDSS, expanded disability status scale

* Corresponding author at: CSF Laboratory, Institute of Laboratory Diagnostics, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba, Czech Republic.

E-mail address: david.zeman@fno.cz (D. Zeman).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.021>

Received 18 March 2020; Received in revised form 11 May 2020; Accepted 11 May 2020

Available online 19 May 2020

0009-8981/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

index might give false positive results, mainly in patients with blood-CSF-barrier dysfunction. In general, the proportions of CIS and MS patients positive for intrathecal IgM synthesis differ substantially among patient cohorts in various studies (range of 13–63% for the Reiber formula and 20–74% for the o-IgM test).

We aimed to estimate the frequency of CSF o-IgM in an unselected consecutive series of patients where this test was requested by the treating physician, and to investigate the correlations between o-IgM and quantitative estimates of intrathecal IgM synthesis.

2. Methods

2.1. Samples

432 patients were prospectively examined for o-IgM between September 2018 and August 2019. Hospital information system search was performed retrospectively (January 2020) to identify patients that had been sent to the University Hospital Ostrava for further diagnostic evaluation or treatment. Among these patients, 31 were diagnosed as multiple sclerosis (according to the 2017 diagnostic criteria), 4 as CIS, 7 as other inflammatory CNS diseases (ID-CNS), 9 as inflammatory peripheral nervous system diseases (ID-PNS), 31 as non-inflammatory neurologic diseases (NIND), and 16 as symptomatic controls (no evidence of organic neurologic disease). Diagnosis was not known in the remaining 334 patients. For more details, see Supplemental Table S1. Simplified diagram depicting flow of samples through the study is shown in Fig. 1.

2.2. Ethical approval

The study has been approved by the University Hospital Ostrava Ethics committee (reference number 2/2020). Informed consent is mandatory before lumbar puncture according to the Czech Republic Law about Health Services, 372/2011, §28. Separate informed consent for this study was not required because it would be impossible or impractical to obtain for such research. This study included retrospective analysis of routine laboratory data.

2.3. Methods

Upon receipt, aliquots of CSF samples were centrifuged in eppendorf polypropylene tubes at $390 \cdot g$ for 10 min, supernatants were pipetted into clean eppendorf polypropylene tubes and stored at $+4^\circ\text{C}$. Blood samples were centrifuged in original tubes at $2500 \cdot g$ for 6 min; next, sera were aliquoted in eppendorf polypropylene tubes and stored in parallel with the CSF samples. Measurement of albumin, IgG and IgM and o-IgG test were performed within 3 days, and o-IgM test within 2 weeks.

o-IgG was performed using a commercially available method (Hydragel 9 CSF Isofocusing, Cat. No. S-4355, Sebia, Evry Cedex, France) on Hydrasys or Hydrasys2 apparatus (Sebia). o-IgM bands were detected by an in-house procedure by means of affinity immunoblotting after isoelectric focusing (IEF/AIB). A slight modification of the method combining the advantages of affinity-mediated immunoblotting [7], glutaraldehyde fixation [6,7], and pretreatment of samples with dithiothreitol in an alkaline solution [8] followed by SH-group alkylation, described by us previously [29] is presented in detail as Supplemental Protocol.

Out of the two patients where a follow-up sample was tested, one with an unknown diagnosis was repeatedly negative after 5 months, while the other (OID-CNS group) was repeatedly positive after 3.5 months. The follow-up samples are not included in any further analysis.

CSF and serum albumin, IgG and IgM levels were measured by nephelometry on BN ProSpec (Siemens, Erlangen, Germany) using dedicated kits. Lower end of the assay range lies between 0.13–0.16 mg/L and 0.16–0.18 g/L for CSF and serum IgM, respectively, depending on different lots of the calibrator. Lower values were assigned an arbitrary concentrations of 0.1 mg/L (CSF) and 0.1 g/L (serum). These values were omitted from the main analysis. IgM index and formulas of Reiber [4], Auer [5], and Öhman [3] were compared to the result of the o-IgM test. Similar comparisons were performed for formulas of intrathecal IgG synthesis calculation and o-IgG test.

Intrathecal synthesis calculations were performed according to the known formulas for Q_{lim} [4,5] and transformation of the formula of Öhman et al. [3,30] that is in fact very similar to that of Auer et al. Substituting the cut-off value in the extended Öhman's index formula as

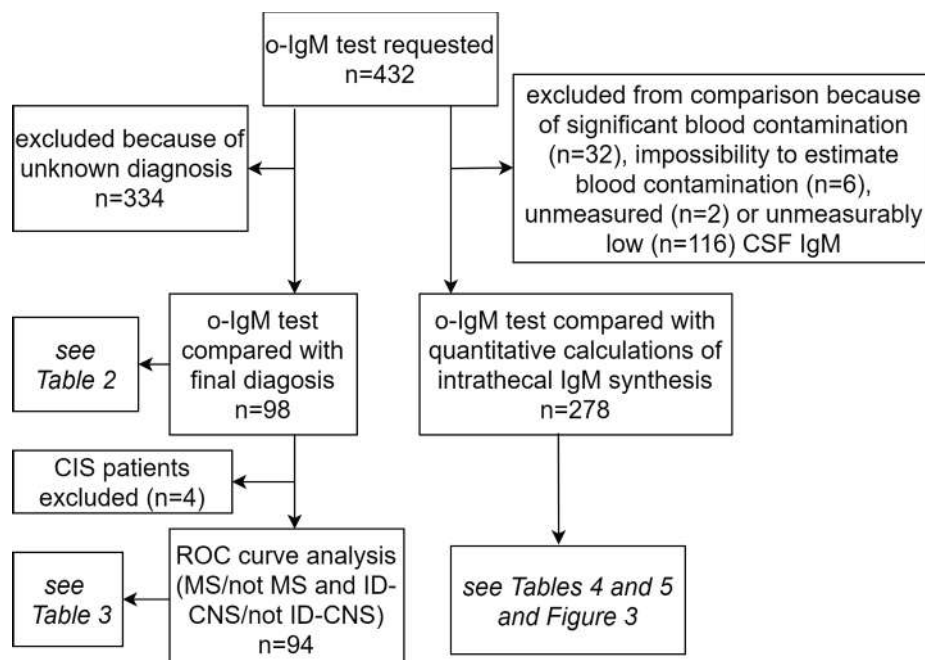


Fig. 1. Simplified diagram to show flow of samples through the study.

parameter a and parameter a from the extended index formulas as parameter b in the formula of Auer et al., the only difference between those formulas lies in the a and b parameter values.

$$Q_{\text{limIgM}(R)} = 0.67 \cdot \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + 0.00012} - 0.0071$$

$$Q_{\text{limIgG}(R)} = 0.93 \cdot \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + 0.000006} - 0.0017$$

$$Q_{\text{limIgM}(A)} = 1.845 \cdot Q_{\text{Alb}}^{1.34}$$

$$Q_{\text{limIgG}(A)} = 0.882 \cdot Q_{\text{Alb}}^{1.035}$$

$$Q_{\text{limIgM}(\bar{O})} = 15 \cdot Q_{\text{Alb}}^{1.9}$$

$$Q_{\text{limIgG}(\bar{O})} = 1.24 \cdot Q_{\text{Alb}}^{1.12}$$

Intrathecal synthesis calculations are then performed by comparing calculated Ig quotient (obtained from CSF and serum Ig measurements) to Q_{lim} and can be expressed as Ig_{loc} in mg/L or as Ig_{IF} in the percentage of total CSF Ig concentration [4,5]:

$$Ig_{\text{loc}} = (Q_{\text{Ig}} - Q_{\text{limIg}}) \cdot Ig_{\text{serum}}$$

$$Ig_{\text{IF}} = \frac{Ig_{\text{loc}}}{Ig_{\text{CSF}}} \cdot 100$$

IgG and IgM index values were compared directly with the above calculations, although in theory, both Ig_{loc} and Ig_{IF} can be derived from an index value ($Q_{\text{lim Ig}} = \text{index cut-off value} \cdot Q_{\text{Alb}}$).

2.4. Selection of samples for comparison between quantitative and qualitative tests for intrathecal IgM synthesis

It is well-known that blood contamination may lead to false positive intrathecal IgM synthesis [3]. Unfortunately, we lacked information on the number of erythrocytes in the CSF samples since this analysis was performed in local laboratories. Nevertheless, for many years it is our practice to prepare a cytologic slide from every CSF sample we are requested to analyze to reveal blood contamination or other unexpected abnormalities. Blood contamination was assessed qualitatively according to the presence of red blood cells in the cytologic slide as none (0), negligible (1), moderate (2), significant microscopic contamination (3) and macroscopic contamination (4). In (3) and (4), presumably false positive calculations of intrathecal IgM synthesis were found significantly more frequently in o-IgM negative samples (χ^2 tests and χ^2 tests for trend, $P < 0.001$). In addition, out of seven samples with $Q_{\text{IgM}} > Q_{\text{IgG}}$ (inversion of normal relationship between quotients that indicates intrathecal IgM synthesis), the only sample without o-IgM was macroscopically blood contaminated. This sample was also negative for o-IgG, whereas in the six other cases, no blood contamination was noted, and both CSF-restricted o-IgM (range, 3–12) and o-IgG (range, 10–19) bands were found. Hence, for the analysis of intrathecal IgM synthesis calculations from measured CSF and serum IgM and albumin concentrations, we used a subgroup of samples fulfilling the following criteria: (1) Absence of significant blood contamination (32 samples – 1 from the NIND group, 1 from the Control group, and 30 from the Unknown group – were excluded because of blood contamination and another 6 samples – 1 each from the MS, ID-PNS, NIND, and 3 from the Unknown group – were excluded because CSF cytologic slide was not prepared due to insufficient material). (2) Measurable CSF and serum IgM concentration. Unmeasurably low CSF IgM values were observed in 116/432 samples (26.9%); in another 2 samples, CSF IgM concentration could not be measured due to insufficient amount of material. The remaining 278 patients were analyzed for correlations with o-IgM test results.

2.5. Statistics

The data were analyzed using MedCalc Statistical Software version

18.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018). Sensitivity and specificity of intrathecal IgM and IgG synthesis calculations was compared to the *bona fide* gold standard o-IgM and o-IgG test, respectively. ROC curve analysis was used to find the most suitable cut-off values of the evaluated tests. Figs. 3 and 4 were prepared using GraphPad Prism version 8.3.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. Graphical Abstract was created using language R-3.6.0, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, www.R-project.org. The most important raw data are included as Supplementary Data file.

3. Results

3.1. Reproducibility of the o-IgM test

At the beginning of the study, we tested a reproducibility of our method using 85 samples where IEF was performed on Multiphor II (GE Healthcare, Chicago, USA) and Flatbed Professional (Electrophoresis Development & Consulting, Tübingen, Germany) apparatus, while the subsequent blotting and detection procedure was exactly the same. For details please see Section Method reproducibility in the Supplemental protocol. We concluded that the method was reproducible and both electrophoretic platforms were interchangeable.

An example of a routine blot is provided in Fig. 2A.

Seven samples with an unexpected positivity of o-IgM test (2 ID-PNS, 3 NIND and 2 Controls; range 3–9 CSF-restricted IgM bands) where frozen samples were still available were re-tested at the end of the study. We could reproduce at least two CSF-restricted IgM bands in four of them (both ID-PNS, 1 NIND and 1 Control) while three having 3–5 bands in the original analysis (reported as faint positivity in all three cases) were evaluated as negative in a reanalysis. Examples of concordant and discordant results are shown in Fig. 2B and C.

3.2. Frequencies of positive o-IgM and o-IgG tests

At a cut-off of 2 CSF-restricted bands, 83 out of 432 tested samples (19.2%) were positive for o-IgM, while 81 samples (18.8%) were positive for o-IgG. At a cut-off of 4 bands, 48 out of 432 samples were positive for o-IgM (11.1%) and 56 for o-IgG (13.0%). Significant concordance between o-IgM and o-IgG test results was found (Table 1). The frequencies of positive o-IgM and o-IgG tests in different diagnosis groups at a cut-off of ≥ 2 , ≥ 3 and ≥ 4 CSF-restricted bands are presented in Table 2.

ROC curve analyses (Table 3) for both MS and ID-CNS (MS and OID-CNS) revealed that AUC for o-IgG was significantly larger than for o-IgM both in the context of MS (difference between areas 0.140, 95% CI 0.0424–0.237, $P = 0.0049$) and ID-CNS diagnosis (difference between areas 0.181, 95% CI 0.0897–0.272, $P = 0.0001$). ROC curves for o-IgM intensity (instead of the number of CSF-restricted bands) were also tested; the AUC was 0.751 (95% CI 0.651–0.835) for MS and 0.776 (95% CI 0.679–0.856) for ID-CNS diagnosis, slightly but insignificantly smaller when compared to the AUC for the number of CSF-restricted o-IgM bands ($P = 0.0786$ and 0.1511 , respectively).

16 and 19% of patients with non-inflammatory neurological diseases and symptomatic controls, respectively, were o-IgM positive using the conventional cut-off of 2 CSF-restricted bands. None of the symptomatic controls, however, had more than 3 CSF-restricted bands.

In patients with MS or CIS, Expanded Disability Status Scale (EDSS) was examined during the assessment at our MS Center. No difference in the EDSS value was noted between o-IgM negative ($n = 11$, median EDSS 2.5, IQR 1.5–4.75, range 1.0–7.5) and o-IgM positive ($n = 24$, median EDSS 2.0, IQR 1.5–2.75, range 1.0–7.0) patients (Mann-Whitney U 122.5, $P = 0.7309$).

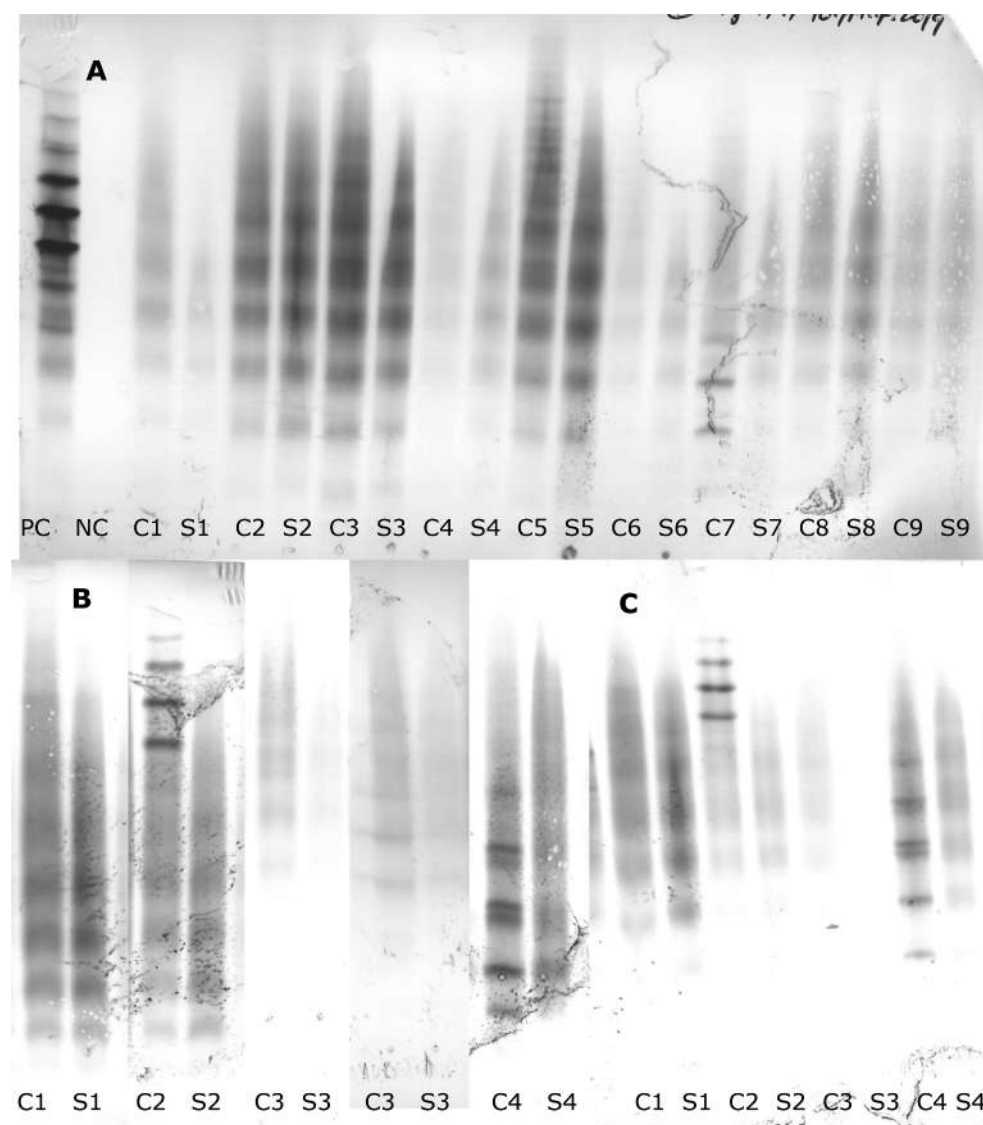


Fig. 2. Oligoclonal IgM. Anode is at the top; samples are applied near the cathode. (A) Example of o-IgM detection. PC, positive control (known IgM paraprotein); NC, negative control (intravenous IgG preparation); C1–C9, CSF; S1–S9, paired serum. Samples C5 and C7 (both multiple sclerosis) were evaluated as positive (++) in both cases, o-IgG test was positive as well (type 2). Samples C1–C4, C6, C8 and C9 were evaluated as negative. (B) Unexpectedly positive o-IgM results. Original analyses (sample 3 was repeated before final evaluation). C1–C4, CSF; S1–S4, paired serum. The diagnoses were diabetic polyneuropathy (C1), seropositive myasthenia gravis (C2), lower back pain and polydiscopathy L2 – S1 (C3), and diabetic polyneuropathy in a patient with type 1 diabetes and psoriatic arthritis (C4). None of these patients was positive for o-IgG. (C) Unexpectedly positive o-IgM results. Reanalysis of frozen samples (C1–C4 and S1–S4 as in B.). While samples C2 and C4 were reproducibly positive (++ and +++, respectively), weak positivity (+) in samples C1 and C3 could not be reproduced.

Table 1
Concordance between o-IgM and o-IgG test results.

		cut-off 2 bands o-IgG			cut-off 4 bands o-IgG		
		negative	positive	total	negative	positive	total
o-IgM	negative	314	35	349	359	25	384
	positive	37	46	83	17	31	48
	total	351	81	432	376	56	432
X ²		90.483 (P < 0.0001)			127.239 (P < 0.0001)		

3.3. Relation between quantitative and qualitative tests for intrathecal IgM synthesis

Next, we assessed the relation between quantitative and qualitative tests in 278 samples selected as described in Section 2.4. In order to allow direct comparison, the same group of samples was analyzed for calculations of intrathecal IgG synthesis (although IgG was measurable in all samples) and compared to o-IgG test results. See Supplemental Table S2 for proportions of abnormal intrathecal IgG and IgM tests in different diagnosis groups.

The proportion of samples with unmeasurably low CSF IgM varied

between diagnoses: 3/31 (9.7%) in the MS group, 2/4 (50%) in the CIS group, 2/7 (28.6%) in the OID-CNS group, 2/9 (22.2%) in the ID-PNS group, 8/29 (27.6%) in the NIND group, 7/16 (43.8%) in the Control group, and 93/334 (27.8%) in the Unknown group). Serum IgM concentrations were unmeasurably low only in 2 samples in the Unknown diagnosis group.

Quotient diagrams in a double-logarithmic scale (Q_{IgM} vs. Q_{Aib}) are shown in Figs. 3 and 4, demonstrating the results of various intrathecal Ig synthesis calculations (lines for Q_{lim}) in o-IgM negative/positive patients at a cut-off ≥ 2 (top) and ≥ 4 (bottom) CSF-restricted bands. For IgG, lines for Q_{lim} are closer to each other. Formulas for intrathecal IgG and IgM synthesis were rather insensitive compared to o-IgG and o-IgM tests. At a conventional cut-off ($> 0\%$ IF), all the tests had high specificity ($> 94\%$) but rather low sensitivity (15–26% and 21–36% for intrathecal IgM synthesis; 42–47% and 55–62% for intrathecal IgG synthesis at a cut-off of 2 and 4 bands, respectively). Sensitivity and specificity of the quantitative tests at a conventional cut-off value of $> 0\%$ IF (except for IgM and IgG indices where arbitrary and ROC-curve-analysis-based values are compared) are shown in Table 4. ROC curve analysis for quantitative measures of IgM and IgG synthesis is presented in Table 5. Of note is the fact that the suggested cut-off values as well as cut-off values at a specificity of $\geq 95\%$ differed substantially from those conventionally used, in particular for the formula of Auer for

Table 2

Oligoclonal IgM and oligoclonal IgG test results in 432 consecutively analyzed paired CSF and serum samples.

Diagnosis	n	o-IgM positive				o-IgG positive		
Cut-off		2 bands	3 bands	4 bands	++ or +++	2 bands	3 bands	4 bands
MS	31	22 (71.0%)	22 (71.0%)	19 (61.3%)	14 (45.2%)	31 (100%)	29 (93.5%)	28 (90.3%)
CIS	4	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)
OID-CNS	7	5 (71.4%)	5 (71.4%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)
ID-PNS	9	3 (33.3%)	3 (33.3%)	2 (22.2%)	2 (22.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NIND	31	5 (16.1%)	4 (12.9%)	4 (12.9%)	2 (6.5%)	5 (16.1%)	3 (9.7%)	1 (3.2%)
Controls	16	3 (18.8%)	3 (18.8%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12.5%)	2 (12.5%)	0 (0%)
Unknown	334	43 (12.9%)	29 (8.7%)	20 (6.0%)	18 (5.4%)	35 (10.5%)	27 (8.1%)	19 (5.7%)
Total	432	83 (19.2%)	68 (15.7%)	48 (11.1%)	39 (9.0%)	81 (18.8%)	69 (16.0%)	56 (13.0%)

MS, multiple sclerosis; CNS, central nervous system; CIS, clinically isolated syndrome; OID-CNS, other inflammatory CNS diseases; ID-PNS, inflammatory peripheral nervous system diseases; NIND, non-inflammatory neurologic diseases

In 2 patients (1 OID-CNS and 1 with unknown diagnosis), follow-up sample was analyzed during the study period. In these cases, only the result of the first CSF analysis was included.

++ or +++, moderate or strong intensity of the o-IgM pattern (taking into account both the number of bands and their staining intensity; using this criterion, patients with faint CSF-restricted o-IgM bands were considered as o-IgM negative)

intrathecal IgM synthesis (cut-off value at $\geq 95\%$ specificity – 119% and – 64.9% for 2- or 4-IgM bands cut-off, respectively). This is probably due to the analytical method used for IgM measurement in the study of Auer et al. (measurement on an Immage nephelometer with a lower end of the assay range of 0.3 mg/L). We have previously shown that this method (that is no more in use for Beckman nephelometers) gave significantly higher CSF IgM concentrations than either nephelometry on BN II or BN ProSpec or ELISA [31].

We were unable to find statistically significant difference between areas under the ROC curves for various calculations, either when compared to o-IgM and o-IgG tests (Table 5) or when analyzing the diagnostic value of the test in the context of MS or ID-CNS diagnosis (Supplemental Table S3). Interestingly, AUCs for Ig_{loc} (not shown) were consistently smaller than those for Ig_{IF} although the only difference between Ig_{loc} and Ig_{IF} lies in the expression of intrathecally synthesized Ig, either in mg/L or as a percentage of total CSF Ig concentration.

Finally, we analyzed the correlations between the number of CSF-restricted IgM bands and CSF IgM concentration, CSF/serum IgM quotient, as well as various calculations of intrathecal IgM synthesis in a subgroup of 88 CSF samples with at least 1 CSF-restricted IgM band. Spearman ρ was 0.356 (P 0.0007) for CSF-IgM, 0.325 (P 0.0020) for Q_{IgM} , 0.426 (P < 0.0001) for IgM index, and 0.414, 0.418 and 0.408 for IgM_{IF} according to Reiber, Auer and Öhman, respectively (P 0.0001 in all cases). Almost identical results were obtained when blood-

contaminated samples and samples with unmeasurable CSF IgM concentrations were included. Likewise, higher CSF IgM, IgM quotient, IgM index and IgM_{IF} values corresponded to higher o-IgM intensity (Kruskal-Wallis test, P 0.0093, 0.0043, 0.0003 for CSF IgM, IgM quotient and IgM index, respectively, and P 0.0003, 0.0003 and 0.0006 for IgM_{IF} values according to Reiber, Auer and Öhman when only positive o-IgM samples were compared).

4. Discussion

We compared the results of o-IgM analysis with quantitative measures of IgM synthesis and, where available, also with clinical diagnoses, and subsequently we performed similar comparisons for IgG.

The strength of our study lies in the analysis of a consecutive series of routine samples tested during a 1-year period. It avoids possible bias associated with sample selection in study protocols and provides real-world data. Despite several drawbacks it has, such as a lack of information concerning CSF cell count and clinical diagnosis for most of the tested samples, as well as less stringent control of pre-analytical variables compared to CSF biomarker studies, we believe the study still enables us to formulate reliable conclusions. The MS Center at the Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava is the only MS Center in the Moravian-Silesian region. It can be assumed that the vast majority of patients tested at our laboratory are subsequently sent to this

Table 3

ROC curve analysis in the context of MS diagnosis (A) and diagnosis of ID-CNS (B).

	A. MS/not MS (n = 31/63)		B. ID-CNS/not ID-CNS (n = 38/56)	
AUC	0.928	0.789	0.984	0.804
(95% CI)	(0.856–0.971)	(0.692–0.866)	(0.934–0.999)	(0.715–0.882)
Suggested criterion (Youden index; sensitivity; specificity)	≥ 2 (0.7778; 100%; 77.8%)	≥ 1 (0.5049; 80.6%; 69.8%)	≥ 4 (0.9032; 92.1%; 98.2%)	≥ 1 (0.5395; 78.9%; 75.0%)
Criterion at $\geq 90\%$ specificity (sensitivity; specificity)	≥ 7 (71.0%; 90.5%)	≥ 6 (32.3%; 95.2%)	≥ 3 (94.7%; 91.1%)	≥ 5 (39.5%; 91.1%)
≥ 2 (sensitivity; specificity)	100%; 77.8%	71.0%; 74.6%	100%; 87.5%	71.1%; 80.4%
≥ 3 (sensitivity; specificity)	93.5%; 80.9%	71.0%; 76.2%	94.7%; 91.1%	71.1%; 82.1%
≥ 4 (sensitivity; specificity)	90.3%; 87.3%	61.3%; 85.7%	92.1%; 98.2%	57.9%; 89.3%

MS, multiple sclerosis; not MS, other known diagnoses (excluding CIS, including symptomatic controls); ID-CNS, inflammatory diseases of the CNS (multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases), not ID-CNS, inflammatory peripheral nervous system diseases, non-inflammatory neurologic diseases and symptomatic controls

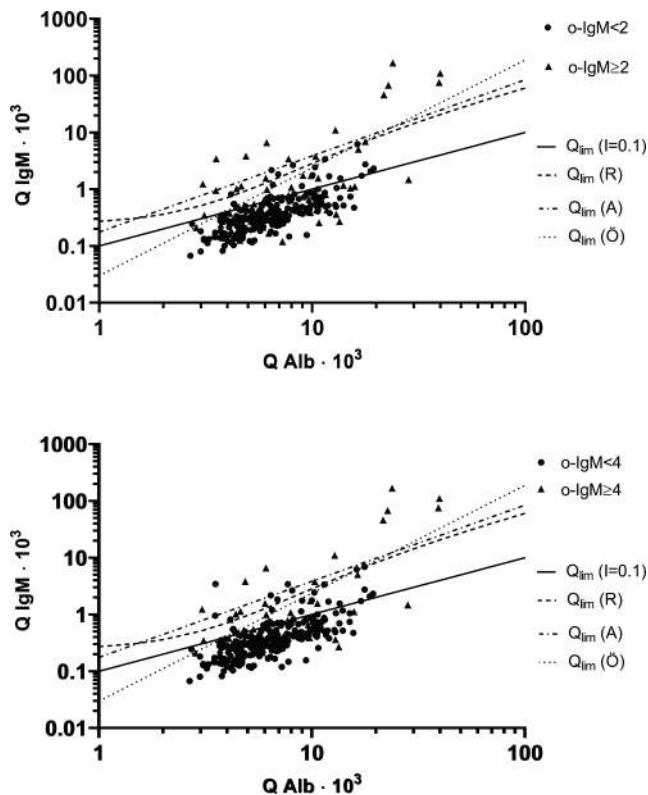


Fig. 3. CSF/serum quotient diagrams for IgM. Cut-off lines for various calculations of intrathecal synthesis are depicted: Q_{lim} according to the cut-off IgM index value (I) and formulas of Reiber (R), Auer (A) and Öhman (Ö). Results in o-IgM negative and positive subgroups at a cut-off of ≥ 2 (top) and ≥ 4 (bottom) CSF-restricted o-IgM bands.

MS Center whenever MS diagnosis is suspected. Hence, the proportion of MS patients in the Unknown diagnosis group can be estimated to be very low. On the other hand, clinicians were not blinded to the results of CSF analysis, which might have influenced diagnostic decisions in some cases. This is particularly relevant for IgG analysis that is now a part of MS diagnostic criteria. Based on the fact that 100% of OID-CNS patients in our series were o-IgG positive (a frequency much higher than expected in an unselected population of OID-CNS patients), it is obvious that o-IgG test positivity was an important reason for sending the patients from local hospitals to the University Hospital Ostrava. We do not assume this bias is relevant for IgM analysis since the relevance of intrathecal IgM synthesis for MS or OID-CNS diagnosis is not yet precisely known.

It can be objected that the exclusion of patients with unmeasurably low CSF IgM values could have affected our results. However, we felt that calculations using approximated values were invalid and should have been omitted. For the diagnosis of MS or ID-CNS, ROC curve comparisons gave similar results when including these samples (Supplemental Table S4).

We did not aim to assess the correctness of particular models for intrathecal IgM and IgG synthesis quantitation. Larger sample size with enough values at both extremes of Q_{Alb} would be required for this purpose. We have used the Reiber formula for many years mainly because of its biological plausibility, i. e. this is the only formula that is not only empirical but also theory-based [4,32], while no alternative theory concerning diffusion of blood proteins into the CSF has been published so far. However, we failed to demonstrate the superiority of any method in our consecutive series of routinely analyzed samples.

In our opinion, what is even more important is the finding that all calculations seem to have rather low sensitivity compared to the o-IgM test. Similar relation is well-known for intrathecal IgG synthesis [1,2]

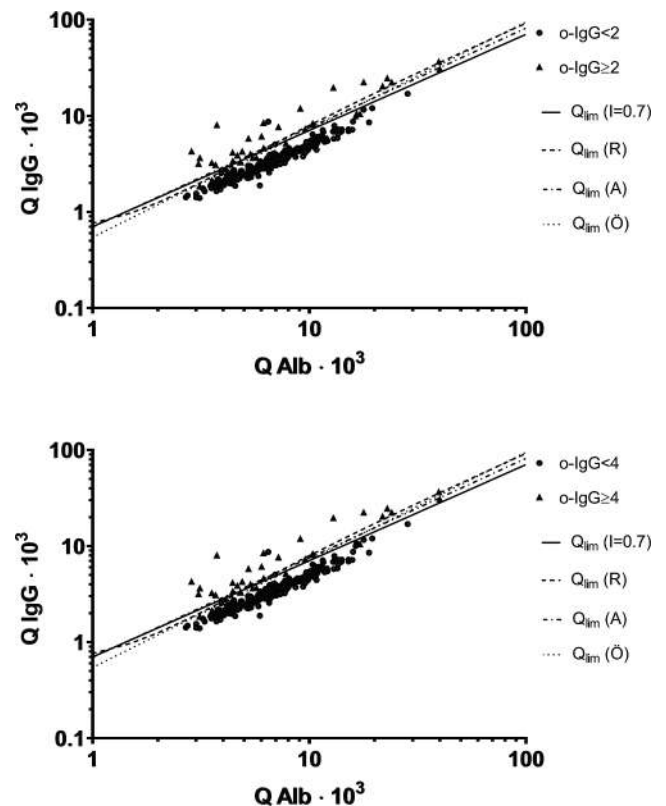


Fig. 4. CSF/serum quotient diagrams for IgG. Cut-off lines for various calculations of intrathecal synthesis are depicted: Q_{lim} according to the cut-off IgG index value (I) and formulas of Reiber (R), Auer (A) and Öhman (Ö). Results in o-IgG negative and positive subgroups at a cut-off of ≥ 2 (top) and ≥ 4 (bottom) CSF-restricted o-IgG bands. To allow direct comparison, the same group of 278 samples was used as for intrathecal IgM synthesis evaluation.

Table 4

Sensitivity and specificity of intrathecal IgG and IgM synthesis calculations at conventional cut-offs compared to the o-IgG and o-IgM tests, respectively, as *bona fide* gold standards.

Calculation	IgM			
	Cut-off 2 bands		Cut-off 4 bands	
	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity
Reiber (IF > 0%)	23.3%	97.6%	29.5%	96.2%
Auer (IF > 0%)	15.1%	99.5%	20.5%	98.7%
Öhman (IF > 0%)	26.0%	95.1%	36.4%	94.4%
IgM index (> 0.1)	42.5%	89.3%	54.5%	87.6%
IgM index ^a (> 0.196)	24.7%	97.1%	31.8%	95.7%
	IgG			
	Cut-off 2 bands		Cut-off 4 bands	
	sensitivity	specificity	sensitivity	specificity
Reiber (IF > 0%)	41.9%	99.5%	55.3%	99.6%
Auer (IF > 0%)	41.9%	99.5%	55.3%	99.6%
Öhman (IF > 0%)	46.8%	98.6%	61.7%	98.7%
IgG index (> 0.7)	43.5%	99.1%	57.4%	99.1%
IgG index ^a (> 0.647)	51.6%	98.6%	68.1%	98.7%

Values calculated from 278 samples (samples with numerous red blood cells in the CSF cytologic slide, unmeasurable CSF and/or serum IgM concentrations, or samples where any of these tests could not be performed due to limited amount of material were excluded).

^a cut-off values for IgM and IgG indices chosen from the ROC curve analysis at the specificity similar to other calculations of intrathecal synthesis where the cut-off value > 0% for intrathecal fraction (IF) is given implicitly.

Table 5
Comparison of ROC curves for prediction of o-IgM and o-IgG test positivity.

Ig	Cut-off	Calculation	AUC (95% CI)	Cut-off suggested by Youden index	Cut-off with $\geq 95\%$ specificity
IgM	≥ 2 bands	IgM index	0.698 (0.640–0.751)	> 0.094 (48.0%; 87.3%)	> 0.141 (30.1%; 95.1%)
		IgM IF (Reiber)	0.663 (0.604–0.718)	$> -130.37\%$ (49.3%; 88.3%)	$> -61.37\%$ (31.5%; 95.1%)
		IgM IF (Auer)	0.674 (0.616–0.729)	$> -262.99\%$ (50.7%; 86.8%)	$> -119.05\%$ (28.8%; 96.1%)
		IgM IF (Öhman)	0.638 (0.578–0.694)	$> -57.76\%$ (49.3%; 86.8%)	$> -3.44\%$ (30.1%; 95.1%)
	≥ 3 bands	IgM index	0.718 (0.661–0.770)	> 0.089 (58.3%; 84.4%)	> 0.155 (33.3%; 95.4%)
		IgM IF (Reiber)	0.695 (0.637–0.748)	$> -130.37\%$ (56.7%; 88.1%)	$> -41.47\%$ (31.7%; 95.9%)
		IgM IF (Auer)	0.702 (0.645–0.756)	$> -262.99\%$ (58.3%; 86.7%)	$> -119.05\%$ (33.3%; 95.9%)
		IgM IF (Öhman)	0.679 (0.620–0.733)	$> -57.76\%$ (56.7%; 86.7%)	$> 3.20\%$ (30.0%; 95.4%)
	≥ 4 bands	IgM index	0.770 (0.716–0.818)	> 0.089 (68.2%; 83.3%)	> 0.196 (31.8%; 95.7%)
		IgM IF (Reiber)	0.753 (0.698–0.802)	$> -130.37\%$ (65.9%; 86.7%)	$> 13.04\%$ (29.6%; 97.9%)
		IgM IF (Auer)	0.759 (0.705–0.808)	$> -262.99\%$ (68.2%; 85.5%)	$> -64.93\%$ (31.8%; 95.7%)
		IgM IF (Öhman)	0.739 (0.683–0.789)	$> -88.40\%$ (72.7%; 79.5%)	$> 16.69\%$ (31.8%; 97.0%)
IgG	≥ 2 bands	IgG index	0.856 (0.809–0.895)	> 0.554 (79.0%; 86.1%)	> 0.600 (61.3%; 95.8%)
		IgG IF (Reiber)	0.841 (0.793–0.842)	$> -18.63\%$ (64.5%; 94.4%)	$> -18.28\%$ (62.9%; 95.4%)
		IgG IF (Auer)	0.856 (0.809–0.895)	$> -30.23\%$ (74.2%; 89.3%)	$> -24.80\%$ (66.1%; 95.4%)
		IgG IF (Öhman)	0.850 (0.803–0.890)	$> -14.44\%$ (66.1%; 93.1%)	$> -13.01\%$ (62.9%; 95.8%)
	≥ 3 bands	IgG index	0.876 (0.831–0.912)	> 0.579 (74.1%; 92.4%)	> 0.600 (66.7%; 95.1%)
		IgG IF (Reiber)	0.872 (0.827–0.909)	$> -17.11\%$ (70.4%; 96.4%)	$> -17.11\%$ (70.9%; 96.4%)
		IgG IF (Auer)	0.878 (0.833–0.914)	$> -25.83\%$ (74.1%; 93.7%)	$> -24.62\%$ (70.4%; 95.1%)
		IgG IF (Öhman)	0.878 (0.834–0.914)	$> -14.44\%$ (74.1%; 92.9%)	$> -12.56\%$ (70.4%; 96.4%)
	≥ 4 bands	IgG index	0.922 (0.884–0.950)	> 0.579 (83.0%; 92.2%)	> 0.614 (72.3%; 96.5%)
		IgG IF (Reiber)	0.921 (0.882–0.950)	$> -17.11\%$ (80.9%; 96.5%)	$> -17.11\%$ (80.9%; 96.5%)
		IgG IF (Auer)	0.924 (0.887–0.953)	$> -25.83\%$ (83.0%; 93.5%)	$> -24.42\%$ (76.6%; 95.2%)
		IgG IF (Öhman)	0.926 (0.889–0.954)	$> -12.56\%$ (80.9%; 96.5%)	$> -12.56\%$ (80.9%; 96.5%)

IF, intrathecal fraction. Values calculated from 278 samples (samples with numerous red blood cells in the CSF cytologic slide, unmeasurable CSF and/or serum IgM concentrations, or samples where any of these tests could not be performed due to limited amount of material were excluded).

and it has been confirmed in our study. Unlike for IgG, however, the ROC curve comparison failed to detect significant differences between the AUC for o-IgM and quantitative intrathecal IgM synthesis measures in the context of clinical diagnosis. Since the relation with an unfavorable CIS/MS prognosis has been repeatedly described both for quantitative measures of intrathecal IgM synthesis and for o-IgM, it might be interesting to compare the clinical utility of these methods in the context of CIS/MS prognosis. This could not be done in our study due to low proportion of MS samples sent to our laboratory for o-IgM analysis as well as the lack of follow-up data. Similar to Villar et al. [11], we did not find significant differences in baseline EDSS between o-IgM negative and positive patients.

The issue of the number of CSF-restricted oligoclonal IgG bands used as a cut-off is frequently discussed [33–38]. While the conventional cut-off of ≥ 2 CSF-restricted bands is used in most studies, even patients with a single CSF-restricted band appear to be at an increased risk of an inflammatory CNS disease [33,34]. On the other hand, some laboratories use a higher cut-off of 3 [35] bands that was found to have

the best discriminatory value in the context of MS diagnosis [36], or even 4 bands [37]. For o-IgM, different cut-off values have not been studied so far.

The number of CSF-restricted IgM bands correlated with quantitative measures of intrathecal IgM synthesis. Albeit statistically significant, the correlation was only moderate (Spearman $\rho < 0.5$). This is not surprising since both the number of bands and their intensity reflect the quantity of intrathecal synthesis. Although quantification of bands on nitrocellulose membranes after IEF was attempted already 35 years ago [39] and similar methods have been in routine use for serum protein electrophoresis for about half a century, quantification of signal in oligoclonal bands as a percentage of the total signal in the lane has never found its way to routine CSF analysis. Our attempt to differentiate faint (+), moderate (++) and strong (+++) intrathecal IgM synthesis based on visual evaluation, taking into account both the number of bands and their staining intensity, is largely subjective and is not supposed to be reproducible between different observers or even different laboratories.

Oligoclonal IgM is technically more demanding than oligoclonal IgG analysis, and a question arises concerning the possibility of false-positive results [12,21,40]. Interlaboratory reproducibility of o-IgM analysis was studied and assessed as satisfactory [40] although Cohen κ 0.71 was inferior to that for o-IgG (κ 0.81) studied under similar conditions [41]. We believe that our results add to the evidence that the method is feasible in routine practice and its reproducibility is acceptable. Using conventional cut-off of ≥ 2 CSF-restricted bands, however, false positivities may occur. We therefore suggest to evaluate the finding of 2 or 3 CSF-restricted IgM bands as a borderline result and only the presence of 4 or more such bands as unequivocally positive, similar to the recommendation made for o-IgG by the dozen of oligoclonal band analysis Dr. Ulrich Wurster already in 2004 [38]. Evaluation of the intensity of intrathecal o-IgM synthesis might also help to eliminate false-positive findings, and the development of more exact measures than subjective visual evaluation is warranted for this purpose.

In conclusion, the non-linear formulas for intrathecal synthesis were found to be specific but rather insensitive when compared to o-IgM. No significant difference was noted in the performance of different formulas. To avoid false positive o-IgM results, we propose to evaluate samples with 2 or 3 extra-CSF IgM bands as borderline and only samples with 4 or more as definitely positive. At a cut-off of 4 bands, 61% of MS patients, but none of the controls were positive for o-IgM in our study.

CRediT authorship contribution statement

David Zeman: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Pavlna Kušnierová:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **František Všianský:** Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Katarína Reguliová:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Monika Škutová:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Ivana Woznicová:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Olga Zapletalová:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Pavel Hradílek:** Conceptualization, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Supervision.

Acknowledgements

The authors thank Dr. J. Jurčiková and Dr. K. Vítková (Dept. of Science and Research, University Hospital Ostrava) for their help in processing the manuscript and for their continuous support, Prof. Dr. D. Stejskal (Institute of Laboratory Diagnostics) for useful comments, and M. Hradecká for language correction.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.021>.

References

- [1] M. Gastaldi, E. Zardini, D. Franciotta, An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17 (1) (2017) 31–46, <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1262260>.
- [2] A.J. Thompson, B.L. Banwell, F. Barkhof, W.M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, et al., Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria, *Lancet. Neurol.* 17 (2) (2018) 162–173, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).
- [3] S. Öhman, J. Ernerudh, P. Forsberg, H. von Schenck, M. Vrethem, Improved formulae for the judgement of intrathecally produced IgA and IgM in the presence of blood CSF barrier damage, *Ann. Clin. Biochem.* 30 (5) (1993) 454–462, <https://doi.org/10.1177/000456329303000507>.
- [4] H. Reiber, Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases, *J. Neurol. Sci.* 122 (2) (1994) 189–203, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)90298-4](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)90298-4).
- [5] M. Auer, H. Hegen, A. Zeileis, F. Deisenhammer, Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula, *Eur. J. Neurol.* 23 (4) (2016) 713–721, <https://doi.org/10.1111/ene.12924>.
- [6] M.K. Sharief, G. Keir, E.J. Thompson, Glutaraldehyde-enhanced immunofixation: A sensitive new method for detecting oligoclonal immunoglobulin M, *J. Neuroimmunol.* 23 (2) (1989) 149–156, [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90034-9).
- [7] C.J. Sindic, P. Monteyne, E.C. Laterre, Occurrence of oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of neurological patients: an immunoaffinity-mediated capillary blot study, *J. Neurol. Sci.* 124 (2) (1994) 215–219, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)90329-8).
- [8] L.M. Villar, P. González-Porqué, J. Masjuan, J.C. Alvarez-Cermeño, A. Bootello, G. Keir, A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands, *J. Immunol. Methods* 258 (1–2) (2001) 151–155, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00492-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00492-6).
- [9] L.M. Villar, J. Masjuan, P. González-Porqué, J. Plaza, M.C. Sádaba, E. Roldán, et al., Intrathecal IgM synthesis in neurological diseases: Relationship with disability in MS, *Neurology* 58 (5) (2002) 824–826, <https://doi.org/10.1212/wnl.58.5.824>.
- [10] L.M. Villar, J. Masjuan, P. González-Porqué, M.D. Plaza, B.S. Sádaba, E. Roldán, M. D. Bootello, J.C. Alvarez-Cermeño, Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS, *Neurology* 59 (4) (2002) 555–559, <https://doi.org/10.1212/wnl.59.4.555>.
- [11] L.M. Villar, J. Masjuan, P. González-Porqué, J. Plaza, M.C. Sádaba, E. Roldán, et al., Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 53 (2) (2003) 222–226, <https://doi.org/10.1002/ana.10441>.
- [12] P. Perini, F. Ranzato, M. Calabrese, I. Battistin, P. Gallo, Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77 (8) (2006) 953–955, <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.086116>.
- [13] P.J.H. Jongen, G. Lycklama a Nijeholt, K.J.B. Lamers, W.H. Doesburg, F. Barkhof, W.A.J.G. Lemmens, et al., Cerebrospinal fluid IgM index correlates with cranial MRI lesion load in patients with multiple sclerosis, *Eur. Neurol.* 58 (2) (2007) 90–95, <https://doi.org/10.1159/000103643>.
- [14] L. Durante, W. Zaaraoui, A. Rico, L. Crespy, D. Wybrecht, A. Faivre, et al., Intrathecal synthesis of IgM measured after a first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis is associated with subsequent MRI brain lesion accrual, *Mult. Scler.* 18 (5) (2012) 587–591, <https://doi.org/10.1177/1352458511424589>.
- [15] D. Ferraro, A.M. Simone, R. Bedin, V. Galli, F. Vitetta, L. Federzoni, et al., Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome, *J. Neuroimmunol.* 257 (1–2) (2013) 76–81, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.01.011>.
- [16] L.M. Villar, B. Casanova, N. Ouamara, M. Comabella, F. Jalili, D. Leppert, et al., Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 76 (2) (2014) 231–240, <https://doi.org/10.1002/ana.24190>.
- [17] A. Huss, A. Abdelhak, S. Halbgebauer, B. Mayer, M. Senel, M. Otto, H. Tumani, Intrathecal immunoglobulin M production: A promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients, *Ann. Neurol.* 83 (5) (2018) 1032–1036, <https://doi.org/10.1002/ana.25237>.
- [18] C. Pfuhl, U. Grittner, R.M. Gieß, M. Scheel, J.R. Behrens, L. Rasche, et al., Intrathecal IgM production is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis, *Neurology* 93 (15) (2019) 1439–1451, <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008237>.
- [19] A. Klein, R. C. Selter, A. Hapfeimeier, A. Berthele, B. Müller-Myhsok, V. Pongratz, et al., CSF parameters associated with early MRI activity in patients with MS, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 30(4) (2019) 573, <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000573>.
- [20] R. Schneider, B. Euler, S. Rauer, Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event, *Eur. J. Neurol.* 14 (8) (2007) 907–911, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.01871.x>.
- [21] C. Stauch, H. Reiber, M. Rauchenzauner, A. Strasak, D. Pohl, F. Hanefeld, et al., Intrathecal IgM synthesis in pediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis, *Mult. Scler.* 17 (3) (2010) 327–334, <https://doi.org/10.1177/1352458510388543>.
- [22] A. Abdelhak, T. Hottenrott, C. Mayer, G. Hintereder, U.K. Zettl, O. Stich H. Tumani, CSF profile in primary progressive multiple sclerosis: Re-exploring the basics, *PLoS ONE* (12) (8) (2017) e0182647, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182647>.
- [23] J. Frau, L.M. Villar, C. Sardu, M.A. Secci, L. Schirru, D. Ferraro, et al., Intrathecal oligoclonal bands synthesis in multiple sclerosis: is it always a prognostic factor? *J. Neurol.* 265 (2) (2018) 424–430, <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8716-4>.
- [24] L.M. Villar, M.I. García-Sánchez, L. Costa-Frossard, M. Espiño, E. Roldán, D. Páramo, et al., Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis, *Arch. Neurol.* 69 (2) (2012) 191–197, <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.971>.
- [25] B. Casanova, L. Lacruz, L.M. Villar, J.A. Domínguez, M.C. Gadea, F. Gascón, et al., Different clinical response to interferon beta and glatiramer acetate related to the presence of oligoclonal IgM bands in CSF in multiple sclerosis patients, *Neurol. Sci.* 39 (8) (2018) 1423–1430, <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3442-y>.

