

Efficacia diagnostica di un metodo di isoelettrofocalizzazione delle IgG liquorali in pazienti con sospetto di sclerosi multipla

Italia Schiavano¹, Giuseppa Nichil¹, Cosimo Mega¹, Giorgio Trianni², Aniello Carbone¹, Sergio L. Pasca²

¹Unità Operativa Complessa di Patologia Clinica e ²Unità Operativa Complessa di Neurologia, Presidio Ospedaliero "F. Ferrari", Casarano (LE)

Caro Editore,

la sclerosi multipla (SM) è una patologia autoimmune del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata da infiammazione cronica, demielinizzazione e gliosi. Rappresenta il più comune processo infiammatorio demielinizzante del SNC e si presenta con aree multifocali di demielinizzazione con conservazione relativa degli assoni, perdita di oligodendrociti e cicatrizzazione astrogliale. La lesione acuta della SM, invece, è caratterizzata da un manicotto periventricolare, da infiltrazione tessutale di cellule mononucleari, soprattutto linfociti T e macrofagi, e da demielinizzazione. Tutti questi elementi morfologici sono espressione dell'origine immunomediata della malattia (1). Per porre diagnosi di SM è necessario combinare criteri clinici e strumentali, questi ultimi riferiti alle più avanzate tecniche di diagnostica per immagini come la risonanza magnetica nucleare (RMN) con gadolinio, alle indagini elettrofisiologiche e alle analisi di laboratorio delle proteine liquorali. Il ruolo della diagnostica di laboratorio è molto importante per la diagnosi di SM, perché apporta al quadro clinico specifiche informazioni di natura fisiopatologica, relative allo stato infiammatorio e di attivazione immunologica presenti a livello del SNC, di cui il liquor rappresenta una diretta emanazione. Le anomalie liquorali comprendono una pleiocitosi cellulare mononucleare, peraltro poco specifica di SM, e soprattutto un aumento delle concentrazioni di IgG e la presenza di bande oligoclonali di IgG di sintesi intratecale. Nell'80% circa dei pazienti la concentrazione di IgG nel liquor è aumentata in presenza di una concentrazione totale di proteine ancora fisiologica, come conseguenza della sintesi intratecale di IgG da parte dei B-linfociti del SNC in stato di attivazione. Occasionalmente qualche paziente con SM mostra un lieve aumento del contenuto totale di proteine liquorali. La determinazione dell'albumina nel siero e nel liquor è l'indice più accurato del grado di permeabilità della barriera emato-liquorale (danno di barriera) e deve sostituire il semplice dosaggio delle proteine totali liquorali (2). Il danno di barriera è esprimibile sia come rapporto tra albumina nel siero e albumina nel liquor (limite decisionale >130) o come quoziente albuminico [(albumina liquor/albumina siero) x 10³ (limite decisionale <7,0) oppure x 10² (limite decisionale <0,7)] (3). Numerose formule sono state proposte per quantificare l'aumento selettivo di IgG e per distinguere le IgG di sintesi intratecale, espressione di attivazione immunitaria del SNC, dalle IgG di origine plasmatica che raggiungono il SNC attraversando la barriera emato-encefalica danneggiata. L'espressione quantitativa della sintesi intratecale di IgG si ottiene utilizzando sia funzioni non-lineari, come le formule di Reiber (4-6), che correggono il dato anche in presenza di danno di barriera moderato o grave, che formule più semplici come il ben noto indice di Link (3). Tuttavia la tecnica di riferimento per dimostrare la sintesi intratecale di IgG è la ricerca nel liquor delle bande oligoclonali di IgG, evidenziate mediante separazione con tecniche elettroforetiche ad alta risoluzione come l'isoelettrofocalizzazione (IEF) su gel di agarosio e successiva caratterizzazione immunologica delle IgG dopo trasferimento su un supporto di nitrato di cellulosa (immunoblotting) o di altra composizione chimica (7-9). I criteri di interpretazione dell'IEF sono chiaramente definiti e contemplano la presenza di due o più bande di IgG esclusivamente liquorali, cioè assenti nel siero dello stesso paziente, quale criterio di sintesi intratecale di IgG (10). Il riscontro di sintesi intratecale di immunoglobuline è un importante criterio di diagnosi nella SM ed in tal senso l'indagine qualitativa tramite IEF offre una sensibilità molto maggiore dell'approccio quantitativo in quanto confronta il liquor del paziente contro il suo stesso siero anziché contro un dato di riferimento come inevitabilmente avviene per le concentrazioni e gli indici proteici misurabili.