- [26] S. Richard, V. Miossec, J.F. Moreau, J.L. Taubin, Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method, *Clin. Chem.* 48 (1) (2002) 165–173.
- [27] M.K. Sharief, G. Keir, E.J. Thompson, Intrathecal synthesis of IgM in neurological diseases: a comparison between detection of oligoclonal bands and quantitative estimation, *J. Neurol. Sci.* 96 (2–3) (1990) 131–142, [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(90\)90126-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(90)90126-8).
- [28] R. Kaiser, C.H. Lücking, Intrathecal synthesis of IgM and IgA in neurological diseases: comparison of two formulae with isoelectric focusing, *Clin. Chim. Acta.* 216 (1–2) (1993) 39–51, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90137-s](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90137-s).
- [29] D. Zeman, P. Kušnierová, [Detection of oligoclonal IgM in cerebrospinal fluid.] *Klin. Biochem. Metab.* 24 (3) (2016) 141–146.
- [30] S. Öhman, P. Forsberg, N. Nelson, M. Vrethem, An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage, *Clin. Chim. Acta.* 181 (3) (1989) 265–272, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90232-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90232-5).
- [31] D. Zeman, P. Kušnierová, J. Gottwaldová, A. Kloudová, I. Lochman, J. Ženková, et al., [Difficulties of IgM quantitation in cerebrospinal fluid.], *Klin. Biochem. Metab.* 20 (3) (2012) 136–142.
- [32] H. Reiber, D. Zeman, P. Kušnierová, E. Mundwiler, L. Bernasconi, Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams, *Clin. Chim. Acta.* 497 (2019) 153–162, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.027>.
- [33] G. Davies, G. Keir, E.J. Thompson, G. Giovannoni, The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band, A follow-up study. *Neurology.* 60 (7) (2003) 1163–1166, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000055864.08740.cb>.
- [34] D. Ferraro, D. Franciotta, R. Bedin, C. Solaro, E. Cocco, M. Santangelo, et al., A multicenter study on the diagnostic significance of a single cerebrospinal fluid IgG band, *J. Neurol.* 264 (5) (2017) 973–978, <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8480-5>.
- [35] H. Hegen, A. Zinganel, M. Auer, F. Deisenhammer, The clinical significance of single or double bands in cerebrospinal fluid isoelectric focusing. A retrospective study and systematic review, *PLoS ONE* 14 (4) (2019) e0215410, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215410>.
- [36] A. Bourahoui, J. De Seze, R. Gutierrez, B. Onraed, B. Hennache, D. Ferriby, et al., CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases, *Eur. J. Neurol.* 11 (8) (2004) 525–529, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2004.00822.x>.
- [37] A.S. Fortini, E.L. Sanders, B.G. Weinshenker, J.A. Katzmann, Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis, *Am. J. Clin. Pathol.* 120 (5) (2003) 672–675, <https://doi.org/10.1309/EM7K-CQR4-GLMH-RCX4>.
- [38] U. Wurster, The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: A follow-up study [Letter], *Neurology* 62(7) (2004) 1237. <https://doi.org/10.1212/wnl.62.7.1237>.
- [39] U. Paluch, G. Keir, S. Moyle, E.J. Thompson, Quantification of bands produced by isoelectric focusing using immunoperoxidase, *J. Clin. Pathol.* 37 (10) (1984) 1172–1176, <https://doi.org/10.1136/jcp.37.10.1172>.
- [40] M. Espiño, V. Abaira, R. Arroyo, L. Bau, C. Cámara, L. Carnpos-Ruiz, et al., Assessment of the reproducibility of oligoclonal IgM band detection for its application in daily clinical practice, *Clin. Chim. Acta.* 438 (1) (2015) 67–69, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.004>.
- [41] V. Abaira, J.C. Alvarez-Cermeño, R. Arroyo, C. Cámara, B. Casanova, S. Cubillo, et al., Utility of oligoclonal IgG detection for MS diagnosis in daily clinical practice, *J. Immunol. Methods.* 371 (1–2) (2011) 170–173, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.009>.

Quantitation of free light chains in the cerebrospinal fluid reliably predicts their intrathecal synthesis

David Zeman^{1,2}, Pavlína Kušnierová¹, Vladimír Bartoš¹, Pavel Hradílek²,
Barbora Kurková² and Olga Zapletalová²

Abstract

Background: The results of free light chains quantitation in the cerebrospinal fluid were recently compared with the presence of cerebrospinal fluid-restricted oligoclonal IgG, but not oligoclonal free kappa light chains and oligoclonal free lambda light chains. We therefore aimed to compare the performance of the quantitative tests with the qualitative one for the same molecule.

Methods: Seventy-five paired cerebrospinal fluid and serum samples were analysed for oligoclonal IgG, oligoclonal free kappa light chains and oligoclonal free lambda light chains. Cerebrospinal fluid and serum free kappa and lambda light chains were quantified using Freelite™ kits on SPA Plus analyzer. ROC curves were analysed for the prediction of intrathecal synthesis and compared for cerebrospinal fluid concentration, cerebrospinal fluid/serum quotient (Q_{fLC}) and index ($Q_{fLC}/Q_{Albumin}$). The presence of cerebrospinal fluid-restricted oligoclonal free kappa light chains and oligoclonal free lambda light chains bands was used as reference.

Results: No statistically significant differences were observed among cerebrospinal fluid concentration, Q_{fLC} and index for the prediction of free light chain intrathecal synthesis. Each parameter was able to predict the occurrence of cerebrospinal fluid-restricted oligoclonal free light chain bands (AUCs 0.932–0.999). However, we noted elevated cerebrospinal fluid free light chain concentrations in the absence of cerebrospinal fluid-restricted oligoclonal free light chain bands in two patients with very high serum free light chain values.

Conclusions: Quantitation of cerebrospinal fluid free light chains reliably predicts their intrathecal synthesis. Yet, cerebrospinal fluid/serum quotient may still be preferred to correct for high serum free light chain concentrations. An appropriate formula should be sought to correct for blood–cerebrospinal fluid barrier status.

Keywords

Cerebrospinal fluid, free light chains, oligoclonal IgG

Accepted: 26th February 2015

Introduction

Several recent reports propose cerebrospinal fluid (CSF) free light chain (fLC) measurement as a valuable marker of intrathecal immunoglobulin synthesis that has predictive value similar to oligoclonal IgG (o-IgG).^{1–4} Up to now, CSF fLC measurements have only been compared to o-IgG as a gold standard. This approach, however, does not compare exactly

¹Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, Ostrava-Poruba, Czech Republic

²Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, Ostrava-Poruba, Czech Republic

Corresponding author:

David Zeman, Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, Ostrava-Poruba 708 52, Czech Republic.

Email: david.zeman@fno.cz

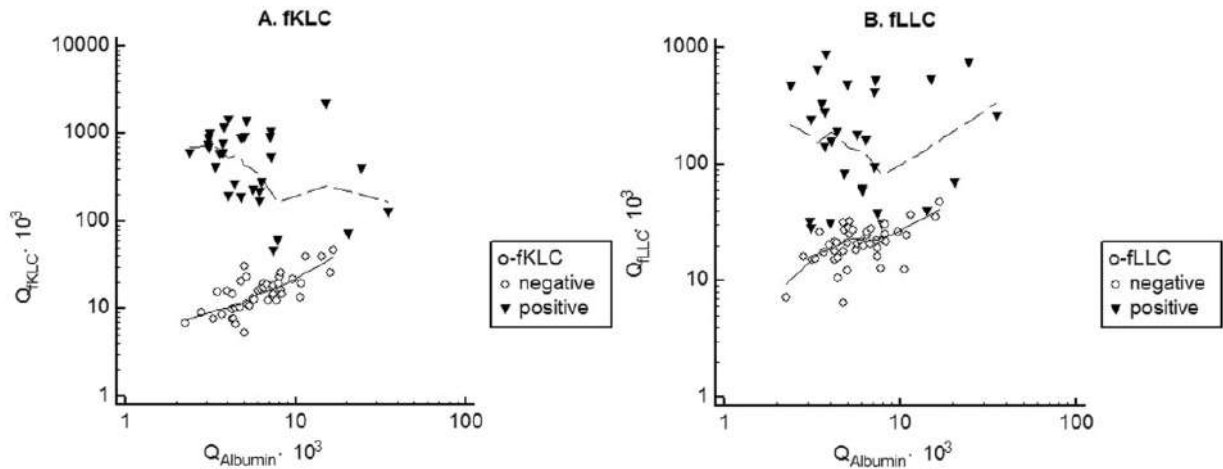


Figure 1. Quotient diagrams for fKLC (A) and fLLC (B) with local regression smoothing trend lines.

The trend lines for o-fLC positive subgroups show that Q_{fLC} depends almost exclusively on the amount of intrathecally synthesised fLC in these cases, with negligible contribution of the blood-CSF barrier status ($Q_{Albumin}$). The trend lines for o-fLC negative subgroups show that hyperbolic function would not fit the data perfectly. Nevertheless, direct relationship between $Q_{Albumin}$ and Q_{fLC} is obvious in the o-fLC negative subgroups ($r = 0.725$, $P < 0.0001$ for fKLC; $r = 0.527$, $P = 0.0002$ for fLLC) implicating that an appropriate formula should be used to correct for the blood–CSF barrier status.

like with like. We therefore aimed to compare the performance of the quantitative tests with the qualitative one for the same molecule, i.e. oligoclonal free kappa light chains (fKLC) and oligoclonal free lambda light chains (fLLC).

Methods

Seventy-five paired CSF and serum samples under o-IgG analysis were also analysed for o-fKLC and o-fLLC, as described elsewhere.⁵ Samples were then kept frozen at -30°C until quantitative fLC measurements. CSF and serum fKLC and fLLC concentrations were determined on the SPA Plus turbidimetric analyser using dedicated Freelite™ kits (The Binding Site Ltd.) CE marked for CSF analysis (Ref. No. LK016.L.S and LK018.L.S.). Statistical analysis was performed using MedCalc Software. Presence of CSF-restricted o-fLC and o-IgG bands was used as a reference. CSF samples measured as $<0.1\text{ mg/L}$ were analysed as 0.09 mg/L . P values < 0.05 were considered significant.

Results

Using cut-offs for CSF-restricted bands (≥ 4 for IgG, ≥ 6 for fKLC and ≥ 2 for fLLC) determined in our laboratory,⁵ 26 samples were positive for o-IgG, 30 for o-fKLC and 28 for o-fLLC. All samples positive for o-IgG were positive for o-fKLC; three samples positive for o-IgG were negative for o-fLLC and five samples negative for o-IgG were positive for o-fLLC.

CSF fKLC concentrations varied between <0.1 and 1.33 mg/L (median: 0.20 ; interquartile range: 0.11 – 0.27)

in the o-fKLC negative group and between 0.80 and 16.90 mg/L (6.62 ; 2.71 – 11.61) in the o-fKLC positive group. CSF fLLC concentrations varied between <0.1 and 1.44 mg/L (0.22 ; 0.17 – 0.29) in the o-fLLC negative group and 0.24 and 12.03 mg/L (1.55 ; 0.56 – 3.08) in the o-fLLC positive group. Among patients without CSF-restricted o-fLC bands, one patient had high CSF (1.33 and 1.06 mg/L) as well as serum (97.63 and 84.48 mg/L) fKLC and fLLC concentrations and one patient with detectable fLLC paraproteinaemia had high CSF (1.44 mg/L) and serum (223.05 mg/L) fLLC values (see Supplementary File 1).

Analysis of ROC curves for the prediction of appropriate o-fLC positivity showed no significant differences between CSF fLC concentration only or CSF/Serum Quotient (Q_{fLC}) or index ($Q_{fLC}/Q_{Albumin}$). AUCs for fKLC and fLLC were 0.998 (95% confidence interval: 0.948 – 1.000) and 0.954 (0.879 – 0.989), respectively, for CSF concentrations; 0.999 (0.949 – 1.000) and 0.977 (0.913 – 0.998) for Q_{fLC} ; 0.991 (0.935 – 1.000) and 0.932 (0.848 – 0.997) for fLC index. Associated criteria were as follows: CSF fKLC $> 0.56\text{ mg/L}$; CSF fLLC $> 0.43\text{ mg/L}$; $Q_{fKLC} > 39.2 \cdot 10^{-3}$; $Q_{fLLC} > 36.3 \cdot 10^{-3}$; fKLC index > 6.07 ; fLLC index > 6.68 .

When ROC curves for CSF fLC quantitative data as predictors of intrathecal IgG synthesis were compared, CSF fKLC performed best: AUC = 0.997 (95% confidence interval: 0.946 – 1.000 ; criterion: $> 1.38\text{ mg/L}$), followed by Q_{fKLC} : AUC = 0.994 (0.940 – 1.000 ; $> 70.7 \cdot 10^{-3}$), fKLC index: AUC = 0.989 (0.931 – 1.000 ; > 7.67) and fLLC index: AUC = 0.978 (0.914 – 0.998 ; > 5.58). AUCs for CSF fKLC, Q_{fKLC} , fKLC index and fLLC index proved significantly larger than those

for CSF fLLC and Q_{fLLC} ; other differences were not significant (see Supplementary File 2).

CSF but not serum fKLC/fLLC ratio was significantly higher in samples positive for o-IgG (median, 3.137; interquartile range, 1.929–16.482) as compared to negative ones (0.938; 0.679–1.157) (Mann-Whitney test, $P < 0.0001$).

Although fKLC measurements were able to predict intrathecal IgG synthesis, such a prediction is not perfectly appropriate since o-fLC are sometimes detected in the absence of o-IgG and o-fKLC are more frequently observed in inflammatory CNS diseases than o-fLLC.⁵ Nevertheless, we proved that CSF fLC quantitation can predict intrathecal fLC synthesis. Although we did not aim at diagnosis-related analysis, it is of note that two patients with CNS inflammation proved positive for both o-fLC, while negative for o-IgG; 19/20 patients with MS or CIS (95%) were both o-IgG and o-fKLC positive and 17 (85%) were also o-fLLC positive. There was almost perfect agreement between qualitative and quantitative fLC data in this subgroup (see Supplementary File 1).

fLC index did not perform better than Q_{fLC} or CSF fLC only. This led us to investigate the relation of Q_{fLC} to $Q_{Albumin}$ in more detail (Figure 1).

Proposing Reiber's hyperbolic function for the estimation of intrathecal fLC synthesis^{1,2} is a misconception.⁶ Since fLCs have a smaller molecule than albumin, theoretically an inverse function should be used i.e.

$$Q_{fLC} = \sqrt{\left[\frac{b^2}{a^2} \cdot (Q_{Alb} + c^2) - b^2 \right]} = b \sqrt{\left(\frac{Q_{Alb} + c}{a} \right)^2 - 1}$$

Larger data set, however, is needed to verify our hypothesis (see Supplementary File 3).

Conclusions

Quantitation of fLCs in CSF enables reliable prediction of intrathecal fLC synthesis. Q_{fLC} may be preferred to correct for elevated serum fLC concentrations. Correction for blood–CSF barrier status seems reasonable, but the most suitable formula remains to be determined. We further suggest that both fLC be analysed together because of substantial differences in the CSF fKLC/fLLC ratios among o-fLC positive patients that might be of some (although yet unknown) significance.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Dr. Ulrich Wurster (CSF Laboratory, Medizinische Hochschule Hannover) for fruitful discussions and suggestions; to Iлона Faruzelová, Lenka Fürstová, Renata Malečková and Olga Michnová for their

skillful technical assistance; and to Monika Hradecká for language corrections.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Funding

This study was supported by MH CZ – DRO-FNOs/2014.

Ethical approval

The study was approved by University Hospital Ostrava Ethics Committee (Ref. No. 319/2014).

Guarantor

DZ.

Contributorship

DZ and PK conceived the study. DZ and VB performed the experiments. DZ, PK and VB analysed the data. VB checked statistical calculations. PH, BK and OZ provided clinical diagnoses and were involved in gaining ethical approval and sample collection. DZ wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed substantially to the interpretation of data, edited the manuscript and approved the final version of the manuscript.

References

1. Fischer C, Arneth B, Koehler J, et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004; 50: 1809–1813.
2. Arneth B and Birklein F. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 2009; 119: 39–44.
3. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, et al. Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS. *PLoS One* 2014; 9: e89945. DOI: 10.1371/journal.pone.0089945.
4. Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemidou A, et al. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. Epub ahead of print 8 Aug 2014. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.08.003.
5. Zeman D, Hradilek P, Kušnierová P, et al. Oligoclonal free light chains as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Epub ahead of print 5 Dec 2014. DOI: 10.5507/bp.2014.058.
6. Reiber H. Free light chains in CSF – pushing a method with biased interpretations. *Acta Neurol Scand* 2009; 120: 445–446.

RESEARCH ARTICLE

Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting

David Zeman^{1,2*}, Pavlína Kušnierová¹, Zdeněk Švagera¹, František Všianský¹, Monika Byrtusová³, Pavel Hradílek², Barbora Kurková², Olga Zapletalová², Vladimír Bartoš¹

1 Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba, Czech Republic, **2** Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba, Czech Republic, **3** Institute for Healthcare Disciplines, St. Elisabeth University of Health and Social Work in Bratislava, Palackého 1, P.O. Box 104, 810 00 Bratislava, Slovak Republic

* david.zeman@fno.cz



OPEN ACCESS

Citation: Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, Všianský F, Byrtusová M, Hradílek P, et al. (2016) Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting. PLoS ONE 11(11): e0166556. doi:10.1371/journal.pone.0166556

Editor: Güher Saruhan-Direskeneli, Istanbul University, TURKEY

Received: May 26, 2016

Accepted: October 31, 2016

Published: November 15, 2016

Copyright: © 2016 Zeman et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Relevant raw data and sample blots are available from the Dryad database, doi:10.5061/dryad.8tk26. Relevant processed data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was supported by the grant of the Ministry of Health of the Czech Republic (MH CZ - DRO-FNOs/2014). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Objectives

We aimed to compare various methods for free light chain (fLC) quantitation in cerebrospinal fluid (CSF) and serum and to determine whether quantitative CSF measurements could reliably predict intrathecal fLC synthesis. In addition, we wished to determine the relationship between free kappa and free lambda light chain concentrations in CSF and serum in various disease groups.

Methods

We analysed 166 paired CSF and serum samples by at least one of the following methods: turbidimetry (Freelite™, SPA_{PLUS}), nephelometry (N Latex FLC™, BN ProSpec), and two different (commercially available and in-house developed) sandwich ELISAs. The results were compared with oligoclonal fLC detected by affinity-mediated immunoblotting after isoelectric focusing.

Results

Although the correlations between quantitative methods were good, both proportional and systematic differences were discerned. However, no major differences were observed in the prediction of positive oligoclonal fLC test. Surprisingly, CSF free kappa/free lambda light chain ratios were lower than those in serum in about 75% of samples with negative oligoclonal fLC test. In about a half of patients with multiple sclerosis and clinically isolated

Competing Interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: The Binding Site Company provided Hevylite antibodies and Hevylite diagnostic kits free of charge to the University Hospital Ostrava for research use. These reagents, however, were not used in this study and the provision of these antibodies has no impact on the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. All reagents used in this study were purchased under standard pricing conditions. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

syndrome, profoundly increased free kappa/free lambda light chain ratios were found in the CSF.

Conclusions

Our results show that using appropriate method-specific cut-offs, different methods of CSF fLC quantitation can be used for the prediction of intrathecal fLC synthesis. The reason for unexpectedly low free kappa/free lambda light chain ratios in normal CSFs remains to be elucidated. Whereas CSF free kappa light chain concentration is increased in most patients with multiple sclerosis and clinically isolated syndrome, CSF free lambda light chain values show large interindividual variability in these patients and should be investigated further for possible immunopathological and prognostic significance.

Introduction

Although the presence of free kappa light chains (fKLC) in the cerebrospinal fluid (CSF) of multiple sclerosis (MS) patients was already assumed in 1974 [1], only recently had they been widely advocated as a tool in the laboratory support of MS diagnosis or to estimate the probability of developing MS in patients after the first demyelinating event, the so-called clinically isolated syndrome (CIS) [2–10]. Already in the 1980s and 1990s, several qualitative [11–17] and quantitative [18–22] methods were introduced for the assessment of free kappa (fKLC) as well as lambda (fLLC) light chains in the CSF, but none of them have reached wide acceptance due to labouriousness and possibly also lack of standardisation. The development of turbidimetric/nephelometric free light chain (fLC) assays for serum analysis [23] and subsequent introduction of these tests into clinical practice for the diagnosis and monitoring of patients with plasma cell dyscrasias at the beginning of the 21st century [24, 25] opened a more convenient way to fLC quantitation not only in serum and urine, but also in CSF. Nevertheless, fLC concentrations in CSF are much lower than those in serum, which made the development of CSF assays quite challenging.

Already in 2004 Fischer et al. published a study on the use of Freelite™ for CSF fKLC measurement on Siemens BN II analyser [26]. One year later, Desplat-Jégo et al. [27] published the values for CSF fKLC as well as fLLC using the same reagents on the same analyser. The CSF fKLC concentration measured in the non-inflammatory subgroup was substantially higher, as compared to the previous study, and CSF fLLC levels were also surprisingly high in this subgroup. Until 2014, all of these adaptations of Freelite fLC assays had been off-label. Recently, The Binding Site Company has introduced CE marked kits designed for CSF fKLC as well as fLLC measurement. The same is hopefully expected in the near future for N Latex FLC kits by Siemens introduced for serum fLC measurement in 2011 [28].

However, several problems persist. First, there is still no internationally recognised primary standard. The source of most commercially available purified fLC is either serum or urine of patients with fLC paraproteinaemia or Bence Jones paraproteinuria, respectively. The Binding Site primary standards are light chains purified from intact immunoglobulins by reduction and acetylation, which has been criticised by Nakano et al., who proposed a purification procedure for polyclonal fLC from human urine as an alternative for standard preparation [29]. Normal serum values obtained using this standard were much higher (43.5 ± 12.0 mg/L for fKLC and 55.2 ± 17.9 mg/L for fLLC) than those obtained earlier by the same research group

with the same ELISA method using purified human myeloma fLC standards (25.7 ± 10.5 mg/L and 4.34 ± 2.0 mg/L for fKLC and fLLC, respectively) [30]. Nevertheless, the values obtained by the same group using the same (monoclonal) standards but different ELISA method with two anti-fLC specific antibodies [31] gave even more different results (3.11 ± 1.18 mg/L and 2.30 ± 1.03 mg/L for fKLC and fLLC, respectively). These discrepancies might be related to the second problem of fLC assays: even minor cross-reactivities of the antibodies with bound light chains could result in significant overestimation of fLC in biological material where the concentration of immunoglobulins is approximately a thousand times larger than that of the fLC [32]. In addition, it has been shown that some antibodies employed in fLC assays detect better fLC dimers rather than monomers, while the degree of fLC dimerisation can vary under pathological conditions [33].

Third, all of the fLC tests have primarily been developed to help in the diagnosis and monitoring of plasma cell dyscrasias, while their performance in other settings has not yet been sufficiently validated.

Finally, fLC concentrations in normal CSF are often so low that they cannot be measured even by the modifications of the original assay. Even with latex particle enhancement, turbidimetry or nephelometry simply come to their limits on principal grounds at concentrations below 0.1 mg/L.

Reports on the diagnostic performance of CSF fKLC measurement in the context of MS diagnosis are extraordinarily consistent. Almost all studies showed performance similar to, or even marginally better than, the detection of oligoclonal IgG bands, irrespective of what the qualitative or quantitative methods were used and whether CSF fKLC concentration, CSF/Serum quotient, fKLC index (fKLC quotient/Albumin quotient) or any kind of non-linear relationship between fKLC quotient and albumin quotient was used for evaluation. The value of CSF fLLC measurement is less clear. While the earliest reports found intrathecal fLLC synthesis more frequently than that of fKLC [11, 12, 17], the reverse is observed in almost all later studies, with one notable exception [34]. Some groups were unable to develop a suitable fLLC assay [20, 35]. Other groups failed to report their fLLC results although they had apparently performed the CSF fLLC measurement [9] making one guess that the relative scarcity of fLLC data might be caused by some methodical problems and consequently a publication bias.

We therefore aimed at choosing the most suitable method for the routine detection of intrathecal fLC synthesis. After we had successfully introduced oligoclonal fLC detection [36, 37], we looked for a quantitative method for comparison and possibly monitoring purposes. Our sandwich ELISA, which was developed during several years, is based on the same principle as the o-fLC test [38]. After being CE marked for CSF fLC analysis, we started to use the Freelite assay in our laboratory [39] and aimed to compare it with other commercially available or in-house developed tests. The present paper is intended to report the analysis of such a comparison and to point to some questions that arose during this research.

Materials and Methods

Patients and samples

Paired CSF and serum samples of 166 patients were included in the analysis. We categorised the patients into diagnosis groups as follows: 1. multiple sclerosis (MS; $n = 17$), 2. clinically isolated syndrome (CIS; $n = 30$), 3. other inflammatory neurological diseases (OIND; $n = 20$), 4. non-inflammatory neurological diseases (NIND; $n = 57$), 5. no evidence of organic nervous system disease (symptomatic controls according to the definition of Teunissen *et al.* [40]; $n = 18$), and 9. unknown or uncertain diagnoses ($n = 24$). Three CIS patients had asymptomatic gadolinium-enhancing lesions on brain magnetic resonance imaging (MRI) defining

definite MS in the latest version of McDonald's diagnostic criteria [41] at the time of lumbar puncture. Nevertheless, the patients were still categorised within the CIS group for the purpose of this study because they experienced the first attack of the disease shortly before the time of lumbar puncture. Other eight CIS patients progressed into definite MS during the period of sample recruitment (May 2014–August 2015) or data analysis (September–October 2015). The diagnoses in the OIND group comprised meningoencephalitis ($n = 3$), encephalitis ($n = 1$), acute disseminated encephalomyelitis ($n = 1$), myelitis ($n = 2$), neuroborreliosis ($n = 2$), neurosyphilis ($n = 1$), neurolupus ($n = 1$), neuromyelitis optica spectrum disease ($n = 1$), plexitis ($n = 1$) and immune-mediated polyneuropathies ($n = 7$).

Patients with MS together with those CIS patients that fulfilled the recent definite MS criteria at the time of lumbar puncture or had progressed into definite MS before the diagnosis data were collected and analysed formed the MS group ($n = 28$) to be compared with the non-MS group consisting of patients of the groups 3, 4 and 5 ($n = 95$). For the comparison between inflammatory neurological diseases (IND) and non-inflammatory neurological diseases (NIND), we compared the MS group described above plus patients of the group 3 ($n = 48$) against patients in the groups 4 and 5 ($n = 75$). CIS patients that did not progress into definite MS during the study period as well as patients with an unknown or uncertain diagnosis were excluded from these analyses.

CSF was drawn by lumbar puncture and venous blood by venipuncture under standard conditions. Within one week after CSF withdrawal, immediately after all routine tests including oligoclonal IgG detection had been performed, paired CSF and serum samples were frozen to -30°C and thawed only once just before the fLC quantitative analysis. CSF storage at $+2$ to $+8^{\circ}\text{C}$ for up to 7 days is allowed in the package insert of the Freelite SPA_{PLUS} kits (method A, see below). Additionally, we have tested 11 CSF samples frozen either immediately or after 7 days at $+2^{\circ}\text{C}$ to $+8^{\circ}\text{C}$ and found only marginal decrease of fKLC concentrations and no decrease of fLLC concentrations (detailed data are available from Dryad, doi: [10.5061/dryad.8tk26](https://doi.org/10.5061/dryad.8tk26)). For oligoclonal fLC detection, an aliquot was kept at $+2$ to $+8^{\circ}\text{C}$ for up to 20 days. We have previously reported that oligoclonal fLC patterns remain stable during this period [37].

All the patients signed the informed consent for anonymised use of the surplus of the fluids for research purposes. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Ostrava (Ref. No. 319/2014).

Methods

Free light chain quantitative assays. (A) Turbidimetric assay on SPA_{PLUS} with Freelite Kappa SPA_{PLUS} kit and Freelite Lambda SPA_{PLUS} kit (Cat. No. LK016.L.S and LK018.L.S, respectively, The Binding Site Ltd., Birmingham, UK). These tests use polyclonal sheep antibodies coated onto polystyrene latex. Calibrators are serum-based. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. CSF is analysed neat and if the concentration measured exceeds that of the highest standard, the analysis is repeated after manual dilution 1/10. The assay uses an extrapolated calibration curve with triplicate measurement of blank and standard 1 (lot-specific, about 0.35 mg/L for fKLC and 0.45 mg/L for fLLC), enabling measurement down to 0.1 mg/L. Values lower than 0.1 mg/L were analysed as 0.09 mg/L in this study. The highest calibrator has concentration about 16 mg/L (lot-specific) for both fKLC and fLLC.

(B) Nephelometric assay on BN ProSpec with N Latex FLC kit (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany, catalogue numbers OPJA03–OPJF03). The assay uses a mixture of mouse monoclonal antibodies covalently coupled to polystyrene particles. Standards contain purified polyclonal fLC in PBS with 1% human serum albumin [28]. Based on our preliminary experiments, the lowest calibration point was deleted for CSF fKLC

analysis on our request by the Siemens technician in order to avoid too many repetitive dilutions. Then the calibration curve spanned the range between 0.0616 and 1.97 mg/L for CSF fKLC, 0.0308 and 0.985 mg/L for Serum fKLC and 0.104 and 3.32 mg/L for both CSF and Serum fLLC. CSF is analysed neat and as soon as the signal exceeds that of the highest standard, automatic dilutions 1/5, 1/20 and 1/100 are performed by the instrument until the measured signal falls within that of the standards. Serum is diluted 1/100 for fKLC and 1/20 for fLLC analysis.

(C) Human Immunoglobulin Free Light Chains Kappa and Lambda ELISA kit (BioVendor-Laboratori medicina a.s., Brno, Czech Republic, Cat. No. RD194088100R). The wells are pre-coated with monoclonal anti-human immunoglobulin fKLC or fLLC antibodies. The standards are human serum based. CSFs were diluted 1/2 (or more, if appropriate) and sera 1/200. The test was performed according to manufacturer's instructions. Both standards and samples were analysed in duplicate. The manufacturer provides no information concerning the source of antibodies and it is not clear whether the second antibody is anti-free light chain specific or whether it detects free as well as bound light chains. Six calibrators prepared by subsequent two-fold dilutions span the concentration range 10–320 µg/L for fKLC and 17.5–560 µg/L for fLLC.

(D) In-house ELISA. Microtiter plates (F96MaxiSorp F96, Nunc A/S, Roskilde, Denmark, Cat. No. 442404) were coated either with 0.75 mg/L anti-human free kappa light chain antibody (DAKO, Glostrup, Denmark, Cat. No. A0100) or 0.30 mg/L anti-human free lambda light chain antibody (DAKO, Cat. No. A0101) diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5 ± 0.1 . The plates were covered with paraffin foil and incubated for 18–48 hours in 4°C. Next, plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.3 ± 0.1)-0.05% Tween 20 (PBST) and blocked with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V receptor grade; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany, Cat. No. 11924) in PBST for 75 minutes. CSF and serum were diluted with 0.2% (w/v) BSA in PBST. Usual dilution was 1/10 for CSF and 1/1000 for serum. Samples with high or low fLC content were diluted as appropriate in order for the signal to fall within the calibration curve. For calibration, monoclonal free light chains (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA, Cat. No. P080-126 and P080-127) were used. Seven two-fold dilutions (concentration range between 1.25 and 80.00 µg/L for fKLC and 2.5 and 160.0 µg/L for fLLC) were prepared. The plate was washed 5 times with PBST. Standards and samples were applied in duplicate and the plate was incubated for 2 hours in room temperature. Next, the plate was washed 5 times with PBST, while the biotinylated anti-fLC antibody prepared as described earlier [36] diluted 1/10,000 (0.4 mg/L) in 0.2% BSA. After 90-minute incubation, decantation and washing, horseradish peroxidase streptavidin (ELISA grade, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, Cat. No. SA-5014) diluted 1/750 was applied and the plate was incubated for 40 minutes and washed as described above. Finally, TMB one-step substrate system (DAKO, Cat. No. S159985) was applied and the plate was incubated until suitable colour intensity developed (18–20 minutes). After stopping the reaction with 50 µl of 1M H₂SO₄, the optical density was read by DSX ELISA automatic analyser (Dynex, Buřtřhrad, Czech Republic). The 4-parameter calibration curve was constructed using the analyser software.

(E) In-house ELISA as described in (D) but using appropriately diluted (1/200) Freelite standards 1–6. The 4-parameter calibration curve was constructed using the in-house developed programme. Calibration range was about 1.8 and 80 µg/L for fKLC and 2.25 and 80 µg/L for fLLC with slight lot-to-lot variations.

Our sandwich ELISA was developed during several years [38] and uses a principle that is similar to the method of qualitative detection of oligoclonal fLC bands by means of affinity-mediated immunoblotting, described by Sindic and Laterre [16] and later modified by us [36,

37]. Both intra- and interassay coefficients of variations (CVs) were determined for Freelite control samples. In addition, interassay CVs were determined in several pooled CSF and serum samples. Recovery was determined by spiking CSF and serum samples with 10 vol.% of either Bethyl monoclonal light chains or Freelite serum-based standard. Details concerning analytical characteristics of the in-house methods are available from Dryad, doi: [10.5061/dryad.8tk26](https://doi.org/10.5061/dryad.8tk26)

Detection of oligoclonal fLC (reference method). Isoelectric focusing (IEF) in 1.2% agarose gels containing 12% sorbitol (interelectrode distance 8.5 cm, limits 200 V/cm, 100 mA, 10 W) was carried out on Multiphor II apparatus (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) at 10°C for 1,200 Vh. 7.5 µl of the respective monoclonal fLC protein (Bethyl, Cat. No. P080-126 for fKLC and P080-127 for fLLC) diluted to 2.0 and 0.2 mg/L were run as positive controls, while intravenous immunoglobulin preparation (Flebogamma, Instituto Grifols S.A., Barcelona, Spain, or Kiovig, Baxter AG, Wien, Austria) diluted to 250 or 500 mg/L IgG was run as a negative control. CSF samples were used neat and serum samples were diluted 1/100. All dilutions were performed with 0.75% saline. Paired CSF and serum samples were applied side by side using applicator strips (Serva, Cat. No. 42899). After IEF, fLC were blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham™ Hybond ECL, Cat. No. RPN303D, or Amersham™ Protran™ Premium, Cat. No. 10600003, GE Healthcare, pore size 0.45 µm) precoated with anti-fLC antibodies (DAKO, Cat. No. A0100 for fKLC and A0101 for fLLC) and blocked with 3% BSA in tris-buffered saline (75 mM TBS, pH 7.5 ± 0.1) for 60 minutes. Next, membranes were washed briefly in phosphate-buffered saline, followed by the fixation of proteins on the membrane with 0.25% glutardialdehyde for 15 minutes at 4°C. Then, the membranes were briefly rinsed in deionised H₂O, washed 3 times in TBS, re-blocked with 0.3% BSA in TBS for 15–20 minutes, washed once with TBS and incubated with biotin-labelled anti-fLC antibody (diluted to 5 mg/L) for 105 ± 5 minutes. After washing once in TBS, 3 times in TBST and 2 times in TBS, incubation followed with Alkaline phosphatase streptavidin (Vector, USA, Cat. No. SA-5100) diluted 1/750 for 50 minutes. Next, the membranes were washed twice in TBS, 3 times in TBST and 2 times in TBS. Finally, colour reaction was developed using Alkaline Phosphatase Substrate IV Kit–BCIP/NBT (Vector, USA, Cat. No. SK-5400) for 30 minutes. Membranes were then washed in TBS for 5 minutes and in deionised water for 1–2 minutes. After being held for 1 minute in a vertical position to let the water drop out, the membranes were dried overnight between 2 sheets of filter paper covered with a glass plate.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using MedCalc statistical software version 14.12.0 (MedCalc software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014). Kolmogorov-Smirnov test was used for the assessment of normality whenever appropriate. Differences between the methods were assessed by means of Spearman's correlation coefficient, log-log scatter diagrams, Passing and Bablok regression and Bland-Altman plots. ROC curves were analysed and compared, if appropriate, for the prediction of a positive o-fLC test as well as the MS or IND diagnosis. Correlations between categorical variables (o-IgG and o-fLC) were investigated by the Chi-square test.

Results

Oligoclonal IgG and oligoclonal fLC results

The results of these tests in patients within individual diagnosis groups, MS/non-MS and IND/NIND groups are provided in [S1 Table](#). Only 1 out of 92 patients negative for o-fKLC was positive for o-IgG and o-fLLC. Out of 74 patients positive for o-fKLC, 18 were o-IgG negative and 22 were o-fLLC negative. Out of 53 patients positive for o-fLLC, 8 were o-IgG negative. The

correlations between the results of o-IgG, o-fKLC and o-fLLC tests were significant (chi-square test, all P values <0.0001). Representative examples of o-fLC detection using our IEF/AIB method are shown in [S1 Fig](#) (the original blots from which this figure was combined are available from Dryad, doi:[10.5061/dryad.8tk26](https://doi.org/10.5061/dryad.8tk26)).

Quantitative method comparison

The comparison of CSF/Serum quotients determined by various methods is presented in [Fig 1](#). For in-depth comparison of CSF and serum concentrations as well as CSF/Serum quotients see Tables A-C in [S1 File](#), Figures A-F in [S2 File](#) and Figures A-F in [S3 File](#). Both systematic and proportional differences occurred. The largest differences were observed between the results of the commercially available ELISA method in the CSF that were much lower than those of all other tests. Nevertheless, the obtained concentrations were comparable with those published previously [9]. Serum fLLC were measured much higher by nephelometry using N Latex FLC kit than by turbidimetry using Freelite assay, although there was no significant difference between the two methods when measuring fLLC in CSF.

To get some insight into the possible reasons of differences among the methods used, we analysed standards used in the individual assays by the in-house ELISA method. Optical densities of the standards diluted to similar fLC concentrations differed substantially, especially in the case of fKLC standards. For more details see the [S2 Fig](#).

Correlation between fLC quotient and albumin quotient

In the group of patients with negative o-fKLC test (<2 CSF-restricted fKLC bands, $n = 87$), a clear correlation could be seen between fKLC quotient and albumin quotient ($r = 0.6028$, 95% CI 0.4491–0.7218, $P < 0.0001$), while the absence of such a correlation was obvious in the CSF o-fKLC positive group ($n = 70$, $r = -0.1322$, 95% CI -0.3561–0.1060, $P = 0.2752$). Also, the presence of the correlation between fLLC quotient and albumin quotient in the o-fLLC negative group ($n = 109$, $r = 0.5171$, 95% CI 0.3645–0.6427, $P < 0.0001$) and the absence of this correlation in the o-fLLC positive group ($n = 49$, $r = -0.04943$, 95% CI = -0.3261–0.2350, $P = 0.7359$) was obvious ([S3 Fig](#)).

ROC curves for the prediction of a positive o-fLC test

ROC curves for the prediction of a positive CSF-restricted o-fLC test showed AUCs >0.9 except for fKLC index using ELISA BioVendor assay and fLLC index using all the three

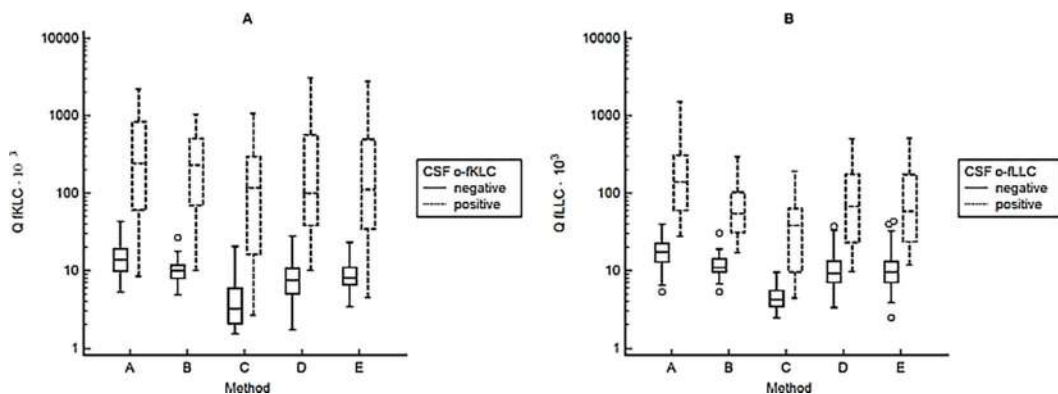


Fig 1. CSF/Serum quotients of fKLC and fLLC determined by methods (A)–(E).

doi:[10.1371/journal.pone.0166556.g001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166556.g001)

ELISAs employed with AUCs 0.87 in all these four cases. There was no significant difference in the AUCs between CSF concentrations, CSF/Serum quotients or indices. When the cut-off for CSF-restricted o-fKLC bands was raised to ≥ 6 bands as in our previous studies [37, 39], all AUCs for CSF fKLC, fKLC quotient as well as fKLC index were >0.95 . For the Freelite method on SPA_{PLUS}, calculated cut-off values were >0.78 mg/L for CSF fKLC, $>43.19 \cdot 10^3$ for fKLC quotient and >6.07 for fKLC index, i. e. similar to those found in our preliminary study [39]. However, we feel that while searching for optimal cut-offs may be important for diagnostic purposes, the canonical definition of ≥ 2 CSF-restricted oligoclonal bands is rather appropriate for a methodical study. The optimal cut-off values calculated by the ROC curve analysis differed substantially among the methods (Table 1).

Further, the ROC curves for the Freelite™ method on SPA_{PLUS} were compared pairwise with the ROC curves for all the other methods. The AUCs were significantly larger for the Freelite™ method on SPA_{PLUS} than for in-house ELISA using either monoclonal or polyclonal fLC standard only in the case of fLLC CSF concentration and quotient.

ROC curves for the prediction of MS or inflammatory neurological disease diagnoses

Concerning the diagnostic performance of quantitative fLC data in the context of MS or inflammatory neurological disease (IND) diagnoses, fKLC AUCs were significantly larger than those of fLLC. Especially in the context of MS diagnosis, the use of fLC indices was shown to be superior to CSF concentrations or even CSF/Serum quotients. No significant difference between the diagnostic performance of the best quantitative fKLC measures, o-fKLC and o-IgG was revealed (Fig 2). Using the classical criterion of ≥ 2 CSF-restricted oligoclonal bands, sensitivities and specificities for MS were 85.7 and 88.4% for o-IgG, 92.9 and 72.6% for o-fKLC, and 64.3 and 84.2% for o-fLLC. For the diagnosis of IND, sensitivities and specificities were 62.5 and 93.3% for o-IgG, 77.1 and 85.3% for o-fKLC and 62.5 and 93.3% for o-fLLC. The optimal cut-off values of the quantitative tests calculated from the ROC curves again differed among methods (S2 and S3 Tables).

Table 1. Cut-offs for predicting positive o-fLC test (≥ 2 CSF-restricted bands) suggested by receiver operating characteristic curve analysis.

Free kappa light chains	<i>n</i> (o-fKLC+/o-fKLC-)	CSF fKLC (mg/l)	fKLC quotient ($\cdot 10^3$)	fKLC index
Freelite™ on SPA _{PLUS}	70/89 (70/87 for fKLC quotient and index)	>0.54 (82.9; 97.8)	>30.61 (84.3; 98.9)	>3.25 (90.0; 82.8)
N Latex FLC™ on BN ProSpec	20/29	>0.417 (85.0; 100)	>17.60 (90.0; 96.6)	>3.21 (80.0; 100)
ELISA (BioVendor)	22/16	>0.025 (90.9; 87.5)	>9.09 (81.8; 93.8)	>1.20 (77.3; 87.5)
ELISA (in-house, monoclonal standards)	49/84 (46/82 for fKLC quotient and index)	>0.216 (87.8; 90.5)	>19.18 (89.1; 95.1)	>2.75 (84.8; 96.3)
ELISA (in-house, Freelite™ standards)	56/85	>0.340 (85.7; 94.1)	>17.48 (89.3; 96.5)	>2.17 (89.3; 89.4)
Free lambda light chains	<i>n</i> (o-fLLC+/o-fLLC-)	CSF fLLC (mg/l)	fLLC quotient ($\cdot 10^3$)	fLLC index
Freelite™ on SPA _{PLUS}	49/110 (49/109 for fLLC quotient and index)	>0.30 (98.0; 91.8)	>36.31 (91.8; 99.1)	>6.68 (79.6; 97.3)
N Latex FLC™ on BN ProSpec	15/33	>0.368 (93.3; 87.9)	>16.92 (100; 90.9)	>3.82 (86.7; 100)
ELISA (BioVendor)	17/21	>0.039 (94.1; 90.5)	>7.38 (82.4; 95.2)	>0.92 (82.4; 80)
ELISA (in-house, monoclonal standards)	40/102	>0.358 (87.5; 91.2)	>22.05 (77.5; 96.1)	>3.03 (75.0; 91.2)
ELISA (in-house, Freelite™ standards)	40/102	>0.272 (92.5; 85.3)	>21.11 (80.0; 92.2)	>2.88 (77.5; 90.2)

n, number of positive/negative cases; o-, oligoclonal; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains. Sensitivity and specificity obtained by receiver operating characteristic analysis are given in parentheses. All areas under the curve were above 0.9 except for fKLC index using BioVendor ELISA and fLLC index using BioVendor ELISA as well as in-house ELISAs (all these areas under the curve were 0.87). At pairwise comparison of other assays against the Freelite™ assay, in-house ELISAs for CSF fLLC and fLLC quotient performed somewhat worse ($P = 0.0167-0.0434$); all other differences between the areas under the curve were not significant ($P > 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0166556.t001

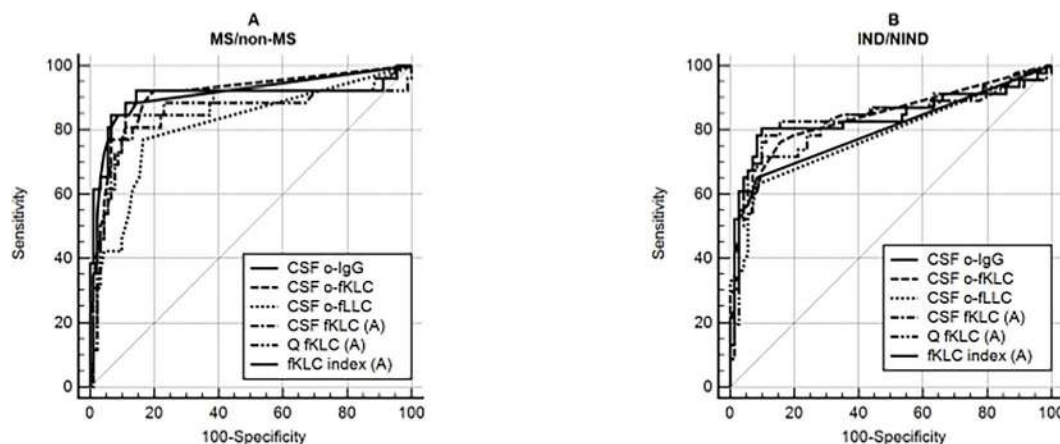


Fig 2. ROC curves in the context of MS and IND diagnoses. a. MS versus non-MS b. Inflammatory neurological diseases versus non-inflammatory neurological diseases and symptomatic controls a. 26 MS and 91 non-MS patients were compared. AUCs for o-IgG, o-fKLC, o-fLLC, CSF fKLC, Q fKLC and fKLC index were 0.911, 0.907, 0.813, 0.850, 0.857 and 0.903, respectively. Significant differences were found between o-IgG and o-fLLC ($P = 0.0035$), o-fKLC and o-fLLC ($P = 0.0075$), fKLC index and Q fKLC ($P = 0.0031$), o-fKLC and CSF fKLC ($P = 0.0201$), o-fKLC and Q fKLC ($P = 0.0219$), fKLC index and CSF fKLC ($P = 0.0347$), o-IgG and Q fKLC ($P = 0.0477$), o-IgG and CSF fKLC ($P = 0.0700$), and fKLC index and o-fLLC ($P = 0.0474$) were of borderline significance. Other differences were not significant. b. 46 inflammatory neurological diseases (IND) and 71 non-inflammatory neurological diseases and symptomatic controls (NIND) patients were compared. AUCs for o-IgG, o-fKLC, o-fLLC, CSF fKLC, Q fKLC and fKLC index were 0.798, 0.840, 0.783, 0.838, 0.825 and 0.840, respectively. Although the AUCs for o-fKLC and fKLC index are slightly larger than for o-IgG, the only significant difference was observed between o-fKLC and o-fLLC ($P = 0.0299$). Quantitative measurements by the method (A) (Freelite™ on SPA_{PLUS}) were considered for these comparisons.

doi:10.1371/journal.pone.0166556.g002

fKLC/fLLC ratios in CSF and sera

In the absence of intrathecal fLC synthesis, CSF fKLC/fLLC ratios were slightly lower than the corresponding serum ratios. This result was consistent in all 5 used methods. Thus CSF/Serum quotient of these ratios [(CSF fKLC/fLLC)/(Serum fKLC/fLLC)] was slightly below 1 and the value of 1.0 corresponded approximately to the 75th percentile (Fig 3). About half of MS and CIS patients have a profoundly increased CSF fKLC/fLLC ratio normalised to serum fKLC/fLLC ratio as discussed above (Fig 4).

Discussion

Can CSF/Serum fLC quotients be regarded as method-independent values?

According to Reiber [42], CSF/Serum immunoglobulin quotients are method-independent values, provided that the concentrations in both fluids are measured within the same run on the same calibration curve. Nevertheless, despite good overall correlation of the data, we observed considerable differences between fLC quotient values, implying that different and method-specific cut-offs have to be used for the assessment of intrathecal synthesis. We conclude that given current analytical possibilities, quotient method-independence does not apply for fLC.

Relationship between Q fLC and Q Albumin

We confirmed our earlier observations [39] that for both fKLC and fLLC there is a clear correlation between fLC quotient and albumin quotient values in cases with a negative o-fLC test. Conversely, no such correlation was observed in cases with CSF-restricted o-fLC bands. This

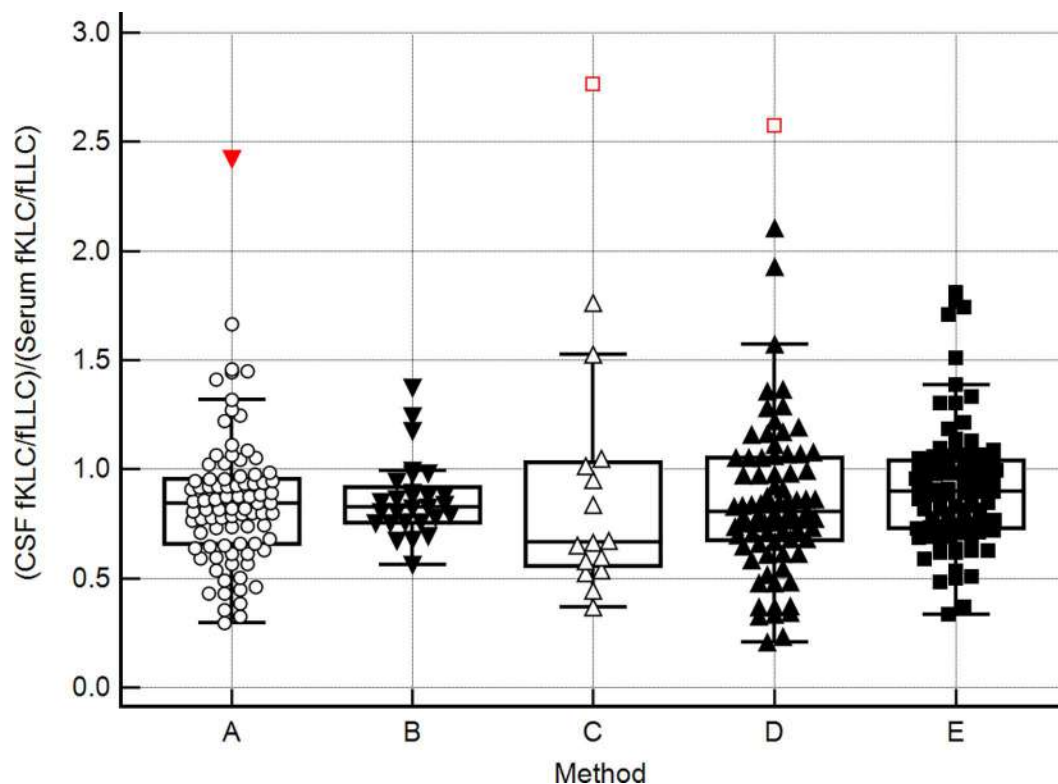


Fig 3. Ratio (CSF fKLC/fLLC)/(Serum fKLC/fLLC) in patients without CSF-restricted o-fLC bands, using the methods (A)–(E). CSF, cerebrospinal fluid; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains. (A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards.

doi:10.1371/journal.pone.0166556.g003

demonstrates that compared to the intrathecal fraction, the relative amount of serum-derived fLC fraction in the CSF becomes negligible, which is in line with the recent study of Presslauer et al. [8] where fKLC intrathecal fraction was close to 100% in most MS patients. This probably accounts for the fact that simple CSF fLC concentration has similar diagnostic sensitivity and specificity as quotients and indices, although we still recommend the use of the latter because false positive results of CSF fLC may occur in cases of very high serum fLC concentrations (e.g. in patients with paraproteinaemia or systemic inflammation). The relationship between fLC quotient and albumin quotient appears to be non-linear and the intrathecal synthesis could be calculated using either inverted Reiber's hyperbole, as we proposed recently [39], or the power function proposed by Presslauer et al. [7, 8]. We demonstrated that almost all values lie above the line of equality, as expected for the CSF/Serum quotient of a smaller molecule plotted on the ordinate and that of a larger molecule plotted on the abscissa [43]. The shape of the curve displaying the non-linear relationship is also consistent with the theoretical expectations. However, more patients with negative o-fLC results, especially those with severe blood-CSF barrier disturbance, should be examined so that reliable parameters of these equations could be calculated.

fKLC/fLLC ratios in CSF and sera

Besides CSF/Serum quotient, also fKLC/fLLC ratio can be calculated from the data. Since this ratio is used in serum as an aid in diagnosing and monitoring patients with monoclonal gammopathies, it might be interesting to detect a skewed distribution of fLC in CSF.

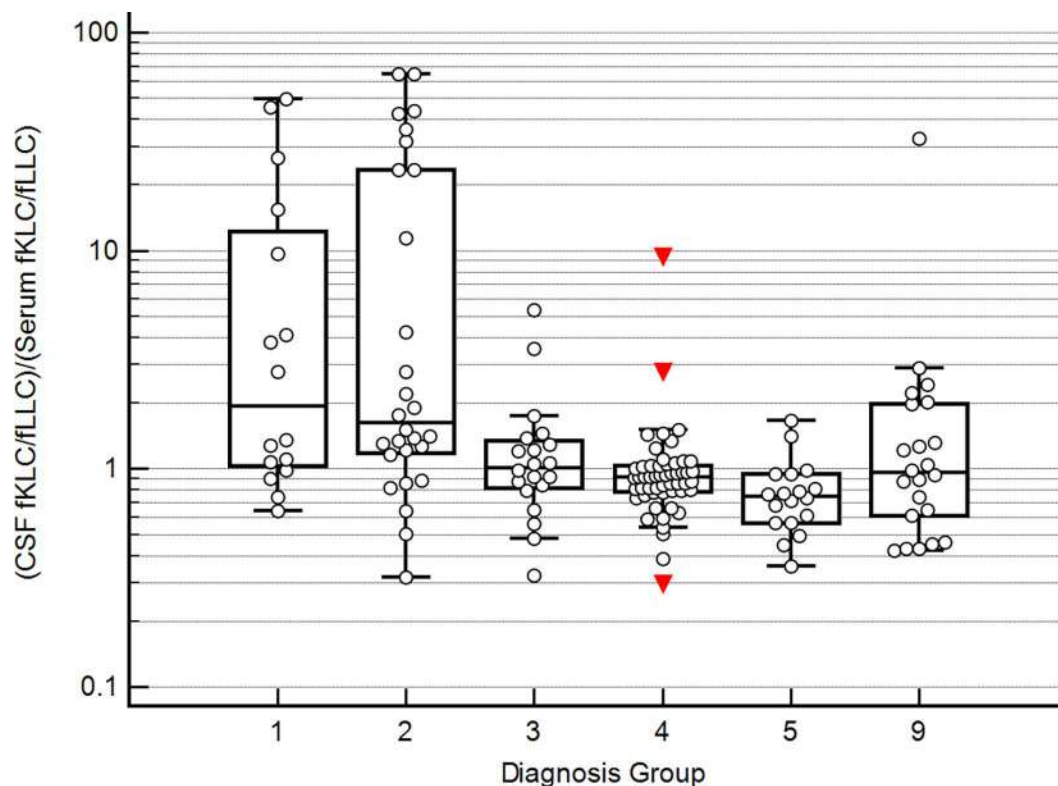


Fig 4. Ratio (CSF fKLC/fLLC)/(Serum fKLC/fLLC) in individual diagnosis groups, using the Freelite™ method on SPA_{PLUS}. 1, multiple sclerosis; 2, clinically isolated syndrome; 3, other inflammatory neurological diseases; 4, non-inflammatory neurological diseases; 5, symptomatic controls; 9, uncertain/unknown diagnosis. It can be seen that about a half of multiple sclerosis and clinically isolated syndrome patients have an increased CSF/Serum quotient of fKLC/fLLC ratios compared to symptomatic controls.

doi:10.1371/journal.pone.0166556.g004

Our results are in accordance with older studies that showed substantially higher CSF fLLC than fKLC concentrations in the control groups [19, 21] but theoretically unexpected. fKLC are assumed to circulate predominantly as monomers, while fLLC as dimers. Hence, fKLC monomers with a lower molecular weight (22.5 kDa) should diffuse into the CSF more easily than fLLC dimers (45 kDa) and, consequently, the values above 1.0 should be obtained. The discrepancy between expected and real data suggests that either there is a general methodological problem in fLC analyses or that there might be a more complex monomer/dimer/oligomer fLC balance than it is currently perceived. Another explanation includes the presence of other physiological factors hindering fKLC or facilitating fLLC diffusion from blood into the CSF. Monomer/dimer patterns of fLC were studied in serum as well as in the CSF [33, 44, 45] and although these tests seem to be too complicated to be introduced into clinical routine, in further research studies they should complement quantitative determinations of fLC in order to solve this interesting question.

Since the intrathecal fLLC synthesis is usually accompanied by the fKLC synthesis, it may seem logical to drop fLLC studies and perform only fKLC tests. However, from the immunological point of view, the analysis of both fLC might be useful as widely different fLLC values were seen in MS patients by our group [39] as well as by the others [3, 4]. It is plausible to suggest that the fKLC/fLLC ratio may provide important additional information on the intrathecal humoral immune response and might even be of prognostic significance. The skewed CSF

fKLC/fLLC ratio may be the result of receptor editing/receptor revision [46, 47] that has already been described as occurring within the CNS of MS patients [48].

Choosing the method: Practical considerations

Each method as well as each analyser has its own limits and advantages. Finally, we chose the Freelite turbidimetric assay on SPA_{PLUS} analyser, which is economic and user-friendly; manual dilution of the CSF sample is rarely required for fKLC and almost never for fLLC. Nevertheless, ELISA based assays might be better applicable in some laboratories worldwide where access to automated instruments is limited. In addition, diluted CSF is used in our in-house ELISA assay, which leads to a much lower amount of sample required for the analysis. Although the sample volume in the automatised assays is low (SPA_{PLUS} requires 15 µl for fKLC and 6.5 µl for fLLC analysis, i.e. 21.5 µl for both measurements, while 50 µl–i.e. 100 µl for both measurements—were required for the analysis on BN ProSpec), we have to add the dead volume that is slightly above 100 µl in both cases. Nephelometric method on BN ProSpec (with either Freelite or N Latex FLC) might be best suited for scientific purposes. Besides having marginally better sensitivity for fKLC (about 0.05 mg/L versus 0.1 mg/L on the SPA_{PLUS} instrument), in consequent dilutions it strives to achieve a signal in the sample that is close to the middle of the calibration curve where the measurement can be expected to be most precise. On the other hand, this results in a high consumption of reagents for samples with high CSF fLC concentrations, which is a major drawback of this method.

Limits of the study

We are aware of several weaknesses of our study. First, it was impossible to perform all tests on every sample, mainly due to insufficient amounts of CSFs and/or sera needed for the assays. Testing by the N Latex FLC method on BN ProSpec had to be interrupted prematurely because of quality control failure regarding a new lot of reagents that was unfortunately only discovered after thawing a proportion of samples. Simultaneously performing in-house ELISA methods with monoclonal and polyclonal (Freelite™) standards, we found out there were rare cases when one sample showed a signal higher than that of the highest standard in one method, but within the calibration range in the other method. However, the analysis could not be repeated in higher dilution either due to insufficient amount of sample or for logistic reasons.

Second, although theoretically sound, the assumption that the detection of CSF-restricted oligoclonal immunoglobulin or fLC bands represents a gold standard to prove intrathecal synthesis, against which quantitative measures should be compared, was only sufficiently validated for IgG. The negative result of oligoclonal IgG detection is often used as a reference method for detecting the absence of intrathecal humoral immune reaction, but it was shown that o-fLC could sometimes be detected in the absence of o-IgG, especially in other inflammatory CNS diseases rather than MS [16, 37]. Therefore, we tried to validate CSF fLC quantitation against o-fLC detection as the reference method. However, unlike for IgG, the amounts of fLC in paired CSF and sera are not matched in the o-fLC assays published so far (including that of ours). Instead, neat CSF and arbitrary diluted serum (1/100) are used. This approach seems more appropriate than the dilution of serum and CSF to the same IgG concentration used in several older studies [11, 12, 16] because fLC have a smaller molecular weight and therefore a considerably larger serum fraction passes into the CSF. In patients with severe blood-CSF-barrier disturbance, however, systemic o-fLC response might still be falsely detected as intrathecal if serum fLC concentrations are not elevated. In our experience, however, systemic o-fLC response is detected much less frequently than systemic o-IgG response.

Conclusions

In spite of considerable proportional as well as systematic differences between various quantitative fLC assays compared in this study, no major differences were observed regarding the prediction of a positive o-fLC test or the diagnostic performance in the context of inflammatory nervous system disease diagnosis. The performance of o-fKLC as well as quantitative fKLC tests is comparable to that of o-IgG, but not superior. In the context of MS diagnosis, o-IgG seems to be more specific than fKLC tests. We therefore conclude that it is too early to recommend abandoning the o-IgG test as suggested in some recent reports [3, 8] until more data have been gathered from various laboratories and different fKLC assay methods have been used. The diagnostic performance of qualitative as well as quantitative fLLC tests is inferior to that of o-IgG and fKLC tests, but enormous variability in the CSF fLLC concentration observed among individual MS patients warrants further studies including prospective evaluation of the possible significance of intrathecal fLLC synthesis in MS. Besides, the fKLC/fLLC ratio in normal CSFs seems to be lower than theoretically expected, based on the postulated predominance of circulating fKLC monomers and fLLC dimers and on the Reiber's blood-CSF barrier diffusion theory [49], which remains to be elucidated.

Supporting Information

S1 Fig. Oligoclonal fKLC (left) and fLLC (right) detected by isoelectric focusing followed by affinity-mediated immunoblotting. ST2 and ST0.2, fKLC and fLLC standards (2.0 and 0.2 mg/L, i.e. 15 and 1.5 ng) as positive controls; F, IgG preparation (Flebogamma, 500 mg/L) as a negative control; C1+S1, C2 + S2: CIS (case 1 subsequently converted into definite MS). Both CSF samples are positive for fKLC, while only the second sample is positive for fLLC. CSF fKLC concentrations were 5.09 and 1.74 mg/L, while CSF fLLC concentrations 0.10 and 1.06 mg/L, respectively. C3 + S3: myelitis of unknown aetiology (diagnosis group 3); both fKLC and fLLC OCBs can be seen in the CSF. CSF concentration of fKLC was 2.02 mg/L and that of fLLC 1.37 mg/L. At control 7 months later, no fLC bands were seen and the CSF fLC concentrations fell to normal (CSF fKLC 0.12 mg/L, CSF fLLC 0.18 mg/L). Control sample was not included in the analysis. C4 + S4: cryptogenic oculomotor mononeuropathy (diagnosis group 4); normal CSF, negative result of both o-fKLC and o-fLLC (CSF fKLC 0.14 mg/L, CSF fLLC 0.24 mg/L). Anode is at the top. (GIF)

S2 Fig. Standards of methods (A)–(D) analysed by the in-house ELISA method. Calibrators of methods (A)–(D) together with Freelite® calibrators for serum assays (Catalogue Numbers LK016.S and LK018.S, respectively, marked A (S) in the figure legend) were diluted to similar fLC concentrations and analyzed by in-house ELISA (D). Please note that method (E) used the same calibrator as method (A). Dilution curves were compared. Optical densities (OD) were very similar for both Freelite® calibrators. Otherwise, however, there were considerable differences among the calibrators, especially for fKLC. (PDF)

S3 Fig. Relationship between fLC quotient and albumin quotient. A clear correlation can be seen between fLC quotients and albumin quotients in the group of o-fLC negative samples, whereas no such correlation is observed when there is intrathecal fLC synthesis. (TIFF)

S1 File. Comparison of CSF and serum fLC concentrations measured by methods (A)–(E) and CSF/Serum fLC quotients by means of Passing and Bablok regression and Spearman's

correlation coefficient. Table A. Comparison of CSF fLC concentrations measured by methods (A)—(E) by means of Passing and Bablok regression and Spearman's correlation coefficient. (A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains; CI, confidence interval **Table B. Comparison of serum fLC concentrations measured by methods (A)—(E) by means of Passing and Bablok regression and Spearman's correlation coefficient.** (A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains; CI, confidence interval **Table C. Comparison of CSF/Serum fLC quotients by means of Passing and Bablok regression and Spearman's correlation coefficient.**(A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains; CI, confidence interval (ZIP)

S2 File. CSF and serum fLC concentrations and CSF/Serum fLC quotients. Method comparison (scatter diagrams). A. CSF fKLC (mg/L) B. Serum fKLC (mg/L) C. CSF fLLC (mg/L) D. Serum fLLC (mg/L) E. Q fKLC ($\cdot 10^3$) F. Q fLLC ($\cdot 10^3$) CSF, cerebrospinal fluid; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains; Q, CSF/Serum quotient. (A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards (ZIP)

S3 File. Bland-Altman plots. A. CSF fKLC (mg/L) B. Serum fKLC (mg/L) C. CSF fLLC (mg/L) D. Serum fLLC (mg/L) E. Q fKLC ($\cdot 10^3$) F. Q fLLC ($\cdot 10^3$) CSF, cerebrospinal fluid; fLC, free light chains; fKLC, free kappa light chains; fLLC, free lambda light chains; Q, CSF/Serum quotient. (A), Freelite™ assay on the SPA_{PLUS} analyser; (B) N Latex FLC™ assay on BN ProSpec analyser; (C) commercially available ELISA (BioVendor); (D), in-house ELISA using monoclonal standards (Bethyl Laboratories); (E), in-house ELISA using Freelite™ standards. (ZIP)

S1 Table. Results of o-IgG, o-fKLC and o-fLLC tests (≥ 2 CSF-restricted bands). a. according to the diagnosis group b. according to MS and IND status MS, multiple sclerosis; CIS, clinically isolated syndrome; OIND, other (than MS) inflammatory neurological diseases; NIND, non-inflammatory neurological diseases; IND, inflammatory neurological diseases. (RTF)

S2 Table. Cut-offs in the context of multiple sclerosis diagnosis. a. Free kappa light chains b. Free lambda light chains MS, multiple sclerosis; non-MS, other diagnoses than multiple sclerosis or clinically isolated syndrome It should be noted that the number of samples examined by the N Latex FLC™ and BioVendor ELISA is too small to permit definitive conclusions regarding the performance of these tests in the context of MS diagnosis.* The second best cut-off value in case the calculated cut-off resulted in $\leq 50\%$ sensitivity or specificity that was considered as unacceptable. (RTF)

S3 Table. Cut-offs in the context of inflammatory neurological disease diagnosis. a. Free kappa light chains b. Free lambda light chains IND, inflammatory neurological diseases; NIND, non-inflammatory neurological diseases and controls * The second best cut-off value in case the calculated cut-off resulted in $\leq 50\%$ sensitivity or specificity that was considered as unacceptable. ** The second best cut-off value in case the calculated cut-off resulted in $\leq 50\%$ specificity that was considered as unacceptable. (RTF)

Acknowledgments

We are obliged to M. Hradecká for language corrections. Skillful technical assistance of I. Faruzelová, L. Fürstová, O. Michnová, R. Malečková and R. Výtisková (CSF Laboratory, Dept. Of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava) is gratefully acknowledged. We would also like to thank Dr. V. Procházka, Dr. K. Vítková and Dr. J. Jurčíková from the Dept. of Science and Research and Dr. K. Šafarčík, Head of the Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, for their continuous support.

Author Contributions

Conceptualization: DZ PK ZŠ PH OZ.

Data curation: DZ PK.

Formal analysis: DZ FV VB.

Funding acquisition: DZ PK PH BK.

Investigation: DZ PK MB PH BK OZ.

Methodology: DZ PK MB.

Project administration: DZ PK.

Resources: PK FV PH BK OZ.

Supervision: ZŠ FV PH VB.

Validation: DZ FV MB VB.

Writing – original draft: DZ PK PH.

Writing – review & editing: DZ PK ZŠ FV MB PH BK OZ VB.

References

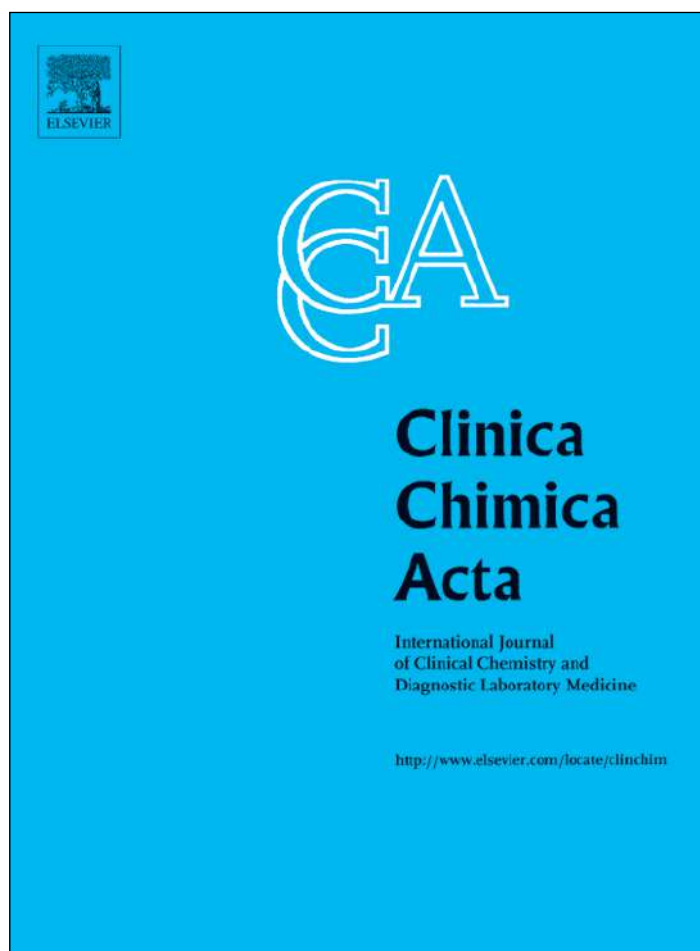
1. Iwashita H, Grunwald F, Bauer H. Double ring formation in single radial immunodiffusion for kappa chains in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neurol.* 1974; 207: 45–52. PMID: [4142885](#)
2. Duranti F, Pieri M, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. Determination of kFLC and K Index in cerebrospinal fluid: A valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunol.* 2013; 263: 116–120. doi: [10.1016/j.jneuroim.2013.07.006](#) PMID: [23916392](#)
3. Hassan-Smith G, Durant L, Tsentemidou A, Assi LK, Faint JM, Kalra S, et al. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2014; 276: 175–179. doi: [10.1016/j.jneuroim.2014.08.003](#) PMID: [25146968](#)
4. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PloS ONE* 2015, November 25, doi: [10.1371/journal.pone.0143375](#) PMID: [26606531](#)

5. Pieri M, Duranti F, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. K Index in cerebrospinal fluid: a valid tool in multiple sclerosis diagnosis. *Riv Ital Med Lab*. 2014; 10: 167–171.
6. Presslauer S, Milosavljevic D, Bruecke T, Bayer P, Huebl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008; 255: 1508–1514. doi: [10.1007/s00415-008-0954-z](https://doi.org/10.1007/s00415-008-0954-z) PMID: [18685917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18685917/)
7. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Parigger S, Schneider-Koch G, Bruecke T. Kappa free light chains: Diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS. *PLoS One* 2014, 9, e89945. doi: [10.1371/journal.pone.0089945](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089945) PMID: [24651567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651567/)
8. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Aboulenein-Djamshidian A, Krugluger W, Deisenhammer F, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. *Mult Scler J*. 2015, published online before print Jul 21, doi: [10.1177/1352458515594044](https://doi.org/10.1177/1352458515594044) PMID: [26199348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26199348/)
9. Senel M, Tumani H, Lauda F, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PloS One* 2014; 9, e88680, doi: [10.1371/journal.pone.0088680](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088680) PMID: [24695382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24695382/)
10. Villar LM, Espiño M, Costa-Frossard L, Muriel A, Jiménez J, Álvarez-Cermeño JC. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin. Chim. Acta* 2012; 413: 1813–1816. doi: [10.1016/j.cca.2012.07.007](https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.07.007) PMID: [22814197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814197/)
11. Bracco F, Gallo P, Menna R, Battistin L, Tavalato B. Free light chains in the CSF in multiple sclerosis. *J. Neurol*. 1987; 234: 303–307. PMID: [3112315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3112315/)
12. Gallo P, Tavalato B, Bergenbrant S., Sidén Å. Immunoglobulin light chain patterns in the cerebrospinal fluid. A study with special reference to the occurrence of free light chains in cerebrospinal fluid with and without oligoclonal immunoglobulin G. *J Neurol Sci*. 1989; 94: 241–253. PMID: [2515256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2515256/)
13. Krakauer M, Schaldemose Nielsen H, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1998; 98: 161–165. PMID: [9786611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9786611/)
14. Lamers KJ, de Jong JG, Jongen PJ, Kock-Jansen MJ, Teunesen MA, Prudon-Rosmulder EM. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements. *J Neuroimmunol*. 1995; 62: 19–25. PMID: [7499488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7499488/)
15. Rudick RA, Peter DR, Bidlack JM, Knutson MD. Multiple sclerosis: Free light chains in cerebrospinal fluid. *Neurology* 1985; 35: 1443–1449. PMID: [3929159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3929159/)
16. Sindic CJM, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol*. 1991; 33: 63–72. PMID: [1829093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1829093/)
17. Vakaet A, Thompson EJ. Free light chains in the cerebrospinal fluid: an indicator of recent immunological stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 995–998. PMID: [3932600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3932600/)
18. DeCarli C, Menegus MA, Rudick RA. Free light chains in multiple sclerosis and infections of the CNS. *Neurology* 1987; 37: 1334–1338. PMID: [3112610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3112610/)
19. Fagnart OC, Sindic CJM, Laterre C. Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *J Neuroimmunol*. 1988; 19: 119–132. PMID: [3135296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3135296/)
20. Lolli F, Amaducci L. Measurement of free kappa immunoglobulin light chains in the cerebrospinal fluid by a competitive avidin-biotin ELISA. *Clin Chim Acta* 1989; 182: 229–234. PMID: [2505952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2505952/)
21. Rudick RA, Pallant A, Bidlack JM, Herndon RM. Free kappa light chains in multiple sclerosis spinal fluid. *Ann Neurol*. 1986; 20: 63–69. doi: [10.1002/ana.410200111](https://doi.org/10.1002/ana.410200111) PMID: [3090930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3090930/)
22. Stanescu GL, Swick AR, Tuohy VK, Rudick RA. Sensitive competitive-binding ELISAs for quantifying free kappa and lambda light chains in cerebrospinal fluid. *J Clin Lab Anal*. 1991; 5: 206–211. PMID: [1905748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1905748/)
23. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, et al. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem*. 2001; 47: 673–680. PMID: [11274017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11274017/)
24. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem*. 2002; 48: 1437–1444. PMID: [12194920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194920/)
25. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San MJ, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report on the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011; 117: 4701–4705. doi: [10.1182/blood-2010-10-299529](https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-299529) PMID: [21292778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292778/)
26. Fischer C, Arnetz B, Koehler J, Lotz J, Lackner KJ. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem*. 2004; 50: 1809–1813. doi: [10.1373/clinchem.2004.033977](https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.033977) PMID: [15271859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15271859/)

27. Desplat-Jégo S, Feuillet L, Pelletier J, Bernard D, Cheriff AA, Boucraut J. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol*. 2005; 25: 338–345. doi: [10.1007/s10875-005-5371-9](https://doi.org/10.1007/s10875-005-5371-9) PMID: [16133990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16133990/)
28. te Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos HK, Hol S, et al. N Latex FLC—new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49: 1323–1332. doi: [10.1515/CCLM.2011.624](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.624) PMID: [21663464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21663464/)
29. Nakano T, Miyazaki S, Nagata A. Proposed reference material for human free immunoglobulin light chain measurement. *J Immunoassay Immunochem*. 2006; 27: 129–137.
30. Nakano T, Nagata A. ELISAs for free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. *J Immunol Methods* 2003; 275: 9–17. PMID: [12667666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12667666/)
31. Nakano T, Nagata A. ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity by using two specific antibodies in a sandwich detection method. *J Immunol Methods* 2004; 293: 183–189. doi: [10.1016/j.jim.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.002) PMID: [15541287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541287/)
32. Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H, Matsumori A, Maruyama T, Komoda T, et al. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44: 522–532. doi: [10.1515/CCLM.2006.118](https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.118) PMID: [16681419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16681419/)
33. Kaplan B, Livneh A, Sela BA. Immunoglobulin free light chain dimers in human diseases. *TheScientific-WorldJOURNAL* 2011; 11: 726–735. doi: [10.1100/tsw.2011.65](https://doi.org/10.1100/tsw.2011.65) PMID: [21442150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21442150/)
34. Arneth B, Birklein F. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand*. 2009; 119: 39–44. doi: [10.1111/j.1600-0404.2008.01058.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01058.x) PMID: [18573131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18573131/)
35. Zeman D. Quantitation of free kappa light chains in neurological patients. [Diploma Thesis]. Institute of Chemical Technology, Prague 2008, pp. 1–102.
36. Zeman D, Hradílek P, Švagera Z, Mojžíšková E, Woznicová I, Zapletalová O. Detection of oligoclonal IgG kappa and IgG lambda bands in cerebrospinal fluid and serum with Hevylite™ antibodies. Comparison with the free light chain oligoclonal pattern. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9: 5 (23 February 2012). doi: [10.1186/2045-8118-9-5](https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-5) PMID: [22360869](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22360869/)
37. Zeman D, Hradílek P, Kušnierová P, Píža R, Reguliová K, Woznicová I, et al. Oligoclonal free light chains as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015; 159: 104–113. doi: [10.5507/bp.2014.058](https://doi.org/10.5507/bp.2014.058) PMID: [25485529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25485529/)
38. Byrtusová M. Optimization of the ELISA method for the determination of free light chains in the cerebrospinal fluid. [Master's Thesis]. St. Elizabeth University of Health and Social Work, Institute for Healthcare Disciplines, Bratislava, 2015: pp. 1–98.
39. Zeman D, Kušnierová P, Bartoš V, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O. Quantitation of free light chains in the cerebrospinal fluid reliably predicts their intrathecal synthesis. *Ann Clin Biochem*. 2016; 53: 174–6. doi: [10.1177/0004563215579110](https://doi.org/10.1177/0004563215579110) PMID: [25753032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25753032/)
40. Teunissen C, Menge T, Altintas A, Álvarez-Cermeño JC, Bertolotto A, Berven FS, et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19: 1802–1809. doi: [10.1177/1352458513488232](https://doi.org/10.1177/1352458513488232) PMID: [23695446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23695446/)
41. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011; 69: 292–302. doi: [10.1002/ana.22366](https://doi.org/10.1002/ana.22366) PMID: [21387374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21387374/)
42. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/Serum quotients. *Clin Chem*. 1995; 41: 256–263. PMID: [7874779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7874779/)
43. Reiber H. Free light chains in CSF—pushing a method with biased interpretations. *Acta Neurol Scand*. 2009; 12: 445–446.
44. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariev R, Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2010; 229: 263–271. doi: [10.1016/j.jneuroim.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.09.002) PMID: [20870296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20870296/)
45. Kaplan B, Golderman S, Yahalom G, Yeskaraev R, Ziv T, Aizenbud BM, et al. Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2013; 390: 74–80. doi: [10.1016/j.jim.2013.01.010](https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.01.010) PMID: [23376556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376556/)
46. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1217: 96–121. doi: [10.1111/j.1749-6632.2010.05877.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05877.x) PMID: [21251012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251012/)
47. Sukumar S, Schlissel MS. 2011. Receptor editing as a mechanism of B cell tolerance. *J Immunol* 2011; 186: 1301–1302. doi: [10.4049/jimmunol.1090129](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1090129) PMID: [21248267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21248267/)

48. Monson NL, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Mobley A, Vaughan GK, Frohman EM, et al. Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2005; 158: 170–181. doi: [10.1016/j.jneuroim.2004.04.022](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.04.022) PMID: [15589051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15589051/)
49. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1994; 122: 189–203. PMID: [8021703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8021703/)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cca



Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams

Hansotto Reiber^{a,*}, David Zeman^{b,c}, Pavlína Kušnierová^b, Esther Mundwiler^d, Luca Bernasconi^d

^a CSF and Complexity Studies, Göttingen, Germany

^b Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

^c Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Poruba, Czech Republic

^d Institute of Laboratory Medicine, Kantonsspital Aarau, Switzerland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cerebrospinal fluid
Free light chain kappa
Reference range
Grouped data statistics
Hyperbolic function
Multiple sclerosis
Clinically isolated syndrome
CIS

ABSTRACT

Background: Free light chains, type kappa (FLC-K), in cerebrospinal fluid (CSF) were compared to oligoclonal IgG in many studies for sensitive detection of immune reactions in brain. The missing consensus about CSF data interpretation prevents reliable conclusions. This can be overcome by a theory-based hyperbolic reference range in CSF/serum quotient diagrams.

Methods: Mean Quotients for FLC-K, Q_{Kappa} , and albumin, QAlb, of grouped, biochemically defined controls ($N = 433$) are fitted with the hyperbolic function $Q_{\text{Kappa}}(\text{mean}) = a/b (Q_{\text{Alb}}^2 + b^2)^{0.5} - c$ by a generally applicable procedure excluding outliers.

Results: With $Q_{\text{Kappa}}(\text{mean})$, the coefficient of variation CV (22.5%) and the reference range ($Q_{\text{Kappa}}(\text{mean}) \pm 3$ CV) we got the discrimination line $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim}) = (3.27(Q_{\text{Alb}}^2 + 33)^{0.5} - 8.2) \times 10^{-3}$ in a FLC-K Reibergram. Intrathecal FLC-K was found in 8% of another control group without OCB ($N = 388$) but was missed in 7% of patients with definite Multiple sclerosis ($N = 95$). In MS the mean intrathecal fraction was threefold larger for FLC-K (95%) compared to total IgG (36%). Similar mean quantities of intrathecal FLC-K contradict an immunological conversion between a Clinically isolated syndrome and MS.

Discussion: The hyperbolic reference range is superior to linear FLC-K Index (10 to 15% false negatives) and exponential curves (30% false positive interpretations for controls) in the analytical range of MS data, with excellent data fit for up to ten-fold larger QAlb values. Dynamics of the small molecule FLC-K contribute to the understanding of molecular size dependent barrier functions.

1. Introduction

1.1. Laboratory supported diagnosis of inflammatory neurological diseases

The diagnosis of inflammatory neurological diseases [1,2] is based on the detection of an intrathecal humoral immune response. The qualitative analysis of oligoclonal IgG [2,3] is so far the most sensitive method, which allows the detection of an intrathecal IgG fraction as small as 0.5% of the total CSF IgG [3] and has a diagnostic sensitivity in

Multiple sclerosis of up to 98% [4]. But this gold standard for the sensitive detection of intrathecal IgG [5] lacks specificity and represents in the routine laboratory a notoriously capricious method: The demanding isoelectric focusing is not easily automated and needs individual, experienced interpretation, based on method-related criteria [5].

The quantitative protein analysis in CSF, like the detection of intrathecal total IgG, IgA and IgM, can provide by the combined analysis specific, disease-related data patterns [1,6] but is far less sensitive. The

Abbreviations: CIS, Clinically isolated syndrome; CV, Interindividual coefficient of variation; FLC-K, free light chain kappa; FLC-L, free light chain lambda; IgG_{IF} , intrathecal fraction of total IgG; IgG_{Loc} , locally, intrathecal synthesized total IgG; I_{Kappa} , FLC-K Index; K_{IF} , intrathecal fraction of FLC-K; K_{Loc} , locally, intrathecal synthesized FLC-K; OCB, Oligoclonal IgG bands; Q_{Kappa} , CSF/serum concentration quotient of FLC-K; QAlb, CSF/serum concentration quotient of albumin; $Q_{\text{Kappa}}(\text{Lim})$, upper limit of the reference range; $Q_{\text{Kappa}}(\text{mean})$, mean of the reference range; $Q_{\text{Kappa}}(\text{low})$, lower border of the reference range

* Corresponding author at: Muehlenstr.3c, 37073 Göttingen, Germany.

E-mail addresses: CSF.LCR@horeiber.de (H. Reiber), david.zeman@fno.cz (D. Zeman), Pavlina.kusnierova@osu.cz (P. Kušnierová), Esther.Mundwiler@ksa.ch (E. Mundwiler), Luca.Bernasconi@ksa.ch (L. Bernasconi).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.07.027>

Received 14 June 2019; Received in revised form 24 July 2019; Accepted 24 July 2019

Available online 25 July 2019

0009-8981/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

still frequently used IgG Index has a very restricted reliability due to its false positive and false negative interpretations [6].

1.2. Development of free light chain analysis

With the development of fully automated nephelometric or turbidimetric protein analysis the kappa type of free light chains (FLC-K) in CSF (Ref. in [7,8]) gained new interest [9]. FLC-K, which circulates in blood and CSF predominantly as a monomer (22.5 kDa), gained more diagnostic relevance in neurology compared to its immunological partner, the predominantly dimeric lambda type of the free light chains (FLC-L) [8].

Many studies report a promising high sensitivity of FLC-K analysis for detection of an intrathecal humoral immune response, in particular in MS, but suffer from a missing consensus for a reference range of the normal blood-derived protein fraction in CSF. The common deficit in most of these investigations is their restricted data base, which does not include blood-CSF barrier dysfunctions that exceed a QAlb of 25×10^{-3} .

There are mainly three groups of approaches:

- A) Interpretations of the absolute FLC-K concentration in CSF with cut-off values between 0.4 mg/l [7,10], 0.5 mg/l [7,11] and 0.61 mg/l [12] ignore a large inter-individual variation for age, FLC-K blood concentration and blood CSF barrier function [3].
- B) Interpretations of the CSF/serum FLC-K quotient, Q_{Kappa} , refer to the albumin CSF/serum concentration quotient, QAlb. This Index takes into account the variations by the individual barrier function. The proposed cut-off values of $I_{\text{Kappa}} = Q_{\text{Kappa}}/\text{QAlb}$ vary between 3.6 [13], 5.9 [14], 6.07 [11], and 12 [7]. In addition to these huge discrepancies without any consensus, the use of a linear fit (Index) for the control groups ignores the nonlinearity of the relation between two blood-derived molecules of different size, e.g., QIgG/QAlb [15]. Therefore the FLC-K Index creates again the same problems with false negative and false positive interpretations as shown for total IgG [6].
- C) A third group of studies suggests nonlinear curve fits for the reference range, eventually with a mathematical function. In this group with the most sophisticated approach we find concepts based on the physiological and biophysical knowledge [15–17], albeit insufficiently applied [9,11] but also arbitrary solutions without a physiological rational [14,18].

1.3. Targets of the investigation

The empirical data of free light chain kappa were grouped for small QAlb intervals [15] and the mean values of these groups were fitted with a hyperbolic function, based on the empirically and theoretically founded concept [15,17]. With the curve for Q_{Kappa} (mean) and the mean of the CV-values we create the FLC-K quotient diagram (Reibergram) to compare the sensitivity of intrathecal FLC-K, OCB, linear Index and nonlinear reference ranges published so far. Based on the hyperbolic reference range we calculate the absolute amount of intrathecal FLC-K synthesis or the relative fraction of total FLC-K concentrations in CSF. This allows to compare the intrathecal immunological response of FLC-K and total IgG. This concept provides also a quantitative criterion for comparison of the immune reaction in patients with a Clinically isolated syndrome (CIS) and definite MS.

This study is primarily focused on the development of the empirically and theoretically correct reference range for FLC-K analysis and the possible pathophysiological and clinical applications. The answer to the question whether OCB can be replaced by FLC-K analysis in general, or in a restricted spectrum of diseases, is left to the reevaluation of the many earlier more clinically oriented studies.

2. Methods

2.1. Control patients

Controls had to fulfill the following set of biochemical data: No intrathecal IgG, IgA and IgM ($\text{Ig}_{\text{IF}} \leq 0$) [1,3], no oligoclonal IgG in CSF, normal cell counts in CSF (lymphocytes $< 5/\mu\text{l}$), no blood contamination and lactate in CSF $\leq 2.5 \text{ mmol/l}$. The detection limit in the FLC-K assay for CSF should be 0.04 mg/l to allow the calculation of a reliable quotient, i.e., samples with concentrations reported as $\text{CSF}_{\text{Kappa}} < 0.1 \text{ mg/l}$ were omitted from interpretations.

2.2. Ethics approval

The original studies have been approved by the local Ethics Committee, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic (Ref. No. 319/2014 and Ref. No. 400/2017). The general approval of the local ethics committee, Kantonsspital Aarau, Switzerland was obtained for the use of anonymized routine left-over samples for method development, validation or quality control.

2.3. Sources of data

This retrospective study uses data sets of the routine analysis from two independent laboratories with different methods (Table 1). All samples were analyzed fresh in the routine laboratory or retrospective from frozen samples to avoid a preanalytical bias. Possible instabilities could cause lowered concentrations preferentially of serum samples.

Table 1
Definition of analytical groups.

Group	N	Control/disease	Method	Reagent
1a	353	No outliers	BN ProspeC nephelometer	Siemens
1b	256	Including outliers		Latex kits
2a	170	No outliers	SPApplus turbidimeter	Freelite
2b	132	Including outliers		Binding Site
3a	11	No outliers	(1 + 2)	(1 + 2)
3b	30	including outliers	(1 + 2)	(1 + 2)
4 MS	45	Multiple sclerosis	SPApplus turbidimeter	Freelite
5 CIS	50	Clin. isolated syndrome		Binding Site

1 = Bernasconi/Mundwiler group, 2 = Zeman/Kušnerová group. 3 = All extreme data, 3a for $\text{QAlb} = 1.6\text{--}2.2 \times 10^{-3}$ ($N = 11$) and 3b $\text{QAlb} = 20\text{--}128 \times 10^{-3}$ ($N = 30$), no oligoclonal IgG, combined from the analytical groups 1a and 2a. 4 = Definitive MS at time of puncture, 5 = CIS patients with a later diagnosis of definite MS. Group 4 and 5 are diagnosed by the group 2.

1. Data from the Bernasconi/Mundwiler laboratory
From a set of $N = 599$ patient data, received in the routine laboratory consecutively between 2011 and 2017, we obtained a selection of $N = 367$ biochemically defined controls or $N = 353$ qualified controls after elimination of outliers (control group 1a in Table 1). This group was divided into subgroups with QAlb intervals of $N \approx 20$ (Table 2). Control group 1b in Table 1 contains subsequently analyzed control data in the routine laboratory 2017–2018, including FLC-K outliers ($N = 256$ patients [19]).
2. Data from the Zeman/Kušnierová laboratory are compiled from several studies published earlier [8,11] resulting in $N = 170$ qualified controls without outliers (group 2a). Control group 2b (Table 1) were subsequently analyzed control data in the routine laboratory, including FLC-K outliers ($N = 132$).
3. Group 3 (Table 1) contains control patients with extreme, pathologically increased QAlb values, collected together with groups 1a and 2a. These data were not used in the statistical evaluation (Table 2) and possible outliers were not eliminated.
4. Group 4 (Table 1) definitive Multiple sclerosis at time of first puncture.
5. Group 5, Clinical isolated syndrome (CIS) which was later diagnosed as MS.
Group 4 and 5 were analyzed and diagnosed by the Zeman/Kušnierová laboratory [7,10].

2.4. Qualified control groups

The total groups of biochemically defined controls were divided into equal subgroups of about $N = 20$ patients ($N = 11$ –17 patients in group 2a) for the smallest possible QAlb intervals (Table 2). After calculation of preliminary medians, means, standard deviations (SD) and the mean coefficients of variation ($CV = SD/\text{mean} \times 100$ [%]), the outliers ($> Q_{\text{Kappa}}(\text{mean}) \pm 3 \times CV$) were excluded from the subgroups. By iteration of this process we established the final mean/median and mean CV values (Table 2).

Table 2

Evaluation of the FLC-K data set for controls without outliers (Siemens assay, group 1a, total $N = 353$).

N	QAlb $\cdot 10^3$			Q _{Kappa} $\cdot 10^3$			
	Range	Mean	Med	Mean	Med	SD	CV %
17	2.0–2.99	2.57	2.53	7.4	7.3	2.24	30
20	3.0–3.6	3.35	3.36	8.5	7.8	1.9	23
21	3.6–4.05	3.79	3.74	8.9	8.2	1.8	20
24	4.1–4.47	4.30	4.29	9.75	9.4	2.23	23
21	4.5–4.8	4.65	4.65	9.58	9.1	1.5	16
20	4.8–5.2	4.99	4.95	11.2	10.5	2.57	23
23	5.2–5.6	5.41	5.40	11.7	11.4	2.48	21
30	5.7–6.2	5.86	5.84	11.8	11.1	2.95	25
23	6.2–6.8	6.47	6.42	13.6	13.2	3.26	24
25	6.8–7.2	6.98	7.0	13.7	13.1	3.7	27
27	7.2–7.9	7.5	7.46	14.63	13.6	3.9	27
27	7.9–8.6	8.21	8.13	14.8	14.2	3.2	22
24	8.7–9.8	9.26	9.31	17.0	16.5	2.84	17
25	9.9–11.9	10.7	10.6	19.3	19.4	3.04	16
18	12–14.8	13.6	13.85	23.0	22.2	5.4	23
8	17.1–19.3	18.4	18.9	30.0	31.5	(8.7)	(27.6)
						Mean	22.5

Data are evaluated as a grouped statistics method for mean and median quotient values, the standard deviation, $SD \times 10^3$, and the interindividual coefficient of variation ($CV = SD/Q_{\text{mean}} \times 100$ in %). Data in parenthesis are not integrated in the calculation of mean CV.

2.5. Analytical methods

2.5.1. Albumin, IgG, IgA, IgM

Proteins were analyzed by nephelometry (Laboratories 1 and 2: Siemens reagents, BN ProSpec, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany).

2.5.2. Oligoclonal bands

OCB's were detected by isoelectric focusing in agarose gels and immunofixation (Laboratories 1 and 2: Hydragel 9 CSF isofocusing, Sebia). Two extra bands in CSF compared to serum ($OCB \geq 2$) were the interpretation criteria for intrathecal oligoclonal IgG synthesis.

2.5.3. FLC-K analysis

Groups 1a, b. The nephelometric N Latex FLC kappa Siemens Assay uses the same calibration curve (range 0.034–1.09 mg/l) for CSF and serum samples, but modifies the default dilutions correspondingly (initially undiluted for CSF and 1: 100 for serum). The analyzer automatically dilutes CSF samples (1:5, 1:20, etc) in order to keep the measured values in the reliable range of the calibration curve.

Groups 2a,b. The SPA_{PLUS} turbidimetric analyzer, using Freelite™ kits (The Binding Site Ltd.) was described [8]. A common six-point calibration curve is used for CSF and serum samples. Lowest and highest standards are approximately 0.40 mg/l and 18.0 mg/l with a calibration curve including the origin (0 mg/l). CSF is analyzed undiluted or manually re-diluted 1:10. Serum analysis is performed at 1:10 dilution or reanalyzed after automatic dilution by the instrument.

This turbidimetric method (laboratory 2) has concentration-dependent inaccuracies with a tendency to false high quotients. QAlb values $< 6 \times 10^{-3}$ (group 2a) have not been used for the data set in Fig. 1. Few procedural changes could improve this method: A better choice of the sample dilutions in the assay to match CSF and serum concentration location on the calibration curve and a better control of the calibration curve to ensure acceptable recovery for a serially diluted sample.

2.6. Data fitting with a hyperbolic function

Concentration quotients (Q) of blood-derived proteins in CSF are characterized in quotient diagrams with reference to the albumin quotient, QAlb, by the general hyperbolic function [15]:

$$Q = a/b [QAlb^2 + b^2]^{0.5} - c \quad (1)$$

The meaning of the parameters a, b, c for this mathematical function are shown in Fig. 1. These parameters depend on the size of the molecule [15].

2.7. Manual fitting procedure for the Qmean curve

The asymptote $y = a/b x - c$ (Fig. 1) is determined preliminary as an approximation to the slope of the empirical curve in the range of largest QAlb values. In the range of low concentrations of x ($x \rightarrow 0$) we can estimate the value of (a-c) (Fig. 1) and calculate the value of a with c from the asymptote. These preliminary parameter values yielded a preliminary hyperbolic curve (like Fig. 1) with the function $Q_{\text{kappa}}(\text{mean})$ corresponding to Eq. (1). By iteration of this process for different values of the parameters a, b, c the best fitting function for the Qmean curve of FLC-K, can be found with the method of least squares, but using relative concentration differences, $[(Q_{\text{measured}} - Q_{\text{theor}})/Q_{\text{measured}}]$. This is needed to take the increasing standard deviation with increasing QAlb (Fig. 1) into account.

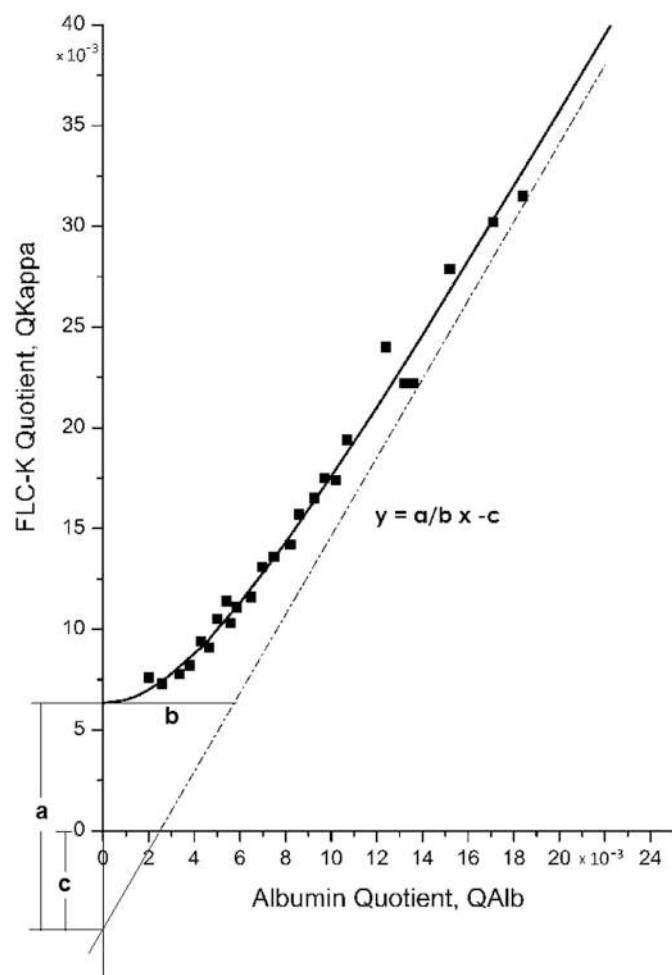


Fig. 1. Fitting procedure for the hyperbolic function. The squares represent means from grouped controls without outliers, (groups 1a in Table 2, part of the values of group 2a, s. methods and group 3a, total $N = 433$). Preliminary values for the parameters a-c and the slope of the asymptote $s = a/b$ were used for the iteration procedure with the function $Q_{Kappa} = a/b[QAlb^2 + b^2]^{0.5} - c$, to find the best fitting parameters a,b,c with a particular least square calculation (methods). The theoretically defined limit of the hyperbolic function is reached at $Q_{Kappa} = 0.5$ or $QAlb = 256 \times 10^{-3}$ (Table 3).

Table 3

Parameters of hyperbolic functions, $Q_{Kappa} = a/b [QAlb^2 + b^2]^{0.5} - c$ (Fig. 1).

	a-c	a/b	a [$\times 10^3$]	b ² [$\times 10^6$]	c [$\times 10^3$]	QAlb (0.5)	QAlb (1)
Q_{Kappa} (lim)	10,6	3.27	18.8	33	8.2	$< 155 \times 10^{-3}$	308×10^{-3}
Q_{Kappa} (mean)	6,35	1.95	11.2	33	4.85	$< 256 \times 10^{-3}$	515×10^{-3}
Q_{Kappa} (low)	2,54	0.78	4.48	33	2	$< 643 \times 10^{-3}$	$> 1000 \times 10^{-3}$

The functions are shown in FLC-K Reibergrams for the upper border line Q_{lim} , the mean Q_{mean} , and the lower border line Q_{low} in Fig. 2. The theoretical limit of the valid range for the Q_{Kappa} functions in the QAlb quotient diagram is defined for $Q_{Kappa} < 0.5 = 500 \times 10^{-3}$. As example for $Q_{Kappa}(\text{mean}) = 500 \times 10^{-3}$ we get for $QAlb(0.5) = [(504,85/1.95)^2 - 33]^{0.5} = 256 \times 10^{-3}$. $Q_{Kappa} = 1$ is reached at a QAlb(1) with values calculated as approximation from the asymptote. Corresponding calculations are performed for Q_{lim} and Q_{low} .

2.8. Construction of the complete reference range

With the mean CV value (Table 2) and the definition of the reference range as $Q_{mean} \pm 3CV$ the complete curves for the upper limit (Q_{lim}) and the lower border (Q_{low}) of the reference range (Table 3 in Results) could be established. This is shown in a linear diagram in Fig. 2 in Results.