Nel presente lavoro riportiamo la nostra esperienza ottenuta con un metodo di IEF per la ricerca delle bande oligoclonali di IgG liquorali. Sono stati studiati 95 soggetti, 41 maschi e 54 femmine, ricoverati negli anni 2003-2005 presso la Divisione di Neurologia dell'Ospedale di Casarano con il sospetto di una patologia infiammatoria del SNC. I pazienti sono stati valutati clinicamente e, alla fine del percorso diagnostico, classificati come SM o non SM sulla base dei criteri clinici e neuroradiologici secondo McDonald (11), senza considerare il dato liquorale. L'indagine liquorale è stata condotta con il kit IgG-IEF (Alfawassermann) per l'identificazione delle bande oligoclonali IgG nel siero e nel liquor. Il metodo permette di separare, utilizzando una quantità minima di campione (5 µL), le proteine sieriche e liquorali in funzione del loro punto isoelettrico mediante IEF su gel di agarosio con gradiente di pH 3-10, utilizzando l'apparecchiatura per elettroforesi SAS-3 (Alfawassermann). L'ampio intervallo di pH delle anfoline permette di focalizzare tutte le IgG eventualmente sintetizzate. Dopo la separazione mediante IEF, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrato di cellulosa e quindi immunofissate con anticorpi specifici anti-IgG (12). I traccianti vengono

interpretati qualitativamente comparando la presenza delle bande oligoclonali nel siero e nel liquor dello stesso paziente secondo i criteri già citati che considerano un liquor positivo per sintesi intratecale di IgG quando presenti almeno due bande non reperibili nel siero (10).

Esempi di tracciati ottenuti con il metodo utilizzato sono mostrati nella Figura 1. Dei 95 campioni di liquor testati, 27 (24 di pazienti con SM e 3 di pazienti non SM) sono risultati positivi per sintesi intratecale di IgG e 68 negativi. Di questi, 13 erano di pazienti affetti da SM e 55 di pazienti non affetti da SM. Ciò corrispondeva ad una sensibilità pari a 0,65 con una specificità di 0,95 e un valore predittivo positivo di 0,89 e negativo di 0,81. Un'analisi del sottogruppo dei pazienti con SM non ha mostrato significative differenze nella positività del liquor in rapporto al sesso.

Nella pratica clinica di una divisione neurologica, il caso clinico di sospetta SM di più frequente rilievo è quello di un paziente con lesioni di tipo demielinizzante alla RMN la cui storia clinica è ancora troppo breve per porre diagnosi di SM secondo i criteri clinici classici. In questa condizione il neurologo è chiamato comunque a rispondere alla cruciale domanda se si è realmente di fronte a un malato di SM oppure no. Secondo Mc Donald et al. (11), una risposta al quesito può venire dall'osservazione, clinica e neuroradiologica, dell'evoluzione temporale delle lesioni cerebrali. Questo approccio comporta necessariamente l'attesa di una nuova fase infiammatoria di cui non è prevedibile l'impatto in termini clinici. Ecco quindi la necessità di identificare un profilo di laboratorio che sia predittivo della condizione di malattia, rappresentato dalla presenza all'IEF di bande oligoclonali esclusivamente liquorali (nella nostra casistica con un valore predittivo positivo pari a 89%). Come è noto il valore predittivo è dipendente dalla prevalenza della malattia nella popolazione da cui proviene il campione di soggetti esaminati (nel nostro caso pazienti neurologici con sospetta malattia infiammatoria demielinizzante). Nella nostra casistica, l'elevato valore predittivo positivo della presenza di bande oligoclonali di IgG nel liquor di pazienti con sospetta SM, anche se negativamente influenzato dalla inferiore sensibilità riscontrata rispetto ad altre più ampie casistiche citate in letteratura (13), dimostra l'utilità della ricerca delle bande oligoclonali nell'inquadramento diagnostico di questi pazienti. Un'attenta selezione dei pazienti su cui eseguire la ricerca delle bande oligoclonali rimane tuttavia un elemento fondamentale per garantire all'esame un elevato valore predittivo. Infatti, molti dei pazienti la cui diagnosi conclusiva escludeva la SM sono risultati affetti da patologie diagnosticabili sulla base dei soli dati clinici, neuroradiologici e neurofisiologici, e dell'esame chimico-fisico del liquor, per i quali la ricerca delle bande oligoclonali ha rappresentato un esame richiesto in modo inappropriato.

Figura 1

Esempio di tracciati di IEF per la ricerca di bande oligoclonali di IgG nel liquor ottenuti durante lo studio.

Su ogni striscia, in posizione 1 è stato depositato un lisato emoglobinico per evidenziare la corsa, in posizione 2 un controllo positivo per bande oligoclonali. Di ogni paziente è stato esaminato sia siero (s) che liquor (lcr). I pazienti B e C mostrano un tracciato positivo per bande oligoclonali di IgG esclusivamente liquorali, mentre i campioni A e D mostrano un quadro negativo, senza bande oligoclonali di IgG nel siero e nel liquor.

BIBLIOGRAFIA

1. Goodkin DE, Rudick RA, eds. Treatment of multiple sclerosis: advances in trial design, result and future perspectives. London: Springer-Verlag, 1996.
2. Linee guida sull'esame del liquido cerebro spinale. www.aini.it/files/pdf/50158.pdf
3. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385-90.
4. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-28.
5. Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998;4:99-107.
6. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995;41:256-63.
7. Niederwieser G, Bonelli RM, Brunner D, et al. Diagnostic accuracy of an agarose gel electrophoretic method in multiple sclerosis. *Clin Chem* 2001;47:144.
8. Cavuoti D, Baskin L, Jialal I. Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 1998;109:585-8.
9. Richard S, Miossec V, Moreau J, et al. Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. *Clin Chem* 2002;48:167-73.
10. 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;57:897-902.
11. Mc Donald WI, Compston A, Edan G et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
12. 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.
13. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, et al. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis: isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *Am J Clin Pathol* 2003;120:672-5.