3. Results

3.1. Hyperbolic function of the mean FLC-K reference curve, $Q_{Kappa}(\text{mean})$

The mean values of FL-K quotients, Q_{kappa} , from the subgroups of controls are shown in Fig. 1 with the best fit for a hyperbolic function.

$$Q_{Kappa}(\text{mean}) = 1.95 [QAlb^2 + 5.74^2]^{0.5} - 4.85 (\times 10^{-3}) \quad (2)$$

characterized by the ordinate interval of $a-c = 6.35 \times 10^{-3}$ and the asymptote $y = 1.95x - 4.85$ (Fig. 1 and Table 3). The grouped analysis of the control group with the smallest values of QAlb in the range 1.66 to 2.3×10^{-3} shows that the slope of the mean curve is approaching zero as expected for a hyperbolic function (Fig. 1). The normal $Q_{Kappa}(\text{mean})$ (Eq. (2)) for a given normal QAlb value (e.g., $QAlb = 5 \times 10^{-3}$) can be calculated as $Q_{Kappa}(\text{mean}) = 1.95 [5^2 + 33]^{0.5} - 4.85 (\times 10^{-3}) = 10.0 \times 10^{-3}$. This yields a normal ratio of $Q_{Kappa}/QAlb$ of 2 to 1.

3.2. Reference range of Q_{Kappa} in the quotient diagram

The mean interindividual coefficient of variation ($CV = SD/Q_{mean} \times 100$ in %) for Q_{Kappa} is $CV = 22,5\%$ (group 1a) and 21% (group 2a), correspondingly.

The upper and lower border line of the reference range is calculated with the confidence interval of $Q_{mean} \pm 3 CV$ or $Q_{mean} \pm 67.5\%$. This range provides a maximal diagnostic specificity for the detection of an intrathecal synthesis (connected with a lower sensitivity) The corresponding functions are calculated for the upper limit $Q_{lim} = Q_{mean} \times 1.675$ and for the lower curve $Q_{low} = Q_{mean} \times 0.325$ (Table 3) and shown in Fig. 2 with linear axes. Values above the reference range ($Q_{mean} + 3 CV$) are pathologic with a probability of 99.5%. Values below Q_{low} may represent an analytical fault.

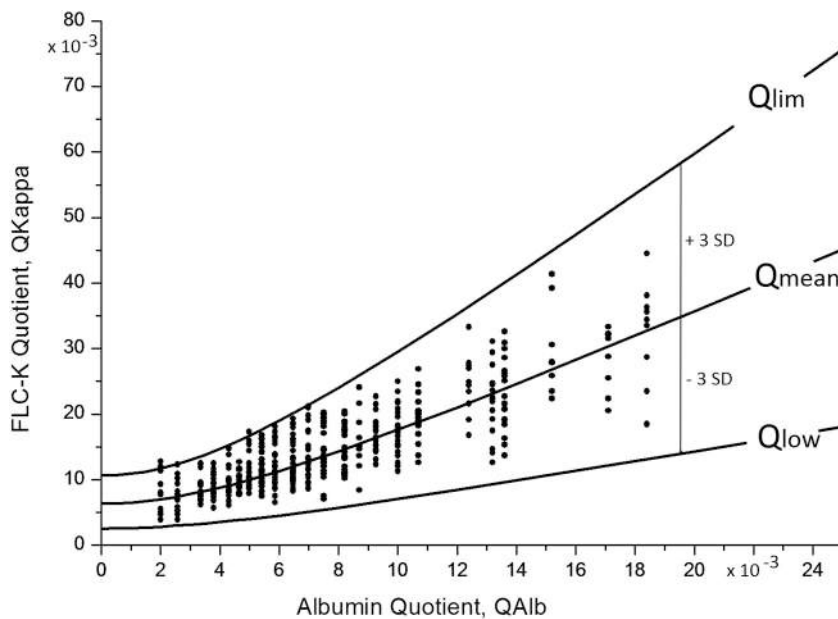


Fig. 2. Reference range of CSF/serum quotients, Q_{Kappa} , in a quotient diagram with linear axis. Q_{lim} and Q_{low} are calculated from $Q_{\text{mean}} \pm 3 \text{ CV}$ (Table 3). Increasing standard deviations (SD) have a constant coefficient of variation, $\text{CV} = 22.5\%$ (Table 2). The reference range includes 99% of the controls. Data are accumulated from group 1a (Table 2), group 2a and 3a (Total $N = 433$).

The use of a double log plot for FLC-K analysis in Fig. 3, corresponding to the Reibergrams for IgG, IgA and IgM [1,6], has also the advantage to spread optically the range between $Q_{\text{Alb}} = 2 \times 10^{-3}$ and $Q_{\text{Alb}} = 20 \times 10^{-3}$ where the largest number of data from patients of diagnostic interest (e.g., with Multiple sclerosis) are localized but also provides a possible display of data up to values of $Q_{\text{Alb}} = 150 \times 10^{-3}$. The implemented Q_{mean} curve (dotted line) in Fig. 3 indicates the optical asymmetry in the double log diagrams. The square symbols represent the ungrouped data set from Fig. 2, expanded with values from patients with extremely increased Q_{Alb} (group 3 in Table 1). This shows the reliability of the theoretically founded extension of the hyperbolic reference range beyond the statistically treated data groups in Figs. 1 and 2.

The upper limit of the reference range, the diagnostically relevant discrimination line is.

$$Q_{\text{kappa}}(\text{lim}) = 3.27 [Q_{\text{Alb}}^2 + 33]^{0.5} - 8.2 (\times 10^{-3}) \quad (3)$$

This function is valid in the Q_{Alb} range below 155×10^{-3} (Table 3). The diagnostic border line for Q_{Alb} values above 150×10^{-3} is given in Discussion and Table 3.

An extrapolation to Q_{Alb} below 1.6×10^{-3} is not justified. The ordinate interval (a-c) is influenced by the different molecular transfer mechanisms into the ventricular CSF [17], which are not restricted to diffusion, the precondition for a hyperbolic function.

3.3. Quantitation of intrathecal synthesis

With these functions according to Table 3 and the serum concentrations S_{Kappa} , we can calculate the locally, in brain synthesized FLC-K fraction in CSF. The quantity is expressed, like for the immunoglobulins [5,12], either as the locally synthesized absolute amount of FLC-K, K_{loc} , or the relative intrathecal fraction, K_{IF} (Fig. 3):

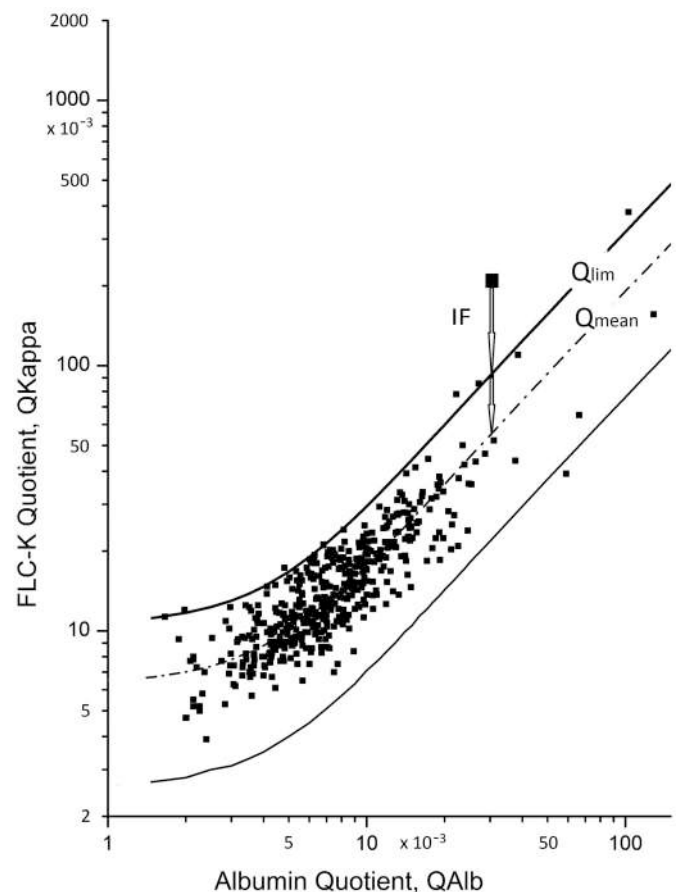


Fig. 3. FLC-K control data in a double logarithmic quotient diagram (Reibergram). The hyperbolic functions (Table 3) are shown up to $Q_{\text{Alb}} = 150 \times 10^{-3}$. The data from Fig. 2 are shown ungrouped and extended by additional data for Q_{Alb} above 20×10^{-3} ($N = 30$, group 3b in Table 1, total $N = 463$). Q_{mean} (dashed line) is shown to characterize the optical asymmetry of Q_{mean} in the double log diagram. The intrathecal fraction, IF, is represented either with reference to Q_{lim} for diagnostic purposes as a relative fraction (K_{IF} in %) or with reference to Q_{mean} for statistical purposes, $K_{\text{IF}}(\text{mean})$, eventually calculated as quantitative value $K_{\text{loc}}(\text{mean})$ in mg/l.

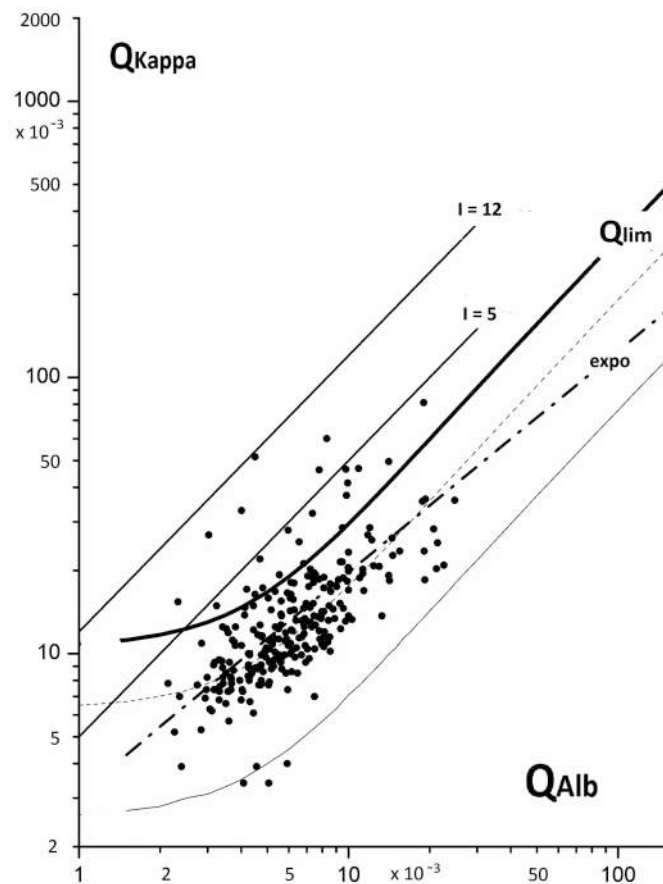


Fig. 4. Control group in the FLC-K Reibergram for comparison of different interpretation concepts. Routine laboratory data from biochemically defined controls without oligoclonal IgG, with normal IgG, IgA, IgM, normal cell count and normal lactate ($N = 256$ patients, group 1b). The bold line represents the hyperbolic Q_{lim} curve (Table 3). 20/256 data pairs (8%) are outside the reference range, i.e., false negative interpretations of samples with negative oligoclonal IgG. Examples of the linear Index, $I_{Kappa} = 5$ (similar to [11,14]) and $I_{Kappa} = 12$ [7] show 15/20 or 20/20, respectively, false negative interpretations, compared to Q_{lim} . The bold dash-dot line (expo) is the Q_{lim} value of an exponential function [20] with 77/256 = 30% false positive interpretations of normal controls.

$$K_{loc} = [Q_{kappa} (total) - Q_{kappa} (lim)] \times S_{kappa} [mg/l] \quad (4)$$

$$K_{IF} = K_{loc} / CSF_{kappa} \times 100 \text{ or } (1 - Q_{lim} / Q_{kappa}) \times 100 [\%] \quad (5)$$

With $K_{loc} = 0 \text{ mg/l}$ and $K_{IF} = 0\%$ at Q_{lim} , the quantitative values for the intrathecal synthesis represent the calculable minimal amount of intrathecal FLC-K in CSF. In case of statistics for the comparison of patient groups (Fig. 5) it is more relevant to refer K_{loc} to Q_{mean} (like IF in Fig. 3): $K_{loc} (mean) = [Q_{kappa} (total) - Q_{kappa} (mean)] \times S_{kappa}$ in mg/l. Examples are calculated in paragraph 3.6 for the data of the MS and CIS patients in Fig. 5.

3.4. Sensitivity of FLC-K analysis in different interpretation methods

Fig. 4 shows subsequently analyzed controls in the routine laboratory without any selection. With Q_{Kappa} above $Q_{Kappa}(lim)$ in 20/256 or 8% of the patients (Fig. 4) the FLC-K analysis is more sensitive for an intrathecal immune response compared to other basic CSF parameters, in particular oligoclonal IgG, normal intrathecal IgG, IgA, IgM fractions, cell count and lactate.

Fig. 4 shows also two examples of reported thresholds values of the

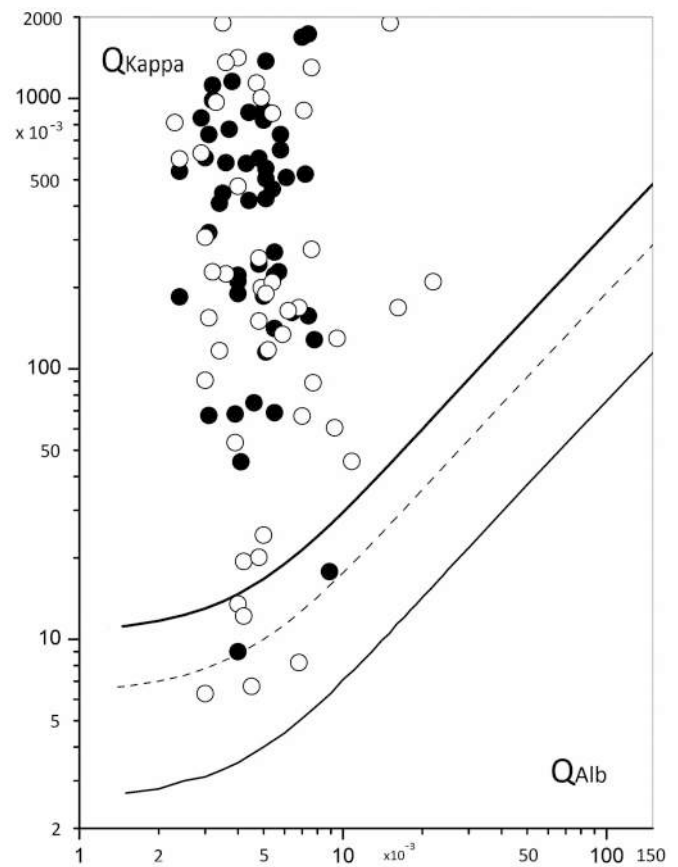


Fig. 5. MS and CIS patient data in the FLC-K Reibergram.

Filled circles are Multiple sclerosis patients ($N = 45$) and open circles represent Clinically isolated syndrome patients, later found as MS ($N = 50$). FLC-K analysis detects 93% of total 95 MS patients. For detailed comparison of quantitative intrathecal synthesis in the CIS and MS groups see text. A corresponding software for the evaluation of FLC-K in this quotient diagram is available as free download [27].

linear Index ($I_{Kappa} = 5$ and $I_{Kappa} = 12$). $I_{Kappa} = 12$ is including all OCB negative controls, i.e. there are no false positive interpretations, but compared to $Q_{Kappa}(lim)$, this Index $I_{Kappa} = 12$ creates 20/256 or 8% false negative interpretations. The cut-off value $I_{Kappa} = 5$ creates 14/256 = 6% false negative interpretations. This means, that the application of the hyperbolic reference line instead of the Index cut-off values would dramatically increase the sensitivity of FLC-K analysis reported in earlier studies [7,10–14].

From the groups with molecular size dependent exponents of Q_{Alb} [14,20,21] the best fitting function $Q_{Kappa}(Lim) = 31,276 Q_{Alb}^{0.8001}$ [18] is shown as dash - dot line (expo) in Fig. 4. The negative bent border line creates 77/256 = 30% false positive interpretations of normal OCB negative controls in Fig. 4. The percentage of false positive interpretations will be increasing for further increasing Q_{Alb} values.

The additional patients with extreme barrier dysfunctions, i.e., large Q_{Alb} values up to 128×10^{-3} in Fig. 3, show the superiority of the hyperbolic reference range over the other methods, which completely fail to fit this range of data.

3.5. Diagnostic sensitivity: multiple sclerosis

The total group of patients with a definite MS ($N = 95$, 94% OCB in CSF) is shown in Fig. 5 as filled and open circles. We find intrathecal FLC-K in 93% of the patients with reference to the hyperbolic border line, 90% with reference to $I_{Kappa} = 5$, or 85% with reference to $I_{Kappa} = 12$ and 98% with reference to the exponential border line.

These results mirror the methodological bias with a false low sensitivity for the Index and a false high sensitivity for the exponential border line. For a final judgement whether FLC-K can replace OCB in MS diagnosis remains to be investigated with larger patient groups.

3.6. Multiple sclerosis and clinically isolated syndrome in FLC-K diagrams

The data of the patient groups 4 (MS) and 5 (CIS) are shown in the FLC-K Reibergram in Fig. 5. At the time of first diagnostic CSF puncture the definite MS cases presented in 10% with false negative interpretations and in 2% of the CIS group with later confirmed definite MS with Q_{Kappa} below $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})$. The quantitation of intrathecal synthesis changes this first impression. $K_{\text{loc}}(\text{mean})$ with reference to $Q_{\text{Kappa}}(\text{mean})$ is calculated for each patient and subsequent the means of the groups. The mean intrathecally synthesized amounts with $K_{\text{loc}}(\text{mean}) = 3.3 \text{ mg/l}$ for the MS group is lower than the mean $K_{\text{loc}}(\text{mean}) = 4.4 \text{ mg/l}$ for the CIS group. This result allows to conclude that there is no tendency for a weaker immune response in CIS to support a pathophysiological conversion from CIS to MS as stated by several researchers [22,23]. The CIS group had the lowest ($Q_{\text{Kappa}} = 6 \times 10^{-3}$) but also highest ($Q_{\text{Kappa}} = 2700 \times 10^{-3}$) quotient values. These extremely high Q_{Kappa} quotients mirror the higher relative intrathecal fractions, K_{IF} , compared to the total IgG, IgG_{IF} , with the Q_{mean} related values $K_{\text{IF}}(\text{mean}) = 95\%$ for FLC-K but only $\text{IgG}_{\text{IF}}(\text{mean}) = 36\%$ for total IgG. This means that in average 95% of the CSF concentration of FLC-K is intrathecally synthesized compared to 36% of total IgG. This threefold larger relative intrathecal response of FLC-K compared to total IgG is the reason why the quantitative FLC-K analysis has a much better diagnostic sensitivity of 93% in the MS group compared to the correspondingly poor sensitivity of total IgG with about 70% [24].

4. Discussion

4.1. Reliability of the hyperbolic reference range

The method of grouped data analysis (Table 2) for a known curve function is superior to a regression analysis of the total data cloud in a scatter plot. From the data in the range of the lowest Q_{Alb} values in Fig. 1 (mean $Q_{\text{Alb}} = 2 \times 10^{-3}$, range $Q_{\text{Alb}} = 1.66 \times 10^{-3}$ to 2.3×10^{-3}) we learn that the slope of the curve $Q_{\text{Kappa}}(\text{mean})$ is approaching zero as expected for a hyperbolic curve. These data are not biased by the sensitivity of the method as only those values were included for which the serum values and corresponding CSF values were high enough.

The extrapolation of the curves to Q_{Alb} values larger than in the group of Table 2 and Fig. 1 is justified by the theory-based concept [15,17] and gains plausibility by higher Q_{Alb} values up to $Q_{\text{Alb}} = 128 \times 10^{-3}$ in Fig. 3. These concentration ranges, which are 10-fold the concentrations of the average quotients from MS patients, are barely considered in the many studies with other interpretation concepts [7,10–14,20–23]. But this would have been crucial to see the general reliability of the reference line in the individual model.

Table 4

Analytical sensitivity of FLC-K compared with oligoclonal IgG (group 2b in Table 1).

	Total	2 Bds	3 Bds	4–24 Bds
OCB +	116	7	8	101
FLC-K +	110	3	6	101

From the subsequent analysis of 320 patients in the routine laboratory with total 116 OCB positive CSF samples ($\text{OCB} \geq 2 \text{ Bds}$) we get the described frequencies of 2 to 24 bands. Of the CSF samples neg for OCB, 7/204 had a single band of which 3 had an intrathecal FLC-K synthesis. 26/204 cases without intrathecal IgG synthesis had ≥ 2 oligoclonal FLC-K bands in CSF [8].

4.2. Biophysically defined validity ranges of $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})$

The hyperbolic reference range in CSF/serum quotient diagrams was discovered empirically [25] and later confirmed with a larger set of immunoglobulin data combined with the theoretical derivation of the hyperbolic function from the laws of diffusion [15]. The concept was applied to several different blood-derived proteins in CSF [16]. The free light chain type kappa (22.5 kDa) is the first molecule smaller than the reference albumin (64 kDa) to be investigated with this concept. The basic difference comes with the faster diffusion of FLC-K than albumin. The FLC-K concentration in CSF reaches the blood concentration ($Q_{\text{Kappa}} = 1$) before albumin reaches the equilibrium ($Q_{\text{Alb}} = 1$). Therefore, we need to describe eventually the complete Q_{lim} curve, i.e. also for values of $Q_{\text{Kappa}} > 0.5$. For this purpose we have to remember that for the derivation of the hyperbolic function [15] from the diffusion equation we need a trigonometric series to get an approximation for the mathematical solution of this differential equation. Depending on the concentration range of the diffusing molecule there are two complementary trigonometric series. In the usual range of the low concentrations in CSF this is the error function complement, erfc [15,17]. At high concentrations, i.e., at $Q_{\text{Kappa}} > 0.5$ or 500×10^{-3} we have to use mathematically the alternative trigonometric function (error function, erf [15,17], i.e., we get an inverted hyperbolic function in the quotient diagram which, like a sigmoid curve, approaches to $Q_{\text{Kappa}} = 1$ at $Q_{\text{Alb}} \approx 308 \times 10^{-3}$. This is shown explicitly in [17].

According to Table 3 we reach $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim}) = 0.5$ at a $Q_{\text{Alb}} = 155 \times 10^{-3}$, the limit for the validity of the hyperbolic function Q_{lim} in Eq. (3).

For the rare cases with Q_{Alb} above 150×10^{-3} instead of the inverted hyperbolic function we can use simpler approximations. In the range $Q_{\text{Alb}} = 150$ to 300×10^{-3} we can use the asymptote $Q_{\text{Kappa}} = 3.27 \times Q_{\text{Alb}}$ as upper reference line and for Q_{Alb} above 300×10^{-3} any value of Q_{Kappa} larger than 1 or 1000×10^{-3} must be due to an intrathecal synthesis of FLC-K. The inaccuracy by this approximation for the few rare cases is negligible compared to the analytical imprecision.

4.3. Clinical relevance of FLC-K analysis

4.3.1. FLC-K analysis compared to oligoclonal IgG

The theoretically expected symmetrical distribution of data in the reference range [15–17] is obviously fulfilled for FLC-K as shown in the distribution of data around Q_{mean} in Fig. 2. This allows to conclude that the patients in Fig. 4 with Q_{Kappa} above $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})$ have a probability of $> 99.5\%$ to have an intrathecal FLC-K synthesis in spite of absent oligoclonal IgG (OCB).

Any relevant comparison between the clinical relevance of OCB versus FLC-K -analysis must consider two different aspects: The quality of the OCB method and the particular disease (paragraph 4.3.2). In this study ($N = 388$ OCB negative samples) we find $N = 31$ cases (8%) with intrathecal FLC-K synthesis. The reference is a widespread used automated OCB method but we regarded two bands as positive oligoclonal IgG in contrast to the common 3 bands in routine diagnosis. Table 4 shows the relevance of this decision for the frequency of intrathecal FLC-K: 7/116 cases of our group 2b (Table 1) had only two bands which would be missed in the cut off with ≥ 3 bands. From these 7 cases with 2 bands only three cases had intrathecal FLC-K. But in the group of negative oligoclonal IgG ($N = 204$), which included 7 cases with one single OCB, we found with quantitative FLC-K analysis three patients and with qualitative FLC-K analysis 26 patients with intrathecal FLC-K.

So, any figure about false negative results of OCB, like our 8%, depends on several aspects of the quality and the interpretation of the OCB method.

The second comparison for the clinical relevance of FLC-K analysis is the diagnostic sensitivity for Multiple sclerosis. Our data for a small MS group and CIS group in Fig. 5 have been introduced for the

demonstration of the different results dependent on the interpretation concept with false low values for the Index (85%) and false high values for the exponential curve (98%) compared to the hyperbolic reference range (93%). A second motivation for this presentation of a CIS and MS group is the possibility to quantitate intrathecal synthesis for pathophysiological interpretations. For a reliable figure for the diagnostic sensitivity of FLC-K analysis we would need a larger cohort of MS patients and essentially an application for other diseases (s. 4.3.2).

4.3.2. Theoretical limits for quantitative FLC-K analysis

The analytical sensitivity of a quantitative method, with a statistically determined reference range, can't reach the analytical sensitivity of qualitative method like the oligoclonal IgG analysis in CSF [3] with a direct comparison in the individual patient.

1. The theoretical limits of diagnostic sensitivity for quantitative FLC-K analysis can be calculated from the coefficient of variation, CV: A healthy patient at the lower border of the reference range $Q_{\text{kappa}}(\text{low})$ (Fig. 2) may have to synthesize in brain additional 135% ($6 \times \text{SD}$ in Fig. 2) of its original FLC-K concentration in CSF to reach significantly $Q_{\text{kappa}}(\text{lim})$. It would need still more to generate a detectable intrathecal synthesis of FLC-K with a value above $Q_{\text{kappa}}(\text{lim})$. This is in contrast to the qualitative detection of OCB in IEF, which can detect under optimal conditions already 0.5% intrathecal IgG in the total CSF IgG [3].
2. In Multiple sclerosis patients this theoretical limitation is compensated by a relatively high intrathecal FLC-K fraction in CSF ($K_{\text{IF}}(\text{mean}) = 95\%$, paragraph 3.6). But there are other diseases with a less prominent IgG class response, like neuroborreliosis [20,26] with dominant intrathecal IgM class response in a two to three class pattern or neurotuberculosis with a dominant intrathecal IgA class response in a one to two class pattern [1,6]. The investigations of the clinical sensitivity of the intrathecal FLC-K response have to consider the relation of OCB to FLC-K in different diseases. Of course, both, OCB as well as FLC-K analysis, may be less relevant with respect to the most specific and most sensitive parameter(s), like the specific borrelia antibody Index [26].

4.3.3. Comparison of different interpretation methods of FLC-K data in CSF

Among all published attempts to define a limit between normal and pathologically increased FLC-K concentration in CSF the absolute concentration of FLC-K is the worst choice [7,10–12]. First, normal CSF concentrations depend directly on the serum concentration which varies more than $\pm 100\%$ (serum concentrations of FLC-K vary between 6 and 100 mg/l with a median of 12.9 mg/l). Second, this approach ignores the influence of the age on the blood CSF barrier function [3]. In group 1a we find 50% increase of QAlb between 30 and 70 years of age. Third, the largest increase of the blood-derived FLC-K concentrations in CSF comes with the up to 100-fold increasing concentration by blood-CSF barrier dysfunctions [1,3,6].

The most frequent concept uses a linear Index, $I_{\text{kappa}} = Q_{\text{kappa}}/Q_{\text{Alb}}$. Fig. 4 shows two examples of reported thresholds values of the linear Index ($I_{\text{kappa}} = 5$ and $I_{\text{kappa}} = 12$). Together with the data from MS analysis in Fig. 5 we can conclude that the Index related interpretations produce 8% false negative controls as well as 15% false negative MS interpretations. This means, that the sensitivity of FLC-K analysis with reference to the hyperbolic function is higher than reported in earlier Index studies [7,10–14].

Among the groups with nonlinear functions for the reference range those groups with molecular size dependent exponents of QAlb (e.g., $Q_{\text{Alb}}^{1.035}$ for IgG [18] and $Q_{\text{Alb}}^{0.6687}$ [14,21] or $Q_{\text{Alb}}^{0.8001}$ [20] for FLC-K) showed the worst empirical results with 30% false positive interpretations of normal controls in Fig. 4. As a consequence of the obviously much to low border lines [14,21] the studies get a much to high FLC-K sensitivity (e.g. 98% for the detection of an intrathecal immune response in MS in Fig. 5). In addition to the questionable

empirical data fit the biophysical concept [18] is wrong. The molecular size dependence comes with the diffusion not with the CSF flow related change of QAlb. This approach is also not compatible with the physiological and pathophysiological data [15–17].

As a summary, these data from Fig. 4 show that compared to the hyperbolic reference range including 99% of the normal FLC-K controls, the Index values come along with underestimated sensitivity while the exponential approaches make as many as 30% of the controls to a false pathological case and may pretend to have a higher sensitivity of the FLC-K analysis.

Former publications that calculated sensitivity and specificity and compared with oligoclonal IgG in Multiple sclerosis or other diseases should be reevaluated with our new approach. A free software for the evaluation and graphical presentation of FLC-K data in quotient diagrams is available [27].

4.3.4. Relevance for diagnosis and laboratory practice

The hyperbolic reference range in the FLC-K analysis avoids the false positive and false negative interpretations of the other methods reported and provides a reference range valid also for very high albumin quotients, i.e. in patients with the severest blood CSF barrier dysfunctions. With the possibility to calculate the intrathecally synthesized amounts of FLC-K the new reference functions provide also pathophysiological information.

For diagnosis of Multiple sclerosis the quantitative FLC-K analysis has a reasonably high sensitivity (93%), but could fail in other diseases with a less intense intrathecal immune response, where the theoretically founded advantage of the qualitative method over the quantitative method counts.

The quantitative FLC-K analysis has the advantage, compared to the sophisticated qualitative OCB method, that it can be easily performed in each laboratory with an equipment for protein analysis, considering the different qualities of the commercial assays (s. Methods). So, the laboratories without OCB analysis could gain a basic improvement in their analytical performance with FLC-K analysis. In the laboratory with OCB analysis the FLC-K detection could be complementary for cases with ambiguous interpretations presenting with 1–3 bands.

Our study, which is focused on the development of the reference range for FLC-K analysis, can't conclude whether FLC-K analysis could replace the more capricious OCB analysis. We would like to see a re-evaluation of the former studies with larger cohorts of MS cases with the new concept to avoid false positive and false negative interpretations.

Principally, like for IgG, also for the FLC-K analysis in CSF the qualitative detection of specific oligoclonal FLC-K bands after isoelectric focusing [8,28] could be a more sensitive method than the quantitative FLC-K analysis (s. legend to Table 4). But this would again create the problems with the capricious isoelectric focusing.

4.4. Free light chains and the blood-CSF barrier function

The molecular size dependent passage of molecules between blood and brain or CSF is mirrored by the mathematical function for the reference range in quotient diagrams [15,17], in particular by the slope of the asymptote $s = a/b$ of the hyperbolic curve (Fig. 1). In the quotient diagrams with reference to QAlb the molecules larger than albumin have a slope for Q_{mean} of $s < 1$ (IgG $s = 0.65$, IgA and CEA $s = 0.47$, IgM $s = 0.33$ [9]), but for molecules smaller than albumin we find the slope exceeding 1, e.g., $s = 1.95$ for FLC-K (Fig. 1 and Table 3). For the hyperbolic function of FLC lambda (FLC-L) we get a slope of about $s = 1.2$ (unpublished results of D. Zeman et al.). This means that FLC-K passes the barrier primarily as the smaller, monomeric molecule (22.5 kDa), compared to the primarily dimeric FLC-L (45 kDa) with a slope approaching to 1.0 like the value found e.g., for the transthyretin/retinol binding protein complex (54 + 21 kDa) with $s = 1$ [16].

As a consequence, the normal ratio of Kappa/Lambda free light

chain concentrations in CSF must be different from the normal relation in blood, due to the slower passage of the dimeric FLC-Lambda through the barrier and a subsequently lower concentration in CSF compared to the smaller monomeric molecule FLC-K. The ratio of monomeric to dimeric FLC-K reported from SDS PAGE electrophoresis with western blot detection [29] may not reflect the real relation that is present in physiological solutions, i.e., in blood and CSF.

4.5. Pathophysiology of MS and CIS

Several authors [21–23] investigated FLC-K analysis as a biomarker to prognose a conversion [22] of the Clinically isolated syndrome, CIS, into Multiple sclerosis, MS. The Qmean related statistical evaluation of the FLC-K intrathecal synthesis with Eq. (4) (free software available at www.albaum.it [27]) detects no differences in immune response between CIS and MS: There is no smaller mean amount of intrathecal FLC-K synthesis in CIS ($K_{loc}(\text{mean}) = 4.4 \text{ mg/l}$) compared to MS ($K_{loc}(\text{mean}) = 3.3 \text{ mg/l}$) which could support a conversion between CIS and MS. This idea of CIS as an early pathologically defined phase in the course of the disease may derive from insensitive methods or from the false interpretation of an analytical parameter. A study which declares intrathecal IgM synthesis to be a risk factor for conversion of CIS to MS [30], simply ignores that only 50% of the MS patients have an intrathecal IgM synthesis at all and that the isotype specific B cells immigrate in the individual MS patient as an arbitrary combination with locally different antibody specificities [31]. From our earlier investigations on juvenile MS [4] we also learned that already at the earliest time in the course of the disease we find the complete set of immune reactions, including the M-,R-,Z-antibody reaction [32]. There has never been shown a direct conversion e.g. from an acute disseminated encephalomyelitis, ADEM, without MRZ antibodies [4] to a chronic form, i.e., to MS with the typical polyspecific immune response [32].

5. Perspectives

The question in the editorial of D Zeman [33] about the relevance of oligoclonal IgG detection when FLC-K analysis is available cannot be answered as long as the nonlinear interpretation scheme described here has not been applied to larger patient cohorts with varying diseases. It is mandatory to use the concept of complete disease-related data patterns [1], as well as disease-specific parameters and to consider the context of the differential diagnostic questions to further establish the clinical relevance of FLC-K analysis. The fashionable search for the ONE, disease-specific marker molecule and the data evaluations with linear regression lines and linear reference ranges may fit the common preference for linear cause and consequence models but keeps missing the understanding of chronic diseases [34]. For this behavior we find a very simple and clear comment from the Austrian naturalist and artist Friedensreich Hundertwasser: “The straight line is a crime”.

References

- [1] H. Reiber, Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases: diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry, *Arq. Neuropsychiatr.* 74 (4) (2016) 337–350.
- [2] B. Wildemann, P. Oschmann, H. Reiber (Ed.), *Laboratory diagnosis in Neurology*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2010.
- [3] H. Reiber, Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns - essentials in neurology and psychiatry, *Arq. Neuropsychiatr.* 74 (6) (2016) 501–512.
- [4] H. Reiber, M. Teut, D. Pohl, K.M. Rostasy, F. Hanefeld, Paediatric and adult multiple sclerosis: age related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid, *Mult. Scler.* 15 (2009) 1466–1480.

- [5] M. Andersson, J. Alvarez-Cermeño, G. Bernardi, I. Cogato, P. Fredman, J. Frederiksen, et al., Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57 (8) (1994) 897–902, <https://doi.org/10.1136/jnnp.57.8.897>.
- [6] H. Reiber, J.B. Peter, Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, *J. Neurol. Sci.* 184 (2) (2001) 101–122, [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(00\)00501-3](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(00)00501-3).
- [7] F. Duranti, M. Pieri, D. Centonze, F. Buttarì, S. Bernardini, M. Dessì, Determination of κ FLC and κ index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis, *J. Neuroimmunol.* 263 (1–2) (2013) 116–120.
- [8] D. Zeman, P. Kušnierová, Z. Švagera, F. Všíanský, M. Byrtusová, P. Hradělek, B. Kurková, O. Zapletalová, V. Bartoš, Assessment of intrathecal free light chain synthesis: comparison of different quantitative methods with the detection of oligoclonal free light chains by isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting, *PLoS ONE* 11 (11) (2016; Nov 15), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166556>.
- [9] C. Fischer, B. Arnetz, J. Koehler, J. Lotz, K.J. Lackner, Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1809–1813.
- [10] M. Christiansen, M.C. Gjelstrup, M. Stilund, T. Christensen, T. Petersen, H. Jon Møller, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* 57 (2) (2018) 210–220, <https://doi.org/10.1515/ccm-2018-0400>.
- [11] D. Zeman, P. Kušnierová, V. Bartoš, P. Hradělek, B. Kurková, O. Zapletalová, Quantitation of free light chains in the cerebrospinal fluid reliably predicts their intrathecal synthesis, *Ann. Clin. Biochem.* 53 (2016) 174–176.
- [12] K.M. Gurtner, E. Shosha, S.C. Bryant, B.D. Andreguetto, D.L. Murray, S.J. Pittock, M.A.V. Willrich, CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison with oligoclonal banding and other CSF indexes, *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (2018) 1071–1080.
- [13] M. Süße, M. Hannich, A. Petersmann, S. Zylla, M. Pietzner, M. Nauck, A. Dressler, Kappa free light chains in cerebrospinal fluid to identify patients with oligoclonal bands, *Eur. J. Neurol.* 25 (2018) 1134–1139.
- [14] S. Presslauer, D. Milosavljevic, W. Huebl, S. Parriger, G. Schneider-Koch, T. Bruecke, Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS, *PLoS ONE* 9 (2) (2014) e89945, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089945>.
- [15] H. Reiber, Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)- a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases, *J. Neurol. Sci.* 122 (1994) 189–203.
- [16] H. Reiber, Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics, *Restor. Neurol. Neurosci.* 21 (2003) 79–96.
- [17] H. Reiber, Blood-brain and Blood-CSF barriers: physiology, pathophysiology and the common diffusion/flow interface, *Fluids and Barrier Research* (2019) submitted.
- [18] M. Auer, H. Hegen, A. Zeileis, F. Deisenhammer, Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula, *Eur. J. Neurol.* 23 (2016) 713–721.
- [19] E. Mundwiler, L. Bernasconi, Detection of intrathecal immunoglobulin synthesis: A rapid and economical approach using a combination of kappa free light chain index and oligoclonal bands, Poster, Autoimmunity Conference, 2018 (Lisbon).
- [20] H. Hegen, D. Milosavljevic, W. Huebl, A. Manowiecka, J. Walde, F. Deisenhammer, S. Presslauer, Cerebrospinal fluid free light chains as diagnostic markers in neuroborreliosis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (2018) 1383–1391.
- [21] S. Presslauer, D. Milosavljevic, W. Huebl, F. Aboulenein-Djamshidian, W. Krugluger, F. Deisenhammer, M. Senel, H. Tumani, H. Hegen, Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study, *Mult. Scler.* 22 (2016) 502–510.
- [22] L.M. Villar, M. Espiño, L. Costa-Frossard, A. Muriel, J. Jiménez, J.C. Álvarez-Cermeño, High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 813–816.
- [23] M. Senel, H. Tumani, F. Lauda, et al., Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis, *PLoS ONE* 9 (2014) e88680.
- [24] H. Reiber, Ungefähr St. Jacobi Chr, The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis, *Mult. Scler.* 4 (1998) 111–117.
- [25] H. Reiber, K. Felgenhauer, Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system, *Clin. Chim. Acta* 163 (1987) 319–328.
- [26] H. Reiber, Ressel Chr, A. Spreer, Diagnosis of Neuroborreliosis-improved knowledge base for qualified antibody analysis and cerebrospinal fluid data pattern related interpretations, *Neurol. Psychiatry Brain Res.* 19 (2013) 159–169.
- [27] W. Albaum, FLC- K Statistics and Graphic Program, Freeware www.albaum.it 7 (2019).
- [28] S. Goffette, M. Schluep, H. Henry, T. Duprez, C. Sindic, Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75 (2004) 308–310.
- [29] B. Kaplan, B.M. Aizenbud, S. Golderman, R. Yaskariev, B.A. Sela, Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 229 (2010) 263–271.
- [30] A. Huss, A. Abdelhak, Halbgabauer St, B. Mayer, M. Senel, M. Otto, H. Tumani, Intrathecal immunoglobulin M production: a promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients, *Anal. Neurol.* 83 (2018) 1032–1036.

- [31] H. Reiber, H. Kruse-Sauter, C. Quentin, Antibody patterns vary arbitrarily between cerebrospinal fluid and aqueous humor of the individual multiple sclerosis patient: specificity-independent pathological B cell function, *J. Neuroimmunol.* 278 (2015) 247–254.
- [32] H. Reiber, Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barré syndrome: immune network connectivity in chronic diseases, *Arq. Neuropsiquiatr.* 75 (8) (2017) 580–588, <https://doi.org/10.1590/0004-282X20170081>.
- [33] D. Zeman, Free light chains in the cerebrospinal fluid. Do we still need oligoclonal IgG? (Editorial), *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (2018) 1011–1014.
- [34] H. Reiber, Chronic diseases with delayed onset after vaccinations and infections: a complex systems approach to pathology and therapy, *J. Arch. Mil. Med.* 5 (3) (2017) e12285, , <https://doi.org/10.5812/jamm.12285>.

Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG

David Zeman^{a,b,c}, Pavel Hradilek^b, Pavlina Kusnierova^{a,c}, Radim Piza^b, Katarina Reguliova^b, Ivana Woznicova^b, Olga Zapletalova^b

Aims. To compare the sensitivity and specificity of CSF-restricted oligoclonal IgG and free light chains as markers of multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases.

Methods. 196 paired CSF and serum samples were examined for oligoclonal IgG and oligoclonal free light chains. The sensitivity and specificity of the tests were calculated and optimal cut-offs for the number of CSF-restricted oligoclonal bands were then determined by analysis of receiver operating characteristic curves.

Results. Optimal cut-off values were ≥ 5 IgG bands for multiple sclerosis, ≥ 4 IgG bands for inflammatory neurological disease, ≥ 6 free κ , and ≥ 2 free λ bands for both purposes. Using these cut-off values, sensitivities and specificities for multiple sclerosis were 83.8% and 91.3% for IgG, 83.8% and 81.0% for free κ , and 67.6% and 75.4% for free λ . For inflammatory neurological disease, sensitivities and specificities were 60.8% and 95.7% for IgG, 69.6% and 92.6% for free κ , and 64.8% and 86.2% for free λ .

Conclusions. Although exact cut-off values may vary according to method, reporting borderline results as positive, may compromise the specificity of the test and should be avoided. The detection of intrathecal free light chain synthesis may be of value especially when the oligoclonal IgG test is negative or borderline, even though its specificity is slightly lower.

Key words: cerebrospinal fluid, oligoclonal free light chains, oligoclonal IgG

Received: May 29, 2014; Accepted: November 6, 2014; Available online: December 5, 2014
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.058>

^aDepartment of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

^bClinic of Neurology, University Hospital Ostrava

^cDepartment of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava

Corresponding author: David Zeman, e-mail: david.zeman@osu.cz

INTRODUCTION

Intrathecal synthesis of IgG as well as free light chains (fLC) are detectable in the majority of patients with multiple sclerosis (MS) and less frequently in other, mostly inflammatory, nervous system diseases^{1,2}. Little information is available however that compares these tests and the existing results are somewhat conflicting.

In their seminal paper on oligoclonal free light chains (o-fLC), Sindic and Laterre reported a method of affinity-mediated immunoblotting (AIB) after isoelectric focusing (IEF) and they found that CSF-restricted free κ light chains can occur even in the absence of oligoclonal IgG (o-IgG) in MS (ref.³). This was later confirmed by the same group, showing o-free κ bands in 18 out of 33 o-IgG negative patients who presented isolated symptoms suggestive of MS (ref.⁴). Lamers et al. reported o-free κ in most samples with CSF-restricted o-IgG and only rarely in those without⁵. Similar results were reported by Krakauer et al.⁶ using classical passive blotting but prolonged incubation (overnight) with anti-fLC antisera. These authors found o-free λ to be both less sensitive and less specific for MS than o-free κ which was at variance with the earlier reports of Bracco et al.⁷ and Gallo et al.^{8,9} of o-free λ being more frequent than o-free κ both

in MS (ref.^{7,8}) and human immunodeficiency virus type 1-infected patients⁹. Lolli et al. studied o-fLC by means of the classical blotting technique; they found o-fLC less frequently than o-IgG (ref.¹⁰). Vakaet and Thompson used polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting and also found o-fLC less frequently than o-IgG in MS (ref.¹¹) and other inflammatory nervous system diseases¹².

Positivity criteria for the o-fLC test are not well established. Usually, ≥ 2 cerebrospinal fluid (CSF)-restricted oligoclonal bands (OCB) are required for o-IgG (ref.^{1,2,13}). However, some authors use different criteria for o-IgG positivity. Mayringer et al.¹⁴ reported 3 bands, which were found to be an optimum cut-off in the context of MS diagnosis in a recent large study¹⁵. Wurster reported 2 or 3 bands to be a “borderline” finding and used 4 bands as a cut-off value for definitely positive samples¹⁶. On the other hand, only 1 CSF-restricted band was considered sufficient for o-IgG positivity in another recent study¹⁷.

We therefore decided to analyze o-IgG as well as o-fLC in various disease groups and to compare the sensitivity and specificity of individual tests for MS and inflammatory nervous system diseases (IND) diagnosis in general.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by Ostrava University Hospital Ethics Committee (reference number 615/2011). All patients underwent lumbar puncture (LP) for diagnostic purposes; o-IgG test was always requested by the clinician. All gave written informed consent for the use of the surplus of biological material for research purposes. We examined a total of 196 paired CSF and serum samples for o-IgG and o-fLC. Subsequently, neurologists were asked to provide a diagnosis and samples were then divided into the following groups:

Group I – Multiple sclerosis (MS) at the time of lumbar puncture (n=28): mainly patients with relapsing-remitting MS (n=21); only 5 patients had primary progressive MS and 2 patients secondary progressive MS;

Group II – Clinically isolated syndrome (CIS) (n=42): we simplified the classification of Miller et al.¹⁸ and grouped patients with at least one asymptomatic MRI lesion versus those without;

Group III – CNS infectious diseases (n=13): neuroborreliosis (n=3), varicella zoster virus (VZV) infection (n=2), aseptic meningitis/meningoencephalitis of unknown aetiology (n=4), and 1 case each of sepsis complicated by meningitis, enteroviral meningitis, herpes simplex encephalitis, and tick-borne encephalitis;

Group IV – Other inflammatory CNS diseases (n=9): CNS vasculitis (n=2), idiopathic recurrent myelitis (n=2), and 1 case each of neuromyelitis optica, paraneoplastic cerebellitis, limbic encephalitis, Tolosa-Hunt syndrome, and chorioretinitis;

Group V – Immune-mediated neuropathies (IMN) (n=10): 4 cases of acute and 4 cases of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, 1 case of acute motor axonal neuropathy and 1 case of polyneuropathy associated with trace amounts of IgM kappa paraprotein and anti-ganglioside IgM reactivity;

Group VI – Non-inflammatory nervous system diseases (NIND) (n=79): included a very wide and heterogeneous spectrum of diagnoses; more frequent were non-inflammatory (mostly diabetic) polyneuropathy (n=9), discarthrosis, spinal canal stenosis and/or radiculopathy (n=6), CNS tumors (n=5), vertigo (n=5), ischaemic stroke (n=4), idiopathic facial nerve palsy (n=3), motor neuron disease (n=3), dementia (n=3), and migraine (n=3);

Group VII – No evidence of organic neurological disorder (control group, n=15): these patients presented mainly with mild mood disorders and/or psychosomatic problems.

For the analysis of the diagnostic value of CSF-restricted OCB tests, an MS group was created of patients fulfilling criteria for definite MS at the time of lumbar puncture (n=28) plus patients presenting CIS who developed definite MS during the follow-up (n=9). The non-MS group consisted of patients in groups III, IV, V, VI and VII. Groups I, II, III, IV and V were considered inflammatory neurological diseases (IND), whereas groups VI and VII were considered “non-inflammatory”.

Most patients were not treated by any immunomodulatory agents. However, we identified 30 patients who had received such treatment either at the time of the LP or less than six months prior to it: 7 patients in group I, 9 patients in group II, 2 patients in group III, 4 patients in group IV, 7 patients in group VI and 1 patient in group VII. One patient in the MS group was treated with natalizumab. Five patients were treated with intravenous methylprednisolone (IVMP) at the time of LP (first infusion at least one day before LP) and another five patients received IVMP 2-4 months prior to LP (two of them were still given low-dose oral steroids at the time of the LP). Another three patients were on low-dose oral steroids (in one case in combination with oral azathioprine). These treatments were given for MS or CIS-related symptoms. Another MS patient, suffering from type 1 diabetes with organ complications, received mycophenolate mofetil after previous renal/pancreas transplant, and one CIS patient received infliximab because of psoriasis. One patient with neuroborreliosis had been treated with intravenous dexamethasone several days prior to LP because of radicular syndrome, and a patient with VZV-infection had received oral steroids for facial palsy. A patient with neuromyelitis optica had been treated with oral methylprednisolone and azathioprine and had received a series of plasma exchanges one month prior to LP. One patient with idiopathic recurrent myelitis received IVMP and both patients with CNS vasculitis received low-dose oral steroids. In the NIND group, two patients had been treated with interferon alfa-2a because of polycythaemia vera (one had received intravenous dexamethasone two weeks prior to the LP); two patients with suspected optic neuritis were treated with IVMP (final diagnoses were nasopharyngeal carcinoma with propagation into the orbit in one case and acute hypertonic neuroretinopathy in the other case), one patient received intravenous dexamethasone for radicular syndrome and two patients received low dose oral methylprednisolone in combination with sulfasalazine for rheumatoid arthritis and unspecified arthralgias, respectively. One patient in the control group too, had been treated with oral methylprednisolone because of suspected central limb monoparesis and minimal non-specific MRI changes (the final diagnosis was somatoform disorder).

In the exceptional cases of repeated lumbar punctures, the results of the first sample were used. Heavily blood-contaminated CSFs were not used for the purpose of this study. Microscopic blood contamination was allowed, since no false positive results of the qualitative tests were expected.

CSF and sera were kept at 2-8 °C for up to one week for o-IgG test, and up to three weeks for o-fLC test. Repeated analyses of several samples showed consistent results during this time period. Samples were not frozen before OCB analysis.

o-IgG was detected by means of IEF followed by immunofixation using a commercial kit on Hydrasys instrument (Sebia, Évry Cedex, France, Cat. No. 4355). Standard amounts of IgG were applied. o-fLC were ana-

lyzed in undiluted CSFs and paired sera diluted 1/100 by IEF focusing followed by AIB as originally described by Sindic and Laterre³ and slightly modified by us¹⁹. This method combines the advantages of the previously described techniques of AIB (ref.²⁰), glutaraldehyde fixation²¹, biotin-(strept)avidin amplification²² and alkaline phosphatase detection²³ to obtain maximum sensitivity. The only difference to our previous report consisted in the prolongation of the incubation time with biotinylated antibodies against free κ and free λ light chains to 105 min, which improved the detection limit for free λ up to 0.75 ng of monoclonal free λ protein. o-IgG κ and o-IgG λ bands were analyzed as described¹⁹, but the amount of applied IgG was reduced to 12 ng. For logistic reasons and/or due to the shortage of antibodies, only 79 samples could be analyzed for the o-IgG κ /IgG λ pattern. The patient group described in this study included none of samples reported in our previous paper.

The results were classified as negative or positive based on the conventional criterion of ≥ 2 CSF-restricted OCB for positivity. Classification into types 1-5 according to the international consensus for o-IgG (ref.^{24,25}) was also performed but for the sake of simplicity is not reported in this paper. CSF-restricted bands were counted and if faint bands only were observed, this was noted. Analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves was undertaken to find optimal cut-off values for the number of CSF-restricted OCB.

The predominance of free κ or λ bands was assessed on the basis of visual comparison of the blots, taking into account both the number and intensity of CSF restricted bands. However, at least twice as many bands of one type, compared to the other, were required for judging the predominance of one light chain type.

Statistical analysis was performed using MedCalc software version 11.4.4 (Frank Schoonjans, Belgium). Binomial exact confidence intervals were calculated for individual areas under the curve and the method of DeLong et al.²⁶ was used to calculate the difference between two areas under the curve. Chi squared tests were used for categorical data.

RESULTS

Table 1 shows the proportions of samples positive for o-IgG, o-free κ and o-free λ in groups I-VII, using conventional criterion of at least 2 CSF-restricted OCB. The presence of o-IgG correlated with the presence of o-free κ as well as o-free λ (chi-square test, $P < 0.0001$). Also, the presence of both o-fLC correlated with each other (chi-square test, $P < 0.0001$).

Subdividing CIS patients according to Miller et al.¹⁸ showed that the intrathecal humoral immune response strongly correlated with the MRI findings (chi-square test, $P = 0.0081$ for o-IgG, $P < 0.0001$ for o-free κ and $P = 0.0002$ for o-free λ). Only 2/6 patients without at least one asymptomatic MRI lesion displayed CSF-restricted o-IgG (only two bands in both cases), and none displayed CSF-restricted o-fLC bands. In contrast, 32/36 patients with at least one asymptomatic MRI lesion displayed CSF-restricted o-IgG, 33 o-free κ , and 30 o-free λ light chain bands. Nine CIS patients progressed to definite MS during the study. All of these patients had multiple MRI lesions, in 8 cases, CSF-restricted o-IgG as well as o-fLC (both o-free κ and o-free λ in 7 cases and o-free κ only in the remaining case) and 1 patient was OCB-negative in all tests. In CNS infectious diseases, o-fLC were positive

Table 1. Proportion of patients positive for o-IgG, o-free κ and o-free λ in individual disease groups, using conventional criterion of ≥ 2 CSF-restricted bands.

Group	o-IgG	o-free κ	o-free λ	At least 1 out of the 3 tests	At least 1 of both fLC tests	Both fLC	All tests positive
I (MS; n=28)	23 (82.1%)	24 (85.7%)	18 (64.3%)	25 (89.3%)	24 (85.7%)	18 (64.3%)	17 (60.7%)
II (CIS; n=42)	34 (81.0%)	33 (78.6%)	30 (71.4%)	36 (85.7%)	34 (81.0%)	29 (69.0%)	28 (66.7%)
III (CNS infections; n=13)	4 (30.7%)	11 (84.6%)	9 (69.2%)	12 (92.3%)	12 (92.3%)	8 (61.5%)	3 (23.1%)
IV (OIND; n=9)	5 (55.6%)	7 (77.8%)	6 (66.7%)	7 (77.8%)	7 (77.8%)	8 (88.9%)	5 (55.6%)
V (IMN; n=10)	1 (10.0%)	5 (50.0%)	3 (30.0%)	6 (60.0%)	5 (50.0%)	3 (30.0%)	0 (0%)
VI (NIND; n=79)	10 (12.7%)	18 (22.8%)	13 (16.5%)	23 (29.1%)	21 (26.6%)	10 (12.7%)	5 (6.3%)
VII (control group; n=15)	1 (6.7%)	3 (20.0%)	0 (0%)	3 (20.0%)	3 (20.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total (n=196)	78 (39.8%)	101 (51.5%)	79 (40.3%)	112 (57.1%)	106 (54.1%)	76 (38.7%)	58 (29.6%)

MS, multiple sclerosis; CIS, clinically isolated syndrome; OIND, other inflammatory CNS diseases; IMN, immune-mediated neuropathies; NIND, non-inflammatory nervous system diseases

more frequently than o-IgG. The only o-fLC negative case of a patient with VZV ganglionitis was also negative for o-IgG, but pleocytosis and elevated anti-VZV antibody index were found.

For group IV, all OCB tests were negative in both patients with idiopathic myelitis. One case of CNS vasculitis was borderline positive for o-free κ , while other OCB tests were negative. In the other case of CNS vasculitis, all three OCB tests were positive, as in patients with paraneoplastic cerebellitis, neuromyelitis optica, Tolosa-Hunt syndrome, and chorioretinitis. In the case of limbic encephalitis, both o-fLC tests were positive but the o-IgG test was negative. 9 out of 10 cases of immune-mediated neuropathy (group V) were negative for CSF-restricted IgG bands, whereas 2 CSF-restricted IgG bands were found in the remaining case. Nevertheless, 5 cases were positive for CSF-restricted o-free κ and 3 cases also for o-free λ bands.

Within the NIND group, findings in 5 patients with CNS tumors are worth mentioning in detail. In 3/5 cases, CSF cytology was positive for atypical/malignant cells (highly atypical lymphocytes in 2 cases of the B-CLL and unspecified malignant cells in the case of malignant meningeal infiltration of unknown primary source), whereas only mild lymphocytic pleocytosis was present in the other 2 cases (1 case each of primary CNS lymphoma and glioblastoma). 3 cases were positive for o-IgG and all cases were positive for o-free κ and 3 for o-free λ . An example of OCB findings in one patient of this group is shown in Fig. 1. Other positive cases in the NIND group com-

prised a wide range of other diagnoses: ischaemic stroke and vestibular syndrome in two cases each and epilepsy, dementia, idiopathic facial palsy, ocular myositis, myasthenia gravis, vertigo, cervicocranial syndrome, cervical myelopathy, spinal stenosis, intervertebral disc herniation with radiculopathy, ischaemic mononeuropathy, toxic/diabetic polyneuropathy, fibromyalgias, headache in patient with monoclonal gammopathy of undetermined significance, tetany, mood disorder and somatoform disorder in one case each). Those cases without proven etiological diagnosis (i.e. with only symptom-related diagnoses) had features atypical for CIS, normal brain CT and/or MRI and no evidence of an infectious cause.

Analysis of samples positive for CSF-restricted o-fLC showed κ fLC predominance in more than half of the cases (62 out of 106 o-fLC positive cases, i.e. 58.5%), whereas free λ predominance was rarely found (9 out of 106 cases, i.e. 8.5%). Free κ/λ light chain predominance correlated well with the predominance of κ/λ light chains in IgG (chi-square test, $P < 0.0001$), although IgG κ predominance was found somewhat less frequently than that of free κ (13 out of 32 positive cases, i.e. 40.6%).

Although there were similar frequencies of o-IgG and o-free κ positivity in groups I and II, o-free κ were positive more frequently than o-IgG not only in the other “inflammatory” groups III, IV and V, but also in the “non-inflammatory” groups VI and VII. This finding led us to search for an optimal criterion for positivity of individual tests.

Fig. 2 shows fewer CSF-restricted bands in patients in NIND and control groups than in IND patients. We there-

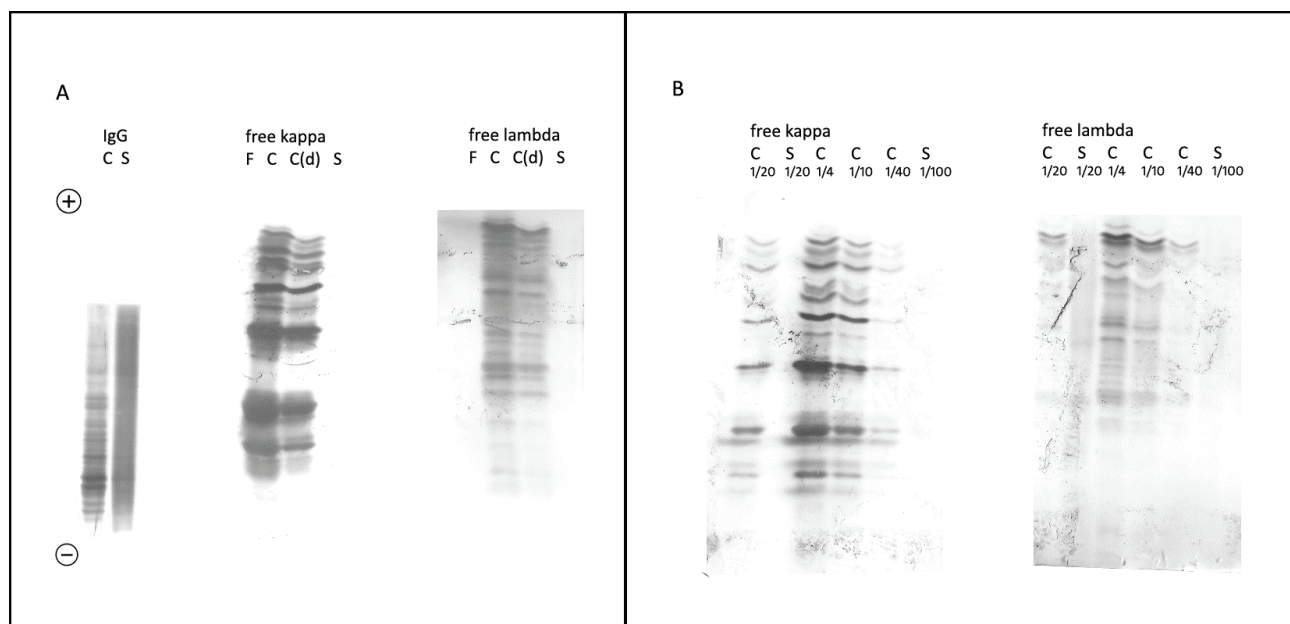


Fig. 1. Pronounced intrathecal IgG and fLC synthesis in the case of malignant meningeal infiltration.

C, cerebrospinal fluid; S, serum; F, Flebogamma (intravenous IgG preparation – negative control); (d), diluted 1/4. (A) CSF-restricted oligoclonal IgG, free κ and free λ bands. For fLC analysis, CSF sample was examined neat as well as diluted 1/4. (B) Dilution experiments showing CSF-restricted o-fLC bands even when CSF and serum were equally diluted (1/20). Higher concentration of CSF fLC than in serum can be assumed. Indeed, using Freelite kit on the SPA Analyzer (The Binding Site, Birmingham, United Kingdom), we measured CSF free κ and free λ 80.5 mg/L and 32.2 mg/L, respectively, whereas serum free κ and free λ concentrations were 14.5 mg/L and 12.1 mg/L, respectively.

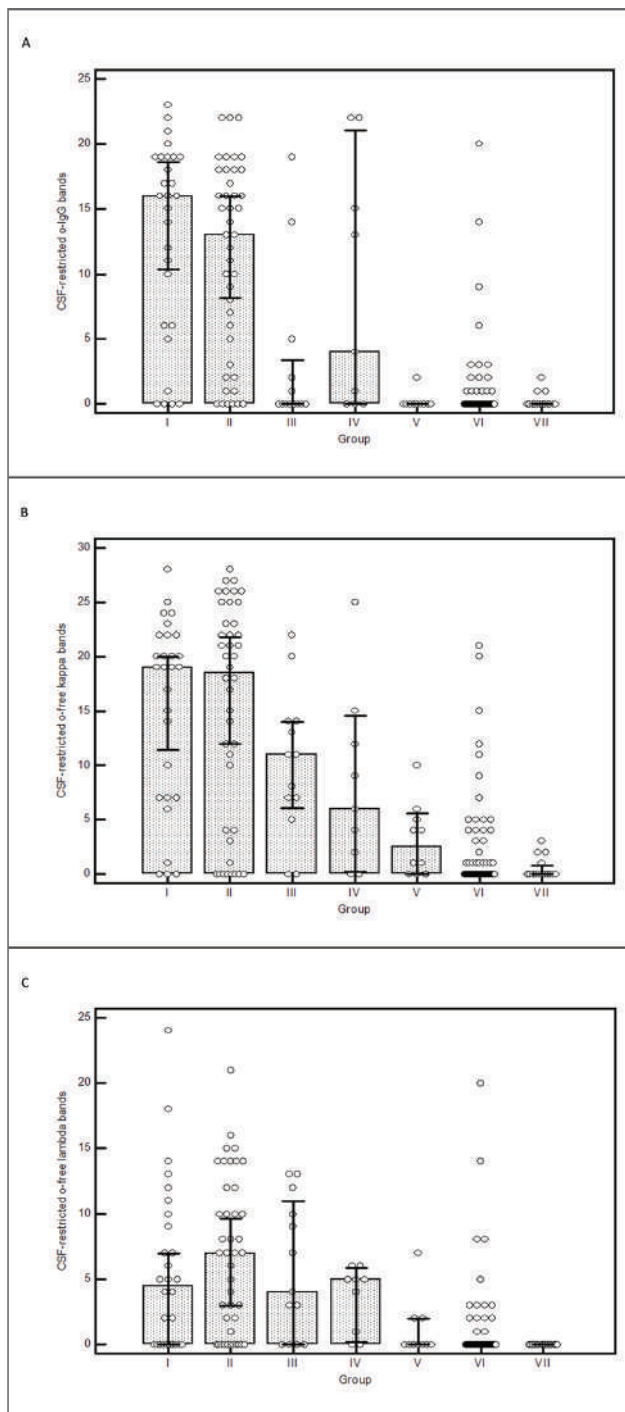


Fig. 2. Numbers of CSF-restricted oligoclonal bands in the individual disease groups. Bars for medians; error bars: 95% confidence intervals for medians

I = multiple sclerosis, II = clinically isolated syndrome, III = CNS infectious diseases, IV = other inflammatory CNS diseases, V = immune-mediated neuropathies, VI = non-inflammatory neurologic diseases, VII = control group. (A) oligoclonal IgG, (B) oligoclonal free κ , (C) oligoclonal free λ .

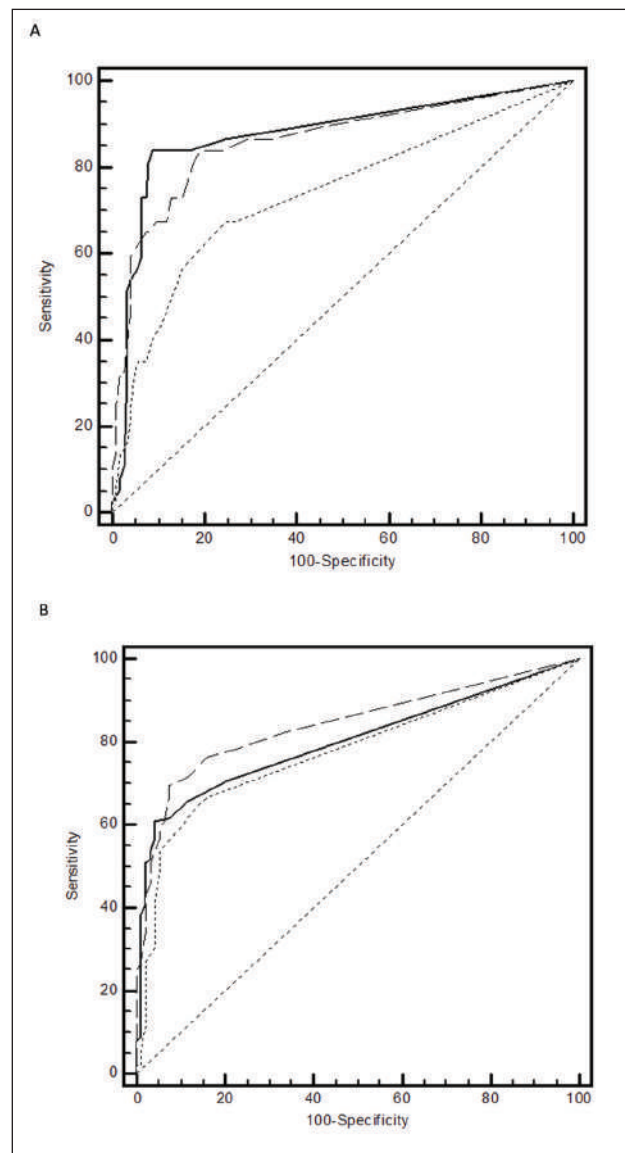


Fig. 3. Comparison of ROC curves for o-IgG (solid line), o-free κ (dashed line) and o-free λ (dotted line).

(A) For the diagnosis of multiple sclerosis. (B) For the diagnosis of inflammatory nervous system disease. For MS diagnosis, AUC values were 0.876 (95% CI: 0.816-0.923), 0.862 (95% CI: 0.800-0.911), and 0.739 (95% CI: 0.664-0.804); for IND diagnosis, AUC values were 0.802 (95% CI: 0.739-0.855), 0.843 (95% CI: 0.784-0.891) and 0.777 (95% CI: 0.712-0.833), for o-IgG, o-free κ and o-free λ respectively ($P < 0.0001$ in all cases). Differences between areas were significant for o-IgG versus o-free λ ($P = 0.0008$) and o-free κ versus o-free λ ($P = 0.0026$) in A, and between o-free κ versus o-free λ ($P = 0.0059$) in B.

Table 2. Sensitivity and specificity of CSF-restricted OCB for the diagnosis of MS or inflammatory neurologic disorder (IND) in general, using different cut-off values.

		MS		IND	
		Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
o-IgG	≥5 for MS, ≥4 for IND	83.8 (68.0-93.8)	91.3 (84.9-95.6)	60.8 (50.6-70.3)	95.8 (89.5-98.8)
	≥2	83.8 (68.0-93.8)	83.3 (75.7-89.4)	65.7 (55.6-74.8)	88.3 (80.0-94.0)
	At least 1	86.5 (71.2-95.5)	75.4 (66.9-82.6)	70.6 (60.7-79.2)	79.8 (70.2-87.4)
o-free kappa	≥6	83.8 (68.0-93.8)	81.0 (73.0-87.4)	69.6 (59.7-78.3)	92.6 (85.3-97.0)
	≥2	86.5 (71.2-95.5)	65.1 (56.1-73.4)	78.4 (69.2-86.0)	77.7 (67.9-85.6)
	At least 1	89.2 (74.6-97.0)	55.6 (46.4-64.4)	82.4 (73.6-89.2)	67.0 (56.6-76.4)
o-free lambda	≥2	67.6 (50.2-82.0)	75.4 (66.9-82.6)	64.7 (54.6-73.9)	86.2 (77.5-92.4)
	At least 1	67.6 (50.2-82.0)	73.0 (64.4-80.5)	66.7 (56.6-75.7)	84.0 (75.0-90.8)

CI, confidence interval

Please note that MS group in Tables 3 and 4 is not identical with group I but comprises patients of group I (n=28) plus those patients presenting with CIS who developed definite MS during follow-up (n=9). The IND group consists of patient groups I-V. Sensitivity is defined as the percentage of patients having MS or IND positive for CSF-restricted OCB; specificity for MS is defined as percentage of patients from groups III-VII without CSF-restricted OCB; specificity for IND is defined as percentage of patients from groups VI and VII without CSF-restricted OCB. Calculated optimal cut-off values and appropriate sensitivities and specificities are indicated in bold.

Table 3. Sensitivity and specificity of CSF-restricted OCB combined tests for the diagnosis of MS or inflammatory neurologic disorder in general, using different cut-off values.

Combined test	Positivity criteria	MS		IND	
		Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
At least 1 OCB test +	Conventional (≥2 CSF-restricted bands)	89.2	59.5	84.3	72.3
	Excluding weak bands	86.5	65.1	77.5	74.5
	Using optimal cut-off values	89.2	69.8	77.5	80.9
At least 1 fLC OCB test +	Conventional (≥2 CSF-restricted bands)	86.5	61.9	80.4	74.5
	Excluding weak bands	83.8	66.7	74.5	75.5
	Using optimal cut-off values	86.5	70.6	76.5	81.9
Both fLC OCB tests +	Conventional (≥2 CSF-restricted bands)	67.6	77.0	64.7	89.4
	Excluding weak bands	62.2	84.9	53.9	94.7
	Using optimal cut-off values	67.6	85.7	57.8	96.8
All OCB tests +	Conventional (≥2 CSF-restricted bands)	64.9	89.7	52.0	94.7
	Excluding weak bands	59.5	92.1	43.1	96.8
	Using optimal cut-off values	64.9	92.9	48.0	97.9

Optimal cut-off values for the number of CSF-restricted bands: ≥4 for o-IgG; ≥6 for free κ and ≥2 for free λ. For the sake of simplicity, minor difference in optimal cut-off values for o-IgG bands (≥5 for MS and ≥4 for IND) was not taken into account and the criterion of ≥4 o-IgG bands was used for both groups. Sensitivities and specificities using optimal cut-off values are shown in bold. See also legend to Table 2 for details.

fore compared and analyzed ROC curves to determine the optimal cut-off values of the number of CSF-restricted bands, for the MS and IND diagnoses (Fig. 3).

An optimal cut-off for positivity was estimated to be ≥5 IgG bands for MS and ≥4 IgG bands for IND; for fLC bands, optimal cut-off values were the same for both purposes, namely ≥6 for free κ and ≥2 for free λ.

The specificity and sensitivity of the tests using calculated optimal cut-off values or a conventional cut-off value of ≥2 bands or at least 1 CSF-restricted band were compared (Tables 2 and 3).

We tested whether specificity could be increased if weak bands were ignored. This, however, decreased the sensitivity and failed to help increase the specificity (Table 3). In contrast, using optimal cut-off values helped

increase specificity without compromising sensitivity. Noteworthy is that in 9/26 cases with unexpected OCB positivity (patients in groups VI and VII), numbers of CSF-restricted OCB were below these cut-off values; in particular, all 3 patients from the control group positive for free κ light chains had less than 5 free κ bands and the single patient in this group positive for o-IgG only had 2 CSF-restricted o-IgG bands.

DISCUSSION

The main result of this study is the finding that optimizing the criteria for o-IgG and o-FLC positivity may increase specificity without compromising sensitivity. Although exact cut-off values require validation in an independent cohort and could depend on method used, the conclusion is that borderline findings of a few CSF-restricted bands should be interpreted with caution. For o-IgG, such findings have been found to be unreliable²⁷ and mostly unrelated to the diagnosis of MS (ref.²⁸). On the other hand, a few patients with such a finding, or even a single CSF-restricted band^{29,30}, may have MS (ref.³¹). For this reason, we prefer to report borderline findings as such and not as negative. If there are numerous CSF-restricted bands, the value of band counting is questionable but bands should be counted in cases where only a few CSF-restricted bands are seen.

The frequencies of o-FLC and o-IgG positive results in MS are in agreement with other studies^{3,6,15,32}. In CNS infections, CSF-restricted o-FLC bands were detected more frequently than CSF-restricted o-IgG bands. We speculate that intrathecal synthesis of o-FLC might precede detect-

able intrathecal IgG synthesis; this should be confirmed in a larger study.

The immune-mediated neuropathies requires special attention as the absence of intrathecal humoral immune response is considered typical in these diseases. Indeed, only 1/10 cases displayed a borderline positive o-IgG test. Nevertheless, half of these patients were positive for CSF-restricted o-FLC.

In the NIND group, the most striking finding was o-FLC positivity in CNS tumors. These findings undoubtedly do not represent 'false positivity' from the immunological point of view, but reflect the intrathecal humoral immune response that may be directed either against the tumor itself or, secondarily, against the damaged nervous tissue. The latter hypothesis was proposed by Arneth and Birklein to explain their findings of elevated free λ concentrations in CSF in patients with cerebral ischaemia³³, and although passionately discussed^{34,35}, it requires further attention. Similar explanation is plausible for some of the other cases in the NIND group, although the possibility of unrecognized inflammatory cause cannot be completely ruled out.

All 6 CIS patients without at least one asymptomatic MRI lesion had negative OCB tests (except for 2 borderline o-IgG results) and none of them progressed to definite MS during the study. Nevertheless, no definite conclusions concerning the diagnostic use of CSF analysis in this subgroup of CIS patients can be made from our results due to small samples of the cases as well as absence of longer- follow-up data. Further studies are required to elucidate the value of o-IgG and o-FLC tests in this context. Although the diagnosis of MS, according to recent revision of McDonald criteria, does not require

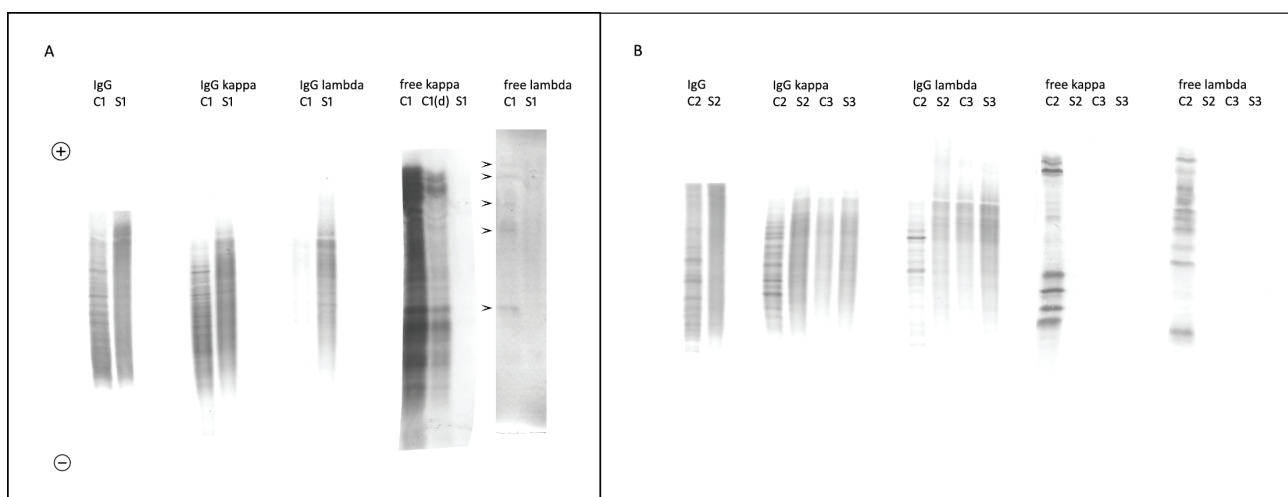


Fig. 4. Two patterns of CSF-restricted light chain distribution in MS patients.

C, cerebrospinal fluid; S, serum; (d), CSF diluted 1/5. Samples 1 and 2 (positive) originate from MS patients, whereas sample 3 (negative) is from the control group. (A) Clear predominance of κ light chains can be seen in Sample 1. Note that all IgG bands are of the κ type, whereas almost no staining for IgG λ is visible in the CSF, suggesting highly elevated IgG κ /IgG λ ratio. Also note that CSF had to be diluted 1/5 for free κ light chain analysis in order to make bands clearer, whereas only a few faint free λ bands can be seen (arrowheads). (B) Both CSF-restricted IgG as well as free κ and λ light chains are present. Comparison of oligoclonal IgG pattern (IEF/IF) with IgG κ /IgG λ patterns (IEF/AIB) is difficult in this case, which can be expected considering the differences in the IEF procedures.

CSF analysis (except for primary progressive MS fulfilling only 1 of 2 MRI criteria) (ref.¹³), most neurologists still recommend CSF examination as an important tool to exclude alternative diagnosis in CIS patients as well as to increase the predictive value for conversion to clinically definite MS (ref.³⁶). It has been demonstrated that the presence of OCB considerably increases the risk of suffering a second attack even in MRI-negative patients³⁷ and, in contrast, that as many as 50% of MRI-positive but OCB-negative CIS patients were finally diagnosed as having diseases other than MS during the follow-up³⁸.

Different properties of fLC monomers and dimers have been reported, as well as a more specific CSF fLC profile for MS using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) separation^{40,41}. Interestingly, we also found two types of CSF-restricted oligoclonal patterns in MS patients: one with a predominance of κ light chains and the other with both CSF-restricted κ as well as λ light chains (Fig. 4). These two types may correspond to patients with the elevation of free κ monomers and free λ dimers in CSF in the study of Kaplan et al.⁴¹ On the other hand, free λ predominance was rare in our study. It would be interesting to demonstrate whether κ light chain predominance is associated with more or less aggressive course of the disease compared to balanced κ and λ light chain intrathecal production. The value of elevated CSF free κ concentrations for predicting disability progression has already been reported^{41,42}, but no ratio of CSF free κ to CSF free λ concentrations has been sought for. Further studies on similar relationships are warranted. Although the value of quantitative analysis prior to IEF is questioned by some authors^{43,44}, it would be interesting to apply standardized amounts of fLC in both CSF and serum for IEF analysis. This would, however, require precise fLC quantification in both fluids that is difficult to achieve for the low concentrations that occur in normal CSFs (ref.⁴⁵). Up to now, there is no commercially available method explicitly designated for fLC measurement in the CSF, and absolute values obtained by various ELISAs or nephelometric assays modified for fLC measurement in the CSF are quite discrepant^{5,33,46-50}. Also, greater dilution of samples would require more sensitive, e.g. luminescent, detection of o-fLC on the membranes. We are not aware of any study using such an approach for o-fLC. Recently, quantitation of CSF free κ light chains has been compared with o-IgG test in MS and CIS patients with encouraging results⁵¹⁻⁵³. We believe that CSF fLC concentrations should be compared with the o-fLC test as well. It is known that qualitative analysis of o-IgG is more sensitive for the demonstration of intrathecal IgG synthesis than quantitative tests. However, this might not be true for fLC; indeed, correlation between quantitative and qualitative tests is much better than for IgG, and no or only marginal increase in sensitivity has been achieved with the qualitative test compared to fLC quantitation in two studies^{3,5}.

Unlike Kaplan et al.^{39,40}, the specificity of our o-fLC test was lower than that of the o-IgG test. This might point to a more important role of fLC dimerization status (on which no information is available using IEF) than that of

free κ/λ proportion in the pathophysiology of MS, as it has been shown recently that fLC monomers and dimers are differentially secreted by plasma cells and functionally distinct⁵⁴. Methods yielding combined information on both molecular weight and isoelectric point were described for fLC (ref.⁵⁵), but these are technically more demanding and hardly applicable in routine clinical laboratories.

The antigen specificity of fLC (ref.^{3,54}) should also be addressed in future studies. Only one study demonstrating antigen-specific fLC in the CSF was found⁵⁶. These authors failed to demonstrate *Toxoplasma gondii*-specific fLC in AIDS patients with *T. gondii* encephalitis using IEF/AIB: although o-fLC were found in all patients; antigen-specific fLC were demonstrated by ELISA instead. The way Villar et al. described CSF-restricted lipid-specific oligoclonal IgM bands⁵⁷, we can speculate whether CSF-restricted fLC could have the same specificity.

The main limitation of this study was patient selection. Although we attempted to investigate all consecutive samples sent for routine immunochemical CSF analyses, for logistic reasons this was not possible. Instead, after the publication of our previous study, we were frequently asked for o-fLC tests by clinicians. The neurologists were hence not blind to the results. However, it is rather unlikely that this could lead to misdiagnosis of MS since current MS diagnostic criteria¹³ do not usually rely on CSF findings. Inclusion of patients treated with immunomodulatory agents may also be considered problematic. Changes in o-IgG patterns after such therapies have been described by some authors⁵⁸⁻⁶⁰ but not others^{61,62}. It should be noted, however, that the only natalizumab-treated patient in our study had numerous CSF-restricted o-IgG (o-IgG κ only) as well as o-free κ (but no o-free λ) bands, and that we found no significant difference either in the numbers of CSF-restricted o-IgG or o-fLC bands or in the proportions of positive samples in treated and untreated MS patients (data not shown). However, the study was not aimed at looking for these differences. Collection of larger data sets and analysis of paired pre- and post-treatment samples are clearly warranted to analyze the effect of treatment on o-IgG and o-fLC profile in detail.

There are two other concerns that might complicate the interpretation of the results. First, the inclusion of CIS patients who did not progress to definite MS in inflammatory neurological disease group remains speculative; it cannot be excluded that some of these patients suffered from a non-inflammatory condition.

Second, an optimal cut-off for the decision between negative or positive can vary for different OCB detection techniques.

One may argue that using sensitive IEF/AIB method for both o-IgG as well as for o-fLC detection would be more appropriate than comparison with routine o-IgG detection method. However, evaluation of an in-house method requires comparison with a widely used routine method rather than with another in-house method. In addition, we found no clinically significant difference between routine IEF with immunofixation (Sebia) and in-house IEF/AIB method for o-IgG detection²⁷.

CONCLUSIONS

For MS diagnosis, the CSF-restricted o- κ LC test has similar sensitivity to the oligoclonal IgG test but lower specificity. For other inflammatory nervous system diseases, o- κ LCs are more frequent than oligoclonal IgG. Detection of intrathecal κ LC synthesis for routine clinical purposes is meaningful only when the o-IgG test is negative or borderline. Reporting borderline OCB results as positive, compromises the specificity of the test both for MS and IND and thus should be avoided. While we tried to assess the utility of the test for IND in general and to discuss unexpected findings in non-MS cases in more detail, further studies directed more specifically to the CIS and MS patients are warranted.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are indebted to Assoc. Prof. Kristian Safarik, Head of the Dept. of Biomedical Sciences, University of Ostrava, and Dr. Zdenek Svagera, Head of the Dept. of Clinical Biochemistry, University Hospital Ostrava for their continuous support; to Ilona Faruzelova, Lenka Fürstova, Renata Maleckova, and Olga Michnova for performing routine o-IgG analyses; to Monika Hradecka for language corrections; to Frantisek Vsiansky for his advice on reporting the results of statistical analysis; and to Filip Chadzijski for his help in preparing figures for the manuscript.

Authorship contributions: DZ, PH, PK, OZ: study design; DZ, PK: evaluation of o-IgG and o- κ LC tests; DZ, PH, RP, KR, IW, OZ: clinical data collection and management; DZ, PK, PH, RP, KR, IW, OZ: data analysis; DZ, PH, PK, OZ: manuscript drafting; DZ, PH, PK, RP, KR, IW, OZ: final approval.

Conflict of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:333-40.
- Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;180:17-28.
- Sindic CJ, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991;33:63-72.
- Goffette S, Schluep M, Henry H, Duprez T, Sindic CJ. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:308-10.
- Lamers KJ, de Jong JG, Jongen PJ, Kock-Jansen MJ, Teunissen MA, Prudon-Rosmulder EM. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements. *J Neuroimmunol* 1995;62:19-25.
- Krakauer M, Schaldemose Nielsen H, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1998;98:161-5.
- Bracco F, Gallo P, Menna R, Battistin L, Tavalato B. Free light chains in the CSF in multiple sclerosis. *J Neurol* 1987;234:303-7.
- Gallo P, Tavalato B, Bergenbrant S, Sidén Å. Immunoglobulin light chain patterns in the cerebrospinal fluid. A study with special reference to the occurrence of free light chains in cerebrospinal fluid with and without oligoclonal immunoglobulin G. *J Neurol Sci* 1989;94:241-53.
- Gallo P, Piccinno MG, De Rossi A, Pagni S, Amadori A, Chieco-Bianchi L, Tavalato B. Free light chains of immunoglobulins in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Neuroimmunol* 1990;26:229-38.
- Lolli F, Siracusa G, Amato MP, Fratiglioni L, Dal Pozzo G, Galli E, Amaducci L. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1991;83:239-43.
- Vakaet A, Thompson EJ. Free light chains in the cerebrospinal fluid: an indicator of recent immunological stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;48:995-8.
- McLean BN, Miller D, Thompson EJ. Oligoclonal banding of IgG in CSF, blood-brain barrier function, and MRI findings in patients with sarcoidosis, systemic lupus erythematosus, and Behçet's disease involving the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:548-54.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302.
- 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.
- Bourahoui A, de Seze J, Guttierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 2004;11:525-9.
- Wurster U. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: A follow up study. Letter to the Editor. *Neurology* 2004;62:1237.
- Lourenco P, Shirani A, Saeedi J, Oger J, Schreiber WE, Tremlett H. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. *Mult Scler* 2012;19:577-84.
- Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, Richert JR, Reingold SC, Polman CH. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008;14:1157-74.
- Zeman D, Hradílek P, Švagera Z, Mojžíšková E, Woznicová I, Zapletalová O. Detection of oligoclonal IgG kappa and IgG lambda using Hevylite antibodies. Comparison with oligoclonal free light chain pattern. *Fluids Barriers CNS* 2012;9:5.
- Knisley KA, Rodkey LS. Affinity immunoblotting. High resolution isoelectric focusing analysis of antibody clonotype distribution. *J Immunol Methods* 1986;95:79-87.
- Ikegati N, Kennet RH. Glutaraldehyde fixation of the primary antibody-antigen complex on nitrocellulose paper increases the overall sensitivity of immunoblot assay. *J Immunol Methods* 1989;124:205-10.
- Olsson T, Kostulas V, Link H. Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling, and avidin-biotin amplification. *Clin Chem* 1984;30:1246-9.
- Sádaba MC, González-Porqué P, Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004;284:141-5.
- Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhães A, Massaro AR, Öhman S, Reiber H, Rönnebeck L, Schluep M, Schuller E, Sindic CJ, Thompson EJ, Trojano M, Wurster U. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Öhman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ,

- Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005;62:865-70.
26. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non-parametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-45.
27. Novackova L, Zeman D. Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: comparison between commercial immunofixation method and home-made affinity immunoblotting method and evaluation of interobserver agreement. *Klin Biochem Metab* 2011;19:229-33.
28. Lin MW, Suan D, Lenton K, Henniker T, Burke T, Vucic S, Fulcher DA. Differentiating patterns of oligoclonal banding in the cerebrospinal fluid improves diagnostic utility for multiple sclerosis. *Pathology* 2012;44:248-50.
29. Davies G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band: a follow-up study. *Neurology* 2003;60:1163-6.
30. Franciotta D, Bergamaschi R, Amato MP, Zardini E, Persico A, Portaccio E, Lolli F. Clinical correlations of CSF single IgG bands. *J Neurol* 2005;252:1274-5.
31. Absalom S, Shah S. Differentiating patterns of oligoclonal banding in the cerebrospinal fluid and the diagnosis of multiple sclerosis. *Pathology* 2013;45:441-2.
32. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:909-14.
33. Arneth B, Birklein F. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 2009;119:39-44.
34. Reiber H. Free light chains in CSF – pushing a method with biased interpretations. Letter to the editor. *Acta Neurol Scand* 2009;120:445-6.
35. Arneth B. Author's response to professor Reiber's second letter concerning our article: High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 2009; 120:451-2.
36. Tumani H, Deisenhammer F, Giovannoni G, Gold R, Hartung HP, Hemmer B, Hohlfeld R, Otto M, Stangel M, Wildemann B, Zettl UK. Revised McDonald criteria: the persisting importance of cerebrospinal fluid analysis. Letter to the Editor. *Ann Neurol* 2011;70:520.
37. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008;70:1079-83.
38. Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M, Pantoni L, Pescini F, Sorbi S, Amato MP. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15:472-8.
39. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariyev R, Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;229:263-71.
40. Kaplan B, Golderman S, Yahalom G, Yeskaraev R, Ziv T, Aizenbud BM, Sela BA, Livneh A. Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2013;390:74-80.
41. Rudick RA, Medendorp SV, Namey M, Boyle S, Fischer J. Multiple sclerosis progression in a natural history study: Predictive value of cerebrospinal fluid free kappa light chains. *Mult Scler* 1995;1:150-5.
42. Rinker JR, Trinkaus K, Cross AH. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. *Neurology* 2006;67:1288-90.
43. Thompson EJ. Quality versus quantity: Which is better for cerebrospinal fluid IgG? *Clin Chem* 2004;50:1721-2.
44. Keir G, Barrio S, Thompson EJ. Discrepancies between qualitative and quantitative analysis of cerebrospinal fluid IgG: densitometric comparison of nephelometry-silver versus immuno-enzymes. *Ann Clin Biochem* 2008;45:404-8.
45. Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H, Matsumori A, Maruyama T, Komoda T, Nagata A. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:522-32.
46. Fagnart OC, Sindic CJM, Laterre C. Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 1988;19:119-32.
47. Lolli F, Amaducci L. Measurement of free kappa immunoglobulin light chains in the cerebrospinal fluid by a competitive avidin-biotin ELISA. *Clin Chim Acta* 1989;182:229-34.
48. Fischer C, Arneth B, Koehler J, Lotz J, Lackner KJ. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004;50:1809-13.
49. Desplat-Jégo S, Feuillet L, Pelletier J, Bernard D, Chériff AA, Boucraut J. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. *J Clin Immunol* 2005;25:338-45.
50. Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, Bayer P, Hübl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255:1508-14.
51. Villar LM, Espiño M, Costa-Frossard L, Muriel A, Jiménez J, Álvarez-Cermeño JC. High levels of cerebrospinal fluid free kappa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 2012;413:1813-6.
52. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Parigger S, Schneider-Koch G, Bruecke T. Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS. *PLoS One* 2014;9(2):e89945.
53. Senel M, Tumani H, Lauda C, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, Brettschneider J. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS One* 2014;9(4):e88680.
54. Groot Kormelink T, Blokhuis BR, Kil L, Hendriks R, Redegeld FA. Immunoglobulin free light chain monomers and dimers are differentially secreted by plasma cells and are functionally distinct. In: Groot Kormelink T. Immunoglobulin free light chains in inflammatory diseases. New findings on FLCs fitted into current concepts of immune regulation. Thesis. GVO/Ponson & Looijen B.V., Ede, The Netherlands 2012:187-203.
55. Kaplan B, Ramirez-Alvarado M, Dispenzieri A, Zeldenrust SR, Leung N, Livneh A, Gallo G. Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study of intact and truncated forms of light chains and their charge properties. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:335-41.
56. Contini C, Gainardi E, Cultrera R, Seraceni S, Castellazzi M, Peyron F, Granieri E. Evidence of cerebrospinal fluid free kappa light chains in AIDS patients with *Toxoplasma gondii* encephalitis. *J Neuroimmunol* 2000;108:221-6.
57. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 2005;115:187-94.
58. Anderson TJ, Donaldson IM, Sheat JM, George PM. Methylprednisolone in multiple sclerosis exacerbation: changes in CSF parameters. *Aust N Z J Med* 1990;20:794-7.
59. Mares J, Muchova B, Herzog R, Urbanek K. Changes in the pattern of oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis during therapy with beta interferons, and glatiramer acetate respectively. Pilot study. *Ces a Slov Neurol Neurochir* 2003;66/99:118-20.
60. Von Glehn F, Farias AS, de Oliveira AC, Damasceno A, Longhini AL, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LM, Brandao CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2012;18:1038-41.
61. Tourtellotte WW. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In: Vinken JP, Bruyn GW, Klawans HL, Koetsier JC, editors. *Handbook of Clinical Neurology Vol. 47. Demyelinating diseases*. Rev. ser. 3. Amsterdam: Elsevier; 1985. p. 79-130.
62. Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, Ransohoff RM, Richert JR, Jacobs LD, Herndon RM, Salazar AM, Fischer JS, Granger CV, Goodkin DE, Simon JH, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownschilde CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munchsauer FE, O'Reilly K, Priore RL, Pulicino PM, Scherokman BJ, Wende K, Weinstock-Guttman B, Whitham RH, The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFN-beta 1a) for relapsing multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;93:8-14.

Chemiluminescent detection of oligoclonal immunoglobulins after isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting

Ondrej Dlouhy^a, Pavlina Kusnierova^{b,c}, Irena Kurasova^a, Monika Cisarikova^b, David Zeman^{b,c}

Background and Aims. Detection of oligoclonal IgG (o-IgG) in the cerebrospinal fluid (CSF) not found in serum is the principal laboratory test to support a diagnosis of multiple sclerosis. The aim of this study was to compare chemiluminescent and chromogenic detection of oligoclonal immunoglobulins in the cerebrospinal fluid and serum after their separation by means of isoelectric focusing followed by immunoblotting.

Methods. A set of experiments was designed to detect oligoclonal immunoglobulins by means of alkaline phosphatase BCIP/NBT substrate and chemiluminescent peroxidase substrate.

Results. Based on visual evaluation of signals, chemiluminescent detection requires about a 4 times lower amount of applied protein than very sensitive BCIP/NBT chromogenic detection. Very good correlation between methods has been shown for oligoclonal IgG. Antigen-specific oligoclonal IgG could be demonstrated by both methods although the pattern was clearer using chemiluminescence. In one patient, oligoclonal IgD bands barely visible by BCIP/NBT were convincingly demonstrated by chemiluminescence.

Conclusion. Chemiluminescent detection is a feasible option for oligoclonal immunoglobulin detection and could be used in cases when the sensitivity needs to be improved. Further studies and method optimisation are warranted.

Key words: cerebrospinal fluid, chemiluminescence, immunoglobulins, isoelectric focusing, immunoblotting

Received: January 11, 2018; Accepted: February 5, 2018; Available online: February 21, 2018

<https://doi.org/10.5507/bp.2018.003>

^aDepartment of Physics, Faculty of Natural Sciences, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

^bDepartment of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

^cInstitute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Corresponding author: David Zeman, e-mail: david.zeman@osu.cz

INTRODUCTION

Detection of oligoclonal IgG (o-IgG) in the cerebrospinal fluid (CSF) not found in serum is the principal laboratory test to support a diagnosis of multiple sclerosis^{1,2}. Although the presence of o-IgG is not disease-specific, it confirms the presence of an inflammatory process within the central nervous system^{3,4}. Oligoclonal IgM (ref.^{5,6}), IgD (ref.⁷) and free light chains⁸⁻¹⁰ detection was reported to provide useful additional information. The concentration of IgG in CSF lies between 10 – 100 mg/L and IgG can be easily detected by means of chromogenic detection method. However, the concentrations of IgM, IgD and free light chains are below 1 mg/L in most CSF samples, and chromogenic detection may not be sensitive enough for detection of these proteins.

According to two international consensus reports^{1,2}, isoelectric focusing (IEF) is the preferred separation method for demonstration of o-IgG. On principal grounds, the same should hold true for the demonstration of oligoclonality of other immunoglobulins or free light chains. IEF is mostly done using commercial kits from Sebia or Helena in clinical laboratories. The former method uses immunofixation of IgG within the gel by means of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-IgG antibody, while the latter is based on a passive blotting onto a nitrocellulose membrane and labelling

with HRP-conjugated antibody. Both methods, as well as various in-house methods used in research laboratories, use chromogenic substrate for detection.

Luminescent detection, using either fluorescence or chemiluminescence, is routinely used after electrophoretic separation of proteins, mainly after sodium dodecyl sulfate (SDS) electrophoresis¹¹. Although chemiluminescence has been mentioned as one of the recommended techniques for IgG immunodetection in recently published guidelines on CSF analysis¹², we were able to find few reports on luminescent detection of proteins separated by IEF as antigen-specific oligoclonal IgG (ref.¹³⁻¹⁵) or oligoclonal IgM (ref.¹⁶).

Chemiluminescent detection was also used by Kaplan and co-workers for CSF studies employing their innovative method of SDS electrophoresis in non-reducing conditions for separation of free light chain monomers and dimers^{17,18}.

Luminescent detection provides significant advantages such as higher sensitivity¹⁹ and possibility of signal quantification²⁰. The precise quantification of protein using chemiluminescent signal reveals the necessity to perform dilution series and calibration curves to estimate range of linearity between primary antibody and protein amount²¹.

Whether luminescent detection could provide an advantage for routine o-IgG detection has not been systematically investigated. Of note, however, 1 of 17 o-IgG-

negative patients in routine workup (immunofixation with peroxidase labelled anti-IgG, commercially available Hydragel Isofocusing Sebia Kit) in the study of Stich et al.¹⁵ turned out to be positive when using chemiluminescent detection.

Unfortunately, many CSF studies do not report their detection method in detail. Peroxidase labelled antibody is often the last step described, without referring whether chromogenic or luminescent detection followed. All reports of chemiluminescent detection of oligoclonal immunoglobulins separated by IEF refer to detection on an X-ray film. We were not able to find one single report using CCD camera for this purpose.

Using chemiluminescence instead of chromogenic detection may be required for two main reasons: 1. when one wants to improve detection sensitivity, 2. for the purpose of signal quantification. The first issue has been the matter of this study.

In the present study, we performed a set of experiments aimed at comparing chemiluminescent detection to very sensitive chromogenic detection using biotinylated antibody, alkaline phosphatase labelled streptavidin and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) substrate.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Hydragel 9 CSF isofocusing kits (Cat. No. 4355) and CSF control (Cat. No. 4794) were from Sebia (Evry Cedex, France). Agarose IEF (Cat. No. 17-0468-01), Pharmalyte™ 3-10 (Cat. No. 17045601), 4-6.5 (Cat. No. 17045201), 5-8 (Cat. No. 17045301) and 8-10.5 (Cat. No. 17045501), electrophoresis wick (Munktel filter paper, Cat. No. 80-1129-52), electrofocusing strips (Cat. No. 18-1004-40), Amersham™ Protran™ 0.45 µm (Cat. No. 10600002) or Amersham™ Protran™ Premium 0.45 µm (Cat. No. 10600003) nitrocellulose blotting membrane were from GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden, distributed through AP Czech, Prague, Czech Republic. Polyclonal rabbit anti-human kappa free light chains (Cat. No. A0100), lambda free light chains (Cat. No. A0101), IgD (Cat. No. A0093) and IgE (Cat. No. A0094) were from DAKO (Medesa, Czech Republic). Native human kappa light chain (Cat. No. PHP280) and lambda light chain (Cat. No. PHP281), purified goat anti-human IgG (Cat. No. 5211-8004) and native *Borrelia burgdorferi* purified protein (Cat. No. 1440-0006) was from Bio-Rad (formerly AbD Serotec). AffiniPure Goat Anti-Human IgM (Cat. No. 109-005-043), Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgM (Cat. No. 109-066-129) and IgG Fc (Cat. No. 109-066-008) were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Horseradish peroxidase streptavidin ELISA grade (Cat. No. SA-5014), alkaline phosphatase streptavidin (Cat. No. SA-5100) and BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate kit (Cat. No. SK-5400) were from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Bovine serum albumin (Cat. No. 11924) and Tween 20 (Cat. No. 37470-01) were from Serva Electrophoresis (Heidelberg, Germany). D-Sorbitol (Cat. No. 85529) and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Cat. No. 252859) were from Sigma-Aldrich. Recombinant HIV-1 p17-p24, gp41-gp120 antigen (Cat. No. Hiv-110) was from Prospe (Ziona, Israel). Finally, Super Signal Western Blot Pico PLUS chemiluminescent substrate (Cat. No. 3480) and Super Signal West Femto maximum sensitivity substrate (Cat. No. 34095) were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Samples

Only surplus CSF and serum samples remaining after aliquoting for routine analyses were used for the purpose of this methodical study.

Samples were diluted with 0.75% (w/v) saline. For IgG, dilution to 0.5 and 1.0 mg/L was used for chromogenic and 0.25 and 0.5 mg/L for chemiluminescent detection, respectively. For IgM, samples were diluted to 1.0 mg/L for chromogenic and 0.5 mg/L for chemiluminescence method. CSF samples with immunoglobulins below these concentrations were used undiluted and sera were diluted exactly to the estimated CSF IgM concentration; only if amount of CSF IgM was lower than 0.2 mg/L, sera were diluted to 0.2 mg/L to prevent undetectable signal in the serum since CSF IgM measurements in this range are known to be unreliable. Before IgM separation by IEF, samples were pretreated subsequently with dithiothreitol and acrylamide as described previously²². For fLC analysis, CSF samples were used neat and serum was diluted 1/80. For IgD, neat CSF and 1/250 serum dilution was used in most experiments.

Isoelectric focusing

IEF was performed on Multiphor II apparatus (GE Healthcare) at 10 °C. Interelectrode distance was 8.5 cm. Agarose gels were prepared in-house (1.0% gels with Pharmalytes 4-6.5 and 5-8 for IgM and IgD; 1.2% gels with Pharmalytes 5-8 and 8-10.5 for IgG and Pharmalyte 3-10 for fLC).

0.5M (for IgG and fLC) or 0.25M (for IgM and IgD) sodium hydroxide served as a catholyte whereas 0.04M DL-Glutamate (for IgG), 0.04M H₂SO₄ (for fLC) or 0.25M acetic acid (for IgM and IgD) served as anolytes, respectively.

Single step method was used for fLC analysis (1200 Vh with limiting values 1700 V, 50 mA, 10 W). 7 µL of samples were applied 2 cm from the anode. For other proteins investigated, gradient methods were used:

For IgG separation, 6 µL of samples were applied 2 cm from the anode. The separation program used was as follows: 1. 1 Vh, 500 V, 25 mA, 5 W; 2. 150 Vh, 500 V, 25 mA, 5 W; 3. 500 Vh, 1275 V (gradient), 25 mA, 8 W; 4. 550 Vh, 1275 V (constant), 25 mA, 8 W.

For IgM and IgD analysis, a prefocusing step was used (250 Vh, 600 V, 25 mA, 4W); then, the apparatus was set off and 7 µL of samples were pipetted 2 cm from the cathode. Then, the following gradient method was applied:

1. 1 Vh, 300 V, 25 mA, 3W; 2. 125 Vh, 300 V, 25 mA, 3 W; 3. 500 Vh, 1275 V (gradient), 25 mA, 8 W; 4. 575 Vh, 1275 V (constant), 25 mA, 8 W.

Affinity-mediated immunoblotting

Membranes coated with the respective antibodies at a concentration of 10 mg/L (20 mg/L for o-fLC) were incubated at least 4 h or overnight at room temperature on a rocking platform, washed in tris-buffered saline (TBS) and blocked in 3% BSA for 75–90 min. After washing twice in TBS, membranes were applied on the gel, covered by 1 sheet of moistened filter paper, 5–7 dry filter papers, a glass plate and a weight of approximately 1 kg. After 45–50 min, the membranes were washed in PBS and proteins were fixed by 0.25% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 15–20 min at 4 °C. After washing with water and three changes of TBS, membranes were re-blocked in 0.3% BSA for 15–20 min and washed in TBS. Next, the biotinylated antibody was applied. Incubation times were 90 min for IgG, 105–115 min for fLC, and 120–130 min for IgM and IgD. After washing, streptavidin-enzyme conjugate was added and membranes were left incubated for 45–50 min, followed by final washing cycles and appropriate detection.

Western Blot Pico Plus Chemiluminescent Substrate was used in most experiments while Western Blot Femto Maximum Sensitivity Substrate was used when higher sensitivity was required.

Image acquisition and analysis were performed using ChemiDoc Imager (Bio-Rad).

Ethics Approval

The study was approved by the Ethics Committee of FN Ostrava, Reference Number 1010/2016, on December 12, 2016. All patients gave an informed consent before lumbar puncture.

RESULTS AND DISCUSSION

A set of experiments was designed to determine the feasibility and reproducibility of the method. Suitable concentration of HRP-labelled streptavidin was found to be 0.05 – 0.2 mg/L for Western Blot Pico Plus substrate and 0.01 – 0.02 mg/L for Western Blot Femto maximum sensitivity substrate. Membrane washing with TBS for 3 – 5 min followed by two washes in TBS with 0.05% Tween 20 (5–7 min each) and two washes in TBS (3 – 5 min each) was sufficient for removing most of the unspecific background signal. The excessive washing (>30 min) was unfavourable and lead to substantial loss of sensitivity. Detection time varied between 10 seconds and 10 min; longer detection times were not useful due to increased background signal (data not shown).

Next, we determined o-IgG in 34 paired CSF and serum samples sent for routine o-IgG analysis. Routine test was performed using Hydrasys CSF IEF kit on Hydrasys II apparatus (Sebia, Evry Cedex, France). This method uses IEF in agarose gels followed by immunofixation by HRP-conjugated anti-IgG antibody and subsequent chromogenic detection. Most samples were also analysed by the IEF/AIB method with BCIP/NBT detection. In one set of samples, this method failed for unknown reasons even when repeated on the next day. Third attempt has not been performed since we aimed at analysing the samples by all methods within an interval of 3–5 days to avoid any possible influence of preanalytic factors. The results of o-IgG analysis by IEF/IF as well as by IEF/AIB using BCIP/NBT or luminescent detection were evaluated by a blinded observer to avoid any possible bias. To compare the relative sensitivity of the tests to demonstrate oligoclonal IgG bands diluted into a polyclonal background, serial dilutions of CSF control into prediluted intravenous IgG preparation (Flebogamma) was performed so that IgG of the CSF control represented 41%, 7.1% and 1.7% of total IgG in the sample applied. The bands were clearly

Table 1. Agreement between methods used for o-IgG detection evaluated by a blinded observer (PK).

Methods compared (amount of IgG in ng applied per lane)	n (negative/ positive)	Kappa statistics (95% CI)		Number of discrepant results (%)	
		positivity	Types 1-5	positivity	Types 1-5
IEF/AIB-CL (1.5) vs. IEF/IF (300)	33 (25/8)	1.000	0.476 (0.220 – 0.732)	0	11 (33 %)
IEF/AIB-CL(3.0) vs. IEF/IF (300)	34 (25/9; 26/8)	0.922 (0.771 – 1.000)	0.562 (0.330 – 0.794)	1 (3 %)	10 (29 %)
IEF/AIB-CL(1.5) vs. IEF/AIB-BCIP/NBT (3.0)	24 (19/5)	1.000	0.730 (0.483 – 0.977)	0	4 (17 %)
IEF/AIB-CL(3.0) vs. IEF/AIB-BCIP/NBT (3.0)	25 (19/6)	1.000	0.649 (0.414 – 0.883)	0	6 (24 %)
IEF/AIB-CL(1.5) vs. IEF/AIB-BCIP/NBT (6.0)	24 (19/5)	1.000	0.730 (0.483 – 0.977)	0	4 (17 %)
IEF/AIB-CL(3.0) vs. IEF/AIB-BCIP/NBT (6.0)	25 (19/6)	1.000	0.649 (0.414 – 0.883)	0	6 (24 %)

IEF/AIB, isoelectric focusing followed by affinity-mediated immunoblotting; CL, chemiluminescence; BCIP/NBT, chromogenic detection using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium. For IEF/AIB, two IgG concentrations considered suitable for evaluation were tested for both chromogenic and luminescence detection.

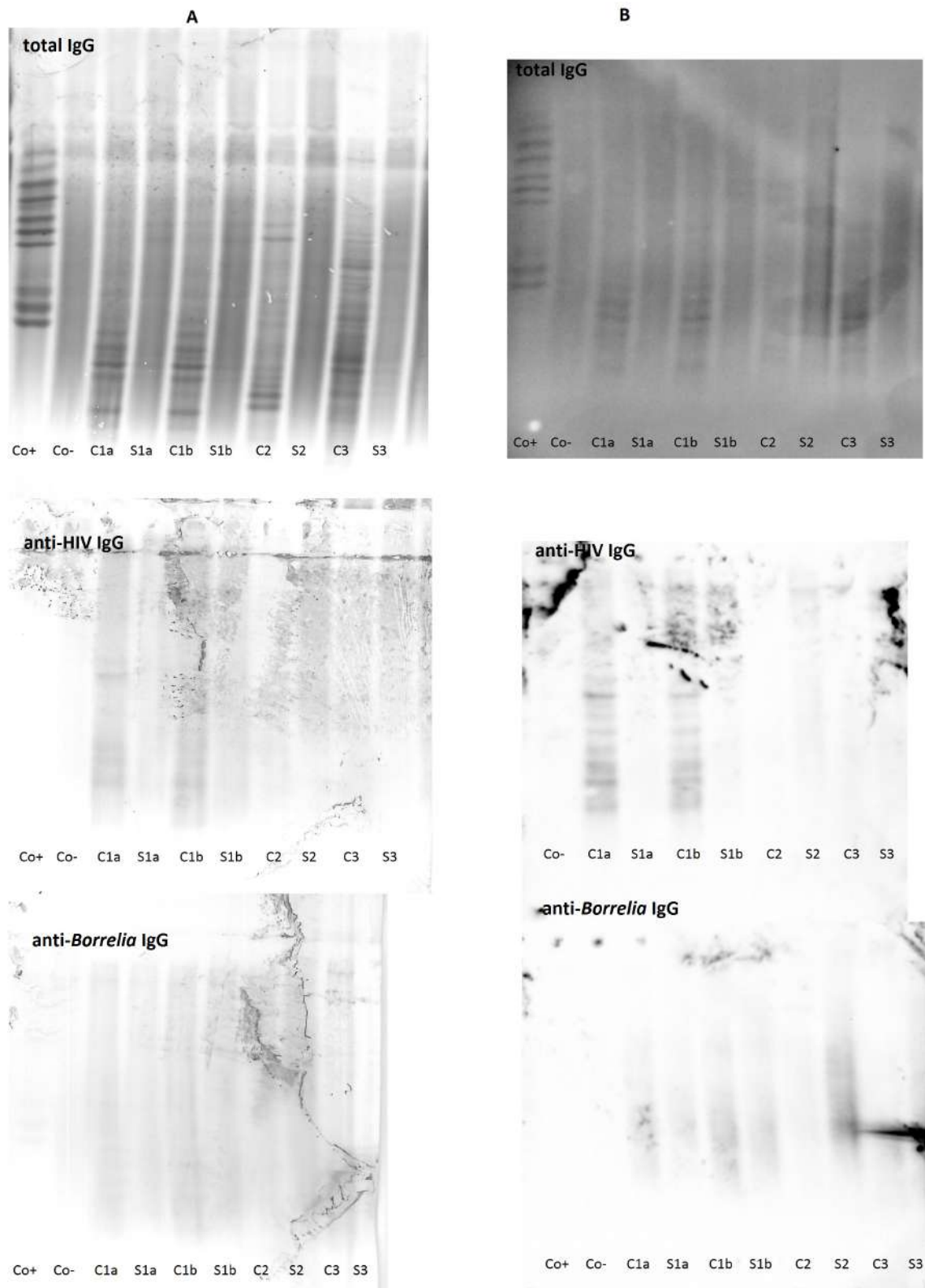


Fig. 1. Total IgG, anti-HIV IgG and anti-Borrelia IgG.

Panel A (left): chromogenic detection. 6 ng of IgG were applied for analysis of total o-IgG and 30 ng of IgG for the analysis of antigen-specific o-IgG.

Panel B (right): chemiluminescent detection. 1.5 ng of IgG were applied for analysis of total IgG and 15 ng of IgG for the analysis of antigen-specific o-IgG. Exposition times were 7 s for total IgG and 63 s for antigen-specific IgG.

o-IgG reactivity against HIV, but not against *Borrelia* purified protein, can be observed in C1a (unfrozen CSF stored at +4°C for 45 days) and C1b (CSF stored frozen at -30°C). No reactivity of o-IgG against HIV in o-IgG positive samples of the other two patients (C2, S2 and C3, S3) can be seen.

Co+, positive CSF control for o-IgG test (Sebia); Co-, negative control (purified intravenous IgG preparation); C, cerebrospinal fluid; S, serum.

visible in samples with CSF control IgG 41% and 7.1% while only 2-3 faint bands were visible in the sample with CSF control IgG 1.7% concentration. For real paired CSF and serum samples, the agreement was perfect if results were evaluated as negative/positive only. Only one discrepant result (negative by IEF/IF and marginally positive by both IEF/AIB-BCIP/NBT and IEF/AIB-CL with 2-3 CSF-restricted bands) has been observed. Interestingly, the diagnosis of multiple sclerosis (MS) could be made in this case after the first clinical presentation when multiple MS-typical hyperintense lesions as well as active lesions were demonstrated by brain magnetic resonance imaging (MRI). The agreement was moderate only if samples were evaluated as type 1-5 according to an international consensus (1, 2) (Table 1). However, absence of perfect agreement concerning IEF type classification has been published several times²³⁻²⁵ and the usefulness of types 1-5 has even been questioned³.

We were able to demonstrate anti-*Borrelia* o-IgG in two patients with neuroborreliosis (not shown) as well as anti-HIV o-IgG in an HIV positive patient with unspecific neurological complaints and a few small MRI white matter hyperintensities. In the latter case, CSF examination was performed because of suspicion of coincidental MS, demonstrating that a result of this laborious analysis may be of significant value in routine clinical practice in diagnostically difficult cases. The amount of IgG applied for the analysis of antigen-specific OCB was 5 to 10 fold higher than for total IgG because even in CNS infections, only a fraction of intrathecally synthesised IgG is directed against the causative organism²⁶. As for total IgG, CL required approximately 4 times lower amount of IgG applied for comparable results, and half the concentration used for chromogenic method lead to an obviously clearer pattern if CL was used (Fig. 1).

For o-IgM, results were also comparable although the agreement was not as perfect as for IgG. Results were classified as positive (≥ 2 CSF-restricted bands) and negative only. Discrepant results were found in 8/34 paired CSF and serum samples (24%) and although the number of CSF-restricted bands was ≤ 4 in all these cases (2 cases positive by CL and negative by BCIP/NBT and 6 cases negative by CL but positive by BCIP/NBT), it is clear that the method of o-IgM detection requires further optimisation. Representative o-IgM detection by BCIP/NBT and CL is shown in Fig. 2.

The search for o-IgD, driven by our previous experience of beautiful IgD serum paraprotein patterns and an accidental finding of o-IgD bands in the CSF of one patient with neuroborreliosis (unpublished results), was unsuccessful. We were able to find o-IgD in 1 out of 23 examined paired CSF and serum samples. The diagnosis in this only positive case was relapsing meningoencephalitis of unknown aetiology. The bands were barely visible by a BCIP/NBT method but obvious using CL. Interestingly, these bands were present in a CSF sample frozen on the day of receipt at -70°C as well as in a sample stored for 5 days at $+4^{\circ}\text{C}$ but precipitate at the application site was visible in the same CSF sample with protease inhibitor added on receipt before storing at -70°C . Western Blot

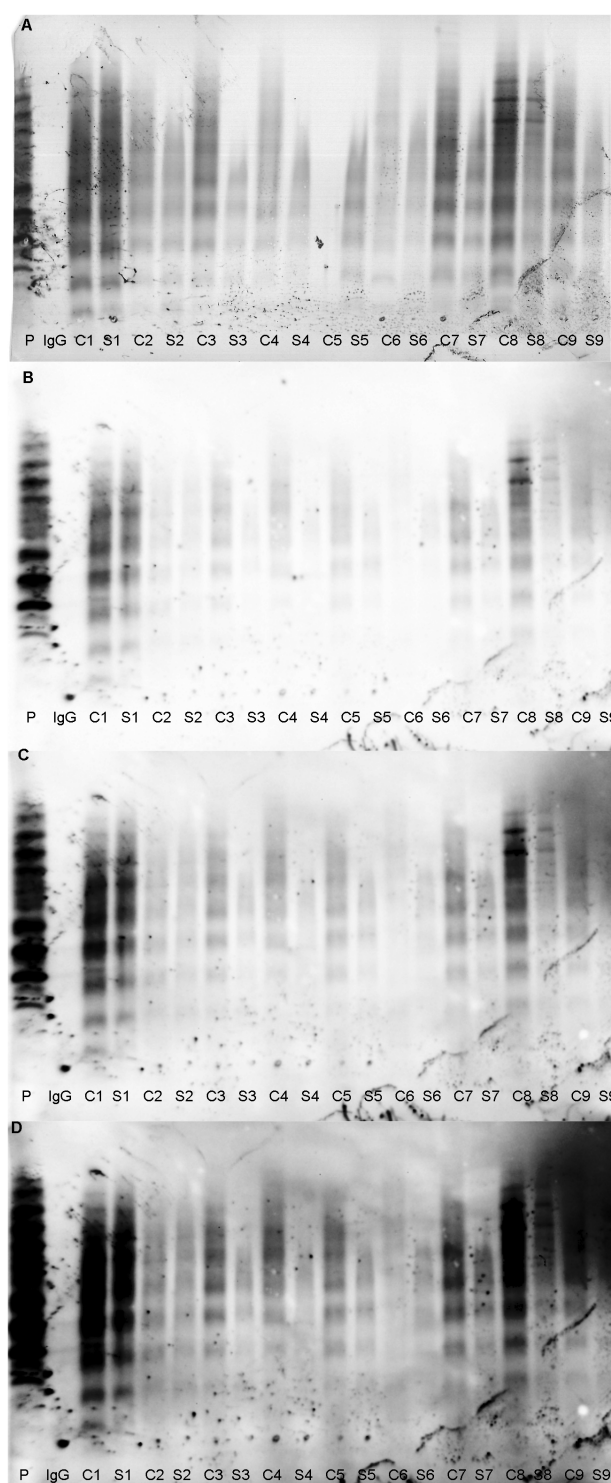


Fig. 2. Oligoclonal IgM. A. BCIP/NBT staining (55 min). B-D. CL detection; exposition times were 33 s (B), 50 s (C) and 90 s (D).

Femto maximum sensitivity improved the results so that the IgD pattern could be seen in several other samples; however, we did not observe a distinct oligoclonal pattern. Notably, in one case of neuroborreliosis, some rather polyclonal IgD was found on the *Borrelia burgdorferi* purified protein coated membrane, suggesting possible occurrence of antigen-specific IgD (Fig. 3).

Free light chains (fLC) were detectable down to 0.008 mg/L (0.056 ng) for free kappa and 0.04 mg/L

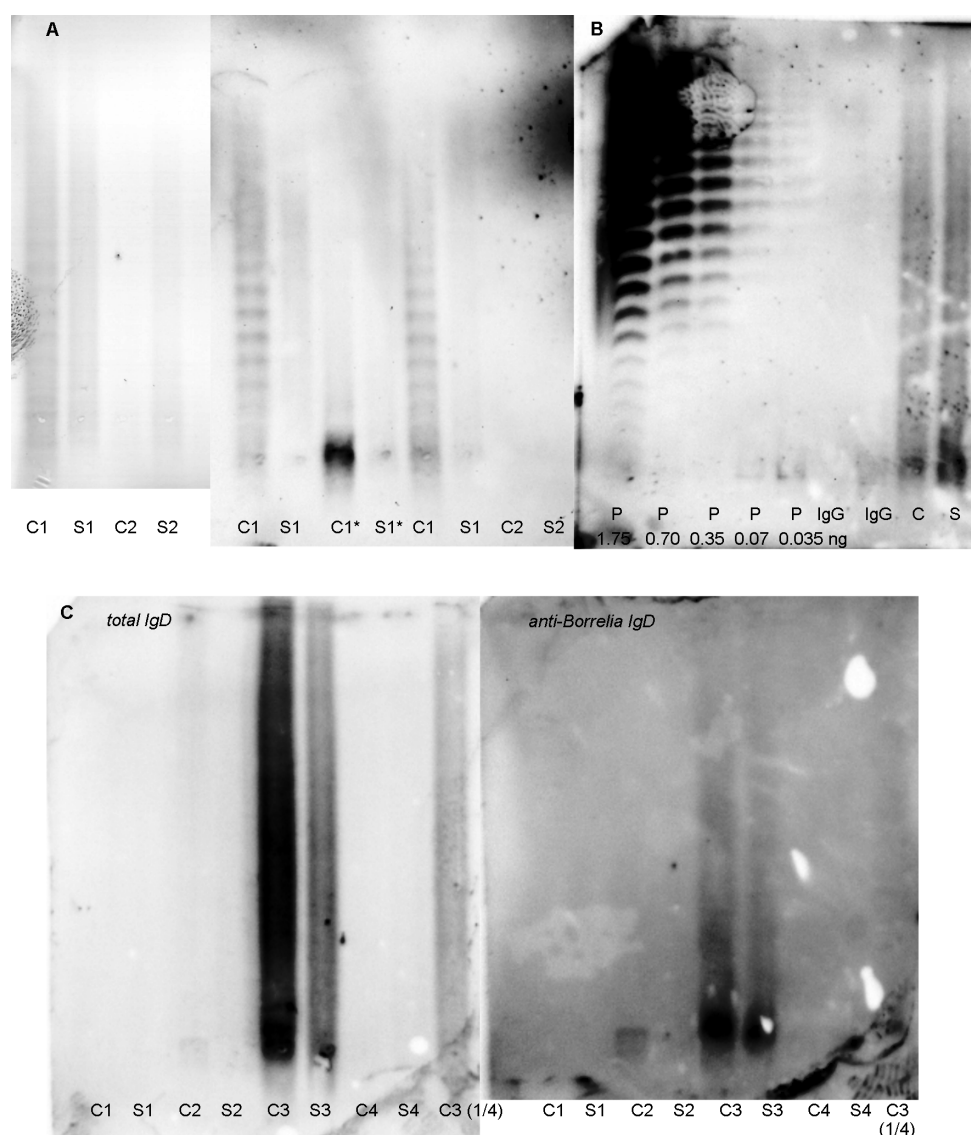


Fig. 3. A. Oligoclonal IgD in the CSF of a patient with relapsing meningoencephalitis of unknown cause. Left: chromogenic detection; right: CL detection (exposition time 569 s). C1*, S1*, cerebrospinal fluid and serum sample with protease inhibitor. B. Monoclonal IgD in serum of a patient with IgD kappa myeloma (P). The amounts of IgD applied in (P) were 1.75; 0.70; 0.35; 0.07 and 0.035 ng. Exposition time was 186 s. C. Total IgD (left; exposition time 4 s) and anti-*Borrelia* IgD (right; exposition time 20 s): a signal is observed in the CSF on the *Borrelia burgdorferi* purified protein coated membrane but the pattern seems to be polyclonal rather than oligoclonal. Western Blot Pico Plus substrate was used in A. while Western Blot Femto maximum sensitivity substrate was used in B. and C.

(0.21 ng) for free lambda in the monoclonal fLC standard used, which was 5 times better than chromogenic detection (lowest detected concentrations were 0.04 mg/L for free kappa and 0.2 mg/L for free lambda light chains). However, the lowest detectable concentration was not reproducible in other experiments, and we have noticed some problems with unspecific background signal, probably due to lower dilution of serum samples than for other proteins investigated. We were able to compare oligoclonal fLC patterns in 19 paired CSF and serum samples. When evaluated as positive or negative for CSF-restricted o-fLC, 3 discrepant results (15.8%) were noted for free kappa (positive by IEF/AIB-CL and negative by IEF/AIB-BCIP/NBT in 2 cases, and vice versa in 1 case)

and 1 (5.3%) for free lambda (2 faint bands by IEF/AIB-BCIP/NBT and no clear-cut bands by IEF/AIB-CL). The number of CSF-restricted bands in these cases were 2 or 3 only. Example of o-fLC detection is provided in Fig. 4.

Of course, no detection method is able to solve separation problems. However, if these are overcome using serum samples with monoclonal component for preliminary testing, chemiluminescent detection can increase detection sensitivity, although not to an extent we had expected. Notably, in their pioneering study, Schneppenheim and co-workers¹⁹ compared luminescence to HRP chromogenic substrate (4-chloro-1-naphthol). However, ALP substrate (BCIP/NBT) has been found substantially more sensitive compared to another HRP substrate (3-amino-

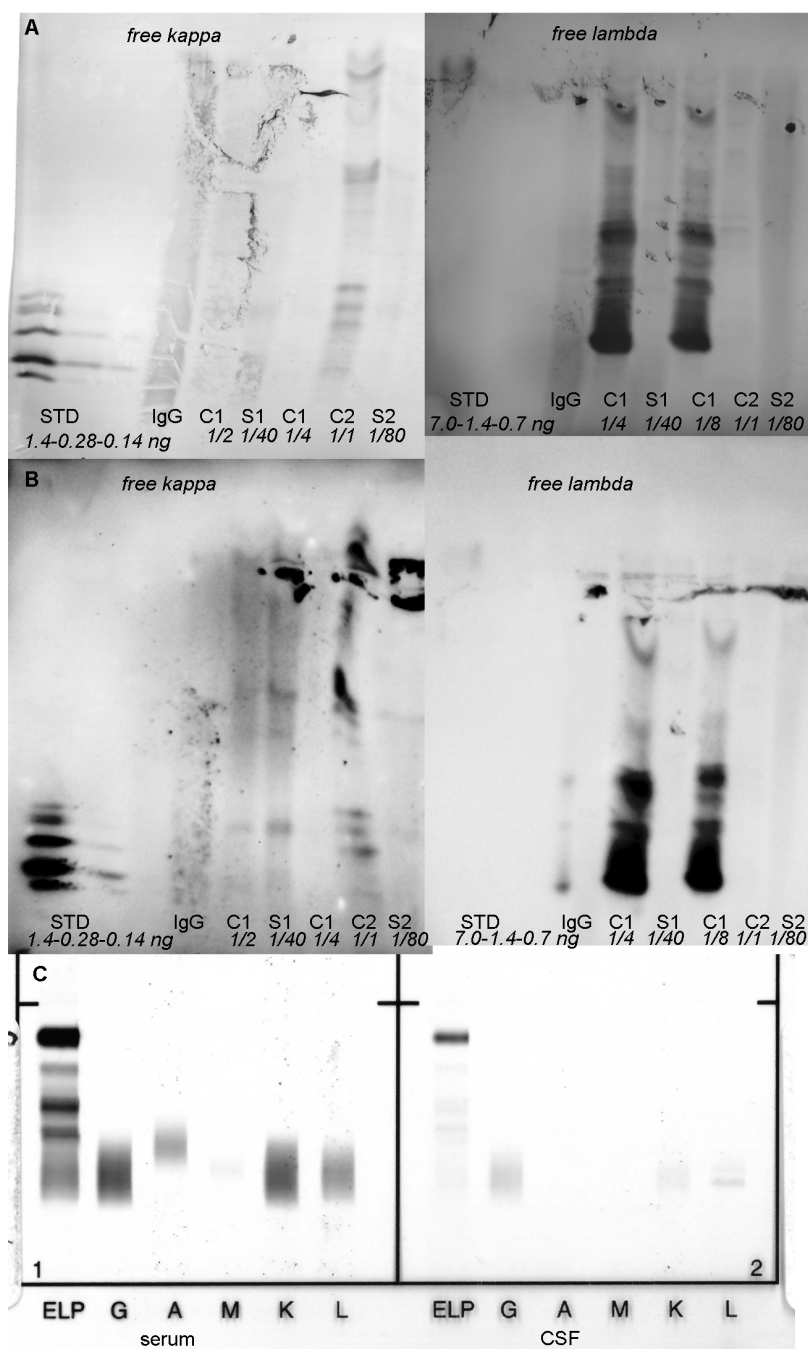


Fig. 4. Chromogenic (A) and chemiluminescent (B) detection of free kappa and free lambda light chains by means of IEF/AIB. C1 was diluted 1/2 and 1/4 for free kappa and 1/4 and 1/8 for free lambda, respectively. FLC concentration were measured only after performing the qualitative IEF/AIB method and were 0.91 mg/L for CSF FLC kappa and 57.65 mg/L for CSF FLC lambda, i.e. dilutions result in a concentration of 14.41 mg/L and 7.21 mg/L for FLC lambda, leading to overloading problems. STD, standard (1.0, 0.2 and 0.05 mg/L for free kappa, 1.0, 0.2 and 0.1 mg/L for free lambda); IgG, intravenous immunoglobulin (Kiovig, 200 mg/L IgG); C1 and S1, CSF and serum sample of a patient shown in A and B; C2 and S2, cerebrospinal fluid and serum sample of a patient with multiple sclerosis. Exposition time was 180 s for free kappa and 5 s for free lambda C. Immunofixation electrophoresis in serum (normal) and unconcentrated CSF; two closely spaced lambda light chain bands can be seen in the CSF (lane L) without counterpart in lanes immunofixed with anti-gamma (G), anti-alpha (A) and anti-mi (M) antisera, respectively.

9-ethyl carbazole) in a later study²⁷. Maximum sensitivity substrate was needed if the amount of applied sample was less than 1 ng. Other factors influencing detection sensitivity should be taken into account. Polyacrylamide gels with smaller pores might offer better resolution and thus increased sensitivity. However, high-molecular weight proteins cannot be separated by polyacrylamide. It has been

reported that polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes are 3 to 30 times more sensitive than nitrocellulose when using passive immunoblotting, but no difference in sensitivity when affinity-mediated immunoblotting has been used²⁸. We use nitrocellulose membranes due to easier handling and lower consumption of immunodetection reagents compared to PVDF.

Although we are aware that our experiments resembles a series of case studies rather than large, well-defined patient group, we are able to answer if chemiluminescent detection could be feasible on a larger scale and provide additional information compared to chromogenic method. Both questions were answered positively. CL would probably not replace routine semi-automated o-IgG detection due to its higher manual and time requirement; however, it can be considered in cases where suspicion of MS is high and routine o-IgG test is negative. It has been recently demonstrated that routine o-IgG analysis might fail to detect low-grade intrathecal humoral immune response in a proportion of MS patients²⁹. Chemiluminescence detection using a CCD camera might be of advantage over detection on X-ray film²⁰ since multiple images could be taken at different times and the most suitable image for the evaluation of a particular sample could be used. This is not easily possible with CL detection on X-ray films; using chromogenic detection, only close visual follow-up of the reaction can be used to prevent overdevelopment. Using CL, exposition times vary between a few seconds and 10 minutes compared to 20–60 minutes needed for BCIP/NBT staining.

Another interesting perspective for the future lies in the attempt to quantify the intrathecal oligoclonal immune response. Most studies have failed to find significant clinical correlations with the number of oligoclonal bands, but it should be stressed that the amount of the intrathecal immune response affects the number of bands as well as their intensities. Quantification of the amount of immunoglobulins within individual bands, compared to the known amount of the immunoglobulin applied per lane, could reveal more clear-cut correlations. Unfortunately, software developed for chemiluminescent detectors was for native or SDS electrophoresis and cannot be directly used for isoelectric focusing where many bands represent the same protein.

CONCLUSIONS

Chemiluminescent detection using the appropriate camera is a feasible option for o-IgG and o-IgM analysis although we failed to find it clearly superior. Chemiluminescent detection might be the best option for studies of antigen-specific oligoclonal immunoglobulins, since these might represent only a minor portion of total immunoglobulin in the sample, as well as for the research of less abundant free light chains, IgD and IgE. Using maximum sensitivity substrate, we were able to detect 0.035–0.070 ng of monoclonal IgD which corresponds to a concentration of 0.005 – 0.01 mg/L in 7 µL of the applied sample. We have also shown that detection times longer than 10 minutes did not improve the sensitivity due to increase in background signal. Further efforts are needed to achieve better sensitivity.

Acknowledgement: The study was supported by University of Ostrava (project number SGS09/LF/2017). We are greatly indebted to Assoc. Prof. Zuzana Cermakova,

Ph.D., Assoc. Prof. Kristian Safarcik, Ph.D., Mgr. Ivona Zavacka, Ph.D. (Dept. of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava) and Assoc. Prof. Vladimír Spunda (Dept. of Physics, Faculty of Natural Sciences, University of Ostrava) for their support of the study.

Author contributions: OD, PK, MC and DZ conceived the study. OD performed all CL detection experiments and prepared the documentation from the experiments for the manuscript. PK analysed and evaluated all o-IgG results. IK contributed to the design of CL experiments and brought ideas into the final version of the manuscript. MC participated in the design, execution and evaluation of IgD experiments. DZ performed the experiments with chromogenic detection, evaluated the results of o-IgM and o-fLC experiments, participated in the evaluation of IgD experiments, and wrote the first draft of the manuscript. OD, PK, IK, MC and DZ edited the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

- Andersson M, Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhães A, Massaro AR, Öhman S, Reiber H, Rönnebeck L, Schlupe M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EJ, Trojano M, Wurster U. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(8):897-902.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Öhman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJM, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005;62(6):865-70.
- Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;180(1-2):17-28.
- Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D. An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(1):31-46.
- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: Relationship with disability in MS. *Neurology* 2002;58(5):824-6.
- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology* 2002;59(4):555-9.
- Mavra M, Luxton R, Keir G, Thompson EJ. Oligoclonal immunoglobulin D in the cerebrospinal fluid of neurologic patients. *Neurology* 1992;42(6):1244-5.
- Sindic CJ, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991;33(1):63-72.
- Goffette S, Schlupe M, Henry H, Duprez T, Sindic CJ. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(2):308-10.
- Zeman D, Hradilek P, Kusnierova P, Piza R, Reguliova K, Woznicova I, Zapletalova O. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2015;159(1):104-13.
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Mol Biotechnol* 2013;55(3):217-26.

12. Gastaldi M, Zardini E, Leante R, Ruggieri M, Costa G, Cocco E, et al. Cerebrospinal fluid analysis and the determination of oligoclonal bands. *Neurol Sci* 2017;38(Suppl 2):217-24.
13. Skorstad G, Vandvik B, Vartdal F, Holmøy T. MS and clinically isolated syndromes: Shared specificity but diverging clonal patterns of virus-specific IgG antibodies produced in vivo and by CSF B cells in vitro. *Eur J Neurol* 2009;16(10):1124-9.
14. Virtanen JO, Wohler J, Fenton K, Reich DS, Jacobson S. Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings. *Mult Scler* 2014;20(1):27-34.
15. Stich O, Kluge J, Speck J, Rauer S. Oligoclonal restriction of antiviral immunoreaction in oligoclonal band-negative MS patients. *Acta Neurol Scand* 2015;131(6):381-8.
16. Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 2007;14(8):907-11.
17. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariyev R, Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;229(1-2):263-71.
18. Kaplan B, Golderman S, Yahalom G, Yeskaraev R, Ziv T, Aizenbud BM, Sela BA, Livneh A. Free light chain monomer-dimer patterns in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2013;390(1-2):74-80.
19. Schneppenheim R, Budde U, Dahlmann N, Rautenberg P. Luminography – a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 1991;12(5):367-72.
20. Dickinson J, Fowler SJ. Quantification of Proteins on Western Blots Using ECL. In: Walker JM., editor. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press; 2002. p. 429-437.
21. Charette SJ, Lambert H, Nadeau PJ, Landry J. Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: Elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. *J Immunol Methods* 2010;353(1-2):148-50.
22. Zeman D, Kusnierova P. [Detection of oligoclonal IgM in cerebrospinal fluid.] *Klin Biochem Metab* 2016;24(3):141-6.
23. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56(2):135-43.
24. Franciotta D, Avolio C, Lolli F. Between-laboratory variability in oligoclonal IgG band numbering. *Clin Chem* 2005; 51(1):270-2.
25. Novackova L, Zeman D. Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: comparison between commercial immunofixation method and home-made affinity immunoblotting method and evaluation of interobserver agreement. *Klin Biochem Metab* 2011;19(4):229-33.
26. Jacobi C, Lange P, Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: Discrimination between microorganism-driven and polyspecific immune response. *J Neuroimmunol* 2007(1-2);187:139-46.
27. Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004;284(1-2):141-5.
28. Nooij FJM, Van der Sluijs-Gelling AJ, Jol-Van der Zijde CM, Van Tol MJD, Haas H, Radl J. Immunoblotting techniques for the detection of low level homogeneous immunoglobulin components in serum. *J Immunol Methods* 1990;134(2):273-81.
29. Halbgebauer S, Huss A, Buttmann M, Steinacker P, Oeckl P, Brecht I, Weishaupt A, Tumani H, Otto M. Detection of intrathecal immunoglobulin G synthesis by capillary isoelectric focusing immunoassay in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol* 2016;263(5):954-60.

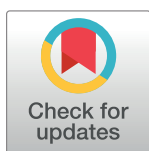
RESEARCH ARTICLE

Determination of chitinase 3-like 1 in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological diseases

Pavlaína Kušnierová^{1*}, David Zeman^{1,2}, Pavel Hradílek², Olga Zapletalová², David Stejskal¹

1 Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic, **2** Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

* pavlina.kusnierova@fno.cz



Abstract

Objectives

Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) is an extracellular monomeric single-chain glycoprotein expressed by many types of cells. Its elevated levels were found in cerebrospinal fluid in central nervous system (CNS) inflammatory diseases patients. The aim of the study was 1) to validate the reference interval of cerebrospinal fluid (CSF) CHI3L1 in a control group; 2) to measure the CHI3L1 concentration in different diagnosis groups including multiple sclerosis (MS); and 3) to correlate those values with other biomarkers of axonal damage or neuroinflammation in different groups.

Methods

The study included 132 CSF samples sent to the Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava. Concentrations of CHI3L1, CXCL13 chemokine, neurofilament light chains, and phosphorylated neurofilament heavy chains were determined by enzyme-linked immunosorbent assays. IgG oligoclonal bands were detected by isoelectric focusing in agarose gels followed by immunofixation. IgM and FLC oligoclonal bands were analyzed by IEF followed by affinity immunoblotting. The group consisted of 42 patients with multiple sclerosis, 14 with clinically isolated syndrome, 11 with other central nervous system inflammatory diseases, 46 with non-inflammatory diseases of the central nervous system, 4 with inflammatory diseases of the peripheral nervous system, and 15 controls.

Results

The estimated reference values of CHI3L1 were 28.6–182.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Statistically significant differences of CSF CHI3L1 concentrations were found among diagnosis groups ($p < 0.0001$), after age adjustment ($p = 0.002$). There was a statistically significant relationship between CHI3L1 and NFL in the MS group ($r_s = 0.460$; $P = 0.002$), and between CHI3L1 and pNFH in the MS group ($r_s = 0.691$; $P < 0.001$). No statistically significant difference was

OPEN ACCESS

Citation: Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Zapletalová O, Stejskal D (2020) Determination of chitinase 3-like 1 in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological diseases. PLoS ONE 15(5): e0233519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519>

Editor: Claudio Liguori, University of Rome Tor Vergata, ITALY

Received: December 30, 2019

Accepted: May 6, 2020

Published: May 21, 2020

Copyright: © 2020 Kušnierová et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data is available within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (FNOs/2017) to PK. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. There was no additional external funding received for this study.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

found in the categorical comparison of CHI3L1 in the MS group and other diagnostic groups as well as when using the Mann-Whitney U test for CHI3L1 with additional parameters with and without oligoclonal bands present.

Conclusions

CSF CHI3L1 values differ depending on diagnosis and correlate significantly with concentrations of the axonal damage markers CSF neurofilament light chains, and CSF phosphorylated neurofilament heavy chains, but not with CSF concentrations of the inflammatory marker CXCL13. Thus, CSF CHI3L1 could be another promising prognostic, albeit probably etiologically nonspecific, biomarker of MS.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease affecting the central nervous system. In recent years several biochemical markers in cerebrospinal fluid have been suggested as prognostic tools [1–3].

CHI3L1, also known as YKL-40, belongs to the chitin glycoside hydrolase 18 family. Unlike true chitinases, it lacks enzymatic activity. It is a glycoprotein produced by a wide variety of cells, such as macrophages, chondrocytes, synovial cells, osteoblasts, neutrophils, and astrocytes [4–6].

CHI3L1 is expressed in astrocytes in the brain tissue of patients with multiple sclerosis, and is associated with reactive gliosis in different neuropathological states, particularly those associated with neuroinflammation. A correlation between the time course of the CHI3L1 concentration and the CSF viral load was shown in lentiviral encephalitis [7]. CHI3L1 is released in vitro from macrophages but the CHI3L1 protein is present in vivo around the microglial nodes in certain astrocytes. CHI3L1 mRNA is expressed by reactive astrocytes surrounding the microglial nodes, suggesting that macrophages release inflammatory mediators that can induce CHI3L1 expression in surrounding astrocytes but not in neurons. The transcription of CHI3L1 by macrophages is likely to be inhibited only after they enter the brain, which may be the cause of the differences observed in other tissue pathologies [8–9].

MS is a demyelinating disease associated with increasing and decreasing inflammation, gliosis, and variable axonal loss. Therefore, we expect to find increased concentrations of CHI3L1 in MS patients.

The aim of the study was 1) to validate the reference interval (RI) of cerebrospinal fluid (CSF) chitinase 3-like 1 (CHI3L1) in a control group; 2) to measure the CHI3L1 concentration in different diagnosis groups, including MS; and 3) to correlate those values with other biomarkers of axonal damage or neuroinflammation in different groups.

RIs were estimated on the basis of the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI C28-A3), which recommends the use of nonparametric tests for statistical data processing and the evaluation of data according to gender and age [10–11].

Materials and methods

Patients

Our study includes 132 patients of the Moravian-Silesian region of the Czech Republic whose CSF samples were sent for analysis to the Institute of Laboratory Diagnostics, Department of

Clinical Biochemistry, University Hospital Ostrava. Informed consent was obtained from all patients at the University Hospital Ostrava who were included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Ostrava as a part of the project 'CSF biomarkers of multiple sclerosis' (reference number 400/2017). Patients were subdivided into diagnosis groups: MS (n = 42; 33 women, average age 39.5 ± 12.1 years; 9 men, average age 36.6 ± 10.5 years), clinically isolated syndrome (CIS; n = 14; 8 women, average age 28.8 ± 8.3 years; 6 men, average age 28.3 ± 8.9 years), other central nervous system inflammatory diseases (OIND; n = 11; 5 women, average age 78.4 ± 21.2 years; 6 men, average age 62.3 ± 12.1 years), inflammatory diseases of the peripheral nervous system (IDPNS; n = 4; 4 men, average age 53.5 ± 13.3 years), non-inflammatory diseases of the central nervous system (NIND; n = 46; 32 women, average age 51.8 ± 17.1 years; 14 men, average age 59.1 ± 11.1 years), and controls (n = 15; 11 women, average age 41.7 ± 15.2 years; 4 men, average age 40.2 ± 15.5 years). For diagnosis of multiple sclerosis, we used the 2017 Revisions of the McDonald Criteria [12]. 26 patients were diagnosed as relapsing-remitting MS (RR-MS) while 14 patients were classified as primary progressive (PP-MS); in the remaining two patients, the MS course could not be evaluated because no follow-up documentation was available. None of the patients from MS and CIS groups was on disease-modifying drug (DMD) treatment at the time of sample collection. Lumbar puncture was performed within 3 months after the first symptom of an attack in 7 CIS patients and 14 RR-MS patients. The diagnoses in the OIND group comprised neuromyelitis optica (n = 2); encephalitis (n = 1), granulomatosis with polyangiitis (n = 2), aseptic meningitis (n = 2), neuroborreliosis (n = 3), and myelitis (n = 1). The IDPNS group included patients with acute (n = 2) and chronic (n = 2) inflammatory demyelinating polyneuropathy. The NIND group included a very wide and heterogeneous spectrum of diagnoses: the more frequent were neurodegenerative diseases (n = 11), non-inflammatory polyneuropathy (n = 5), vascular CNS disease (n = 19) and vertigo (n = 5), with fewer cases of CNS tumors (n = 3), radiculopathy (n = 1), anisocoria (n = 1), motor neuron diseases (n = 1), spondylogenic cervical myelopathy (n = 2), cervicobrachial syndrome (n = 1), epilepsy (n = 4), tremor (n = 1), and amyotrophy (n = 2). In estimating the reference interval we used 43 controls (the original group of controls (see above, n = 15) was extended by another 28 CSF samples from CSF biobank of the University Hospital Ostrava). The average age was 40.9 ± 15.1 years. There were 30 women, of average age 41.1 ± 13.0 years, and 13 men, of average age 40.5 ± 19.6 years.

Samples

CSF samples were collected into polypropylene tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Samples were centrifuged at $390 \times g$ for 10 minutes at room temperature, and the supernatants for determination of CHI3L1, CXCL13, neurofilament light chains (NFL), and phosphorylated neurofilament heavy chains (pNFH) were then aliquoted into at least 3 vials (0.3 ml per vial) and stored at -70°C until analysed.

Analytical methods

The concentrations of CHI3L1 (Quantikine ELISA Human Chitinase-3-like 1 Immunoassay, REF DC3L10, R&D Systems, USA&Canada), CXCL13 (CXCL13 ELISA, REF EQ6811-9601-L, Euroimmun AG), NFL (NF-light ELISA, REF 10-7001, IVD CE, UmanDiagnostics AB, Umeå, Sweden), and pNFH (Neurofilament "pNf-H" ELISA, REF EQ 6561-9601, IVD CE, Euroimmun AG, Lübeck, Germany) were determined by ELISA. Undiluted CSF was used for CXCL13 and pNf-H whereas 1/2 and 1/50 dilution was used for NFL and CHI3L1, respectively.

The quality control samples supplied by the manufacturers of the diagnostic kits were used for accurate and reproducible measurement of CHI3L1, CXCL13, and pNHF; for NFL measurements, the patient sample was used, because the diagnostic kit did not include a quality control sample. Kit manufacturers reported that analytical sensitivity was 3.55 ng.L⁻¹ for CHI3L1, 10.7 ng.L⁻¹ for CXCL13, 32 ng.L⁻¹ for NFL, and 27 ng.L⁻¹ for pNHF. All samples were measured in duplicate. The mean coefficients of variation for CHI3L1, CXCL13, NFL, and pNHF were 5.8%, 5.2%, 1.9%, and 3.3%, respectively.

IgG oligoclonal bands (oIgG) were detected by isoelectric focusing in agarose gels followed by immunofixation, using a commercial kit on a Hydrasys instrument (Hydragel 9 CSF isofocusing, Cat. No. 4355, Sebia).

IgM and FLC oligoclonal bands (oIgM, oFLC) were analyzed by IEF focusing followed by affinity immunoblotting as originally described by Sindic and Laterre [13] and slightly modified by us [14]. Two extra oligoclonal bands (OCB) in CSF compared to serum (OCB \geq 2) were the interpretation criteria for intrathecal oligoclonal IgG, IgM, and FLC synthesis [15].

Statistical methods

The statistical analysis was rendered using Excel, Stata version 13, MedCal version 17.9.7., R and NCSS 2007 software [16–17]. MedCal version 17.9.7. was applied to estimate the CHI3L1 reference interval too. The robust CLSI C28—A3 method was used, due to the small sample size ($n = 43$).

Basic descriptive statistics, including frequency tables, medians, arithmetic means, standard deviations and percentiles, were used to describe the results. With the Shapiro-Wilk test of normality, the normality of the parameters CHI3L1, CXCL13, NFL, and pNHF was verified.

The normality hypothesis was rejected; therefore, non-parametric tests were used, including the Kruskal-Wallis rank test and the two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

The relationship between the parameters was assessed by Spearman's correlation coefficient. Data values were classified as positive and negative. Fisher's exact test was used to test categorized data. Conformity between assay results was measured using the kappa index with confidence intervals of 95%. Statistical tests were evaluated using a significance level of 5%.

Results

First, we validated the diagnostic kit for CHI3L1 determination. The coefficients of variation were comparable to the values supplied by the manufacturer (Table 1). Based on repeated measurements ($n = 6$) of the blank and the low-concentration CHI3L1 sample, the limit of blank (LoB = 1.05 ng.L⁻¹) and the limit of detection (LoD = 5.48 ng.L⁻¹) values were calculated. The average recovery of CHI3L1 obtained using spiked samples of CSF was 101.4% (Table 2).

A total of 132 patient samples were included in the analysis, which evaluated the correlation between CHI3L1 levels and several other biochemical markers. Characteristics of the studied groups are presented in Table 3; for summary characteristics please see Supplementary material (S1 Table). Age distribution in diagnostic groups compared with One-way analysis of variance (ANOVA) was statistically different ($p < 0.05$).

A statistically significant difference was found by the nonparametric Kruskal-Wallis test between CHI3L1 and diagnosis groups ($p < 0.0001$). After age-adjusted analysis according to regression dependence $\text{CHI3LI} = 51.874 + 1.997 * \text{Age}$, OIND diagnosis group had higher CHI3L1 levels than other diagnosis groups, ($p = 0.002$), Fig 2. Comparison of the individual groups against the Control was performed by the Wilcoxon test.

Table 1. Assessment of the precision of commercial CHI3L1 ELISA using the manufacturer's controls.

Control	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3
n	10	10	10	5	5	5
Mean (ng.L ⁻¹)	335	1030	2084	417	1109	2094
SD (ng.L ⁻¹)	15.9	52.2	105.1	22.2	63.0	135.5
CV (%)	4.8	5.1	5.0	5.3	5.7	6.5
CV _d [†] (%)	4.7	4.3	4.7	5.3	5.8	6.9

n, number of measurements; SD, Standard deviation; CV (%), coefficient of variation;

[†]the declared value of coefficient of variation from the manufacturer

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t001>

The regression relationship between studied parameters was evaluated using Passing–Bablok regression (Fig 3). There was a statistically significant correlation between CHI3L1 and NFL concentrations ($r_s = 0.595$; $n = 105$; $P < 0.0001$) and between CHI3L1 and pNFH concentrations ($r_s = 0.744$; $n = 115$; $P < 0.0001$).

At the same time, we evaluated the correlation between the CHI3L1 concentrations and other studied parameters in individual diagnostic groups. There was a statistically significant relationship between CHI3L1 and NFL in the MS ($r_s = 0.460$; $P = 0.002$), NIND ($r_s = 0.503$; $P = 0.003$), and OIND ($r_s = 0.964$; $P < 0.001$) diagnosis groups, and between CHI3L1 and pNFH in the MS ($r_s = 0.691$; $P < 0.001$) and NIND diagnosis groups ($r_s = 0.691$; $P < 0.001$) (Table 4). We performed a categorical comparison of the selected variables expressed in positivity or negativity of test with individual diagnosis using Fisher's exact test. Positive values of the quantitative tests were as follows: CHI3L1 $> 194.7 \mu\text{g.L}^{-1}$; NF-L $> 900 \text{ ng.L}^{-1}$ [18]; CSF pNFH $> 610 \text{ ng.L}^{-1}$ [19]; CXCL13 $> 20 \text{ ng.L}^{-1}$ [20], in the case of qualitative tests two extra oligoclonal bands (OCB) in CSF compared to serum ($\text{OCB} \geq 2$) were the interpretation criteria for intrathecal oligoclonal IgG, IgM, and FLC synthesis. Statistically significant differences were found in pNFH, oIgG, oIgM, oFLC kappa, and oFLC lambda ($P < 0.0001$) (Table 5).

The Cohen's kappa statistic was used to compare the assays based on clinical interpretation (positive and negative results) because the methods had different reference intervals (Table 6). The higher the kappa value, the greater the agreement between the methods. The highest kappa coefficient, i.e. moderate conformity between the studied biomarkers, was demonstrated between the concentrations of CHI3L1 and pNFH ($\kappa = 0.436$).

Table 2. The recovery of CHI3L1 obtained from spiked samples of CSF.

Theoretical concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Measured concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Average ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recovery (%)
	1. measurement	2. measurement		
32.3	34.0	28.3	31.2	96.4
149.8	162.0	158.0	160.0	106.8
267.5	289.0	295.0	292.0	109.2
385.3	340.5	356.0	348.3	90.4
503.0	512.0	535.0	523.5	104.1

The estimated reference interval ($28.6\text{--}182.5 \mu\text{g.L}^{-1}$) showed age-related increase ($\text{CHI3L1} = 41.546 + 1.072 * \text{Age}$, $P = 0.0017$), sex-related difference was not found ($P = 0.837$) (Fig 1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t002>

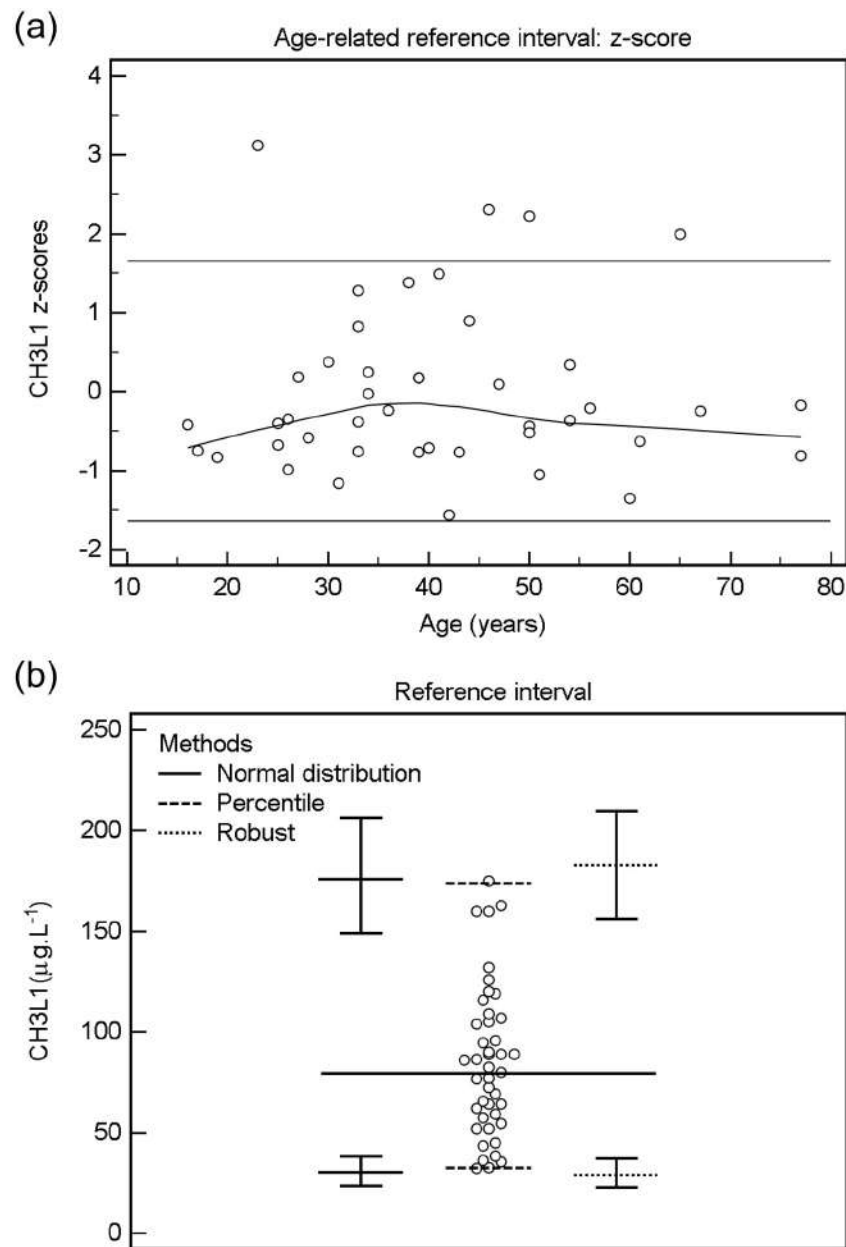


Fig 1. Estimation of the CHI3L1 CSF reference interval and age-dependence of test values. A: Age-related reference interval: centiles; B: reference interval.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.g001>

The Mann-Whitney U test was chosen to compare parameters (CHI3L1, pNFH, NFL and CXCL13) with and without the presence of oligoclonal bands (oIgG, oIgM, oFLC; positive results indicate more than 2 bands in cerebrospinal fluid absent from serum). Statistically significant differences were not found with the presence of oligoclonal bands for CHI3L1, but were found with oIgG for pNFH and CXCL13 ($P = 0.0061$; resp. $P < 0.0001$), with oIgM for CXCL13 ($P = 0.0279$), with oFLC lambda for NFL and CXCL13 ($P = 0.0348$; resp. $P < 0.0001$), oFLC kappa and CXCL13 ($P < 0.0001$).

Table 3. Descriptive characteristics of the studied groups.

MS						
Variable	n	Min	Max	Mean	Median	SD
Age (year)	42	18.00	69.00	38.833	38.00	11.95
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	42	35.70	392.00	139.35	130.50	68.80
CSF NFL (ng.L^{-1})	42	97.00	4044.00	1036.45	721.00	875.43
CSF pNfH (ng.L^{-1})	35	87.31	1985.82	339.56	284.05	320.91
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	42	10.70	265.50	37.43	10.70	61.16
CIS						
Age (year)	14	16.00	44.00	28.57	27.00	8.86
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	14	38.50	269.00	83.92	65.70	58.29
CSF NFL (ng.L^{-1})	14	139.00	1204.00	531.14	479.50	311.42
CSF pNfH (ng.L^{-1})	10	104.18	475.28	188.35	159.37	105.92
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	14	10.70	116.10	32.56	23.55	30.26
OIND						
Age (year)	11	21.00	85.00	56.00	56.00	19.11
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	11	75.30	503.00	216.03	187.00	127.97
CSF NFL (ng.L^{-1})	7	161.00	10073.00	2055.43	690.00	3553.81
CSF pNfH (ng.L^{-1})	9	109.96	22400.00	3686.63	682.55	7161.84
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	7	< 10.70	80040.00	11464.36	24.10	30239.04
IDPNS						
Age (year)	4	37.00	73.00	53.50	52.00	15.35
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4	89.70	230.00	139.38	118.90	64.77
CSF NFL (ng.L^{-1})	4	354.00	27149.00	7430.75	1110.00	13151.77
CSF pNfH (ng.L^{-1})	4	226.88	23100.00	6121.19	578.93	11321.79
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	1	10.70	10.70	10.70	10.70	0.00
NIND						
Age (year)	46	12.00	79.00	54.07	55.00	16.08
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	46	61.10	386.00	163.37	140.00	83.56
CSF NFL (ng.L^{-1})	31	210.00	60600.00	3997.87	744.00	10994.63
CSF pNfH (ng.L^{-1})	43	141.73	15500.00	1573.79	501.34	2892.56
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	24	10.70	96.20	17.01	10.70	21.57
Control						
Age (year)	15	18.00	67.000	41.200	39.000	15.8439
CSF CHI3L1 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	15	32.30	188.00	85.84	76.90	42.24
CSF NFL (ng.L^{-1})	7	108.00	644.00	324.14	303.00	182.20
CSF pNfH (ng.L^{-1})	14	85.85	526.05	235.18	241.16	123.74
CSF CXCL13 (ng.L^{-1})	5	< 10.70	< 10.70	< 10.70	< 10.70	0.00

MS, multiple sclerosis; CIS, clinically isolated syndrome; OIND, other central nervous system inflammatory diseases; IDPNS, inflammatory diseases of the peripheral nervous system; NIND, non-inflammatory diseases of the central nervous system; n, number of patients; Min, minimal concentration; Max, maximal concentration; SD, standard deviation

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t003>

Discussion

In this study we tested CHI3L1 as a marker of multiple sclerosis. The CHI3L1 ELISA diagnostics kit is sensitive enough to measure CHI3L1 in cerebrospinal fluid. We also estimated the normal CSF CHI3L1 values that were show to be independent of gender but associated with age. The CHI3L1 concentration increased with increasing age. This is consistent with published data showing increased levels of CSF CHI3L1 in patients with CNS inflammation

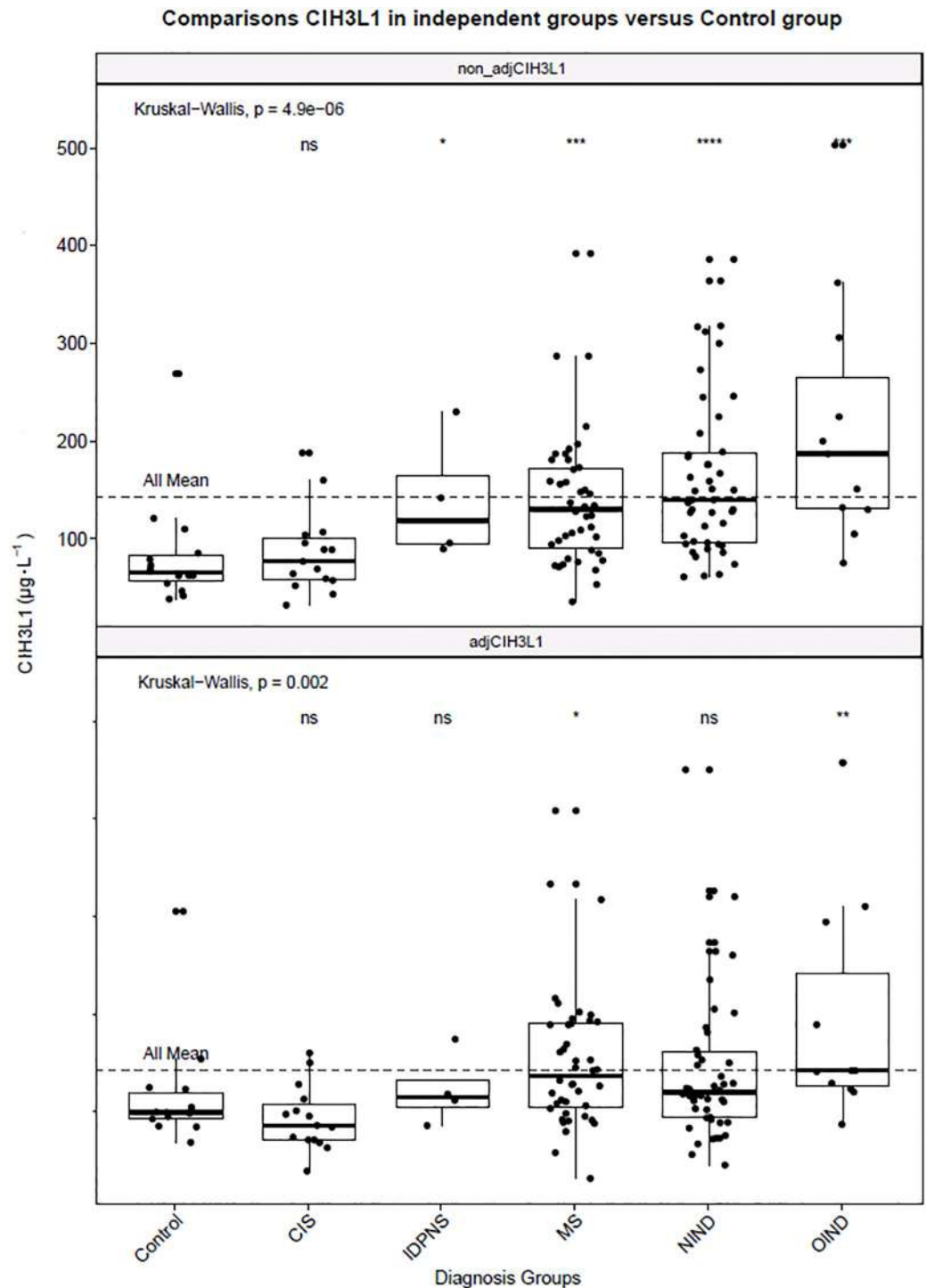


Fig 2. Box-plot concentration of CSF CHI3L1 individual diagnosis groups against base-mean CHI3L1 and results of pairwise comparisons between individual diagnosis groups against “control group”. Upper graph: non-adjusted levels of CHI3L1. Statistically significant differences were found in the IDPNS, MS, NIND and OIND groups. Lower graph: Age adjusted levels of CHI3L1. Statistically significant differences were found only in the MS and OIND group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.g002>

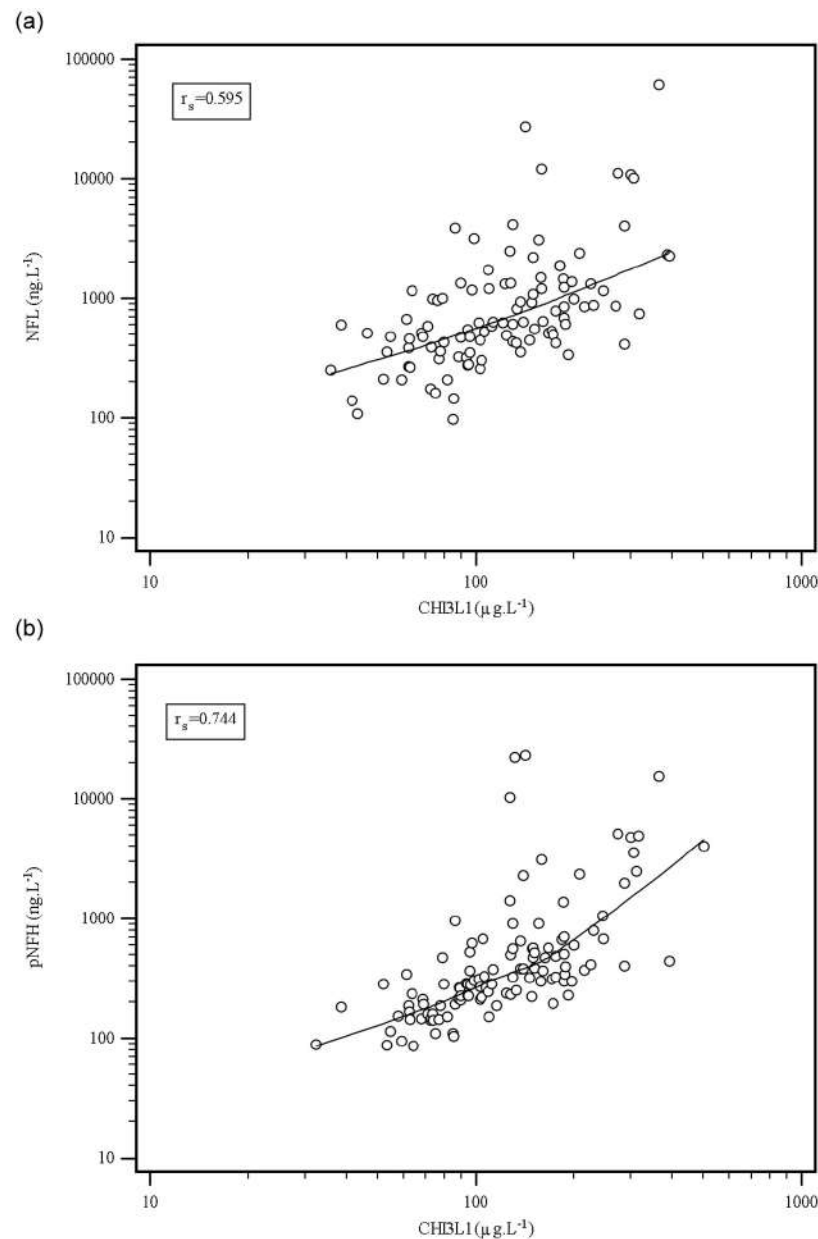


Fig 3. Passing-Bablok regression analysis of CH3L1 and NFL, respectively pNFH concentrations in all groups. r_s = Spearman correlation coefficient. The correlation between CH3L1 and NFL and pNFH in cerebrospinal fluid, $P < 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.g003>

compared with healthy individuals, and an increase with increasing age, consistent with the hypothesis that lower-grade inflammatory processes are induced in the aging brain [9].

The dependence of CH3L1 concentration in different diagnostic groups was studied. An elevated level of CSF CH3L1 was found in patients with MS, but it was much higher in patients with other inflammatory neurological diseases. Modvig et al. [21] reported similar results. They suggested that increased levels of CSF CH3L1 are associated with tissue damage related to inflammation and might predict residual disabilities and possibly cumulative damage over time.

Table 4. Correlations between selected biochemical markers in CSF and the indicated diagnoses.

Parameters		Diagnosis					
		MS	CIS	NIND	OIND	Control	All
CHI3L1 vs. NFL	r_s	0.460	0.422	0.503	0.964	0.857	0.595
	P	0.002	0.131	0.003	<0.001	0.0137	<0.0001
	n	42	14	31	7	7	105
CHI3L1 vs. pNFH	r_s	0.691	-0.091	0.691	0.550	0.662	0.744
	P	<0.001	0.802	<0.001	0.125	0.010	<0.0001
	n	35	10	43	9	14	115
CHI3L1 vs. CXCL13	r_s	0.302	0.421	0.391	0.371		0.205
	P	0.052	0.133	0.059	0.4131	n.a.	0.0482
	n	42	14	24	7		93

MS, multiple sclerosis; CIS, clinically isolated syndrome; OIND, other central nervous system inflammatory diseases; NIND, non-inflammatory diseases of the central nervous system, IDPNS, inflammatory diseases of the peripheral nervous system; r_s , Spearman's correlation coefficient; n.a., not applicable

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t004>

At the same time, a number of studies dealt with the study of CHI3L1 in relation to CNS tissue damage. Burman et. [8] found a fundamental difference in the origin of tissue damage in T1 lesions relative to normal appearing white matter, consistent with the dual paradigm that inflammation and degeneration are important for the development of tissue damage and disability in different form of MS. Baldacci et al. [22] conclude that CHI3L1 is a pathophysiological biomarker of neurodegeneration and its concentration correlate with parameters of neuronal injury, large axonal damage and synaptic disruption in different neurodegenerative disease.

Concurrently, CSF CHI3L1 concentration correlates significantly with CSF NFL and even more with CSF pNFH concentrations, making pNFH kit more convenient for routine analysis. The correlation between CHI3L1 and NFs varies depending on the diagnosis.

Table 5. Categorical comparison of the selected variables expressed in positivity or negativity of test with individual diagnosis using Fisher's exact test, because we compared quantitative methods (CHI3L1, NFL, pNFH, CXCL13) with qualitative methods (oligoclonal bands IgG, IgM, FLC kappa and FLC lambda).

Methods (n)	Fisher exact test P	Sample distribution	Diagnosis				
			CIS	MS	IDPNS	NIND	OIND
CHI3L1 (117)	0.0770	Neg	13	37	3	35	6
		Pos	1	5	1	11	5
CXCL13 (104)	0.0004	Neg	8	32	4	28	4
		Pos	9	11	0	2	6
NFL (106)	0.3775	Neg	13	25	2	19	4
		Pos	3	18	2	16	4
pNFH (104)	<0.0001	Neg	11	33	2	26	4
		Pos	0	2	2	18	6
oIgG (106)	<0.0001	Neg	5	5	8	18	9
		Pos	11	38	0	6	6
oIgM (55)	0.0001	Neg	3	7	1	17	3
		Pos	4	16	0	1	3
oFLC Kappa (132)	<0.0001	Neg	2	6	3	46	6
		Pos	13	37	1	10	8
oFLC Lambda (132)	<0.0001	Neg	7	15	3	53	9
		Pos	8	28	1	3	5

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t005>

Table 6. Correlation of selected parameters based on positivity and negativity of results, Cohen's kappa statistics. Positive values were as follows: CHI3L1 > 194.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$; NF-L > 900 ng.L^{-1} [18]; CSF pNFH > 610 ng.L^{-1} [19]; CXCL13 > 20 ng.L^{-1} [20].

	CHI3L1 vs. NFL	CHI3L1 vs. pNFH	CHI3L1 vs CXCL13
Weighted Kappa (n)	0.243 (105)	0.436 (115)	0.287 (93)
95% CI	0.058–0.428	0.242–0.630	0.067–0.507
Standard error	0.0942	0.0988	0.112

95% CI, 95% confidence interval

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233519.t006>

We also assessed the correlation between CHI3L1 and CXCL13. CXCL13 is a potent B cell chemoattractant. In cerebrospinal fluid, it is expressed by monocytes and especially macrophages in perivascular inflammatory lesions and scattered parenchymal cells [23]. Khademi et al. stress that this chemokine could be a very important marker of inflammatory activity in patients with multiple sclerosis [24]. The authors demonstrated a statistically significant correlation of elevated CXCL13 levels with the conversion of CIS to clinically definite MS and the rate of relapses one year after diagnostic lumbar puncture. They also found a significant relationship between high levels of CXCL13 and the presence of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. This finding is confirmed by our observation of statistically significant differences in CXCL13 concentrations between oIgG, oFLC kappa and oFLC lambda negative versus positive patients.

The present study also provides the first results that compare CHI3L1, NFL, pNFH, and CXCL13 with IgG, IgM, and FLC kappa and FLC lambda oligoclonal bands. Our reason for conducting the comparison is the fact that intrathecal synthesis of IgG as well as of free light chains (FLC) is detectable in the majority of patients with multiple sclerosis and less frequently in other, mostly inflammatory, nervous system diseases. In addition, a positive finding of intrathecal FLC synthesis can be a marker of disease progression [25]. The detection of oIgM may help us to better understand the nature of the intrathecal antibody response in inflammatory neurological diseases and may be important in their differential diagnoses [26–27].

Since CSF CHI3L1 concentrations correlated much more closely with CSF pNFH, an established biomarker of disease progression than with inflammatory biomarker CSF CXCL13 and oFLC, we hypothesize that CSF CHI3L1 levels might reflect the extent of tissue damage rather than the degree of inflammatory activity. Lowest CSF CHI3L1 level found in the CIS group might further support this hypothesis, although patients with CIS (i.e., not fulfilling the diagnostic criteria of MS after the first episode consistent with demyelination) are probably at lower risk of progression to CDMS than before the implementation of 2017 revision of MS diagnostic criteria.

Limits of the study

Our study has several weaknesses. Although three CSF and serum aliquots were frozen for each patient in the study, there was not always enough material, especially cerebrospinal fluid, for all tests. At the same time, the patient population was obtained during a 3-year study (n = 356), but in some patients no definitive diagnosis has been established. Therefore, these patients were not included in the final evaluation, which also affected the unequal representation of patients in the individual diagnostic groups. Finally, detailed clinical characteristics of patients within individual diagnostic groups were not taken into account in the analysis.

Conclusions

In this study, we tested a diagnostic kit for the determination of CHI3L1 concentrations in biological fluids. The CHI3L1 ELISA assay has adequate sensitivity and is suitable for CSF analysis. The data showed good correlation and moderate conformity between CHI3L1 and pNFH concentrations. When assessing the relationship of CHI3L1 concentrations and diagnosis, correlations were found between the concentrations of CHI3L1 and NFL in the MS, NIND, and OIND groups, and between the concentrations of CHI3L1 and pNFH in the MS and NIND groups. The results support the hypothesis that CSF CHI3L1 could be another promising prognostic, albeit probably etiologically nonspecific, biomarker of MS.

Supporting information

S1 Table. Descriptive characteristics of the individual studied groups.
(DOCX)

S1 Data.
(XLSX)

S2 Data.
(XLSX)

Acknowledgments

We wish to thank the laboratory technicians L. Fürstová, I. Faruzelová, R. Malečková, R. Výtisková and B. Strakošová for their expert technical assistance. We thank Ing. F. Všianský for help with the statistical analysis.

Author Contributions

Conceptualization: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek, Olga Zapletalová.

Data curation: Pavlína Kušnierová, David Zeman.

Formal analysis: Pavlína Kušnierová, David Zeman.

Funding acquisition: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek.

Investigation: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek, Olga Zapletalová.

Methodology: Pavlína Kušnierová, David Zeman.

Project administration: Pavlína Kušnierová, David Zeman.

Resources: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek, Olga Zapletalová.

Supervision: David Zeman, Pavel Hradílek, David Stejskal.

Validation: Pavlína Kušnierová, David Zeman.

Writing – original draft: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek.

Writing – review & editing: Pavlína Kušnierová, David Zeman, Pavel Hradílek, Olga Zapletalová.

References

1. Tintore M, Rovira Á, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. <https://doi.org/10.1093/brain/awv105> PMID: 25902415.

2. Sellebjerg F, Royen L, Soelberg Sørensen P, Oturai AB, Jensen PEH. Prognostic value of cerebrospinal fluid neurofilament light chain and chitinase-3-like-1 in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019; 25(11):1444–1451. <https://doi.org/10.1177/1352458518794308> PMID: 30113249.
3. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler*. 2011; 17(3):335–343. <https://doi.org/10.1177/1352458510389102> PMID: 21135023.
4. Llorens F, Thüne K, Tahir W, Kanata E, Diaz-Lucena D, Xanthopoulos K, et al. YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Mol Neurodegener*. 2017 Nov 10; 12(1):83. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0226-4> PMID: 29126445.
5. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang M-J, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling and injury. *Annu Rev Physiol*. 2011; 73:479–501. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142250> PMID: 21054166.
6. Canto E, Tintore M, Villar LM, Costa C, Nurdin R, Alvarez-Cermenio JC, et al. Chitinase 3-like 1: prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*. 2015; 138,918–31. <https://doi.org/10.1093/brain/awv017> PMID: 25688078.
7. Bonneh-Barkay D, Bissel SJ, Wang G, Fish KN, Nicholl GC, Darko SW, et al. YKL-40, a marker of simian immunodeficiency virus encephalitis, modulates the biological activity of basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 2008, 173:130–143. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080045> PMID: 18556781.
8. Burman J, Raininko R, Blennow K, Zetterberg H, Axelsson M, Malmeström C. YKL-40 is a CSF biomarker of intrathecal inflammation in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 2016; 292:52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.013> PMID: 26943959.
9. Bonneh-Barkay D, Wang G, Starkey A, Hamilton RL, Wiley CA. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J. Neuroinflammation*. 2010; 7,34. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-34> PMID: 20540736.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. CLSI document C28–A3. 3rd ed. Wayne: PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
11. Pavlov IY, Wilson AR, Delgado JC. Resampling approach for determination of the method for reference interval calculation in clinical laboratory practice. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17:1217–22. <https://doi.org/10.1128/CLVI.00112-10> PMID: 20554803.
12. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018; 17(2):162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2) PMID: 29275977
13. Sindic CJM, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991; 33:63–72. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90035-6) PMID: 1829093.
14. Zeman D, Hradilek P, Švagera Z, Mojžíšková E, Woznicová I, Zapletalová O. Detection of oligoclonal IgG kappa and IgG lambda using Hevylite antibodies. Comparison with oligoclonal free light chain pattern. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9:5. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-5> PMID: 22360869.
15. Zeman D, Hradilek P, Kusnierova P, Piza R, Reguliova K, Woznicova I, et al. Oligoclonal free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal inflammation. Comparison with oligoclonal IgG. *Biomed Pap Med Fac Univ Palackz Olomouc Cech Repub*. 2015; 159(1):104–113. <https://doi.org/10.5507/bp.2014.058> PMID: 25485529.
16. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica* 2012; 22(3):276–282. PMID: 23092060.
17. Stata Version 13, Stata Press Publication, Texas, 2013. ISBN-13:978-1-59718-129-7.
18. Arrambide G., Espejo C., Eixarch H., Villar LM., Alvarez-Cermenio JC, Picon C, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology* 2016; 87(11):1076–1084. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003085> PMID: 27521440
19. Neurofilament (pNf-H) ELISA, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Germany). Version: 20/07/2017.
20. CXCL13 ELISA, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Germany). Version: 16/6/2018.
21. Modvig S, Degn M, Roed H, Sørensen TL, Larsson HBW, Langkilde AR, et al. Cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain predict multiple sclerosis development and disability after optic neuritis. *Mult Scler* 2015; 21(14),1761–1770. <https://doi.org/10.1177/1352458515574148> PMID: 25698172.
22. Baldacci F, Lista S, Palermo G, Giorgi FS, Vergallo A, Hampel H. The neuroinflammatory biomarker YKL-40 for neurodegenerative diseases: advances in development. HYPERLINK "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- [pubmed/31195846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195846/)" to "Expert review of proteomics." *Expert Rev Proteomics*. 2019; 16(7),593–600. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1628643> PMID: 31195846.
23. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006; 129:200–211. <https://doi.org/10.1093/brain/awh680> PMID: 16280350.
 24. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler* 2011; 17(3):335–343. <https://doi.org/10.1177/1352458510389102> PMID: 21135023.
 25. Senel M, Tumani H, Lauda F, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, et al. Cerebrospinal Fluid Immunoglobulin Kappa Light Chain in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis. *Plos One*. 2014 Apr 2; 9(4):e88680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088680> PMID: 24695382.
 26. Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:333–40. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2001.052> PMID: 11388658.
 27. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180:17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.006> PMID: 16945427.



Stanovení biomarkerů β -amyloidu 1-42 (Ab42), celkového tau proteinu (T-Tau) a fosforylovaného tau proteinu 181 (P-Tau) je využíváno v rámci diferenciální diagnostiky neurodegenerativních onemocnění, zvláště Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD). Cílem naší práce bylo porovnání neurodegenerativních markerů dvěma typy diagnostických souprav.

Porovnání dvou analytických metod stanovení neurodegenerativních markerů β -amyloidu 1-42, celkového tau proteinu a fosforylovaného tau proteinu 181

KUŠNIEROVÁ P.,^{1,2} SLEPČANOVÁ H.,¹ VŠIANSKÝ E.,¹ MICHNOVÁ O.,¹ BÁRTOVÁ P.,³ STEJSKAL D.^{1,2}

¹ Ústav laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava

² Katedra biomedicínských oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

³ Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Ostrava

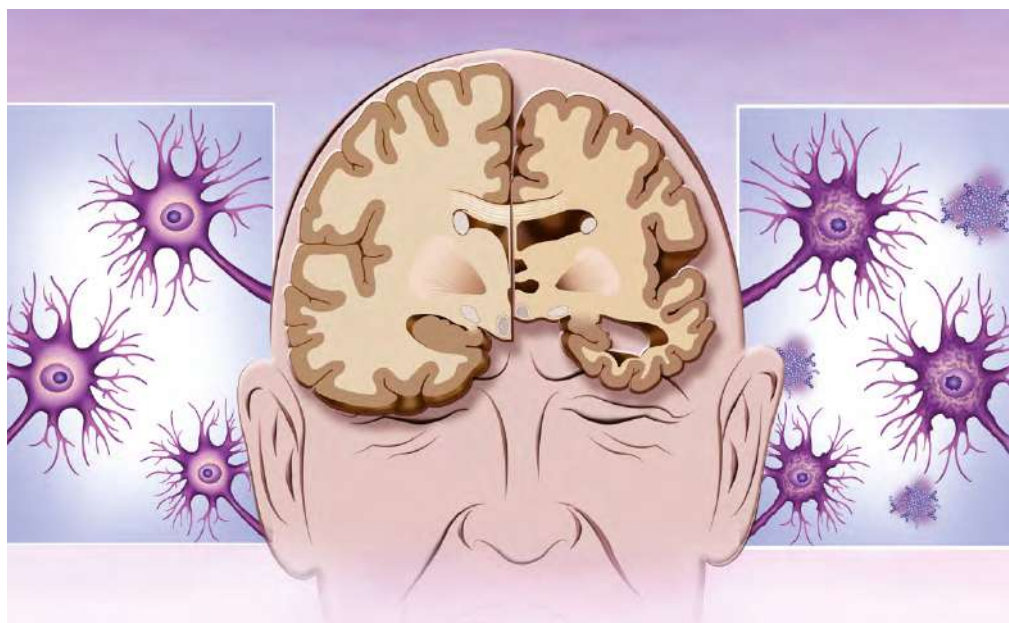
Úvod

Neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova choroba (AD) a další související demence, postihují téměř 44 milionů lidí na celém světě.¹ Nejčastěji se s nimi setkáváme u osob starších 65 let, jejich prevalence s věkem stoupá a podle odhadu se vzhledem k rostoucí délce života počet lidí s demencí v příštích 30 letech zdvojnásobí.² Z tohoto důvodu jsou hledány laboratorní biomarkery, které by pomohly diagnostikovat tuto chorobu v časných stádiích. V současné době je při podezření na řadu onemocnění centrálního nervového systému (CNS) doporučováno základní vyšetření mozkomíšního moku (CSF), a to posouzení vzhledu likvoru, kvantitativní stanovení počtu buněčných elementů, celkové bílkoviny, glukózy a laktátu.³ Pro podrobnější diferenciaci nemocí CNS je poté doporučováno stanovení konkrétních biomarkerů. Z hlediska diferenciace neurodegenerativních onemocnění se jedná o stanovení likvorové koncentrace beta-amyloidu 42 (Ab42), celkového tau proteinu (T-Tau), popř. fosforylovaného tau proteinu 181 (P-Tau).

Tau protein jako nízkomolekulární neurocytoskeletální protein se může vyskytovat až v 6 různých izoformách, které se liší délkou polypeptidového řetězce.⁴ Účastní se výstavby mikrotubulů, která je řízena fosforylací a defosforylací. Defosforylovaný tau protein přispívá k polymerizaci a stabilizaci mikrotubulů, kdežto fosforylovaný tau protein se z jejich vazby uvolňuje a tím vede k jejich rozpadu. Za fyziologických okolností

je mezi těmito dvěma pochody udržována rovnováha zajišťující potřebnou stabilitu mikrotubulů.⁵ Za patologických podmínek se fosforylované formy tau proteinu uvolňují za tvorby párových helikálních filament agregujících za vzniku neurofibrilárních klubíček.⁶ Přítomnost těchto obtížně odbouratelných intracelulárních depozit tau proteinu je typická pro neurodegenerativní onemocnění označované jako tauopatie, jejímž hlavním představitelem je AD. Následkem může být rozpad buňky se současným uvolněním tau proteinu do extracelulárního prostoru. Zvýšená koncentrace celkového tau proteinu společně s fosforylovaným tau proteinem v CSF tak patří k ukazatelům AD.

Beta-amyloid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu, který je fyziologickou součástí buněčné membrány. V klinické praxi se využívá převážně stanovení izoformy Ab42 končící alaninem na rozdíl od kratší izoformy Ab40 končící valinem, která za fyziologických okolností převažuje, je solubilní a tělem vylučována. Rychle agregující izoforma Ab42 je tak dominující formou beta-amyloidu uloženého v placích. Jeho snížená koncentrace u pacientů s AD je pak vysvětlována právě jeho zvýšenou adherencí v perineuronálních neuritických placích.⁷





Senzitivita a specifita Ab42 pro diagnostiku AD oproti kontrolní skupině je odhadována z řady studií na 86 % a 90 %; pro celkový T-Tau 81 %, resp. 90 %, a pro P-Tau 80 %, resp. 92 %. Při kombinovaném hodnocení senzitivity a specifity byly pro Ab42 a T-Tau získány hodnoty 85–94 %, resp. 83–100 % ve skupině s AD oproti kontrolní skupině.⁸ Nicméně při hodnocení specifity těchto biomarkerů pro AD vzhledem k ostatním demencím byly její hodnoty mnohem nižší.⁹ Současně byly pozorovány rozdíly v absolutních koncentracích těchto biomarkerů napříč různými laboratořemi. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnými preanalytickými i analytickými podmínkami.¹⁰⁻¹¹

Cílem naší práce bylo porovnání neurodegenerativních markerů dvěma typy diagnostických souprav, korelace mezi absolutními koncentracemi jednotlivých biomarkerů a jejich vzájemnými poměry a posouzení jejich vzájemné výpovědní hodnoty na základě shody klinické interpretace.

Metodika

Pacienti

Do studie bylo zařazeno 42 vzorků pacientů z Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Ostrava s podezřením na neurodegenerativní onemocnění. Průměrný věk celé skupiny byl $49,9 \pm 16,8$ let. Skupinu tvořilo 33 žen s průměrným věkem $51,1 \pm 15,3$ let a 9 mužů s průměrným věkem $45,6 \pm 22,0$ let. Soubor pacientů byl dále rozdělen do následujících diagnostických skupin: Alzheimerova choroba (AD) (n = 3), jiné demence (D) (n = 6), Parkinsonova choroba (PD) (n = 3) a kontrolní skupina (Co) (n = 30).

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s použitím zbytkového biologického materiálu pro výzkumné účely. Kromě pohlaví a věku byly všechny údaje o pacientech anonymní.

Vzorky

Vzorky likvoru studovaných jedinců byly odebrány standardizovaným způsobem do polypropylenových zkumavek (Sarstedt, Nümbrecht, Německo). Vzorky byly centrifugovány při $390 \times g$ po dobu 10 minut za pokojové teploty a supernatanty byly poté uchovány v kryozkumavkách (0,5 ml na kryozkumavku) a skladovány při -70°C do doby analýzy.

Analytické metody

Ke stanovení Ab42, T-Tau a P-Tau v likvoru byly použity dvě imunoanalytické metody s odlišným způsobem detekce, elektrochemiluminiscenční detekce využívající značení rutheniovým chelátem na plně automatickém analyzátoru **cobas** 6000 firmy Roche a imunoenzymatická detekce využívající bezbarvého chromogenního substrátu (ELISA) na analyzátoru DSX (Euroimmun; EI). V případě automatizovaného analyzátoru **cobas** 6000 byly použity diagnostické soupravy Elecsys Total-Tau CSF, kat. č. 07356994 190, Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF, kat. č. 07357036 190, a Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF, kat. č. 06986811 190. V případě ELISA stanovení byly použity diagnostické soupravy Total-Tau determination in CSF, kat. č. EQ 6531-9601-L, Beta-amyloid (1-42) determination in CSF, kat. č. EQ 6521-9601-L, a P-Tau (181) determination in CSF, kat. č. EQ 6591 9601 L (Euroimmun).

Ke statistickému zpracování dat byly použity programy Excel a MedCalc verze 17.9.7. U všech použitých testů byla statistická významnost posuzována na hladině $P = 0,05$.

Výsledky

Základní charakteristiku studovaného souboru uvádí tabulka 1. Absolutní hodnoty obou testovaných analytických platform se výrazně lišily, nicméně korelační analýza mezi studovanými biomarkery prokázala statisticky významné korelace mezi metodami Ab42 (Roche) vs. Ab42 (EI), resp. P-Tau (Roche), mezi Ab42 (EI) vs. P-Tau (Roche), mezi P-Tau (Roche) vs. P-Tau (EI), T-Tau (Roche) vs. T-Tau (EI), mezi P-Tau (EI) vs. T-Tau (Roche), resp. T-Tau (EI), a mezi T-Tau (Roche) vs. T-Tau (EI), $P \leq 0,001$. Při porovnání jednotlivých biomarkerů pomocí Demingovy regrese byla mezi nimi zjištěna výrazná proporcionální chyba, u Ab42 40 %, T-Tau 43 % a P-Tau 46 %, což je možné vysvětlit odlišným principem stanovení, viz tabulka 2, obrázek 1. Existence výrazných rozdílů mezi jednotlivými diagnostickými soupravami vyplynula rovněž ze vzájemného porovnání jednotlivých dvojic biomarkerů provedeného pomocí metody diferenčních grafů dle Bland-Altmana, viz tabulka 3, obrázek 2. Ve všech diferenčních

	N	Min.	Max.	Průměr	Medián	SD
Věk (roky)	42	17	90	49,91	50,50	16,78
Ab42 (ng.L ⁻¹) (EI)	42	280	1896	970,21	933,40	334,22
T-Tau (ng.L ⁻¹) (EI)	42	148	961	364,22	320,0	175,45
P-Tau (ng.L ⁻¹) (EI)	42	17,5	155,5	39,11	28,95	27,38
T-Tau/Ab42 (EI)	42	0,132	3,147	0,496	0,306	0,553
P-Tau/Ab42 (EI)	42	0,018	0,288	0,051	0,032	0,062
Ab42 (ng.L ⁻¹) (Roche)	42	200	1700	1087,59	1001,90	456,59
T-Tau (ng.L ⁻¹) (Roche)	42	80	493	171,18	138,35	96,37
P-Tau (ng.L ⁻¹) (Roche)	42	8,0	39,9	12,99	10,63	6,72
T-Tau/Ab42 (Roche)	42	0,047	0,781	0,200	0,132	0,174
P-Tau/Ab42 (Roche)	42	0,006	0,082	0,016	0,010	0,016

▲ Tab. 1: Základní charakteristika studovaného souboru. N – počet vzorků; SD – směrodatná odchylka



grafech byl navíc pozorován statisticky významný lineární trend nárůstu diferencí v závislosti na koncentraci daného biomarkeru ve vzorku. Tento trend samozřejmě ovlivňuje validitu výpočtu rozdílu (biasu) mezi jednotlivými metodami. Současně bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací T-Tau průměrná odchylka (BIAS) klesá, nicméně v celém rozsahu koncentrací je záporná, v případě P-Tau záporný BIAS s rostoucí koncentrací roste, kdežto u Ab42 je u nízkých koncentrací záporný BIAS, s rostoucí

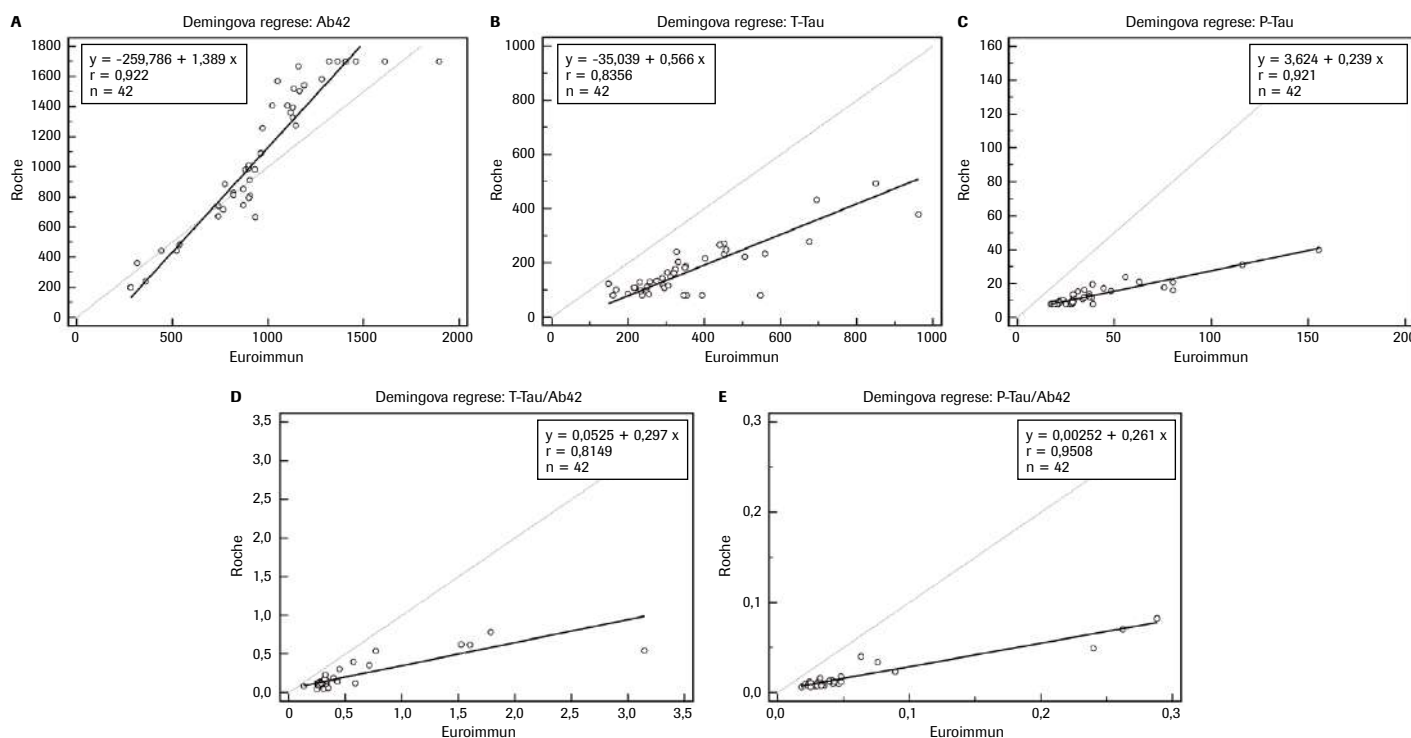
koncentrací Ab42 průměrná odchylka vzrůstá, tj. vykazuje kladný BIAS. Při porovnávání diferencí mezi měřenými biomarkery vzhledem k celkové analytické chybě měření ($TE_a = \pm 25\%$) vycházející z hodnocení externí kontroly kvality společnosti Instand bylo zjištěno, že metody jsou z klinického pohledu vzájemně nezaměnitelné.

Dále z důvodu rozdílných referenčních intervalů byla pro porovnání metod na základě shody klinické interpretace

použita Kappa statistika. Kvantitativní výsledky měření získané odlišnými metodami stanovení bylo nutné převést pomocí referenčních hodnot používaných pro danou metodu na kvalitativní výsledky (negativní/pozitivní). Nejvyšší kappa koeficient, resp. velmi dobrá shoda mezi testovanými metodami byla prokázána u T-Tau ($\kappa = 0,844$), dostatečná shoda pak mezi P-Tau metodou EI a Roche ($\kappa = 0,465$) a slabá shoda mezi Ab42 metodou EI a Roche ($\kappa = 0,286$), viz tabulka 4.

Metoda	Úsek (95% CI)	Směrnice přímky (95% CI)	r
T-Tau (EI) vs. (Roche)	-35,036 (-100,982 až 30,905)	0,566 (0,367 až 0,766)	0,744
P-Tau (EI) vs. (Roche)	3,624 (2,674 až 4,575)	0,239 (0,211 až 0,268)	0,921
Ab42 (EI) vs. (Roche)	-259,786 (-496,565 až -23,006)	1,389 (1,108 až 1,669)	0,922
T-Tau/Ab42 (EI) vs. (Roche)	0,053 (-0,071 až 0,176)	0,297 (-0,042 až 0,636)	0,815
P-Tau/Ab42 (EI) vs. (Roche)	0,003 (0,001 až 0,004)	0,261 (0,207 až 0,315)	0,951

▲ Tab. 2: Porovnání metod pomocí Demingovy regresní analýzy. CI – 95% interval spolehlivosti, r – Pearsonův korelační koeficient



▲ Obr. 1: Porovnání neurodegenerativních markerů a jejich vzájemných poměrů metodami Euroimmun vs. Roche Demingovou regresní analýzou. A: Ab42, B: T-Tau, C: P-Tau, D: T-Tau/Ab42 a E: P-Tau/Ab42; plnou čarou je vyznačena regresní linie, tečkovaně diagonální linie (identita)



Rozložení naměřených hodnot neurodegenerativních markerů v závislosti na diagnóze a použité metodě stanovení (EI vs. Roche) lze pozorovat na obrázku 3.

Diskuse

Neurodegenerativní onemocnění vznikají v důsledku progresivní degenerace nebo postupného zániku specifických skupin neuronů. Jejich patofyziologickou podstatou je strádání specifického

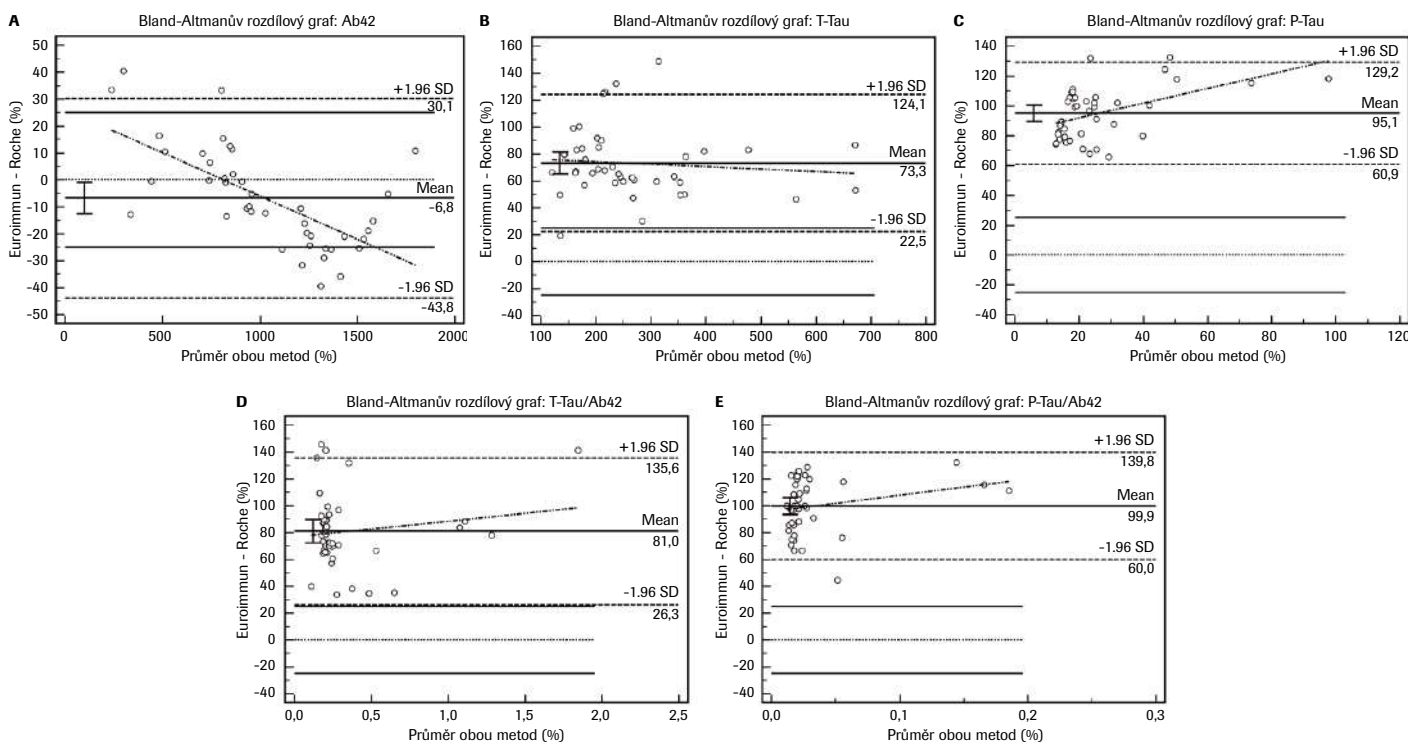
proteinu pro dané onemocnění v mozkové tkáni v kombinaci s obecnými mechanismy apoptózy a autofagie.¹²⁻¹³

V naší studii jsme se zaměřili na beta-amyloid 42, celkový tau protein a fosforylovaný tau protein (181P) a jejich stanovení dvěma odlišnými metodami. Stanovení diagnostickými soupravami firmy Roche vyžaduje přísné dodržování preanalytických podmínek, jako je odběr předem daného množství likvoru definovaným způsobem do specifických

odběrových zkumavek a jeho další zpracování (použití konkrétních špiček, mikrozukmavek atd.) a uchování při teplotě -60 °C nebo nižší minimálně po dobu 3 dnů do doby analýzy.¹⁴⁻¹⁶ Oproti tomu stanovení diagnostickými soupravami firmy Euroimmun vyžaduje odběr do polypropylenových zkumavek bez další specifikace typu odběrových zkumavek, špiček, alikvotačních zkumavek a doby zamražení před analýzou.¹⁷⁻¹⁹ Podobné informace lze získat i od autorů Bartoš a spol.,²⁰ kteří ve své práci popisují praktické informace

Metody	Aritmetický průměr difference	P (H ₀ : Mean = 0)	Dolní limit	Horní limit	P (směrnice trendu)
Ab42 (EI) vs. (Roche)	-6,816	0,024	-43,769	30,137	<0,001
T-Tau (EI) vs. (Roche)	73,288	<0,001	22,484	124,093	0,549
P-Tau (EI) vs. (Roche)	95,083	<0,001	60,926	129,239	0,002
T-Tau /Ab42 (EI) vs. (Roche)	80,993	<0,001	26,339	135,647	0,349
P-Tau /Ab42 (EI) vs. (Roche)	99,887	<0,001	60,016	139,758	0,145

▲ Tab. 3: Posouzení shody studovaných biomarkerů a jejich poměrů metodami Roche vs. Euroimmun pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Aritmetické průměry diferencí u T-Tau, P-Tau, T-Tau/Ab42 a P-Tau/Ab42 se signifikantně lišily od 0 (P < 0,001)

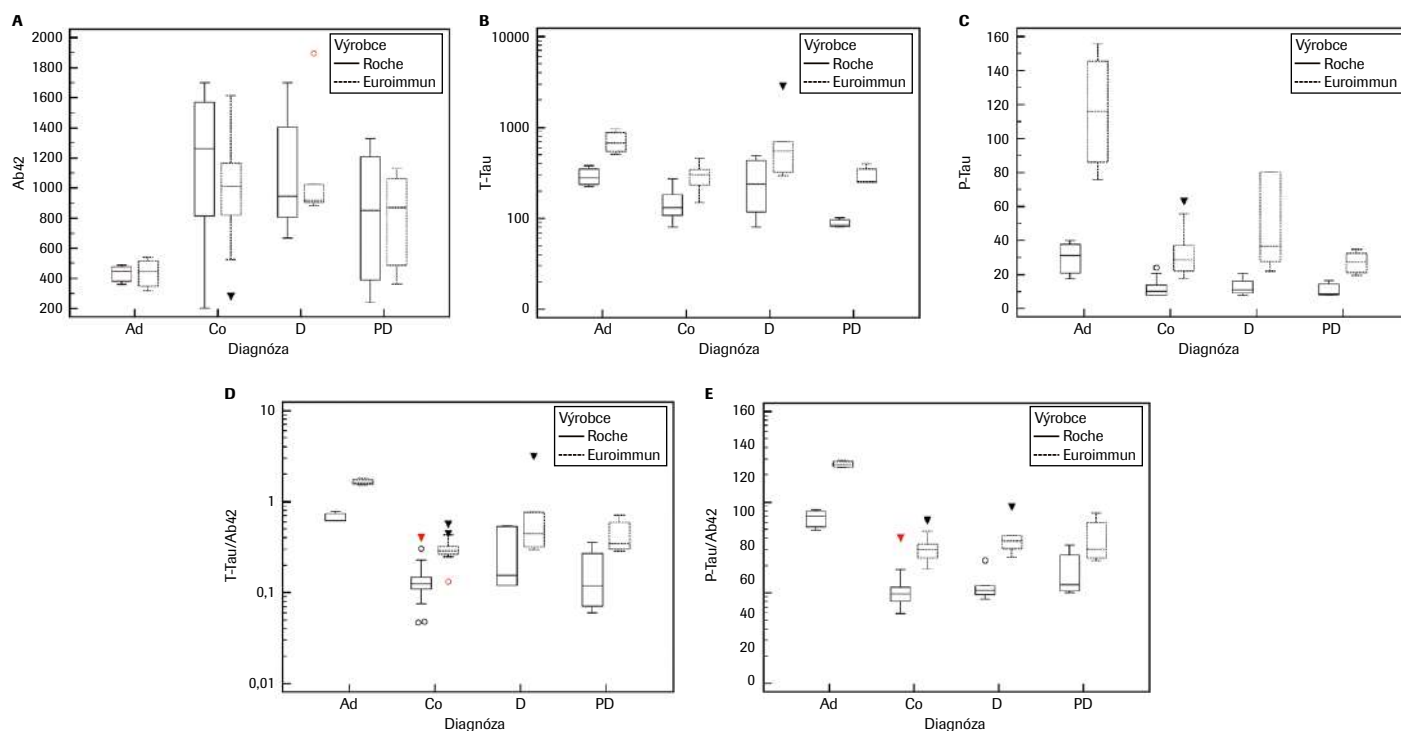


▲ Obr. 2: Bland-Altmanův rozdílový graf metod Euroimmun a Roche pro stanovení (A) celkového tau proteinu (T-Tau); (B) fosforylovaného tau proteinu (P-Tau), (C) beta-amyloidu (1-42) (Ab42), (D) poměru T-Tau a Ab42 a (E) poměru P-Tau a Ab42 v mozkomíšním moku. Plná čára představuje průměr rozdílů (Mean), přerušované čáry znázorňují interval – průměr $\pm 1,96$ SD, současně jsou vyznačeny plné čáry odpovídající celkové povolené chybě ± 25 %



	T-Tau (EI) vs. T-Tau (Roche)	P-Tau (EI) vs. P-Tau (Roche)	Ab42 (EI) vs. Ab42 (Roche)
Kappa statistika	0,844	0,465	0,286
Standardní chyba	0,152	0,216	0,103
95% CI	0,547 až 1,000	0,0386 až 0,884	0,083 až 0,489

▲ Tab. 4: Porovnání metod na základě Kappa statistiky. Rozhodující limity jednotlivých diagnostických souprav: T-Tau Roche $>300 \text{ ng.L}^{-1}$, P-Tau Roche $>27 \text{ ng.L}^{-1}$, Ab42 Roche $\leq 1\,000 \text{ ng.L}^{-1}$; T-Tau EI $>614 \text{ ng.L}^{-1}$, P-Tau EI $>61 \text{ ng.L}^{-1}$, Ab42 EI $<550 \text{ ng.L}^{-1}$



Obr. 3: Rozložení naměřených hodnot neurodegenerativních markerů a jejich poměrů v závislosti na diagnóze a použité metodě stanovení (Roche vs. Euroimmun). (A) T-Tau, (B) P-Tau, (C) Ab42, (D) poměr T-Tau/Ab42, (E) poměr P-Tau/Ab42 v mozkomíšním moku

k vyšetření likvorového tripletu. Z práce vyplývají i další podstatné informace týkající se transportu vzorku bez nutnosti chlazení či zamražení vzorku, pokud je CSF dopraven do 6 dnů od odběru. Při delší časové prodlevě pak doporučuji vzorek CSF zamrazit a skladovat při teplotě -15 až $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pro dlouhodobé skladování zamražení na $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vlastní stanovení neurodegenerativních biomarkerů již probíhá zcela standardně při použití obou diagnostických souprav. Nicméně diagnostické soupravy firmy Roche lze použít ke stanovení neurodegenerativních markerů kdykoliv bez ohledu na množství vzorků přijatých laboratoří k analýze na rozdíl od ELISA metody, kde by se rozhodně nevyplatilo provádět analýzu při počtu vzorků menším než 8.

V konečném důsledku, při malém počtu vzorků, by se stala ELISA metoda cenově náročnější než plně automatizovaná metoda na analyzátoru ROCHE, která má však vyšší vstupní cenu.

Při porovnání výše jmenovaných diagnostických souprav byly pozorovány v absolutních koncentracích výrazné rozdíly mezi testovanými biomarkery, nicméně testy spolu dobře korelovaly. V případě T-Tau a P-Tau bylo dále zjištěno, že diagnostické soupravy firmy Roche poskytují nižší hodnoty než diagnostické kity firmy Euroimmun, zatímco v případě Ab42 diagnostické soupravy firmy Roche poskytují při nižších koncentracích nižší hodnoty, naopak při vyšších koncentracích vyšší hodnoty. Současně jsme došli k závěru, že použité diagnostické soupravy nelze

z klinického hlediska zaměnit, tudíž je při interpretaci nutné přihlížet k referenčním mezím konkrétního výrobce.

S podobnými výsledky se setkáváme i v práci autorů Bartoš A. a spol.²⁰ kteří studovali shodu výsledků likvorového tripletu T-Tau, P-Tau a Ab42 dvěma ELISA metodami, ale podobně jako v naší studii nacházeli u tau proteinu analyzovaného soupravou Euroimmun vyšší koncentrace než u druhé testované soupravy Innatest, zatímco v případě stanovení koncentrace Ab42 soupravou Euroimmun získali nižší koncentrace než soupravami Innatest.

Také Fagan A. M. a spol.²¹ se zabývali porovnáním diagnostických souprav Innatest® ELISA a INNO-BIA AlzBio3. Ačkoli absolutní hodnoty Ab42, T-Tau



a P-Tau získané oběma platformami byly odlišné, korelovaly spolu velmi dobře, stejně jako poměr T-Tau/Ab42. Rovněž v souladu s předchozími studiemi²²⁻²³ používajícími tyto testy zjistili, že jednotlivé neurodegenerativní markery T-Tau, P-Tau i Ab42 v CSF korelují s kortikální amyloidovou náloží, i když různou měrou. Nicméně poměry T-Tau/Ab42 získané oběma testovanými diagnostickými kity překonaly jednotlivé biomarkery včetně Ab2. Autoři došli k závěru, že obě testovací platformy fungují dobře při identifikaci jedinců

s přítomnými amyloidními plakami, zejména poměr T-Tau/Ab42, a dále podporují silný vztah mezi patologiemi amyloidu a celkového tau proteinu u pacientů s AD.

Závěr

Byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými metodami stanovení. Diagnostické soupravy firmy Roche a Euroimmun nejsou navzájem zastupitelné. Nicméně uspokojivá shoda z hlediska

klinické interpretace byla prokázána mezi všemi testovanými diagnostickými soupravami. Pro rutinní analýzu lze tedy doporučit obě metody stanovení, nicméně je nutné mít stále na paměti sledování hladiny příslušných biomarkerů ve stejné laboratoři používající stále stejnou metodu stanovení a hladinu konkrétního biomarkeru interpretovat vzhledem k referenčním mezím konkrétní laboratoře. Za pozitivní nález je pak vždy považován nález patologických koncentrací minimálně dvou testovaných parametrů.



RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.

Ústav laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava
Kontakt: pavlina.kusnierova@fno.cz

Vystudovala Přírodovědeckou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci (2001). Téhož roku nastoupila jako chemik analytik na Oddělení klinické biochemie Nemocnice ve Frýdku-Místku, od roku 2005 pak na Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk jako vedoucí úseku molekulární biologie a genetiky, od roku 2009 jako vedoucí laboratoře. V roce 2007 dokončila PGS na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v oboru Lékařská chemie a biochemie, v témže roce atestovala jako odborný pracovník ve vyšetřovacích metodách v klinické biochemii. Od roku 2011 pracuje jako odborný pracovník v laboratořích Ústavu laboratorní diagnostiky, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Ostrava. Ve stejném roce atestovala jako bioanalytik pro klinickou genetiku. Mimo jiné vyučuje na katedře biomedicínských oborů Ostravské univerzity. Podílí se na grantových výzkumných projektech v oblasti klinické biochemie, na tvorbě výukových materiálů. Je členkou České společnosti pro klinickou biochemii, České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Genetické společnosti Gregora Mendela. Je autorkou/spoluautorkou 40 publikací, z toho 19 v časopisech s IF, 24 publikovaných abstraktů, 3 skript, 1 kapitoly v odborné knize a e-knihy E-klinická biochemie s celkovým H-indexem 7. Současně je hlavním řešitelem/spoluřešitelem 10 grantů/projektů.

LITERATURA

- Nichols E., Szeoke C.E.I., Vollset S.E., Abbasi N., Abd-Allah F., Abdela J., et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019; 18(1): 88–106.
- Ferri C.P., Prince M., Brayne C., et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366: 2112–2117.
- Zeman D. Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru. Olomouc 2018. ISBN 978-80-244-5262-3.
- Fialová L., Bartoš A., Švarcová J., Doležil D., Malbohan I. Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA. *Klin. Biochem. Metab.*, 19 (40), 2011, No. 2, p. 113–118.
- Johnson, G. V., Stoothoff, W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.*, 2004, 117, p. 5721–5729.
- Shahani, N., Brandt, R. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, 59, p. 1668–1670.
- Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2004; 1: 213–25.
- Blennow K., Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 605–613.
- Mattsson N., Zetterberg H., Hansson O., et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009; 302: 385–393.
- Hort J., Bartos A., Pirttila T., Scheltens P. Use of cerebrospinal fluid biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *Eur J Neurol* 2010; 17: 90–96.
- Verwey N.A., van der Flier W.M., Blennow K., et al. A worldwide multicentre comparison of assays for cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 235–240.
- Rohan Z., Matěj R., Rusina R. Překrývání neurodegenerativních demencí. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(6): 641–648.
- Kaňovský P. Diferenciální diagnostika neurodegenerativních chorob doprovázených demencí. *Interní medicína – mezioborové přehledy* 2003/4.
- Návod k použití: Elecsys Total-Tau CSF, Ref. 07356994 190, Roche Diagnostics.
- Návod k použití: Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF, Ref. 07357036 190, Roche Diagnostics.
- Návod k použití: Elecsys β-Amyloid (1-42) CSF, Ref. 06986811 190, Roche Diagnostics.
- Návod k použití: Total tau determination in CSF, Ref. EQ 6531-9601-L, Euroimmun.
- Návod k použití: Beta-amyloid (1-42) determination in CSF, Ref. EQ 6521-9601-L, Euroimmun.
- Návod k použití: pTau (181) determination in CSF, Ref. EQ 6591 9601 L, Euroimmun.
- Bartoš A., Smětáková M., Říčný J., Nosková L., Fialová L. Možnosti stanovení likvorového tripletu tau proteinů a β-amyloidu 42 metodami ELISA a orientační normativní vodítka. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82/ 115(5): 533–540.
- Fagan A.M., Shaw L.M., Xiong Ch., Vanderstichele H., Mintun M.A., Trojanowski J.Q., Coart E., Morris J.C., Holtzman D.M. Comparison of analytical platforms for cerebrospinal fluid measures of Aβ1-42, total tau and p-tau181 for identifying Alzheimer's disease amyloid plaque pathology. *Arch Neurol.* 2011 September ; 68(9): 1137–1144.
- Reijn T., Rikkert M., Van Geel W., De Jong D., Verbeek M. Diagnostic accuracy of ELISA and xMAP technology for analysis of amyloid β42 and tau proteins. *Clin Chem.* 2007; 53:859–865.
- Lewczuk P., Kornhuber J., Vanderstichele H., et al. Multiplexed quantification of dementia biomarkers in the CSF of patients with early dementias and MCI: a multicenter study. *Neurobiol Aging.* 2008; 29: 812–818.

RESEARCH ARTICLE

Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels

Pavlaína Kušnierová¹  | David Zeman^{1,2}  | Pavel Hradílek² | Martin Čábal² | Olga Zapletalová²

¹Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Diagnostics, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

²Clinic of Neurology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Correspondence

Pavlaína Kušnierová, Department of Clinical Biochemistry, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, tr. 17. listopadu 1790, 708 52, Ostrava, Czech Republic.

Email: pavlina.kusnierova@fno.cz

Funding information

The study was supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNOs/2017)

Abstract

Background: Neurofilaments are the major cytoskeletal components of neurons, and cell injury leads to their release into the surrounding area. The aim of this study was to compare the cerebrospinal fluid (CSF) and serum (S) concentrations of neurofilament light chains (NFLs) and phosphorylated neurofilament heavy chains (pNFHs).

Methods: Neurofilament concentrations were measured in CSF and S samples from 172 patients using three enzyme-linked immunosorbent assays. Excel, Stata version 13, MedCal version 17.9.7., and NCSS 2007 software were used for the statistical analysis.

Results: There was a statistically significant correlation between the concentrations of CSF NFL and CSF pNFH ($r_s = 0.748$; $n = 89$; $P < 0.001$), but Passing-Bablok regression showed systematic deviation between the values obtained using the two assays. This indicates that the assays were not interchangeable. CSF pNFH and S pNFH concentrations showed low correlation. The kappa statistic showed moderate conformity between CSF pNFH and CSF NFL concentrations ($\kappa = 0.556$).

Conclusions: The CSF NFL and CSF pNFH assays gave clinically consistent results that reflected the degree of axonal damage, independent of any particular neurological diagnosis. The S pNFH assays had a lower predictive value due to the low correlation coefficient and the kappa index of the CSF pNFH method.

KEYWORDS

axonal damage, cerebrospinal fluid, enzyme-linked immunosorbent assay, neurofilament, neurological disease

1 | INTRODUCTION

Neurofilaments (NFs) are the main structural proteins of neurons and are members of the class IV intermediate filament protein family. NFs are selectively expressed in the nervous system and are found at the highest levels in long projection axons. They are composed of four subunits, namely NF light (NFL), NF medium (NFM), and NF

heavy (NFH) chain subunits plus an unstable alpha-internexin subunit. These subunits have different molecular weights and functional properties. The NFL gene is on chromosome 8p21, and the NFL protein, which has a molecular mass of 61.5 kDa, consists of 543 amino acids. The NFM gene is also on chromosome 8p21; it consists of 916 amino acids and is important for radial axonal growth. The NFH gene is on chromosome 22q12.2, and the protein, which has a molecular

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* Published by Wiley Periodicals, Inc.

mass of 112.5 kDa, consists of 1020 amino acids. NFH is important for protein-protein interactions, which are regulated locally in the axon by phosphorylation.^{1,2} The alpha-interneixin protein has a molecular mass of 66 kDa and can form homopolymers; however, due to its instability, this subunit is difficult to detect in laboratory practice. Its gene is on chromosome 10q24.33.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) or more sensitive techniques, such as electrochemiluminescence immunoassays and single molecule arrays (SIMOAs), can be used to determine NF levels.³ After axonal injury, NFs are released into the extracellular space. Accordingly, their concentration in CSF and/or S reflects the degree of axonal damage.⁴ The levels of both NFL and NFH are increased in multiple sclerosis (MS), reflecting both neuroaxonal damage in active plaques, which is mediated by the inflammation, and neurodegeneration.⁵ In patients with clinically isolated syndrome (CIS), the NFL levels correlate with radiological signs of disease activity (gadolinium-enhancing magnetic resonance lesions) and predict conversion to clinically definite MS with a worse prognosis.⁶⁻⁸ During MS progression, NFH levels correlate with physical disability and changes in brain volume but not with lesion number or volume. The NFH concentration may indicate ongoing neurodegeneration.^{5,7,9}

Natalizumab-treated patients show a 3-fold decrease in NFL, indicating that this treatment not only has an immunomodulatory effect but may also reduce axonal damage.¹⁰ These effects are also observed in patients with MS who were treated with rituximab, mitoxantrone, or fingolimod.^{11,12} However, studies have not demonstrated conclusively that the decline in axonal involvement is not secondary, and anti-NF antibody levels do not correlate with the clinical variants of MS.^{13,14}

The aims of the study were to compare the cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of NFL and pNFH and the CSF and S concentrations of pNFH and to evaluate the correlation of these parameters with the following diagnoses: MS; CIS; inflammatory diseases of the peripheral nervous system (IDPNS); and other inflammatory central nervous system diseases (OIND), noninflammatory neurological diseases (NIND), and no evidence of organic nervous system disease (the control group, Control).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

We examined a total of 172 patients from the Moravian-Silesian region of the Czech Republic who had CSF and S samples sent for analysis to the Institute of Laboratory Diagnostics, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Ostrava. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Ostrava, Czech Republic, and was conducted in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2000. The average age of the entire group of subjects was 47.0 ± 16.44 years. The group consisted of 113 women (65.7%) with an average age of 46.4 ± 16.30 years and 59 men (34.3%) with an average age of 48.2 ± 16.64 years. The files of

patients from the University Hospital Ostrava with available clinical data ($n = 101$) were further subdivided into diagnosis groups: MS ($n = 19$; 14 women, average age 38 ± 9.36 years; 5 men, average age 31 ± 7.30 years), CIS ($n = 11$; 9 women, average age 34 ± 11.12 years; 2 men, average age 31 ± 3.50 years), OIND ($n = 10$; 4 women, average age 39 ± 11.88 years; 6 men, average age 63 ± 6.10 years), IDPNS ($n = 5$; 5 men, average age 51 ± 13.06 years), NIND ($n = 38$; 25 women, average age 54 ± 15.87 years; 13 men, average age 58 ± 10.58 years), and Control ($n = 33$; 24 women, average age 43 ± 16.04 years; 9 men, average age 43 ± 16.84 years). For diagnosis of multiple sclerosis, we used the 2017 Revisions of the McDonald Criteria.¹⁵ The diagnoses in the OIND group comprised neuromyelitis optica ($n = 3$), encephalitis ($n = 1$), granulomatosis with polyangiitis ($n = 2$), aseptic meningitis ($n = 1$), neuroborreliosis ($n = 3$). The NIND group included a very wide and heterogeneous spectrum of diagnoses; more frequent were neurodegenerative diseases ($n = 14$), non-inflammatory polyneuropathy ($n = 8$), and vascular CNS disease ($n = 5$), further CNS tumors ($n = 2$), vertigo ($n = 3$), tinnitus ($n = 1$), radiculopathy ($n = 2$), anisocoria ($n = 1$), spinal stenosis ($n = 1$), spondylogenic cervical myelopathy ($n = 1$). All subjects provided written informed consent for the use of their biological material (CSF and S) for research purposes. Apart from sex and age, all patient data were anonymous.

2.2 | Samples

Neurofilament light, pNFH, and albumin concentrations were determined in CSF samples that were collected into a polypropylene tube (Sarstedt) and in S samples that were collected into a Serum Gel with Clotting Activator tube (Sarstedt). S and CSF samples were drawn on the same day. The CSF samples were centrifuged at $390 \times g$ for 10 minutes at room temperature, and the S samples were centrifuged at $2500 \times g$ for 6 minutes at 4°C . Both the CSF and S samples were aliquoted into at least three vials (0.3 mL per vial) and stored at -70°C until the analysis.

2.3 | Analytical methods

The concentrations of NFL (NF-light® [Neurofilament light] ELISA, REF 10-7001, IVD CE, UmanDiagnostics AB) and pNFH (Neurofilament [pNf-H] ELISA, REF EQ6561-9601, IVD CE, Euroimmun AG; Neurofilament (pNf-H)-high sensitive ELISA, REF EQ6562-9601, For Research Use Only, Euroimmun AG) were determined by ELISA. A patient sample was used for precise and reproducible measurement of NFL, as the diagnostic kit did not include a quality control sample; for measuring pNFH, the manufacturer of the diagnostic kit supplied two quality control samples. The kit manufacturers stated that the analytical sensitivity for NFL was $32 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $27 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for pNFH and $6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for pNFH sensitive (pNFHs). All samples were measured in duplicate, and the mean intra-assay coefficients of variation for CSF NFL, CSF pNFH, and S pNFH were 1.9%, 3.3%, and 4.2%, respectively.

TABLE 1 Assessment of the precision and accuracy of assay methods that used either patient cerebrospinal fluid as a control for NFL or commercial controls for pNFH

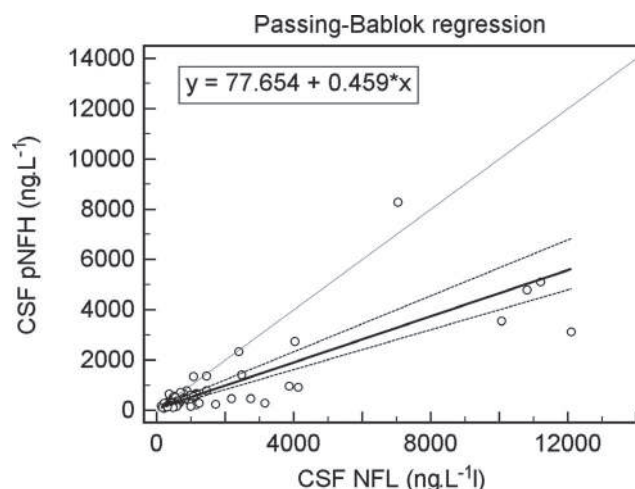
Methods	Mean	SD	CV (%) (95% CI)	CV _d ^a (%)	Bias (%)
NFL (ng·L ⁻¹)	305.3	19.25	6.31 (4.26-9.32)	<9.0	—
pNFH-level 1 (ng·L ⁻¹)	273.9	23.03	8.41 (5.91-12.16)	6.6	-8.69
pNFH-level 2 (ng·L ⁻¹)	1051.1	70.03	6.66 (5.36-8.31)	4.4	16.79

^aThe declared value from the manufacturer.**TABLE 2** Descriptive characteristics of the studied group

Variables	N	Median	Mean	SD	Min	Max
Age	172	46.0	47.0	16.5	12.0	85
CSF NFL (ng·L ⁻¹)	107	553.0	1604.8	3397.0	133.0	27 149
CSF pNFH (ng·L ⁻¹)	148	286.8	1099.1	3127.4	80.5	23 100
S pNFH (ng·L ⁻¹)	79	47.2	115.9	343.7	18.2	2916.6
S pNFHs (ng·L ⁻¹)	69	29.0	124.7	382.3	0.937	2705.4

FIGURE 1 Passing-Bablok regression analysis of CSF NFL and CSF pNFH concentrations. r_s = Spearman correlation coefficient

Regression	Intercept (95% CI)	Slope (95% CI)
CSF NFL vs. CSF pNFH	77.654 (26.769 to 113.591)	0.459 (0.397 to 0.557)



2.4 | Statistical methods

Excel, Stata version 13, MedCal version 17.9.7., and NCSS 2007 were used for the statistical analyses.^{16,17} Basic descriptive statistics were used to describe the data, including frequency tables, medians, arithmetic means, standard deviations, and percentiles. The normality of the CSF NFL, CSF pNFH, and S pNFH parameters was verified with the Shapiro-Wilk test of normality. The normality hypothesis was rejected; therefore, nonparametric tests were used, including the Kruskal-Wallis rank test and the two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test. The relationship between the parameters was evaluated by Spearman's correlation coefficient. Data values were categorized as positive and negative. Fisher's exact test was used to test categorized data. Conformity between assay results was evaluated by the kappa index with 95% confidence intervals. Statistical tests were evaluated using a 5% significance level.

2.5 | Ethics approval

Informed consent was obtained from all patients at the University Hospital Ostrava who were included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Ostrava as a part of the project "CSF biomarkers of multiple sclerosis" (reference number 400/2017).

3 | RESULTS

First, we partially verified diagnostic kits for NFL and pNFH determination. When we evaluated whether the measurements were precise and reproducible, both diagnostic kits showed variation coefficients that were comparable to the values supplied by the manufacturer (Table 1).

A total of 172 patient samples were included in the analysis that evaluated the correlation between NF levels and clinical diagnoses. The analytical characteristics of the studied group are presented in Table 2.

There was a statistically significant correlation between CSF NFL and CSF pNFH concentrations ($r_s = 0.748$; $n = 89$; $P < 0.001$). The regression relationship between these parameters was evaluated using Passing-Bablok regression (Figure 1). At the same time, Passing-Bablok regression demonstrated a statistically significant bias between the CSF NFL concentration and the CSF pNFH concentration. For a concentration of $300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, bias represents 28.11%; for a concentration of $5000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, bias is more than 50% (namely, 52.45%). This indicated that at high CSF NFL concentrations, the CSF pNFH concentration was approximately half of the CSF NFL value.

NF concentrations according to the diagnosis groups are presented in Figure 2. We evaluated the correlation between the NF concentrations and the different diagnoses. There was a statistically significant relationship between CSF NFL and CSF pNFH in the NIND ($r_s = 0.793$; $P < 0.001$) and control ($r_s = 0.811$; $P < 0.001$)

diagnosis groups, and between CSF pNFH and S pNFH in the IDPNS ($r_s = 0.900$; $P = 0.037$) and NIND diagnosis groups ($r_s = 0.459$; $P = 0.018$) and between CSF pNFH and S pNFHs in the NIND diagnosis groups ($r_s = 0.435$; $P = 0.030$) (Table 3).

The correlation coefficient between the CSF pNFH and S pNFH values and between the CSF pNFH and S pNFHs was moderate ($r_s = 0.579$ resp. 0.439), probably due to the differences in the biological material that was analyzed (CSF or S; Figure 3).

The kappa statistic was used to compare the assays based on clinical interpretation because the methods had different reference intervals (Table 4). The highest kappa coefficient, that is, moderate conformity between the diagnostic kits, was demonstrated between the concentrations of CSF pNFH and NFL ($\kappa = 0.556$). The positive value for the concentration of CSF NFL was set at $>900 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ based on the study of Arrambide et al.¹⁵ That is, values $>900 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ can be considered to be significantly elevated and indicative of axonal damage. For CSF pNFH, the positive value was $>610 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (95th percentile of negative samples; (Table 4)).¹⁸

The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to evaluate the relationship of individual analytes on diagnosis. A statistically significant

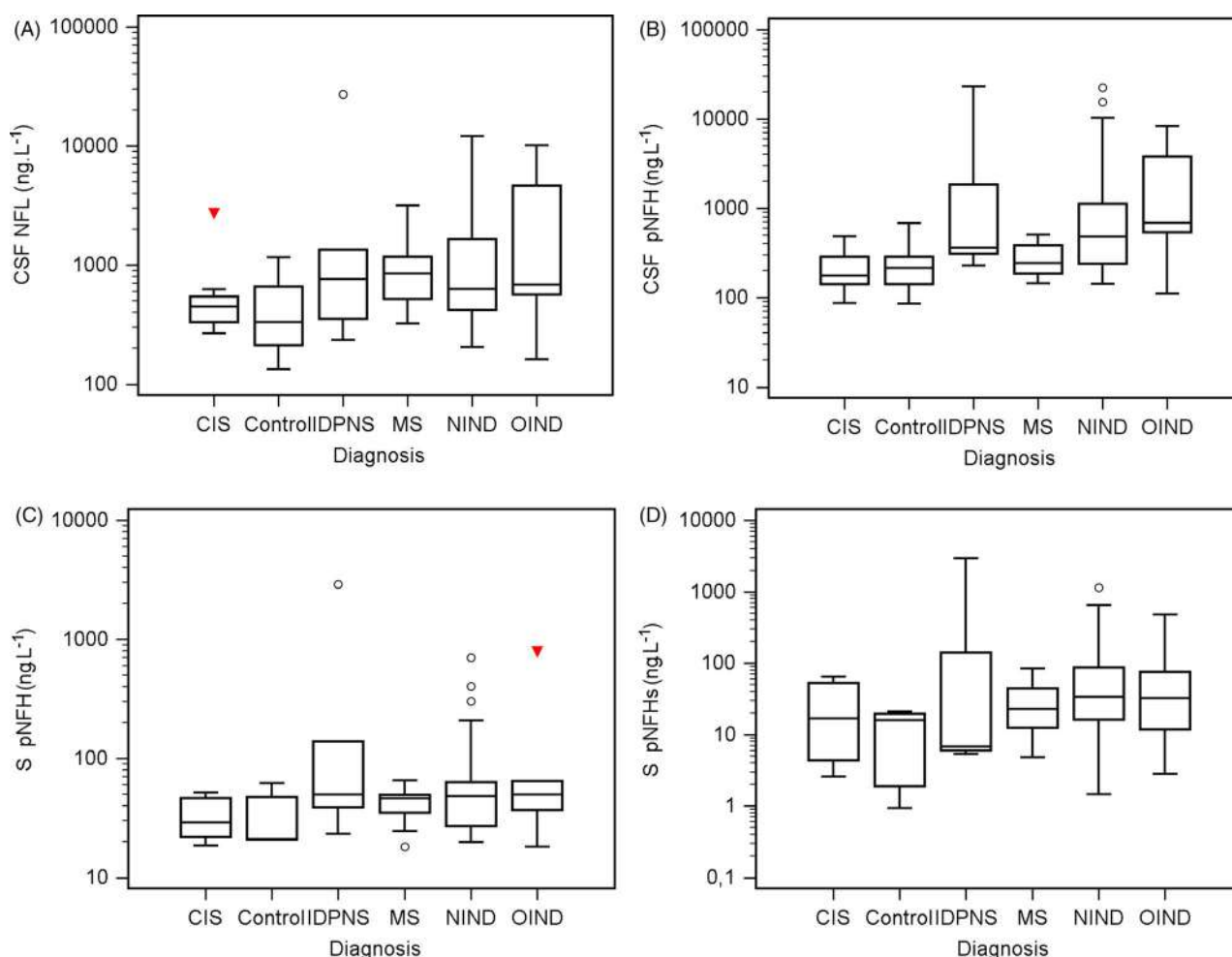
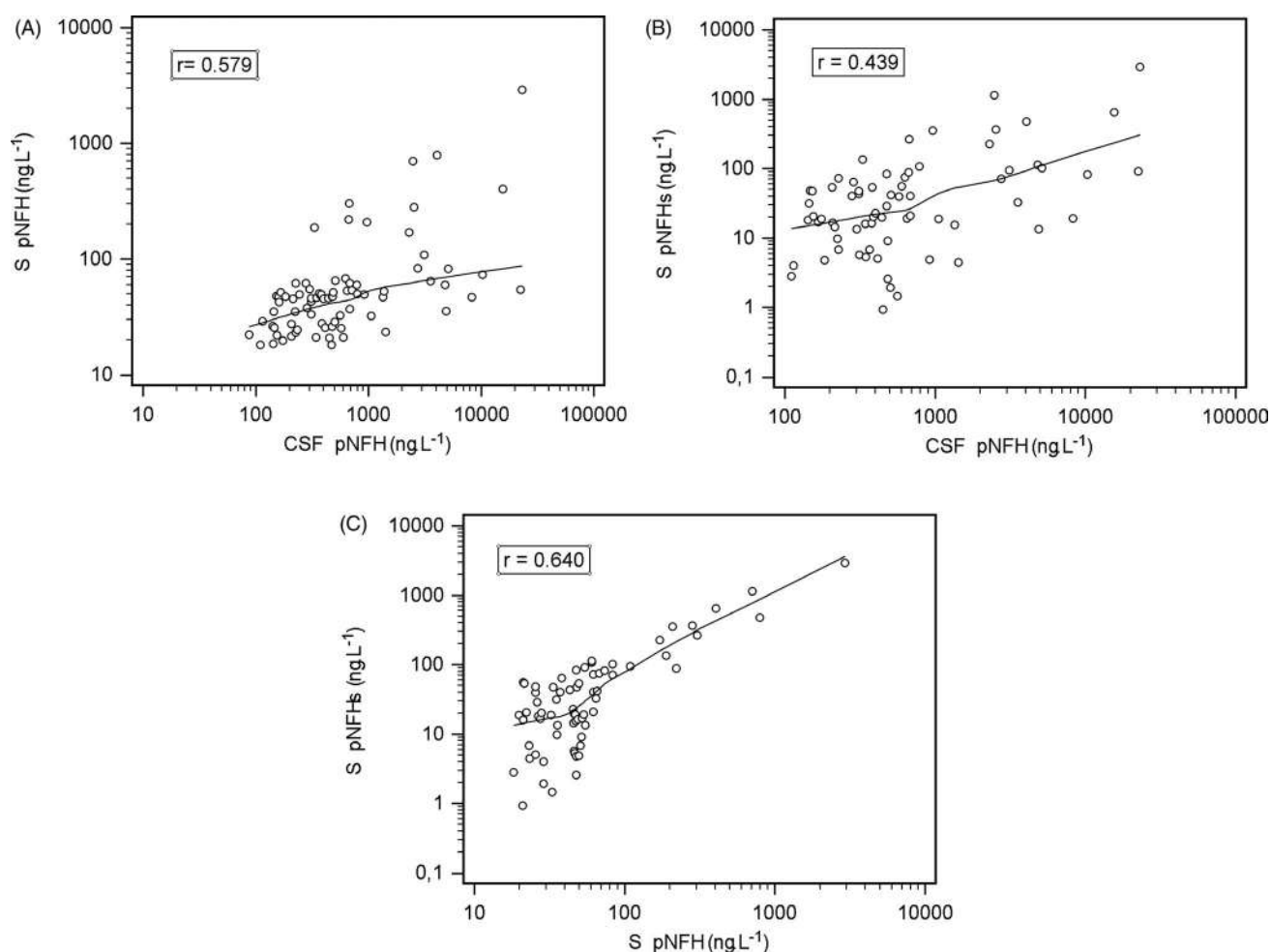


FIGURE 2 Concentrations of individual parameters according to the diagnosis. A, CSF NFL vs diagnosis; B, CSF pNFH vs diagnosis; C, S pNFH vs diagnosis; D, S pNFHs vs diagnosis

TABLE 3 Correlations between NF concentrations and the indicated diagnoses

Parameters		Diagnosis						
		MS	CIS	IDPNS	NIND	OIND	Control	All
CSF NFL vs CSF pNFH	r_s	0.396	0.650	0.400	0.793	0.943	0.811	0.748
	P	0.144	0.058	0.600	<0.001	0.005	<0.001	<0.001
	n	15	9	4	24	6	15	89
CSF pNFH vs S pNFH	r_s	0.368	0.624	0.900	0.459	0.657	0.464	0.579
	P	0.177	0.054	0.037	0.018	0.156	0.294	<0.001
	n	15	10	5	26	6	7	79
CSF pNFH vs S pNFHs	r_s	0.515	-0.214	0.800	0.435	0.300	0.286	0.439
	P	0.128	0.610	0.200	0.030	0.624	0.535	<0.001
	n	10	8	4	25	5	7	69

Abbreviation: r_s , Spearman's correlation coefficient.

**FIGURE 3** Correlation analysis of CSF pNFH and serum pNFH, CSF pNFH and S pNFHs, and S pNFH and S pNFHs

difference was found for CSF pNFH in the group that included all diagnoses (Table 5). Post hoc analysis was performed by Dunn test (Table 6).

We also investigated the correlations of NF concentrations with clinical data. The CSF NFL concentration in the MS and CIS diagnosis groups was significantly higher in the subgroup

of patients who had a expanded Kurtzke Disability Status Scale (EDSS) score of 2.5 or higher (median 1208.5 ng·L⁻¹ 6 months after lumbar puncture versus the subgroup of patients with EDSS scores of 0 to 2 (median 488 ng·L⁻¹; $P = 0.0269$; Table 7). CSF NFL thus appears to be a promising parameter for predicting disability severity.

TABLE 4 Assay conformity based on the kappa statistic

	CSF pNFH ^a vs CSF NFL	CSF pNFH ^b vs CSF NFL	CSF pNFH ^a vs S pNFH ^a	CSF pNFH ^b vs S pNFH ^b	CSF pNFH ^a vs S pNFHs ^a	CSF pNFH ^b vs S pNFHs ^b
Kappa statistics	0.380	0.556	0.337	0.306	0.431	0.272
Conformity (%)	(80)	(83)	(84)	(71)	(69)	(69)
95% CI	0.152-0.608	0.360-0.752	0.067-0.607	0.124-0.488	0.153-0.709	0.088-0.456
Standard error	0.0938	0.1043	0.0938	0.0871	0.1418	0.0940

Note: Positive values were as follows: CSF NFL > 900 ng·L⁻¹¹⁵; CSF pNFH > 1520^a (respectively, 610^b) ng·L⁻¹; S pNFH > 290¹ (resp., 130^b), ng·L⁻¹¹⁶.

^a95th percentile for disease controls and healthy.

^b95th percentile for negative samples.

	CSF NFL (P-value)	CSF pNFH (P-value)	S pNFH (P-value)	S pNFH _{sen.} (P-value)
All diagnoses ^a	0.157	<0.001	0.138	0.260

^aKruskal-Wallis rank test.

TABLE 5 One-way analysis of variance of individual analytes and all diagnoses**TABLE 6** Mutual comparison of individual diagnoses (Dunn test)

Diagnosis groups (n)	Average rank	Different (<i>P</i> < 0.05) from subgroups
(1) CIS (20)	41.40	(5)
(2) Control (24)	49.64	(4) (5)
(3) IDPNS (5)	101.00	
(4) NIND (37)	82.93	(2)
(5) OIND (10)	112.88	(1) (2)
(6) MS (14)	63.53	

4 | DISCUSSION

This study investigated NF concentrations in S and in CSF as a marker of axonal damage. We used two CE ELISA diagnostic kits, one to determine the concentrations of NFL in CSF (NFL-light ELISA, UmanDiagnostics) and one to determine the concentrations of pNFH in S and CSF (Neurofilament (pNf-H) ELISA, Euroimmun). The other ELISA diagnostic kits for S pNFHs determination (Neurofilament (pNf-H)-high sensitive ELISA, Euroimmun) are for research use only. All three assays were suitable for precise measurement of NFs. There was a statistically significant correlation between CSF NFL levels and CSF pNFH levels. However, the CSF pNFH assay showed much lower values than the values for CSF NFL. The reason for this difference may be the relative molar ratio of the individual NF subunits, which is approximately 5:2:1 for NFL:NFM:NFH.¹⁹ Another possibility is that NFL, which has a lower molecular mass, diffuses into CSF more easily than the heavier pNFH or with regard to the NF stoichiometry as motor neurons have the ability to save energy to shift the protein expression from larger to smaller subunits.²⁰

We demonstrated that the CSF NFL concentrations correlated well with the CSF pNFH concentrations, especially in the Control and in patients with NIND. We found no correlation for the other

TABLE 7 Correlation of the CSF NFL concentration with clinical data (MS and CS group, patients with available follow-up data, Mann-Whitney test)

CSF NFL median (IQR)		
Relapse at the time of lumbar puncture		
No	883 (533-1471)	n = 18/8
Yes	607 (439.5-992.5)	ns <i>P</i> = 0.2013
Relapse within 6 mo after lumbar puncture		
No	1083 (488-1471)	n = 14/3
Yes	446 (N/A)	<i>P</i> = 0.1015
Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) 6 mo after lumbar puncture		
0-2.0	488 (438.5-1039)	n = 9/8
≥2.5	1208.5 (862-1597.5)	<i>P</i> = 0.0269

diagnosis groups, possibly due to the small number of patients, especially in the IDPNS group. The correlation between the S and CSF concentrations of pNFH was lower. The SIMOA method is a suitable alternative for testing these analytes in CSF and S. Kuhle et al^{11,21,22} showed that SIMOA had higher sensitivity than ELISA and the electrochemiluminescence-based assay. They further reported a statistically significant correlation between CSF NFL and S NFL concentrations. In the future, despite the high cost of the SIMOA method, it would be appropriate to examine a larger dataset to determine whether S NFL determination could replace CSF NFL determination for assessing the severity and prognosis of neurological diseases.

When we evaluated the correlations of these methods with the different diagnoses, the assays showed the best correlations with each other in the IDPNS and NIND groups of patients. Similar results were obtained by De Schaepdryver et al,²³ who determined the S and CSF NF concentrations using two diagnostic kits from Euroimmun and BioVendor. Both kits were ELISA-based. The authors

compared the assays in a group of patients with amyotrophic lateral sclerosis and showed a good correlation between CSF NFH and S NFH ($r = 0.652$).

When we evaluated these assays according to clinical findings, there was moderate conformity between the CSF NFL and pNFH concentrations, but only fair conformity between the CSF pNFH and the S pNFH concentrations. One possible explanation is that NFs are heteropolymers that form aggregates. Thus, precise determination of NFH concentrations by immuno-based methods can be influenced by several factors: the ability of the aggregate to mask the NFH epitope; the aggregate's decreased solubility; the difference in stability of NFH monomers in solution versus NFH in aggregates; and the ability of the antibody to bind to soluble NFH.²⁴ Lu et al²⁴ confirmed that NF aggregates are characteristic of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases and that they represent a significant pre-analytical problem for immunoassay analysis. They developed an ELISA method in which, after 1-hour incubation of the sample with a buffer containing a "urea-calcium chelator," aggregate disruption resulted in a precise quantification of the NFH concentration.

We performed one-way analysis of variance of the individual analytes for all diagnoses and for paired comparisons of patients with MS and CIS versus the control group. A statistically significant difference was found only for the concentration of CSF pNFH in the group that included all diagnoses. This finding was not a surprise, because a number of studies have shown that NFs are markers of axonal damage rather than markers of a specific diagnosis. Increased levels of NF have been observed, for example, in ALS,²³ CIS/MS,^{4-10,12-15} neurological diseases related to aquaporin-4- (AQP4-Ab-) and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies (MOG-Ab), and other neurological diseases.²⁵

We studied the correlation of CSF NFL with clinical data as well. The CSF NFL concentration in the MS and CIS diagnosis groups was significantly higher in the subgroup of patients who had EDSS scores of 2.5 or higher 6 months after sampling versus the subgroup of patients with EDSS scores of 0 to 2. These data showed the suitability of using CSF NFL to predict disease severity. Similar results were obtained in the study by Disanto et al,²⁶ which examined the relationship between NFL concentration and other markers of disease activity, such as the number of T2 hyperintense and gadolinium-enhancing (Gd+) lesions on cranial MRI and the presence of IgG oligoclonal bands in the CSF of patients with CIS. That group found higher S NFL concentrations in patients with T2 and Gd+ lesions, and the NFL concentrations increased with increasing EDSS scores at CIS time. These results are in line with other studies showing that NF levels in CSF are correlated with both MRI and clinical markers of MS disease activity.²⁷

5 | CONCLUSION

In this study, we tested three diagnostic kits for the determination of NF concentrations in biological fluids. The NFL ELISA assay had lower sensitivity and was suitable only for CSF analysis, while the

pNFH ELISA assay had satisfactory sensitivity and was suitable for S and CSF analysis, the pNFHs only for S analysis. The data showed good correlation and moderate conformity between CSF NFL and CSF pNFH concentrations, indicating that the results can be considered to be consistent. However, the low correlation coefficient and the kappa index found between the S pNFH, even if using a high-sensitivity ELISA assay and CSF pNFH meant that the S pNFH and S pNFHs assays gave a lower predictive value. When assessing the relationship of NF concentrations and diagnosis, correlations were found between the concentration of CSF NFL and CSF pNFH in the NIND diagnosis group and in the control group of patients, between the CSF and S pNFH in the IDPNS and NIND diagnosis groups, and between the CSF and S pNFHs in the NIND diagnosis groups. The results confirmed that NFs, whether NFLs or pNFHs, represent an etiologically nonspecific indicator of tissue damage and that it is better to determine their levels in CSF than in S.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the laboratory technicians L. Fürstová, I. Faruzelová, R. Malečková, R. Výtisková, and B. Strakošová for their expert technical assistance. We thank Ing. H. Tomášková, Ph.D. and Ing. F. Všianský for help with the statistical analysis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

ORCID

Pavla Kušnierová  <https://orcid.org/0000-0001-8835-2155>

David Zeman  <https://orcid.org/0000-0001-6822-2572>

REFERENCES

- Grant P, Pant HC. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* 2000;29:843-872.
- Slawson C, Hart GW. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(5):631-636.
- Kuhle J, Barro C, Disanto G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler.* 2016;22(12):1550-1559.
- Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci.* 2005;233(1-2): 183-198.
- Kuhle J, Leppert D, Petzold A, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology.* 2011;76(14):1206-1213.
- Salzer J, Svenningsson A, Sundstrom P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(3):287-292.
- Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler.* 2013;19(4):436-442.

8. Martinez MA, Olsson B, Bau L, et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015;21(5):550-561.
9. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(5):552-556.
10. Gunnarsson M, Malmestrom C, Axelsson M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol*. 2011;69(1):83-89.
11. Axelsson M, Malmestrom C, Gunnarsson M, et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(1):43-50.
12. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J, et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;84(16):1639-1643.
13. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukal J, Malbohan I, Pitha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2007;116(2):100-107.
14. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukal J, Malbohan I, Pitha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2007;254(1):20-25.
15. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
16. Neurofilament (pNf-H) ELISA, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG (Germany). Version: 20/07/2017.
17. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*. 2012;22(3):276-282.
18. Arrambide G, Espejo C, Eixarch H, et al. Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. *Neurology*. 2016;87(11):1076-1084.
19. Stata Version 13. Stata Press Publication, Texas, 2013. ISBN-13:978-1-59718-129-7.
20. Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:187-217.
21. Zucchi E, Lu CH, Cho Y, et al. A motor neuron strategy to save time and energy in neurodegeneration: adaptive protein stoichiometry. *J Neurochem*. 2018;146(5):631-641.
22. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence assay and Simoa. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(10):1655-1661.
23. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(4):367-373.
24. Lu CH, Kalmar B, Malaspina A, Greensmith L, Petzold A. A method to solubilise protein aggregates for immunoassay quantification which overcomes the neurofilament "hook" effect. *J Neurosci Methods*. 2011;195:143-150.
25. Mariotto S, Farinazzo A, Monaco S, et al. Neurofilament light chain in NMOSD and related disorders: comparison according to aquaporin-4 and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies status. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2017;3(4):2055217317743098.
26. Disanto G, Adiutori R, Dobson R, et al. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(2):126-129.
27. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, et al. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;25(5):678-686.

How to cite this article: Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. *J Clin Lab Anal*. 2019;00:e22948. <https://doi.org/10.1002/jcla.22948>